

**Strukturelle Basis signalinduzierter Änderungen in
Phytochrom B sowie der Phytochrom-assoziierten
Proteinphosphatase PAPP5**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

Hochschulkenziffer 1180

vorgelegt von

Silke von Horsten, M.Sc. Chemie

aus Otterndorf

Marburg an der Lahn 2016

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Fachbereich Chemie)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer (Fachbereich Biologie)

Einreichungstermin: _____

Prüfungstermin: _____

Marburg 2016

“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not ‘Eureka!’ but ‘That’s funny ...’.”

Isaac Asimov

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit vom August 2012 bis zum Mai 2016 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Erklärung

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass meine vorgelegte Dissertation

„Strukturelle Basis signalinduzierter Änderungen in Phytochrom B sowie der
Phytochrom-assoziierten Proteinphosphatase PAPP5“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Ort/Datum

Unterschrift

Publikationen

von Horsten, S., Straß, S., Hellwig, N., Gruth, V., Klasen, R., Mielcarek, A., Linne, U., Morgner, N., Essen, L.-O. Mapping the light driven changes of the photosensory core of plant phytochromes. *Sci Rep.* **6**, 34366 (2016).

von Horsten, S., Essen, L.-O. Structural base for fatty acid control of phytochrome-associated protein phosphatase 5. In Vorbereitung.

Weitere Publikationen, deren Arbeiten nicht in diese Dissertation eingeflossen sind:

Helizon, H., Rösler, J., Gasch, P., **von Horsten, S.**, Essen, L.-O., Zeidler, M. Arabidopsis phytochrome A nuclear translocation involves the importin route and is modulated by the cytoplasmic protein phosphatase A2 and far red elongated hypocotyl 1. In Vorbereitung.

Konferenzbeiträge

International Conference on tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms, Wuhan, China (2013) Posterbeitrag: **von Horsten, S.**, Essen, L.-O. *Generation and Charactrsiation of cyanobacterial-plant phytochrome hybrids.*

Molecular Life Sciences (GBM), Frankfurt, Deutschland (2013) Vortrag und Posterbeitrag: **von Horsten, S.**, Essen, L.-O. *Generation and Charactrsiation of cyanobacterial-plant phytochrome hybrids.*

Wissenschaftlicher Werdegang

Silke von Horsten, M.Sc. Chemie

geboren am 13.10.1985 in Otterndorf

seit 08/2012	Anfertigen der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L.-O. Essen
10/2011 bis 06/2012	Anfertigen einer Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L.-O. Essen Titel: <i>Funktionelle Analyse C-terminaler Phytochrom-domänen</i>
10/2009 bis 06/2012	Studium der Chemie (M.Sc.) mit dem Schwerpunkt Biochemie an der Philipps-Universität Marburg
04/2009 bis 07/2009	Anfertigen einer Bachelorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Oberthür Titel: Synthese von Glycosyldonoren zur Generierung von Mannopeptimycin-Analoga
10/2006 bis 10/2009	Studium der Chemie (B.Sc.) an der Philipps-Universität Marburg
06/2005 bis 07/2006	Auslandsaufenthalt in den USA
06/2005	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium Otterndorf

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Phytochrome	4
1.1.1 Phytochrome der Gruppe I – Kanonische Phytochrome	5
1.1.2 Phytochrome der Gruppen II und III – Knotenlose Phytochrome.....	8
1.1.3 Biosynthese des Chromophors	10
1.2 Photokonversion	11
1.3 Pflanzenphytochrome – Biologische Funktionen der Domänen	14
1.4 Signaltransduktion in Phytochromen	16
1.4.1 Nukleosolische Signaltransduktion	18
1.4.2 Zytosolische Signaltransduktion	20
1.5 Phosphatasen als Interaktionspartner	20
1.5.1 Phytochrom-assoziierte Protein Phosphatase 5	24
1.5.2 Phytochrom-assoziierte Protein Phosphatase 2C	26
1.6 Zielsetzung.....	28
2 Material	29
2.1 Geräte.....	29
2.2 Verbrauchsmaterialien	31
2.3 Chemikalien und Enzyme.....	31
2.4 Enzyme	33
2.5 Vektoren und Plasmide.....	33
2.6 Synthetische Gene	36
2.6.1 Das Hybrid-System	39
2.7 Primer	41
2.7.1 Sequenzierungsprimer	42

2.8	Bakterienstämme.....	43
2.8.1	<i>E. coli</i> DH5 α	43
2.8.2	<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3)	43
2.8.3	<i>E. coli</i> BL21 PRO.....	44
2.8.4	<i>E. coli</i> Arctic Express (DE3).....	44
2.8.5	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	44
2.9	Kulturmedien und Puffer	45
2.9.1	Kulturmedien.....	45
2.9.2	Puffer.....	46
3	Methoden.....	47
3.1	Molekularbiologische Methoden	47
3.1.1	Polymerasekettenreaktion	47
3.1.2	Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen	49
3.1.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	49
3.1.4	Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	50
3.1.5	Ligation mittels T4-DNA-Ligase	50
3.1.6	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	51
3.1.7	Plasmidpräparation.....	53
3.2	Nukleinsäureanalytik.....	55
3.2.1	Agarosegelelektrophorese	55
3.2.2	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	55
3.2.3	DNA-Sequenzierung	56
3.3	Proteinchemische Methoden.....	57
3.3.1	Testexpression und analytischer Aufschluss.....	57
3.3.2	Glycerinkulturen.....	58
3.3.3	Präparative Expression	58
3.3.4	Präparativer Aufschluss.....	59

3.3.5	Ni-NTA-Affinitätschromatografie.....	59
3.3.6	Konzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation	61
3.3.7	Pufferwechsel	61
3.3.8	Thrombin-Verdau	61
3.3.9	Gelfiltrationschromatografie	62
3.4	Proteinanalytik.....	64
3.4.1	SDS-PAGE	64
3.4.2	Nachweis des Tetrapyrrol-Kofaktors.....	65
3.4.3	Western-Blot.....	65
3.4.4	Dynamische Lichtstreuung	67
3.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	68
3.4.6	Bradford-Assay.....	68
3.4.7	Bicinchoninsäure (BCA)-Assay	68
3.5	Spektroskopie.....	69
3.5.1	UV/Vis-Spektroskopie	69
3.5.2	Circulardichroismus-Spektroskopie	69
3.5.3	Resonanz-Raman-Spektroskopie.....	71
3.6	Massenspektrometrie.....	73
3.6.1	Peptidmassenfingerprint von Proteinen mittels tryptischem Verdau	73
3.6.2	Massenspektrometrische Analyse intakten Proteine/Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen	74
3.6.3	Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie	74
3.7	Protein-Assays.....	81
3.7.1	Para-Nitrophenol-Assays.....	81
3.7.2	Thermofluor-Assay.....	82
3.7.3	Thermophorese im Submikrobereich	82
3.8	Kristallisation und Strukturlösung.....	87

3.8.1	Kristallisationsscreenings.....	87
3.8.2	Optimierung von Proteinkristallen.....	89
3.8.3	Montieren von Proteinkristallen und Datensammlung.....	90
3.8.4	Datenprozessierung.....	90
3.8.5	Strukturlösung.....	91
3.8.6	Verfeinerung der Strukturmodelle.....	92
4	Ergebnisse.....	95
4.1	Einfluss der N-terminalen Erweiterung und Lokalisierung der lichtgesteuerten Änderungen in <i>AtPhyB</i>	95
4.1.1	Etablierung der Produktion und Reinigung von PhyB.....	96
4.1.2	Spektroskopische Analyse.....	98
4.1.3	Wasserstoff-Deuterium-Austausch.....	101
4.2	PAPP5 – Kontrolle der Aktivität durch Autoinhibition.....	109
4.2.1	Etablierung der Produktion und Reinigung von PAPP5.....	109
4.2.2	Kristallisation und Strukturlösung.....	110
4.2.3	Studien zur Phosphatase-Aktivität von PAPP5.....	120
4.2.4	Mechanistische Studien zum Einfluss von Arachidonsäure.....	124
4.2.5	Studien zur Interaktion von PAPP5 mit Phytochromen.....	130
4.3	Erzeugung von Hybrid-Phytochromen.....	133
4.3.1	Aufbau des Hybrid-Systems.....	134
4.3.2	Das Hybrid-System – Ein einfacher Weg um Interaktionspartner zu untersuchen.....	138
5	Diskussion.....	143
5.1	Der Typ des Bilinchromophors bestimmt die spektroskopischen Eigenschaften.....	143
5.2	Bindungsstellen der Signalpartnern pflanzlicher Phytochrome.....	147
5.3	N-terminale Erweiterung und Scharnierregion der pflanzlichen Phytochrome	

5.3.1	Ortsspezifisches Interaktionsmodell der N-terminalen Erweiterung.....	153
5.3.2	Scharnierregion.....	157
5.4	Anwendung pflanzlicher Phytochrome in der Optogenetik.....	159
5.5	PAPP5 – Mechanismen der Aktivierung.....	160
5.5.1	PAPP5- Kontrolle der Aktivität durch Autoinhibition	161
5.5.2	Die Vielseitigkeit der TPR Domäne.....	163
5.5.3	Fettsäureaktivierung von Phosphatasen/Kinasen	165
5.5.4	Die Aktivierung von PAPP5 außerhalb der TPR Domäne.....	166
5.5.5	Photorezeptoren, Fettsäuren und Phosphatasen.....	168
5.5.6	Aktivierung von PAPP5 - Ein Modell für alle PP5 Phosphatasen?	171
5.6	HDX-MS Analytik – Anwendung auf Photorezeptorproteine und Phosphatasen.....	174
6	Ausblick.....	177
7	Literaturverzeichnis.....	179
8	Anhang.....	195
8.1	Sekundärstrukturelemente in <i>AtPhyB</i>	195
8.2	Peptidabdeckung nach HDX-MS.....	196
8.2.1	Phytochrom B (1-654).....	196
8.2.2	Phytochrom B (1-654).....	197
8.2.3	Phytochrome B(1-651) – Auswertung von Verena Gruth ²⁷⁰	198
8.2.4	Phytochrom B (90-654).....	199
8.2.5	PAPP5.....	200
8.3	SDS-Page und Größenausschlusschromatografie des Cph1-PhyB-PhyA-Hybrids.....	201
8.4	<i>Guidelines</i> zur Analyse von HDX-MS Daten	201
8.4.1	Darstellung der Austauschraten.....	203
8.5	Alignment der N-terminalen Erweiterung	205

8.6	Alignment der PP5 Phosphatasen	209
8.7	Produzierte und analysierte Proteine.....	222
9	Abkürzungen.....	225
9.1	Aminosäuren.....	228
	Danksagung	229

Zusammenfassung

Pflanzen haben auf Grund ihrer sessilen Lebensweise im Laufe der Evolution komplexe Mechanismen entwickelt, um ihr Überleben zu sichern. Speziell Licht ist sowohl für die Photosynthese als auch die Aufnahme von Informationen über die Umgebung essentiell. Hierfür haben Pflanzen verschiedene Photorezeptoren entwickelt, von denen die Phytochrome die am besten charakterisierten Vertreter darstellen. Durch die Absorption von rotem Licht findet eine reversible Umwandlung des Grundzustandes P_r (engl.: *Red*) in die in Pflanzen aktive Form P_{fr} (engl.: *Far-red*) statt. Für Pflanzen konnte bislang nur eine Kristallstruktur im P_r Zustand von Phytochrom B erhalten werden.

Diese Arbeit bietet eine detaillierte Analyse der konformationellen Änderungen des photosensorischen Moduls von *Arabidopsis thaliana* (*At*) PhyB zwischen der P_r und der P_{fr} Form durch Wasserstoff-Deuterium-Austausch Messungen. Des Weiteren konnten ein Einfluss der N-terminalen Erweiterung (NTE) auf den Chromophor nachgewiesen werden und mithilfe der Vermessung einer Deletionsvariante ohne NTE mittels Wasserstoff-Deuterium-Austausch erstmals ein Packungsmodell für die N-terminale Erweiterung von PhyB entwickelt werden.

Weiterhin konnte die Struktur einer mit Phytochromen interagierende Phosphatase, PAPP5, gelöst und die Interaktion mit dem NTE von PhyB nachgewiesen werden. Die Struktur von PAPP5 zeigt eine Autoinhibition durch die N-terminale TPR Domäne sowie das C-terminale inhibierende Motiv. Hierbei konnten die verantwortlichen Reste in der TPR Domäne und in dem C-terminalen Motivs identifiziert werden. CD-spektroskopische Messungen und Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Experimente lieferten Daten zur Entwicklung eines Modells der PAPP5-Aktivierung durch Fettsäuren.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin ein Hybridsystem zu entwickeln, das einen einfacheren Zugang zur biophysikalischen Analyse pflanzlicher Phytochrome ermöglicht. Hierfür wurden die PAS und GAF Domäne des cyanobakteriellen Phytochroms *SynCph1* mit der PHY Domäne aus PhyB fusioniert. Zwar zeigte das Hybrid keine vollständige Photokonversion, dennoch war es in der Lage eine lichtabhängige Wechselwirkung mit der Phosphatase PAPP2c einzugehen.

Summary

In the course of evolution plants have evolved complex mechanisms to ensure their survival as sessile organisms. Especially light plays a key role for autotrophic organisms because it is not only essential for photosynthesis, but also provides informations about the environment and the day/night rhythm. To sense these informations, plants have developed different photoreceptors, among them phytochromes are the best characterized ones. The absorption of red light results in a reversible transformation of the ground state P_r (Red) into the plant-active form P_{fr} (Far-red). For plants, only a crystal structure of phytochrome B in its P_r state exists.

This work provides a detailed analysis of the conformational changes of the photosensory module of *Arabidopsis thaliana* (*At*) PhyB between the P_r and the P_{fr} form by hydrogen-deuterium exchange (HDX) measurements. Furthermore, an influence of the N-terminal extension (NTE) on the chromophore could be detected. For the first time, a packing model for the NTE of PhyB was developed by means of the HDX of a deletion variant without NTE.

Furthermore, the structure of a phosphatase, PAPP5, interacting with phytochromes was solved and the interaction with the NTE of PhyB could be demonstrated. The structure of PAPP5 showed autoinhibition by the N-terminal TPR domain and a C-terminal motif. The responsible residues could be identified in the TPR domain and in the C-terminal motif. CD-spectroscopic measurements and hydrogen deuterium exchange experiments provided data on the development of a model of PAPP5-fatty acid activation.

Another aspect of this work was to develop a hybrid system that allows easier access biophysical studies on plant phytochromes. For this purpose, the PAS and GAF domains of the cyanobacterial phytochrome *SynCph1* were fused with that of the PHY domain from *AtPhyB*. Although, the hybrid lacked complete photoconversion, it was able to interact with the phosphatase PAPP2c in a light-dependent manner.

1 Einleitung

Pflanzen haben als sessile Organismen komplexe Systeme entwickelt, um ihr Überleben in den unterschiedlichsten Bedingungen zu sichern. So nutzen sie Sonnenlicht nicht nur als Energiequelle für die Photosynthese, sondern auch als Informationsquelle, da sie ihre Entwicklungsprozesse auf die Umgebung abstimmen müssen.

Pflanzen besitzen zwei gegensätzliche Entwicklungsprogramme, die es ihnen ermöglichen, unter den sie umgebenden Lichtbedingungen zu überleben: Skotomorphogenese und Photomorphogenese. Die Skotomorphogenese ist charakterisiert durch verlängerte Hypokotyle, geschlossene Kotyledone sowie Apikalhaken, um die nötige Energie für ein schnelles Wachsen des Sämlings in Dunkelheit zu erlauben. Aufgrund des fehlenden Chlorophylls ist der Sämling farblos, und der Prozess wird deswegen auch Etiolierung genannt. Im Gegensatz dazu steht die Photomorphogenese (Deetiolierung). Bei ihr inhibiert das Licht das Wachstum des Hypokotyls, die Kotyledonen sind geöffnet und die Proplastiden entwickeln sich zu reifen Chloroplasten¹ (siehe Abbildung 1.1).



Abbildung 1.1: Skotomorphogenese *versus* Photomorphogenese. In Dunkelheit gewachsene Sämlinge (links) sind charakterisiert durch verlängerte Hypokotyle und geschlossene Kotyledone sowie Apikalhaken und weisen keine Farbe auf. Im Gegensatz dazu zeigen unter Licht gewachsene Pflanzen verkürzte Hypokotyle, geöffnete Kotyledone und eine grüne Färbung².

Zur Steuerung dieser verschiedenen Prozesse ist die Pflanze darauf angewiesen Licht wahrnehmen zu können. Ein entscheidender Faktor hierfür sind Photorezeptoren, da ohne sie die Auswertung der Informationen aus Intensität, Wellenlänge, Richtung und

Dauer nicht möglich wäre. Ein breites Spektrum an Photorezeptoren ermöglicht den Pflanzen den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts und Teile des UV-Lichts wahrzunehmen. Die im UVR8 (UV-Licht-Resistenz-Lokus 8) enthaltenen Tryptophane erlauben dem Photorezeptor UV-B Licht intrinsisch wahrzunehmen. Der blaue Bereich des Lichts wird durch Phototropine und Proteine der Zeitlupe Familie abgedeckt, die beide FMN (Flavinmononukleotid) als Kofaktor gebunden haben. Weiterhin reagieren Cryptochrome durch die Kofaktoren FAD (Flavinadeninnukleotid) und 5,10-MTHF (5, 10-Methenyltetrahydrofolat) auf die Bestrahlung mit blauem Licht. Im langwelligen Bereich hingegen absorbieren Phytochrome, da sie Phytochromobilin gebunden haben³ (siehe Abbildung 1.2). Neochrome sind eine weitere Gruppe von Photorezeptoren in Farnen und einigen Algen auftreten, die eine Kombination aus Phytochromen und Phototropinen darstellen. Auf Grund des gebundenen FMN und Phytochromobilin sind sie in der Lage sowohl blaues als auch rotes Licht zu absorbieren⁴.

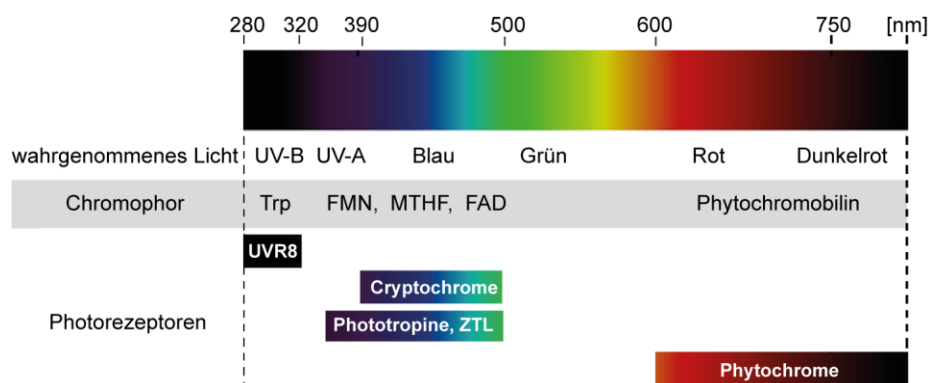


Abbildung 1.2: Photorezeptoren in Pflanzen und ihre gebundenen Kofaktoren sowie der Wellenlängenbereich, in dem sie Licht absorbieren. UVR8 = UV-Licht-Resistenz Lokus 8; Trp = Tryptophan; FMN = Flavin-Mono-Nukleotid; MTHF = Methenyltetrahydrofolat; FAD = Flavin-Adenin-Nukleotid; ZTL = Zeitlupe nach³.

1.1 Phytochrome

Phytochrome wurden vor circa 60 Jahren erstmals in Pflanzen entdeckt und von Lagarias und Quail 1983 erstmals in Reinform hergestellt^{5,6}. Ihr Name ergibt sich aus dem griechischen *phytos* = Pflanze und *chroma* = Farbe. Später wurden Phytochrome auch in vielen photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Bakterien und Pilzen entdeckt.

Phytochrome haben über ein Cystein ein Bilin-artiges Tetrapyrrol kovalent gebunden, welches ihnen ermöglicht, das Verhältnis von rotem (Sonne) und dunkelrotem Licht (Schatten) zu ermitteln und entsprechende biologische Signale zu initiieren. Nach der Absorption eines Photons wird die inaktive P_r Form in die in Pflanzen physiologisch aktive P_{fr} Form umgewandelt^{7,8}. In Pflanzen steuern Phytochrome alleine oder im Zusammenspiel mit anderen Photorezeptoren alle wichtigen Wachstums- und Entwicklungsprozesse. Dazu gehören vor allem Samenkeimung, Deetiolierung, Schattenvermeidungsreaktion, Blütenbildung, Chloroplastendifferenzierung und die Regulation zirkadianer Rhythmen⁹⁻¹¹. In Cyanobakterien und Bakterien regulieren die Phytochrome die Biosynthese des Photosyntheseapparates und der Pigmente, während sie in Pilzen über den Eintritt in die vegetative oder generative Entwicklungsphase entscheiden¹².

Phytochrome setzen sich aus einem N-terminalen photosensorischen Modul (PSM), das der Lichtabsorption dient, und einem C-terminalen regulatorischen Module (RM) zusammen, welches für die Signaltransduktion verantwortlich ist. Bei pflanzlichen Phytochromen ist jedoch die Funktion des C-terminalen Moduls noch nicht vollständig geklärt. Bis jetzt konnte lediglich ein Einfluss auf die Dimerisierung nachgewiesen werden. Phytochrome können anhand ihrer Domänenarchitektur des photosensorischen Moduls in drei Subfamilien eingeordnet werden¹³.

1.1.1 Phytochrome der Gruppe I – Kanonische Phytochrome

Pflanzliche Phytochrome gehören, wie auch Algenphytochrome sowie Phytochrome aus Cyanobakterien, Proteobakterien und Pilzen, der Phytochrom Gruppe I an¹⁴. Sie alle besitzen ein photosensorisches Modul, bestehend aus den folgenden drei Domänen: PAS-GAF-PHY (PAS = PER, ARNT, SIM; GAF = cGMP Phosphodiesterase, Adenylat Zykklase, FhlA; PHY = Phytochrom-spezifische GAF Domäne). Neben Strukturen aus Cyano- und Proteobakterien konnte 2014 auch die erste Struktur eines PSM in der P_r Form aus Pflanzen aufgeklärt werden (siehe Abbildung 1.3). Allgemein zeigt die Struktur von *Arabidopsis thaliana* Phytochrom B (*AtPhyB*) eine gute Übereinstimmung zu den Strukturen aus Proteo- und Cyanobakterien.

Die GAF Domäne bildet die Bindungstasche für den Chromophor, bei Pflanzen und Cyanobakterien stellt die GAF Domäne auch das Cystein an welches der Chromophor

kovalent gebunden ist. Durch die Ausbildung eines Deckels über der Bindungstasche, der sogenannten Zungenregion, schirmt die PHY Domäne den Chromophor weiter ab. Dies erklärt, warum die PHY Domäne für die spektrale Integrität der Phytochrome sowie die Stabilisierung der P_{fr} Form zuständig ist^{15,16}. Weiterhin bildet die GAF Domäne eine Schleife, durch die sich eine N-terminale Helix fädelt, so dass sich ein Knoten/Lasso-Motiv bildet¹⁷⁻²¹.

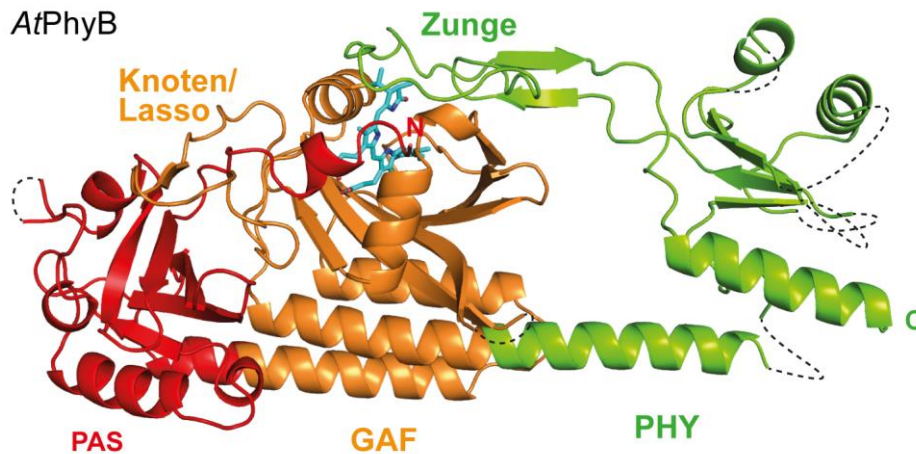


Abbildung 1.3: Struktur des photosensorischen Moduls (T90-A624) von Phytochrom B aus *Arabidopsis thaliana* (AtPhyB). Die strukturellen Merkmale der Phytochrome der ersten Gruppe, der Knoten/das Lasso und die Zunge sind in der Struktur markiert. Die PAS (PER, ARNT, SIM) Domäne ist in rot, die GAF (cGMP Phosphodiesterase, Adenylat Zykase, FhlA) Domäne in orange und die PHY (Phytochrom spezifische GAF Domäne) Domäne in grün dargestellt. Der Chromophor, Phytychromobilin, ist in türkis eingefärbt. Nicht aufgelöste Bereiche in der Struktur sind als gestrichelte Linien abgebildet. (PDB Code: 4OUR) nach 22.

Im Falle der Proteobakterien und Pilzen befindet sich das Cystein, das den Chromophor bindet, in der variablen N-terminalen Erweiterung (NTE).

Während das N-terminale photosensorische Modul bei allen Phytochromen konserviert vorliegt, treten im C-terminalen Modul starke Variationen auf^{12,23} (siehe Abbildung 1.4). Das C-terminale Modul besteht aus einer Histidinkinase, die durch die Übertragung eines Phosphats auf ein Aspartat eine Signalkaskade auslöst^{24,25}. Eine Besonderheit stellt das C-terminale Modul bei den Pflanzen dar, das sich aus zwei PAS Domänen und einer Histidinkinase verwandten Domäne (engl.: *Histidin kinase related*; kurz: HKR) zusammensetzt, welchem das konservierte Histidin fehlt. Vermutungen über eine Serin-/Threoninkinaseaktivität, wie für *Avena sativa* Phytochrom A

erwiesen, konnten nicht weiter bestätigt werden²⁶. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Kinasefunktion in pflanzlichen Phytochromen im PSM lokalisiert ist²⁷.

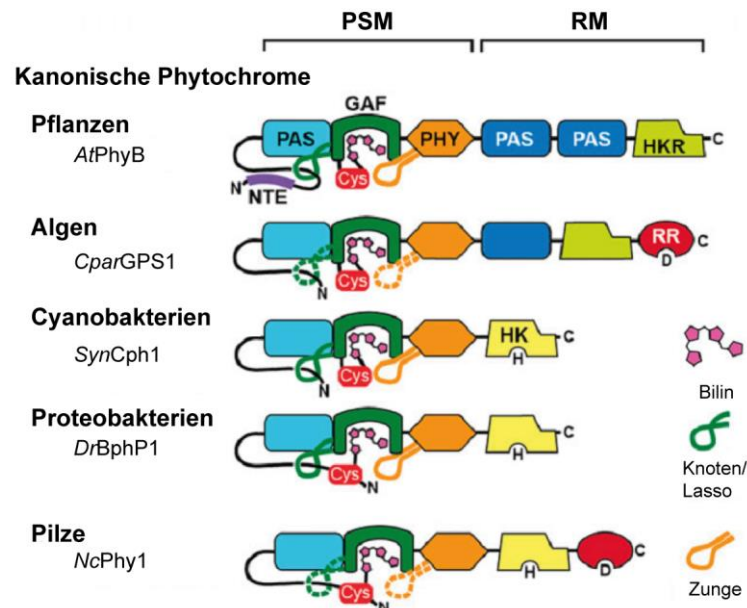


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur der Gruppe I der Phytochrom-Superfamilie. Das photosensorische Modul (PSM) der pflanzlichen, cyanobakteriellen, proteobakteriellen und pilzlichen Phytochrome setzt sich bei allen aus einer PAS, einer GAF sowie einer PHY Domäne zusammen. Hierbei wird von der GAF Domäne eine Schleife gebildet, durch den sich der N-Terminus fädelt, so dass ein Knoten/Lasso-Motiv entsteht. Die PHY Domäne bildet den Deckel für die Chromophorbindungstasche, die sogenannte Zungenregion. Das regulatorische Modul (RM) setzt sich aus einer Histidinkinase (HK) oder einer Histidinkinase verwandten (engl.: *Histidin kinase related*; kurz: HKR) Domäne zusammen. Pflanzliche Phytochrome besitzen zusätzlich noch zwei PAS Domänen und pilzliche eine weitere regulatorische Region (engl.: *Response regulator*, kurz: RR). Bei den gestrichelten strukturellen Charakteristika (Knoten/Lasso und Zunge) wird ihre Existenz vermutet. Die sich unmittelbar vor der PAS Domäne befindende α -Helix der N-terminalen Erweiterung (NTE) ist in lila dargestellt nach 28.

1.1.1.1 Die pflanzliche Phytochromfamilie

Die Zugehörigkeit in Pflanzen zu Monokotyledonen oder Dikotyledonen ist entscheidend für die Anzahl der Phytochrome. So enthalten monokotyle Pflanzen, wie Mais, Reis und Hafer, nur die Phytochrome PhyA-C, während in der Modellpflanze für höhere Pflanzen, *Arabidopsis thaliana*, fünf Phytochrome, PhyA-E, zu finden sind. In Tomaten konnte weiterhin ein Phytochrom F identifiziert werden²⁹.

Phylogenetische Sequenzanalysen der Phytochrome in *A. thaliana* zeigen, dass die Phytochrome in zwei Unterfamilien eingeteilt werden können: PhyA/C und PhyB/D/

E⁸. Alle fünf Phytochrome aus *A. thaliana* besitzen eine Aminosäuresequenzidentität untereinander von 46 %-56 %, mit Ausnahme von PhyB und PhyD, deren Sequenzen als Folge einer Genduplikation sich lediglich um 20 % unterscheiden^{8,30} (siehe Abbildung 1.5).

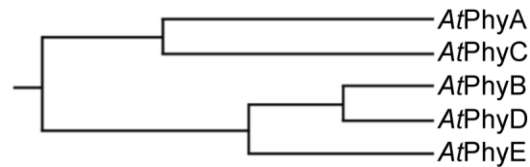


Abbildung 1.5: Phylogenetischer Baum der fünf Phytochrome (Phy) aus *Arabidopsis thaliana* (At)^{8,31}.

1.1.2 Phytochrome der Gruppen II und III – Knotenlose Phytochrome

Im Gegensatz zur Gruppe I beinhalten die Gruppen II und III knotenlose Varianten. Allerdings existieren sie nur in Cyanobakterien. Die Gruppe II zeichnet sich durch die Abwesenheit der vorderen PAS Domäne aus, die Gruppe III benötigt lediglich eine GAF Domäne für eine vollständige Photokonversion^{23,13}. Wie alle bisherigen 3D Strukturen der Phytochrome zeigen, unterscheidet sich die Bindungstasche der Chromophore zwischen den Gruppen nicht und wird durch ein sechs-strängiges β -Faltblatt und drei α -Helices gebildet (siehe Abbildung 1.6).

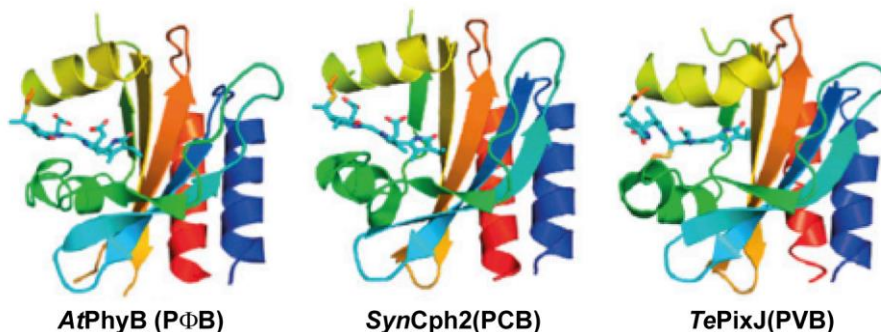


Abbildung 1.6: GAF Domänen aller drei Gruppen mit gebundenen Chromophoren. Gruppe I: *Arabidopsis thaliana* (At) PhyB; (PDB Code: 4OUR); Gruppe II *Synechocystis* PCC6803 (Syn) Cph2 (PDB Code: 4BWI); Gruppe III: *Thermosynechococcus elongatus* (Te) PixJ; (PDB Code: 4GLQ). Die Polypeptidketten sind in regenbogenfarben dargestellt, wobei der N-Terminus blau ist und der C-Terminus rot. PΦB = Phytochromobilin; PCB = Phycocyanobilin; PVB = Phycoviolobilin²⁸.

Das regulatorische Modul der zweiten Gruppe kann, wie bei den kanonischen Phytochromen, aus einer Histidinkinase bestehen oder, im Fall von Cph2 aus *Synechocystis*, aus zwei GGDEF Domänen und einer EAL Domäne, welche c-di-GMP

produzieren beziehungsweise degradieren können. Die Gruppe III besteht aus Cyanobakteriochromen (CBCR), die durch Modifikationen der Bilinbindungstasche, beispielsweise einer autokatalytischen Isomerisierung oder einer zweifachen Anbindung des Chromophors, in der Lage sind, verschiedene spektrale Endzustände einzunehmen. Diese erstrecken sich von violett/blau, violett/orange, blau/grün, grün/rot bis rot/grün^{13,32,33}. Weiterhin können CBCRs auch aus mehreren GAF Domänen mit verschiedenen spektralen Endzuständen bestehen, die es ihnen ermöglichen, auf mehrere Wellenlängen gleichzeitig zu reagieren (siehe Abbildung 1.7).

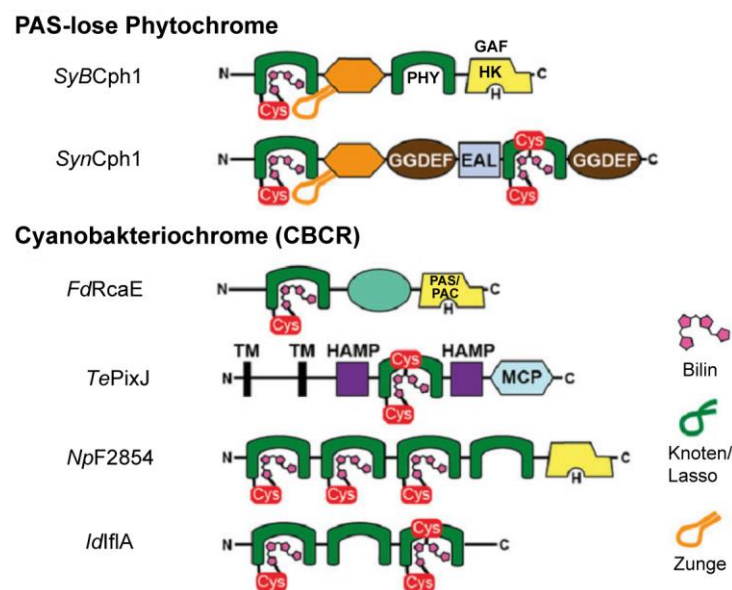


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Domänenarchitektur der charakterisierten Phytochrome der Gruppen II und III. Die Gruppe II benötigt für die volle Photoaktivität lediglich die GAF und PHY Domäne und wird daher auch als Gruppe der PAS-losen Phytochrome bezeichnet. Die bislang kristallisierten Vertreter dieser Gruppe enthalten ebenfalls die charakteristische Zungenstruktur in der PHY Domäne. Die Gruppe III besteht aus Cyanobakteriochromen, bei denen eine einzige GAF Domäne ausreicht, um die volle Photoaktivität zu erreichen. HK = Histidinkinase; GGDEF = konservierte Aminosäuren in der Diguanylatzyklase; EAL = konservierte Aminosäuren in der Diguanylatphosphodiesterase; PAS/PAC = PAS Domäne gefolgt von einem C-terminalen Motiv, das ähnlich der PAS Domäne ist; TM = Transmembran-ständig; HAMP = Histidinkinase/Adenylatzyklase/Methyl-akzeptierende Phosphatase; MCP = Methyl-akzeptierendes Chemotaxis Protein ^{nach 28}.

Die regulatorischen Module können durch ihre große Variation an Domänen eine Vielzahl an Signalkaskaden auslösen. Neben Histidinkinasen können auch MCP (Methyl-akzeptierenden Chemotaxis Proteine) Domänen gebunden werden. Die HAMP

(Histidinkinase/Adenylatzyklase/Methyl-akzeptierende Phosphatase) Domäne fun-
giert hierbei als Brücke zwischen dem sensorischen und dem regulatorischen Modul.

1.1.3 Biosynthese des Chromophors

Die Biosynthese der Biline beginnt bei Pflanzen und Algen ausgehend von Aminolävulin-
säure in den Plastiden, während Apophytochrom im Zytosol produziert wird^{8,34}. In
mehreren Schritten wird aus 5-Aminolävulinsäure, Protoporphyrin IX hergestellt,
welches auch ein Vorläufer in der Chlorophyll-Synthese darstellt^{35,36}. Der Einbau von
Eisen durch die Ferrochelatase führt zur Herstellung von Häm b, welches durch die
Ferrodoxin-abhängige Hämoxygenase an der α -Methinbrücke gespalten wird. Die
Reduktion von Biliverdin IX α (BV) ist nötig um (3Z)-Phytochromobilin (P Φ B) zu
erhalten^{37,38}. In einem abschließendem Schritt findet eine Isomerisierung von (3Z)-
P Φ B zu P Φ B statt³⁹ (siehe Abbildung 1.8).

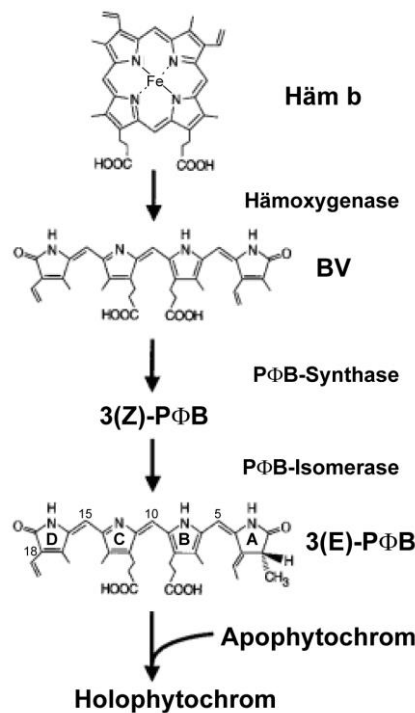


Abbildung 1.8: Biosyntheseweg von Phytochromobilin in *Arabidopsis thaliana* ausgehend von Häm b.
BV = Biliverdin IX α ; P Φ B = Phytochromobilin nach 38.

Die Verwendung der Chromophore variiert zwischen den verschiedenen Organismen.
Pflanzen und Grünalgen verwenden P Φ B beziehungsweise Phycocyanobilin (PCB),
welches eine zusätzliche Ethyl-Seitengruppe an der C18 Position besitzt. PCB wird
von cyanobakteriellen Phytochromen und CBCRs ebenfalls als Chromophor verwen-

det. Durch die Isomerisierung von PCB entsteht Phycoviolobilin (PVB), das von manchen Cyanobakteriochromen als Chromophor eingebaut wird. Proteobakterien und Pilze verwenden Biliverdin (BV)¹².

In Grünalgen und Moosen wurde kürzlich eine weitere Reduktase (PubS) entdeckt, welche die Umwandlung von BV zu Phycourobilin (PUB) katalysiert. Die Funktion von PUB ist jedoch noch unklar. Eine Vermutung der Autoren sieht eine reversible Bindung an die Apoform der Phytochrome vor⁴⁰.

1.2 Photokonversion

Durch die Absorption von rotem Licht (circa 660 nm) findet eine Umwandlung des Grundzustandes P_r (engl.: *Red*) in die in Pflanzen aktive Form P_{fr} (engl.: *Far-red*) statt. Hierbei erfolgt eine Z zu E Isomerisierung der C15=C16-Doppelbindung, was ein Drehen des D-Rings bewirkt, und dadurch ausgelöst eine Konformationsänderung des gesamten Proteins⁴¹⁻⁴³. Dieser Vorgang kann durch die Absorption von dunkelrotem Licht (circa 730 nm) umgekehrt werden, beziehungsweise in der sogenannten Dunkelreversion auch ohne Licht ablaufen. Da letztere Reaktion jedoch viel langsamer abläuft, können Phytochrome sowohl als kurz- oder langlebige Photoschalter agieren (siehe Abbildung 1.9).

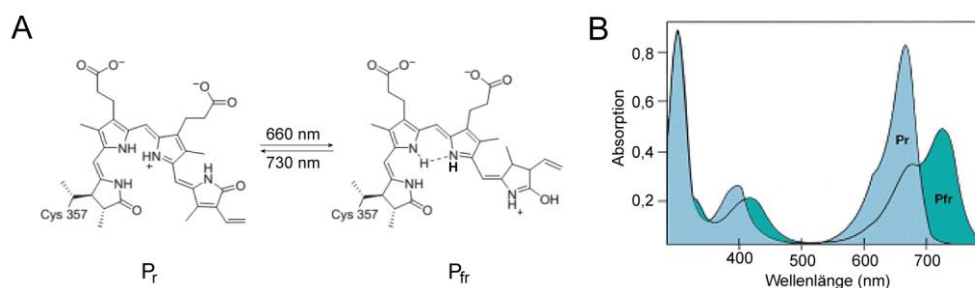


Abbildung 1.9: Durch Absorption ausgelöste strukturelle Änderungen des Chromophors und die dazugehörigen UV/Vis Spektren. (A) Pflanzen haben PCB als Chromophor kovalent an ein Cystein (Cys) gebunden. Durch die Absorption von rotem Licht (660 nm) isomerisiert die C15=C16-Doppelbindung von Z zu E. Die Rückreaktion erfolgt durch dunkelrotes Licht (730 nm). (B) UV/Vis Spektrum eines pflanzlichen Phytochroms nach Bestrahlung mit rotem Licht oder dunkelrotem Licht. Die P_r Form liegt als Reinform vor, während die P_{fr} Form in der Regel nur als Mischform erhältlich ist ^{nach 31,11}.

Da eine Kristallstruktur von Pflanzen nur im P_r Grundzustand existiert, muss auf bakterielle Verwandte zurückgegriffen werden, um die einzelnen Schritte nach der Isomerisierung des Chromophors zu beschreiben. In einem Vergleich der P_r Grund-

struktur von *Deinococcus radiodurans* (*Dr*) BphP mit dem *bathy* Phytochrom *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) BphP, bei dem die P_{fr} Form den Grundzustand darstellt, zeigt sich, wie die Isomerisierung des Chromophors die direkte Umgebung beeinflusst²⁸. Die Rotation des D-Rings bei *Dr*BphP bewirkt, dass dieser sich in einer nicht-idealen Umgebung befindet. Um größere Abstoßungskräfte zu vermeiden, verschiebt sich so der Chromophor innerhalb der Bindungstasche (siehe Abbildung 1.10).

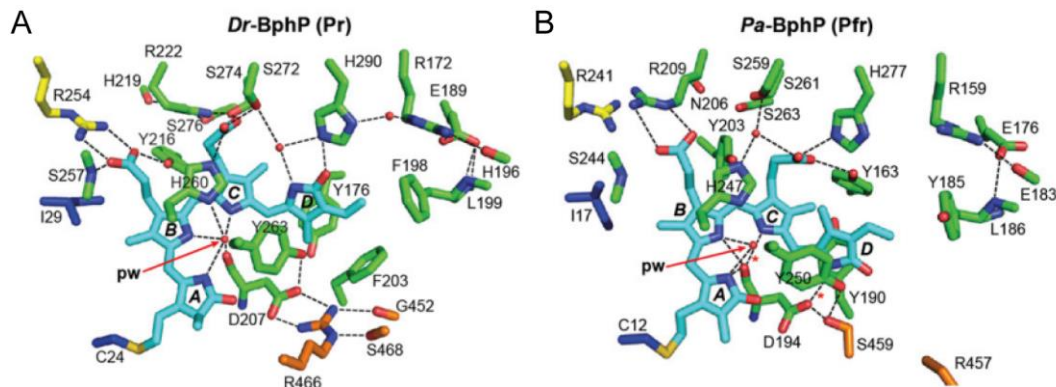


Abbildung 1.10: Bilin und die umgebenden Aminosäuren des kanonischen Phytochroms *Deinococcus radiodurans* (*Dr*) BphP (A) und des *bathy* Phytochroms *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) BphP (B) in ihren Grundzuständen P_r und P_{fr} (PDB Codes: 4Q0J und 3C2W). Als Chromophor haben beide Phytochrome Biliverdin IX α (BV) gebunden, das in cyan dargestellt ist. Die PAS, GAF und PHY Domänen sind in blau, grün und orange koloriert sowie das für die Chromophoranbindung verantwortliche Cystein in gelb. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrückenbindungen an. Pw = Pyrrrolwasser²⁸.

Während der Pyrrolstickstoff des gedrehten D-Rings sich hin zum Carboxylat des D207 verschiebt und eine Wasserstoffbrücke ausbildet, verbleibt die aliphatische Gruppe in ihrer vorherigen Umgebung. Durch die Rotation der Interaktionspartner der aliphatischen Gruppe, Y176 und F203, wird diese jedoch verschoben. Spektroskopische und kristallographische Studien zeigten, dass die Ausbildung der Interaktion zwischen D-Ring und D207 essentiell für die Generierung der P_{fr} Form ist^{21,25,28,44–46}. Die Verschiebung des Chromophors bewirkt weiterhin eine Reorientierung der Propionate des B- und C-Rings. Hierbei wird die Wasserstoffbrücke zwischen dem B-Ring Propionat und R254 gebrochen und eine neue zu R222 ausgebildet. Die Propionatgruppe des C-Rings richtet sich neu aus und bildet Wechselwirkungen zu Y176 und H290²⁸. Die hier beschriebenen Änderungen beziehen sich auf *Dr*BphP beziehungsweise *Pa*BphP als Chromophor und demzufolge könnten auch andere Aminosäuren an der Stabilisierung des P_{fr} Zustandes beteiligt sein. So ist für CBCRs

ein zusätzlicher Deprotonierungsschritt während der Photokonversion nötig⁴⁷ und Reste (zum Beispiel Y216), die für die Stabilisierung des B-Rings benötigt werden, sind in Pflanzen nicht konserviert^{20,28}.

Die neuen Interaktionspartner des Chromophors führen dazu, dass die Salzbrücke zwischen D207/R466 gelöst wird und die Zungenregion ihre Lage verändert, was letztendlich zur Auflösung der zwei β -Stränge führt. Ein Teil des Zungenbereichs rotiert und es bildet sich eine α -Helix. Hierbei wechseln die Tryptophane der konservierten Motive W^G/AG und W^F/XE ihre Positionen, weshalb dieses Modell auch Tryptophan-Tausch-Modell genannt wurde¹⁴. Der Kontakt zur GAF Domäne wird über die Wechselwirkung zwischen D207/S468 wieder hergestellt und weitere hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem β 3-Strang der GAF Domäne sowie der α -Helix werden gebildet²⁸ (siehe Abbildung 1.11).

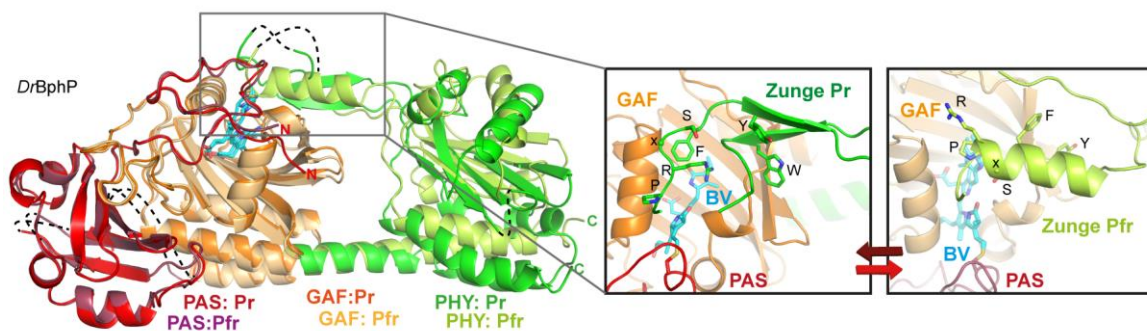


Abbildung 1.11: Vergleich der 15Z und 15E Strukturen der Gruppe I. Überlagerung der P_r und P_{fr} Strukturen von *DrBphP* (PDB Codes: 400P und 4001). Die PAS, GAF und PHY Domänen sind in rot, orange und grün dargestellt. Als Chromophor ist Biliyerdin IX α (BV) gebunden, das in türkis eingefärbt ist. Die P_{fr} Struktur ist in den jeweils helleren Farben abgebildet. Die Vergrößerungen zeigen die Zungenregion im P_r und P_{fr} Zustand. Die Aminosäuren der konservierten Motive in der Zungenregion, W^G/AG , $PRxSF$ und W^F/XE , sind gekennzeichnet nach 22.

Die Umfaltung der Zungenregion hat zur Folge, dass die PHY Domäne dichter an die GAF Domäne rückt, was zu einer Begradigung der domänenverbindenden Helix zwischen der GAF und PHY Domäne führt. Des Weiteren zeigen Elektronenmikroskop-Aufnahmen des Volllängenproteins von *DrBphP* das Vorhandensein von zwei P_{fr} Populationen (P_{fr} und P_{fr}'), die sich im Durchmesser der Lücken zwischen GAF und PHY Domäne unterscheiden (siehe Abbildung 1.12). Die Rolle der PAS Domäne ist bisher noch nicht geklärt, jedoch verhindert sie durch die starke Bindung an die GAF Domäne, dass diese sich auf die PHY Domäne zubewegt.

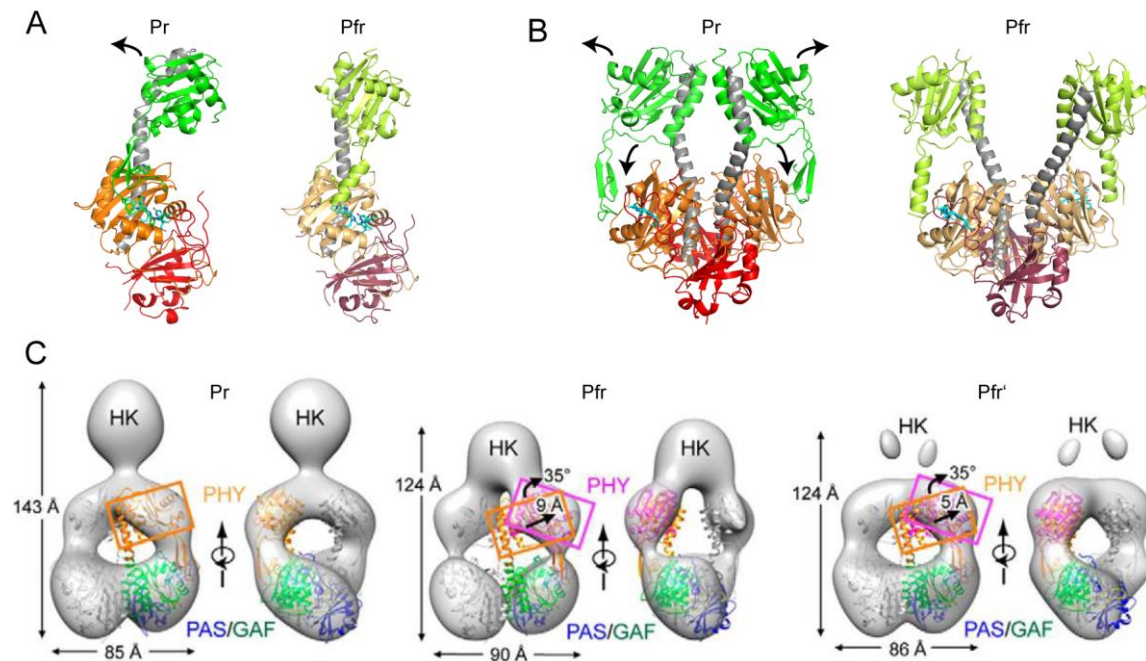


Abbildung 1.12: Vergleich der P_r und P_{fr} Strukturen von DrBphP aus der Gruppe I. (A,B) Die Bewegung der PHY Domäne bei der Photokonversion ist durch Pfeile angedeutet. Die PAS, GAF und PHY Domänen sind in rot, orange und grün dargestellt. Als Chromophor ist Biliverdin IX α (BV) gebunden, das in türkis eingefärbt ist. (C) Analyse des Volllängenphytochroms DrBphP mittels Einzelpartikelelektronenmikroskopie. Die Ergebnisse wurde auf die P_r Struktur und Modelle der P_{fr} und P_{fr'} Form abgebildet. Die Position der PHY Domäne wurde angepasst. Sie wurde um 35 Å gedreht und 9 Å in P_{fr}, beziehungsweise 5 Å in P_{fr'} nach außen bewegt²².

1.3 Pflanzenphytochrome – Biologische Funktionen der Domänen

Bei pflanzlichen Phytochromen ist die N-terminale Erweiterung stark ausgeprägt; insbesondere für die Phytochrome B und D, bei denen sie sich über 100 Aminosäuren erstreckt. Die Region ist stark hydrophil und weist einen besonders hohen Anteil an Glycinen und Serinen auf⁴⁸. Weiterhin gilt sie als unstrukturiert und flexibel. Für die 52 Aminosäuren lange Erweiterung von PhyA aus *Avena sativa* (*As*) konnten auch strukturelle Veränderungen zwischen der P_r und der P_{fr} Form durch CD-spektroskopische Studien und verschiedene Antikörper-Bindung nachgewiesen werden^{49,50}. Weiterhin lag der Kofaktor bei einer Variante ohne NTE exponierter vor^{49,51}, die spektralen Maxima waren verschoben⁵² sowie die P_{fr} Stabilität verringert⁵³. Der Einfluss auf die spektralen Eigenschaften konnte ebenfalls für *AtPhyB* nachgewiesen werden. Aus den Analysen wurde geschlussfolgert, dass der NTE nicht nur die

physiochemischen Eigenschaften beeinflusst, sondern auch für die vollständige biologische Aktivität benötigt wird⁵⁴. Weiterhin konnten sowohl für *AsPhyA* (S7 und S17)⁵⁵⁻⁵⁷, als auch für *AtPhyB* (S84, S86 und Y104)^{58,59} Phosphorylierungsstellen im NTE gefunden werden. Serin zu Alanin Mutationen von S8 und S18 aus *AsPhyA* zeigten eine erhöhte biologische Aktivität, eine Hypersensitivität gegenüber Licht und ein Zwergwachstum⁶⁰.

An die NTE schließt sich die PAS und GAF Domäne an. Eine von der GAF Domäne ausgebildete Knoten/Lassoregion gilt dabei als mögliche Interaktionsstelle für Bindungspartner. Weiterhin bildet die GAF Domäne die Chromophorbindungsstasche. Eine Mutation in der Bindungsstasche von Histidin zu Tyrosin (H276Y) ist zwar biologisch dauerhaft aktiv, zeigt aber vom spektralem Verhalten, dass die (meta) stabile Ausbildung der P_{fr} Form nicht mehr möglich ist⁶¹.

Die PHY Domäne ist für die spektrale Integrität notwendig. Darüber hinaus wird spekuliert, ob die von der PHY Domäne ausgebildete Zungenregion ebenfalls als Bindungsstelle für Interaktionspartner dienen könnte. Durch die strukturelle Umwandlung wäre die Möglichkeit einer lichtabhängigen Bindung gegeben.

Eine weitere Phosphorylierungsstelle befindet sich für *AsPhyA* zwischen dem photosensorischen Modul und dem Dimerisierungsmodul, der sogenannten Scharnierregion (S599)^{55,56}. Ihre Phosphorylierung wirkt sich negativ auf die Affinität zu Bindungspartnern aus.

Die PAS-PAS Wiederholung beinhaltet das Kernlokalisierungssignal (engl.: *Nuclear localization signal*; kurz: NLS) bei Phytochrom B, das den Transport der Phytochrome in den Zellkern steuert⁶². Weiterhin sind die PAS Domänen verantwortlich für die Dimerisierung der Phytochrome. Phytochrom A formt nur Homodimere⁶³, während Phytochrom C und E nur Heterodimere ausbilden⁶⁴. Hingegen sind Phytochrom B und D in der Lage sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden⁶³. Die funktionelle Bedeutung der Homo- und Heterodimere ist noch nicht abschließend geklärt. Allerdings zeigen erste Studien, dass die Anwesenheit von PhyB notwendig ist um die entsprechenden Signale von PhyC auszulösen. Des Weiteren ist die PhyC Konzentration viel geringer in Abwesenheit von PhyB. Die nicht mehr mögliche Bildung von PhyB/PhyC Heterodimeren könnte eine mögliche Erklärung hierfür sein^{65,66}. PAS

Domänen sind allgemein für die Bildung von Homodimeren und Heterodimeren bekannt. Dieses wirft die Vermutung auf, dass Signal-induzierte Veränderungen der quartären Struktur eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion spielen könnten⁶⁷. PAS Domänen setzen sich aus circa 100 bis 130 Aminosäuren zusammen, wobei nur geringe Sequenzähnlichkeiten auftreten. Allerdings zeigt eine Analyse der Kristall- und NMR-Strukturen verschiedener PAS Domänen, dass eine konservierte dreidimensionale Struktur im Kern vorliegt, bestehend aus einer typischen α/β -Faltung⁶⁸⁻⁷². Die Struktur ist charakterisiert durch ein zentrales antiparalleles β -Faltblatt, bestehend aus fünf Strängen, das von mehreren α -Helices umgeben wird. Die Orientierung, Länge und Anzahl der umgebenden α -Helices ist hierbei variabel. Auch wenn PAS Domänen oft als PAS-PAS Wiederholung zu finden sind, treten sie auch einzeln in vielen Proteinen auf, welche an einer Signalweiterleitung beteiligt sind.

Ein Sequenzalignment der Histidinkinase aus *SynCph1* mit dem C-Terminus von *A. thaliana* zeigte, dass diese sowohl zur HKR Domäne (13 – 17 %) als auch zum PAS Modul (14 – 15 %) eine geringe Sequenzidentität aufweist²⁶. In einer Studie mit Phytochrom A aus *A. sativa* und ATP-Analoga wurde eine Sequenz (DLKLDGLA) identifiziert, welche Ähnlichkeiten zu der Nukleotidbindungsstelle in Proteinkinasen aufweist. Diese befindet sich jedoch am Anfang der ersten PAS Domäne⁷³. Vermutungen über eine Serin-/Threoninkinaseaktivität, wie für *AsPhyA* berichtet, konnten nicht weiter bestätigt werden²⁶.

Sowohl das N-terminale, als auch das C-terminale Modul sind an der Signalweiterleitung beteiligt, da für beiden Bereiche Bindungspartner gefunden werden konnten⁷⁴⁻⁷⁸.

1.4 Signaltransduktion in Phytochromen

Verschiedene physiologischen Reaktionen können durch unterschiedliche Phytochrome gesteuert werden. Diese können auf Grund ihrer Stabilität gegenüber Licht in zwei Typen eingeteilt werden: Typ I, lichtlabil (PhyA) und Typ II, lichtstabil (PhyB-PhyE). Die P_{fr} Form von PhyA ist lichtinstabil und wird innerhalb kürzester Zeit abgebaut, so dass PhyA überwiegend präsent in dunkel-gewachsenen Pflanzen ist. Die P_{fr} Formen der anderen Phytochrome werden nicht durch Licht beeinflusst⁷⁹⁻⁸¹. Bei den lichtstabilen Phytochromen fällt Phytochrom B die Aufgabe des Hauptphoto-

rezeptors zu⁸. Er steuert Signalwege, die durch Rotlicht ab einer Lichtintensität von $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ausgelöst werden. Über diesen als Niedrig-Fluenz-Antwort (engl.: *Low fluence response*; kurz: LFR) bezeichneten Signalweg werden die Keimung und die Induktion der Blütenbildung initiiert⁸². Darüber hinaus wird kontinuierlich das Verhältnis von P_r zu P_{fr} überprüft, um gegebenenfalls die Deetiolerungsreaktion auszulösen. An dieser Reaktion sind auch die Phytochrome D und E beteiligt⁸³. *AtPhyA* hingegen ist für die Niedrigst-Fluenz-Antwort (engl.: *Very low fluence response*; kurz: VLFR) und die Dunkelrotlicht induzierte Hoch-Intensitäts-Antwort (engl.: *High irradiance response*; kurz: HIR) verantwortlich³¹. Diese außerordentliche Lichtsensitivität erlaubt *PhyA* die Kontrolle über die Keimbildung und Deetiolerungsreaktionen, da nur geringste Mengen an Licht auf die Samen treffen müssen⁸². Ein dritter *PhyA*-gesteuerter Signalweg wird durch Rotlicht (R) HIR (R-HIR) initiiert. Dabei wurde beobachtet, dass die Keimlinge bei einer Bestrahlung mit sehr hohen Dosen von Rotlicht ein verkürztes Hypokotyl aufwiesen. Dieser Effekt konnten bei *PhyA*-Mutanten nicht beobachtet werden⁸⁴. Die Phytochrome haben zum Teil überlappende, aber auch distinkte Aufgaben. Durch *Knockout*-Mutanten generierte Phänotypen sind in nachfolgender Abbildung zu sehen.

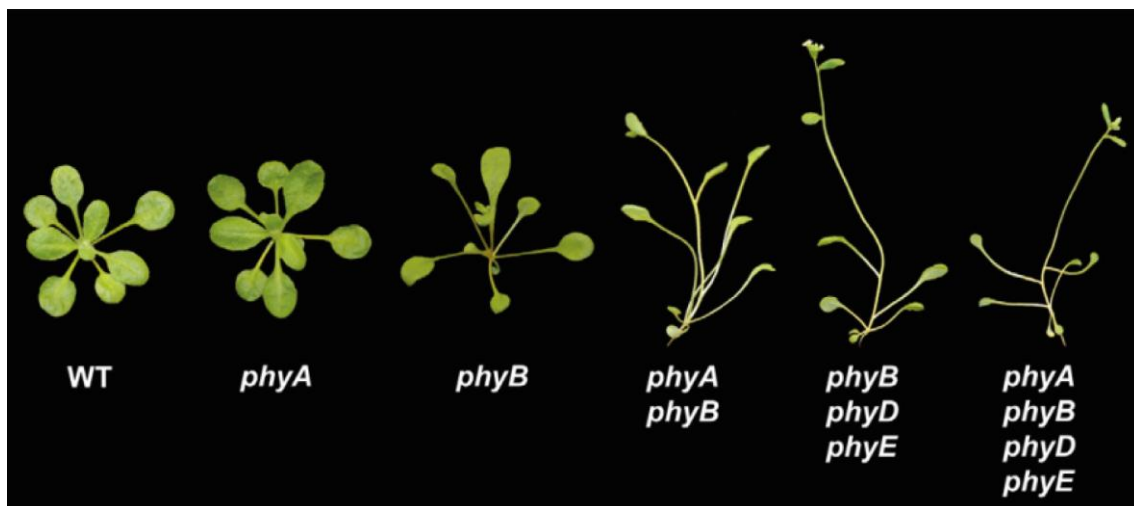


Abbildung 1.13: Phänotypen von drei Wochen alten Pflanzen, die täglich 16 Stunden mit weißem Licht bestrahlt wurden. WT = Wildtyp³¹.

Während *PhyB-E* nur durch Bestrahlung mit Rotlicht in die physiologisch aktive P_{fr} Form umgewandelt werden können, kann die P_{fr} Form von *PhyA* durch Belichtung mit jeder Wellenlänge gebildet werden. Folglich repräsentiert *PhyA* den einzigen Dunkelrotlichtrezeptor in *Arabidopsis*. Nur für *PhyC* wurden nach langfristiger

Bestrahlung mit hohen Dosen an Dunkelrotlicht eine physiologische Aktivität verzeichnet, die aber unter natürlichen Bedingungen irrelevant sein dürfte⁸³. In Pflanzen ist die P_{fr} Form die physiologisch aktive Form. Die aus dem Umgebungslicht erhaltenen Informationen werden durch lichtabhängige Signalkaskaden weitergeleitet und initiieren die verschiedenen physiologischen Reaktionen.

1.4.1 Nukleosolische Signaltransduktion

Die am besten untersuchte Signalkaskade beginnt mit dem Transport der Phytochrome in den Nukleus. Hierbei wird der Kerneintritt für PhyB durch die Anregung mit Rotlicht und die damit verbundenen strukturellen Änderungen des Phytochroms ermöglicht. Während PhyB eine Kernlokalisierungssequenz besitzt, die den Eintritt in den Kern erlaubt, benötigt PhyA die Transporterproteine FHY1 (engl.: *Far-red elongated hypocotyl 1*) oder FHL1 (*FHY1-like*)^{85,86}. Weiterhin kann der Kerneintritt für PhyA durch Bestrahlung mit jeder Wellenlänge (blau, rot und dunkelrot) erreicht werden⁸⁷⁻⁸⁹. Im Kern interagieren PhyA und PhyB mit den negativen Transkriptionsfaktoren PIF⁹⁰ (*Phytochrominteraktionsfaktoren*) und PIL (engl.: *PIF3-like*), die dadurch phosphoryliert und schließlich durch das Proteasom abgebaut werden⁹¹. Die Degradierung in dunkelrotem Licht wird nur durch PhyA ausgelöst, während die Antworten im roten Licht durch die Phytochrome PhyA, PhyB und PhyD generiert werden. Weiterhin interagiert ein Repressor der Photomorphogenese, COP1 (engl.: *Constitutive photomorphogenic 1*), mit den Phytochromen im Kern. COP1, selber eine E3-Ubiquitin-Ligase, wird dadurch von dem Proteasom abgebaut. Durch diese Interaktion werden die positiven Transkriptionsfaktoren HY5 (engl.: *Long hypocotyl 5*), LAF1 (engl.: *Long after far-red light 1*) und HFR1 (engl.: *Long hypocotyl in far-red 1*) im Kern angereichert⁹²⁻⁹⁵. Beide Interaktionen bewirken eine Aktivierung der Photomorphogenese⁹¹ (siehe Abbildung 1.14)

Weiterhin findet sowohl eine Akkumulation von PhyA, als auch von PhyB im Kern statt, die zur Bildung von sogenannten *speckles* führen kann^{87,89}. Bei den *speckles* wird je nach Zeitpunkt der Bildung zwischen zwei Typen unterschieden. So kann eine frühe *speckle* Entstehung (2 min nach einem Rotlichtpuls) durch PIF3-Mutationen verhindert werden, während eine spätere *speckle* Formierung (6 h nach einem Rotlichtpuls) nicht mehr beeinflusst wird. Interessanterweise kann das N-terminale Modul alleine im Kern zwar keine *speckle* mehr bilden, aber dennoch die

Degradierung von PIF3 starten. Der Zusammenhang zwischen der *speckle* Bildung und Degradation der PIFs ist noch nicht vollständig geklärt. Für die Ausbildung der *speckles* wird nur das C-terminale Modul benötigt, jedoch kann es alleine keine Signaltransduktion initiieren⁹⁶. Ursprünglich wurden die PIFs als Interaktionspartner des C-Terminus von PhyB (645-1210) identifiziert⁹⁷. Durch weitere Experimente stellte sich jedoch heraus, dass beide Module unabhängig voneinander in der Lage sind PIF3 zu binden⁷⁶⁻⁷⁸.

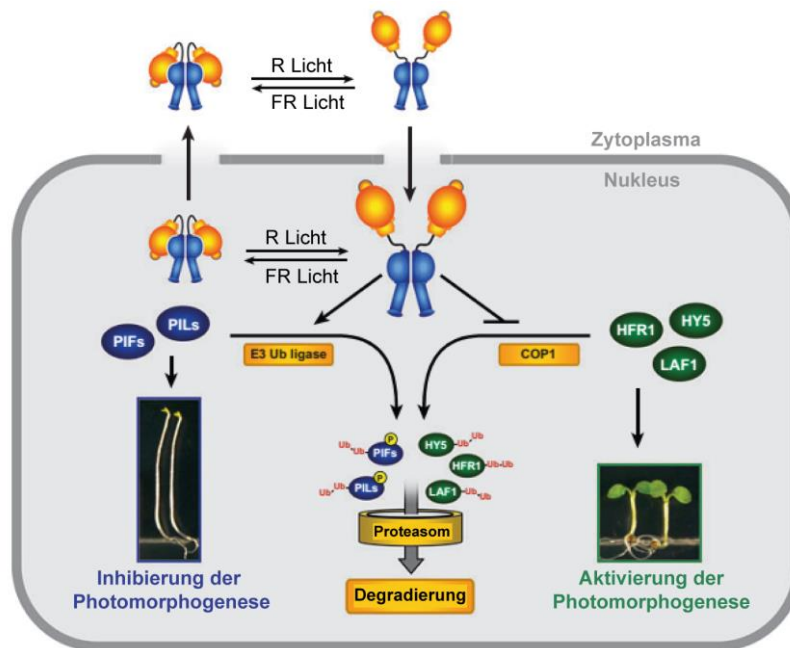


Abbildung 1.14: Lichtinduzierten Signalwege der Phytochrome im Nucleus. Die Bestrahlung mit rotem Licht (R) führt zur Bildung der P_{fr} Form der Phytochrome, die in den Nucleus eintritt und den Abbau der PIF (Phytochrominteraktionsfaktor) und PIL (engl.: *PIF3-like*) Proteine initiiert. Sie werden durch eine E3-Ubiquitin-Ligase markiert. Der Abbau erfolgt durch das 26S Proteasom. Weiterhin wird COP1 (engl.: *Constitutive photomorphogenic 1*) degradiert, welches die positiven Transkriptionsfaktoren der Photomorphogenese (HY5 (engl.: *Long hypocotyl 5*), LAF1 (engl.: *Long after far-red light 1*) und HFR1 (engl.: *Long hypocotyl in far-red 1*) durch Ubiquitinulierung abbaut. Durch die Bestrahlung mit dunkelrotem Licht (engl.: *Far-red*; kurz: FR) erfolgt der Austritt aus dem Nucleus¹¹.

Es ist außerdem bekannt, dass Phytochrome mit den Phosphatasen PAPP2c (Phytochrom-assoziierte Proteinphosphatase des Typs 2c) und PAPP5 (Phytochrom-assoziierte Proteinphosphatase des Typs 5) im Nucleus interagieren^{75,74}. Die dephosphorylierte Form von PhyA und PhyB zeigt eine höhere Affinität gegenüber PIF3^{58,59}. Neben weiteren Interaktionspartnern sind auch die Photorezeptoren Cryptochrom 1 und 2

in der Lage mit Phytochromen in Interaktionen zu treten. So interagiert beispielsweise PhyB mit Cry2 im Kern^{98,99}.

1.4.2 Zytosolische Signaltransduktion

Nicht alle physiologische Antworten lassen sich durch die Genregulation im Nukleus erklären. So treten auch Rotlicht-/Dunkelrotlicht-abhängige Änderungen innerhalb von Sekunden auf^{100,101}, für die eine Lokalisation der Phytochrome in den Nukleus zu langsam abläuft. Weiterhin sind auch Proteine bekannt, die mit Phytochrome im Zytosol interagieren. So interagiert Phytochrom A mit Phototropinen, die an der Plasmamembran gebunden sind¹⁰². Weiterhin bindet die P_{fr} Form von AtPhyA und AtPhyB das zytosolische Protein PKS1 (Proteinkinase Substrate 1) und NDPK2 (Nukleare Diphosphatekinase 2)^{103,104}. Auch wenn eine Kolo-kalisierung von PhyB und PAPP5 im Nukleus beobachtet wurde⁷⁴, kann eine Interaktion im Zytosol nicht ausgeschlossen werden. So ist bekannt, dass PAPP5 die Scharnierregion von PhyA dephosphoryliert, was eine höhere Affinität gegenüber NDPK2 bewirkt⁷⁴.

1.5 Phosphatasen als Interaktionspartner

Die lichtabhängige Signalgebung in Pflanzen wird durch posttranslationale Modifikationen reguliert, wie zum Beispiel Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen. Dabei ist zu beachten, dass die Anzahl von identifizierten Kinasen deutlich über der Anzahl identifizierter Phosphatasen liegt. So wurden in *A. thaliana* über 1000 Kinasen¹⁰⁵ gefunden, jedoch nur 150 Phosphatasen¹⁰⁶. Phosphorylierungen können prinzipiell an neun verschiedenen Aminosäuren auftreten (Arginin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Histidin, Lysin, Serin, Threonin und Tyrosin). Die Mehrzahl an Phosphorylierungen treten in eukaryotischen Systemen an Serinen auf (86,4 %), gefolgt von Threoninen (11,8 %) und Tyrosinen (1,8 %)¹⁰⁷. Die Übertragung einer negativ geladenen Phosphatgruppe beeinflusst in Phytochromen die spektralen Eigenschaften, wie auch die Affinität gegenüber Bindungspartnern^{74,108,109}.

Proteinphosphatasen sind Metalloproteine, in deren aktivem Zentrum zwei Metallionen binden¹¹⁰. Sie können auf Grund ihres Substrats in Serin/Threonin Phosphatasen, Tyrosin Phosphatasen und Aspartat-basierende Phosphatasen kategorisiert werden. Die Serin-/Threonin-spezifischen Phosphatasen können wiederum in

zwei weitere Klassen unterteilt werden: die PPPs (Phosphoprotein Phosphatase) und die PPMs (metallionenabhängige Proteinphosphatase), wobei die PPPs durch Sequenz und Struktur in Pflanzen noch in sieben weitere Subklassen unterteilt werden können. Die PPM Phosphatase, auch als PP2C bezeichnet, unterscheiden sich hierbei von den PPP Phosphatase durch ihre Sequenzen, Metallionenabhängigkeit und Sensitivität gegenüber bestimmten Inhibitoren¹¹¹ (siehe Abbildung 1.15).

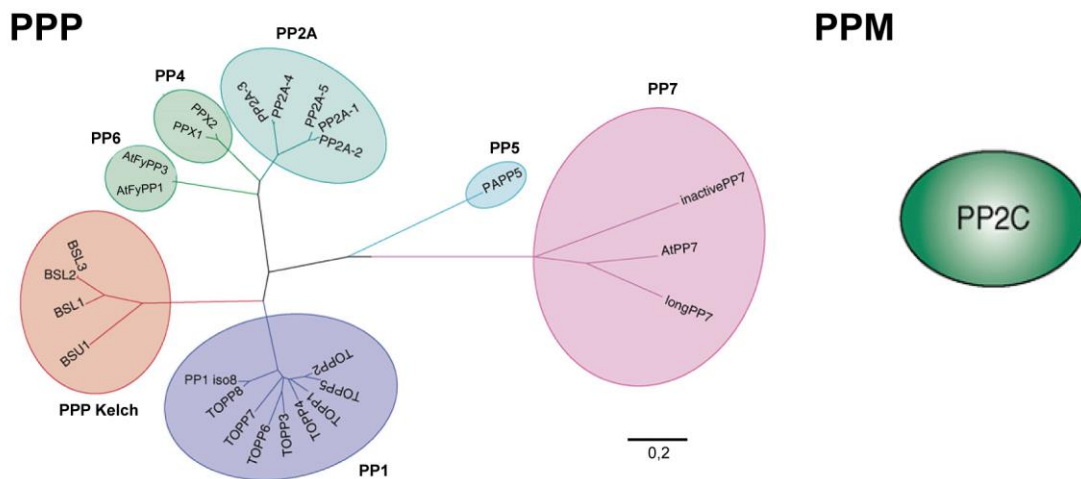


Abbildung 1.15: Klassifikation der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatase. Die Familie der PPPs (Phosphoprotein Phosphatase) kann in sieben weitere Klassen unterteilt werden. Die PPM (Phosphatase, die Metallionen-angewiesen sind) Familie wird auch als PP2C bezeichnet, da keine weitere Unterteilung vorgenommen wird. Der Balken repräsentiert 0,2 substituierte Aminosäuren¹¹¹.

Die PPP Phosphatase bestehen fast alle aus einer katalytischen Untereinheit sowie ein oder zwei weiteren Untereinheiten. Durch die Variation der Untereinheiten wird die Aktivität, die Substratspezifität und/oder die Lokalisierung der PPP Phosphatase kontrolliert, und so viele zelluläre Funktionen reguliert¹¹²⁻¹¹⁵. Eine Ausnahme bilden hierbei PP5 und PP7 Phosphatase, die keine separaten Untereinheiten besitzen. Sie setzen sich aus einer katalytischen Domäne, die denen von PP1 und PP2A ähnelt, einer N-terminalen Domäne und einer C-terminalen Subdomäne zusammen¹¹⁶⁻¹¹⁸. Bei PP5 erfolgt durch die N-terminale Domäne eine Inhibition der Phosphatase, während bei PP7 Disulfidbrücken oder eine Metallreduzierung an der Regulation der Phosphatase beteiligt sein könnten¹¹⁹. Von PP2A ist bekannt, dass sie auch Komplexe mit anderen Phosphatase bilden kann, was die Diversität der Phosphatase weiter erhöht¹²⁰.

PPM Phosphatasen wurden auf Grund ihrer Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}) sowie ihrer Sensitivität gegenüber Okadasäure und weiteren Inhibitoren der PPPasen entdeckt. Weiterhin besitzen sie, wie auch PP5 und PP7, keine weiteren Untereinheiten, können jedoch N- oder C-Terminal zusätzliche Domänen haben. Ob diese die Aktivität der Phosphatase und/oder die Substratspezifität regulieren, ist noch nicht abschließend geklärt.

Obwohl die PPP und PPM Phosphatasen wahrscheinlich von zwei unterschiedlichen Genen resultieren und nur eine geringe Sequenzidentität aufweisen, besitzen die Strukturen und insbesondere die katalytischen Taschen eine hohe Ähnlichkeit. Bei beiden Klassen werden die gebundenen Metalle für die Aktivierung eines Wassermoleküls benötigt, welches dann einen nukleophilen Angriff auf das gebundene Phosphation nach dem S_N2 -Mechanismus ausführt¹²¹⁻¹²³. Für die Hydrolyse der Phosphoesterbindung in PPP Phosphatasen werden neun konservierte Aminosäuren benötigt, die für die Koordination der Metallionen, Orientierung der Phosphatgruppe des Substrats für den nukleophilen Angriffs und für die notwendige Protonierung der Abgangsgruppe zuständig sind. An der oktaedrischen Koordination der Metallionen sind neben den Aminosäuren zwei Wassermoleküle und der Phosphatrest beteiligt¹¹⁸ (siehe Abbildung 1.16).

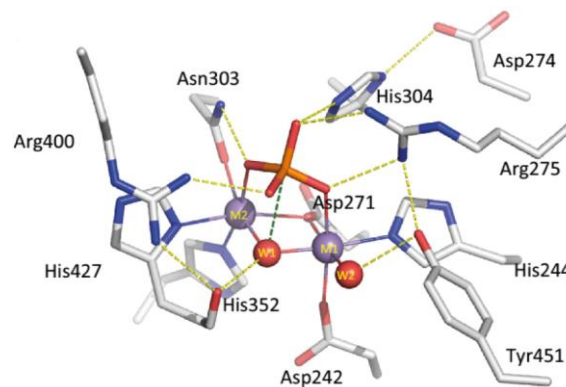


Abbildung 1.16: Detaillierte Ansicht der Kontakte innerhalb der aktiven Tasche von PP5. Die Manganionen sind oktaedrisch von sechs Liganden umgeben. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gelb gestrichelte Linien dargestellt und Metall-Liganden-Bindungen als schwarze Linien. Die grün gestrichelte Linie markiert die geringe Distanz zwischen dem Wasser W1 und dem Phosphation. (PDC Code: 1S95)¹²⁴.

Okadasäure, ein komplexer Polyether, war der erste identifizierte natürliche Inhibitor der PPPasen¹²⁵. Neben Microcystin-LR, einem toxischen Heptapeptid, und Cantharidin, einem zyklischen Anhydrid^{126,127}, wurden noch weitere natürliche Inhibitoren

identifiziert, die alle die aktive Tasche blockieren. Obwohl die Inhibitoren unterschiedliche Strukturen aufweisen, inhibieren sie alle Mitglieder der PPP Familie, bis auf PP7, das eine zusätzliche Region innerhalb der katalytischen Tasche besitzt, die eine Inhibition verhindert^{127,128}. Beispielhaft ist die Bindung von Cantharidin dargestellt, das die Metallionen der aktiven Tasche bindet und so die Wassermoleküle verdrängt¹²⁹ (siehe Abbildung 1.17).

Die Bindungsaffinität und Inhibition der Aktivität gegenüber einzelnen Mitgliedern variiert^{130,131}. Nicht konservierte Reste innerhalb der katalytischen Tasche, in welche die Inhibitoren binden, könnten eine sterische Hinderung bewirken und die unterschiedlich starke Inhibitionen der Aktivitäten erklären¹²⁴.

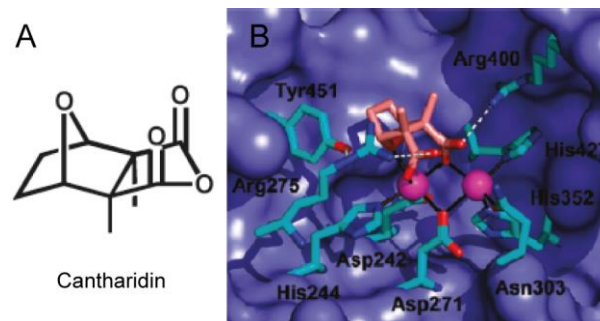


Abbildung 1.17: Bindung von Cantharidin in die aktive Tasche von *Homo sapiens* PP5. (A) Die Struktur von Cantharidin. (B) Cantharidin nimmt die Position der zwei Wassermoleküle in der aktiven Tasche ein. Die Bindung des Inhibitors wird durch drei Reste (275, R400, Y451) ausgebildet. Die Manganionen gehen weiterhin Bindungen zu den entsprechenden Aminosäuren (D242, H244, D271, N303, H352, H427,) ein¹²⁹.

Drei Phosphatasen sind in Pflanzen bekannt, die Phytochrome dephosphorylieren: FyPP (engl.: *Flower-specific phytochrome associated protein phosphatase*)¹⁰⁸, PAPP5⁷⁴ und PAPP2c⁷⁵. FyPP-überexprimierende transgene Pflanzen weisen eine erhöhte Phytochromaktivität bei der Blütenbildung sowie verkürzten Hypokotyle auf, während die Repression von FyPP in transgenen Pflanzen mit einer reduzierten Phytochromaktivität resultiert. Sie gehören zur Klasse der PP6-Phosphatasen¹⁰⁸. PAPP5 ist involviert in die Regulation der Deetiolerung und PAPP2C reguliert die Lichtantworten der Pflanze⁷⁵. Diese Beobachtungen zeigen die Stellung, die den Phosphatasen innerhalb der Signaltransduktion von Phytochromen zukommt.

1.5.1 Phytochrom-assoziierte Protein Phosphatase 5

Obwohl PP5 Phosphatasen in allen Eukaryoten zu finden sind, wurden sie erst relativ spät entdeckt, was vermutlich auf ihre geringe Aktivität *in vivo* sowie ihre niedrige Sequenzidentität zu den anderen Phosphatasen der PPP Klasse zurückzuführen ist¹³². So besitzen die Phosphatasen dieser Familie vor ihrer katalytisch aktiven Domäne drei TPR (engl.: *Tetratricopeptide repeat*) *Repeats*, die zusammen mit einem C-terminalen Motiv die katalytische Tasche der PP2A Domäne blockieren. Für die katalytische Aktivität benötigen die Phosphatasen zusätzlich zwei Manganionen. Verbunden ist die TPR mit der PP2A Domäne über einen langen helikalen Linker, in dem sich zusätzlich eine PPIase (Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase) ähnliche Sequenz befinden soll¹³³. PPIasen sind molekulare Chaperone, welche die Proteinfaltung an Cysteinen regulieren.

Die Kristallstruktur der Phosphatase PP5 aus *Homo sapiens* (*Hs*) konnte mit einer Auflösung von 2,9 Å gelöst werden (siehe Abbildung 1.18).

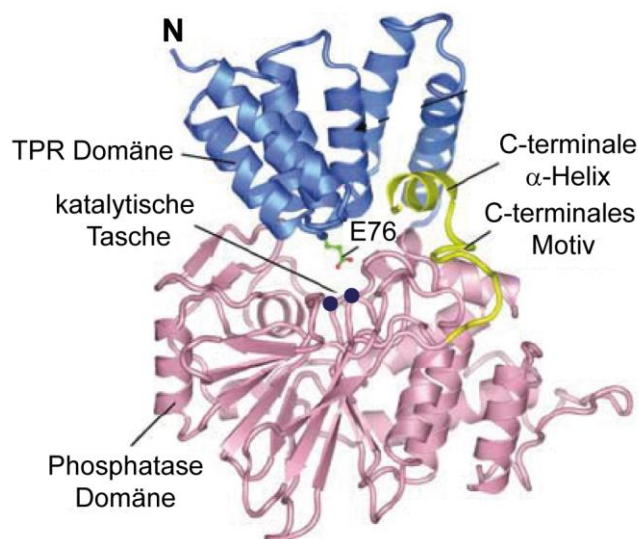


Abbildung 1.18: Kristallstruktur von PP5 aus *Homo sapiens*. Die TPR (engl.: *Tetratricopeptide repeat*) Domäne ist in blau, die Phosphatase Domäne in rosa und das C-terminale inibierende Motiv in gelb koloriert. Die gebundenen Metallionen sind als blaue Kugeln dargestellt. Der Rest E76 der TPR Domäne bindet in die aktive Tasche der Phosphatase Domäne (PDB Code: 1WAO)¹¹⁸.

Jedes TPR Motiv besteht hierbei meist aus nur 34 Aminosäuren, die sich als antiparallele α -Helices anordnen. Die *Repeats* sind übereinander in drei Paaren angeordnet, wodurch eine superhelikale tertiäre Struktur entsteht. Der lange helikale Linker, wird für eine zusätzliche Stabilisierung der TPR Domäne benötigt¹³⁴. Die

streng konservierte PP2A Domäne bildet in der Mitte eine β -Sandwich Struktur aus, die von α -Helices umgeben ist. Über eine lange Schleifenregion schließt sich im C-terminalen inhibierenden Motiv noch eine kurze α -Helix an, die über der katalytischen Tasche positioniert ist¹¹⁸. Weiterhin ist im C-terminalen Motiv ein mögliches Kernlokalisierungssignal zu finden (462-477)¹³⁵.

Proteolytische Studien haben gezeigt, dass sich die Aktivität der Phosphatasen erheblich steigern lässt, wenn die TPR Domäne und/oder die 13 C-terminalen Aminosäuren entfernt werden¹³⁶⁻¹³⁸. Hierbei erhöht die Mutation der Aminosäure E76 (E61 in Pflanzen) des TPR2 *Repeats* die Phosphatase-Aktivität um das zehnfache¹³⁶. Des Weiteren können PP5 Phosphatasen auch durch Zugabe von langkettigen, ungesättigten Fettsäuren, hier im speziellen Arachidonsäure, aktiviert werden^{137,139}. Die geringe Löslichkeit von Arachidonsäure in wässrigen Medien kann durch die Addition eines Coenzym A-Restes erhöht werden, so dass eine Aktivierung bei physiologischen Konzentrationen (1 μ M) möglich ist¹⁴⁰. Die gebundenen Fettsäuren führen wahrscheinlich zu einer konformationellen Änderung des Enzyms, so dass die katalytische Tasche zugänglich wird. Inhibiert werden die Phosphatasen durch die Zugabe von Okadasäure oder Microcystin¹⁴¹.

In Pflanzen gibt es zwei Isoformen der PP5-Phosphatasen: Eine Isoform mit einer Größe von circa 60 kDa, deren Funktion bisher unerforscht ist, und eine Isoform der Größe von circa 55 kDa. Die größere Variante besitzt zwei zusätzliche Transmembrandomänen, die am Ende des Linkers platziert sind. Weiterhin bindet sie an das endoplasmatische Retikulum, während die verkürzte Variante sowohl im Nukleus als auch im Zytosol zu finden ist¹⁴². Im Nukleus ist sie jedoch nur in geringen Konzentrationen vorhanden, im Gegensatz zu Untersuchungen der *HsPP5*^{132,143}.

Für die 55 kDa Variante von *A. thaliana* zeigt sich weiterhin, dass ein Hitzeschock (42 °C) vermutlich die Umwandlung der monomeren in eine hochmolekulare Spezies bewirkt. Studien zeigen, dass die hochmolekulare Spezies eine Chaperonfunktionalität aufzuweisen scheint, während die Phosphataseaktivität um 50 % reduziert ist. Deletionsvarianten zeigten, dass die Chaperonfunktionalität nicht in der TPR Domäne lokalisiert ist. Eine Punktmutation (H290N) in der katalytischen Tasche, die eine erheblichen Reduktion der Phosphataseaktivität zur Folge hat, zeigt interessanterweise eine dreifach höhere Chaperonaktivität. Eine geringere Phosphataseaktivität

scheint die Chaperonaktivität zu fördern. Durch die zwei spezifischen Oligomerisationszustände von PAPP5 ist es möglich, dass es nach einem Hitzeschock in Pflanzen die Regeneration wichtiger Proteine bewirkt¹⁴⁴. Eine Überproduktion von PAPP5 führte zudem zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Hitzeschocks.

PAPP5 interagiert mit dem Chaperon Hsp90¹⁴³ sowie den Phytochromen A und B und dephosphoryliert selektiv ihre P_{fr} Form¹⁴⁵. Im Dunklen befinden sich PhyB und PAPP5 im Zytoplasma, kolokalisieren aber bei Rotlichtexposition in den Kern. Die Dephosphorylierung von PhyA führt zu einer Erhöhung der Stabilität des Phytochroms und zu einer höheren Affinität gegenüber NPK2^{104,146}. Für *AsPhyA* konnte gezeigt werden, dass die TPR Domäne an die HKR Domäne bindet, aber im NTE Aminosäuren dephosphoryliert⁷⁴.

Weiterhin ist PAPP5 Teil eines zytosolischen Proteinkomplexes, der Mg-Protochlorophyllin IX bindet. Vermutlich kann PAPP5 ein Ungleichgewicht in der Tetrapyrrolsynthese durch die Akkumulation von Mg-Protochlorophyllin IX erkennen und agiert als ein Repressor der Chloroplastbiogenese und -entwicklung. Somit verbindet PAPP5 lichtgesteuerte Signalwege mit der Signaltransduktion der Plastide¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

1.5.2 Phytochrom-assoziierte Protein Phosphatase 2C

Die Phytochrom-assoziierte Phosphatase, PAPP2C gehört zur Serin-/Threonin-PP2C-Familie, die mittlerweile 80 putative Mitglieder in *A. thaliana* umfasst¹⁵⁰⁻¹⁵². Sie ist, wie alle Familienmitglieder dieser Gruppe, unempfindlich gegenüber Okadasäure und benötigt zur Aktivierung zweiwertige Kationen, wie beispielsweise Mangan oder Magnesium^{121,153}. Die Proteinarchitektur, sowie daraus bedingt der katalytische Mechanismus der PP2C-Phosphatasen, entsprechen dem der Phosphatasen aus der PPP-Klasse, auch wenn die Sequenzidentitäten verhältnismäßig gering sind.

Die Struktur eines Homologs der pflanzlichen Phosphatase PAPP2c aus *Homo sapiens* ist in nachfolgender Abbildung dargestellt. Sie besitzt eine zusätzliche C-terminale Domäne, die aus drei α -Helices besteht. Die N-terminale katalytische Domäne wird aus einer β -Sandwich-Struktur gebildet, die auf beiden Seiten von α -Helices umgeben ist. Im aktiven Zentrum sind zwei Manganionen gebunden¹²¹.

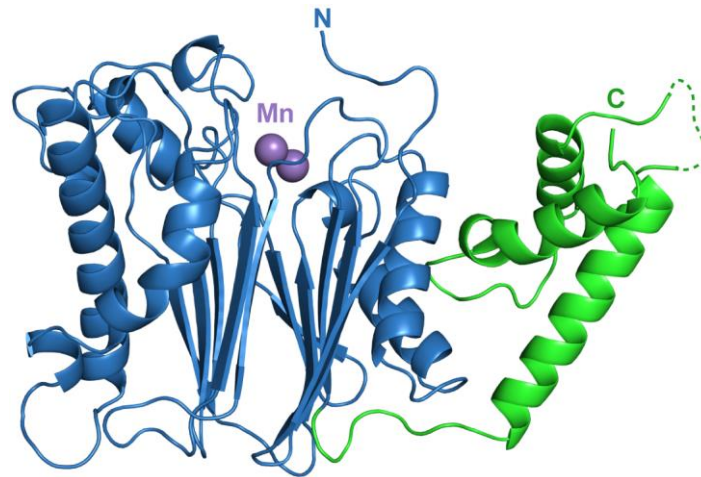


Abbildung 1.19: Struktur der Phosphatase PP2C aus *Homo sapiens*. Die katalytische Domäne ist in blau, die C-terminale Domäne in grün und die gebundenen Manganionen in lila koloriert (PDB Code: 1A).

Es konnte gezeigt werden, dass PAPP2C sowohl mit PhyA als auch PhyB im Nukleus interagieren kann. Hierbei ist für die Bindung der Phosphatase die PHY Domäne verantwortlich, deren Bindungsstärke steigt, wenn das Phytochrom in der P_{fr} Form vorliegt. Obwohl die PHY Domäne für die Bindung der Phosphatase zuständig ist, werden sowohl in PhyA als auch in PhyB Aminosäuren in der N-terminalen Erweiterung dephosphoryliert⁷⁵. Ein fehlender Phänotyp für PAPP2C-*Knockout*-Pflanzen legt die Vermutung nahe, dass die Aufgaben von PAPP2C auch von einer anderen Phosphatase ausgeführt werden können⁷⁵. Bekannt ist, dass PAPP5 ebenfalls die NTE von PhyA dephosphoryliert⁷⁴.

Neben der Bindung und Dephosphorylierung von Phytochromen ist zudem eine Interaktion mit dem Resistenzprotein RPW8.2 bekannt, durch die der Salizylsäure-abhängige Abwehrmechanismus negativ beeinflusst wird¹⁵⁴.

1.6 Zielsetzung

2014 konnte die erste Struktur eines photosensorischen Moduls des pflanzlichen Phytochrom B im Grundzustand gelöst werden. Durch die Analyse von bakteriellen Strukturen, die sowohl im Grundzustand als auch in der aktiven Form kristallisiert werden konnten, wurden Modelle entwickelt, welche die strukturellen Änderungen während der Photokonversion beschreiben.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, die Gültigkeit dieser strukturellen Änderungen für pflanzliche Phytochrome anhand Phytochrom B aus *Arabidopsis thaliana* zu überprüfen und weitere eventuelle lichtabhängige Änderungen zu identifizieren und lokalisieren. Weiterhin sollte der Einfluss der pflanzenspezifische N-terminale Erweiterung (NTE) auf das Phytochrom näher untersucht werden. Da die NTE nicht in der Kristallstruktur enthalten war, sollte durch Wasserstoff-Deuterium-Austauschmessungen ein mögliches ortsspezifisches Interaktionsmodell zwischen NTE und den PAS-GAF-PHY Domänen erarbeitet werden.

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung stellen wichtige Schritte in der Phytochrom-induzierten Signaltransduktion dar. Bislang konnten drei Phosphatasen identifiziert werden, die mit Phytochromen interagieren. Von diesen drei Phosphatasen stellt speziell PAPP5 ein interessantes Target dar, da diese Phosphatase in der Lage ist sich selber zu inhibieren. In dieser Arbeit sollte deshalb durch röntgenkristallographische Untersuchungen die speziell hierfür verantwortlichen Aminosäuren identifiziert werden. Auch sollte ein Mechanismus für die Aktivierung von PAPP5 durch Fettsäuren entwickelt werden.

Die Ausbeute rekombinant hergestellter pflanzlicher Phytochrome ist sehr gering. Aus diesem Grund sollte letztlich ein Hybrid-System entwickelt werden, das einen leichteren Zugang zu pflanzlichen Domänen erlaubt.

2 Material

2.1 Geräte

In den folgenden Tabellen finden sich in alphabetischer Reihenfolge die in dieser Arbeit verwendete Geräte (Tabelle 2.1), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 2.2), Chemikalien (Tabelle 2.3) und Enzyme (Tabelle 2.4). Im weiteren Verlauf des Textes wurde darauf verzichtet, den Firmen- oder Herstellernamen nochmals aufzuführen.

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Geräte.

Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
ÄKTA Purifier	Box 900	
Fraktionskollektor	Frac-950	<i>GE Healthcare</i>
Detektor	pH/C-900	<i>GE Healthcare</i>
Pumpe	P-900	<i>GE Healthcare</i>
Autoklav	T-Line™	<i>Fedegari</i>
	VX150	<i>Systec</i>
Bidest. Wasser Anlage	Seralpur Pro90CN	<i>Seral</i>
Blottingapparatur		<i>peQLab</i>
Brutschrank	BFED-53	<i>Binder</i>
	Incu-Line	<i>VWR</i>
CD-Spektrometer	J-810 Spektropolarimeter	<i>Jasco</i>
Chromatografie-Säulen	Superdex200 26/60 PG	<i>GE Healthcare</i>
	Superdex200 10/300 GL	<i>GE Healthcare</i>
	Superdex200 16/60 (selbstgepackt)	<i>GE Healthcare</i>
DLS Instrument	SpectroLight 600/610	<i>Xtal Concepts</i>
Elektrophorese		
Elektrophoresekammer für SDS Gele	Mighty Small II	<i>Hoefer Scientific</i>
Elektrophoresekammer für Agarosegele		<i>Feinmechanische Werkstatt Philipps-Universität Marburg</i>
Spannungsquelle	EPS 300	<i>GE Healthcare</i>
Dokumentationssystem		
Kamera		<i>UVP</i>
Transilluminator		<i>Herolab</i>
	DP-CF-011.C	<i>Vilber Lourmat</i>
Glaskugelmühle	Fastprep 24	<i>MP Biomedicals</i>
automatisches HDX-System		
Autosampler	LEAP PAL	<i>LEAP Technologies</i>
UPLC	ACQUITY UPLC M-Class	<i>Waters</i>
Masse	Synapt G2 Si	<i>Waters</i>
Pepsin Säule	Enzymate BEH	<i>Waters</i>
UPLC Säule	BEH C18 column	<i>Waters</i>
French Press		<i>Thermo Fischer Scientific</i>
Hochdruckzelle		<i>Feinmechanische Werkstatt Philipps-Universität Marburg</i>

Geräte	Typbezeichnung	Hersteller
Kristallisation		
Kristallisationsroboter	Honeybee 963	<i>Zinsser Analytic</i>
Dokumentation	Rock Imager	<i>Formulatrix</i>
LED Lampen	475 nm (B56L5111P; 20-30 cd) 625 nm (5RAA5111P; 60-75 cd) 735 nm (ELD-720-524; 7,5 cd)	<i>Roithner Lasertechnik</i>
Microscale Thermophoresis Instrument	Monolith NT.115	<i>Nanotemper Technologies</i>
Mikroskop	SZ 60 und B 601 MZ8	<i>Olympus</i> <i>Leica</i>
Peristaltik-Pumpe	P-1	<i>Pharmacia</i>
NGC-System	NGC Quest 10 Plus System	<i>Biorad</i>
Fraktionskollektor	BioFrac	<i>Biorad</i>
Detektor	Multi-Wavelength	<i>Biorad</i>
pH-Meter	Basic Meter PB-11 pH 7110	<i>Sartorius</i> <i>Ino Lab</i>
Photometer	Genesys 10 UV scanning	<i>Thermo spectronic</i>
Nanodrop	ND-1000 Ultrospec™ OD600	<i>peqlab</i> <i>GE Healthcare</i> <i>Implen</i>
Pipetten	Research	<i>Eppendorf</i>
Quarzküvetten	110-QS 1 mm	<i>Hellma</i>
Realtime PCR	Rotor Gene Q	<i>Qiagen</i>
Absorptionssystem	MyIQ RT-PCR IQ5	<i>Biorad</i> <i>Biorad</i>
Schüttelinkubatoren	Certomat IS EB swip TH25 Multitron eco	<i>Sartorius</i> <i>Edmund Böhler</i> <i>Infors</i>
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400 Biometra	<i>PERKIN ELMER</i> <i>Tpersonal</i>
Thermomixer	Comfort	<i>Eppendorf</i>
Ultraschallsonde	Sonoplus HD 200	<i>Bandelin</i>
UV-VIS-Spektrometer	Agilent 8453E UV/Visible V-660	<i>Agilent Technologies</i> <i>Jasco</i>
Vortexer	REAX 2000	<i>Heidolph</i>
Waagen	PC2200 und Labstyle 54 S2002	<i>Mettler</i> <i>Denver Instruments</i>
Wasserbad	NK22	<i>Haake</i>
Zentrifugen		
Standzentrifuge	Centrifuge 5810R und S804R	<i>Eppendorf</i>
Standzentrifuge	J2-HS und J2-21	<i>Beckman</i>
Standzentrifuge	RC 5B Plus	<i>Sorvall</i>
Tischzentrifuge	Biofuge pico	<i>Heraeus</i>
Kühlzentrifuge	Biofuge fresco	<i>Heraeus</i>

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Herstellerbezeichnung	Hersteller
Analytische Ni-NTA	Ni-NTA Spin-kit	<i>Qiagen</i>
Dialysemembran	MF™ 0,025 µm VSWP	<i>Millipore</i>
Einmalküvetten	67.734	<i>Sarstedt</i>
Entsalzungssäulen	PD-10 Desalting Column, PD Mini trap G25	<i>GE Healthcare</i>
Falcon tubes	PP-Röhrchen 15 mL/50 mL, steril	<i>Greiner BIOone</i>
Gelextraktionskit	QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
Ionenaustauschersäulen	HiTrap CM FF, HiTrap DEAE FF, HiTrap Q FF	<i>GE Healthcare</i>
Konzentratoren	Amicon Ultra-15 /-5	<i>Merck Millipore</i>
Ni-NTA Säulenmaterial	Ni-NTA Superflow	<i>Qiagen</i>
PCR-Aufreinigungskit	QIAquick PCR Purification Kit	<i>Qiagen</i>
Plasmidpräparationskit	QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen</i>
Spritzenvorsatzfilter	S 0,45	<i>Sarstedt</i>
Kristallisationszubehör	24-wel EasyXtal Platten mit Schraubverschluss und dropguard	<i>Qiagen</i>
	96-wel Innovaplate	<i>Innovadyne</i>
	VIEWseal	<i>Greiner BIOone</i>
	Micromounts	<i>MiTeGen</i>
	CrystalCap HAT™ und Micro-Tools	<i>Hampton Research</i>
Western Blot	ECL detection kit	<i>GE Healthcare</i>
	Hibond-ECL Nitrocellulose Membran	<i>GE Healthcare</i>
	Whatmanpapier 1,5 mm	<i>Carl Roth</i>
Sterilfilter	Röntgenfilm	<i>Kodak</i>
	Ultrafree-MC und Flaschenaufsatzfilter	<i>Millipore</i>

2.3 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2.3: In der Arbeit verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid (30 %)	<i>Roth</i>
Adenosin-5'-(β,γ-imido)triphosphat	<i>Sigma-Aldrich</i>
Adenosin-5'-diphosphat	<i>Sigma-Aldrich</i>
Adenosin-3',5'-zyklisches monophosphat	<i>Sigma-Aldrich</i>
Agar	<i>Roth</i>
Agarose	<i>Invitrogen</i>
Ampicillin	<i>AppliChem</i>
Anti-Penta-His HRP Konjugat	<i>Qiagen</i>
APS	<i>Fluka</i>
Arachidonsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>
Azelainsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>
Bacto-Trypton	<i>Bd</i>
Bacto-Hefeextrakt	<i>Bd</i>

Chemikalie	Hersteller
BC-Assay UP 40840A	<i>Uptima</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva</i>
Decon-90	<i>Decon Laboratories Limited</i>
Dikaliumhydrogenphosphat	<i>Roth</i>
Entwickler	<i>Kodak</i>
Ethanol	<i>J. T. Baker</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
Guanosin-5'-triphosphat	<i>Fermentas</i>
Guanosin-3',5'-zyklisches monophosphat	<i>Fluka</i>
Glycerin	<i>Roth</i>
HEPES	<i>Fluka</i>
Imidazol	<i>Merck</i>
IPTG	<i>Gerbu</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Roth</i>
Kanamycin	<i>AppliChem</i>
Kristallisationsscreens	<i>Qiagen</i>
Linolsäure	<i>Sigma-Aldrich</i>
MassRuler DNA Ladder Mix	<i>Fermentas</i>
β -Mercaptoethanol	<i>Roth</i>
Natriumchlorid	<i>Riedel-de Haën</i>
Na ₂ EDTA	<i>Merck</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck</i>
Ölsäure	<i>Fluka</i>
Palmitinsäure	<i>Fluka</i>
PMSF	<i>Fluka</i>
Salzsäure	<i>Riedel-de Haën</i>
SDS	<i>Serva</i>
Streptomycin	<i>Applichem</i>
Sypro orange	<i>Invitrogen</i>
TEMED	<i>Sigma</i>
Tinte Königsblau 4001	<i>Roth</i>
Traumatic acid	<i>Fluka</i>
Tris	<i>Fluka</i>
TWEEN-20	<i>Roth</i>
Unstained Protein Molecular Weight Maker	<i>Fermentas</i>
Virkon	<i>Tetenal med</i>
Zinkacetat	<i>Fluka</i>

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen *Sigma-Aldrich*, *Fluka*, *Merck* oder *Roth* bezogen.

2.4 Enzyme

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzyme	Hersteller
BSA 10 mg/mL	<i>New England Biolabs</i>
DNAseI	<i>Boehringer</i>
Lysozym 50 mg/mL	<i>Serva</i>
Phusion HiFi-DNA-Polymerase (2 U/ μ L)	<i>New England Biolabs</i>
T4-DNA-Ligase (400 U/ μ L)	<i>New England Biolabs</i>
Restriktionsenzyme (10-20 U/ μ L)	<i>New England Biolabs</i>

2.5 Vektoren und Plasmide

2.5.1 pCDF Duet-1

Der pCDF Duet-1 Vektor (*Novagen, Merck KGaA*) verfügt über zwei *Multiple Cloning Sites* (MCS), welche die rekombinante Produktion von zwei Proteinen aus zwei Monocyclons ermöglicht. Am Anfang der ersten MCS ist ein Hexa-Histidin-Tag kodiert sowie ein Strep-Tag am Ende der zweiten MCS. Diese Tags ermöglichen eine Aufreinigung mittels Ni-NTA-, beziehungsweise Streptavidin-Affinitätschromatographie. Beide MCSs haben eine vorgeschaltete ribosomale Bindungsstelle (rbs) sowie einen *lac*-Operator und unterliegen der Kontrolle durch separate T7 *lac*-Promotoren. Durch diese wird die Steuerung der Proteinproduktion über IPTG-Zugabe und Induktion der chromosomalen T7 RNA Polymerase ermöglicht¹⁵⁵. Der Vektor besitzt einen CDF Replikationsursprung (*ori*) und eine Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz¹⁵⁶. Die Basensequenz mit den regulatorischen Elementen und den Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen ist in Abbildung 2.1 dargestellt.



Abbildung 2.1: Basensequenz des pCDF Duet-1 Vektors mit regulatorische Elementen sowie Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen¹⁵⁶.

2.5.2 pET-28a(+)

Der pET-28a(+) Vektor der Firma *Novagen (Merck KGaA)* verfügt über eine MCS, in der das Zielprotein mit einem N-terminalen oder C-terminalen Hexa-Histidin-Tag produziert werden kann. Die N-terminale Variante enthält zwischen Tag und Proteinsequenz zusätzlich zur Abspaltung des Tags nach Aufreinigung eine Thrombin-Schnittstelle. Die MCS hat eine vorgeschaltete rbs sowie einen lac-Operator und unterliegt der Kontrolle durch separate T7 lac-Promotoren. Dadurch wird die Steuerung der Proteinproduktion über IPTG-Zugabe und Induktion der chromosomalen T7 RNA Polymerase ermöglicht¹⁵⁵. Der Vektor besitzt einen f1 ori und eine Kanamycin-Resistenz¹⁵⁷. Die Basensequenz mit den regulatorischen Elementen und den Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

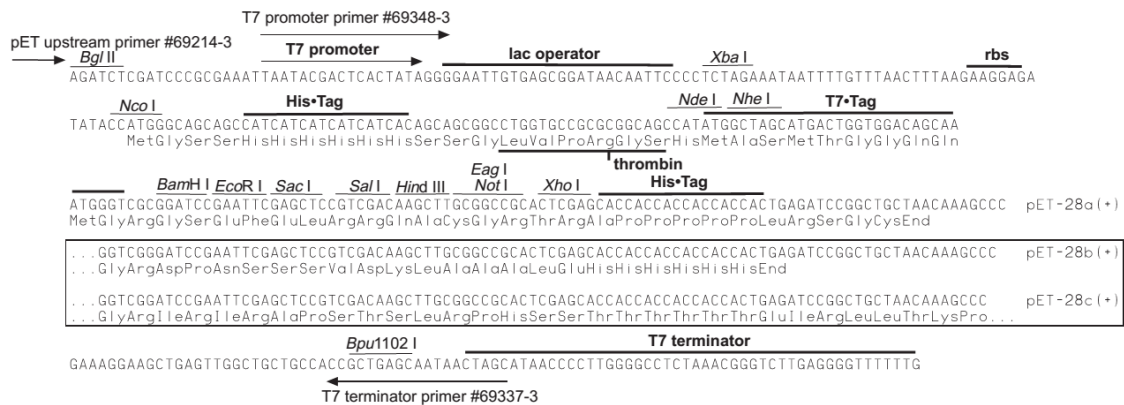


Abbildung 2.2: Basensequenz des pet-28a(+) Vektors mit regulatorische Elementen sowie Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen¹⁵⁷.

2.5.3 pPROLar.A122

Beim pPROLar.A122 Vektor (Clontech) wird die Proteinexpression über einen Hybridpromotor (P *lac/ara-1*) mittels IPTG und Arabinose gesteuert¹⁵⁸. Der Vektor besitzt einen p15A ori und eine Kanamycin-Resistenz. Eine Vektorkarte ist in Abbildung 2.3 dargestellt, in der die regulatorischen Elemente hervorgehoben sind. Da pPROLar.A122 kein *lacI* besitzt, das für den Repressor kodieren kann, erfolgt die Verwendung als Expressionsplasmid nur in Stämmen die hierzu in der Lage sind, wie etwa BL21 PRO. Für die Proteinproduktion in dieser Arbeit wurde eine modifizierte Form dieses Vektors verwendet. Es wurde zusätzlich zur Gensequenz N-terminal eine rbs und C-terminal ein Hexa-Histidin-Tag eingebracht.

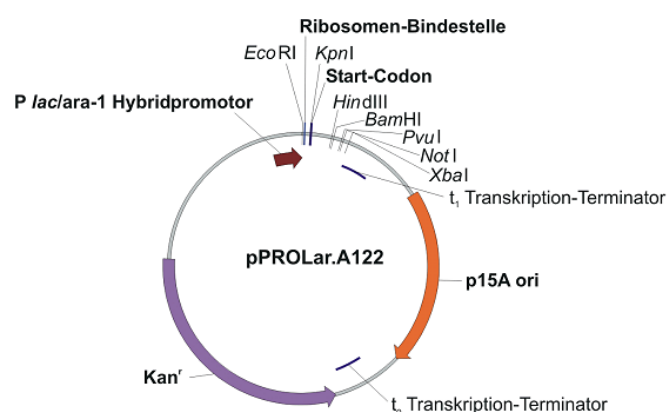


Abbildung 2.3: Modifizierte Vektorkarte von pPROLar.A122, in der die regulatorischen Elemente hervorgehoben sind¹⁵⁸.

2.5.4 p171

Zur Verfügung gestellt wurde das Plasmid p171 vom Arbeitskreis *Hughes* (Universität Gießen). Es handelt sich um einen pQE12 Vektor (*Qiagen*), in welchen die Gene für die Häm-Oxygenase (*ho*; ORF ID: *sll1184*) und Biliverdin-Reduktase (*pcya*; ORF ID: *slr0116*) aus *Synechocystis sp.* kloniert wurden, die für die Produktion des Bilin-Cofaktors aus Häm b sowie den Einbau des Cofaktors in das Protein verantwortlich sind. Da das Gen unter der Kontrolle eines *lac*-Operators steht, kann die Expression durch die Zugabe von IPTG induziert werden. Ein enthaltener T5 Promoter aus der T5 Bakteriophage wird durch die *E. coli* RNA-Polymerase erkannt. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin-Resistenz¹⁵⁹.

2.5.5 pMH001

Das Plasmid pMH001 wurde vom Arbeitskreis *Zurbriggen* (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um einen pPROLar.A122 Vektor (*Clontech*), in welchen das für Phytochrome B (1-651) aus *Arabidopsis thaliana* kodierende Gen kloniert wurde. C-terminal zum Protein befindet sich ein Hexa-Histidin-Tag. Die Proteinexpression wird über einen Hybridpromotor (P *lac/ara-1*) mit IPTG und Arabinose gesteuert. Der Vektor besitzt eine Kanamycin-Resistenz.

2.5.6 pIS24

Das Plasmid pIS24 wurde vom Arbeitskreis *Fankhauser* (Universität Lausanne) zur Verfügung gestellt. Das darauf enthaltene Gen codiert Phytochrom A aus *Arabidopsis thaliana* sowie einen C-terminalen Strep-Tag. Oberhalb des zu exprimierenden Gens befindet sich der T7-Promotor, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Das Gen steht unter Kontrolle des *lac*-Operators, so dass die Expression durch IPTG induziert werden kann. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin-Resistenz.

2.6 Synthetische Gene

Die folgenden Gensequenzen für PAPP5 (UniProtKB: Q84XU2-2) und PAPP2c (UniProtKB: F4I1B4-1) und Phytochrom B (891-1172) (UniProtKB: P14713-1) aus *Arabidopsis thaliana* wurden bei der Firma *Gene Art* bestellt und in einem pMA-T-Vektor (Ampicillin-Resistenz, PAPP2c, PhyB), beziehungsweise pMK-RQ (Kanamycin-Resistenz, PAPP5) kloniert geliefert. Die Kodons wurden für eine Expression in *E. coli*

optimiert. Den Sequenzen wurden mehrere Schnittstellen vorangestellt, so dass sie durch verschiedene Kombinationen von Restriktionsenzymen direkt in die Vektoren: pET-28a(+), pCDF Duet-1, pET-41a und pGEX-4T-2 kloniert werden können. Weiterhin wurden auf diesem Wege eine Thrombin-Schnittstelle für die Vektoren pCDF Duet-1 und pET-41a eingefügt (siehe Tabelle 2.5). Die Gensequenz für PAPP5 besitzt weiterhin eine *HindIII*-Schnittstelle nach der TPR Domäne, so dass es möglich ist lediglich diese Domäne in einen Vektor zu klonieren.

Tabelle 2.5: Übersicht über die zu verwendenden Restriktionsenzyme um die Gensequenzen direkt in die unterschiedlichen Vektoren klonieren zu können.

Vektoren	Restriktionsenzyme
pET-28a(+)	<i>NdeI</i> , <i>Sall</i>
pCDF Duet-1	<i>EcoRI</i> , <i>Sall</i> oder <i>BamHI</i> und <i>Sall</i>
pET-41a	<i>SacII</i> , <i>Sall</i>
pGEX-4T-2	<i>BamHI</i> , <i>Sall</i>

PAPP5(1-485) aus *Arabidopsis thaliana*

CCGCGC GGAATTCCTCGTGCCGCGC GGATCC CATATG ATGGAAACCAAAAATGAAAACAGTGATG
 TTAGCCGTGCCGAAGAGTTTAAAAGCCAGGCAAATGAAGCATTCAAAGGCCACAAATATAGCAGCG
 CAATTGATCTGTATACCAAAGCCATTGAACTGAATAGCAATAACGCAGTGTATTGGGCAAATCGTG
 CATTTCACATACCAAAGTGAAGAATATGGTAGCGCAATTCAGGATGCAAGCAAAGCAATTGAAG
 TTGATAGCCGTTATAGCAAAGGTTATTATCGTCGTGGTGCAGCATATCTGGCAATGGGTAAATTCA
 AAGATGCCCTGAAAGATTTTCAGCAGGTTAAACGTCTGAGCCGAATGATCCGGATGCAACCCGTA
 AGCTTAAAGAATGTGAAAAAGCCGTGATGAACTGAAATTTGAAGAAGCAATTAGCGTCCGGTT
 AGCGAACGTCGTAGCGTTGCAGAAAGCATTGATTTTCATACCATTGAAGTGAACCGCAGTATAGC
 GGTGCACGTATTGAAGGTGAAGAAGTTACCCTGGATTTTGTGAAAACCATGATGGAAGATTTCAA
 AACAGAAAACCCTGCATAAACGCTATGCCTATCAGATTGTTCTGCAGACCCGTCAGATTCTGCTG
 GCACTGCCGAGCCTGGTTGATATTAGCGTGCCGCATGGTAAACATATTACCGTTTGTGGTGATGTG
 CATGGCCAGTTTTATGATCTGCTGAACATTTTTGAGCTGAATGGTCTGCCGAGCGAAGAAAATCCG
 TACCTGTTTAATGGTGATTTTGTGATCGTGGTAGCTTCAGCGTTGAAATTATTCTGACCCTGTTT
 GCCTTTAAATGTATGTGTCCGAGCAGCATTATCTGGCACGTGGTAATCATGAAAGCAAAGCATG
 AAAAAATCTATGGCTTTGAAGGCGAAGTTCGTAGCAAACCTGAGCGAAAAATTTGTTGACCTGTTT
 GCGGAAGTGTGTTTATCTGCCGCTGGCACATGTGATTAATGGTAAAGTTTTTGTGTCACGGT
 GGTCTGTTTAGCGTTGATGGTGTTAAACTGAGTGATATTCGTGCCATTGATCGTTTTTGTGAACCG
 CCTGAAGAGGGTCTGATGTGTGAACTGCTGTGGTCAGATCCGCAGCCGCTGCCTGGTGGTCCGA

GCAAACGTGGTGTGGTCTGAGCTTTGGCGGTGATGTTACCAAACGTTTTCTGCAGGATAATAATC
TGGATCTGCTGGTTCGTAGCCATGAAGTTAAAGATGAAGGCTATGAAGTTGAGCATGATGGCAAAC
TGATTACCGTGTTTAGCGCACCGAATTATTGTGATCAGATGGGTAATAAAGGTGCCTTTATCCGTT
TTGAAGCACCGGATATGAAACCGAACATTGTTACCTTTAGCGCAGTTCCGCATCCTGATGTTAAAC
CGATGGCCTATGCAAATAACTTTCTGCGCATGTTCAACTAATGCTTAA **GTCCGAC**CTGGGCCTCATG
GGCCTTCCTTCACTGCCCGCTTCCAG

SacI, **EcoRI**, **BamHI**, **NdeI**, **HindIII**, **SaI**

PAPP2c(1-485) aus *Arabidopsis thaliana*

CCGCGGGGAATTCCTGGTGCCGCGC**GGATCC****CATATG**ATGGGTAAATTTTGTGTTTTACCAGCGC
CAGCGAAGTTGTTGGTGGTCAGAGCAGCAGCCGTAGCGGTAAAGGTCGTAGTGATGAAGGTATGAT
CAAATATGGTTTCAGCCTGGTTAAAGGCAAAGCAAATCATCCGATGGAAGATTATCATGTGGCCAA
CTTTATTAACATCCAGGATCATGAACTGGGCCTGTTTGCCATTTATGATGGTCACATGGGTGATAG
CGTTCGGCATATCTGCAGAAACGTCTGTTTAGCAATATCCTGAAAGAAGTGAAAACCAAAAAAAAA
AGGCGAATTTTGGGTTGATCCGCGTCGTAGCATTGCAAAGCTTATGAAAAAACCGATCAGGCCAT
TCTGAGCAATAGCAGCGATCTGGGTCGTGGTGGTAGCACCCGAGTTACCGCAATTCTGATTAATGG
TCGTAAACTGTGGATTGCCAATGTTGGTGTAGCCGTGCAGTTCTGAGCCATGGTGGTGAATTAC
CCAGATGAGCACCGATCACGAACCGCGTACCGAACGTAGCAGCATTGAAGATCGCGGTGGTTTTGT
TAGCAATCTGCCTGGTGATGTTCCGCGTGTTAATGGTCAGCTGGCAGTTAGCCGTGCCTTTGGTGA
TAAAGGTCTGAAAACCCATCTGAGCAGCGAACCGGATATTAAGAAGCAACCGTTGATAGCCAGAC
CGATGTTCTGCTGCTGGCAAGTGATGGTATTTGGAAAGTTATGACCAATGAAGAGGCAATGGAAAT
TGCACGTCGTGTTAAAGATCCGCAGAAAGCAGCAAAGAAGTACAGCCGAAGCACTGCGTCGTGA
AAGCAAAGATGATATTAGCTGTGTTGTTGTGCGCTTTCGTAATGCTTAA **GTCCGAC**ATTAATTAAT
GGAGCACAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCGCTCACTGC

SacI, **EcoRI**, **BamHI**, **NdeI**, **HindIII**, **SaI**

Phytochrom B(891-1172) aus *Arabidopsis thaliana*

CCGCGGA**GGATCC**CCTCGTGCCGCGCGGTTCA**CATATG**GTCTCGTTGGAGGGAAAAGTGATTGGGG
CGTTCTGCTTTCTGCAGATTCCGAGTCCGGAAGTGCAGCAGGCCTTAGCTGTTCAACGTCGCCAGGA
TACCGAATGCTTACGAAAGCGAAAGAGCTGGCGTATATCTGTCAGGTGATCAAGAATCCCTTTTC
AGGCATGCGCTTTGCCAATAGCTTGCTGGAAGCGACTGACCTTAACGAAGATCAGAAACAGCTCTT
AGAAACCTCAGTCTCTTGCGAAAAGCAGATTTCCCGCATTGTGGGTGACATGGATCTCGAGTCGAT
CGAAGATGGCAGCTTCGTTCTGAAACGTGAGGAGTTCTTTCTGGGTTCCGTGATTAACGCCATCGT
AAGCCAAGCTATGTTCTTCTGCGGATCGTGGACTGCAACTGATTCGCGACATTCCGGAGGAGAT
CAAATCCATTGAAGTCTTTGGCGACCAAATCCGGATTACGCAACTCTTAGCCGAATTTCTGTTGAG

CATCATTGCTATGCACCGAGTCAGGAATGGGTGGAAATTCACCTCTCGCAACTGAGCAAACAGAT
 GGCAGATGGGTTTGCTGCGATTTCGTACCGAGTTTCGTATGGCATGTCCTGGTGAAGGTTTACCGCC
 AGAACTGGTACGGGATATGTTCCATAGCTCGCGTTGGACATCTCCGGAAGGCCTGGGTCTGTCACT
 TTGTGCGCAAGATCCTGAACTGATGAACGGCGAAGTGCAGTACATTTCGCGAATCTGAACGCAGTTA
 CTTTCTGATCATCCTGGAATTGCCAGTTCCTCGTAA**GCGGCC**GCTGTCAACTGCTAGTGGAAGTGGT
 GACATGATGCTGATGATGCCATATTAATGCTTAA**GTCGAC**

SacI, **BamHI**, **NdeI**, **NotI**, **SalI**

2.6.1 Das Hybrid-System

Für den Aufbau des Hybrid-Systems wurden die PAS und GAF Domäne des Phytochroms Cph1 (ORF ID: *slr0473*) aus *Synechocystis sp.* und die PHY Domäne der Phytochrome A (UniProtKB: P14712-1) und B (UniProtKB: P14713-1) aus *Arabidopsis thaliana* bei der Firma *Gene Art* bestellt und in einem pMA-T-Vektor (Ampicillin-Resistenz) kloniert geliefert. Für die Gensequenzen *phya* und *phyb* wurde die Kodonverwendung hinsichtlich einer Expression in *E. coli* optimiert und ein C-terminaler Hexa-Histidin-*Tag* eingefügt. Weiterhin wurden den Sequenzen bestimmte Schnittstellen vorangestellt, beziehungsweise angehängt, so dass ein modulares System entsteht, welches eine schnellere Generierung unterschiedlich zusammengesetzter Plasmide erlaubt.

Cph1(1-318) aus *Synechocystis sp.*

GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA**ACTAT**GGCCACCACCGTACA**ACTCAGCGACCAATCCCTCCGT**
 CAGCTAGAAACCCTCGCCATCCACACCGCCACCTGATTCAGCCCCACGGTTTAGTGGTGGTCTCGC
 AGGAACCAGACCTCACCATCAGCCAAATTAGCGCCAACTGCACCGGCATTTTAGGGCGATCGCCAGA
 GGATTTGTTGGGCAGAACCCTAGGGGAAGTGTGGATAGCTTTCAGATTGATCCCATCCAGAGTCCG
 CCTAACGGCCGGACAAATCAGCAGCCTCAACCCAGTAAACTTTGGGCGCGGGTCATGGGGGACGA
 CTTTGTCAATTTTGACGGGGTTTTTCATCGCAACAGTGACGGTTTATTGGTATGTGAACTAGAGCC
 AGCCTACACTTCCGATAATCTGCCCTTCCTCGGTTTTATCACATGGCCAACGCTGCCCTGAATCGG
 TTGCGCCAACAAGCTAATCTACGGGATTTCTACGATGTTATTGTCAAGAAGTCCGCCGTATGACT
 GGCTTTGACCGGGTGATGCTATAACCGCTTTGATGAAAATAACCACGGTGATGTCATTGCCGAAGAT
 AAACGGGATGATATGGAACCCTATTTGGGCCTGCACTATCCCGAATCGGATATCCCCAACCCGCC
 GTCGGCTATTTATCCACAACCCATTTCGAGTAATTCCCGATGTTTATGGTGTGGCGGTGCCCTGAC
 CCCAGCGTTAACCCAGCACCAACCGAGCGGTGGATTTAACAGAATCCATTCTGCGCAGTGCGTAC
 CATTGCCACTTGACCTATCTGAAAAATATGGGGGTAGGAGCGTCTTTAACCATTTCCCTAATTAAG

GACGGCCATCTCTGGGGGCTCATTGCCTGCCACCATCAAACCCCCAAAGTAATTCCCTTTGAACTGC
GTAAAGCCTGCGAATTTTTTGGTCGGGTGGTGTTTAGCAACATTTCCGCC

EcoRI, *SacI*

Phytochrom A(403-593) aus *Arabidopsis thaliana*

GAGCTCGAACTGGATAATCAGATGGTGGAAAAAACATTCTGCGTACCCAGACCCTGCTGTGTGAT
ATGCTGATGCGTGATGCACCGCTGGGTATTGTTAGCCAGAGCCCGAACATTATGGATCTGGTTAAA
TGTGATGGTGCAGCCCTGCTGTATAAAGACAAAATTTGGAAACTGGGCACCACCCCGAGCGAATTT
CATCTGCAAGAAATTGCAAGCTGGCTGTGCGAATATCATATGGATAGCACCGGTCTGAGCACCGAT
AGCCTGCATGATGCCGTTTTTCCGCGTGCCTGAGCCTGGGTGATAGCGTTTGTGGTATGGCAGCA
GTTTCGTATTAGCAGCAAAGATATGATTTTTTGGTTTTCGTAGCCAT**ACCGCCGGC**GAAGTTCGTTGG
GGTGGCGCAAACATGATCCGGATGATCGTGATGATGCACGTCGTATGCATCCGCGTAGCAGTTTT
AAAGCATTCTGGAAGTTGTGAAA**ACCAGGCTC**TGCCGTGGAAAGATTATGAAATGGATGCAATT
CATTCCCTGCAGCTGATTCTGCGCAATGCATTTAAAGATAGCGAAACCACC**CATCATCACCACCATC**
ATTAAGGATCCAGATCTCATACCA TCACCATCACTAAGCTT

SacI, *MreI*, *SexAI*, *His-tag*, *HindIII*

Um die *SacI*-Schnittstelle zu erhalten wurde eine Mutation eingeführt (L404V).

Phytochrom B(434-624) aus *Arabidopsis thaliana*

GAGCTCCAGCTGGCACTGCAGATGAGCGAAAAACGTGTTCTGCGTACCCAGACCCTGCTGTGTGAT
ATGCTGCTGCGTGATAGTCCGGCAGGTATTGTTACCCAGAGCCCGAGCATTATGGATCTGGTTAAA
TGTGATGGTGCAGCCTTTCTGTATCACGGTAAATACTATCCGCTGGGTGTTGCACCGAGCGAAGTT
CAGATTAAAGATGTTGTTGAATGGCTGCTGGCAAATCATGCAGATAGCACCGGTCTGAGCACCGAT
AGCCTGGGTGATGCAGTTATCCGGGTGCAGCAGCACTGGGAGATGCAGTTTGTGGTATGGCAGTT
GCATATATTACCAAACGCGATTTTCTGTTTTGGTTTTCGTAGCCAT**ACCGCCGGC**GAAATCAAATGG
GGTGGTGCAAAACATCATCCGGAAGATAAAGATGATGGTCAGCGTATGCATCCGCGTAGCAGCTTT
CAGGCATTCTGGAAGTTGTTAAA**ACCAGGCTC**CAGCCGTGGGAAACCGCAGAAATGGATGCAATT
CATAGCCTGCAGCTGATTCTGCGTGATTCATTTAAAGAAAGCGAAGCAGCA**CATCATCACCATCAC**
CATTAAGGATCCAGATCTCATACCATCACCATCACTAAGCTT

SacI, *MreI*, *SexAI*, *His-tag*, *HindIII*

Cph1(319-486) aus *Synechocystis sp.*

CGCCGGCCAGGTTAATTGGGGCGGTGACCCAAATCATGCTTACGAAGCTACCCAGGAAGAC
 GGTAATAATCGAGCTCCATCCCCGCCAATCCTTTGACCTCTGGAAAGAAATTGTCCGA**ACCA**
GGT

MreI, **SexAI**

2.7 Primer

Die Schmelztemperaturen (T_M) der Primer wurden mit dem Programm *Oligo Analyzer 3.1*¹⁶⁰ der Firma *IDTDNA (Integrated DNA Technologies)* berechnet. Tabelle 2.6 zeigt die Primer sowie die Restriktionsendonukleasen, mit denen die jeweiligen Genfragmente in die Vektoren eingebracht werden können.

Tabelle 2.6: Liste der verwendeten Primer sowie der Restriktionsendonukleasen (Schnittstelle der Enzyme ist unterstrichen), mit denen die Genfragmente in die Vektoren eingebracht wurden. Des Weiteren sind die Schmelztemperaturen (T_M) der Primer aufgeführt.

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Enzym	$T_M/^\circ\text{C}$
PhyA_893-1122_fwd	GGTACGGGGATCCGGCAGTGAAGAGACTAAAG GCTCTAGCATA C	<i>Bam</i> HI	68,4
PhyA_893-1122_rv	GTTTATTGCGGCCGCTTACTTGTTTGCTGCAG CGAGTTCC	<i>Not</i> I	68,4
HybridA_pCDF_fwd	GCTACTGGGATCCGATGGCCACCACCGTAC	<i>Bam</i> HI	67,8
HybridA_pCDF_rv	GCATTTAAAGATAGCGAAACCACCTAAGCGGC CGCAATCAGC	<i>Not</i> I	67,8
HybridB_pCDF_fwd	CATATTAGGATCCACTAGTACCGAGAGGCAGC ATGGCCACCACCGTAC	<i>Bam</i> HI	69,2
HybridB_pCDF_rv	CATTTAAAGAAAGCGAAGCAGCATAAGCGGCC GCGAGACGC	<i>Not</i> I	69,3
PhyB(PAS)_fwd	GCAAAGCACCGCCGGCGAAATCAAATGGGGAG GC	<i>Mre</i> I	70,5
PhyB(PAS)_rv	GTTGTGAATGCTTGTTCACCATCACCATCACCAT CACTGAGGATCCAGATCTTCTCAGGTTAACG C	<i>Bsu</i> 361	70,0
PhyB(PASPAS)_rv	CATAATGCGATTGGTGGCCATCACCATCACCA TCACTGAGGATCCAGATCTTCTCAGGTATAC GC	<i>Bsu</i> 361	70,0
PhyA(PAS)_fwd	GCAATTAACCGCCGGCGAAGTGAGATGGGGAT G	<i>Mre</i> I	67,7
PhyA(PAS)_rv	GTAAATGCATGCGCACATCACCATCACCATCAC TGAGGATCCAGATCTTAAGCTTTAATATC	<i>Hind</i> III	67,6

Primer	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Enzym	T _M /°C
PhyA(PASPAS)_rv	CAATGCTGTGACCAGTCATCACCATCACCATCA CTGAGGATCCAGATCTTAAGCTTTTAAATC	<i>HindIII</i>	68,0
PAPP2c(31-287)_fwd	GCTATTGCATATGATGATCAAATATGGTTTCA GCC	<i>NdeI</i>	61,6
PAPP2c(31-287)_rv	GCTTCTTGTCGACTTATTAAGCATTAGCGAAA GCG	<i>Sall</i>	61,9
PAPP5(136-485)_fwd	CATATTAGGATCCACTAGTACCGAGAGGCAGC CCGGATGCAACCCGTAA	<i>BamHI</i>	70,4
PAPP5(136-485)_rv	GCCTCATCGCGGCCGCTTAAGCATTAGTTGAA CATGCGCAG	<i>NotI</i>	70,1
PAPP5(136-485)_fwd	CGGATTACATATGCCGGATGCAACCCGTAA	<i>NdeI</i>	63,4
PAPP5(136-485)_rv	GCAAAATCGGATCCTTAAGCATTAGTTGAACA TGCGCAG	<i>BamHI</i>	63,8
PAPP5(136-472)_fwd	CGGATTACATATGCCGGATGCAACCCGTAA	<i>NdeI</i>	63,4
PAPP5(136-472)_rv	GCAAAATTTGGATCCTTACATCGGTTTAAACATC AGGATGCG	<i>BamHI</i>	63,9
PhyB(1-651)_fwd	GGTCGCACATGTTCGTATGGTTTCCGGAG	<i>PciI</i>	67,3
PhyB(1-651)_rv	GCACGTCTGCAGTTAATGGTGATGGTGATGAT G	<i>PstI</i>	67,7
PhyB(90-651)_fwd	CCTCGGACATGTATGACGACGTACGGTTCC	<i>PciI</i>	67,4
PhyB_S84A_fwd	GAAATCATTCGACTACGCACAATCACTC		57,0
PhyB_S84A_rv	CCTGATTCGCCGGATTGTTTCG		58,0
PhyB_S84D_fwd	GAAATCATTCGACTACGATCAATCACTC		55,0
PhyB_S86A_fwd	GACTACTCACAATGACTCAAAACG		59,0
PhyB_S86A_rv	GAATGATTTCCCTGATTTCG		61,0
PhyB_S86D_fwd	GACTACTCACAGATCTCAAAACG		58,0
PhyB_Y276H_fwd	GTGTTATGGTTCATAAGTTTCATGAAG		50,0
PhyB_Y276H_rv	GATCATAACCAGTCAAGTCCCTC		48,0
PhyB_G564E_fwd	GAAATCAAATGGGAAGGCGCTAAG		56,0
PhyB_G564E_rv	GAATGATTTCCCTGATTTCG		55,0

Alle Primer wurden bei der Firma *Metabion* entsalzt und lyophilisiert bestellt und in einem entsprechenden Volumen EB-Puffer gelöst, so dass sie einer Konzentration von 100 pmol/μL entsprachen.

2.7.1 Sequenzierungsprimer

Die Sequenzierungsprimer wurden von der Firma *Metabion* bezogen.

pCDF Duet

ACYC Duet Up1

5'-GGATCTCGACGCTCTCCCT-3'

pCDF Down

5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3'

pPROLar

pPROLar_fwd

5'-CCATAAGATTAGCGGATCTAACC-3'

pPROLar_rv

5'GCCCCGATCGATGCGG CCGC-3'

PASPAS Varianten

PAS_fwd

5'-GCAATTAACCGCCGGCGAAGTGAGATGGGGAG-3'

PAS_rv

5'-GCTAGCAGCGGCCGCTTATGCGCATGCATTTAC-3'

2.8 Bakterienstämme**2.8.1 E. coli DH5 α**

Genotyp: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* r_k⁻ m_k⁺ *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*

Kennzeichen der DH5 α -Zellen (*Invitrogen*) sind eine hohe Plasmidreplikationsrate sowie Transformationseffizienz. Auf Grund dessen eignen sich sowohl chemische, als auch elektrokompente Zellen optimal zur Gewinnung von Plasmid-DNA. Durch die *hsdR17*-Mutation im K12-Restriktionssystem wird der Abbau nicht-methylierter DNA verhindert, während die *endA1*-Mutation die Endonuklease A1 inhibiert, so dass Plasmid-DNA während der Präparation nicht abgebaut wird¹⁶¹. Weiterhin ist die homologe Rekombination durch eine eingebrachte *recA1*-Mutation gehemmt¹⁶².

2.8.2 E. coli BL21 Gold (DE3)

Genotyp: B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA Hte*

Zur heterologen Expression wurden chemisch kompetente BL21 Gold (DE3) Zellen (*Invitrogen*) verwendet. Der Stamm enthält ein lysogenes Phagenfragment (DE3), auf welchem das Gen der T7-RNA-Polymerase kodiert ist. Diese unterliegt der Kontrolle eines lacUV5-Promotors, welcher durch Zugabe von IPTG induziert werden kann. Es fehlen die OmpT-Protease, welche die T7-RNA-Polymerase abbaut¹⁶³, sowie die Lon-Protease, welche für den Abbau von Regulationsproteinen verantwortlich sein soll¹⁶⁴. Weiterhin ist im Hte-Phänotyp die Transformationseffizienz gesteigert¹⁶⁵.

2.8.3 *E. coli* BL21 PRO

Genotyp: ompT hsdSB(r_B-m_B⁻) aal dcm F⁻: Tet^r P_{lac}^q/lacI Sp^r

Zur Expression von Plasmiden, die auf dem pPROLar.A122 basieren, wurden chemisch kompetente BL21 PRO Zellen verwendet. Die Zellen enthalten ein zusätzliche Plasmid PROTetE (*Clontech*), das für Lac und Tet Repressoren codiert. Durch das zusätzliche Plasmid besitzen die Zellen eine Spectinomycin-Resistenz¹⁶⁶.

2.8.4 *E. coli* Arctic Express (DE3)

Genotyp: B F⁻ ompT hsdS(r_B-m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^r]

Der Arctic Express Stamm (*Stratagene*) beruht auf einem BL21 Stamm und ermöglicht die heterologe Expression von Proteinen bei tiefen Temperaturen. Da die *E. coli* eigenen Chaperone bei 12 °C nicht mehr aktiv sind, enthält der Stamm zusätzlich noch die Chaperone Cpn10 und Cpn60 aus dem psychrophilen Bakterium *Oleispira antarctica*, welche die Proteinfaltung unterstützen¹⁶⁷.

2.8.5 *E. coli* Rosetta (DE3)

Genotyp: B F⁻ ompT hsdSB(r_B-m_B⁻) gal dcm λ(DE3) pRARE (CamR)

Der Rosetta Stamm basiert auf dem BL21 (DE3) Stamm (*Merck Bioscience*) und beinhaltet zusätzlich noch das Plasmid pRARE, welches für selten genutzte tRNAs von Arginin (AGG; AGA), Glycin (GGA), Isoleucin (AUA), Leucin (CUA) und Prolin (CCC) codiert¹⁶⁸. Für eine Aminosäure kodieren mehrere Codons, welche von verschiedenen Organismen unterschiedlich häufig verwendet werden, entsprechend der jeweiligen tRNA Konzentration in der Zelle. Die Expression einer Gensequenz mit selten vorkommenden Codons kann daher die Translation in *E. coli* Zellen verlangsamen oder ganz abbrechen, was in *E. coli* Rosetta Zellen unterbunden ist.

2.9 Kulturmedien und Puffer

2.9.1 Kulturmedien

Für Kotransformationen wurde SOC-Medium (SOC = *super optimal broth*) verwendet, das einen höheren Nährstoffgehalt aufweist. In Tabelle 2.7 ist die Zusammensetzung angegeben.

Tabelle 2.7: Zusammensetzung für SOC-Medium

Komponente	Menge
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g
dH ₂ O	ad 990 mL

Anschließend wurden 10 mL einer 250 mM KCl-Lösung hinzugegeben, der pH-Wert mit einer NaOH-Lösung auf 7,0 eingestellt und autoklaviert (2 bar, 121 °C für 30 min). Danach wurden pro Liter 20 mL einer 1 M Glukose-Lösung hinzugegeben und vor der Verwendung des Mediums pro Liter 5 mL einer 2 M MgCl₂-Lösung hinzugefügt¹⁶⁹.

Die rekombinante Produktion der Proteine, wie auch die Kultivierung von Übernachtkulturen und Testexpressionen erfolgten in LB-Medium (LB = *lysogeny broth*) oder TB-Medium (TB = *terrific broth*). Die Zusammensetzung der Kulturmedien ist in Tabelle 2.8 angegeben. Das Nährmedium und der Phosphatpuffer für das TB-Medium wurden getrennt autoklaviert (2 bar, 121 °C für 30 min) und erst vor Beginn der Expression im Verhältnis 10:1 zusammengegeben.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung für LB- und TB-Medium.

	LB-Medium		TB-Medium	
	Komponente	Menge	Komponente	Menge
Nährmedium	Bactotrypton	10 g	Trypton	12 g
	Bacto-Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt	24 g
	Natriumchlorid	5 g	Glycerin	4 mL
	10 M NaOH	400 µL		
	dH ₂ O	ad 1 L	dH ₂ O	ad 900 mL
Phosphatpuffer			KH ₂ PO ₄	0,17 M
			K ₂ HPO ₄	0,72 M
			dH ₂ O	ad 100 mL

2.9.2 Puffer

Alle eingesetzten Puffer wurden entsprechend der Angaben im Methodenteil mit dH_2O angesetzt, anschließend mit einem Flaschenaufsatzfilter von Kontaminationen befreit und bei 8 °C gelagert. Die zur Kristallisation eingesetzten Puffer wurden mit bdH_2O angesetzt und mit einem Spritzenvorsatzfilter S 0,45 filtriert. Diese Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, kurz: PCR) ist eine von *Kary Mullis* entwickelte Methode um spezifische DNA-Fragmente mit Hilfe von hitzebeständigen Polymerasen aus thermophilen Organismen *in vitro* zu amplifizieren. Für eine PCR wird ein spezifisches Primerpaar benötigt (komplementär zum 5′-, beziehungsweise 3′-Bereich der Zielsequenz), welches sich am DNA-Strang, beziehungsweise am Gegenstrang, anlagern kann. Die vier Nukleotide, die in der DNA vorkommen, werden in Form von dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) zugegeben^{170, 171}.

In Tabelle 3.1 ist die Standardzusammensetzung für eine typische Polymerasekettenreaktion aufgeführt.

Tabelle 3.1: Standardzusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Reagenz	Konzentration	Menge (µL)
Templat-DNA	20-100 ng/µL	1,0
5′-Primer	20 µM	1,0
3′-Primer	20 µM	1,0
dNTP-Mix	10 mM	1,0
DMSO		2,5
HF-Buffer	5×	10
Polymerase	2 U/µL	0,5
<i>bd</i> H ₂ O		ad 50

Die Amplifikation findet in 20-50 aufeinander folgenden Zyklen mit jeweils drei Schritten statt. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der Templat-DNA, was die Grundlage für den zweiten Schritt der PCR bildet. Hier erfolgt eine rasche Abkühlung auf circa 50 °C, so dass die sequenzspezifischen Primer mit jeweils einem DNA-Strang hybridisieren (engl.: *Annealing*) können. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl der 5′-Primer als auch der 3′-Primer eine ähnliche Schmelztemperatur (T_m) aufweisen. Diese Temperatur ist von dem jeweiligen GC-Gehalt der Primer abhängig und wird nach der *nearest neighbour* Methode berechnet, bei der nebeneinanderliegende

Guanine oder Cytosine stärker gewichtet werden. Im dritten Schritt, der Elongation, wird die DNA wieder auf 72 °C erhitzt, da bei dieser Temperatur die eingesetzte thermophile Polymerase die höchste Aktivität besitzt. Die Polymerase verlängert durch Anlagern der komplementären Basen die Primer. Da der DNA-Strang kein Stoppsignal besitzt, wird dieser über die eigentliche Zielsequenz hinaus verlängert. In den nachfolgenden Syntheseyklen dienen die neu gebildeten DNA-Stränge selbst als Templat für die DNA-Synthese. Das zu amplifizierende DNA-Fragment wird somit exponentiell (2^n -fach) vermehrt.

In Tabelle 3.2 sind die Standardbedingungen einer typischen Polymerase Kettenreaktion angegeben.

Tabelle 3.2: Standardreaktionsbedingungen einer Polymerase Kettenreaktion.

Arbeitsschritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	30 s	98 °C	1
Denaturierung	10 s	98 °C	
<i>Annealing</i>	30 s		35
Elongation		72 °C	
Finale Elongation	10 min	72 °C	1

Für die *Annealing*-Temperatur wurde eine Temperatur gewählt, die 3 °C höher ist als die niedrigste Schmelztemperatur der Primer. Dies verhinderte ein falsches Anlagern der Primer, da bei dieser Temperatur nur die stärkeren Wechselwirkungen der richtigen Basenpaarung Bestand haben. Die Elongationszeit wurde durch die Länge des zu amplifizierenden Genfragments bestimmt; pro 1000 Basenpaare circa 15 bis 30 s.

3.1.1.1 Mutagenese-PCR

Für die Generierung von ortsspezifischen Mutanten von *AtPhyB*(1-651) wurde die *round-the-horn* Methode verwendet. Hierfür werden phosphorylierte Primer verwendet, von denen einer die entsprechende Mutation trug. Die PCR wurde entsprechend der Standard-PCR durchgeführt (Kapitel 3.1.1). Das Produkt der PCR wurde mittels *DpnI*-Verdau von der Templat-DNA befreit. Alle Arbeiten zur Herstellung der Mutanten wurden von *Petra Gnau* durchgeführt.

3.1.2 Reinigung von DNA aus PCR-Ansätzen

Die Reinigung der PCR-Ansätze erfolgte durch ein *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*). Die darin enthaltene *Qiagen* tip20-Anionenaustauschersäule besteht aus einer positiv geladenen Silikagel-Membran, an welche die DNA binden kann. Verunreinigungen, wie Primer oder Salze, sind zu klein um an die Säule zu binden, da erst bei einer Länge ab circa 100 bp eine Adsorption an die Säule erfolgt, und werden in den folgenden Waschschrritten entfernt. Die Elution der DNA erfolgt durch die Verwendung eines Puffers mit niedriger Salzkonzentration und basischerem pH-Wert.

Zu der Probe wurden 250 µL PB-Puffer hinzugegeben und die Mischung auf eine *QIAquick-spin*-Säule aufgetragen, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 1 min bei 2665 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und bei gleichen Bedingungen inkubiert und zentrifugiert. Danach wurde der Durchfluss verworfen, die *Spin*-Säule mit 750 µL PE-Puffer versetzt und 1 min bei 160100 g zentrifugiert. Der PE-Puffer enthält Ethanol, welches dafür zuständig ist auf der Säule verbliebene Salze, Polymerasen, Nukleotide sowie weitere Verunreinigungen, zu entfernen. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule aufgetragen, zentrifugiert und anschließend verworfen. Um die Säule zu trocknen, wurde sie in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 2 min bei 16100 g zentrifugiert und stehen gelassen bis das verbleibende Ethanol verdunstet war. Zur Elution der DNA wurde die Säule mit 50 µL auf 37 °C erwärmten EB-Puffer versetzt, 1 min inkubiert und 1 min bei 16100 g zentrifugiert.

3.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einer präparativen Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.1) wurde die entsprechende DNA-Bande unter UV-Licht (256 nm) herausgeschnitten.

Die Banden wurden mit der dreifachen Menge QG-Puffer versetzt und das Gemisch für 10 min bei 50 °C und 300 rpm inkubiert. Ein im QG-Puffer enthaltener pH-Indikator zeigt bei einer gelben Färbung, dass eine optimale Bindung der DNA an die Säule gewährleistet ist. Bei einer orangenen Färbung müssen 10 µL 3 M Dinatriumacetat hinzugegeben werden, um wieder einen optimalen pH-Wert von 7,5 zu erhalten. Anschließend wird zur Lösung ein Volumen Isopropanol hinzugegeben

und alles auf eine *QIAquick* Säule aufgetragen. Nach einer einminütigen Inkubation wurde die Säule 1 min bei 2665 g zentrifugiert und der Durchfluss erneut auf die Säule aufgetragen, inkubiert und zentrifugiert. Im weiteren Verlauf wurde der Durchfluss verworfen und die Säule mit 500 μL QG-Puffer gewaschen und zentrifugiert (1 min, 2665 g). In einem weiteren Waschschriff wurden 750 μL PE-Puffer auf die Säule gegeben, 5 min inkubiert, zentrifugiert (1 min, 2665 g) und der Durchfluss verworfen. Als nächster Schritt wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (1 min, 16100 g) und getrocknet. Im Anschluss wurde durch die Zugabe von 30 μL EB-Puffer und eine Inkubation von 2 min die DNA eluiert. Die DNA wurde anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.1.4 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage die DNA an eine spezifische palindromischen Basensequenz zu binden und diese hydrolytisch zu spalten. Je nach Enzym wird die DNA glatt (engl.: *Blunt*) oder um einige Nukleotide versetzt (engl.: *Sticky*) geschnitten. Die 5'-Enden der DNA-Stränge tragen in beiden Fällen die Phosphatgruppe, welche für eine spätere Ligation notwendig ist. Die Spaltung der DNA wurde sowohl präparativ, als auch analytisch durchgeführt. Der präparative Verdau erfolgte 5 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und der analytische 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die jeweiligen Zusammensetzungen der Verdaue sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Standardzusammensetzung eines Restriktionsverdaus.

Reagenz	Präparativer Verdau Menge (μL)	Analytischer Verdau Menge (μL)
DNA-Lösung	50	3,0
BSA 10 mg/mL	1,0	0,2
Restriktionsenzym (10-20 U/ μL)	2,0	0,2
Puffer 10 \times	8,0	1,5
<i>bdH</i> ₂ O	ad 80	ad 15

3.1.5 Ligation mittels T4-DNA-Ligase

Die Ligation von DNA-Fragmente erfolgte in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die T4-DNA-Ligase. Sie katalysiert die Ausbildung einer Phosphorsäurediesterbindung zwischen den 3'-Hydroxyl- und den 5'-Phosphatgruppen der doppelsträngigen DNA. Die eingesetzten Volumina (V) an Vektor und Insert sind hierbei

abhängig von der Länge (l) und der Konzentration (c) und wurden nach Formel 3.1 und Formel 3.2 berechnet¹⁷².

$$V(\text{Vektor}) = \frac{V(\text{Gesamtreaktion})}{\frac{c(\text{Vektor}) * l(\text{Insert}) * \text{Ratio}}{c(\text{Insert}) * l(\text{Vektor})} + 1}$$

Formel 3.1: Formel zur Berechnung des Volumens (V) des Vektors, abhängig von der Länge (l) und der Konzentration (c) des Vektors/Inserts sowie dem Gesamtvolumen der Reaktion.

$$V(\text{Insert}) = V(\text{Gesamtreaktion}) - V(\text{Vektor})$$

Formel 3.2: Formel zur Berechnung des Volumen (V) des Inserts, abhängig von dem Volumen der Gesamtreaktion und des Vektors.

Es wurde ein Gesamtvolumen von 20 μL , eine Vektorkonzentration von 5-50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ und ein Vektor-zu-Insert-Ratio von 1:1 oder 1:3 gewählt. Die Ansätze wurden 16 h bei 4 $^{\circ}\text{C}$ oder 2 h bei 21 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert (Tabelle 3.4). Als Kontrollreaktion wurde die Ligation unter gleichen Bedingungen mit geschnittenem Vektor, aber ohne Insert durchgeführt, um den Anteil an Selbst-Ligationen abzuschätzen.

Tabelle 3.4: Standardzusammensetzung eines Ligationsansatzes. Die Volumina für Vektor und Insert wurden nach Formel 3.1 und 3.2 berechnet.

Reagenz	V (μL)
Vektor	
Insert	
10 \times Ligationspuffer	2,0
Ligase (400 U/ μL)	1,0
<i>bd</i> H ₂ O	ad 20

3.1.6 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Bei der Hitzeschocktransformation werden durch einen kurzzeitigen Temperaturschock Poren in der Zellmembran gebildet, durch die Plasmid-DNA aufgenommen werden kann. Die Abstoßung der negativ geladenen Membran mit der ebenfalls negativ geladenen DNA wird durch die Behandlung mit ein- oder zweiwertigen Kationen verringert¹⁷³. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die Rubidiumchlorid-Methode angewendet.

Zunächst wurde ein Glycerinstock auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Kolonie von der Platte wurde eine Übernachtskultur inokuliert, am nächsten Tag mit 5 mL dieser Kultur 50 mL LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5-0,6 inkubiert und anschließend pelletiert (10 min, 1699 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 15 mL kalten TFB-I-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert, anschließend 2 h auf Eis inkubiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 mL TFB-II-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und in 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Um die kompetenten Zellen auf eine Antibiotikumsensitivität zu überprüfen, wird eine Hitzeschocktransformation (siehe 3.1.6.1) ohne die Zugabe von DNA durchgeführt und auf Agarplatten ausplattiert, welche verschiedene Antibiotika enthalten. Weiterhin wird die Transformationseffizienz der neu hergestellten Zellen getestet, indem die Kolonien nach der Inkubation gezählt werden. Unter optimalen Bedingungen sollten 10⁶-10⁷ Kolonien pro µg eingesetzter DNA erreicht werden.

3.1.6.1 Hitzeschocktransformation

Zu 50 µL auf Eis aufgetauter chemisch kompetenter Zellen wurden 10 ng-50 ng (5 ng bei Retransformationen) des Ligationsansatzes gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) ausgesetzt, für zwei Minuten auf Eis abgekühlt, sofort mit 950 µL LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3 min bei 16100 g pelletiert und 900 µL des Überstandes verworfen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert, 10 µL Suspension auf der einen, und 90 µL Suspension auf der anderen Hälfte auf einer mit Selektionsmarkern versehenen LB-Agar-Platte ausplattiert. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.1.6.2 Kotransformation

Für die *in vivo* Assemblierung der Phytochrome mit dem Kofaktor PCB wurden beide Plasmide gleichzeitig in kompetente Zellen eingebracht. Hierfür wurden 0,8 µL (50 ng/µL) des Plasmids, notwendig für die Phytochromproduktion, mit 0,4 µL p171

(50 ng/ μL) in 50 μL chemisch kompetente Zellen (100 μL für BL21 PRO) vermischt und 0,3 μL , beziehungsweise 0,9 μL entnommen und die Hitzeschocktransformation wie nach 3.1.6.1 durchgeführt. Nach der Inkubation auf Eis wurden 600 μL SOC-Medium hinzugegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten nach 3.1.6.1.

3.1.7 Plasmidpräparation

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden (Plamidpräparation mittels Alkoholpräzipitation oder Bindung an eine Silikamembran) zur Aufreinigung von Plasmid-DNA verwendet, die jedoch beide die selektive alkalische Denaturierung chromosomaler DNA verwenden, um diese abzutrennen¹⁷⁴. Eine Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation wurde durchgeführt, wenn anschließend ein analytischer Verdau zur Identifikation richtiger Klone erfolgen sollte.

Zunächst wurde eine 4 mL Übernachtskultur mit den entsprechenden Selektionsmarkern des zu präparierenden Klons angesetzt und am nächsten Tag pelletiert (2 min, 2665 g).

3.1.8.1 Plasmidpräparation mittels Bindung an eine Silikamembran

Die Reinigung der Plasmide erfolgte durch ein *QIAprep Miniprep Kit (Qiagen)*. Nach der Abtrennung genomischer DNA erfolgte die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA durch Bindung an eine Silikamatrix, gefolgt von mehreren Waschschritten. Die Elution der DNA erfolgt durch die Verwendung eines Puffers mit niedriger Salzkonzentration und basischerem pH-Wert.

Das Pellet der Übernachtskultur wurde in 250 μL P1-Puffer resuspendiert. Dieser EDTA-haltige Puffer dient zur Komplexierung von Magnesium und Calcium, die zur Stabilisierung der Zellwand beitragen. Außerdem ist RNase A im Puffer enthalten, welche noch vorhandene RNA degradiert. Anschließend wurden 250 μL P2-Puffer zugegeben und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe, dieses alkalischen Puffers bewirkt, dass Proteine und chromosomale DNA vollständig degradiert werden. Des Weiteren ist SDS im Puffer enthalten, welches Phospholipide und Proteinkomponenten der Zelle löst. Bei einer längeren Inkubationszeit kann die Plasmid-DNA irreversibel denaturiert werden. Im nächsten Schritt wurde das Lysat mit 300 μL P3-Puffer versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zugabe von Kalium-

acetat neutralisiert die Lösung. Denaturierte DNA und Proteine bilden mit Kaliumdodecylsulfat schwerlösliche Komplexe und fallen aus, während die Plasmid-DNA aufgrund ihrer stabilen superhelikalen Struktur in Lösung bleibt. Anschließend wurde die Probe 10 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf eine *QIAprep spin*-Säule aufgetragen, 5 min inkubiert und 1 min bei 2665 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 750 µL PE-Puffer gewaschen und 1 min bei 2665 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 16100 g zentrifugiert. Die Säule wurde getrocknet und anschließend 30 µL EB-Puffer auf die Mitte der Säule gegeben und nach einer 5 minütigen Inkubation die Säule 1 min bei 16100 g zentrifugiert.

3.1.8.2 Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation

Zunächst wurde das Pellet in 250 µL P1-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µL RNase A) resuspendiert und durch die anschließende Zugabe von 250 µL P2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % (v/v) SDS) wurden die Zellen unter alkalischen Bedingungen lysiert. Nach vorsichtigem Invertieren und einer Inkubation von 5 min wurden 350 µL P3-Puffer (3 M KOAc, pH 5,5, 1 % (v/v) SDS) zugegeben. Der Ansatz wurde erneut inventiert, 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (15 min, 16100 g, 4 °C). Nach der Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde erneut und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 600 µL Isopropanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu präzipitieren, und anschließend 30 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert. Das farblose Pellet wurde mit 300 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min bei 4 °C und 16100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet bei 37 °C im Heizblock getrocknet und anschließend in 30 µL EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) resuspendiert.

3.2 Nukleinsäureanalytik

3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Aufgrund der negativen Ladung der DNA-Fragmente können sie in einem polymeren Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Agarosekonzentration werden unterschiedlich große Poren gebildet, durch die kleinere DNA-Fragmente schneller wandern als größere. Des Weiteren werden Verunreinigungen wie Nukleotide, Primer oder Salze abgetrennt. Zusätzlich zur Probe aufgetragene Standards, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthalten, erlauben eine Größenbestimmung der Fragmente in der Probe. Die Visualisierung der DNA erfolgte entweder durch Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen die Basenpaare interkaliert, oder durch *Midori Green*, das an die DNA bindet. Diese Komplexe können durch UV-Licht (256 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden ($\lambda = 590$ nm).

Für die Gelelektrophorese wurde eine 1 %ige Agarosegel-Lösung mit TBE-Puffer (1 M Tris, 1 M Borsäure, 20 mM EDTA) hergestellt, der 3 μ L Midori zugegeben wurde. Dieses wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel anschließend mit TBE-Puffer überschichtet. Je nach verwendetem Probenkamm kann ein analytisches Gel mit kleinen Probenkammern (20 μ L) oder ein präparatives Gel mit größeren Probekammern (80 μ L) hergestellt werden. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 6:1 mit 6 \times DNA-Probenpuffer (2,5 % (w/v) Xylenxyanol FF, 15 % (w/v) Ficoll Typ 400) versetzt und nach vorsichtigem Durchmischen in die Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurden 2,5 μ L als Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 mA. Wenn kein Midori zugesetzt wurde, erfolgte eine Inkubation des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 μ g/mL in dH_2O). In beiden Fällen fand eine anschließende Dokumentation unter UV-Licht statt.

3.2.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration der DNA lässt sich photometrisch durch das Absorptionsmaximum der Pyrimidin- und Purinbasen bei 260 nm bestimmen. Eine Absorption von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 ng/ μ L¹⁷⁵. Um den Reinheitsgrad einer isolierten DNA-Probe zu testen, wird die Absorption der Probe

bei 260 nm und 280 nm gemessen und der Quotient der gemessenen Werte gebildet, da die aromatischen Aminosäuren bei 280 nm ihr Absorptionsmaximum besitzen.

Die Messungen erfolgten an einem Nanodrop, welches gleichzeitig Absorption bei 260 nm und 280 nm misst und daraus sowohl die Konzentration, als auch die Reinheit der Probe bestimmen kann. Nach der Messung von 1 μL Referenzlösung wurde im Anschluss 1 μL Probe vermessen.

3.2.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Sequenzen erfolgte durch die Firma *GATC* nach der Didesoxymethode nach *Sanger*¹⁷⁶.

Ausgehend von einem Primer bekannter Sequenz, welcher nahe an dem zu analysierenden Sequenzabschnitt bindet, werden in einer Polymerasekettenreaktion die zur unbekanntem DNA-Sequenz komplementären DNA-Stränge verlängert. Durch den Einbau eines fluoreszenzmarkierten-2',3'-Didesoxyanalogons wird die Synthese der komplementären DNA abgebrochen, da aufgrund der fehlenden Hydroxygruppe keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Anschließend werden die DNA-Fragmente durch eine Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und die unterschiedliche Fluoreszenz detektiert.

Für eine Analyse wurden 500 ng aufgereinigte DNA sowie 20 μL eines entsprechenden Sequenzierungsprimers (10 pmol/ μL) versandt.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Testexpression und analytischer Aufschluss

Um Bedingungen zu finden, unter denen lösliches Protein produziert wird, wurden Testexpressionen im 50 mL Maßstab durchgeführt.

Zunächst wurden *E. coli* Stämme mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Anschließend wurden 5 mL LB-Medium mit dem entsprechendem Selektionsmarker als Übernachtskultur mit einem Transformanden von der Agar-Platte angeimpft. Am nächsten Tag wurden 50 mL vorgewärmtes (37 °C) LB-oder TB-Medium mit Selektionsmarker mit dieser Kultur im Verhältnis 1:200 inokuliert. Die Kolben wurden bei 37 °C schüttelnd bei 150 rpm bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde auf die gewünschte Temperatur gesenkt, mit IPTG (0,1 µM–0,1 mM) oder einer Mischung aus IPTG und Arabinose (0,2-0,4 %) induziert sowie eine t₀-Probe (1 mL) zum Auftrag auf ein SDS-PAGE-Gel entnommen. Nach dem Beenden der Expression wurde eine t₁-Probe (1 mL) entnommen, diese 1:10 verdünnt und die OD₅₉₅ bestimmt. Zur Überprüfung der Induktion wurden die entnommenen Proben für eine SDS-PAGE vorbereitet indem sie 5 min bei 4 °C und 16100 g zentrifugiert und das Pellet mit 500 µL SDS-Probenpuffer versetzt wurde.

Die restliche Kultur wurde pelletiert (30 min, 1699 g, 4 °C), in 2 mL des entsprechenden Puffers resuspendiert und auf 1,5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt. Für den analytischen Aufschluss wurden die Pellets mit 1 µL Lysozym sowie 1 µL PMSF versetzt und nach einer zehn-minütigen Inkubation bei 37 °C durch Ultraschall (3×20 s, Cycle 30-40, Leistungsstufe 3-4 mit 20 s Inkubation auf Eis zwischen den Pulsen) oder eine Glaskugelmühle (2×30 s, Speed 6; 5 minütige Inkubation auf Eis zwischend den Durchgängen) lysiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (30 min, 16100 g, 4 °C) abgetrennt. Für eine SDS-Probe wurden 50 µL des Überstandes mit 50 µL SDS-Probenpuffer versetzt und das Pellet in 200 µL SDS-Probenpuffer resuspendiert. Abschließend wurden die SDS-Proben der Testexpression sowie des analytischen Aufschlusses auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

3.3.2 Glycerinkulturen

Zur Lagerung der Transformanten im Expressionsstamm wurden Glycerinkulturen hergestellt, aus denen Übernachtskulturen für die präparative Expression angesetzt werden konnten.

Für die Herstellung wurden 4 mL LB-Medium mit Selektionsmarkern versetzt und mit einer Kultur von einer LB-Agarplatte inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD₅₉₅ von 0,5-0,6 inkubiert, anschließend wurden 250 µL mit 500 µL sterilem Glycerin (87 % (v/v)) versetzt, gevortext und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Glycerinstocks erfolgte bei -80 °C.

3.3.3 Präparative Expression

Für die heterologe Überproduktion der rekombinanten Proteine wurde zunächst eine 5 mL LB-Übertagkultur mit Selektionsmarker aus Glycerinkulturen angeimpft und von dieser eine 50 mL LB-Übernachtskultur mit Selektionsmarker inokuliert. Je 2 L LB- oder TB-Medium wurden mit Selektionsmarker im Verhältnis 1:100 mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Bei einer OD₅₉₅ von 0,5 bis 0,6 wurde die Temperatur gesenkt und mit IPTG oder IPTG und Arabinose induziert (siehe Tabelle 3.5) sowie die Kultur für weitere 22 h inkubiert.

Tabelle 3.5: Produktionsbedingungen für die verwendeten Proteine.

	PAPP5	PAPP2c	PhyA	PhyB WT/ Hybride	PhyB Varianten
Medium	TB	TB	LB	TB	TB
Temperatur	21 °C		37 °C	18 °C	18 °C
IPTG-Konzentration	0,1 mM	1 mM	0,5 mM	1 mM	1 mM
Arabinose					0,4 %

Anschließend wurden die Kulturen in JA-10 Bechern 15 min bei 8200 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde im entsprechenden Puffer (siehe Tabelle 3.6) resuspendiert und in 35 mL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3.6: Auflistung der verwendeten Puffer zum Resuspendieren der Zellpellets.

PAPP5	PAPP2c	PhyA	PhyB/Hybride
50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM HEPES	50 mM Tris
100 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl	300 mM NaCl
4 mM MnCl ₂	1 mM IDA	1 mM IDA	1 mM IDA
	20 % Glycerin	20 % Glycerin	10 % Glycerin
1 mM β -Mercapto-ethanol	1 mM β -Mercapto-ethanol	1 mM β -Mercapto-ethanol	1 mM β -Mercapto-ethanol
pH 8,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 7,5

3.3.4 Präparativer Aufschluss

Der präparative Zellaufschluss erfolgte durch einen Hochdruckhomogenisator (*French Press*). Dabei wird die Zellsuspension mittels hohem Druck durch eine kleine Öffnung gedrückt und durch die auftreten der Scherkräfte erfolgt die Lyse der Zellen.

Die Zellsuspension (35 mL) wurde mit 3,5 μ L PMSF (200 mM), 28 μ L Lysozym (50 mg/mL), und 30 μ L EDTA (100 mM) sowie einer Spatelspitze Desoxyribonuklease I (DNaseI) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die vorgekühlte Hochdruckzelle wurde anschließend mit der ebenfalls gekühlten Zellsuspension befüllt und die Zellen bei einem Druck von 1200 psi lysiert. Danach wurden sowohl Zelle als auch Zellsuspension erneut gekühlt, bevor die Prozedur wiederholt wurde (2-3 Mal). Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (JA-20 Becher, 30 min, 40000 g, 4 °C) abgetrennt. Das Pellet wurde mit dem zum Lysat equivalentem Volumen an Puffer versetzt und resuspendiert. Für die SDS-PAGE wurden 50 μ L des Überstands und 50 μ L Pellet entnommen und zu jeweils 50 μ L SDS-Probenpuffer gegeben.

3.3.5 Ni-NTA-Affinitätschromatografie

Durch die verwendeten Vektoren wurden die Proteine als Fusion mit einem N-terminalen oder C-terminalen Hexa-Histidin-*Tag* hergestellt. Bereits 1975 wurde diese Technik von PORATH verwendet um Proteine mittels Chelatisierung an Metallionen zu isolieren^{177,178}. Als Säulenmaterial wird Nitrilotriessigsäure (NTA) verwendet, die Nickel-Ionen komplexiert. Im Austausch gegen zwei Wassermoleküle kann Nickel mit zwei Histidinen interagieren. Die Elution erfolgt durch die Zugabe des Histidin-Strukturanalogs Imidazol im Überschuss (100 mM – 500 mM).

3.3.5.1 Analytische Ni-NTA-Affinitätschromatografie

Um das Bindeverhalten des produzierten Proteins an eine Ni-NTA-Matrix zu überprüfen oder einen *pull-down* durchzuführen, wurde die analytische Ni-NTA-Affinitätschromatografie verwendet.

Zunächst wurde die Ni-NTA *spin column* (*Qiagen*) mit 600 μL Puffer äquilibriert und anschließend bei 270 g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Danach wurden 600 μL der Proteinlösung mit Hexa-Histidin-*Tag* aufgetragen, 1 min auf Eis inkubiert und bei 200 g und 4 °C für 5 bis 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde mit 600 μL Puffer gewaschen und 600 μL Protein ohne *Tag* zugegeben, 1 min auf Eis inkubiert und bei 200 g und 4 °C für 5 bis 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde erneut mit 600 μL gewaschen und mit 300 μL Elutionspuffer (siehe Tabelle 3.7) bei 270 g und 4 °C für 5 min eluiert.

Es wurden von allen Fraktionen jeweils 50 μL SDS-Proben genommen, mit 50 μL SDS-Probenpuffer versetzt und auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

3.3.5.2 Präparative Ni-NTA-Affinitätschromatografie

Bei einer präparativ durchgeführten Ni-NTA-Affinitätschromatografie wurde der filtrierte Überstand des Zellaufschlusses über eine Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von 1 mL/min auf eine mit je fünf Säulenvolumen $d\text{H}_2\text{O}$ und Puffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (1 mL oder 5 mL Ni-NTA-Säulenmaterial, *Qiagen*) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 1 Säulenvolumen Puffer gewaschen und an das Äkta-Purifier-System (*GE Healthcare*) angeschlossen. Die Elution des Proteins erfolgte durch die stufenweise (PhyA, PAPP2c) oder lineare (PAPP5, Hybrid, PhyB) Erhöhung der Imidazolkonzentration. Eine Auflistung der verwendeten Elutionspuffer findet sich in Tabelle 3.7. Nach der Verwendung wurde das Säulenmaterial mit je fünf Volumen $d\text{H}_2\text{O}$ und 20 % Ethanol gewaschen.

Tabelle 3.7: Auflistung der verwendeten Elutionspuffer für die Ni-NTA-Affinitätschromatografie.

PAPP5	PAPP2c	PhyA	PhyB/Hybride
50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM HEPES	50 mM Tris
100 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl	300 mM NaCl
250 mM Imidazol	250 mM Imidazol	500 mM Imidazol	250 mM Imidazol
4 mM MnCl ₂	20 % Glycerin	20 % Glycerin	10 % Glycerin
1 mM β-Mercapto-ethanol	1 mM β-Mercapto-ethanol	1 mM β-Mercapto-ethanol	1 mM β-Mercapto-ethanol
pH 8,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 7,5

3.3.6 Konzentrieren von Proteinlösungen durch Zentrifugation

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch Zentrifugieren in Konzentratoren (Amicon Ultra, Millipore) für 3 bis 10 min bei 2880 g und 4 °C erhöht. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde die Lösung auf- und abpipettiert, um den entstandenen Konzentrationsunterschied auszugleichen.

3.3.7 Pufferwechsel

Um einen Pufferwechsel bei Proteinlösungen durchzuführen, wurde eine spezielle Größenausschlusschromatografie genutzt, bei welcher Säulen mit einem sehr kleinen Ausschlussvolumen (5 kDa) verwendet wurden. Dies führt dazu, dass alle untersuchten Proteine im Ausschlussvolumen in der mobilen Phase eluieren. Hierfür wurden PD-10 Säulen (*GE Healthcare*) oder PD MiniTrap G25-Säulen (*GE Healthcare*) eingesetzt. Zunächst wurden die Säulen mit 3 Säulenvolumen des Zielpuffers äquilibriert, bevor 2,5 mL (PD-10 Säule), beziehungsweise 0,5 mL (G-25 Säule) Proteinlösung aufgetragen und mit 3,5 mL, respektive 1 mL des Zielpuffers eluiert wurde.

3.3.8 Thrombin-Verdau

Da der Hexa-Histidin-Tag Einfluss auf die Messungen zur Charakterisierung der Proteine nehmen kann, wurde dieser mittels Thrombin-Verdau für eine Stunde oder über Nacht bei 4 °C abgespalten. Hierbei wurden pro mg Protein 102 Units der Protease eingesetzt, die eine Aktivität von 41 Units pro mg aufweist. Durch eine reverse Ni-NTA konnte der abgespaltene Hexa-Histidin-Tag vom Protein abgetrennt werden und durch eine anschließende Gelfiltration die Protease.

3.3.9 Gelfiltrationschromatografie

Eine weiterführende Reinigung der Proteine erfolgte durch die Gelfiltrationschromatografie. Sie basiert auf den unterschiedlichen hydrodynamischen Durchmesser der Proteine, die auf Grund dessen unterschiedlich schnell durch ein poröses Säulenmaterial wandern. Kleinere Proteine können in die Poren des Säulenmaterials hineindiffundieren und eluieren daher langsamer als größere Proteine. Da der hydrodynamische Durchmesser mit dem Molekulargewicht (MW) korreliert, kann über die Retentionszeit (T_R) einer kalibrierten Säule das Molekulargewicht abgeschätzt werden (siehe Formel 3.3).

$$T_R \propto -\lg(MW)$$

Formel 3.3: Zusammenhang der Retentionszeit (T_R) mit dem dekadischen Logarithmus (\lg) des Molekulargewichts (MW).

Die Säulen (*GE Healthcare*) wurden vor der Verwendung mit zwei Säulenvolumen dH_2O und Gelfiltrationspuffer (siehe Tabelle 3.8) an einem Äkta-Purifier-System (*GE Healthcare*) äquilibriert. Die Kalibration wurde mit einem *Gel Filtration Calibration Kit HMW* oder *LMW* (*GE Healthcare*) durchgeführt.

Tabelle 3.8: Auflistung der Gelfiltrationspuffer für die jeweiligen Proteine.

PAPP5	PAPP2c	PhyA	PhyB/Hybride
50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM HEPES	50 mM Tris
300 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl	300 mM NaCl
1 mM EDTA		1 mM EDTA	5 mM EDTA
4 mM $MnCl_2$	20 % Glycerin	20 % Glycerin	10 % Glycerin
1 mM β -Mercapto-ethanol	mM β -Mercapto-ethanol	1 mM β -Mercapto-ethanol	1 mM β -Mercapto-ethanol
pH 8,0	pH 7,5	pH 7,5	pH 7,5

Die Eigenschaften der aufgetragenen Proteinproben sowie der maximale Druck und die Flussrate der Säulen sind in Tabelle 3.9 angegeben. Die Detektion erfolgte bei 280 nm und zusätzlich bei 235 nm, wenn die Proteine einen geringen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm besaßen. Bei Phytochromen wurde zusätzlich zu 280 nm noch der Kofaktor PCB bei den Wellenlängen 660 nm sowie 700 nm verfolgt. Nach der Elution der Proteine wurde die Säule mit je zwei Säulenvolumen dH_2O und 20 % Ethanol gespült.

Tabelle 3.9: Maximaler Druck und Flussrate sowie die Probeneigenschaften für die verschiedenen Chromatographiesäulen.

	Superdex200 10/30	Superdex200 16/60	Superdex200 26/60
Maximaler Druck	1,50 MPa	0,35 MPa	0,35 MPa
Flussrate	0,5 mL/min	1 mL/min	2 mL/min
Probenvolumen	0,25 mL	2 mL	2 mL
Maximale Probenkonzentration	0,5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL

3.4 Proteinanalytik

3.4.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (engl.: *Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient zur Identifizierung von Proteinen sowie der Bestimmung ihres Reinheitsgrades. Sie basiert auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Dabei bewirken unterschiedliche Ladungen und Größen der Teilchen eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität, was im Falle der SDS-PAGE zu einer Auftrennung der Proteine anhand ihrer Masse führt¹⁷⁹.

Der Zusatz von SDS und β -Mercaptoethanol zum Probenpuffer bewirkt zunächst eine Denaturierung und somit eine Linearisierung der Proteine, indem fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen und Disulfidbrücken aufgelöst werden. Unterstützt wird dies durch kurzes Erhitzen der Probe. Weiterhin maskiert SDS die Eigenladung der Proteine. Die so behandelten Proben werden anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Probe durchläuft zunächst ein Sammelgel, welches zur Erhöhung der Auflösung durch eine Fokussierung der Proteinprobe dient. Als Sammel- und Trenngel dient ein Polyacrylamidgel, welches chemisch inert und sehr stabil ist. Die Polymerisation des Acrylamids findet dabei über einen Quervernetzer, das N,N'-Methylenbisacrylamid (BIS), dem Katalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, TMEDA) und dem Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS, PER), statt. Die Porengröße und der Vernetzungsgrad kann durch die Acrylamidkonzentration variiert werden. Durch anschließendes Anlegen eines elektrischen Feldes migrieren die negativ geladenen Proteine zur Anode und trennen sich nach ihrer relativen molaren Masse auf, wobei Proteine kleiner molarer Masse schneller migrieren können als die größerer. Nach Abschluss der elektrophoretischen Trennung können die Proteine mit einem Farbstoff, wie zum Beispiel Coomassie-Blau, sichtbar gemacht werden.

Zum Gießen einer SDS-PAGE wurde die Gelgießapparatur zu $\frac{3}{4}$ mit Trenngel befüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation und Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel über das Trenngel aufgetragen und die Kämme eingesetzt. Tabelle 3.10 zeigt die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten 12 %igen Gele.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese.

Substanz	Volumen 12 % Trenngel	Volumen Sammelgel
Acrylamid (30 %)	30 mL	6,7 mL
SDS (10 %)	750 µL	500 µL
dH ₂ O	19,3 mL	32,9 mL
Trenngelpuffer	25 mL	-
Sammelgelpuffer	-	10 mL
TEMED	75 µL	50 µL
APS	375 µL	500 µL

Für die SDS-PAGE wurden die Proben mit Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl, 15 % Glycerin, 4 % (w/v) SDS, 2 mg Bromphenol und 4 % (w/v) β -Mercaptoethanol) versetzt, fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und zwei Minuten bei 16100 g zentrifugiert, bevor sie aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Gele mit Laufpuffer (250 mM Tris, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS) überschichtet und die Elektrophorese bei 40 mA pro Gel durchgeführt.

Nach dem Entfernen des Sammelgels wurde das Trenngel gewaschen, in der Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 5 % (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Ethanol) erwärmt, 15 min inkubiert und abschließend mit Entfärbelösung (5 % (v/v) Essigsäure, 28 % (v/v) Isopropanol) behandelt¹⁸⁰.

3.4.2 Nachweis des Tetrapyrrol-Kofaktors

Die Tatsache, dass der verwendete Kofaktor der Phytochrome, PCB, in Anwesenheit von Zinkacetat einen Komplex bildet, der mit UV-Licht angeregt werden kann, wird als Nachweis der Produktion des Holoenzym verwendet. Hierfür wurde die SDS-PAGE vor der Anfärbung mit Coomassie 30 min in einer 2 mM Zinkacetat-Lösung inkubiert. Die Dokumentation erfolgte anschließend unter UV-Licht¹⁸¹.

3.4.3 Western-Blot

Bei einem Western-Blot werden die Proteinbanden einer ungefärbten SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, welche dort in einer spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung detektiert werden können. Es wird ein anti-Penta-His-HRP-Konjugat verwendet, das spezifisch an den Hexa-Histidin-Tag des Proteins bindet. Durch die an den Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase

(*horseradish peroxidase*, kurz: HRP) kann eine durch die Oxidation von Luminol ausgelöste Chemilumineszenz auf einem Film festgehalten werden¹⁸².

Der Elektroblob für den Western-Blot wurde nach der *semi-dry*-Methode durchgeführt¹⁸³. Für den Transfer der Proteinbanden auf eine Nitrocellulosemembran (*GE Healthcare*) wurde zunächst die Membran und acht Whatman-Filterpapiere auf die Trenngelgröße zugeschnitten und die Membran für 30 min in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol) inkubiert. Anschließend wurden in die Blottingapparatur von der Anode ausgehend vier Whatman-Filterpapiere, die Nitrocellulosemembran, die SDS-PAGE und darauf vier weitere Whatman-Filterpapiere gelegt. Bei maximal 5 V pro Gel wurde 80 min geblottet. Um zu überprüfen, ob die Übertragung der Proteinbanden auf die Nitrocellulosemembran stattgefunden hat, wurde die Membran reversibel mit einem Tintenstain angefärbt. Dazu wurde diese für circa 5 min in Tinten-Lösung (2 % Tinte, 1 % Essigsäure) geschwenkt und die Markerbanden markiert. Nach Entfernen der Tinte mit 0,1 M NaOH-Lösung wurde die Membran mit *dH*₂O gespült und in 20 µL Blocking-Puffer (0,1 mg Blocking-Reagenz, 20 mL Blocking-Puffer, 20 µL Tween-20) bei 4 °C inkubiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen abzusättigen.

Nach einem zweimaligen Inkubieren für 10 min in TBS-T-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20,) und TBS-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 138 mM NaCl; 2,7 mM KCl) wurde die Membran für 1 h in 20 mL Block-Puffer gegeben, zu dem 1:3000 anti-Penta-His-HRP-Konjugat zugesetzt wurde. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation in TBS-T-Puffer und TBS-Puffer unter den gleichen Bedingungen wie zuvor. Um die Chemolumineszenz-Reaktion zu starten, wurden 2 mL ECL-Lösung (1:50 Solution B/Solution A, *GE Healthcare Western Blotting detection system*) auf die Membran gegeben und die Membran für 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit *dH*₂O gewaschen und unter Sicherheitslicht in einer Röntgenkassette für 1 min bis 10 min mit einem ESL-Hyperfilm inkubiert. Daraufhin wurde der Film mit der Entwickler-Lösung (*Kodak Professional D-19, Kodak*) inkubiert, bis die Ecken schwarz wurden und die Reaktion mit einem Gemisch aus *dH*₂O und Essigsäure gestoppt. Abschließend wurde der Film zuerst in eine Fixierer-Lösung (20 g/L K₂S₂O₅, 100 g/L Na₂S₂O₃·5H₂O) und dann in *dH*₂O gegeben.

3.4.4 Dynamische Lichtstreuung

Die dynamische Lichtstreuung (DLS) wird in der Biochemie verwendet um hydrodynamische Radien, Verteilungsbreiten (Polydispersitäten) und Aggregationseffekte von Proteinen bestimmen zu können.

Trifft monochromatisches Licht eines Lasers auf Partikel in Brownscher Bewegung, verursacht dies eine Fluktuation der Streuintensität. Die Schnelligkeit der Fluktuation der Lichtintensität ist abhängig von der Größe der Makromoleküle. Zur Bestimmung der Korrelationsfunktion wird in unterschiedlichen Zeitabständen die Streulichtintensität der Proben analysiert und miteinander verglichen. Für die Annahme, dass Proteine als starre Kugeln zu betrachten sind, ergibt sich mittels der Korrelationsfunktion der Diffusionskoeffizient (D). Aus diesem lässt sich bei bekannter Viskosität des Lösungsmittels über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Radius (R_h) berechnen¹⁸⁴ (siehe Formel 3.4).

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot R_h}$$

Formel 3.4: Die Stokes-Einstein-Gleichung gibt den Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient (D) und hydrodynamischen Radius (R_h) an. Der Diffusionskoeffizient ist abhängig von der Boltzmann-Konstante (k), der Temperatur (T), der Viskosität des Lösungsmittels (η_0) und dem hydrodynamischen Radius (R_h).

Die Standardabweichung des hydrodynamischen Radius gibt die Polydispersität der Makromoleküle in Lösung an. So werden Proben mit einer Polydispersität kleiner 15 % als monodispers und mit einem Wert größer 30 % als polydispers beschrieben klassifiziert¹⁸⁵.

Die Messungen wurden mit einem SpectroLight 600 Instrument (*Xtal Concepts*) durchgeführt. Zunächst wurden die Proben 10 min bei 16100 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde 1 μ L einer 20 μ M Proteinlösung in KP-Puffer (25 mM Tris pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 20 mM Mg(CH₃COO)₂; 0,2 mM EGTA; 0,2 mM EDTA) auf eine 96-well Platte unter Paraffinöl gegeben und bei RT über einen Zeitraum von 6 h vermessen.

3.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte am Nanodrop oder durch einen *Bradford*-, beziehungsweise Bicinchoninsäure (BCA)-Assay.

3.4.6 Bradford-Assay

Der *Bradford*-Assay wurde 1976 entwickelt und basiert auf der Stabilisierung der Sulfonatform des Farbstoffs Coomassie-Brilliantblau G250 durch die Wechselwirkung mit kationischen Seitenketten in saurem Milieu. Hierbei wird das Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm (anionische Sulfonatform) verschoben¹⁸⁶. Der Test ist eine empfindliche photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen bis zu Konzentration im Bereich mehrerer Mikrogramm pro Milliliter.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde Bradforldösung (*Biorad*) im Verhältnis 1:4 mit *dH*₂O versetzt und 999 μ L dieser Lösung mit 1 μ L Proteinlösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten wurde die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Referenz diente eine Probe ohne Proteinlösung. Durch eine mit BSA aufgenommenen Kalibrationsgerade kann die Proteinkonzentration abgeschätzt werden.

3.4.7 Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

Beim 1985 von *Smith* entwickelten BCA-Assay wird bei Anwesenheit von Proteinen Cu(II) zu Cu(I) reduziert. Das reduzierte Kupfer reagiert mit Bicinchoninsäure zu einem violetten Komplex, der bei 562 nm ein Absorptionsmaximum aufweist¹⁸⁷.

Zu 1000 μ L Reagenz A (enthält Bicinchoninsäure, *Interchim*) wurden 20 μ L Reagenz B (enthält CuSO₄, *Interchim*) gegeben sowie 50 μ L Proteinlösung und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Referenz wurden 50 μ L *dH*₂O verwendet. Im Anschluss wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Durch eine zuvor mit BSA aufgenommenen Kalibrationsgerade kann die Konzentration errechnet werden.

3.5 Spektroskopie

3.5.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde verwendet um konformelle Informationen über den an Phytochrome gebundenen Tetrapyrrol Kofaktor, in dieser Arbeit Phycocyanobilin (PCB), zu erhalten. PCB ist ein lineares Tetrapyrrol, das aus konjugierten Doppelbindungen besteht und auf Grund dessen im UV/Vis-Bereich absorbiert. Zu Phytochromobilin, dem nativen Kofaktor der Pflanzen unterscheidet es sich lediglich um eine Doppelbindung am D-Ring.

Die Messungen wurden an einem V-660 Spektrometer (JASCO) bei 8 °C beziehungsweise 20 °C durchgeführt. Zunächst wurde eine Basislinie mit dem verwendeten Puffer aufgenommen, welche von den später gemessenen Proteinspektren automatisch abgezogen wurden. Jeweils drei Spektren wurden aufgenommen und akkumuliert. Die für die Messungen verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.11 aufgeführt.

Tabelle 3.11: Parameter für die Aufnahme von UV/Vis-Spektren am V-660 Zweistrahlenspektrometer.

Parameter	Wert
Messbereich	200-800
Datenintervall	0,5 nm
Bandbreite	10 nm
Response	<i>fast</i>
Messgeschwindigkeit	1000 nm/min
Lampenwechsel	340 nm
Lichtquelle	D2/W1
Filterwechsel	schrittweise

Die Absorptionsmessungen wurden jeweils nach 2 min oder 4 min Bestrahlung mit rotem (635 nm) oder dunkelrotem Licht (735 nm) durchgeführt.

3.5.2 Circular dichroismus-Spektroskopie

Die Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) liefert Informationen über möglicherweise vorhandene Kofaktoren, Sekundärstrukturanteile sowie den Schmelzpunkt des jeweiligen Proteins.

Bei der CD-Spektroskopie wird monochromatisches Licht durch ein hochfrequentes Wechselfeld abwechselnd links- beziehungsweise rechts-circular polarisiert.

Proteine, die eine optische Aktivität besitzen, absorbieren die Strahlung unterschiedlich stark. Aus der resultierenden Differenz ergibt sich die Elliptizität (Θ)¹⁸⁸. Für Proteine wird die mittlere molare Elliptizität ($[\Theta]_{MRW}$) angegeben, die abhängig von der molaren Masse (M), der Konzentration (c), der Schichtdicke (d) und der Anzahl der Aminosäuren (N_{AS}) ist¹⁸⁹ (siehe Formel 3.5).

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot M}{c \cdot d \cdot (N_{AS} - 1)}$$

Formel 3.5: Die mittlere molare Elliptizität ($[\Theta]_{MRW}$) ist abhängig von Elliptizität ($[\Theta]$), der molaren Masse (M), der Konzentration (c), der Schichtdicke (d), sowie der Anzahl der Aminosäuren (N_{AS}).

Für die Kofaktoruntersuchung wurde ein Nah-UV/Vis-CD-Spektrum aufgenommen. Zur Bestimmung der Sekundärstrukturanteile wird ein Fern-UV-CD-Spektrum gemessen. Für beide Messungen wurde zunächst eine Basislinie mit dem verwendeten Puffer gemessen und anschließend wurde das Spektrum der Proteinlösung aufgenommen, von dem die Basislinie automatisch abgezogen wurde. Die Messung wurde drei Mal wiederholt und die Spektren anschließend akkumuliert. Die für die Messung verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.12 aufgeführt.

Zur Messung der thermischen Stabilität wurde die Proteinlösung der Fern-UV/Vis-CD-Messung verwendet. Die Entfaltungskurve wurde am Elliptizitätsminimum des Fern-UV/Vis-Spektrums aufgenommen.

Tabelle 3.12: Parameter für die Aufnahme von CD-Spektren am J-810-Spektropolarimeter.

	Nah-UV/Vis-CD	Fern-UV-CD	T _m -Kurve
Konzentration Probe	mind. 50 μ M	5 μ M	5 μ M
Schichtdicke Küvette	0,1 cm	0,1 cm	0,1 cm
Temperatur	20 °C	20 °C	20-95 °C
Messbereich	800-240 nm	280-198 nm	
Schichtdicke Küvette	0,1 cm	0,1 cm	0,1 cm
Messgeschwindigkeit	100 nm/min	50 nm/min	
Dämpfung	1 s	2 s	
Bandbreite	1 nm	1 nm	2 nm
Heizrate			2 °C/min
Schrittweite			0,5 °C

Um die Dunkelreversionsrate zu bestimmen, wurde das Protein mit rotem Licht bestrahlt und alle 20 min oder 30 min der Bereich zwischen 705 nm und 720 nm, beziehungsweise 695 nm und 710 nm vermessen.

3.5.3 Resonanz-Raman-Spektroskopie

Raman-Spektroskopie beruht auf einem von *Raman* und *Krishnan* 1928 beschriebenen Phänomen, bei dem neben der „normalen“ Lichtstreuung auch Streuung mit verschobenen Frequenzen beobachtet wird. Für die Bioanalytik wurde diese Methode erst zugänglich mit der Anwendung von Lasern.

Im Allgemeinen wechselwirken Photonen des einstrahlenden Lichts mit den Molekülen einer Probe. Die Raman-Streuung kann als unelastische Streuung eines Photons an Molekülen aufgefasst werden, bei der das emittierte Licht auf Grund der unelastischen Wechselwirkung mit dem Molekül eine verschobene Frequenz gegenüber dem einfallenden Licht besitzt. Beide Richtungen der Energieübertragung sind möglich: Stokes-Linien (Verschiebung zu kleineren Energien; Energieübertragung von Photon auf Materie) und Anti-Stokes-Linien (Verschiebung zu höheren Energien; Energieübertragung von Materie auf Photon). Das Raman Spektrum wird erhalten indem die Intensität des emittierten Lichts als Funktion der Differenz (eingestrahlte minus emittierte Wellenlänge) aufgetragen wird und ist charakteristisch für das streuende Molekül. Die Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung ist allerdings sehr gering, was auch die hohe benötigte Anregungsintensität erklärt.

Für Resonanz-Raman-Messungen werden abstimmbare Laser benötigt, welche es erlauben die Anregungsenergie auf die Absorptionsbanden der elektronischen Übergänge von Chromophoren einzustellen. Hierbei lassen sich auf Grund der höheren Polarisierbarkeit des Moleküls, Raman-Linien des Chromophors von den Raman-Linien des gesamten Moleküls unterscheiden, da die Resonanzverstärkung nur auf die Signale des Chromophors zutrifft.

All Proben wurden zunächst in folgenden Puffer überführt: 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 300 mM NaCl und 5 mM EDTA. Für den Deuterium-Puffer wurde entsprechend D₂O (*Deutereo GmbH*) verwendet. Anschließend wurden die Proben mit einem Zentrifugenfilter (0,5 mL *Ultra Microcons*; 30 kDa, *Amicon*) bei 14500 g bis zu einer OD₂₈₀ von 60-100 konzentriert. Für die deuterierten Proben erfolgte der Wasserstoff-Deuterium Austausch durch drei Waschschriffe, jeweils 30 min bei 14500 g. Die Deuterium-Spektren wurden direkt im Anschluss aufgenommen.

Die Messungen wurden an einem FT Raman Spektrometer RFS 100/S (*Bruker*) mit einer Anregung von 1064 nm (Nd:YAG cw Laser; Bandbreite: 1 cm^{-1}) und einem Stickstoff-gekühltem Kryostaten (*Resultec, Linkham*) durchgeführt. Die Spektren wurden bei -140 °C mit einer effektiven Laserenergie von 690 mW aufgenommen. Für jedes Spektrum wurde eine Akkumulationszeit von einer Stunde (Mittelwert von 2000 individuellen Interferogrammen) gewählt und die Auflösung auf 4 cm^{-1} gesetzt. Es wurden jeweils 6 μL Probe pro Messung verwendet, die zuvor mit rotem (660 nm) oder dunkelrotem Licht (785 nm) bestrahlt wurden. Als Sicherheitslicht wurde grünes Licht (530 nm) verwendet. Die Datenprozessierung erfolgte mit der Software *OPUS 5.5*. Nach einer Fourier-Transformation der aufgenommenen Interferogramme wurde manuell von den experimentellen RR Spektren eine polynomale Basislinie subtrahiert.

Die Messungen und Analysen der Daten wurden von *David Buhrke* aus der Gruppe von *Prof. Dr. Peter Hildebrandt* (Technische Universität Berlin) durchgeführt.

3.6 Massenspektrometrie

3.6.1 Peptidmassenfingerprint von Proteinen mittels tryptischem Verdau

Der Peptidmassenfingerprint (PMF) mittels tryptischen Verdau dient zur Überprüfung der Identität der aufgereinigten Proteine. Die massenspektrometrische Analyse wurde mit einem Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (*Thermo Scientific*) durchgeführt.

Die entsprechende Bande des zu identifizierenden Proteins wurde aus einer SDS-PAGE herausgeschnitten und über Nacht mit Trypsin (*sequencing grade modified trypsin, Promega*) bei 37 °C verdaut. 1 µL (4 µg protein) des tryptischen Verdau wurde auf eine C18 *pre-concentration* Säule aufgetragen und die Anreicherung und Entsalzung der Probe wurden bei einer Flussrate von 6 µL/min mit einem Wasser/0,05 % Ameisensäure Lösungsmittelgemisch durchgeführt. Die Trennung der Peptide erfolgte unter Verwendung einer selbstgepackten Säule (20 cm x 75 µm Säule mit 1,7 µm C18 Partikeln), die an eine nanoRSLC-HPLC (Ultimate 3000, *Dionex*) angeschlossen ist. Folgenden Lösungsmittelgemische wurden verwendet: Wasser/0,05 % Ameisensäure (Lösungsmittelgemisch A) und Wasser/80 % Acetonitril/0,045 % Ameisensäure (Lösungsmittelgemisch B) bei einer Flussrate von 300 nL/min. Zunächst wurde mit 4 % B für 5 min gespült, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 45 % B innerhalb von 195 min und abschließend einem linearen Anstieg auf 95 % B innerhalb von 10 min. Die Probe wurde online mittels einer Nanospray Flex Ion Source ionisiert und mit einem Potential von 2300 V in die vorgeheizte Kapillare des Massenspektrometers transferiert.

Anschließend wurden die detektierten Fragmente mit ihren charakteristischen Massen automatisch mit Datenbanken bekannter Proteinsequenzen verglichen. Die Analyse erfolgte mit der Software Proteome Discoverer 1.4 (*ThermoScientific*) unter Verwendung der Programme *Mascot* und *SEQUEST* (Version 2.2, *Matrix Science*) und erlaubt eine Aussage, welches Protein vorliegt.

Die Messungen und Analysen wurden von der massenspektrometrischen Abteilung der Universität Marburg unter Leitung von Herrn *Dr. Uwe Linne* durchgeführt.

3.6.2 Massenspektrometrische Analyse intakten Proteine/Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen

Um eine mögliche Dimerisierung von *AtPhyB* bestimmen zu können, wurden eine massenspektrometrische Messungen von rekombinanten Phytochromen unter nativen Bedingungen durchgeführt.

Für die Messungen wurde ein Synapt G2 S Massenspektrometer (*Waters*), ausgestattet mit einer NanoLockSpray Ionisierungsquelle, verwendet. Direkt vor den MS Messungen wurden 30 µL der Proteinprobe unter Verwendung von mikro Bio-Spin Säulen (*Bio-Rad*) bei 4 °C in einen Puffer ohne Natriumionen transferiert (50 mM Tris pH 7,8; 5 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol). Anschließend wurden 4 µL der Lösung in eine selbsthergestellte Pd/Pt-beschichtete Borsilikatkapillare geladen. Über diese nanoESI-Kapillaren konnte die Probe direkt in das Massenspektrometer eingesprüht werden. Die Kapillar- und Konusspannung wurden auf 2 kV, beziehungsweise 150 V gesetzt. Weiterhin wurde mit einer *Trap*- und Transfer-Stoßenergie von 60 V und 80 V sowie einem *Trap* Gasfluss von 7,0 mL/min gemessen.

Die Messungen wurden von *Dr. Nils Hellwig* aus der Gruppe von *Dr. Nina Morgner* (Universität Frankfurt) durchgeführt.

3.6.3 Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie

Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (engl.: *Hydrogen-deuterium exchange*, kurz: HDX) stellt eine Methode zur Analyse der konformellen und dynamischen Veränderungen von Proteinen und Identifizierung von Bindungsstellen in Proteinkomplexen dar.

Die Messung in Lösung ist von Vorteil gegenüber statischen Methoden wie beispielsweise der Kristallographie, die im wesentlichen nur eine Konformation darstellt, die aber nicht zwangsläufig der *in vivo* aktiven Form entsprechen muss^{190, 191}. Des Weiteren gibt es keine prinzipiellen Größenlimitierungen wie etwa bei NMR und es werden nur geringen Mengen der Probe benötigt¹⁹². Weiterhin sind auch Messungen aus Zellrohextrakten möglich¹⁹³.

Das Prinzip der HDX-MS basiert auf einem Wasserstoff-Deuterium-Austausch der Amidwasserstoffe des Peptidrückgrats, da diese eine Kinetik aufweisen, die es erlaubt, eine Deuterium-Inkorporation massenspektrometrisch nachzuverfolgen. Die Austauschgeschwindigkeiten der Seitenketten hingegen sind so hoch, dass sie während den anschließenden HPLC-Läufen bereits zurücktauschen¹⁹⁴. Weiterhin sind die Austauschzeiten abhängig von den Zugänglichkeiten der Wasserstoffe. So findet ein schnellerer Austausch für exponierte und dynamische Regionen statt, als für Bereiche im hydrophoben Kern, und solche, die an Wasserstoff-Brückenbindungen beteiligt sind (siehe Abbildung 3.1). Für sehr gut geschützte Wasserstoffe kann der Austausch sogar Monate dauern¹⁹⁵.

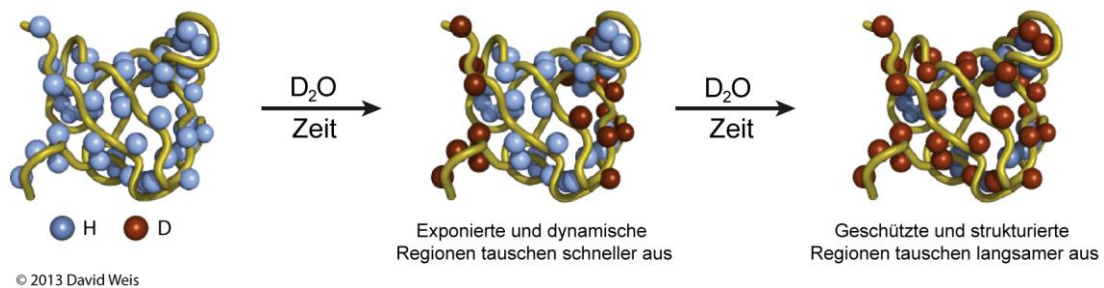


Abbildung 3.1: Prinzip des Wasserstoff-Deuterium-Austausches. Die Wasserstoffe des Proteinerückgrates (graue Kugeln) weisen eine Kinetik auf, die es erlaubt sie massenspektrometrisch zu vermessen. Die schnellsten Austauschzeiten besitzen die Wasserstoffe in den exponierten und dynamischen Regionen, während die Wasserstoffe in geschützten und strukturierten Bereichen langsamer austauschen^{nach 196}.

Der Austausch wird nach bestimmten Zeitpunkten durch die Verminderung der Temperatur auf 0 °C und die Zugabe einer Quench-Lösung eingefroren, was gleichzeitig auch eine Entfaltung des Proteins bewirkt. In einem nächsten Schritt wird das Protein mit Pepsin verdaut und mittels HPLC-MS vermessen (siehe Abbildung 3.2).

Durch Vergleich mit den Massenspektren der Peptide ohne Deuterium-Inkubation kann die jeweilige Inkorporation durch die Massenzunahme berechnet werden. Die maximale Deuteriumaufnahme wird hierbei von der Anzahl der Peptidbindungen (AS-1) bestimmt, wobei zu berücksichtigen ist, dass Proline kein Amid-Wasserstoff am Rückgrat aufweisen.

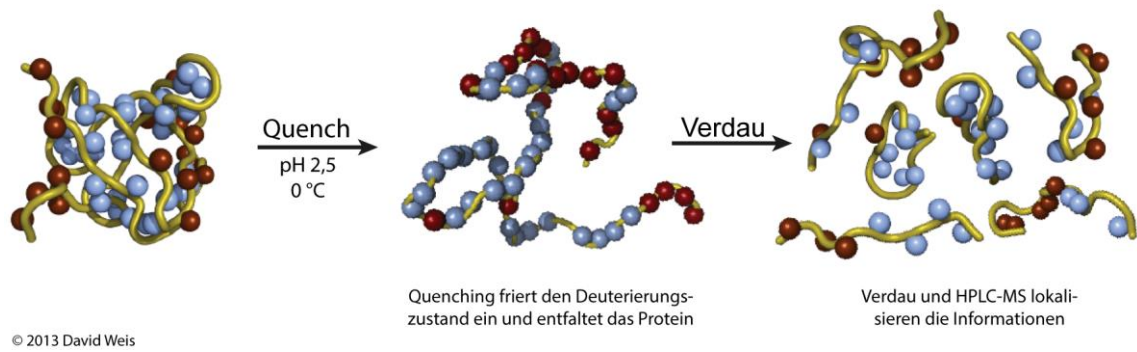


Abbildung 3.2: Lokalisierung des Wasserstoff-Deuterium-Austausches. Durch die Verminderung der Temperatur und die Zugabe einer Quench-Lösung wird das Austauschmuster eingefroren und kann durch den anschließenden Verdau und HPLC-MS Vermessung analysiert werden^{nach 196}.

Die Kinetiken für eine HDX-Reaktion sind abhängig von der Proteindynamik sowie der intrinsischen Wasserstoff-Deuterium-Austauschrate¹⁹⁷. Für eine typische HDX-Reaktion gilt:

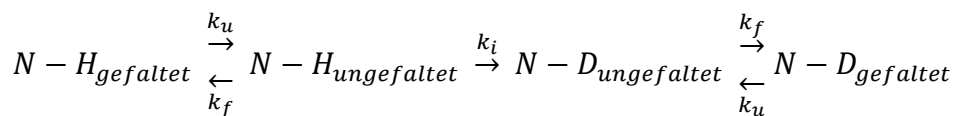


Abbildung 3.3: Gleichgewicht zwischen gefalteter (f) und ungefalteter Form (u) des Peptids sowie dem Wasserstoff-Deuterium-Austausch.

Hierbei stellen k_u und k_f die Geschwindigkeitsraten für die Umwandlung zwischen gefalteten und ungefalteten Protein dar, während k_i die Geschwindigkeitsrate für den intrinsischen Wasserstoff-Deuterium-Austausch repräsentiert.

Die zu beobachtende Austauschrate (k_{ex}), welche die Summe aller Beiträge zur Austauschreaktion des gefalteten (k_f) und ungefalteten (k_u) Proteins berücksichtigt, ergibt sich wie folgt¹⁹⁸.

$$k_{ex} = \frac{k_u \cdot k_i}{k_f + k_i}$$

Formel 3.6: Die Austauschrate (k_{ex}) wird bestimmt durch die Summe aller Beiträge des gefalteten (f) und des ungefalteten Proteins (u) sowie der eigentlichen Wasserstoff-Deuterium-Austauschrate (k_i).

Die Formel gilt unter der Annahme, dass die meisten Peptidbindungen in einer gefalteten Form vorliegen und somit $k_u \ll k_f$ gilt.

Die Geschwindigkeit der Proteinfaltung für ein natives Protein ist hierbei sehr viel schneller als die Geschwindigkeit für den intrinsischen Austausch ($k_f \gg k_i$)^{199, 200}. Allgemein lässt sich der Wasserstoff-Deuterium-Austausch in zwei Mechanismen unterteilen, EX1 und EX2. Durch zufällige thermische Fluktuation des nativen Proteins können die Amidwasserstoffe des Protein-Rückgrats exponiert gegenüber dem Lösungsmittel vorliegen und es erfolgt ein Austausch nach dem EX2-Mechanismus^{201,202}. Der vollständige Deuterium-Austausch kann mehrere Faltungs- und Entfaltungsvorgänge benötigen. Unter EX2-Bedingungen lässt sich die Austauschrate zu Formel 3.7 zusammenfassen. K_{eq} stellt hierbei die Gleichgewichtskonstante zwischen dem gefalteten und dem ungefalteten Zustand dar ($K_{eq} = k_u/k_f$)^{201,197}.

$$k_{ex} = K_{eq} \cdot k_i$$

Formel 3.7: Für eine Austauschreaktion nach dem EX2-Mechanismus ist die Geschwindigkeitsrate (k_{ex}) von der Gleichgewichtskonstante zwischen dem gefalteten und ungefalteten Zustand (K_{eq}) des Proteins abhängig sowie der Geschwindigkeitsrate des eigentlichen Wasserstoff-Deuterium-Austausches (k_i).

Der zweite Mechanismus erfolgt fast ausschließlich bei Messungen unter nicht-nativen Bedingungen²⁰², wie etwa mit hohem pH-Wert, bei dem die Austauschraten viel höher als die Faltungsrate des Proteins sind ($k_i \gg k_f$), so dass die Gesamtaus-tauschrate sich zu Formel 3.8 vereinfacht. Bei einem EX1-Mechanismus erfolgt ein sofortiger Wasserstoff-Deuterium-Austausch^{201,197}.

$$k_{ex} = k_i$$

Formel 3.8: Die Geschwindigkeitskonstante (k_{ex}) für einen Austausch nach dem EX1-Mechanismus ist nur noch abhängig von der Geschwindigkeitsrate des eigentlichen Wasserstoff-Deuterium-Austausches (k_i).

Die beiden Mechanismen unterscheiden sich in den Spektren durch unterschiedliche Peakverteilungen. Austauschraten, die dem EX2-Mechanismus folgen, weisen eine binominale Verteilung auf, während Austauschraten, die dem EX1-Mechanismus folgen, eine bimodale Verteilung zeigen, zurückzuführen auf eine hoch deuterierte und weniger deuterierte Spezies (siehe Abbildung 3.4).

Doch nicht alle Proteine folgen einem dieser zwei Mechanismen und Mischungen sind ebenfalls bekannt, was die Interpretation der Daten erschwert.

Eine Reihe von Faktoren, wie beispielsweise pH-Wert, Temperatur sowie die räumliche Nähe großer Seitenketten können weiterhin Einfluss auf die Austausch-Geschwindigkeit nehmen. Die HDX-Reaktion kann entweder säuren- oder basenkatalysiert erfolgen, jedoch überwiegt die basenkatalysierte Reaktion bei neutralem pH-Wert. Die Austausch-Reaktion erreicht ihren niedrigsten Wert bei einem pD-Wert von 2,3, der sich zu einem pD von 7,0 hin vervierfacht¹⁹⁴.

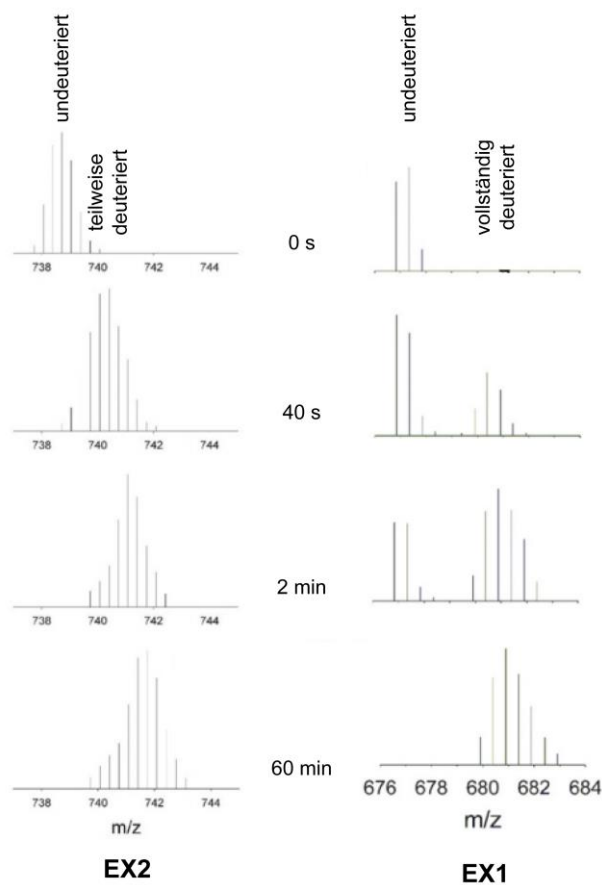


Abbildung 3.4: Beispielhafte Darstellung zweier Peptide zu verschiedenen Austauschzeiten, die entweder dem EX2 (links) oder dem EX1-Mechanismus (rechts) folgen^{nach 203}.

Die HDX-Messungen wurden automatisiert an einem Synapt G2-Si (*Waters*) bestehend aus einer automatischen Roboterfunktion (*LEAP Technologies*), ACQUITY UPLC M-Class system (*Waters*) und HDX manager (*Waters*) durchgeführt.

Für die Messungen wurden die Proben mit einer PD-10 Entsalzungssäule in einen Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris pH 7,8; 100 mM NaCl, 1 mM β -Mercaptoethanol) überführt und 10 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert, um mögliche Aggregate

abzutrennen. Die PhyB Proben wurden anschließend entweder 4 min mit 735 nm (P_{fr} Form) oder 656 nm (P_r Form) bestrahlt, mit Alufolie umhüllt und auf 1 °C gekühlt.

Für jeden LCMS-Lauf wurden 7,5 µL der entsprechenden Proteinlösung (60 µM) in ein neues Vial der Austauschplatte, die auf 25 °C gewärmt wird, pipettiert und mit 61,8 µL H₂O (t_0 -Lauf) oder D₂O (Austausch-Lauf) verdünnt. Nach einer bestimmten Inkubationszeit (30 s, 45 s, 60 s, 90 s und 120 s für *AtPhyB*; 15 s, 30 s und 60 s für PAPP5) wurden 55 µL dieser Lösung in ein Vial transferiert, das 55 µL auf 1 °C gekühlte Quench-Lösung (400 mM H₃PO₄/KH₂PO₄ pH 2,2) enthielt. Nach kurzer Inkubation, wurden 95 µL dieser Lösung injiziert. Der Verdau des Proteins erfolgte bei 20 °C unter Verwendung eines isokratischen Gradienten (Wasser/0,1 % Ameisensäure) und einer Flussrate von 100 µL/min. Anschließend wurden die mittels Pepsin verdauten Peptide bei 0,5 °C unter Verwendung einer C18 *trap*-Säule angereichert. Die Trennung der Peptide wurde bei 0,5 °C durchgeführt unter Verwendung einer 1 x 100 mm ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 µm Säule, bei einer Flussrate von 30 µL/min mit den folgenden Lösungsmittelgemischen: A (Wasser/0,1 % Ameisensäure) und B (Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure). Zunächst wurde mit einem linearen Gradienten von 5 % B auf 35 % B innerhalb von 7 min eluiert, gefolgt von einem Anstieg auf 85 % B innerhalb 1 min und halten für 2 min. Abschließend wurde die Säule mit 95 % B gewaschen und re-äquilibriert zu 5 % B für 5 min. Während der chromatografischen Trennung der Peptide wurde die Pepsinsäule durch die dreimalige Injektion von 80 µL einer Lösung aus 4 % Acetonitril und 0,5 M Guanidiniumchlorid gewaschen.

HDMS_e (engl.: *Enhanced high definition MS*) wurde für die Detektion der t_0 Peptide verwendet, während die Austauschpeptide im HDMS (engl.: *High definition MS*) Modus gemessen wurden. *Lock mass* Spektren wurden zur Kalibration jede 45 s gemessen, unter Verwendung von Glu-fibrinopeptid B als Standard ($M^{2+} = 785,8427$ m/z). Läufe mit Wasser anstatt Protein wurden nach jeder Messung vorgenommen, um die Verschleppung von Peptiden (engl.: *Carryover*) aus dem vorherigen Lauf auszuschließen.

Die Identifikation von t_0 Peptiden wurde mit dem Programm *ProteinLynx Global SERVER 3.0.1* (Waters) mit einer Kunden-generierten Datenbank durchgeführt.

Die Messungen wurden von *Dr. Uwe Linne* und *Dr. Andreas Mielcarek* (Massenspektrometrische Abteilung, Fachbereich Chemie, Universität-Marburg) durchgeführt.

Die Auswertung der Deuteriumaufnahme erfolgte mit dem Programm *DynamX 3.0* (*Waters*). Die minimale Peakintensität wurde auf 10^3 festgelegt, eine Peptidlänge zwischen vier und 16 Aminosäuren gewählt sowie die Anzahl der Wiederholungen von drei aus vier oder sechs aus acht festgelegt. Weiterhin wurde eine Toleranz von 0,5 min für die Retentionszeit und 25 ppm für das Masse-zu-Ladungsverhältnis festgelegt. Eine Standardabweichung von 4σ wurde gewählt, um die Abweichungen zwischen den Läufen zu bestimmen. Statistisch signifikante Unterschiede in der Deuteriumaufnahme wurden mittels t-Test mit einem 98 % Konfidenzintervall festgestellt. Die Anwendbarkeit eines t-Tests wurde zuvor durch den F-Test von Levene überprüft.

Die Ergebnisse der HDX-Analyse wurden auf bekannte Strukturen oder mittels MODELLER 9.10²⁰⁴ generierte Modelle abgebildet.

3.7 Protein-Assays

3.7.1 Para-Nitrophenol-Assays

Para-Nitrophenylphosphat (pNPP) wird verwendet, um in einem photometrischen Assay die Aktivität saurer und alkalischer Phosphatasen nachzuweisen. Die Fähigkeit der Phosphatasen, die Hydrolyse von pNPP zu para-Nitrophenol zu katalysieren, stellt die Grundlage für diesen Nachweis dar. Die Menge des Produkts kann durch eine Farbreaktion im basischen Milieu bei 405 nm bestimmt werden²⁰⁵. Die Aktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 pmol pNPP bei 30 °C zu hydrolysieren. Die spezifische Aktivität ist definiert als die Anzahl Enzymunits pro mg Protein.

Für den Phosphatase-Assay wurde zunächst der Hexa-Histidin-*Tag* von PAPP5 abgespalten und das Protein in KP-Puffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 20 mM Mg(CH₃COO)₂; 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA) überführt. Der Gesamtansatz bestand aus 100 µL, der 1 µg Protein beinhaltet. Das Protein und gegebenenfalls Fettsäuren (10 – 300 µM in Ethanol gelöst) wurden vorgelegt und bei 30 °C für 5 min vorinkubiert, anschließend wurde vorgewärmtes pNPP (10 - 300 mM) hinzugegeben und der Ansatz für 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 900 µL NaOH beendet und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Kontrollreaktionen wurden ohne pNPP oder Protein durchgeführt. Nach Abzug der Extinktion der Kontrollreaktion wurde die Phosphataseaktivität auf Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes und unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von para-Nitrophenolat⁷⁴ ($E_{405} = 18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ²⁰⁶) nach folgender Formel berechnet.

$$A = \frac{E_{405} \cdot V_{total}}{t \cdot \epsilon_{405} \cdot d \cdot m_{Enzym}}$$

Formel 3.9: Die Aktivität (A) der Phosphatase kann ausgehend vom Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet werden. Hierfür wird das Produkt aus der gemessenen Extinktion bei 405 nm (E_{405}) und dem Gesamtvolumen (V_{total}) durch das Produkt aus der Reaktionszeit (t), Extinktionskoeffizienten (ϵ), Schichtdicke der Küvette (d) und Masse des eingesetzten Enzyms (m_{Enzym}) geteilt.

3.7.2 Thermofluor-Assay

Thermofluor-Assays bieten eine schnelle und einfache Technik um die thermische Stabilität von Proteinen abzuschätzen. Hierbei können auch Aussagen über den Einfluss durch Bindungspartner oder Puffersysteme getroffen werden. Von einem signifikanten Einfluss spricht man bei einer Verschiebung des Schmelzpunktes um mindestens 2 °C.

Um die Entfaltung der Proteine verfolgen zu können, wird ein umgebungsabhängiger Fluoreszenzfarbstoff hinzugegeben. Dieser lagert sich an hydrophobe Bereiche des Proteins an, die meistens erst bei der Entfaltung zugänglich werden. Das Fluoreszenzsignal steigt bis das Protein anfängt zu aggregieren und fällt anschließend wieder ab.

Für die Durchführung der Messungen wurde ein Real-time PCR Instrument verwendet sowie Sypro Orange als Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird mit einer Wellenlänge von 492 nm angeregt und emittiert bei 516 nm. Die jeweiligen Messungen erfolgten in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 80 °C bei einer Messgeschwindigkeit von 0,5 °C/min. Jede Messung wurde dreimal wiederholt. Zur Kontrolle wurden Messungen aufgenommen, in denen nur Farbstoff und Puffer, beziehungsweise Additive vorlagen. Tabelle 3.13 zeigt die beispielhafte Zusammensetzung eines Ansatzes.

Tabelle 3.13: Beispielhafte Zusammensetzung eines Ansatzes für ein Thermofluor-Assay.

Reagenz	Konzentration	Volumen
Protein	1,0 mg/mL	30 µL
500× <i>Sypro Orange</i>	1:500	5 µL
Additiv	2-15 mM	5 µL

3.7.3 Thermophorese im Submikrobereich

Die Thermophorese im mikromolarem Bereich (engl.: *Microscale thermophoresis*, kurz: MST) erlaubt die Messung der Bindungsaffinität von Interaktionspartnern. Interaktionen können zwischen Proteinen, Protein und DNA oder RNA, sowie Proteinen und kleinen Molekülen stattfinden.

Das Prinzip der Thermophorese beruht auf der gerichteten Bewegung der Moleküle entlang eines Temperaturgradienten. Dieser ist entgegengesetzt der Massendiffusion. Im Gleichgewichtszustand haben sich beide Effekte ausgeglichen, was in einer stationären räumlichen Konzentrationsverteilung resultiert²⁰⁷. Die relative Konzentration ist allein von der Temperaturerhöhung sowie dem Soret-Koeffizient des Moleküls abhängig (siehe Formel 3.10). Der Soret-Koeffizient gibt hierbei die Stärke des thermophoretischen Molekülflusses verglichen mit der normalen Diffusion an. Abhängig ist der Soret-Koeffizient bei biologischen Proben von der Ladung, der Größe und der Hydrathülle des Moleküls²⁰⁸

$$\frac{c}{c_0} = \exp[-S_T \cdot (\Delta T)]$$

Formel 3.10: Formel zur Bestimmung der stationären Konzentrationsverteilung. Die zu untersuchende Konzentration (c) ist hierbei exponentiell abhängig von dem Soret-Koeffizienten (S_T) und der Temperaturerhöhung (ΔT ; $T-T_0$)²⁰⁸.

Für die thermophoretischen Messungen wurde zunächst einer der Interaktionspartner mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen, um die Bewegung des Moleküls auf Grund des durch einen Infrarotlaser erzeugten Temperatursprungs, nachvollziehen zu können. Der Laser hat einen Einfluss auf die physikalischen Parameter des Farbstoffes, wie etwa die Fluoreszenz-Halbwertszeit oder die Quantenausbeute²⁰⁹. Auf Grund dessen lässt sich die schnelle Änderung der Fluoreszenz nach Einschalten des Lasers erklären. Anschließend bewegen sich die Moleküle aus dem Fokus des Lasers (Thermophorese) und das Fluoreszenzsignal sinkt weiter bis sich schließlich ein Gleichgewicht einstellt. Nach dem Ausschalten des Lasers erfolgt ein inverser Temperatursprung der eine Rückdiffusion der Moleküle auslöst und somit das Signal wieder ansteigen lässt, idealerweise, bis die initiale Fluoreszenz erreicht ist. Doch auf Grund einer noch nicht vollständig abgelaufenen Rückdiffusion innerhalb des Messzeitraumes oder weiterer Effekte, beispielsweise Fotobleichen, kann die initiale Fluoreszenz eventuell nicht erreicht werden²¹⁰ (siehe Abbildung 3.3.5).

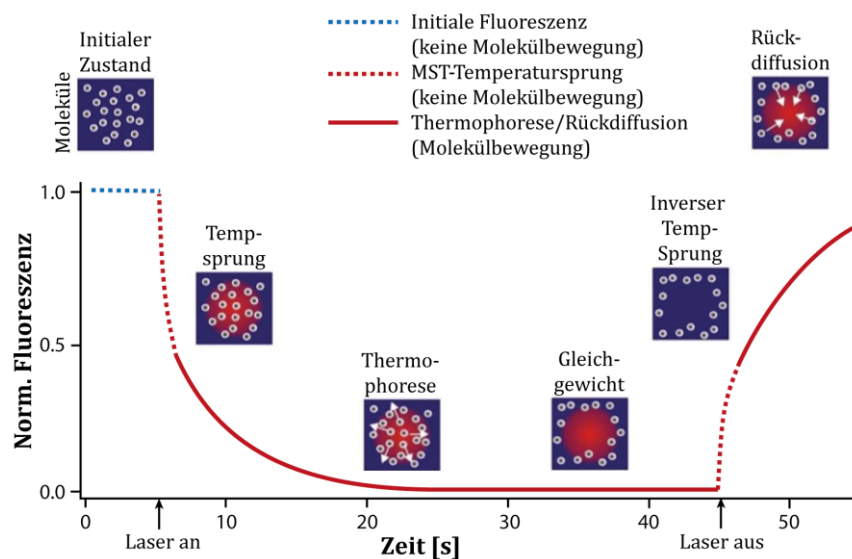


Abbildung 3.3.5: Beispielhafter Verlauf einer Thermophoresemessung. Ein Bindungspartner wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Im initialen Zustand befinden sich die Moleküle gleichmäßig verteilt im Raum (initialer Zustand; blau gestrichelte Linie). Wird nun der Laser eingeschaltet, erfolgt zunächst ein Temperatursprung (rot gestrichelte Linie), der die Bewegung der Moleküle aus dem Fokus des Lasers (Thermophorese; rote Linie) veranlasst. Das Fluoreszenzsignal sinkt, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Nach dem Ausschalten des Lasers erfolgen ein inverser Temperatursprung (rot gestrichelte Linie) und die dadurch ausgelöste Rückdiffusion der Moleküle, so dass das Fluoreszenzsignal wieder steigt^{nach 211}.

Um die Bindungskonstanten zu ermitteln, wird zunächst die Fluoreszenz normiert. Hierfür wird der Quotient der Fluoreszenz (F) aus dem Mittelwert des initialen Zustandes (*cold*) und dem Mittelwert des Gleichgewichtszustandes (*hot*) gebildet²⁰⁸. Für geringe Temperatur- und Konzentrationsänderungen kann die normierte Fluoreszenz durch den Soret-Koeffizient und die Temperaturabhängigkeit des Fluorophors angenähert werden²¹² (siehe Formel 3.11).

$$F_{norm} = \frac{F_{hot}}{F_{cold}} = 1 + \left(\frac{\delta F}{\delta T} - S_T \right) \Delta T$$

Formel 3.11: Der Quotient aus dem Mittelwert des Anfangsfluoreszenz (F_{hot}) und dem Mittelwert des Gleichgewichtszustandes (F_{cold}) gibt die normierte Fluoreszenz (F_{norm})²⁰⁸. Des Weiteren kann diese durch den Soret-Koeffizienten (S_T) und die Temperaturabhängigkeit des Fluorophors ($\delta F/\delta T$) angenähert werden²¹².

Führt die Zugabe eines Interaktionspartners zu Strukturänderungen, verändert dies auch die Hydrathülle des Teilchens, was die Bewegung entlang des Gradienten beeinflusst. Dadurch ändert sich die Geschwindigkeit, mit der sich der Komplex aus dem Fokus des Lasers bewegt. Die aus einer Konzentrationsreihe resultierende

veränderte Fluoreszenz wird zur Bestimmung der Bindungsstärke verwendet (Abbildung 3.3.5).

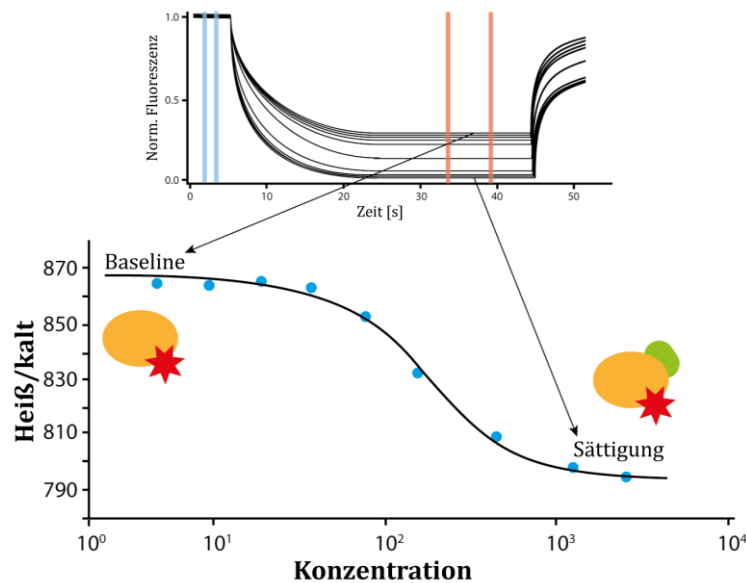


Abbildung 3.6: Zur Bestimmung der Bindungskonstanten wird der zeitliche Lauf der normalisierten Fluoreszenzen aufgetragen. Das Verhältnis der Mittelwerte aus dem Bereich F_{hot} (lachs) zu F_{cold} (hellblau) ergibt, aufgetragen gegen die Konzentration, die Bindungskurve. Aus dem Verlauf lassen sich die Bindungsparameter errechnen. Der Bindungspartner A (ovaler, orangener Kreis) ist mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert (roter Stern). Im Bereich der Baseline liegt der markierte Bindungspartner alleine vor, während im Bereich der Sättigung der Bindungspartner B nahezu vollständig gebunden ist nach 211,

PAPP5 wurde mit einem Maleimide GREEN *labeling kit* (Nanotemper) über Nacht bei 8 °C markiert. Nicht gebundener Farbstoff wurde mittels Entsalzungssäule abgetrennt und die Absorption bei 280 und 647 nm mittels Nanodrop bestimmt. Aus Formel 3.12 lässt sich die Labeleffizienz berechnen.

$$\frac{\text{Moleküle Farbstoff}}{\text{Moleküle Protein}} = \frac{A_{\max}(\text{Farbstoff})}{\varepsilon'(\text{Farbstoff}) \cdot c(\text{Protein})}$$

Formel 3.12: Der Quotient aus dem Absorptionsmaximum des Farbstoffes und dem Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes sowie die Konzentration des Proteins ergibt das Verhältnis von Farbstoff zu Protein.

Anschließend wurden alle zu vermessenen Proben 30 min bei 4 °C und 16100 g zentrifugiert um eventuell vorhandene Aggregate abzutrennen.

Die Thermophoresemessungen wurden mit einem Monolith NT.115 (*Nanotemper*) Instrument durchgeführt. Zunächst wurden verschiedene Kapillaren getestet und es zeigte sich, dass nur die *premium coated* Kapillaren ein Anhaften von PAPP5 an der Glaswand unterbinden konnten. Zunächst wurde PAPP5 mit einer Konzentration von 50 nM ohne die Zugabe eines Interaktionspartners vermessen um das Hintergrundrauschen zu bestimmen. In einem nächsten Schritt wurde die Konzentration von PAPP5 konstant bei 50 nM gehalten, während die Konzentration der Phytochrom-Mutanten (*AtPhyB S84D* und *S86D*) sowie des Wildtyps als Kontrolle von circa 2 nM bis 70 μ M variieren. Die Proben wurden 10 min inkubiert ehe die Kurven mit einem Temperatursprung von 2 und 4 K vermessen wurden. Weiterhin wurde eine LED-Leistung von 80 % und eine Laser-Leistung von 20 % gewählt sowie eine Aufheizphase von 30 s, gefolgt von einer Abkühlphase von 5 s. Weiterhin wurde die Interaktion mit und ohne Zugabe von 100 μ M Arachidonsäure untersucht. Alle Messungen wurden in einer dreifachen Bestimmung durchgeführt.

Bindungskonstanten sowie die Hill-Koeffizienten wurden aus dem Verhältnis von F_{hot} zu F_{cold} mit dem Programm *NT-Analysis (Nanotemper)* ermittelt.

3.8 Kristallisation und Strukturlösung

Um die Funktionsweise von Proteinen auf molekularer Ebene verstehen zu können, bedarf es der Auflösung ihrer dreidimensionalen Struktur dieser. Eine Methode der Strukturaufklärung stellt die Beugung von Röntgenstrahlung an Einkristallen dar. Die Bedeutung dieser Methode spiegelt sich auch in der Anzahl der für diese Methode vergebenen Nobelpreise wieder. So wurde 1914 der Nobelpreis für Physik an *M. von Laue* für die Röntgenbeugung an Kristallen vergeben. Für die Erzeugung von Streubildern an Proteinkristallen erhielt 1964 *D. Crowfoot Hodgkin* den Nobelpreis für Chemie und 1985 *H. Hauptmann* und *J. Karle* für die Erforschung direkter Methoden zur Bestimmung von Kristallstrukturen. Die erste Struktur eines Proteins, Myoglobin, wurde 1962 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt (*Kendrew et al.*).

Der Vorwurf, dass Proteinkristalle nicht der nativen Struktur entsprechen, ist insofern gerechtfertigt, dass die Flexibilität der Proteine eingeschränkt ist. Die Kontaktfläche zwischen einzelnen Proteinmolekülen ist aber verhältnismäßig gering, da der Lösungsmittelgehalt in einem Kristall 30-75 % entspricht. Trotz dieser Einschränkungen stellt die Kristallisation einen wichtigen Zugang zur Struktur und somit zur Aufklärung von Proteinmechanismen dar^{213,214}.

3.8.1 Kristallisationsscreenings

Da bis heute noch kein Zusammenhang zwischen der Primärsequenz eines Proteins und den Bedingungen, in denen es kristallisiert, gefunden wurde, müssen die Bedingungen experimentell ermittelt werden. Um den Arbeitsaufwand zu verringern wurden Bedingungen gesammelt, die in mehreren Experimenten zu Kristallen geführt haben, den sogenannten *sparse-matrix-screens*²¹⁵. In dieser Arbeit wurden kommerzielle Kristallisations-Screens der Firma *Qiagen* verwendet²¹⁶, die die Konzentration der verwendeten Salze, Präzipitantien und den pH-Wert der verwendeten Puffersysteme variieren (siehe Tabelle 3.14).

Tabelle 3.14: Auflistung über die verwendeten Kristallisationsscreens der Firma Qiagen und Informationen über die Zusammensetzung.

Screen	Informationen
JCSG Core I-IV	Literaturbedingungen ²¹⁷
JCSG+	Literaturbedingungen ^{218,219}
PACT	Variierende Salzkonzentrationen und pH-Werte ²¹⁸
Classics, Classics light, Cryo	Literaturbedingungen ²¹⁵
Anions, Cations	Ausgewählte Salze in zwei verschiedenen Konzentrationen und vier verschiedenen pH-Werten
PEGs	Verschiedene PEG-Größen und Konzentrationen
AmSO ₄	Variable AmSO ₄ -Konzentrationen in Kombination mit verschiedenen Salzen oder pH-Werten
MbClass, MbClass II	Literaturbedingungen für Membranproteine

Die Kristallisation wurde nach der *sitting drop* Methode durchgeführt, welche auf der Dampfdiffusion basiert. Hierbei wurde die Proteinlösung mit der *Screening*-Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt, das Reservoir mit Screening-Lösung befüllt und luftdicht verschlossen. Durch den Konzentrationsgradienten findet eine Diffusion des Wassers von der Proteinlösung zum Reservoir statt. Während die Konzentration im Reservoir sinkt, erhöhen sich sowohl Protein- als auch Präzipitatkonzentration im Tropfen bis idealerweise ein labiler übersättigter Bereich erreicht wird, bei dem sich Kristallisationsnuklei ausbilden können. Präzipitanzen setzen die Löslichkeit von Proteinen langsam herab, sodass sich ein Nukleus formt, der langsam zu einem Kristall aus etwa 10^{15} Molekülen heranwächst. Beim Übergang der labilen Phase in den metastabilen Übersättigungsbereich findet ausschließlich ein Wachstum der Kristalle statt^{220,221}.

Für die initiale Kristallisation wurde das Protein in den entsprechenden Puffer überführt, steril filtriert (*Ultrafree-MC*-Zentrifugenfilter, *Millipore*) und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Mit Hilfe eines Pipettierroboters (*Cartesian Microsys SQ 4004*, *Honeybee 963*, *Genomic Solutions*) und den verwendeten 96-well-Innovaplates (*Innovadyne*) können pro Screeningbedingung (300 nL) simultan zwei unterschiedliche Tropfen getestet werden. So wurde neben dem Proteintropfen (300 nL) auch ein Tropfen mit Pufferlösung (300 nL) getestet. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 4 °C oder 18 °C. Durch das Dokumentationssystem *Rockimager* (*Formulatrix*) wurden die Kristallisationsansätze nach 0 h, 12 h, 36 h, 60 h, 84 h, 132 h, 204 h, 324 h, 516 h und 828 h jeweils mikrofotografisch festgehalten.

3.8.2 Optimierung von Proteinkristallen

Wenn die Qualität der Kristalle, die aus dem initialen Kristallisationscreening erhalten wurden, auf Grund einer zu geringen Größe oder einer zu hohen Fehlordnung nicht ausreichend für eine Strukturlösung ist, müssen die Bedingungen weiter optimiert werden. Hierfür können die Konzentrationen der Präzipitantien, Additive und Salze sowie der pH-Wert des Puffersystems der identifizierten Kristallisationsbedingungen variiert werden. Das Einbringen von Kristallisationskeimen (*streak seeding*) ist eine weitere Methode um das Wachstum von wenigen, dafür größeren und wohlgeordneten Kristallen zu begünstigen. Es können sich qualitativ hochwertigere Kristalle ausbilden, da die Konzentration der Proteinlösung bei *seeding*-Experimenten geringer ist²²². Neben Kristallisationskeimen können auch Fremdkörper, wie beispielsweise Glasstaub, Fasern oder Nanopartikel als Kristallisationskeime verwendet werden^{223,222}.

Für die *Seeding*-Suspension wurde 1 μL Kristall-Suspension entnommen und 50 μL der Bedingung hinzugegeben. Um die Kristalle zu verkleinern wurden drei Metallkugeln beigefügt und die Suspension gevortext. Im Anschluss wurde die Suspension für 1 min bei 16100 g und 4 °C zentrifugiert und der Vorgang dreimal wiederholt.

Die Optimierungen wurden in 24-well Platten durchgeführt unter Verwendung des *hanging-drop* Verfahrens. Hierfür wurden 1 μL oder 2 μL Proteinlösung im Verhältnis 1:1, 1:2 und 2:1 mit der Kristallisationsbedingung gemischt und 1 mL der Kristallisationsbedingung in das Reservoir gegeben.

Für die Optimierung mittels *streak seeding* wurden zunächst verschiedene Verdünnungen der Seeding-Suspension hergestellt (1:10 und 1:100). In diese wurde ein Katzenschnurrhaar eingetaucht, das anschließend durch den Protein-Präzipitat-Tropfen gezogen wurde, so dass einige Keime in den Tropfen gelangen und größere Kristalle sich ausbilden können.

3.8.3 Montieren von Proteinkristallen und Datensammlung

Für die Vermessung von Kristallen wurden Einkristalle, wie auch zerbrochene Kristalle mit Hilfe von CryoLoops (*Hampton Research*) MicroMounts (*MiTeGen*) aus den Kristallisationsbedingungen entnommen, mit Kryopuffer (Kristallisationsbedingung und 20 % bis 30 % (v/v) Glycerin oder PEG400) für circa 10 s getaucht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem gekühlten Transportdewar zur Röntgenstrahlungsquelle transportiert.

Die Beugung von Röntgenstrahlen am Gitter des Proteinkristalls, welche durch die Laue-Bedingung und das Bragg'sche Gesetz beschrieben wird, ist die Grundlage der Röntgenstrukturanalyse. Die Intensität und Position der durch konstruktive Interferenz entstehenden Beugungsmaxima sind abhängig von der Art der Einheitszelle des Kristalls^{224, 225}. Die Aufnahme der Röntgenbeugungsbilder erfolgte am BESSY-II Synchrotron am Helmholtz-Zentrum für Materialien und Energie (HZB) in Berlin. Die Kristalle wurden an den Strahllinien 14.2 oder 14.3 vermessen, die beide über einen Rayonix MX-225 Detektor verfügen. Für die Messung wurde der Kristall auf einen Goniometerkopf montiert und mit einem Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt. Zunächst wurden zwei Testbilder bei einem Oszillationswinkel von 1 ° und einem Winkelabstand von 90 ° aufgenommen und in *iMOSFLM*^{226,227} indiziert. Die Software bestimmt die Raumgruppe und Zellparameter und errechnet daraus eine optimale Strategie für die folgende Datensammlung, mit höchstmöglicher Auflösung und Multiplizität bei niedrigster Strahlenbelastung. Zu den variablen Parametern gehörten die Anzahl und Dauer der einzelnen Expositionen des Kristalls (je Bild 0,1 s-20 min), der Oszillationswinkel, um welchen während der Exposition gedreht wurde (0,1°-1°), sowie der Abstand des Detektors zum Kristall.

3.8.4 Datenprozessierung

Der Zusammenhang zwischen gebeugter Welle (F_{hkl}) und der Elektronendichte ($\rho_{x,y,z}$) im Kristallgitter wird durch die Strukturfaktorgleichung, einer Fourier-Transformation gegeben (siehe Formel 3.13).

$$\rho_{(x,y,z)} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz) + \phi(hkl)}$$

Formel 3.13: Die Elektronendichte an einem bestimmtem Ort ($\rho_{(x, y, z)}$) ergibt sich aus dem Volumen der Einheitszelle (V), den Millerschen Indizes (hkl), der Strukturfaktoramplitude (F_{hkl}) und dem dazugehörigen Phasenwinkel (ϕ_{hkl}).

Jeder Strukturfaktor beschreibt dabei einen Punkt in der Ewaldkugel und stellt eine Wellenfunktion dar, die allgemein durch die Frequenz, Phase und Amplitude charakterisiert wird. Die Frequenz lässt sich aus der Wellenlänge der verwendeten Synchrotronstrahlung berechnen und die Amplitude ist proportional zur Wurzel der Intensität der aufgenommenen Reflexe. Beide Werte sind experimentell direkt zugänglich, nur die Phase geht verloren und muss auf anderem Wege ermittelt werden²²⁸.

Zunächst wurden die erhaltenen Reflexe integriert, hierbei werden die Positionen (h,k,l) und die Intensitäten (I_{hkl}) der Reflexe benötigt. Die verwendeten Programme *XDS*^{229,230} oder *iMOSFLM*^{227,226} bieten weiterhin die Möglichkeit die Parameter, wie Gitterzelle, Kristall-Detektor-Abstand sowie die Position des Strahls zu korrigieren. Des Weiteren lässt sich die Raumgruppe bestimmen. Durch die Standardabweichung (σ_{hkl}) und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ($I/\sigma(I)$) kann eine Aussage über die Qualität der Daten getroffen werden²²⁹.

Anschließend erfolgte mit den Programmen *XSCALE*²³¹ oder *SCALA*²³² durch Zusammenfassen aller symmetrieäquivalenten Reflexe (engl.: *Merge*) und anschließender Skalierung der Daten, die Umwandlung in die Strukturfaktoramplituden (F). Die maximale Auflösung wurde durch die Berücksichtigung der Qualitätsparameter Vollständigkeit, R_{merge} , R_{meas} und Signal-zu-Rausch-Verhältnis begrenzt. R_{merge} gibt hierbei den Intensitätsunterschied zwischen symmetrieäquivalenten Reflexen an, während R_{meas} zusätzlich noch die Multiplizität berücksichtigt.

3.8.5 Strukturlösung

Für die Bestimmung der Phasen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung^{233,234,235,236}. So kann die durch den definierten Einbau von Schwermetallatomen im Kristallgitter erzeugte anomale Dispersion genutzt werden, um die Phasen experimentell zu

bestimmen^{225,237}. Eine weitere Methode, die auch für die Bestimmung der Struktur von PAPP5 genutzt wurde, ist der molekulare Ersatz (engl.: *Molecular replacement*, kurz: MR). Diese Methode wurde 1960 von *Rossmann & Blow* sowie *Huber* entwickelt^{238,239}.

Grundlage für diese Methode, ist das Vorhandensein einer Struktur eines homologen Proteins oder eines Proteins mit ähnlichem Faltungsmotiv. Durch eine Korrelation über *maximum-likelihood*-basierte Algorithmen können die experimentellen Daten der bekannten Struktur mit bekannter Phase angenähert werden. Hierfür wird eine Fourier-Transformation zwischen $|F_{hkl}|^2$ und Atom-Atom-Abständen genutzt, die 1935 von *Patterson* entwickelt wurde. Diese Methode kann bereits ab einer Sequenzidentität von 20-30 % genutzt werden²⁴⁰. Um die Qualität der erhaltenen Modelle beurteilen zu können, wird ein Z-Wert errechnet, der sich auf Grundlage der errechneten und zufälligen Lösung sowie dem Mittelwert einer zufällig getroffenen Auswahl an Standardabweichungen (σ_{LLG}) zusammensetzt (siehe Formel 3.14).

$$Z = \frac{LLG_L - LLG_R}{\sigma_{LLG}}$$

Formel 3.14: Der Z-Wert wird verwendet, um die Qualität der erhaltenen Modelle zu beurteilen. Er ergibt sich aus der Differenz der logarithmischen *likelihood gain* der errechneten und zufälligen Lösung (LLG_L und LLG_R) geteilt durch den Mittelwert einer zufällig getroffenen Auswahl an Standardabweichungen (σ_{LLG}).

Für die Strukturlösung mittels molekularem Ersatzes wurde das Programm *Phaser*²⁴¹, implementiert in der *Phenix Suite*²⁴², verwendet. Als Suchmodell wurde das Homolog PP5 aus *Homo sapiens* (PDB Code: 1WAO) verwendet, das eine Sequenzidentität von 56 % zu *AtPAPP5* aufweist. Nach Erhalt der Phasen konnte mit dem Programm *Phenix Autobuild* automatisiert ein erstes Modell der unbekanntenen Struktur erhalten werden.

3.8.6 Verfeinerung der Strukturmodelle

Die erhaltene Struktur wurde manuell mit dem Programm *Coot* gegen die Elektronendichte optimiert. Das hieraus erhaltene Modell wurde anschließend durch die Programme *Refmac5*²⁴³ oder *Phenix Refine*²⁴⁴ verfeinert, die beide auf der *maximum likelihood*-Methode basieren und sowohl ein Modell als auch Strukturfaktoramplituden für die Verfeinerung benötigen. Während der Verfeinerung werden

für jedes Atom die Position (x, y, z) und der Temperatur-Faktor (B-Faktor) optimiert. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten wird mittels eines R-Faktors (engl.: *reliability*) ermittelt, der sich aus den beobachteten Strukturwerten (F_{obs}) und den berechneten Strukturwerten (F_{calc}) der für die Verfeinerung verwendeten Reflexe (R_{work}), als auch die nicht verwendeten Reflexe (R_{free}), ergibt (siehe Formel 3.15). Auf Grund der nicht verwendeten Reflexe (5 % der Daten oder 1000 Reflexe) ist eine Validierung der Verfeinerung möglich, da diese nicht für den Verfeinerungsprozess verwendet wurden.

$$R = \frac{\sum |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum |F_{obs}|}$$

Formel 3.15: eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Daten kann mittel R-Wert getroffen werden, der aus den beobachteten und berechneten Strukturwerten ermittelt werden kann.

Auf Grund der Komplexität von Proteinstrukturen wird nicht jedes Atom individuell verfeinert, sondern es werden Einschränkungen (engl.: *Restraints*) festgelegt, die stereochemischen Parameter, wie Bindungslänge, Bindungswinkel und die Torsion von Bindungswinkeln, umfassen. Des Weiteren können nicht-kristallographische Beziehungen zwischen Bereichen verschiedener strukturgleicher Polypeptidketten (engl.: *Non-crystallographic symmetry*, kurz: NCS) sowie konzertierte Verschiebung von Teilen der Proteinstruktur gegen andere Bereiche (engl.: *Translation/libration/screw*, kurz: TLS) oder Wechselwirkungen von Sekundärstrukturen berücksichtigt werden^{245,246,247,248,249}.

Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte mit dem Programm *Pymol* 1.6 (*DeLano Scientific*) und die Berechnung von elektrostatischen Oberflächen mit dem Plugin *APBS*²⁵⁰.

4 Ergebnisse

Arabidopsis thaliana besitzt fünf unterschiedliche Phytochrome (PhyA-PhyE), von denen PhyA und PhyB die am besten charakterisierten Vertreter darstellen. Im Gegensatz zu den anderen Phytochromen ist PhyA lichtinstabil und wird nach der Bestrahlung mit Licht schnell degradiert, entsprechend seiner Funktion in der frühen Entwicklung von Keimlingen^{251,252,34}. PhyB ist lichtstabil und nimmt eine dominierende Rolle innerhalb des lichtregulierten Wachstums der Pflanzen ein²⁵¹.

Phytochrome sind in der Lage Informationen aus dem umgebenden Licht wahrzunehmen und diese in die verschiedenen Teile der Pflanze weiterzuleiten, um ideale Wachstumsbedingungen sicherzustellen. Durch die Absorption eines Photons findet eine konformationelle Änderung der Phytochrome in die aktive P_{fr} Form statt, welche es ihnen erlaubt mit weiteren Proteinen zu interagieren und verschiedene Signalkaskaden zu initiieren.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den strukturellen Änderungen, die sich durch Photokonversion ergeben. Weiterhin befasst sie sich mit dem Einfluss der N-terminalen Erweiterung auf die Struktur und die Dunkelkonversion. Neben Licht als primäre Steuerung der Interaktionen zeigen erste Studien auch einen Einfluss post-translationaler Modifikationen auf die Stärke der Interaktionen^{58,59}. Die Phosphatase PAPP5 ist in der Lage sich selber zu inhibieren und interagiert mit dem C-terminalen Modul der Phytochrome, wobei sie Aminosäuren in der N-terminalen Erweiterung dephosphoryliert⁷⁴. Von diesem interessanten Interaktionspartner gelang es die Struktur aufzuklären und den Mechanismus der Aktivierung zu untersuchen.

4.1 Einfluss der N-terminalen Erweiterung und Lokalisierung der lichtgesteuerten Änderungen in *AtPhyB*

Im Jahre 2014 wurde die erste Struktur pflanzlicher Phytochrome aufgeklärt. Jedoch betrug die Auflösung der Struktur lediglich 3,5 Å und es konnte nur der P_r Grundzustand kristallisiert werden. Weiterhin fehlte die als flexible und unstrukturiert beschriebene N-terminale Erweiterung^{12,253}. Seitdem der Einfluss der NTE auf die Dunkelkonversion²¹ sowie drei Phosphorylierungsstellen (S84, S86 und Y104)^{58,59} in

der NTE bekannt wurden, die zudem einen Einfluss auf die Bindung mit dem PIF3 zeigten, steigt die Notwendigkeit diesen Bereich strukturell aufzuklären.

Um die durch die Photokonversion hervorgerufenen strukturellen Änderungen lokalisieren zu können und ein mögliches Packungsmodell des NTE zu entwickeln, wurden sowohl der Wildtyp als auch die Δ NTE Variante per HDX-MS vermessen. Diese Methode erlaubt, im Gegensatz zu statischen Methoden wie der Kristallografie, Aussagen über die relativen Dynamiken unterschiedlicher Proteinregionen zu treffen.

4.1.1 Etablierung der Produktion und Reinigung von PhyB

Das für Phytochrom B (1-651) kodierende Plasmid wurde von *Matias Zurbriggen* (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Es wurde für die *in vivo* Produktion von holo PhyB zusammen mit dem Plasmid p171¹⁵⁹ in *E. coli* BL21 PRO Zellen transformiert. Die heterologe Produktion wurde mit 1 mM IPTG induziert und in TB-Medium bei 18 °C über Nacht durchgeführt. Nach Aufschluss der Zellen erfolgte die Reinigung zuerst durch eine Ni-NTA-Affinitätschromatografie und abschließend durch eine Größenausschlusschromatografie unter Verwendung einer Superdex 200 26/60 Säule (siehe Abbildung 4.1). Die Ausbeute nach der Gelfiltration lag bei 1,0 mg pro Liter Kultur.

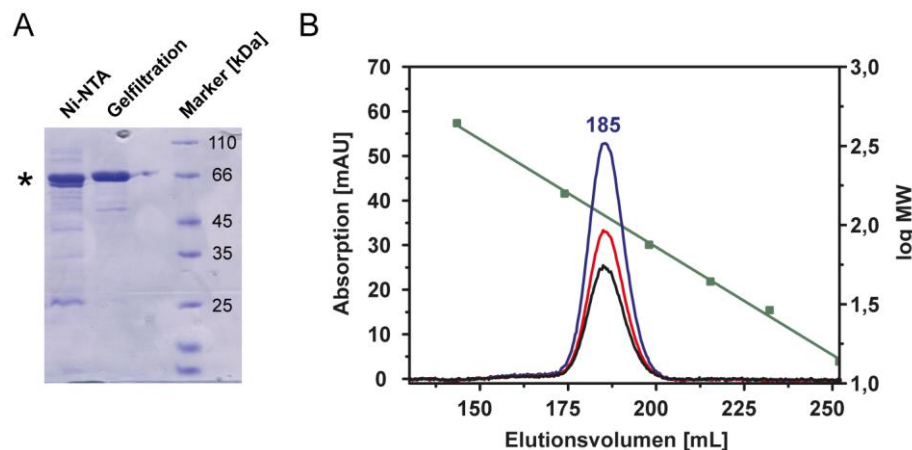


Abbildung 4.1: Reinigung des *in vivo* assemblierten Phytochrom B. (A) Die SDS-PAGE der Reinigung zeigt, dass das Phytochrom bei einer Masse von circa 66 kDa migriert (markiert durch einen Stern), welches etwa der berechneten Masse von 73 kDa entspricht. Als Referenz für die SDS-Page wurde der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* von *Fermentas* eingesetzt. (B) Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen Peak bei 185 mL. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz), 650 nm (rot) und 700 nm (blau) gemessen. Durch eine Kalibrationsgerade mit Standardproteinen (grün) ergibt sich eine apparente Masse von circa 102 kDa.

Das Protein eluierte bei 185 mL von der Säule und zeigte ein Signal bei 280 nm, 650 nm und 700 nm und besitzt laut SDS-PAGE eine Masse von circa 66 kDa. Durch die Kalibrationsgleichung $y = -0,0102x + 3,8959$ der SEC-Säule, ergab sich eine apparente Masse von 102 kDa. Die Differenz zur berechneten Größe des PhyB Monomers von 73 kDa kann durch die nicht-globuläre Form des Phytochroms erklärt werden. Weiterhin wäre es jedoch möglich, dass sich *AtPhyB* in einem raschen Gleichgewicht befindet und so in Lösung die monomere und dimere Spezies vorliegt. Um dies ausschließen zu können, wurden native massenspektrometrische Intaktmessungen des Wildtyps sowie einer verkürzte Variante ohne NTE, PhyB(90-651) von *Dr. Nils Hellwig* (AG Morgner) durchgeführt (siehe Abbildung 4.2). Die Δ NTE Variante wurde von *Ramona Klasen* kloniert²⁵⁴ und die Produktion und Reinigung erfolgten nach dem Protokoll des Wildtyps.

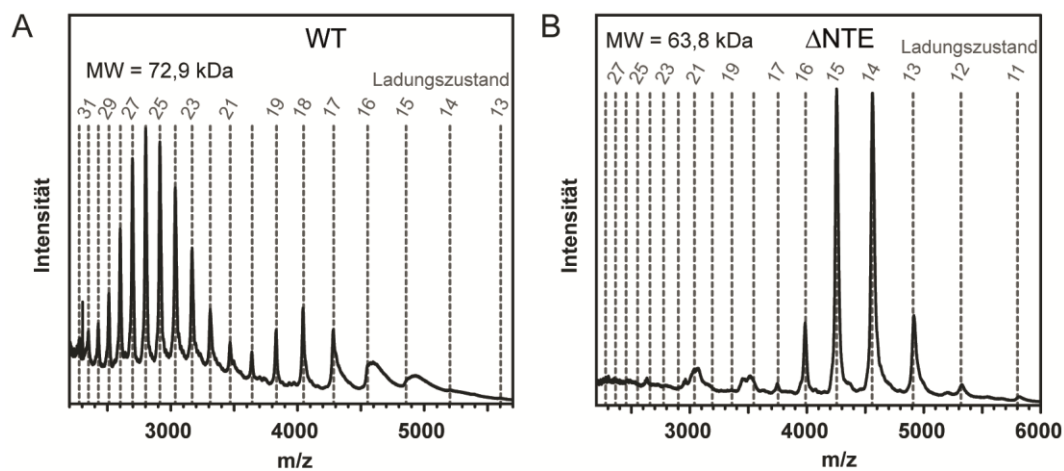


Abbildung 4.2: Native massenspektrometrische Intaktmessung der PhyB Varianten unter nativen Bedingungen. Hierbei wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) gegen die jeweilige Intensität aufgetragen. (A) Der Wildtyp besitzt zwei Signalsätze, wobei beide ein Molekulargewicht (MW) von 72,9 kDa besitzen. (B) Die verkürzte Variante (Δ NTE) zeigt lediglich einen Signalsatz der ein Molekulargewicht von 63,8 kDa aufweist.

Der Wildtyp weist zwei Signalsätze auf, die jedoch beide eine Masse von 72,9 kDa haben und der theoretisch berechneten Masse des Monomers mit Chromophor (72,6 kDa) entsprechen. Bei dem Signalsatz mit einem geringeren Masse-zu-Ladungsverhältnis handelt es sich um denaturiertes Protein, da dieses mehr Ladungen aufnehmen kann. Die Δ NTE Variante besitzt nur einen Signalsatz, der eine Masse von 63,8 kDa besitzt und dem Monomer mit Chromophor (63,5 kDa) entspricht.

4.1.2 Spektroskopische Analyse

Der spektroskopische Einfluss der N-terminalen Erweiterung von PhyB wurde *via* UV/Vis- und Resonanz-Raman-Spektroskopie untersucht und die Dunkelreversion ermittelt. Die UV/Vis-Spektren der Δ NTE Variante wurden von *Ramona Klasen* vermessen²⁵⁴ und die Dunkelreversionen beider Proteine von *Verena Gruth* bestimmt.

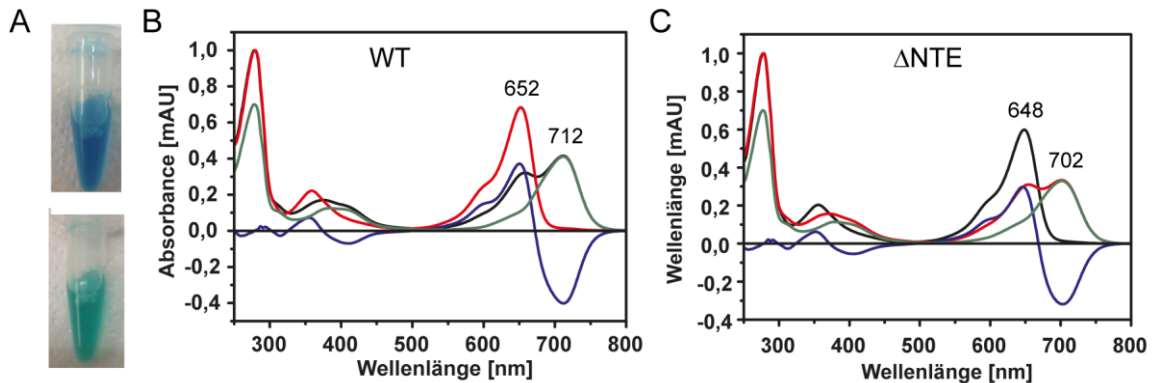


Abbildung 4.3: Absorptionsspektren des P_r und P_{fr} Zustandes sowie das Differenzspektrum des Wildtyps und der Δ NTE Variante. (A) Die beiden Konformationen des Proteins lassen sich bereits durch die Farbe der Proben unterscheiden. P_r ist blau (oben) und P_{fr} türkis (unten). (B und C) Das Spektrum des P_r Zustandes, des P_{fr} Zustandes und des berechneten P_{fr} Zustandes sind in schwarz, rot und grün dargestellt sowie das Differenzspektrum in blau.

Die Bestrahlung mit rotem oder dunkelrotem Licht führte zu einer Konformationsänderung des Chromophors, die strukturelle Änderungen des Proteins bewirken. Zu erkennen war dies bereits an den Farben des mit PCB assemblierten Wildtyps. Während der P_r Zustand eine blaue Farbe aufwies, erschien die P_{fr} Form in türkis.

Die Bestrahlung mit rotem Licht führte zu einem Gemisch aus P_r und P_{fr} , mit einem Anteil von 70 % P_{fr} für den WT und 60 % für die Δ NTE Variante. Der Wildtyp hat ein Absorptionsmaximum bei 652 nm für P_r und 712 nm für P_{fr} , im Gegensatz zu der verkürzten Variante, die Maxima bei 648 nm und 702 nm aufweist. Die bathochrome Verschiebung zeigt sich deutlicher in der P_{fr} Form und liegt hier bei 10 nm, was den Einfluss des NTE auf die Stabilisierung der P_{fr} Form verdeutlicht.

Weiterhin zeigte sich, dass, wie bereits für PhyB mit $P\Phi B$ als Kofaktor beschrieben²¹, die Dunkelkonversion ohne N-terminale Erweiterung um den Faktor fünf schneller abläuft ($t_{1/2} = 270$ min für WT und $t_{1/2} = 58$ min für Δ NTE). Um die Halbwertszeit für beide Varianten bestimmen zu können wurde der jeweilige P_{fr} Anteil für eine Zeit von

1140 Minuten bestimmt und die Halbwertszeit hieraus berechnet. Für die Δ NTE Variante entspricht diese Messzeit dem Ende der Konvertierung, während vom WT noch 30 % im P_{fr} Zustand vorlagen (siehe Abbildung 4.4).

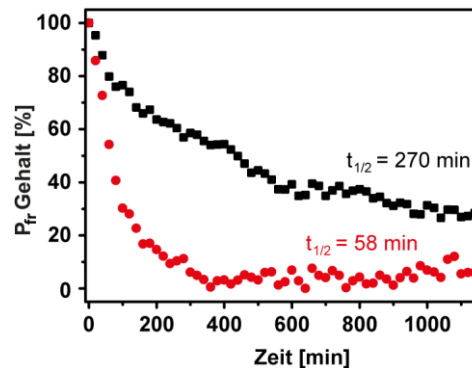


Abbildung 4.4: Dunkelreversion ($P_{fr} \rightarrow P_r$) des Wildtyps (schwarz) und der Δ NTE Variante (rot). Die Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

Aus den Daten ist ersichtlich, dass beim WT nach 200 min noch 65 % der ursprünglichen 70 % im P_{fr} Zustand vorlagen, während es bei der Δ NTE Variante WT nur noch 12 % der ursprünglichen 60 % waren. Um den Einfluss der N-terminalen Erweiterung auf den Chromophor zu untersuchen, wurden von *David Buhrke* aus der AG Hildebrandt Resonanz-Raman-Messungen sowie die Analyse der Daten mit beiden Varianten des Proteins durchgeführt (siehe Abbildung 4.5).

Sowohl die Resonanz-Raman Spektren der P_r , als auch der P_{fr} -Konformation des *AtPhyB* Wildtyps sind denen von *AtPhyA* sehr ähnlich^{252,255}. Daher wurden die Zuordnungen der Schwingungen von *PhyA* auf die Spektren von *PhyB* übertragen um den Einfluss der NTE auf den Chromophor zu evaluieren. Hierbei wurden die spektralen Regionen untersucht, welche für eine strukturelle Veränderung bekannt sind. Ein Vergleich der Spektren zeigte, dass hauptsächlich die Schwingungen der C-D Methinbrücke durch das Entfernen der NTE verändert werden. Äquivalent zum P_{fr} Zustand von *PhyA* werden auch im P_{fr} Zustand von *PhyB* durch die Wasserstoffschwingung (engl.: *Hydrogen out-of-plane*; kurz: HOOP) und die Streckschwingung der C-D Methinbrücke (C-D Streckschwingung) zwei Doppelbanden hervorgerufen. Die Doppelbanden reflektieren die zwei P_{fr} Substrate, P_{fr} -I und P_{fr} -II, die sich im Öffnungswinkel der C-D Methinbrücke unterscheiden^{252,256}. In der P_{fr} -II Form ist der Torsionswinkel zwischen dem C und dem D Ring schmaler als in der P_{fr} -I Form²⁵². Die Intensitäten der Niedrigfrequenz HOOP-Schwingung (802 cm^{-1}) und der Hoch-

frequenz C-D-Streckschwingung (1617 cm^{-1}) erniedrigen sich auf Grund des zweiten Signalsatzes bei 815 cm^{-1} und 1607 cm^{-1} , beziehungsweise den korrespondierenden Signalsätzen des P_{fr} -II Zustandes. Beachtlich ist, dass zusätzlich zur Verschiebung des Gleichgewichts, das Entfernen der NTE feine strukturelle Änderungen in beiden Konformeren hervorruft, beispielsweise durch eine Verschiebung der HOOP Region zu kleineren Frequenzen. Die strukturellen Änderungen beinhalten weiterhin eine Schwächung der Wasserstoffbrückenbindungen mit den N-H-Gruppen der B und C Ringe, da die entsprechende N-H *in-plane bending* eine Verschiebung um 3 cm^{-1} in $AtPhyB\ \Delta NTE$ bewirkt.

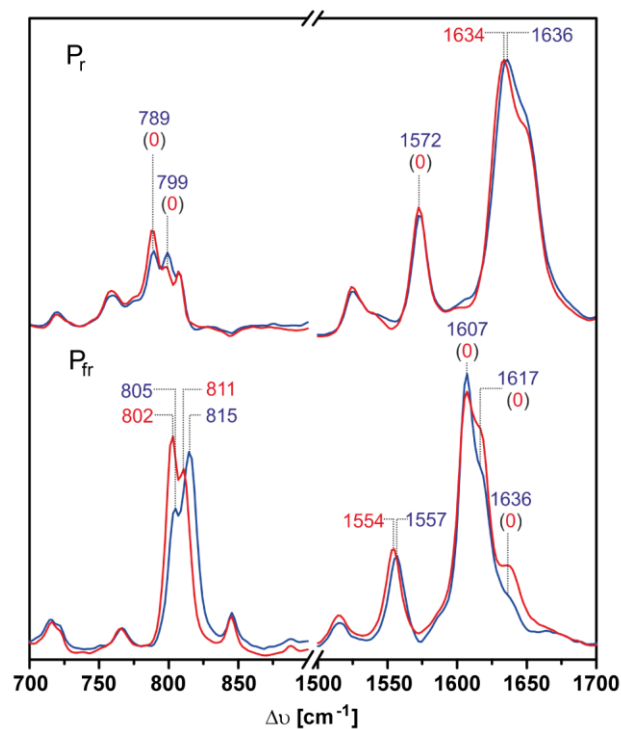


Abbildung 4.5: Resonanz-Raman Spektren des photosensorischen Moduls von PhyB (blau) und einer Variante ohne NTE (rot) in der P_r (oben) und P_{fr} (unten) Form. Dargestellt sind die C=C Streckschwingung ($800\text{-}820\text{ cm}^{-1}$) und der HOOP Bereich ($1550\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$).

In P_r sind die Änderungen auf eine Verschiebung um 2 cm^{-1} der C-D-Streckschwingung (1636 cm^{-1}) beschränkt, begleitet durch eine Schwächung der Intensitäten der Banden 789 cm^{-1} und 799 cm^{-1} , was unter anderem die HOOP Region betrifft, welche die C-D-Methinbrücke koordiniert. Die strukturellen Einflüsse innerhalb der Chromophorbindungstasche, die durch das Entfernen der NTE ausgelöst werden, sind in der P_r Form also deutlich geringer als in der P_{fr} Form.

Auffällig ist jedoch, dass die strukturellen Änderungen beider Konformationen die gleiche Region des Proteins betreffen.

4.1.3 Wasserstoff-Deuterium-Austausch

Um die, durch die Photokonversion ergebenen Änderungen zu lokalisieren und ein Packungsmodell für die NTE zu entwickeln, wurden HDX-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde die Analyse der Δ Variante von Simon Strass durchgeführt²⁵⁷. Zunächst musste jedoch überprüft werden, wieviel Prozent der P_{fr} Form des Wildtyps am Ende einer fünfstündigen HDX-Messung vorliegt. Hierfür wurde die Dunkelkonversionsrate des Wildtyps bei 5 °C bestimmt (siehe Abbildung 4.6).

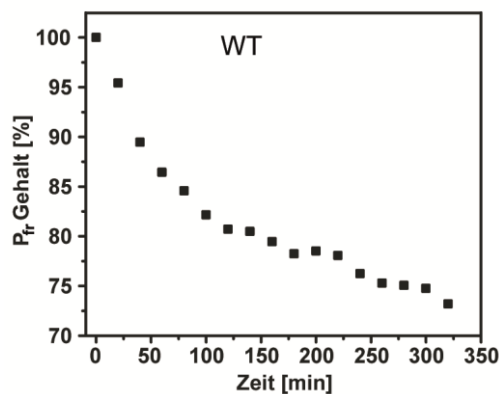


Abbildung 4.6: Dunkelreversion ($P_{fr} \rightarrow P_r$) des Wildtyps. Die Messung wurde bei 5 °C und über einen Zeitraum von fünf Stunden durchgeführt, was der Dauer einer HDX Messung entspricht.

Es ergab sich bei der spektroskopischen Analyse, dass nach 5 h noch 75 % der ursprünglichen P_r nach 5 h in der P_{fr} Form verblieben waren, so dass die HDX-MS-Messung bei 1 °C für beide Konformationen des Phytochroms durchgeführt werden konnte.

Für die HDX-MS Messung des Wildtyps wurden fünf verschiedene Deuterium-Inkubationszeiten gewählt (30 s, 45 s, 60 s, 90 s und 120 s). Unter Verwendung der in 3.6.3 festgelegten Parameter konnten für die P_r Form des Phytochroms 470 Peptide gefunden werden, so dass sich eine Aminosäure-Abdeckung von 96 % ergab. Anschließend erfolgte eine manuelle Durchsicht der Daten und es wurden 168 Peptidfragmente ausgewertet, die eine Abdeckung von 91 % der Proteinsequenz mit einer Redundanz von 2,3 pro Aminosäure erzielten (siehe Abbildung 8.2).

Die Deuterium-Austauschraten für die P_r Form des Wildtyps sind in nachfolgender Abbildung auf der Struktur von PhyB übertragen. Bereiche mit keiner oder einer geringen Deuteriumaufnahme sind in blau dargestellt, während Bereiche mit einer hohen Aufnahme von bis zu 70 % in rot eingefärbt sind.

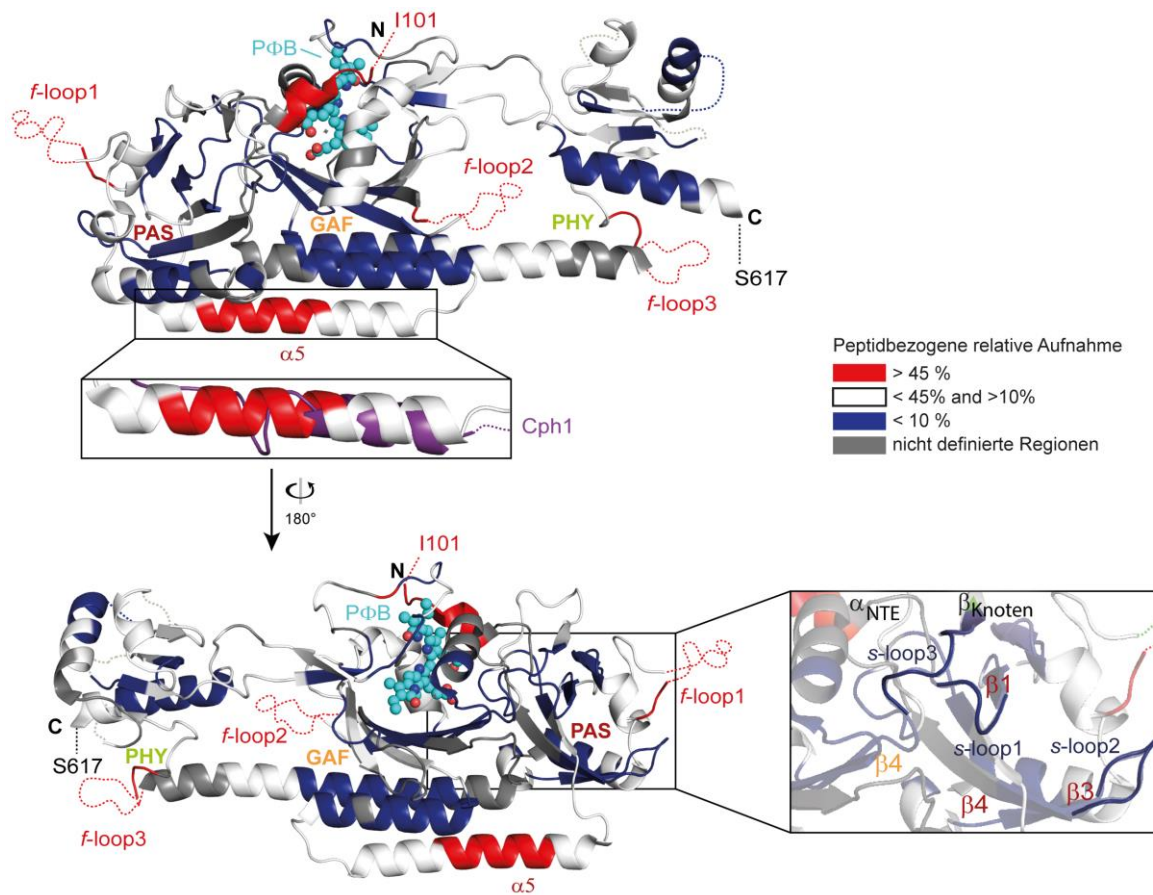


Abbildung 4.7: Ergebnisse der HDX Analyse des photosensorischen Moduls von *AtPhyB*(1-651) in der P_r-Form. Die relative Deuteriumaufnahme des P_r Zustands nach 30 s ist auf die Kristallstruktur (PDB Code: 4OUR) abgebildet. Im Gegensatz zu drei schnell austauschenden Schleifen (*f-loops*; engl.: *Fast exchanging loops*), die in der Kristallstruktur fehlen, tauschen drei Schleifen auf der Rückseite der PAS Domäne sehr langsam aus (*s-loops*; engl.: *Slow exchanging loops*; Ausschnitt rechts). Die α₅PAS Helix ist verglichen mit *SynCph1* (PDB Code: 2VEA; lila) länger, zeigt aber eine hohe Deuterium Aufnahme (oberer Ausschnitt). Die Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente ist entsprechend Burgie *et al* gewählt²¹.

Um eine Aussage über die Richtigkeit der erhaltenen Daten treffen zu können, wurden die Dynamiken der Deuteriumaufnahme mit der Struktur verglichen. Drei schnell austauschende Schleifen (engl.: *Fast exchanging loops*; kurz: *f-loops*): *f-loop1* (G142-E155), *f-loop2* (N378-M394) und *f-loop3* (V464-M471) fehlen in der Kristallstruktur, vermutlich auf Grund ihrer hohen Flexibilität. Die HDX-MS-Analyse zeigte eine hohe Deuteriumaufnahme, was die Annahme der flexiblen Schleifen bestätigt. Die

Übereinstimmung der hohen Deuteriumaufnahme in bekannten flexiblen Bereichen ist ein wichtiges Indiz für die Güte der erhaltenen Daten.

Ein deutlicher Unterschied zur Kristallstruktur ergab sich für die α 5-Helix (siehe Abbildung 8.1) der PAS-Domäne. Die experimentellen Daten zeigten, dass ein Teil der Helix (I228-A238) eine erhöhte Austauschrate besitzt, was daraufhin deutet, dass die Helix eine weniger gefaltete Form in Lösung als im kristallinen Zustand einnimmt. Der Vergleich mit der entsprechenden Helix in Cph1 (PDB Code: 2VEA) ergab, dass Cph1 ebenfalls eine verkürzte Helix aufweist (siehe Abbildung 4.7, oberer Ausschnitt).

Die Rückseite der PAS Domäne zeigt drei Schleifen mit sehr langsamen Deuterium-Austausch (engl.: *Slow exchanging loops*; kurz: *s-loops*): *s-loop1* (Q115-C119), *s-loop2* (H193-F201) und *s-loop3* (K317-V325) (siehe Abbildung 4.7, Ausschnitt rechts). Obwohl die Schleifen exponiert an der Oberfläche des Proteins liegen und nicht in Wasserstoffbrückenbindungen involviert sind, zeigen sie nur einen geringen Austausch.

Um mögliche Unterschiede zwischen der P_r und der P_{fr} zu lokalisieren, wurden die entsprechenden Chromatogramme beider Formen in DynamX geladen und analysiert. Es wurden vom Programm 400 Peptide gefunden, so dass sich eine Aminosäure-Abdeckung von 95 % ergab. Anschließend erfolgte eine manuelle Durchsicht der Daten und es wurden 165 gemeinsamen Peptidfragmente ausgewertet, die eine finale Abdeckung von 91 % der Proteinsequenz mit einer Redundanz von 2,3 pro Aminosäure erzielten. Die ausgewerteten Peptide sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

4 Ergebnisse

P_r Form - P_r Form

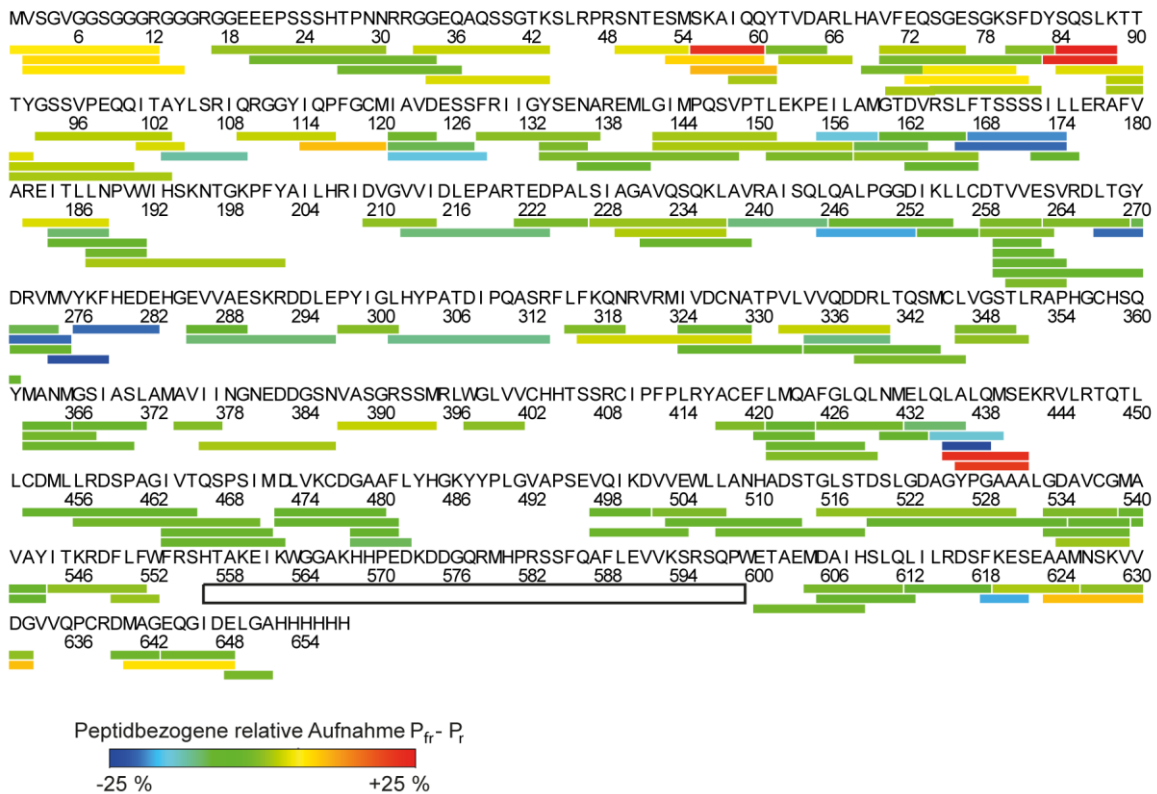


Abbildung 4.8: Darstellung der nach dem Verdau von PhyB WT erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen Deuteriumaufnahme nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot zeigt die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot für eine hohe Aufnahme. Der schwarze Kasten zeigt den Bereich der Zungenregion, in der keine Peptide gefunden wurden.

Interessanterweise zeigten sich Unterschiede in der Deuteriumaufnahme im Bereich der N-terminalen Erweiterung (M1-T90), einen Bereich, den die Kristallstruktur von *AtPhyB* nicht umfasst. Die Region war als sehr flexibel und unstrukturiert vorhergesagt worden. Die HDX Untersuchungen zeigen jedoch kontroverse Ergebnisse, da es Bereiche mit hohen und niedrigen Austauschraten gibt, so dass von einer partiellen geordneten und strukturierten Form ausgegangen werden kann (siehe Abbildung 4.9).

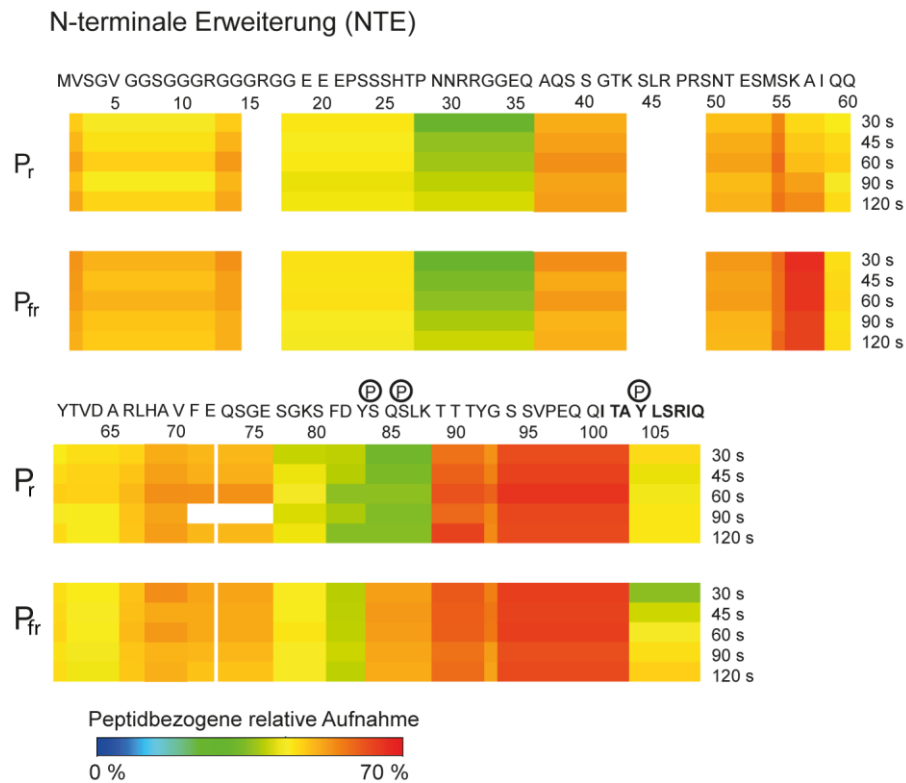


Abbildung 4.9: Ergebnisse der HDX Messung für die N-terminalen Erweiterung (NTE). Die relative Deuteriumaufnahme wurde für den P_r und den P_{fr} Zustand für fünf verschiedene Zeiten ermittelt. Drei Regionen weisen einen Unterschied zwischen dem P_r und P_{fr} Zustand auf (56-58, 84-89 und 104-110). Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass zwei der Bereiche Phosphorylierungsstellen (eingekreistes P; S84, S86 und Y104) beinhalten. Die fett markierten Buchstaben der Sequenz zeigen den Beginn der Kristallstruktur.

Drei Regionen innerhalb der NTE (K56-I58, S84-K88 und Y104-Q110) weisen eine Lichtabhängigkeit auf, da sie einen signifikanten Unterschied in der Deuteriumaufnahme zwischen P_r und P_{fr} Form zeigen. Die letzten zwei Regionen sind hierbei von besonderem Interesse, da sie bekannte Phosphorylierungsstellen beinhalten (S84, S86 und Y104)^{58,59}. Des Weiteren konnte für die Region P28 bis Q36 in beiden Formen eine reduzierte Aufnahme festgestellt werden.

Der Vergleich der Daten des P_r und des P_{fr} Zustandes zeigten weiterhin signifikante Unterschiede im Bereich zwischen der GAF und PHY Domäne (siehe Abbildung 4.10).

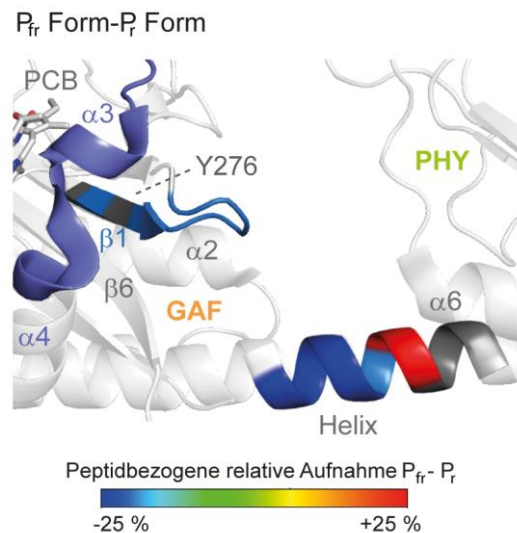


Abbildung 4.10: Differenz der Deuterium Aufnahme zwischen der P_{fr} und der P_r Form des Wildtyps. Die Domänenverbindende Helix weist in der P_{fr} Form zuerst einen niedrigeren und dann eine höhere Deuterium Aufnahme gegenüber der P_r Form auf. Dies ist vermutlich auf den bereits aus bakteriellen Phytochromen bekannten Knick in der Helix zurückzuführen. Eine Schleife und ein daran anschließendes β-Faltblatt, die sich zwischen den Domänen befinden, tauschen in der P_{fr} Form langsamer aus als in der P_r Form. PCB = Phycocyanobilin.

Die helikale Verbindung zwischen der GAF und der PHY Domäne zeigt eine geringere Aufnahme im Bereich L437 bis M439 in P_{fr}, wohingegen dahinter ein Bereich mit einer höheren Austauschrate (S440-E441) zu finden ist. Dies könnte einen Knick in der domänenverbindenden Helix markieren, der bereits in bakteriellen Phytochromen nachgewiesen wurde^{258,259}.

Ein entscheidender Schritt während der Photokonversion ist die Z→E Isomerisierung der C15-C16 Doppelbindung des D-Rings, welche mutmaßlich konformationelle Änderungen innerhalb der Chromophorbindingstasche auslöst. Die Bereiche um die Reste H276 und P304, welche die aliphatische Umgebung des D-Rings formen, sind in der P_{fr} Form geschützter gegenüber einem Deuterium-Austausch. Eine Schleife im gleichen Bereich (F278-E282) zeigt eine vergleichbar niedrige Austauschrate.

Auffälligerweise zeigte sich bei den erhaltenen Peptidfragmenten eine Lücke im Bereich der Zungenregion (siehe Abbildung 4.8). Eine separate Analyse der P_r und der P_{fr} Daten unter den gleichen Parametern ergab schließlich eine Abdeckung der Zungenregion (siehe Abbildung 4.11).

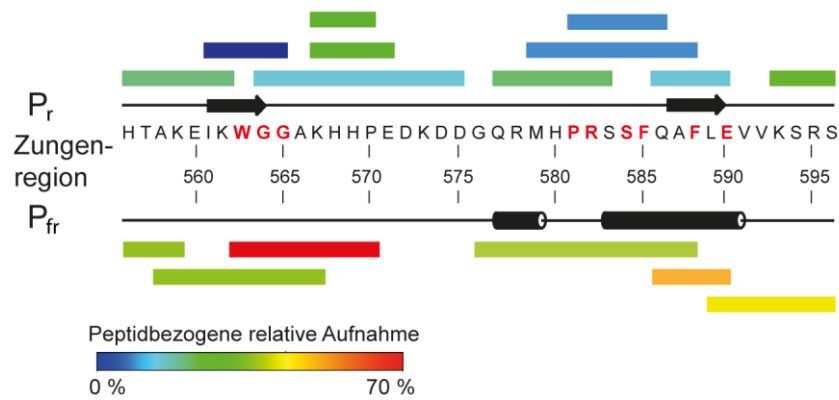


Abbildung 4.11: Unterschiede der Deuterium Aufnahme zwischen der P_{fr} und P_r Form in der Zungenregion. Die fetten und rot dargestellten Aminosäuren markieren die konservierten Motive innerhalb der Zungenregion.

Das unterschiedliche Verdauemuster der Zungenregion ist ein Indiz für eine Änderung der Sekundärstrukturelemente. Bildet man die erhaltenen Austauschraten auf den Zungenbereich der Kristallstruktur und eines generierten Modells der P_{fr} Form ab (siehe Abbildung 4.12), so ist zu erkennen, dass sich die größten Änderungen für das W^G/AG Motiv ergeben.

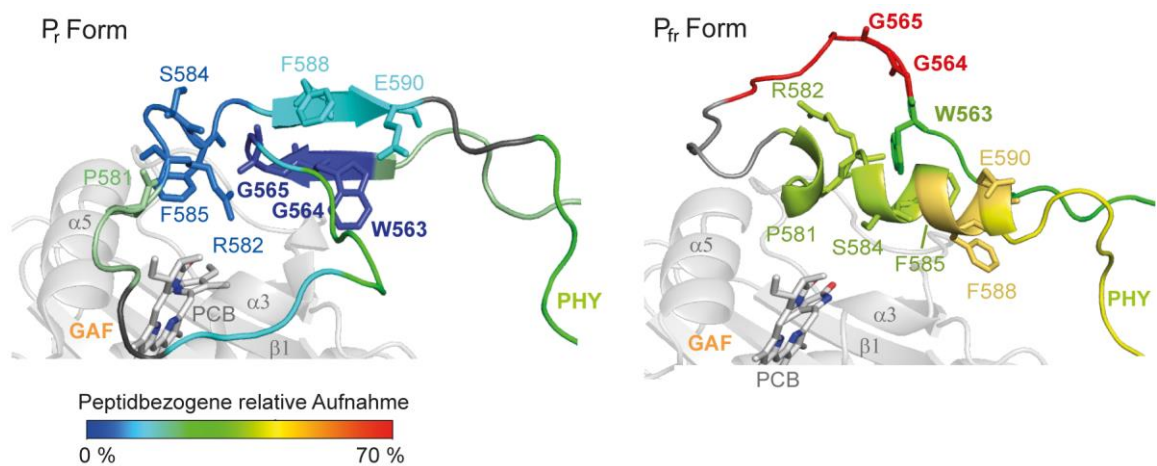


Abbildung 4.12: Unterschiede der Zungenregion in der Deuterium Aufnahme zwischen dem P_{fr} und P_r Zustand. Die Ergebnisse wurden auf die Kristallstruktur (links) oder ein generiertes Modell (rechts) abgebildet. Besonders deutlich wird der Unterschied für das W^G/AG Motiv, welches in der P_{fr} Form exponiert auf einer Schleife und in der P_r Form in einem β -Faltblatt vorliegt. Die strukturellen Unterschiede spiegeln sich auch in den HDX Ergebnissen wieder, da das Motiv in der P_{fr} Form eine hohe und in der P_r Form eine stark verminderte Deuterium Aufnahme zeigt.

In der P_r Form zeigt das Motiv fast keine Deuteriumaufnahme verglichen mit einer sehr hohen Aufnahme in der P_{fr} Form. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der

Kristallstruktur, da das Motiv auf einem β -Faltblätter der Zungenregion liegt, welches hydrophobe Wechselwirkungen mit dem zweiten Faltblatt der Zungenregion und der GAF Domäne eingeht. Dagegen ist in der vorhergesagten Struktur der P_{fr} Form dieses Motiv exponiert auf einer Schleife lokalisiert, dass den signifikant erhöhten Austausch erklärt.

In der Kristallstruktur konnte neben der fehlenden N-terminalen Erweiterung, konnte auch die Scharnierregion (R624-A651)¹¹ zwischen PHY und PAS Domäne nicht abgebildet werden. Jedoch konnte auch diese Region mit Peptiden der HDX-MS-Messung abgedeckt werden, die eine Aussage über die Zugänglichkeit ermöglichen (siehe Abbildung 4.13).

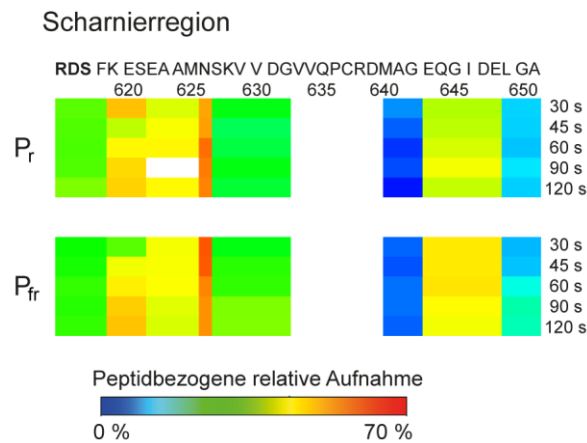


Abbildung 4.13: Der Anfang der Scharnierregion (R615-A651) weist im Gegensatz zur NTE keine hohe Deuteriumaufnahme auf, was vermuten lässt, dass die Region nicht so flexible ist wie angenommen. Es zeigt sich sogar, dass ein Bereich gar keinen Austausch zeigt. Außerdem ist kein Unterschied zwischen dem P_r und P_{fr} Zustand ersichtlich. Die fett markierten Buchstaben der Sequenz zeigen den Beginn der Kristallstruktur.

Im Gegensatz zur NTE, bei der es einen Unterschied in der Deuteriumaufnahme zwischen dem P_r und dem P_{fr} Zustand gibt, weist die Scharnierregion nur leichte Änderungen (E644-E648) im C-terminalen Bereich auf. Des Weiteren zeigt die Scharnierregion eine variierende, jedoch relativ niedrige Deuteriumaufnahme, was darauf hinweist, dass die Region nicht als unstrukturierter C-Terminus vorliegt, sondern wahrscheinlich Wechselwirkungen mit anderen Bereichen des Proteins eingeht.

4.2 PAPP5 – Kontrolle der Aktivität durch Autoinhibition

Neben der spezifischen Absorption von Licht stellt die Phosphorylierung, beziehungsweise die Dephosphorylierung, einen zweiten wichtigen Weg dar, um die Aktivität der pflanzlichen Phytochrome zu regulieren. PAPP5 erweist sich hierbei als interessanter Interaktionspartner der Phytochrome, da Arbeiten von Ryu *et al* zeigten, dass PAPP5 sowohl mit dem N-, als auch mit dem C-Terminus von Phytochrom A aus *Avena sativa* interagiert. Weiterhin konnte auch eine Bindung an PhyA und PhyB aus *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden⁷⁴. Um weitere Informationen über diese Phosphatase zu gewinnen, wurde diese kristallisiert, so dass ihre Struktur gelöst werden konnte. Des Weiteren wurden Experimente durchgeführt, um den bislang ungeklärten Mechanismus der Aktivierung dieses Phosphatasetyps mittels Fettsäuren aufzuklären.

4.2.1 Etablierung der Produktion und Reinigung von PAPP5

Für die rekombinante Expression von PAPP5 wurde die Isoform 2 ohne Membrananker als synthetisches Gen bestellt und in den pET-28a(+) Vektor ligiert. Für die Proteinproduktion wurde das Plasmid in *E. coli* BL21(DE3) Gold Zellen transformiert. Die heterologe Produktion wurde in TB-Medium bei 21 °C über Nacht durchgeführt, nachdem mit 0,1 mM IPTG induziert wurde. Nach dem Aufschluss der Zellen erfolgte ein erster Reinigungsschritt mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie und abschließend eine Größenausschlusschromatografie unter Verwendung einer Superdex200 26/60 Säule. Durch die Kalibrationsgleichung ergibt sich eine apparente Masse von 60 kDa gemäß Kalibrationsgleichung (siehe Abbildung 4.14), die mit der theoretisch berechneten Masse von 55 kDa in guter Übereinstimmung steht. Es zeigte sich, dass PAPP5 in einer rein monomeren Form von der Säule eluierte. Die Ausbeute nach der Gelfiltration lag bei 45 mg pro Liter Kultur.

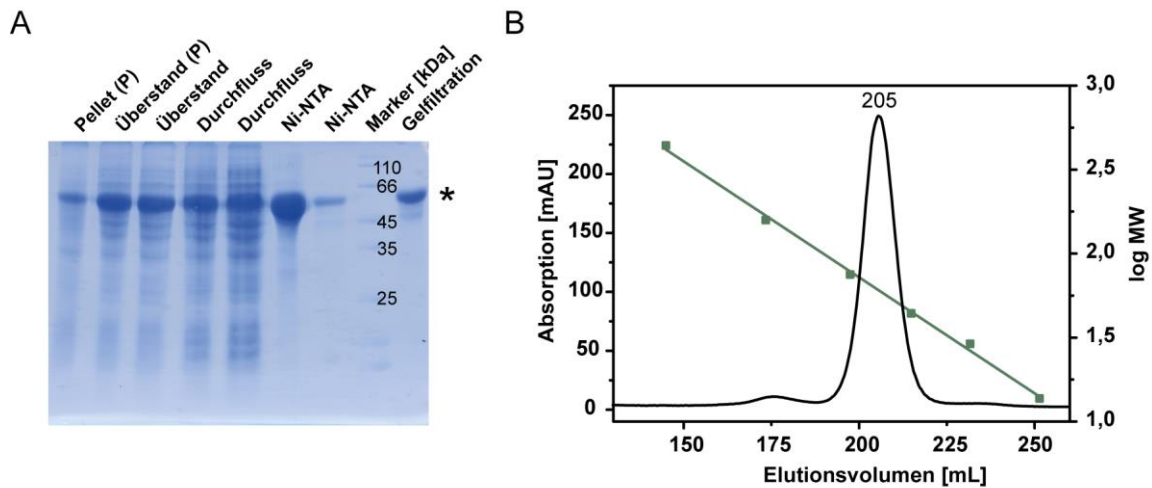


Abbildung 4.14: Reinigung des Phosphatase PAPP5. (A) Aus dem SDS-PAGE der Reinigung ist ersichtlich, dass die Phosphatase bei einer Masse von circa 60 kDa migriert (markiert durch einen Stern), welches sehr gut der theoretisch berechneten Masse von 55 kDa entspricht. Als Referenz für die SDS-Page wurde der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* von *Fermentas* eingesetzt. (B) Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen Peak bei einem Elutionsvolumen von 205 mL, der einer apparenten Masse von 60 kDa entspricht. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz) gemessen.

Nach der Gelfiltration war auf der SDS-PAGE eine Bande bei circa 60 kDa sichtbar, die der theoretisch berechneten Masse von PAPP5 von 55 kDa entspricht. Es zeigte sich, dass es möglich war die Phosphatase in löslicher Form zu erhalten, ohne die Notwendigkeit eines löslichkeitssteigernden Fusions-*Tags*.

Weiterhin konnte eine Deletionsvariante ohne TPR Domäne (136-484) und eine ohne TPR Domäne und C-terminalen inhibierendem Motiv (136-471) hergestellt werden. Die Produktion und Reinigung erfolgten analog zum Wildtyp.

4.2.2 Kristallisation und Strukturlösung

Um für die Kristallisation ideale Bedingungen zu finden, wurden zunächst verschiedene Puffersysteme und pH-Werte getestet. Mittels eines Thermofluor-Assays wurden die Schmelzpunkte von PAPP5 in verschiedenen Puffersystemen verglichen und die besten Bedingungen ermittelt (siehe Abbildung 4.15).

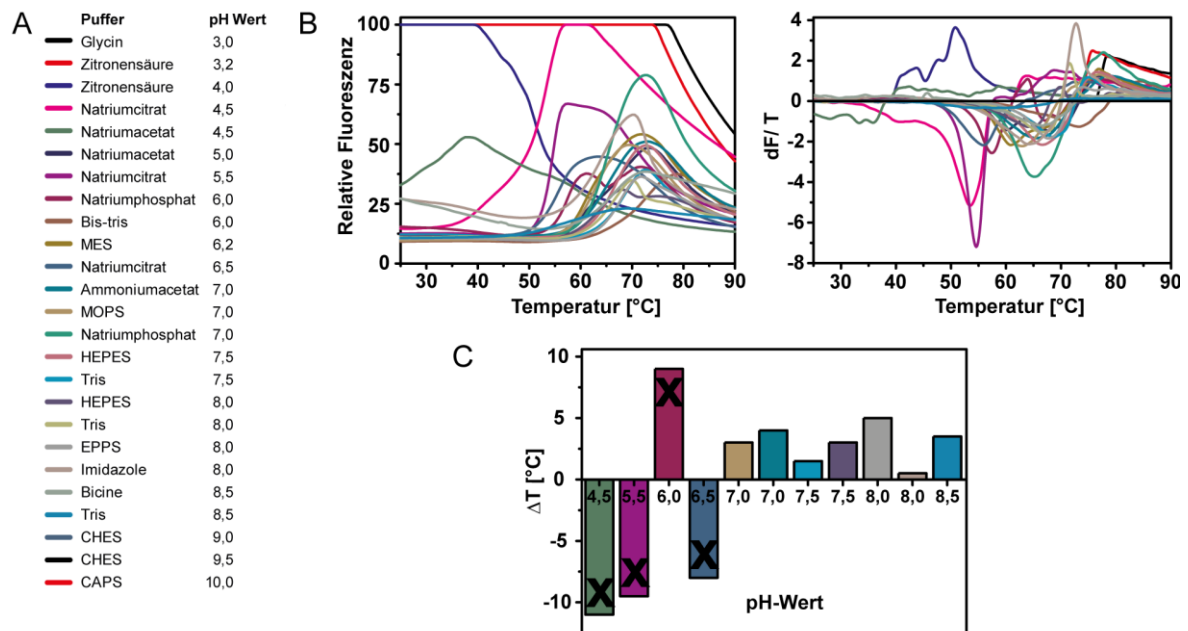


Abbildung 4.15: Thermofluor-Assays zur Ermittlung idealer Pufferbedingungen für die Kristallisation. Es wurden verschiedene Puffersysteme (A) getestet und von den erhaltenen Schmelzkurven Ableitungen gebildet (B), um die Schmelzpunkte zu ermitteln. (C) Zusammenfassung der Schmelzpunktänderung der Puffersysteme aufgetragen in Abhängigkeit von ihrem pH-Wert. Die ersten vier Ergebnisse wurden auf Grund des flachen Verlaufs der Schmelzkurven nicht weiter berücksichtigt.

Unter Berücksichtigung der aus den Ableitungen der Schmelzkurven ermittelten Schmelzpunkte wurden elf Bedingungen für eine nähere Analyse ausgewählt. Weitere vier Bedingungen wurden auf Grund eines sehr flachen Kurvenverlaufs verworfen. Aus den verbleibenden Puffersystemen wurden fünf Bedingungen (Ammoniumacetat pH=7,5; HEPES pH=7,5; EPPS pH=8,0; Tris pH=8,0 und Tris pH=8,5 ausgewählt und initiale Kristallisationsscreens in 96-well Format mit den kommerziellen Screens Core I bis Core IV durchgeführt.

Nach einer Woche war für den Tris Puffer bei pH 8,0 die Bildung kleinerer Nadelbüsche bei 18 °C und Bedingung B2 (0,1 M HEPES pH 7,5; 20 % (v/v) PEG 8000) und C10 (0,1 M HEPES pH 6,5; 20 % (v/v) PEG 6000) des Screens Core I zu beobachten (siehe Abbildung 4.16).

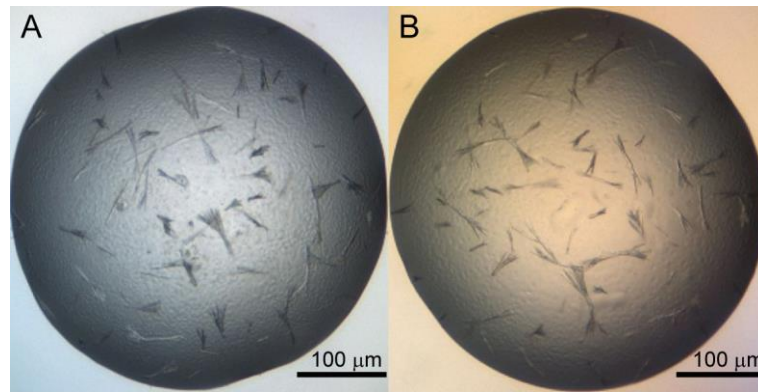


Abbildung 4.16: Kristalle des initialen Kristallisationsscreens Core I. (A) Kleinere Nadelbüschel aus Bedingung C10 (0,1 M HEPES pH 6,5; 20 % (v/v) PEG 6000). (B) Kleinere Nadelbüschel aus Bedingung B2 (0,1 M HEPES pH 7,5; 20 % (v/v) PEG 8000).

Eine Verfeinerung der Bedingung C10 im *24-well hanging drop* Maßstab, sowie ein Mikroseeding mit Kristallen aus der Bedingung C10 führten bei der Bedingung bestehend aus 0,1 M HEPES pH 7,0; 50 % (v/v) PEG 4000 zur Bildung größerer Nadeln mit einer Länge von bis zu etwa 100 µm (siehe Abbildung 4.17).

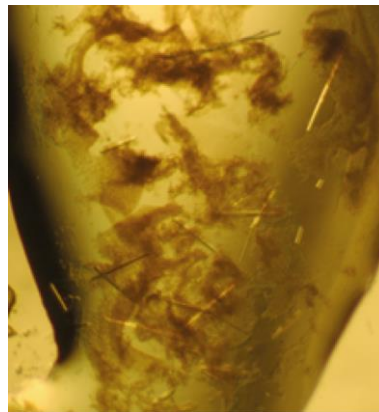


Abbildung 4.17: Kristalle nach der Optimierung der Kristallisationsbedingungen (0,1 M HEPES pH 7,0; 50 % (v/v) PEG 4000) mittels Mikroseeding. Es bildete sich längliche Nadeln bis etwa 100 µm. Sich bildendes amorphes Präzipitat könnte auf denaturiertes Protein zurückgeführt werden.

Die Kristalle von PAPP5 wurden verwendet um am Synchrotron der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY-II) Datensätze aufzunehmen. Hierfür wurde die Strahllinie 14.2 verwendet. Die Integration und Datenreduktion wurde mit *XDS* sowie *SCALA* durchgeführt. Die Kristalle beugten bis zu einer maximalen Auflösung von 3 Å (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Statistik des Datensatzes SvH17. Aufgenommen wurde der Datensatz am Synchrotron der Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY-II). Die Werte in Klammern geben jeweils die Werte der höchsten Schale an. Sl = Strahllinie; a.s.u. = asymmetrische Einheitszelle (engl.: *Asymmetric unit*).

AtPAPP5	
Datensatz	SvH17
Röntgenquelle	BESSY II, Sl 14.2
Wellenlänge	0,91841
Raumgruppe	P 1 21 1
Zellmaße (Å)	a = 51,6, b = 103,0, c = 95,1 $\alpha = 90,0^\circ$, $\beta = 95,6^\circ$, $\gamma = 90,0^\circ$
Moleküle/a.s.u.	2
Auflösung (Å)	34,8 – 3,0
Beobachtete Reflexe	36799 (9404)
Multiplizität	3,3 (3,3)
Einzige Reflexe	19740 (2892)
R_{merge} (%)	0,142 (0,472)
Vollständigkeit (%)	99,1 (99,6)
Mittleres I/σ (I)	13,7 (4,1)
Wilson B-Faktor (Å²)	32,3

Aufgrund der Übereinstimmung der Primärstruktur von 56 % zu der bekannten PP5 Struktur, aus *Homo sapiens* (PDB Code: 1WAO) wurde eine Lösung des Phasenproblems mittels molekularen Ersatzes in *PHENIX* vorgenommen. Weitere Verfeinerungszyklen erfolgten durch die alternierende Benutzung der automatischen Verfeinerung durch *Phenix.refine* und der manuellen Optimierung mittels *Coot*. Der relativ hohe Abstand der R-Werte ($R_{\text{work}} = 0,186$ und $R_{\text{free}} = 0,254$) ergibt sich durch die geringe Auflösung von 3.0 Å. Die weiteren Werte der Verfeinerungsstatistik können Tabelle 4.2 entnommen werden.

Tabelle 4.2: Verfeinerungsstatistik des Datensatzes SvH17.

AtPAPP5	
R_{work}	0,186
R_{free}	0,254
rmsd	
Bindungslängen (Å)	1,355
Bindungswinkel (°)	0,0101
Anzahl Aminosäuren	956
definiert in Kette A	476 (D9 - N484)
definiert in Kette B	480 (N5 - N484)
Heteroatome	4 Mn
Wassermoleküle	13

Einige Kristalle wurden für 10 s bis 2 min in Arachidonsäurelösungen (10 mM, 20 mM, 50 mM und 100 mM) inkubiert und anschließend gefroren. Es zeigte sich jedoch, dass die Inkubation ein Auflösen der Kristalle verursachte und beim Aufnehmen der Datensätze nur eine maximale Auflösung von 8 Å erreicht werden konnte.

4.2.2.1 Die Struktur von PAPP5 – Kontrolle der Aktivität durch Autoinhibition

Die Lösung der Struktur ergab, dass sich zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheitszelle befinden. Eine Analyse mittels des Servers *PISA*²⁶⁰ zeigte keine ausreichenden Wechselwirkungen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine Dimeranordnung vorliegt. Zum Vergleich wurde die menschliche PP5 Phosphatase ebenfalls analysiert, bei der eine Dimeranordnung über ein β -Sandwich beobachtet wurde. Es ergab sich ebenfalls nur eine geringe Anzahl an Wechselwirkungen von denen jedoch keine als signifikant betrachtet werden kann.

Zwischen den beiden Molekülen in PAPP5 ergeben sich lediglich geringfügige Unterschiede im C-Terminus. Da jedoch die aktive Tasche und der C-Terminus im Molekül A besser aufgelöst sind, erfolgt die weitere Betrachtung anhand diesem (siehe Abbildung 4.18).

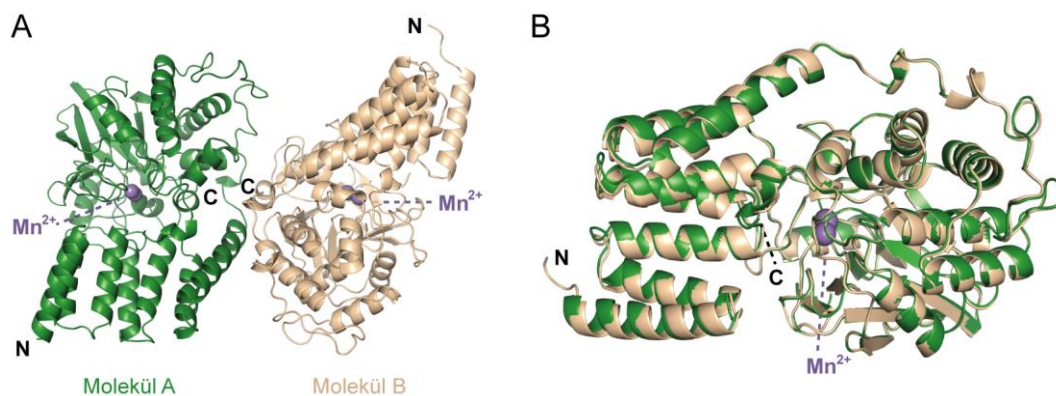


Abbildung 4.18: Orientierung der zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. (A). Das Molekül A ist in beige und das Molekül B in grün dargestellt. Jede Untereinheit hat jeweils zwei Manganionen (lila) gebunden, welche in lila eingefärbt sind. (B) Die Überlagerung beider Moleküle.

Als Mitglied der PP5 Familie zeigt PAPP5 einen typischen Aufbau bestehend aus einer TPR Domäne und einer PP2A Domäne, die ein zusätzliches C-terminales Motiv besitzt.

Zwischen der TPR und PP2A Domäne befindet sich die aktive Tasche, in der zwei Manganionen gebunden sind. Das C-terminale inhibierende Motiv ist oberhalb der Interaktionsfläche der TPR und der PP2A Domäne angeordnet (siehe Abbildung 4.19).

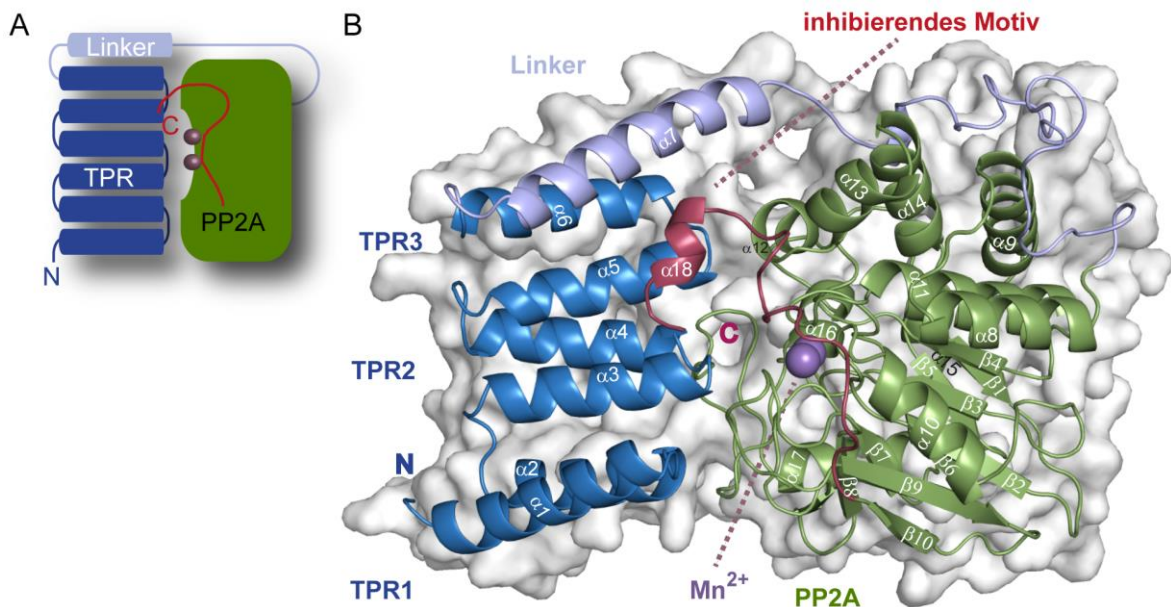


Abbildung 4.19: Schematische Präsentation (A) und Kristallstruktur (B) von AtPAPP5. Die N-terminale TPR Domäne (blau) ist über eine lange α -Helix sowie einer Schleife (Linker; hellblau) mit der PP2A Domäne (grün) verbunden. Der C-Terminus der PP2A Domäne enthält ein inhibierendes Motiv bestehend aus einer lange Schleife sowie einer Helix (rot). Die zwei gebundenen Manganionen sind in lila koloriert. Die α -Helices und β -Stränge sind vom N- zum C-Terminus nummeriert.

Die TPR (engl.: *Tetratricopeptide repeats*) Domäne besteht aus drei *Repeats*, die jeweils zwei α -Helices besitzen, welche ein gemeinsames Helix-Turn-Helix Motiv ausbilden. Diese Motive sind übereinander in drei Paaren angeordnet, wobei eine leichte Rotation zwischen den Paaren auftritt. Durch diese Anordnung kommt es zur Ausbildung einer superhelikalen tertiären Struktur. Die streng konservierte PP2A Domäne besitzt eine kompakte α/β -Faltung bestehend aus elf α -Helices und elf β -Strängen. Die β -Stränge bilden in der Mitte des Moleküls eine β -Sandwich Struktur aus. Auf der einen Seite dieses Sandwiches sind drei kurze Helices ($\alpha 9$ - $\alpha 11$) und auf der anderen Seite sechs Helices ($\alpha 12$ - $\alpha 17$) angeordnet. Das C-terminale inhibierende Motiv ist aus einer 15 Aminosäuren langen Schleife (S463-N477) und einer Helix zusammensetzt. Ein Topologie-Diagramm der PP2A Domäne und des C-terminalen Motivs ist in Abbildung 4.20 dargestellt.

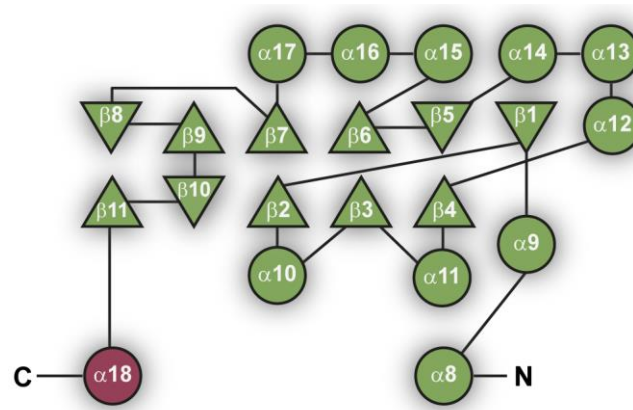


Abbildung 4.20: Topologie-Diagramm der PP2A Domäne (grün) und des C-terminalen Motivs (rot). Die α -Helices sind als Kreise und die β -Stränge als Dreiecke dargestellt. Die Nummerierung entspricht der Gesamtstruktur.

Die Superposition von PAPP5 mit der menschlichen Phosphatase PP5 (PDB Code: 1WAO und 1S95) ergibt eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Strukturen. Lediglich die PP2A Domäne weist Unterschiede auf, da PP5 drei weitere β -Stränge zwischen den Helices 16 und 17 besitzt, welche in der pflanzlichen Struktur als Schleifenregionen vorliegen (siehe Abbildung 4.21B). Die Struktur von PAPP5 konnte im Gegensatz zur Struktur von PP5 mit einer vollständigen Verbindung zwischen der TPR Domäne und der PP2A Domäne gelöst werden (siehe Abbildung 4.21).

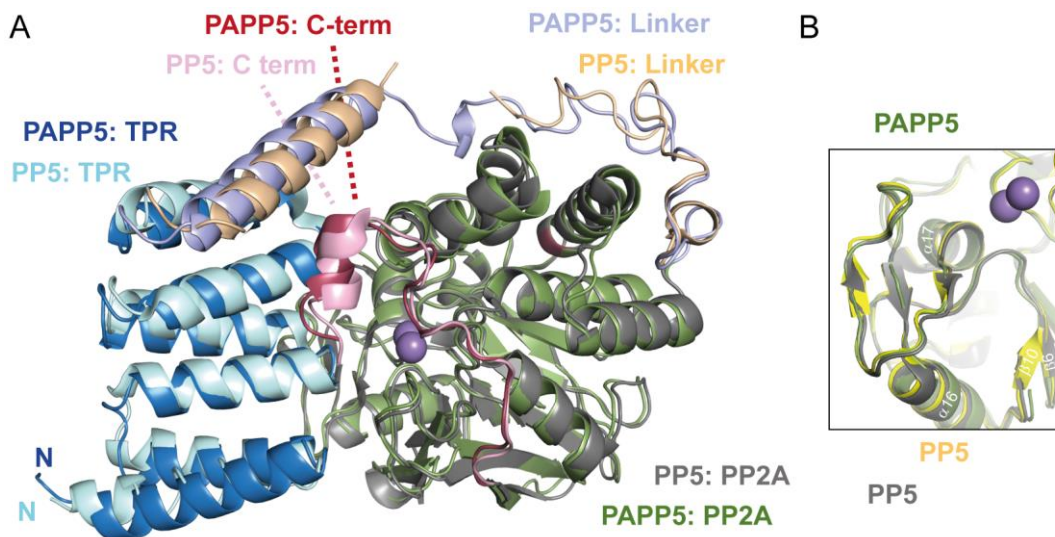


Abbildung 4.21: Superposition von PAPP5 mit PP5. (A) Die Domänen der pflanzlichen Phosphatase PAPP5 sind in dunkelblau, lila, grün und rot koloriert und die der menschlichen Phosphatase PP5 (PDB Code: 1WAO) in hellblau, beige, grau und rosa. (B) Überlagerung der Phosphatase Domäne PP2A der pflanzlichen Struktur (grün) und zweier menschlicher Strukturen (PDB Code: 1WAO in grau und PDB Code: 1S95 in gelb).

Bei einem Vergleich der TPR Domänen fällt auf, dass die TPR2 und die erste Helix des TPR3 *Repeats* eine gleiche Anordnung aufweisen. Wohingegen der TPR1 *Repeat* mit einer Verdrehung von circa 15 ° zueinander die größte Abweichung aufweisen.

Die Superposition der pflanzlichen und menschlichen PP2A Domäne, die ohne TPR Domäne kristallisiert wurde, weist keine strukturellen Änderungen auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass keine größere konformationelle Änderung der PP2A Domäne zur aktiven Form erfolgen muss (siehe Abbildung 4.22).

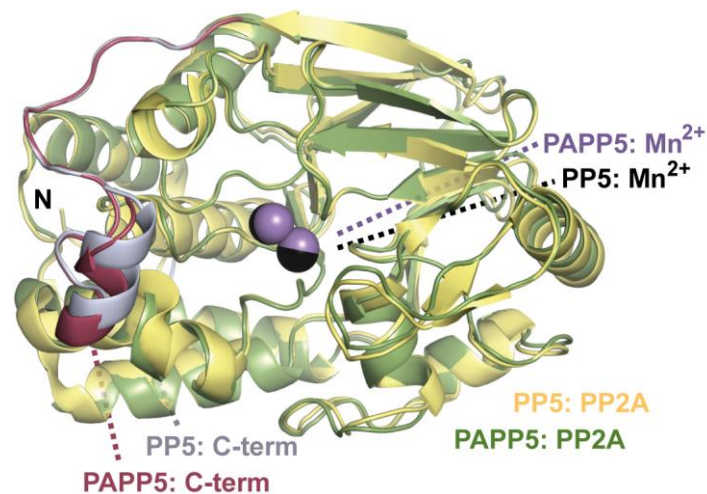


Abbildung 4.22: Superposition der PP2A Domänen, die mit und ohne TPR Domäne kristallisiert wurden. Die Kristallstruktur von PAPP5 aus *Arabidopsis thaliana* (grün) wurde mit der TPR Domäne kristallisiert und die Struktur von PP5 aus *Homo sapiens* (gelb; PDB Code: 1S95) ohne diese. Die C-terminalen inhibitorischen Motive sind in rot (PAPP5) und hellblau (PP5) eingefärbt. Die Manganionen sind in lila und schwarz koloriert.

Weiterhin weisen Deletionsvarianten von PAPP5 ohne TPR Domäne, aber fusioniert an einem GST-Tag eine ebenso hohe katalytische Aktivität, wie das mit AA aktivierte Vollängenprotein⁷⁴. Dies spricht dafür, dass die TPR Domäne nicht an der Dephosphorylierung von Substraten beteiligt ist.

Die katalytische Tasche der Phosphatase befindet sich zwischen der TPR und der PP2A Domäne und wird von vier Schleifen und einer Helix: $\beta 4 - \alpha 12$, $\alpha 15 - \beta 3$, $\beta 7 - \beta 8$, $\beta 6 - \alpha 15$ und $\alpha 16$ gebildet. In der Mitte der Tasche sind zwei Manganionen koordiniert (siehe Abbildung 4.23).

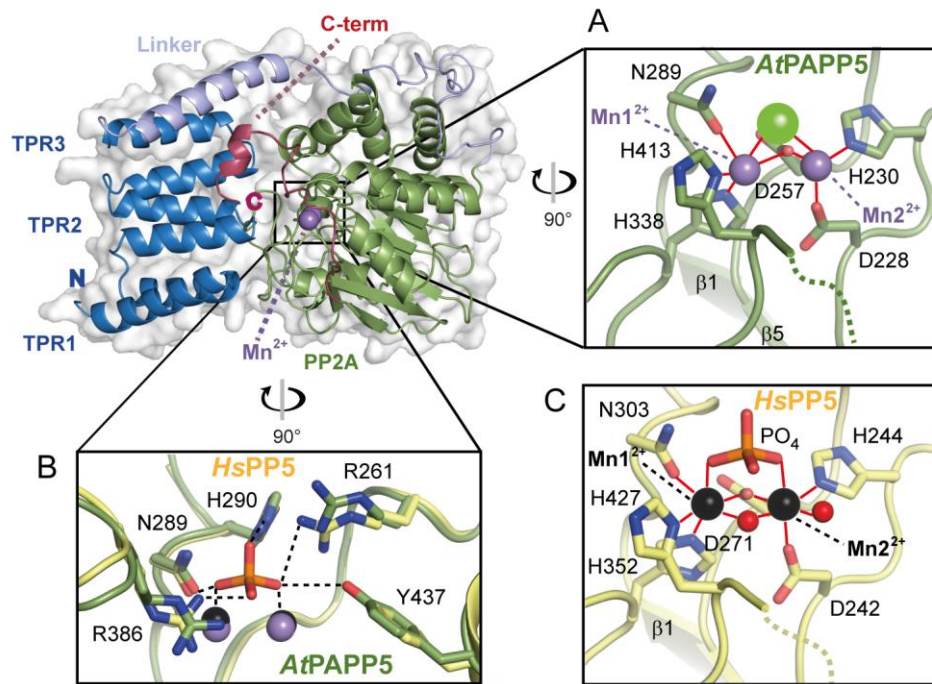


Abbildung 4.23: Katalytische Tasche der Phosphatase PAPP5. (A, C) Detaillierte Darstellung der Koordination der Manganionen der Phosphatase PAPP5 aus *Arabidopsis thaliana* und PP5 aus *Homo sapiens* (PDB Code: 1S95). Die Wechselwirkungen der Aminosäuren mit den Metallionen (PAPP5: lila; PP5: schwarz) sind in rot dargestellt. Grüne Kugeln repräsentieren Chloride und rote Wassermoleküle. (B) Superposition der Phosphatbindungsstelle von PAPP5 und PP5 (PDB Code: 1S95). Die Wechselwirkungen zwischen dem Phosphat und den Aminosäuren sind als schwarz gestrichelte Linien dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf PAPP5.

Hierbei wird das Manganion 1 von den Aminosäuren D257, N289, H338, H413, D228, H230, D257 und einem Chloridion koordiniert und Manganion 2 von den Aminosäuren D228, H230, D257 sowie dem Chloridion. Durch den Vergleich der aktiven Tasche von PAPP5 und PP5 (PDB Code: 1S95) zeigte sich, dass neben den konservierten Aminosäuren noch zwei weitere Wassermoleküle an der Koordination der Manganionen beteiligt sind, so dass ein leicht verzerrter Oktaeder entsteht. Weiterhin besetzt das Chlorid in der pflanzlichen Struktur die Position des Phosphats. Fünf weitere Aminosäure: R261, N289, H290, R386 und Y437 sorgen für die korrekte Positionierung des Phosphatanions (siehe Abbildung 4.23B). Durch die Superposition der Strukturen ergibt sich, dass die Reste R261, und R386 (bezogen auf PAPP5) in PP5 zum gebundenen Phosphat ausgerichtet sind und deren Position somit mit der Phosphatbindung variiert.

An der Inhibition des aktiven Zentrums ist sowohl die TPR Domäne als auch das C-terminale inhibierende Motiv (K471-M484) beteiligt, was bereits durch Aktivitäts-

messungen von Deletionsvarianten bewiesen werden konnte^{138,74}. Die Struktur der pflanzlichen Phosphatase konnte zum ersten Mal die spezifischen Aminosäuren identifizieren, durch welche die Inhibition stabilisiert wird (siehe Abbildung 4.24).

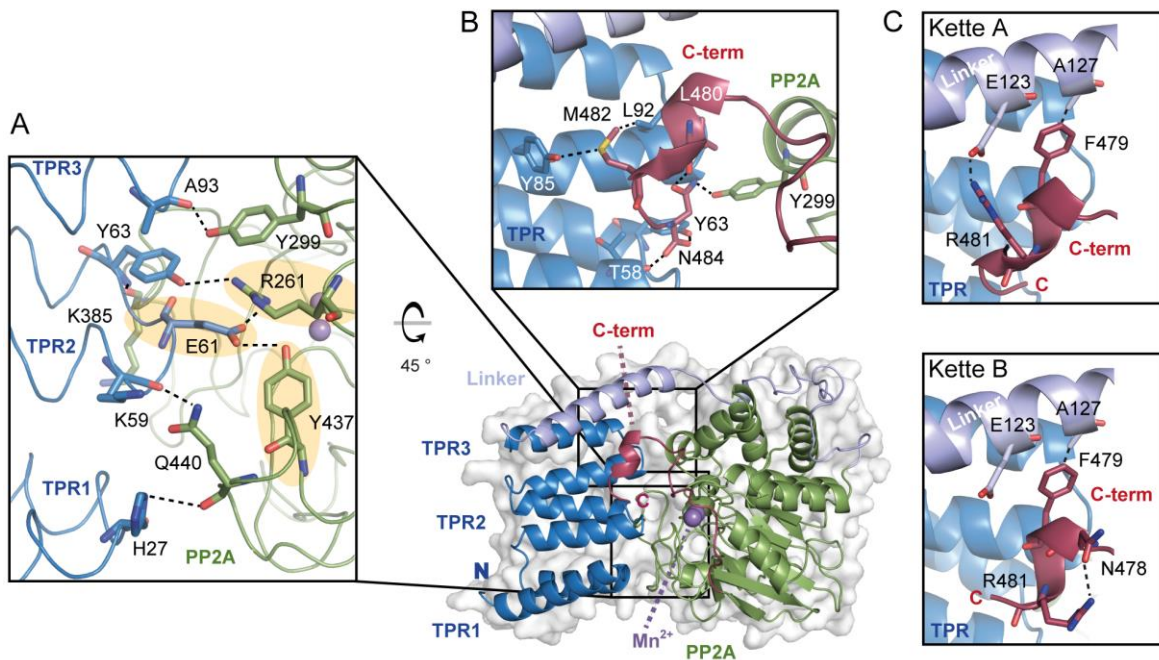


Abbildung 4.24: Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Domänen. (A) Die Inhibition der PP2A Domäne durch die TPR Domäne basiert auf einer Vielzahl von Wechselwirkungen. Hervorgehoben sind die Wasserstoffbrücken von E61 zu R261 und Y437, die beide an der Phosphatbindung beteiligt sind. (B) Die C-terminale Helix interagiert sowohl mit der TPR als auch mit der PP2A Domäne. (C) Die Interaktionen der C-terminalen Helix unterscheiden sich in den Ketten A und B. Die Wechselwirkungen der Aminosäuren sind durch gestrichelte schwarze Linien dargestellt.

Eine Analyse der Interaktionen zwischen der TPR und PP2A Domäne zeigt, dass alle TPR *Repeats* an der Ausbildung von Wechselwirkungen zu der PP2A Domäne beteiligt sind. Hierbei ist die Wasserstoffbrückenbindung der Carboxylatseitengruppe von E61 zu Y437 und R261 von besonderem Interesse, da beide Aminosäuren an der Koordination des Phosphats beteiligt sind. Es konnte bereits durch Mutationsstudien in PP5 gezeigt werden, dass eine Alaninmutante die Aktivität um das zehnfache steigert¹³⁶. Eine weitere Stabilisierung der Inhibition erfolgt durch die Interaktion der Hydroxylseitengruppe von Y63 mit R261. Diese Wechselwirkungen mit der Phosphatbindungstasche sowie die zwischen dem Amidsauerstoff von A93 und der Hydroxylseitengruppe von Y299 sind auch in der menschlichen Phosphatase PP5 konserviert.

Weiterhin ist die C-terminale Helix an der Abschirmung der aktiven Tasche beteiligt. Im Gegensatz zu PP5 liegen in der pflanzlichen Struktur nicht nur unpolare Wechselwirkungen vor. So bildet die Thioether-Gruppe von M482 Wechselwirkungen mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Y85 aus, sowie van-der-Waals-Wechselwirkungen mit L92. Besonders interessant ist die Aminosäure Arginin 484, die mit den Carbonyl-Sauerstoffen von Y63 und Y299 polare Interaktionen eingeht. Die Position der Aminosäure wird weiterhin durch Wechselwirkungen der Amid-NH-Gruppe von L480 und dem Amid-Sauerstoff von T58 stabilisiert. Somit geht die Aminosäure R484 Wechselwirkungen sowohl mit der TPR als auch mit der PP2A Domäne ein.

Die richtige Positionierung der C-terminalen Helix wird auch durch die Interaktion mit dem Linker unterstützt. Die heterogenen Interaktionen der C-Termini führt zu unterschiedlichen Wechselwirkungen in den Ketten. Die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Aminosäure A127 und F474 treten hierbei in beiden Ketten auf. Weiterhin treten in Kette A, zwischen E123 und R481, polare Wechselwirkungen auf, jedoch nicht in Kette B. Hier interagiert Aminosäure R481 mit N478.

Weiterhin könnte die heterogene Interaktion des C-terminalen inhibierenden Motivs ein Hinweis darauf sein, dass nur eine partielle Inhibition des C-Terminus erfolgt und sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der aktiven und inhibierten Form ausbildet. Dies könnte die zwar geringe, aber dennoch vorhandene Aktivität des Wildtyps erklären (siehe Abschnitt 4.2.3).

4.2.3 Studien zur Phosphatase-Aktivität von PAPP5

Aus früheren Veröffentlichungen ist bekannt, dass Arachidonsäure (AA) PAPP5 und die menschliche PP5 Phosphatase aktiviert^{74,137,139}. Um die Funktionalität des rekombinanten PAPP5 zu überprüfen wurde die Phosphatase unter Zugabe von AA vermessen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Assay verwendet, das auf para-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Chromogen basiert. Hierbei wird die freigesetzte Menge an Phosphat (Pi) bei 405 nm verfolgt auf Grund der Bildung zu para-Nitrophosphat. Für die Assays wurde jeweils 1 µg Protein eingesetzt und der Einfluss verschiedener Arachidonsäure- sowie pNPP-Konzentrationen getestet (siehe Abbildung 4.25).

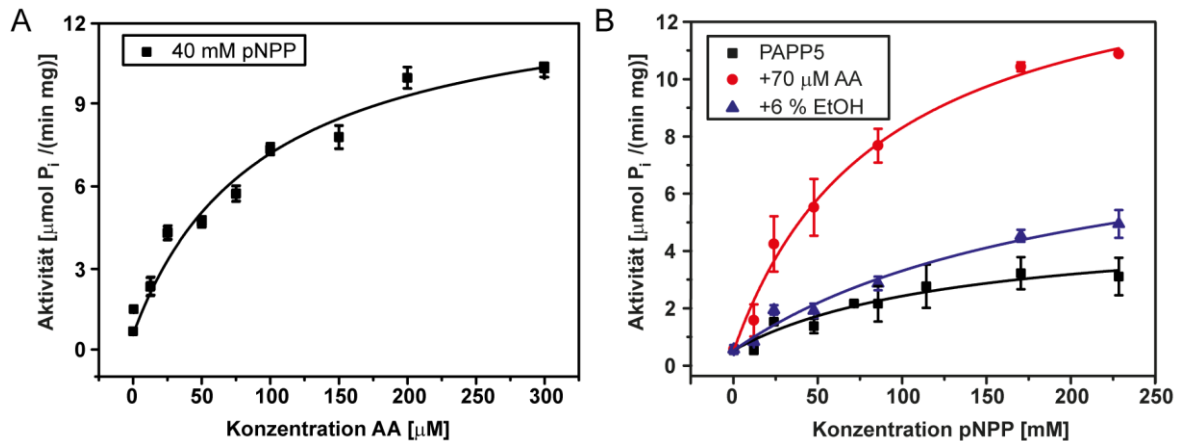


Abbildung 4.25: Phosphataseaktivität von PAPP5. (A) Der Einfluss des Aktivators Arachidonsäure (AA) auf die Aktivität der Phosphatase wurde in Anwesenheit von 40 mM para-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt. Die Arachidonsäurekonzentration wurde gegen die Aktivität (Mittelwert \pm SD; $n=3$) aufgetragen. (B) Die Konzentration des Substrats (pNPP) wurde variiert und die Aktivität (Mittelwert \pm SD; $n=3$) des Wildtyps sowie der Einfluss von Arachidonsäure und Ethanol (EtOH) bestimmt.

Durch die Verwendung der Michaelis-Menten-Kinetik ergab sich für die variierte Arachidonsäurekonzentration ein V_{\max} -Wert von $12,9 \pm 2,2 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt pro min und mg Protein und ein K_M -Wert von $94,7 \pm 12,1 \mu\text{M}$ (siehe Abbildung 4.25 A). Es zeigte sich, dass bis zu einer Arachidonsäurekonzentration von circa $200 \mu\text{M}$ die Aktivität der Phosphatase signifikant steigt. Da die kritische Mizellenkonzentration von Arachidonsäure allerdings bei $77 \mu\text{M}$ (Puffer: 50 mM HEPES pH 7,6; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 ; RT) liegt²⁶¹, wurde für die weiteren Messungen eine Konzentration von $70 \mu\text{M}$ verwendet.

Durch Berechnen der Michaelis-Menten-Kinetiken für variierte pNPP Konzentration ergab sich für die Zugabe der Arachidonsäure ein K_m -Wert von $92,2 \text{ mM}$ und ein V_{\max} -Wert von $15 \pm 1,1 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt / (min·mg). Die Zugabe von der Arachidonsäure bewirkte eine fast doppelte Steigerung gegenüber der Aktivierung mit Ethanol ($V_{\max} = 8,9 \pm 1,9 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt / (min·mg)) und eine vierfache Steigerung gegenüber dem Wildtyp ($V_{\max} = 3,6 \pm 0,7 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt / (min·mg)) unter saturierenden pNPP-Konzentrationen. Ein Vergleich mit den von Ryu *et al.* erhaltenen Werten zeigt, dass die Aktivitäten der Phosphatase mit Fusions-Tag fast doppelt so hoch sind ($V_{\max} = 22 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt / (min·mg)), allerdings wurde hierbei eine Arachidonsäurekonzentration von $100 \mu\text{M}$ verwendet⁷⁴. Unter den gleichen Bedingungen wie für den Wildtyp wurden auch die Deletionsvarianten

PAPP5 (136-484) und PAPP5 (136-471) vermessen. Beide besaßen jedoch keine messbare Aktivität, was wahrscheinlich durch die Bildung von Oligomeren (siehe Abbildung 4.29) und eine daraus resultierende Unzugänglichkeit der aktiven Tasche begründet werden kann.

Weiterhin wurden Kontrollreaktionen mit Ethanol durchgeführt, da die Arachidonsäure in Ethanol gelöst wurde. Das Volumen an Ethanol entsprach dem zugegebenen Volumen an Arachidonsäure. Überraschenderweise zeigte sich ebenfalls eine gesteigerte Aktivierung gegenüber dem Wildtyp, die mit höheren pNPP Konzentrationen zunimmt. Ethanol scheint ebenfalls in der Lage zu sein die blockierte aktive Tasche freizusetzen. Um den Einfluss von Ethanol auf die Aktivität der Phosphatase zu überprüfen, wurde das zugegebene Ethanolvolumen im Bereich zwischen 0 % und 90 % (v/v) variiert (siehe Abbildung 4.26).

Aus den Daten ist ersichtlich, dass eine Steigerung der Aktivität bis 75 % Ethanol erreicht werden konnte. Erstaunlich ist die extrem hohe Toleranz der Phosphatase gegenüber Ethanol.

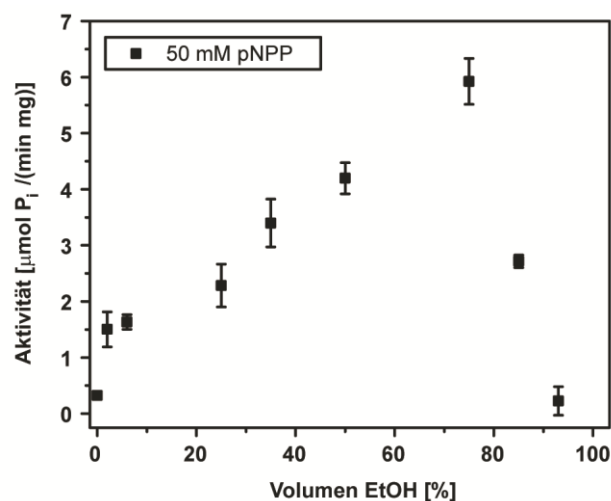


Abbildung 4.26: Einfluss von Ethanol auf die Phosphataseaktivität von PAPP5. Die Aktivität (Mittelwert \pm SD; n=3) wurde in der Anwesenheit von 50 mM para-Nitrophenylphosphat (pNPP) und mit variierender Ethanolkonzentrationen (EtOH) bestimmt.

Um die für die Aktivierung notwendigen Eigenschaften der Fettsäure zu ermitteln, wurde der Einfluss einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren sowie gesättigter Fettsäuren und Dicarbonsäuren auf die Aktivität der Phosphatase bestimmt. Die verwendeten Fettsäuren sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

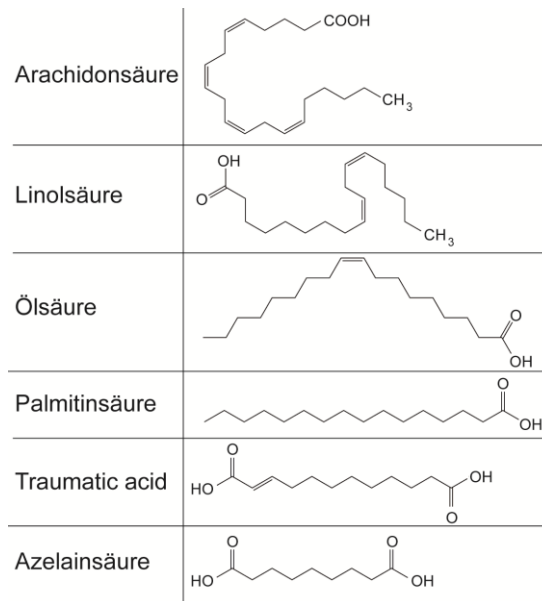


Abbildung 4.27: Strukturen der Fettsäuren, die zur Aktivierung von PAPP5 getestet wurden.

Die durch die Zugabe verschiedener Fettsäuren ermittelten Aktivitäten wurden für einen einfacheren Vergleich als Balkendiagramm aufgetragen (siehe Abbildung 4.28).

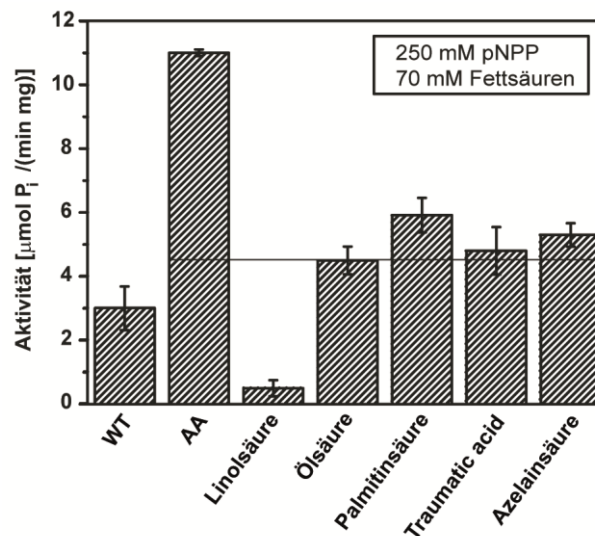


Abbildung 4.28: Einfluss verschiedener Fettsäuren auf die Phosphataseaktivität von PAPP5 (Mittelwert \pm SD; n=3) in Anwesenheit von 250 mM pNPP. Die Linie markiert die Basisaktivität, die bereits durch Ethanol erreicht wird. AA = Arachidonsäure; WT = Wildtyp.

Es zeigte sich, dass keine Fettsäure in der Lage war die Phosphatase so stark zu aktivieren wie Arachidonsäure. Linolsäure, die wie Arachidonsäure ebenfalls eine mehrfach ungesättigte Fettsäure ist, weist sogar eine inhibierende Wirkung auf. Ein Vergleich mit Daten aus Studien, die mit PP5 aus Tomaten und Menschen durchge-

führt wurden, zeigt jedoch eine aktivierende Wirkung der Linolsäure. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Assays unter Zusatz von 2 % Ethanol und Fusionierung von PP5 an einen GST-*Tag* durchgeführt wurden^{137,140,142}. Die Klärung dieses widersprüchlichen Verhaltens der Linolsäure steht noch aus. In Übereinstimmung mit der Literatur kann festgehalten werden, dass Arachidonsäure in der Lage ist PAPP5 zu aktivieren, wie auch schon ursprünglich für PP5 aus Rindern festgestellt wurde¹³⁹.

4.2.4 Mechanistische Studien zum Einfluss von Arachidonsäure

Arachidonsäure ist für die Aktivierung der Phosphatase notwendig, doch der genaue Mechanismus welcher zur Aktivierung führt, ist noch nicht geklärt. Um die physiologisch aktive Form der Phosphatase in Lösung zu bestimmen wurde sie *via* dynamischer Lichtstreuung untersucht. Hierbei wurde sowohl der Wildtyp als auch die zwei Deletionsvarianten untersucht (siehe Abbildung 4.29). Die über 6 h bei 20 °C aufgenommenen DLS Ergebnisse zeigen, dass die Phosphatase im Wildtyp lediglich als Monomer vorliegt, welches eine Größe von 51 kDa aufweist. Dies entspricht der theoretisch berechneten Größe von 55 kDa. Weiterhin deuten die Ergebnisse auf eine Bewegung der Domänen über die Zeit hin. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Interaktionen der TPR Domäne und der PP2A Domäne reversibel gelöst und wieder ausgebildet werden.

Im Gegensatz zum Wildtyp ist bei den Deletionsvarianten die Anwesenheit von Oligomeren zu beobachten. Dies zeigt, dass die Abwesenheit der TPR Domäne zu Stabilitätsproblemen führt und die TPR Domäne neben der autoinhibierenden Funktion auch relevant für die Stabilisierung des Proteins ist.

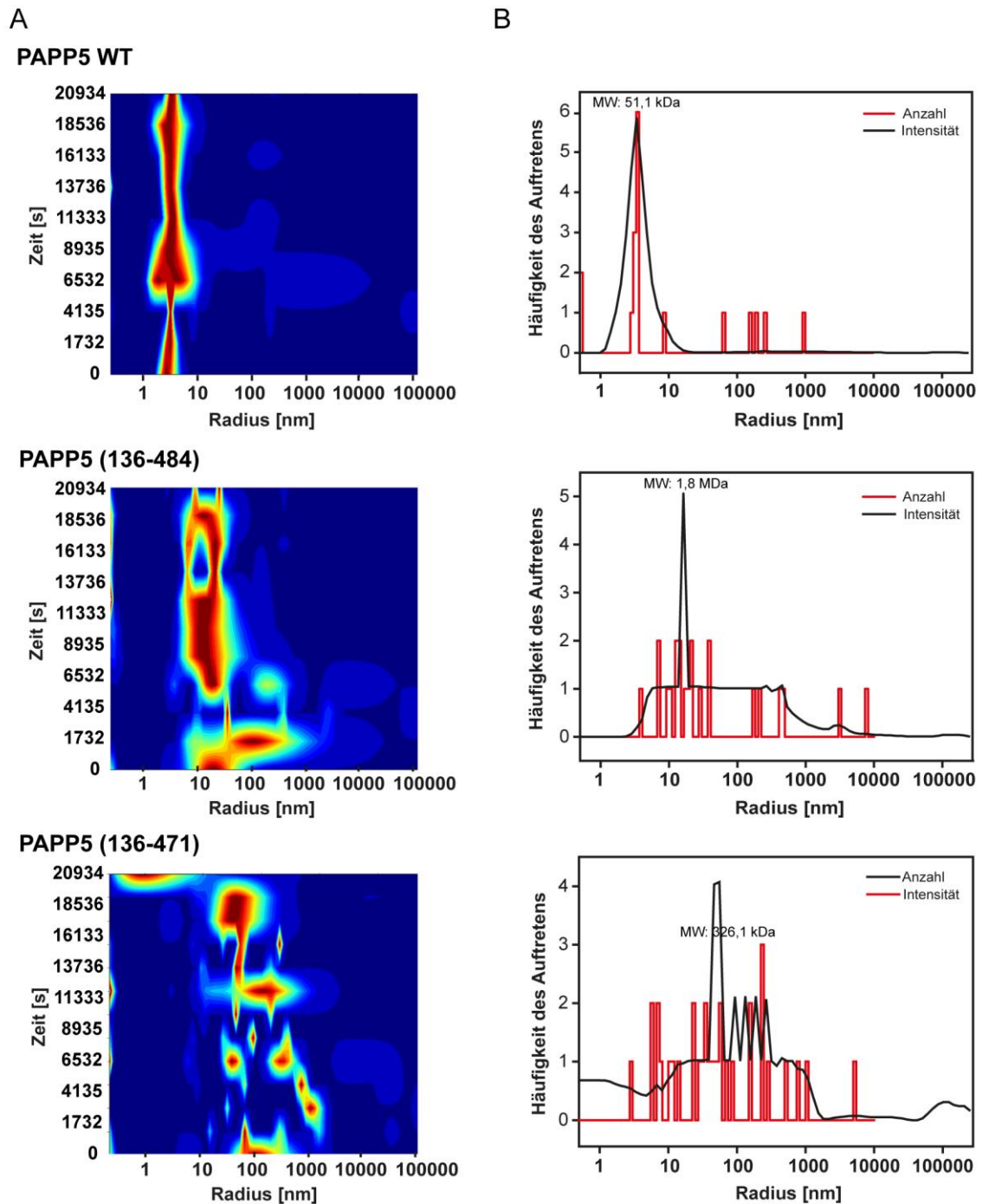


Abbildung 4.29: Untersuchung des oligomeren Zustandes von PAPP5 *via* dynamischer Lichtstreuung. (A) Die Intensität der durchschnittlichen Partikelverteilung ist durch einen Farbverlauf von rot über gelb nach blau dargestellt. Die Anwesenheit einer Spezies ist beim Wildtyp zu beobachten, deren Größe über die Zeit leicht variiert. Bei den Deletionsvarianten sind mehrere Spezies zu sehen. (B) Die Radien der Spezies wurden gegen die Häufigkeit ihres Auftretens aufgetragen. Die verschiedenen Spezies sind in rot gezeigt und die Intensität in schwarz. Die berechnete Größe der dominanten Spezies für den Wildtyp liegt bei 51,1 kDa, was der monomeren Form von PAPP5 entspricht. Die berechnete Größe von PAPP5 (136-484) liegt bei 44 kDa und für PAPP5 (136-471) bei 29 kDa.

Erste Hinweise auf strukturelle Umwandlung gaben die Kristallisationsexperimente, in denen die Inkubation der Kristalle mit Arachidonsäure zum Auflösen dieser führte. Des Weiteren zeigte sich bei Gelfiltrationsläufen, dass durch den Zusatz von Arachidonsäure das Protein früher eluierte, was für eine weniger kompakte Faltung spricht (siehe Abbildung 4.30).

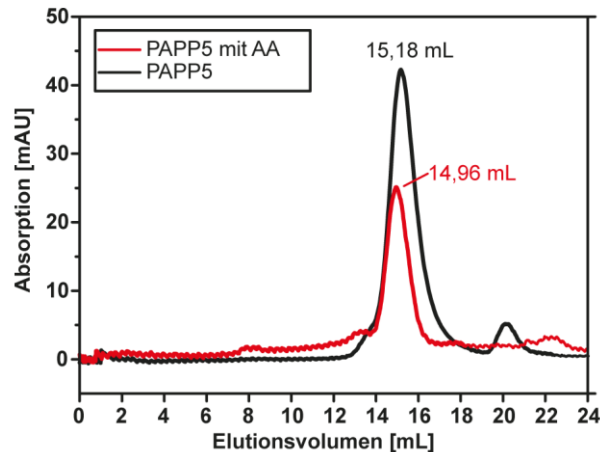


Abbildung 4.30: Chromatogramme analytischer Gelfiltrationsläufe von PAPP5 mit und ohne Arachidonsäure (AA). Durch die Zugabe von Arachidonsäure wird das Elutionsvolumen von 15,2 mL auf 15,0 mL verschoben. Die Absorption wurde jeweils bei 280 nm gemessen.

Die Verschiebung zu einer weniger kompakten Spezies und die Aktivierung der Phosphatase durch Arachidonsäure deuten daraufhin, dass die Bindungen zwischen der TPR und der PP2A Domäne gebrochen wurden, beispielsweise durch ein Entfalten der TPR Domäne, wie von Yang *et al* vorgeschlagen¹¹⁸.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden CD-Messungen in Anwesenheit verschiedener Arachidonsäurekonzentrationen durchgeführt (siehe Abbildung 4.31). Aus den Daten ist ersichtlich, dass der relative α -helikale Anteil mit Zugabe von Arachidonsäure abnimmt. Dies deutet daraufhin, dass die Zugabe von Arachidonsäure eine teilweise Entfaltung α -helikaler Bereiche der Phosphatase bewirkt.

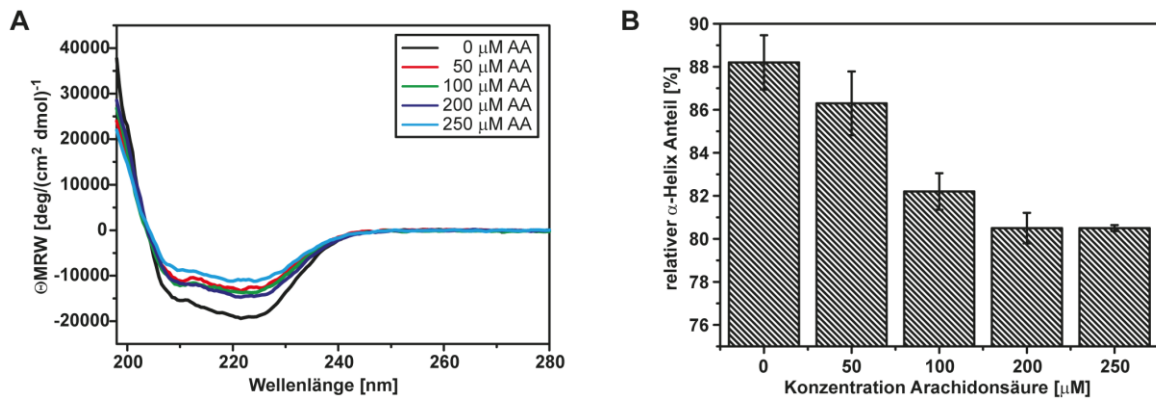


Abbildung 4.31: CD-Spektroskopie von PAPP5 mit und ohne Zusatz von Arachidonsäure (AA). (A) Der Wellenlängenbereich zwischen 200 nm und 280 nm gibt Aufschluss über den Anteil an Sekundärstrukturelementen. Der relative α -helikale Anteil wurde unter Zusatz von verschiedenen Arachidonsäurekonzentrationen vermessen. (B) Die Arachidonsäurekonzentration ist gegen die berechneten relativen α -helikalen Anteile in einem Balkendiagramm aufgetragen.

Ab einer Arachidonsäurekonzentration von 200 μ M kann keine weitere Reduktion der relativen α -helikalen Anteile mehr erreicht werden. Die Aktivitätsmessungen (siehe Abschnitt 4.2.3) zeigten ebenfalls, dass keine weitere Aktivierung ab 200 μ M Arachidonsäure erreicht werden kann.

4.2.4.1 HDX-Analyse

Die CD-Daten weisen auf eine Entfaltung von PAPP5 hin. Um diese Theorie zu bestätigen und die entsprechenden Bereiche zu lokalisieren, wurden HDX Messungen durchgeführt, da entfaltete Bereiche eine höhere Wasserstoff-Deuterium-Austauschrate besitzen.

Für die HDX-MS Messung von PAPP5 alleine und mit Arachidonsäure wurden drei verschiedene Deuterium-Inkubationszeiten gewählt (15 s, 30 s und 60 s). Unter Verwendung der in 3.6.3 festgelegten Parameter konnten 194 Peptide gefunden werden, so dass sich eine Aminosäureabdeckung von 86 % ergab. Anschließend erfolgte eine manuelle Durchsicht der Daten und es wurden 125 Peptidfragmente ausgewertet, die eine Abdeckung von 80 % der Proteinsequenz mit einer Redundanz von 3,0 pro Aminosäure erzielten (siehe Abbildung 8.6).

Die Differenz der Deuterium-Austauschraten der Phosphatase PAPP5 mit und ohne Zusatz von Arachidonsäure sind in nachfolgender Abbildung auf die Struktur übertragen worden. Bereiche mit keiner oder einer geringen Deuteriumaufnahme

sind in weiß dargestellt, während Bereiche in denen die Zugabe von Arachidonsäure zu einer höheren Austauschrate führt in blau, und zu einer niedrigeren in rot koloriert sind (siehe Abbildung 4.32).

In der Oberflächendarstellung fallen zwei rote Bereiche auf (P160-A165 und H467-A474), die eine reduzierte Austauschrate bei Zugabe von AA besitzen. Die erste Region befindet sich am Ende des Linkers (P160-A165) und interessanterweise zeigt der Bereich davor (H154-V158) eine reduzierte Aufnahme. Auffällig ist weiterhin, dass nur D183 gelegen auf der $\alpha 8$ -Helix einen erhöhten Austausch bei Zugabe von AA aufweist. Die Wechselwirkungen, die D183 vorher zu S163 des Linkers und K188 der PP2A Domäne ausgebildet hat, scheinen durch die Zugabe gebrochen zu sein (siehe Abbildung 4.32B).

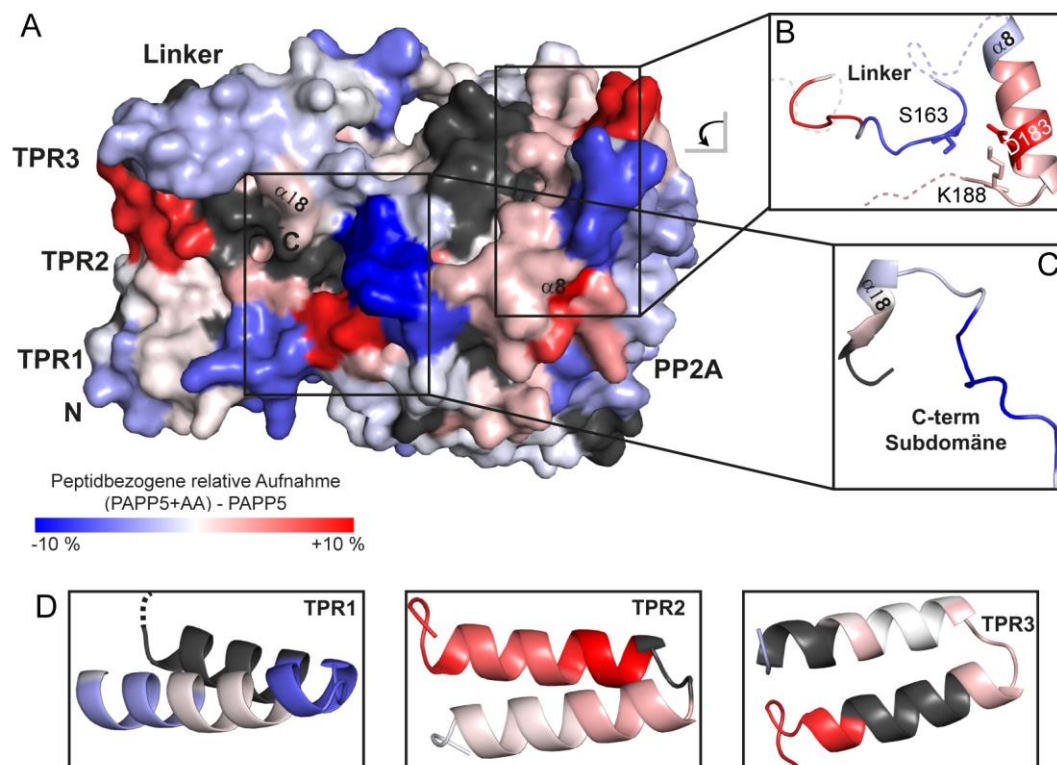


Abbildung 4.32: Die Differenz der Deuterium Aufnahme zwischen PAPP5 alleine und mit Zusatz von Arachidonsäure nach 15 s. Bereiche in rot zeigen eine erhöhte Aufnahme, während blaue Bereiche eine reduzierte Austauschrate aufweisen. (A) Oberflächendarstellung der Kristallstruktur. (B, C) Das Ende des Linkers und der Beginn des C-terminalen Motivs zeigen eine erhöhte Deuteriumaufnahme. (D) Darstellung der einzelnen TPR Repeats und ihre entsprechenden Austauschraten.

Der zweite Bereich mit einer reduzierten Austauschrate liegt am Beginn des C-terminalen Motivs (H467-A474). Die α -Helix der C-terminalen Motivs zeigt keine

signifikanten Änderungen durch Zugabe von AA auf. Die letzten drei Aminosäuren des C-Terminus, die sowohl Wechselwirkungen zur TPR und zur PP2A Domäne ausbilden, als auch die entsprechenden Interaktionspartner sind nicht definiert (siehe Abbildung 4.32C).

Im Gegensatz zu den erwarteten hohen Austauschraten der TPR *Repeats*, zeigten nur der TPR2 *Repeat* sowie der Beginn der TPR3 eine erhöhte Austauschrate. Der Übergang zwischen den beiden α -Helices des TPR1 *Repeats* weisen sogar einen reduzierten Austausch auf (siehe Abbildung 4.32D).

In nachfolgender Abbildung wird der Einfluss der AA auf die Wechselwirkungen zwischen TPR und PP2A Domäne näher betrachtet.

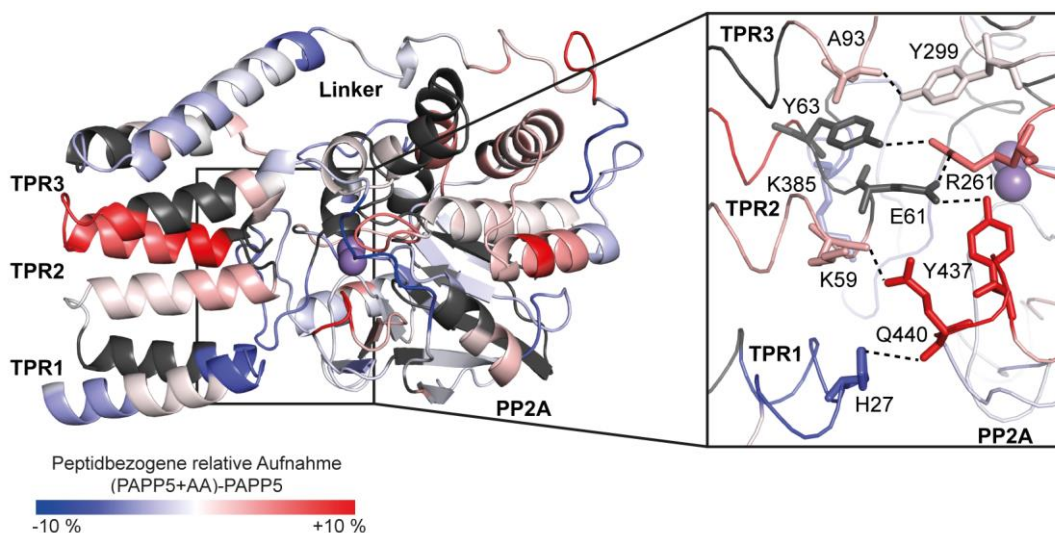


Abbildung 4.33: Die Differenz der Deuterium Aufnahme zwischen PAPP5 alleine und mit Zusatz von Arachidonsäure nach 15 s. Bereiche in rot zeigen eine erhöhte Aufnahme, während blaue Bereiche eine reduzierte Austauschrate aufweisen. Die Vergrößerung zeigt die an der Wechselwirkung zwischen TPR und PP2A Domäne beteiligten Reste.

Interessanterweise zeigt H27 des TPR1 *Repeats* einen reduzierten Austausch, während der Interaktionspartner Q440 und der auf der gleichen Schleife gelegene Rest Y437 einen deutlich erhöhten Austausch bei Zugabe von AA aufweisen. Weiterhin hat R261 ebenfalls einen erhöhten Austausch, so dass davon auszugehen ist, dass die Wechselwirkungen mit E61 als auch Y63 nicht mehr ausgebildet werden, auch wenn diese in der HDX-Analyse selber nicht definiert sind. Weiterhin zeigt K385 einen leicht reduzierten und K59 einen leicht erhöhten Austausch. Die weiteren Reste Y299 und A93 zeigen nur leichte, bis keine Veränderungen.

4.2.5 Studien zur Interaktion von PAPP5 mit Phytochromen

4.2.5.1 Interaktion von PAPP5 mit der N-terminalen Erweiterung

Um die Interaktion zwischen PAPP5 und der NTE zu charakterisieren, wurde der spektroskopische und thermophoretische Einfluss der Phosphatase auf die Phytochrom B Varianten S84D und S86D untersucht, die eine Phosphorylierung der Phytochrome imitieren.

Das Plasmid, das die Gensequenz von Phytochrom B (1-651) enthält, wurde von *Matias Zurbriggen* zur Verfügung gestellt. Es liegt im Vektor pROLar.A122 vor und wurde zunächst in den Vektor pCDF-Duet-1 kloniert; anschließend wurden die Mutanten generiert. Für die *in vivo* Produktion von holo PhyB wurde das Plasmid zusammen mit dem Plasmid p171 in *E. coli* BL21 PRO Zellen transformiert. Die heterologe Produktion und Aufreinigung erfolgte analog zum Wildtyp (siehe Abschnitt 4.1.1). Die Mutanten lagen wie der Wildtyp ebenfalls als monomere Spezies vor, die jedoch auf Grund der länglichen Form bei einer höheren apparenten Masse von der Gelfiltrationssäule eluierten (Daten nicht gezeigt). Die weitere Charakterisierung der Mutanten erfolgte *via* UV/Vis-Spektroskopie (siehe Abbildung 4.34).

Ein Vergleich der UV/Vis-Spektren mit dem Wildtyp ergibt eine bathochrome Verschiebung der Maxima, welche in der P_{fr} Form am deutlichsten wird. Für die S84D Mutante findet eine Verschiebung um 8 nm und für die S86D Mutante um 5 nm statt. Beide Mutanten, sowohl S84D als auch S86D besitzen eine geringere Halbwertszeit ($t_{1/2} = 98$ min für S84D und $t_{1/2} = 40$ min für S86D) im Vergleich zum Wildtyp ($t_{1/2} = 270$ min). Hierbei zeigt die Mutation an der Position S86 eine stark verringerte Dunkelkonversionsrate und liegt eher im Bereich der Δ NTE Variante ($t_{1/2} = 58$ min).

Die Zugabe von PAPP5 mit Arachidonsäure zeigt keinen Einfluss auf die UV/Vis-Spektren. Jedoch kommt es zu einer geringen Verlangsamung der Dunkelkonversion der Mutanten, was sich in der längeren Halbwertszeit ($t_{1/2} = 105$ min für S84D und $t_{1/2} = 49$ min für S86D) widerspiegelt.

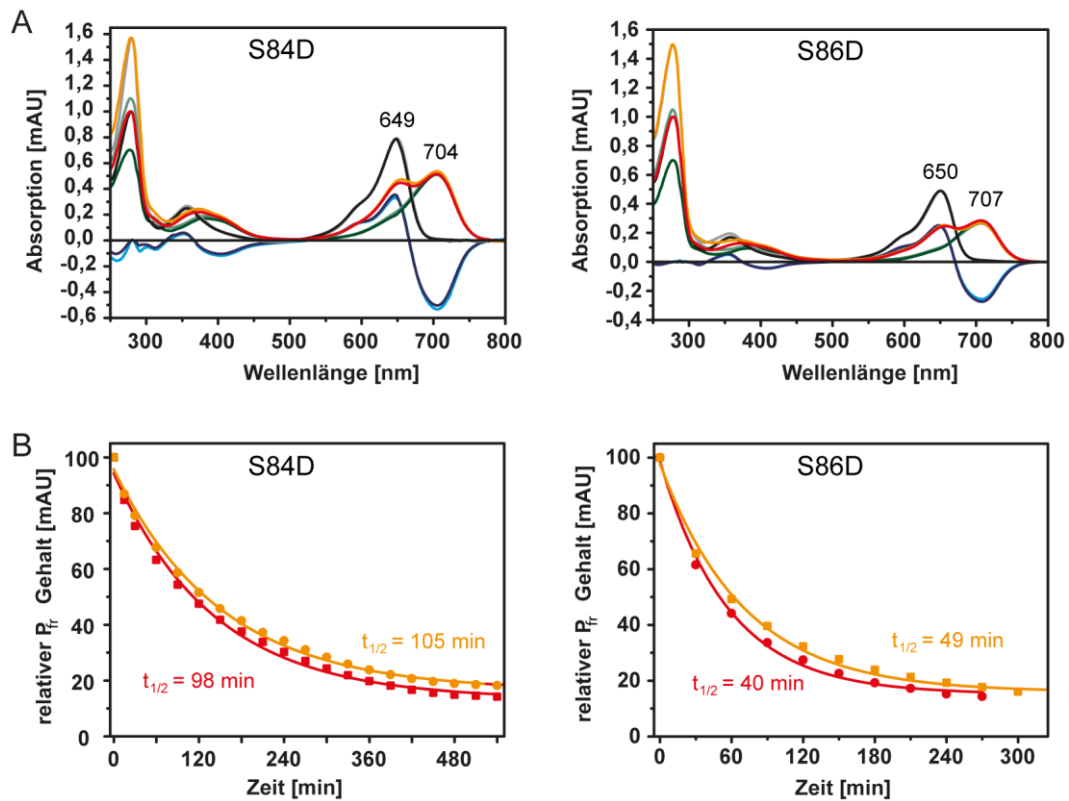


Abbildung 4.34: UV/Vis-Spektren und Dunkelkonversion ($P_{fr} \rightarrow P_r$) der Varianten PhyB S84D und S86D sowie der Einfluss durch die Zugabe von PAPP5 und Arachidonsäure (AA). (A) Das Spektrum des P_r Zustandes, des P_{fr} Zustandes und des berechneten P_{fr} Zustandes sind in schwarz, rot und grün dargestellt sowie das Differenzspektrum in blau. Die entsprechenden Spektren mit PAPP5 und AA sind in grau, orange, hellgrün und türkis dargestellt. (B) Die Dunkelkonversion der Mutanten (rot) und der Einfluss durch Zugabe von PAPP5 und AA (orange) und die daraus berechneten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$).

Einen Nachweis der Interaktion zwischen den Phytochrom B Mutanten und PAPP5 konnte durch MST-Messungen gezeigt werden. Hierfür wurde PAPP5 mit einem Fluoreszenzlabel markiert, mit Arachidonsäure 15 Minuten präinkubiert und gegen einen Konzentrationsgradienten des PhyB WT oder der Mutanten vermessen. Die Assoziation der Proteine bewirkt eine Änderung der Bewegung entgegen des generierten Temperaturgradienten. Durch einen im Instrument eingebauten grünen Laser (Anregung: 515-525 nm, Emission: 650-685 nm), wurden die Phytochrom Varianten konstant in ihrer aktiven Form gehalten. Die Konzentration, aufgetragen gegen die normierten Fluoreszenzen (F_{norm}), ergeben die Bindungskonstanten (siehe Abbildung 4.35).

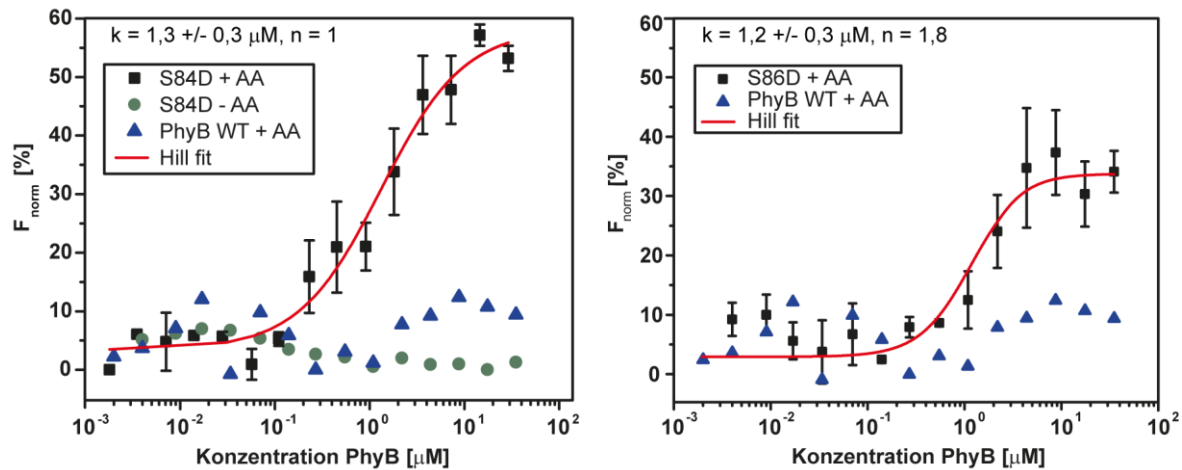


Abbildung 4.35: Thermophoretische Messung der Interaktion der Phosphatase PAPP5 mit PhyB S84D und S86D. Als Kontrollreaktionen wurden Messungen unter gleichen Bedingungen mit dem Wildtyp sowie ohne Zugabe von Arachidonsäure durchgeführt. Die Konzentrationen der PhyB Varianten wurden gegen die genormten Fluoreszenzen aufgetragen und daraus die Bindungskonstanten (k) sowie die Hill-Koeffizienten (n) berechnet.

Die Bindungskonstanten, die unter Verwendung der Hill-Gleichung berechnet wurden, liegen bei $1,3 \mu\text{M}$ für S84D und $1,2 \mu\text{M}$ für S86D. Des Weiteren liegen die Hill-Koeffizienten bei $1,0$ und $1,8$. Allerdings ist hier zu beachten, dass für S84D keine Sättigung der Bindung erreicht werden konnte und deswegen dieser Wert lediglich als Näherung zu betrachten ist. Um eine unspezifische Bindung an oberflächen-exponierte Aspartate auszuschließen, wurde die Messung unter Verwendung der gleichen Parameter mit dem Wildtyp durchgeführt. Die erhaltenen Signale liegen im Bereich des Signal-zu-Rauschverhältnisses. Eine unspezifische Bindung kann auf Grund dessen ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde die Notwendigkeit der Aktivierung der Phosphatase PAPP5 durch Arachidonsäure untersucht. Die erhaltene Grundlinie zeigt, dass die Bindungsstelle von PAPP5 erst für S84D und S86D erreichbar ist, wenn eine vorherige Inkubation mit Arachidonsäure erfolgte.

4.2.5.2 Einfluss der Histidinkinase verwandten Domäne auf PAPP5

Die Interaktion der Domäne mit der TPR Domäne von PAPP5 wurde durch *pull-down* Versuche nachgewiesen⁷⁴. Es sollte nun untersucht werden, ob die HKRD in der Lage ist, die Phosphatase zu aktivieren. Die Produktion und Reinigung der Histidinkinase verwandten Domäne (HKRD) aus *AtPhyA* (973-1122) erfolgt wie bereits zuvor beschrieben²⁶². Hierfür wurde der Einfluss der HKRD auf die Phosphatase mittels

Thermofluor-Assay (siehe Abbildung 4.36A) und die pNPP-Assay (siehe Abbildung 4.36B) untersucht.

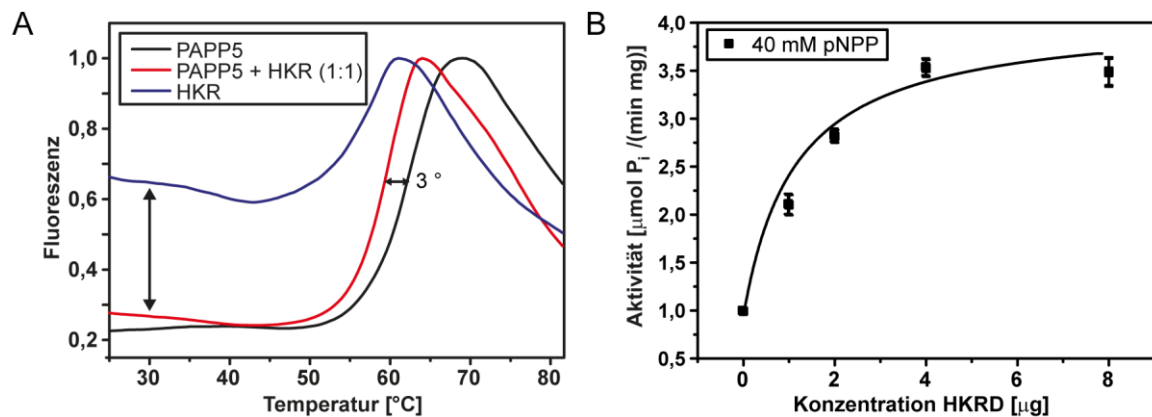


Abbildung 4.36: Interaktion der Phosphatase PAPP5 und der Histidinkinase verwandten Domäne (HKRD) des Phytochrom A. (A) Thermofluor-Assays des Interaktionskomplexes und der Proteine alleine. (B) Einfluss verschiedener Konzentrationen der HKRD auf die Phosphataseaktivität von PAPP5 in Anwesenheit von 40 mM pNPP.

Bei den durchgeführten Thermofluor-Assays ist keine signifikante Änderung der Schmelztemperatur festzustellen, jedoch könnte die starke Fluoreszenzminderung auf Seiten der HKR auf eine Komplexbildung hindeuten. Die exponierten hydrophoben Reste der HKR Domäne, die eine Anlagerung des hydrophoben Farbstoffs erlauben, könnten im Komplex nicht mehr zugänglich sind und so die starke Fluoreszenzminderung erklären.

Durch Berechnen der Michaelis-Menten-Kinetiken für variierende HKR Konzentration ergab sich beim pNPP-Assay ein V_{\max} -Wert von $5,0 \pm 0,6 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt $/(\text{min} \cdot \text{mg})$. Die Zugabe von der HKR bewirkte eine 1,5-fache Steigerung gegenüber der Aktivität des Wildtyps ($V_{\max} = 3,6 \pm 0,7 \mu\text{mol P}_i$ freigesetzt $/(\text{min} \cdot \text{mg})$).

4.3 Erzeugung von Hybrid-Phytochromen

Die HDX-MS Analysen des photosensorischen Moduls von AtPhyB haben signifikante dynamische und somit strukturelle Unterschiede während der Photokonversion innerhalb der PHY Domäne lokalisiert. Weiterhin wurde die Zungenregion der PHY Domäne als potentielle Interaktionsfläche für die PAPP2C Phosphatase identifiziert²⁵⁴. Um zu überprüfen, ob die PHY Domäne innerhalb der kanonischen Phytochrome getauscht werden kann und in wie weit die sie die spektroskopischen

Eigenschaften beeinflusst wurden Hybrid-Systeme entwickelt. Weiterhin sollte so der Zugang zu den pflanzlichen PAS-PAS Domänen des C-terminalen Moduls geschaffen werden, die bislang nicht heterolog in *E. coli* produziert werden konnten.

4.3.1 Aufbau des Hybrid-Systems

Synechocystis sp. PCC 6803 Cph1(1-2) wird nicht nur mit hohen Ausbeuten produziert, sondern wurde bereits erfolgreich kristallisiert und die Struktur gelöst¹⁷. In einem Sequenzalignment stellte sich heraus, dass die PAS und GAF Domäne von SynCph1 zu 32 % und 35 % mit den ersten beiden Domänen aus AtPhyA und AtPhyB übereinstimmen, während die PHY Domäne aus Cph1 eine Übereinstimmung von nur 27 % zu PhyA und 26 % zu PhyB aufweist. Um sich die Vorzüge von Cph1 zu Nutze zu machen, wurden die PHY Domäne aus PhyA(403-593) und PhyB(434-624) an die ersten zwei Domänen aus Cph1(1-318) fusioniert. Um nähere Informationen über wichtige Aminosäuren in der Zungenregion erhalten zu können, wurden in den dafür kodierenden Gensequenzen, Restriktionsschnittstellen direkt vor und hinter der Zungenregion eingeführt, um einen schnellen Austausch dieser Region mit denen anderer Phytochrome zu ermöglichen. Ein weiteres Ziel bestand darin, ein Hybrid zu generieren, welches ebenfalls die PAS-PAS Domänen aus PhyA und PhyB umfasst.

Sowohl die PAS GAF Domäne aus Cph1, als auch die PHY Domänen aus PhyA und PhyB wurden als synthetische Gene bestellt. Anschließend wurden sie in den Vektor pCDF-Duet-1 kloniert. Die Varianten, welche auch die PAS-PAS Domänen der Phytochrome A oder B beinhalten, wurden basierend auf dem Cph1-PhyB-Hybrid oder dem Cph1-PhyA-Hybrid aufgebaut. Die zusätzlichen PAS-PAS Domänen wurden *via* PCR eingebracht in die Plasmide eingebracht. Die *in vivo* Produktion der Hybride zusammen mit dem Plasmid p171 in *E. coli* BL21 PRO Zellen transformiert. Die heterologe Produktion wurde nach Induktion mit 1 mM IPTG in TB-Medium bei 18 ° über Nacht durchgeführt. Nach dem Aufschluss der Zellen folgten eine Ni-NTA-Affinitätschromatografie sowie eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt. Tabelle 4.3 zeigt die produzierten Hybride deren Sequenzen im Kapitel 8.7 zu finden sind.

Tabelle 4.3: Übersicht über die generierten und produzierten Phytochrom-Hybride.

Name	Domänen	Löslichkeit	Ausbeute
Cph1-PhyA-Hybrid	<i>SynCph1</i> :PAS GAF und <i>AtPhyA</i> : PHY	unlöslich	-
Cph1-PhyB-Hybrid	<i>SynCph1</i> :PAS GAF und <i>AtPhyB</i> : PHY	löslich	7,5 mg/L Kultur
Cph1-PhyB-PhyB-Hybrid	<i>SynCph1</i> :PAS GAF und <i>AtPhyB</i> : PHY, PAS-PAS	unlöslich	-
Cph1-PhyB-PhyA-Hybrid	<i>SynCph1</i> :PAS GAF, <i>AtPhyB</i> : PHY, <i>AtPhyA</i> : PAS-PAS	löslich	3,5 mg/L Kultur

Das Hybrid-System bestehend aus Cph1 und PhyA wurde zwar produziert, jedoch war nur eine verkürzte Variante löslich. Eine nach Ni-NTA-Affinitätschromatografie und eine Größenausschlusschromatografie durchgeführte massenspektrometrische Bestimmung der exakten Masse unter denaturierenden Bedingungen ergab, dass die Variante nach den ersten 23 Aminosäuren der PHY-Domäne geschnitten wurde (siehe Abbildung 4.37).

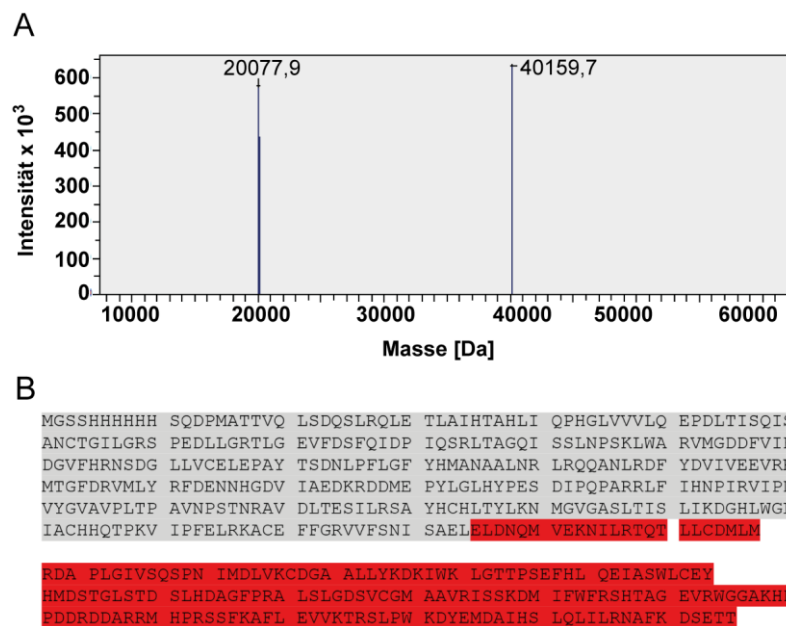


Abbildung 4.37: Massenspektrometrische Analyse des Hybrids *SynCph1*(1-318)*AtPhyA*(403-593). (A) Die Bestimmung der exakten Masse unter denaturierenden Bedingungen ergab eine Größe des Hybrids von 40159,7 Da. (B) Der Absatz zeigt die vermutliche Sequenz des vermessenen Hybrids an, dass lediglich die ersten 23 Aminosäuren der PHY Domäne umfasst.

Das Cph1-PhyB-Hybrid und das Cph1-PhyB-PhyA-Hybrid konnten hingegen in der gesamten Länge löslich produziert und gereinigt werden. Exemplarisch ist die Größenausschlusschromatografie mit einer Superdex200 26/60 Säule des Cph1-PhyB-Hybrids gezeigt (siehe Abbildung 4.38). Die Größenausschlusschromatografie

und die entsprechende SDS-PAGE des Cph1-PhyB-PhyA-Hybrid befinden sich im Anhang (siehe Kapitel 8.3).

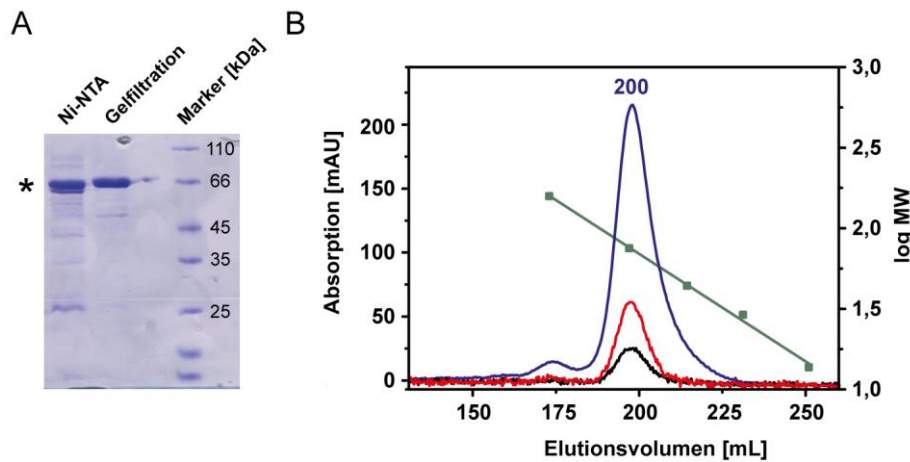


Abbildung 4.38: Reinigung des *in vivo* assemblierten Cph1-PhyB-Hybrids. (A) Die SDS-PAGE der Reinigung zeigt, dass das Phytochrom bei einer Masse von circa 66 kDa migriert (markiert durch einen Stern), welches etwa der berechneten Masse von 58 kDa entspricht. Als Referenz für die SDS-Page wurde der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* von *Fermentas* eingesetzt. (B) Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen Peak bei 200 mL. Die Absorption wurde bei 280 nm (schwarz), 650 nm (rot) und 700 nm (blau) gemessen. Durch eine Kalibrationsgerade mit Standardproteinen (grün) ergibt sich eine apparente Masse von circa 72 kDa.

Das Protein eluierte bei 200 mL von der Säule und zeigte ein Signal bei 280 nm, 650 nm und 700 nm. Laut SDS-PAGE besitzt es eine Masse von circa 66 kDa. Durch die Kalibrationsgleichung ergab sich eine apparente Masse von 72 kDa.

Für das Cph1-PhyB-PhyA-Hybrid konnte bei 181 mL ein Signal bei 280 nm 650 nm und 700 nm detektiert werden, das laut SDS-PAGE (circa 80 kDa) dem Phytochrom-Hybrid zuzuordnen ist. Durch die Kalibrationsgleichung ergibt sich eine Größe von 102 kDa. Die Differenz zur berechneten Größe des Monomers von 84 kDa kann durch die nicht-globuläre Form des Phytochroms erklärt werden (siehe Kapitel 4.1.1). Die monomere Spezies weist eine ausgeprägte Schulter bei höheren molekularen Massen auf, die auf ein Dimer hinweist. Da das Dimer hier lediglich ein Nebenprodukt darstellt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass es unter diesen Bedingungen nicht stabil ist oder dass die alleinige Anwesenheit der C-terminalen PAS Domänen nicht ausreichend für die Dimerisierung der Phytochrome zu sein scheint.

Von beiden Hybriden wurden mit einer Konzentration von 7,5 mg/mL und 15 mg/mL Kristallisationsscreenings durchgeführt, doch ergab sich bis zum jetzigen Zeitpunkt noch kein Kristallwachstum.

4.3.1.1 Spektroskopische Analyse

Das Schaltverhalten des Cph1-PhyB-Hybrids, sowie des Cph1-PhyB-PhyA-Hybrids wurde, nach Bestrahlung mit rotem oder dunkelrotem Licht, *via* UV/Vis-Messungen untersucht (siehe Abbildung 4.39).

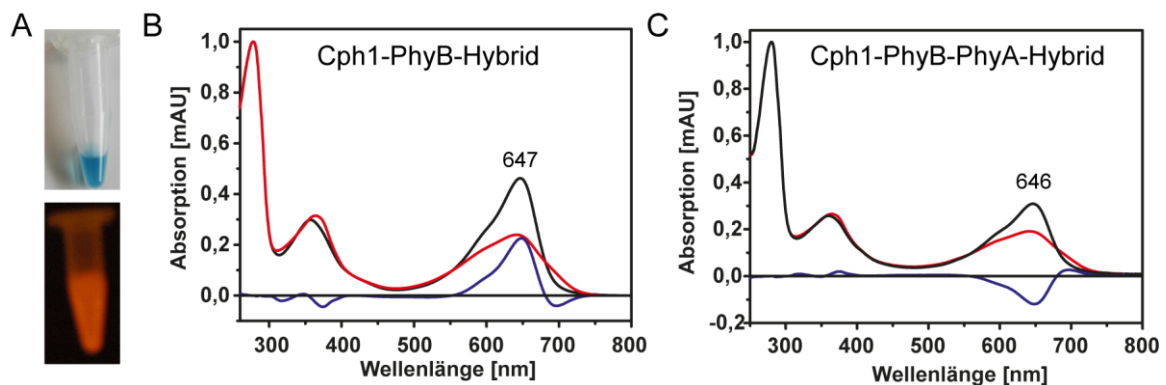


Abbildung 4.39: Absorptionsspektren nach Bestrahlung mit rotem oder dunkelrotem Licht sowie die Differenzspektren des Cph1-PhyB-Hybrids (B) und des Cph1-PhyB-PhyA-Hybrids (C). (A) Unter Weißlicht betrachtet, weist das Cph1-PhyB-Hybrid eine bläuliche Färbung auf (oben) und unter UV-Licht fluoresziert es (unten). (B, C) Die Spektren nach Bestrahlung mit dunkelrotem oder rotem Licht sind in schwarz und rot dargestellt und das Differenzspektrum in blau.

Aus dem Spektrum ist ersichtlich, dass beide Hybride zwar reversibel in die P_r -Form schalten können, doch nicht in der Lage sind vollständig zur P_{fr} -Form zu konvertieren und in einer nicht- P_r Form verbleiben. Nach Bestrahlung mit UV-Licht fluoreszierten beide Hybride. Sowohl das Absorptionsmaximum für das Cph1-PhyB-Hybrid (647 nm) als auch das vom Cph1-PhyB-PhyA-Hybrid (646 nm) weisen eine bathochrome Verschiebung auf, gegenüber Cph1 Δ 2 (660 nm)²⁶³ und AtPhyB(1-651) (652 nm). Eine Verschiebung des Absorptionsmaximums um 1 nm des Cph1-PhyB-PhyA-Hybrids im Vergleich zum Cph1-PhyB-Hybrid zeigt einen geringen Einfluss der PAS Domänen auf den Chromophor.

Weiterhin wurden ein Nah-UV/Vis-CD-Spektrum und eine Schmelzkurve des Cph1-PhyB-Hybrids aufgenommen (siehe Abbildung 4.40).

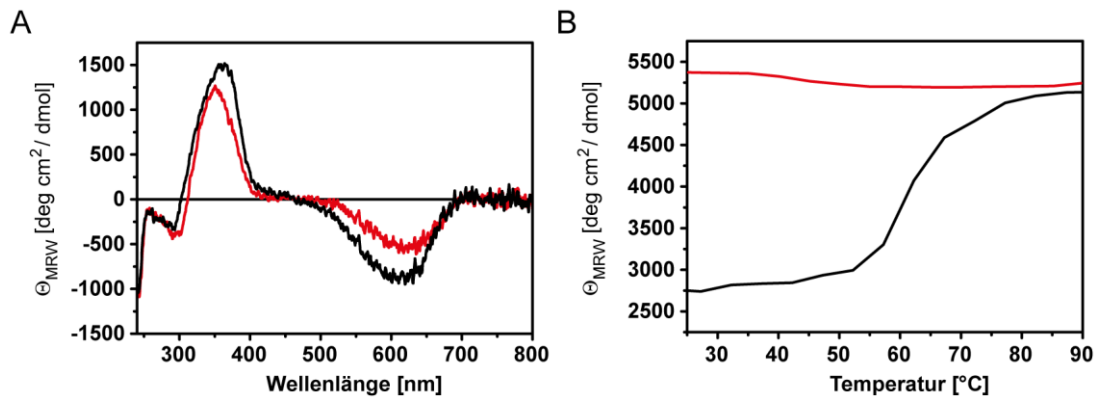


Abbildung 4.40: Nah-UV/Vis-CD-Spektrum und Schmelzkurve des Hybrids *SynCph1(1-318)AtPhyB(434-624)*. (A) Das Spektrum des Hybrids nach einer Bestrahlung mit dunkelrotem (schwarze Kurve) oder rotem Licht (rote Kurve). (B) Die Schmelzkurve zeigt eine kooperative Entfaltung, jedoch keine Rückfaltung.

Das Nah-UV/Vis-CD-Spektrum weist wie auch schon das UV/Vis-Spektrum nur die Anwesenheit der P_r Konformation nach. Die Bestrahlung mit rotem Licht bewirkt strukturelle Veränderung des Chromophors, jedoch wird die P_{fr} Form nicht erhalten. Ein Maximum im Bereich von 710 nm, das auf die Anwesenheit der P_{fr} Form hindeuten würde, fehlt.

Das Spektrum zeigt, dass eine Temperaturerhöhung auf 90 °C zu einer kooperativen Entfaltung führt, jedoch keine Rückfaltung bei einer Verminderung der Temperatur. Die Schmelztemperatur wurde mit dem Programm *Spectra Analysis* ermittelt, welches den Wendepunkt der Entfaltungskurve als Grundlage der Berechnung verwendet. Das Protein besitzt demnach einen Schmelzpunkt von 67 °C. Die kooperative Entfaltung und die relative hohe Schmelztemperatur sprechen dafür, dass das Protein gefaltet vorliegt.

4.3.2 Das Hybrid-System – Ein einfacher Weg um Interaktionspartner zu untersuchen

Um die Funktionalität des Moduls zu untersuchen wurden Interaktionsstudien mit dem bekannten Bindungspartner PAPP2c durchgeführt. Die Phosphatase bindet selektiv an die PHY Domäne der aktivierten Phytochrome⁷⁵. Es sollte überprüft werden, ob trotz nicht vollständiger Photokonversion das Hybrid trotzdem in der Lage ist PAPP2c lichtabhängig zu binden.

4.3.2.1 Etablierung der Produktion und Reinigung von PAPP2c

Für die rekombinante Expression von PAPP2c wurde die Gensequenz als synthetisches Gen bestellt und in den pET-28a(+) Vektor ligiert. Für die Produktion wurde der Vektor in *E. coli* BL21(DE3) Gold Zellen transformiert. Die heterologe Produktion wurde mit 1 mM IPTG induziert und in TB-Medium bei 18 °C über Nacht durchgeführt. Nach dem Aufschluss erfolgte ein erster Reinigungsschritt mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie und abschließend eine Größenausschlusschromatografie mit einer Superdex200 26/60 Säule (siehe Abbildung 4.41).

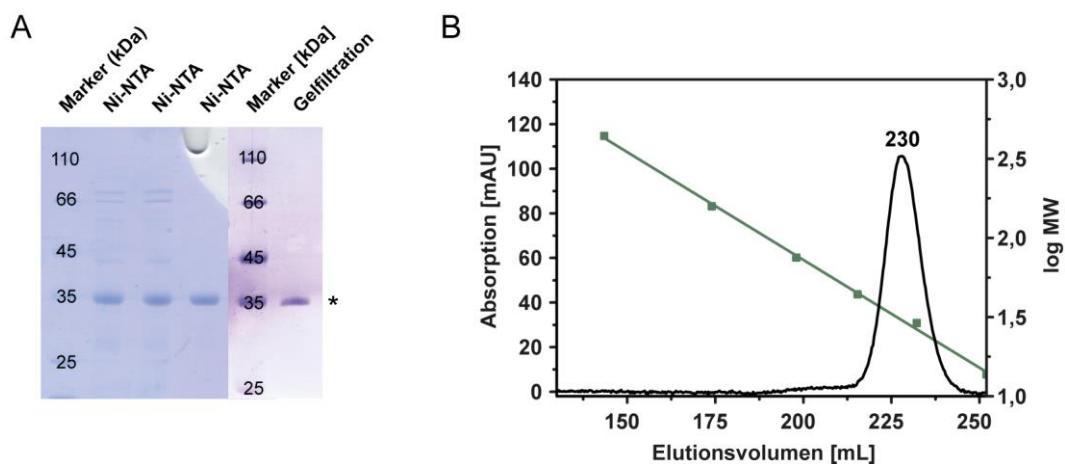


Abbildung 4.41: Reinigung der Phosphatase PAPP2c. (A) Die SDS-PAGE der Reinigung zeigt, dass PAPP2c bei einer Masse von circa 35 kDa migriert (markiert durch einen Stern), was etwa der berechneten Masse von 34 kDa entspricht. Als Referenz für die SDS-Page wurde der *Unstained Protein Molecular Weight Marker* von *Fermentas* eingesetzt. (B) Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen Peak bei 185 mL. Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Durch eine Kalibrationsgerade mit Standardproteinen (grün) ergibt sich eine apparente Masse von circa 36 kDa.

Durch die Kalibrationsgleichung ergibt sich eine Größe von 36 kDa, welches der theoretisch berechneten Masse von 34 kDa entspricht. Es zeigte sich, dass das Protein in einer rein monomeren Form von der Säule eluierte.

Probleme ergaben sich durch eine relativ hohe Aggregationstendenz der Phosphatase, da sie nur wenige Stunden stabil in Lösung gehalten werden konnte. Eine Sekundärstrukturvorhersage mit dem Programm RONN²⁶⁴ ergab, dass die ersten 33 Aminosäuren wahrscheinlich ungefaltet vorliegen, so dass eine verkürzte Variante (PAPP2c(36-472)) hergestellt wurde, was allerdings zu keiner Verbesserung führte. Der Zusatz von Detergenzien sowie ein Wechsel des Puffersystems führten ebenfalls

zu keiner höheren Stabilität des Proteins. Die Fusionierung mit einem ZZ-Tag ermöglichte schließlich eine nähere Analyse der Phosphatase²⁵⁴.

4.3.2.1 Interaktion von PAPP2c und des Hybrid-Systems

Um eine mögliche lichtabhängige Interaktion des Hybrids und der Phosphatase nachzuweisen wurden *pull-down*-Experimente unter Rot- und Dunkelrotlicht durchgeführt. Hierfür wurde zunächst der Hexa-Histidin-Tag von PAPP2c mittels Thrombin-Verdau abgespalten und anschließend die Phosphatase und das Hybrid einmal im Rotlicht und einmal im Dunkelrotlicht zusammen inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen auf Ni-NTA-Säulen aufgetragen und nach gründlichem Waschen mit der Pufferlösung der mögliche Komplex mittels eines Imidazolgradienten eluierte. Proben der Elutionsfraktionen wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und dieses zunächst mit einer Zinkacetat-Lösung und anschließend mit Coomassie angefärbt (siehe Abbildung 4.42).

Interessanterweise zeigt sich, dass trotz der unvollständigen Photokonversion des Hybrid-Systems eine lichtabhängige Interaktion mit PAPP2c stattfindet, da nur bei der Bestrahlung mit Rotlicht PAPP2c durch das Hybrid gebunden werden konnte. Weiterhin konnte so gezeigt werden, dass die pflanzliche PHY Domäne ausreichend für die Bindung der PAPP2c Phosphatase ist.

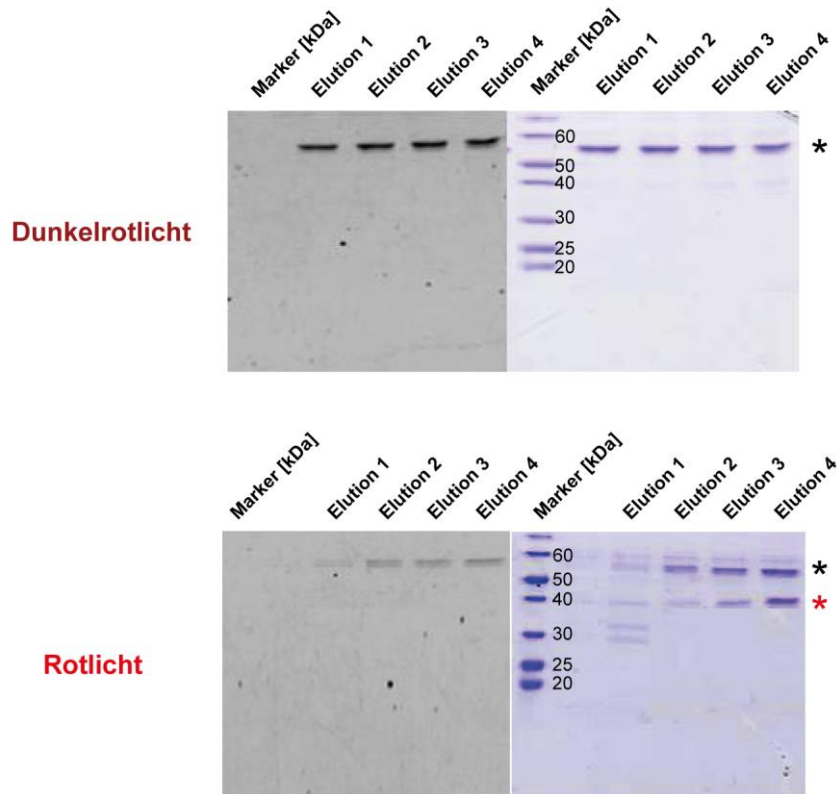


Abbildung 4.42: SDS-Page des Pull-down-Assays nach Zink-Färbung (links) und Coomassie-Färbung (rechts). (A) Bei der Bestrahlung mit dunkelrotem Licht ist bei beiden Färbungsmethoden nur eine Bande bei circa 60 kDa zu erkennen (markiert durch einen schwarzen Stern), die dem Hybrid entspricht, welches eine theoretisch berechnete Größe von 59 kDa besitzt. (B) Bei der Bestrahlung mit rotem Licht ist bei der Zinkfärbung eine Bande bei circa 60 kDa zu erkennen, die dem Hybrid zugeordnet werden kann. Nach der Inkubation des Geles mit Coomassie wird eine zweite Bande bei circa 40 kDa angefärbt (markiert durch einen roten Stern), die PAPP2c entspricht, da dieses eine theoretisch berechnete Größe von 35 kDa besitzt. Als Referenz für die SDS-Page wurde der *Page Ruler Unstained Protein Ladder* von *Fermentas* eingesetzt.

5 Diskussion

Im Jahre 2014 wurde erstmals eine Struktur pflanzlicher Phytochrome aufgeklärt. Die Auflösung der *AtPhyB* Struktur betrug jedoch lediglich 3,5 Å und die Struktur bildete nur den P_r Grundzustand ab. Weiterhin fehlte ihr die als flexibel und unstrukturiert beschriebene N-terminale Erweiterung^{12,253}. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Gesamtbild stark erweitert werden indem diejenigen Regionen in Phytochrom B identifiziert werden konnten, die während der Photokonversion eine strukturelle Änderung vollziehen. Hierfür wurden Änderungen der Wasserstoff-Deuterium-Austauschraten der $P_r \rightarrow P_{fr}$ Übergang mittels Massenspektrometrie verfolgt (HDX-MS), womit signifikante dynamische und somit strukturelle Unterschiede lokalisiert werden konnten. Besonders aufschlussreich war die Analyse der N-terminalen Erweiterung, die entgegen der Erwartung sowohl moderate als auch hohe Austauschraten zeigte. Mittels Raman-Spektroskopie konnte weiterhin ein direkter Einfluss der NTE auf den Chromophor nachgewiesen werden. Auch konnte eine Interaktion des NTE von PhyB mit der Phytochrom assoziierten Phosphatase PAPP5 durch MST Messungen gezeigt werden.

Die Strukturlösung von PAPP5 identifizierte die an der Autoinhibition beteiligten Aminosäuren der TPR Domäne und des C-terminalen inhibierenden Motivs. CD-spektroskopische Messungen zeigten, dass durch die Inkubation mit Arachidonsäure der relative α -helikale Anteil der Struktur sinkt. Weiterhin war es möglich durch HDX-MS Untersuchungen Bereiche in der TPR Domäne zu identifizieren, die eine erhöhte Austauschrate nach Inkubation mit Arachidonsäure aufwiesen. Hingegen zeigten Regionen am Ende des Linkers, welcher die TPR und die PP2A Domäne verbindet, beziehungsweise am Anfang des C-terminalen inhibierenden Motivs eine stark reduzierte Austauschrate.

5.1 Der Typ des Bilinchromophors bestimmt die spektroskopischen Eigenschaften

Die Bilinchromophore ermöglicht den verschiedenen Phytochromen ein breites Spektrum des sichtbaren Licht abzudecken. Ein vergleichbar umfassendes Spektrum weisen nur Retinal-abhängige Rhodopsine aus Tieren und, im Besonderen, aus Garne-

len auf^{265,266}. Bei Phytochromen, die BV als Chromophor gebunden haben liegt der 15E-Zustand im Bereich von 750 nm (mit Ausnahme von *RpBphP3*, das wahrscheinlich auf die Deformation des D-Rings zurückzuführen ist²⁶⁷) und weist somit die größte Rotverschiebung auf. Verantwortlich hierfür ist das im Vergleich zu PΦB um eine Doppelbindung verlängerte konjugierte π-Systeme.

Die PCB-bindenden Phytochrome der Gruppe I zeigen verglichen mit den pflanzlichen Phytochromen, welche PΦB binden, eine Blauverschiebung, die in den Phytochromen der Gruppe II noch ausgeprägter ist^{268,269}. Der Unterschied zwischen den PCB-bindenden Phytochromen der Gruppe I und II ergibt sich durch die fehlende PAS Domäne in der Gruppe II. Diese bildet eine Helix aus, welche den Chromophor weiter gegen Solvenzexposition schützt¹⁴. Das Beispiel zeigt, dass neben dem verwendeten Chromophor auch die Proteinumgebung einen erheblichen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften hat.

Weiterhin ist es möglich nicht-native Chromophore in Phytochrome einzubauen. So konnte in dieser Arbeit *AtPhyB* gebunden an PCB hergestellt werden. Hierbei weisen sowohl das PSM als auch die ΔNTE Variante eine Blauverschiebung gegenüber dem Wildtyp mit PΦB²¹ als Kofaktor auf. Die Absorptionsmaxima von PhyB mit PCB entsprechen denen von Cph1, das ebenfalls PCB als Chromophor gebunden hat. Die Verschiebung ist durch das verkürzte konjugierte π-System zu erklären, da PΦB im Gegensatz zu PCB am D-Ring über eine zusätzliche Doppelbindung verfügt. Des Weiteren verläuft die Dunkelkonversion im Allgemeinen langsamer als bei den Varianten mit PΦB (siehe Tabelle 5.1).

Bei den Mutanten S84D und S86D, die den phosphorylierten Zustand nachahmen, sind die Absorptionsmaxima bathochrom verschoben im Vergleich zum Wildtyp und entsprechen in der P_r Form der ΔNTE Variante. Die P_{fr} Form unterscheidet sich stärker zwischen den Mutationen, so weist S84D eine bathochrome Verschiebung um 8 nm sowie S86D um nur 4 nm auf. Dies deutet daraufhin, dass der phosphorylierte NTE nicht mehr in der Lage ist, den Chromophor vollständig vor einer zusätzlichen Solvenzexposition zu schützen.

Interessanterweise ist der Abstand zwischen dem Absorptionsmaximum von P_r und P_{fr} bei PhyB mit PCB größer als bei Cph1 und entspricht in der Größenordnung eher

PhyB mit PΦB als Chromophor. Weiterhin zeigt sich, dass bei der Verwendung von Phycocyanobilin die ΔNTE Variante im Vergleich zum Wildtyp eine Verschiebung des Maximums um 4 nm aufweist, während die vergleichbaren Varianten mit Phytochromobilin sich um nur 1 nm unterscheiden.

Tabelle 5.1: Absorptionsmaxima des Wildtyps von *AtPhyB*, *SynCph1* und *SynCph2*. Die Maxima von Phytochrom B wurde sowohl mit als auch ohne N-terminale Verlängerung sowie mit Phycocyanobilin oder Phytochromobilin als Kofaktor angegeben.

	Absorptionsmaxima P_r/P_{fr}	Dunkelkonversion $t_{1/2}$
<i>AtPhyB</i> (1-651) mit PCB	652 nm/712 nm	270 min ²⁷⁰
<i>AtPhyB</i> (1-624) mit PΦB ²¹	664 nm/725 nm	82 min
<i>AtPhyB</i> (90-651) mit PCB ²⁵⁴	648 nm/702 nm	58 min ²⁷⁰
<i>AtPhyB</i> (90-624) mit PΦB ²¹	663 nm/718 nm	4,3 min
<i>AtPhyB</i> (1-651) S84D mit PCB	649 nm/704 nm	98 min
<i>AtPhyB</i> (1-651) S86D mit PCB	650 nm/708 nm	40 min
<i>SynCph1</i> (1-514) mit PCB ⁴⁶	656 nm/704 nm	Keine Dunkelreversion ²⁴
<i>SynCph1</i> (1-318) <i>AtPhyB</i> (434-624) mit PCB	647 nm/-	-
<i>SynCph1</i> (1-318) <i>AtPhyB</i> (434-624) <i>AtPhyA</i> (434-624) mit PCB	646 nm/-	-

Betrachtet man die Oberflächenstruktur von ΔNTE *AtPhyB* und *SynCph1* fällt auf, dass der A-Ring in PhyB exponiert gegenüber der Solvenz vorliegt, während er in Cph1 vollständig von der N-terminalen Helix bedeckt wird (siehe Abbildung 5.1).

Da keine Unterschiede zwischen den Varianten am A-Ring durch die Raman Messungen beobachtet werden konnten, ist eine direkte Wechselwirkung zwischen dem NTE und dem A-Ring unwahrscheinlich. Die spektroskopische Untersuchung mittels Raman zeigte, dass hauptsächlich die Schwingungen der C-D Methinbrücke durch das Entfernen der NTE verändert werden und dieser Effekt stärker in der P_{fr} Form ausgeprägt ist (siehe Kapitel 4.1.2).

Eine Solvenzexposition des D-Rings liegt jedoch nicht vor, so dass dies nicht der Grund für die Unterschiede des Wildtyps und der ΔNTE Variante im Bereich des C-D-Methinbrücke darstellt. Eine Wechselwirkung des D-Rings erfolgt mit der physiologisch sehr interessanten Aminosäure Y276, die durch eine Mutation zu Histidin eine dauerhafte Aktivierung des Phytochroms bewirkt⁶¹. Der Bereich um diese Aminosäure zeigte in den HDX-MS-Messungen im P_{fr} Zustand des Wildtyps eine stark

reduzierte Austauschrate, die jedoch nicht in der P_{fr} Form der ΔNTE Variante gefunden werden konnte. Die Interaktion der NTE mit den Aminosäuren in diesem Bereich könnte die Raman-Ergebnisse erklären. Die Doppelbindung des PCB Chromophors scheint den Effekt auf die P_r Form zu verstärken.

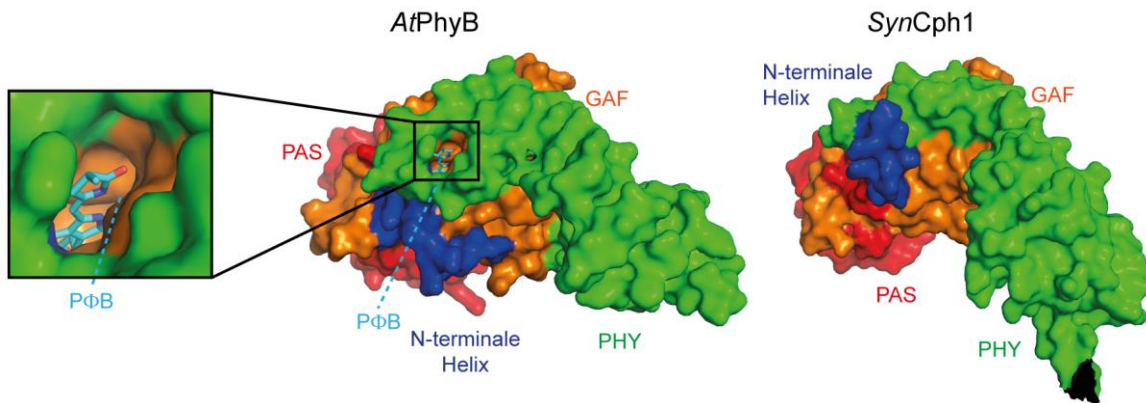


Abbildung 5.1: Unterschiede in der Solvenzexposition des Chromophors von *AtPhyB* (links) und *SynCph1* (rechts). Die PAS, GAF und PHY Domänen sind rot, orange und grün koloriert. Der PΦB Chromophor von *AtPhyB* ist in türkis dargestellt. Die N-terminale Helix ist in beiden Strukturen hervorgehoben. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung der PΦB Bindungstasche. PDB Codes: 4OUR (*AtPhyB*) und 2VEA (*SynCph1*).

Da keine Unterschiede zwischen den Varianten am A-Ring durch die Raman Messungen beobachtet werden konnten, ist eine direkte Wechselwirkung zwischen dem NTE und dem A-Ring unwahrscheinlich. Die spektroskopische Untersuchung mittels Raman zeigte, dass hauptsächlich die Schwingungen der C-D Methinbrücke durch das Entfernen der NTE verändert werden und dieser Effekt stärker in der P_{fr} Form ausgeprägt ist (siehe Kapitel 4.1.2).

Eine Solvenzexposition des D-Rings liegt jedoch nicht vor, so dass dies nicht der Grund für die Unterschiede des Wildtyps und der ΔNTE Variante im Bereich des C-D-Methinbrücke darstellt. Eine Wechselwirkung des D-Rings erfolgt mit der physiologisch sehr interessanten Aminosäure Y276, die durch eine Mutation zu Histidin eine dauerhafte Aktivierung des Phytochroms bewirkt⁶¹. Der Bereich um diese Aminosäure zeigte in den HDX-MS-Messungen im P_{fr} Zustand des Wildtyps eine stark reduzierte Austauschrate, die jedoch nicht in der P_{fr} Form der ΔNTE Variante gefunden werden konnte. Die Interaktion der NTE mit den Aminosäuren in diesem Bereich könnte die Raman-Ergebnisse erklären. Die Doppelbindung des PCB Chromophors scheint den Effekt auf die P_r Form zu verstärken.

Weiterhin ist zu beachten, dass die in der Literatur untersuchten Varianten von Phytochrom B mit Phytochromobilin als Chromophor lediglich bis Aminosäure 624 gehen²¹, während die PhyB Varianten in dieser Arbeit mit Phycocyanobilin zusätzlich noch einen Teil der Scharnierregion (bis 651) umfassen. Das dies den Grund für die unterschiedlichen spektralen Eigenschaften darstellt, scheint unwahrscheinlich, da die Struktur von XccBphP aus *Xanthomonas campestris* mit und ohne regulatorisches Modul keine Änderungen der Absorptionsmaxima bewirkte²⁷¹. Weiterhin zeigte das Hybrid PAS-GAF-PHY ein P_r Maximum von 647 nm, das der ΔNTE Variante von PhyB entspricht. Durch die Verlängerung des Hybrids um die PAS-PAS Domänen wird lediglich eine Verschiebung der Maxima um 1 nm gegenüber dem PAS-GAF-PHY Hybrid erreicht (siehe Kapitel 4.3).

Interessanterweise weist das PAS-GAF-PHY Hybrid trotz zweier Domänen aus Cph1 ein P_r Absorptionsmaximum auf, welches der ΔNTE Variante von PhyB mit PCB entspricht. Dies zeigt, dass die PHY Domäne entscheidend für die photochemischen Eigenschaften der Phytochrome ist. Dieses Verhalten wurde unter anderem bereits für eine Deletionsvariante von AtPhyB ohne PHY Domäne beschrieben. Diese Variante konnte zwar den P_{fr} Zustand erreichen konnte, doch dieser wies nur eine sehr geringe Lebensdauer auf²⁷². Weiterhin fehlt sowohl dem Hybrid als auch der PhyB ΔNTE Variante die N-terminale Erweiterung, welche vermutlich eine Stabilisierung des D-Rings bewirkt. Das Hybrid war nicht in der Lage ein P_{fr} Spektrum zu generieren und verbleibt reversibel in einer Zwischenstufe (siehe Kapitel 4.3). Mutationen im Bereich der Zunge zeigten, dass Interaktionen zwischen Zunge und Bilinbindungstasche nicht entscheidend für die Bildung von P_r, aber notwendig sind um P_{fr} auszubilden^{14,17,18,273}. Diese Interaktionen scheinen im Hybridsystem nicht vollständig ausgebildet zu werden.

5.2 Bindungsstellen der Signalpartner pflanzlicher Phytochrome

Die Signaltransduktion der pflanzlichen Phytochrome ist sehr komplex und involviert die Bindung von Interaktionspartnern sowohl in Nukleus als auch im Zytoplasma (siehe Kapitel 1.4). Weiterhin wurde die Funktion als Kinase für pflanzliche Phytochrome nachgewiesen, so dass auch eine Signalweiterleitung durch die Phosphorylierung von Signalpartnern möglich ist²⁷. Viele Interaktionspartner des

photosensorischen Moduls der Phytochrome sind bekannt, jedoch konnten deren Bindungsstellen am Phytochrom noch nicht lokalisiert werden. Lediglich zu PIF3 sind Mutationen bekannt, die eine Schwächung der Interaktion bewirken. Diese liegen jedoch in der Knotenregion, die in den HDX-MS Messungen keine lichtabhängigen Änderungen zeigte. In pflanzlichen Phytochromen ist jedoch die P_{fr} Form die physiologisch aktive und eine Vielzahl der Interaktionsproteine weist eine signifikant höhere Affinität gegenüber der P_{fr} Form auf. Bis jetzt wurde lediglich der P_r Grundzustand von *AtPhyB* kristallisiert. Für die aktive Form der pflanzlichen Phytochrome muss so auf Erkenntnisse der bakteriellen Verwandten zurückgegriffen werden. Hierbei wurden verschiedene Bereiche identifiziert, die eine strukturelle Änderung erfahren und somit als mögliche Interaktionsstellen für Bindungspartner dienen könnten.

Ein von Anders *et al* vorgeschlagenes Tryptophan-Tausch-Modell postuliert eine Umfaltung der Zungenregion¹⁴. Hierbei wird während der Photokonversion das zwei-strängige β -Faltblatt aufgelöst und eine α -Helix gebildet, die mit der Chromophor-bindungstasche interagiert¹⁴ (siehe Abbildung 5.2). Ein Vergleich der Kristallstrukturen des Bakteriochroms aus *Deinococcus radiodurans* (*Dr*) BphP im P_r Grundzustand und des *bathy* Phytochrom aus *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) BphP im P_{fr} Grundzustand bestätigen diese Umwandlung^{18,258}.

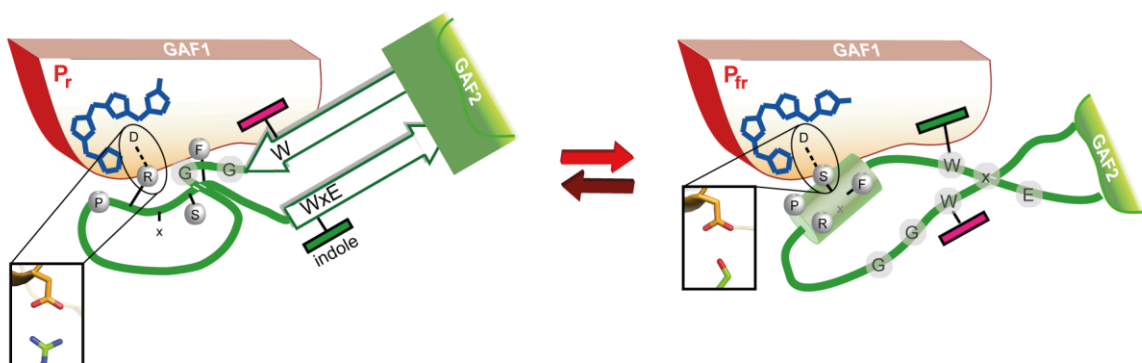


Abbildung 5.2: Modell für den Tryptophan-Tausch innerhalb der Zungenregion von Phytochromen. Die durch die Bestrahlung mit rotem Licht ausgelöste Photokonversion vom P_r in den P_{fr} Zustand und damit verbunden, die Auflösung der Zunge/GAF D-R Salzbrücke (Ausschnitt, links) bewirkt die Auflösung der β -Stränge und die gleichzeitige Ausbildung einer α -Helix sowie einer D-S Salzbrücke (Ausschnitt, rechts)¹⁴.

Für die Zungenregion war eine separate Auswertung der P_r und der P_{fr} Form in den HDX-MS-Messungen notwendig, um eine hinreichende Peptidabdeckung zu erhalten.

Das unterschiedliche proteolytische Verdauemuster der Zungenregion gibt einen Hinweis auf eine Änderung der Sekundärstruktur. In Kombination mit den erhaltenen Austauschraten für die Zungenregion in der P_r und P_{fr} Form (siehe Abbildung 4.12) ist davon auszugehen, dass auch in pflanzlichen Phytochrome eine lokale Umfaltung der Zungenregion erfolgt.

Durch die Änderung der Sekundärstruktur könnte eine direkte Bindung der Interaktionspartner an die Zungenregion ermöglicht werden. Die Phosphatase PAPP2c bindet an die PHY Domäne der Phytochrome A und B⁷⁵. Außerdem zeigten Experimente, dass auch eine Bindung an das cyanobakterielle Phytochrome *SynCph2* möglich ist, was eine Bindung an die Zungenregion als konservierter Bereich innerhalb der PHY Domäne vermuten lässt²⁵⁴.

Des Weiteren wurde in bakteriellen Phytochromen festgestellt, dass sich durch die Photokonversion in die P_{fr} Form die GAF und die PHY Domäne aufeinander zubewegen, was eine Deformation der domänenverbundene Helix zwischen der GAF und der PHY Domäne nach sich zieht^{18,274}. Die HDX-Ergebnisse weisen in der P_{fr} Form einen Bereich am C-terminalen Ende dieser Helix auf, der zunächst über eine erniedrigte (L437-M439) und anschließend über eine erhöhte (S440-E441) Austauschrate im Vergleich zur P_r Form verfügt. Durch die Ausbildung des Knickes in der GAF-PHY-verbindenden Helix wird der letzte Bereich nach Außen gedreht und erfährt dadurch einen stärkeren Austausch. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer Bewegung oder Reorganisation der domänenverbundenen Helix auch in Pflanzen. Dieser Knick in der Helix hat wahrscheinlich eine Verkleinerung des Abstandes zwischen den Domänen zur Folge und könnte die Signaltransduktion beeinflussen.

Die GAF-PHY verbindende Helix bildet auch die Grundlage für die Wechselwirkungen der dimeren Interaktionsfläche in der monoklinen Kristallstruktur von PhyB. Analog zu vielen Strukturen der BphPs^{18,20,275} sind in die Wechselwirkungen weiterhin die Helices $\alpha 5$ der PAS Domäne und die $\alpha 2$ -Helix der GAF Domäne beteiligt (siehe Abbildung 5.3 und Abbildung 8.1).

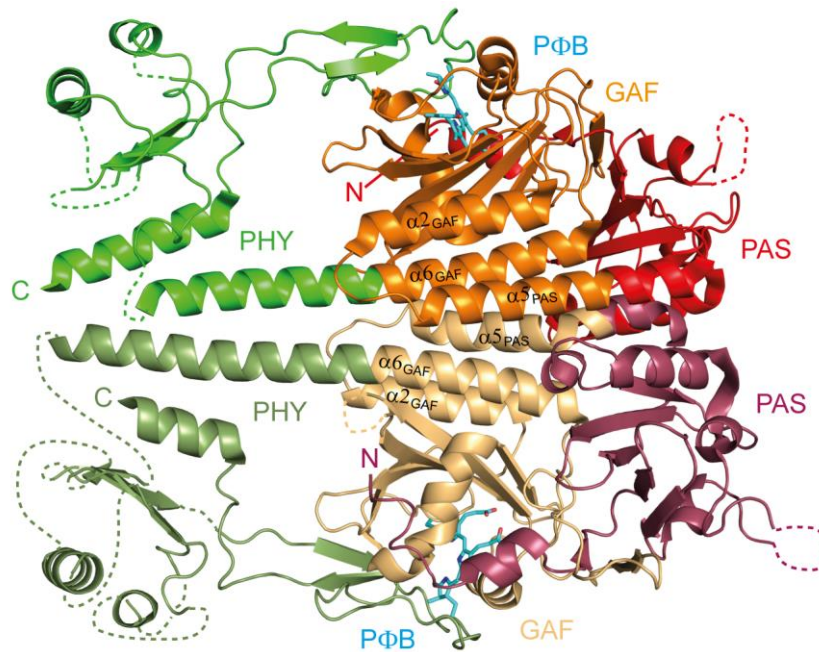


Abbildung 5.3: Kristallstruktur des photosensorischen Moduls von *AtPhyB*(101-624) im P_r Zustand. Das Protein bildet *in crystallo* ein Dimer dessen Interaktionsfläche durch die Helices 5_{PAS} und 2_{GAF} unter Beteiligung der GAF-PHY domänenverbundenen Helix (α_{6GAF}) gebildet wird. Die PAS Domäne der Kette A ist in rot, die GAF Domäne in orange und die PHY Domäne in grün koloriert. Die PAS, GAF und PHY Domänen der Kette B sind lila, beige und dunkelgrün eingefärbt. Der Chromophor Phytylchromobilin (PΦB) ist in türkis dargestellt. (PDB Code: 4OUR).

Ungeachtet der Diskussion, ob Phytochrome als paralleles oder antiparalleles Dimer kristallisieren^{22,28}, konnten Ergebnisse aus nativen massenspektrometrischen Intaktmessungen zeigen, dass Phytochrom B (1-651) und die ΔNTE Variante in Lösung als Monomere vorliegen. Weiterhin unterstützen die HDX-Ergebnisse diese Tatsache, da die N-terminalen Aminosäuren der α_5 -Helix in den HDX-Experimenten eine stark erhöhte Austauschrate aufwiesen (siehe Abbildung 4.7), so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieser Bereich in Lösung unstrukturiert vorliegt und nicht zur Stabilisierung der dimeren Form beitragen kann.

Weitere Experimente konnten zeigen, dass bei pflanzlichen Phytochromen die PAS-PAS Wiederholung verantwortlich für die Ausbildung der dimeren Spezies ist. In verwandten Phytochromen die eine Histidinkinase als regulatorisches Modul besitzen, wie beispielsweise *SynCph1*, ist die Ausbildung eines parallelen Dimers notwendig, um die notwendige trans-Phosphorylierung zu ermöglichen²⁷⁶⁻²⁷⁸. Es wird dabei angenommen, dass nicht nur eine Dimerisierung der Histidinkinase eintritt, sondern des gesamten photosensorischen Moduls^{18,275}. Interessanterweise

befindet sich die Kinasefunktion in pflanzlichen Phytochromen anscheinend nicht innerhalb des regulatorischen, sondern im photosensorischen Modul²⁷.

5.3 N-terminale Erweiterung und Scharnierregion der pflanzlichen Phytochrome

Viele Interaktionspartner der Phytochrome sind inzwischen bekannt, doch obwohl die genauen Bindungsstellen noch nicht identifiziert werden konnten, zeigte sich ein erheblicher Einfluss der N-terminalen Erweiterung auf die Affinität der Bindungspartner gegenüber den Phytochromen. So weist die Δ NTE Variante von PhyB eine schwächere Bindung gegenüber PIF3 auf als der Wildtyp. Im Fall von PIF6 konnte keine Bindung mehr zustande kommen²⁷⁰. Weiterhin wurde festgestellt, dass Phosphorylierungen der Serine und Tyrosine in der N-terminalen Erweiterung und Scharnierregion die Affinität der Phytochrome gegenüber ihren Interaktionspartnern schwächen. Durch die Modifikation wird entweder die Bindungsstelle direkt unzugänglich oder eine allosterische konformationelle Änderung ausgelöst, welche dann die Bindungsstelle partiell blockiert. So schwächen Phosphorylierungen in der NTE die Affinität gegenüber PIF3^{58,59}. In der Scharnierregion bewirkt die Phosphorylierung in *AsPhyA* zudem eine geringere Affinität gegenüber NDPK2⁷⁴. Trotz der Vielfältigen Einflussnahme der NTE und der Scharnierregion sind bislang keine strukturellen Daten über die Regionen verfügbar.

Die N-terminale Erweiterung ist nur in pflanzlichen Phytochromen enthalten und bei den Phytochromen B und D besonders stark ausgeprägt, da sie circa 100 Aminosäuren umfasst. Die Region ist bei allen Phytochromen stark hydrophil geprägt und weist einen besonders hohen Anteil an Glycinen und Serinen auf⁴⁸. Weiterhin gilt sie als unstrukturiert und flexibel¹². Eine Analyse der geordneten beziehungsweise ungeordneten Bereiche der NTE von *AtPhyB* mit dem Programm *RONN*²⁶⁴ zeigte allerdings, dass nur die ersten 60 Aminosäuren sehr ungeordnet vorliegen, jedoch ab Aminosäure 61 ein stärker geordneter Bereich vorliegt (siehe Abbildung 5.4). Innerhalb regulärer Proteindomänen werden Werte zwischen 0,0 und 0,5 angenommen²⁶⁴.

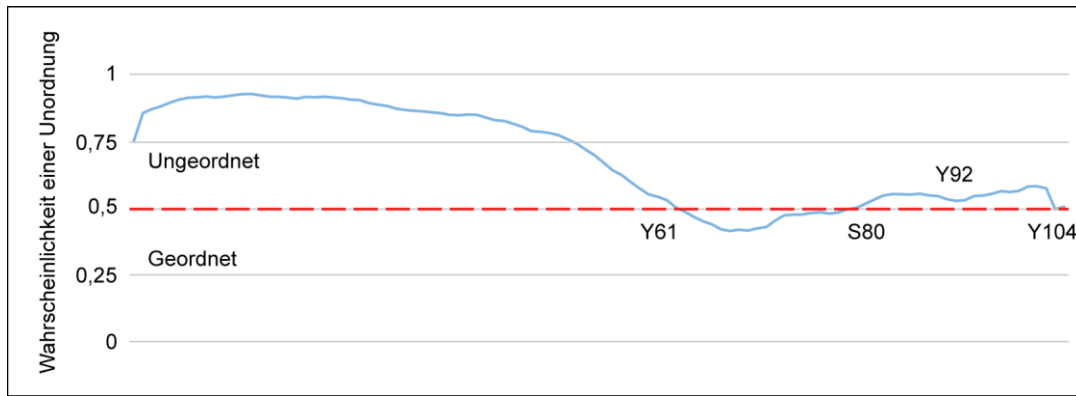


Abbildung 5.4: Vorhersage geordneter und ungeordneter Bereiche innerhalb der N-terminalen Erweiterung von *AtPhyB* mittels des *Servers* RONN²⁶⁴.

Weiterhin wurden die Sekundärstrukturanteile für die NTE durch den *Server* *PSIPRED* bestimmt. In Übereinstimmung mit der Vorhersage über einen geordneten Bereich ab Aminosäure 61 zeigt die Sekundärstrukturvorhersage eine α -helikale Region in dem Bereich von Aminosäure S53 bis Q73 (siehe Abbildung 5.5).

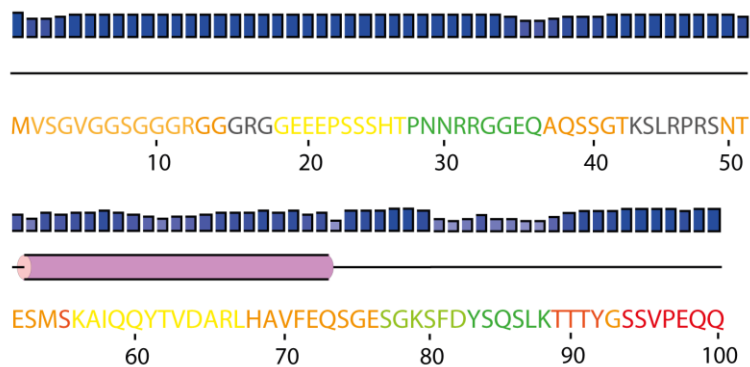


Abbildung 5.5: Sekundärstrukturvorhersage für die N-terminale Erweiterung von *AtPhyB* mittels des *Servers* *PSIPRED*. Helices sind als rosa als Zylinder und ungeordneten Bereiche als schwarze Linie dargestellt. Das jeweilige Konfidenzintervall ist oberhalb der Vorhersage als blaue Kästen angegeben. Die Sequenz ist entsprechend der HDX-Austauschrate für den P_r Zustand eingefärbt.

Für den Bereich der Helix wurde für den P_r Zustand eine leicht erhöhte Austauschrate festgestellt, was ein Hinweis darauf ist, dass die Helix exponiert vorliegt und nur in leichte Wechselwirkungen involviert ist. Außerdem enthält der Anfang der Helix einen Bereich (K56-I58), der in der P_{fr} Form eine höhere Austauschrate aufweist (siehe Abbildung 4.9) und somit für eine partielle Entfaltung der Helix im P_{fr} Zustand sprechen würde.

analysiert. Die HDX-MS Auswertung der Δ NTE Variante wurde hierbei von Simon Straß durchgeführt²⁵⁷. Einen Anhaltspunkte für einen möglichen Verlauf der NTE lieferte der Einfluss zweier phosphorylierter Serine (S86 und S84) auf die PIF3 Bindung⁵⁸. Durch eine Analyse der Mutationen, die ebenfalls die Bindung beeinflussen^{281,282}, wurde die Knotenregion (T330-A353) als wahrscheinliche Bindungsstelle von PIF3 identifiziert (siehe Abbildung 5.7). Weiterhin bewirkt die Mutation der Aminosäure Y104, die nicht in unmittelbarer Nähe zur Knotenregion liegt, ebenfalls eine schwächere PIF3-Bindung. Der Kristallstruktur von *AtPhyB* ist zu entnehmen, dass dieser Rest sich am Beginn der N-terminalen Helix befindet, welcher eine Umwandlung von der P_r zur P_{fr} Form erfährt, da die Austauschrate in der P_{fr} Form geringer ist.

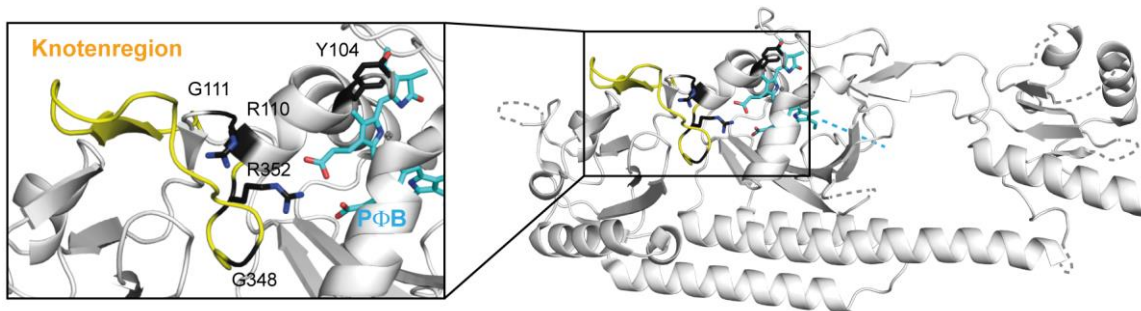


Abbildung 5.7: Die Mutationen, welche die PIF3-Bindung schwächen sind auf der Struktur von *AtPhyB* markiert. In gelb ist die Knotenregion hervorgehoben und in Türkis der Chromophor Phytychromobilin (PΦB). (PDB Code: 4OUR).

Untersuchungen der Bindungsstelle von *AtPIF3* an *AtPhyB* mittels HDX-MS haben ergeben, dass eine andere Region (Y61-F71) innerhalb der NTE einen reduzierten Austausch aufweist und somit ebenfalls an der Interaktion mit PIF3 beteiligt zu sein scheint²⁷⁰. Dieser identifizierte Bereich liegt auf der postulierten Helix und könnte mit der C-Terminal postulierten Helix von PIF3²⁷⁰ interagieren. Interessanterweise zeigte ein Sequenzalignment zwischen Phytychromen A-E aus *Arabidopsis thaliana*, dass dieser Bereich konserviert in allen Phytychromen vorliegt.

Anschließend wurde die Deuteriumaufnahme des WT mit der der Δ NTE Variante verglichen, um Regionen mit einem Unterschied zu ermitteln (siehe Abbildung 8.2 und Abbildung 8.5). Ein mögliches Modell ist in Abbildung 5.8 gezeigt. Hierbei ist der NTE entsprechend der Aufnahme rate aus Abbildung 4.9 eingefärbt. Die rot

eingefärbten Bereiche besitzen eine höhere Deuterium Aufnahme verglichen zum WT und könnten deswegen an der Packung des NTE beteiligt sein.

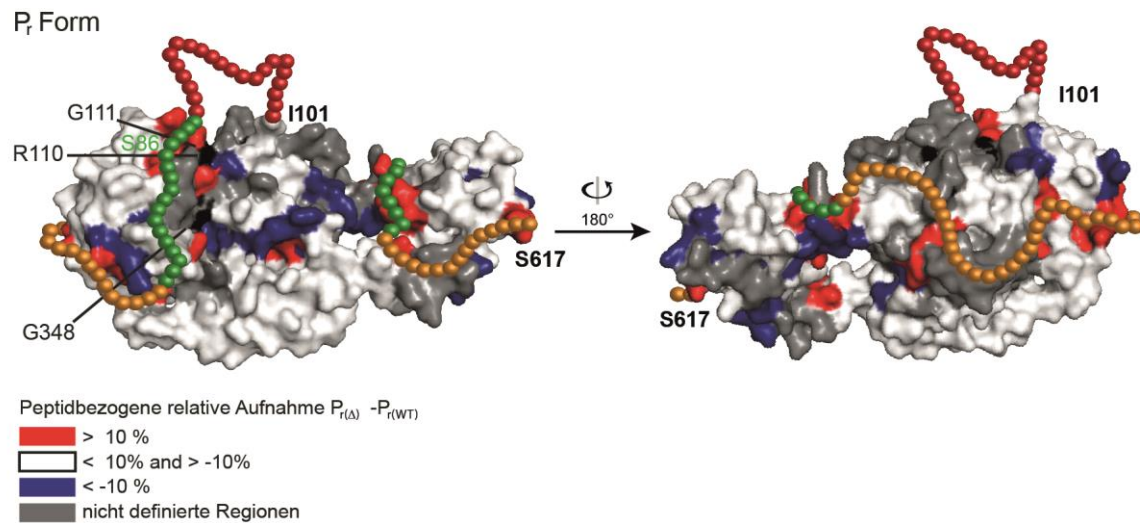


Abbildung 5.8: Differenz der Deuterium Aufnahme der P_r Form zwischen PhyB_(Δ NTE) und PhyB_(WT). Durch die Unterschiede werden mögliche Interaktionsregionen der N-terminalen Erweiterung identifiziert. Der NTE ist durch Kugeln dargestellt, die entsprechend der Deuteriumaufnahme eingefärbt sind. Aminosäuren, die an der Bindung des Phytochrom Interaktionsprotein PIF (engl.: *Phytochrome interaction factor*; kurz: PIF) beteiligt sind, wurden schwarz eingefärbt.

Der erste Bereich der NTE (T89-A103) weist eine hohe Deuteriumaufnahme auf, so dass wahrscheinlich eine exponierte Schleife vorliegt, an die sich eine Region (F81-K88) mit mittlere Aufnahme anschließt. Dieser Bereich beinhaltet zwei Phosphorylierungsstellen (S84, S86)^{58,59} deren Phosphomimic Varianten die Bindung des Interaktionsproteins PIF3 beeinflussen, so dass dieser Bereich in räumlicher Nähe der Bindungsstelle liegen muss. Es zeigte sich, dass in der Nähe der Reste eine verminderte Deuteriumaufnahme im Wildtyp erfolgt, was durch eine Interaktion mit dem NTE erklärt werden könnte.

Darüber hinaus zeigt der *f*-loop1²⁸³ (siehe Kapitel 4.1.3) eine geringere Austauschrate in der Δ NTE Variante, so dass eine Anlagerung der NTE in räumlicher Näherung zum Loop vermutet werden kann, der eine höhere Solvenzexposition auslöst.

Weiterhin interagiert eine Schleife nach dem ^w/_{FxE} Motiv (S594-E600) der Zungenregion offensichtlich mit der NTE, welches die höhere Austauschrate in der Δ NTE Variante erklären würde. Interessanterweise weist die Schleife in der P_{fr} Form des Wildtyps eine erhöhte Aufnahme auf (siehe Abbildung 4.8), was dafürsprechen

würde, dass die Interaktion mit der NTE nur in der P_r Form stattfindet. Hierfür könnte der Bereich P28-Q36 in Frage kommen, der eine reduzierte Austauschrate aufweist. Während der Photokonversion könnte der Bereich P28-Q36 den Interaktionsbereich des PSM wechseln. Ein potentieller Bindungspartner ist der $\beta_{1\text{GAF}}$ -Strang des β -Faltblatt und eine sich daran anschließende Schleife, die in der P_{fr} Form geschützt gegen einen Deuterium Austausch vorliegen (siehe Abbildung 4.10).

Lichtabhängige Änderungen ergeben sich auch für die α_{NTE} (Y104-R110), die einen geringen Austausch in der P_{fr} Form aufweist und mit der Knotenregion anstatt des Chromophors interagieren könnte, da die Y104D Mutante die PIF Interaktion in der P_{fr} Form schwächt. Um weitere Änderungen des NTE-Packungsmodell in der P_{fr} Form bestimmen zu können, wurde eine speziellen Belichtungskammer²⁵⁷ gebaut, welche die schnelle Dunkelkonversion der ΔNTE Variante inhibieren konnte. Der Vergleich der Daten der P_{fr} Formen der ΔNTE Variante und des PSM wurde hierbei von Simon Strass durchgeführt²⁵⁷. Generell ergab sich ein ähnlicher Verlauf für die NTE, der jedoch gerade im Bereich S84-K88 schwächere Wechselwirkungen aufzuweisen scheint, da dieser in der P_{fr} Form eine höhere Austauschrate besitzt. Unterschiede zwischen den beiden Konformationen der ΔNTE Variante ergeben sich im bereits identifizierten Knick der domänenverbindenden Helix (L437-L450) und der Zungenregion (T558-P598). Der interessante Bereich in der domänenverbindenden Helix ist leider nur mit langen Peptiden abgedeckt, doch lässt sich eine leicht verminderte Aufnahme für den Bereich erkennen. Im Wildtyp ist dieser Bereich mit kleineren Peptiden abgedeckt, so dass auch ein Bereich dahinter mit erhöhter Aufnahme zu sehen war. Der stärker geschützte Bereich um Aminosäure Y276 in der P_{fr} Form des Wildtyps, konnte für die ΔNTE Variante nicht beobachtet werden, was für die Involvierung der NTE spricht.

Einen Hinweis, dass das für *Arabidopsis thaliana* gefundene Interaktionsmodell der N-terminalen Erweiterung generell auch übertragbar ist auf die weiteren pflanzlichen Phytochrom B Orthologe, ergab eine bioinformatische Analyse aller Phytochrom B Sequenzen. Hierbei wurden die Sequenzen ausgehend vom *Sequence similarity network* von Anders *et al*²² berücksichtigt (siehe Abbildung 5.9).

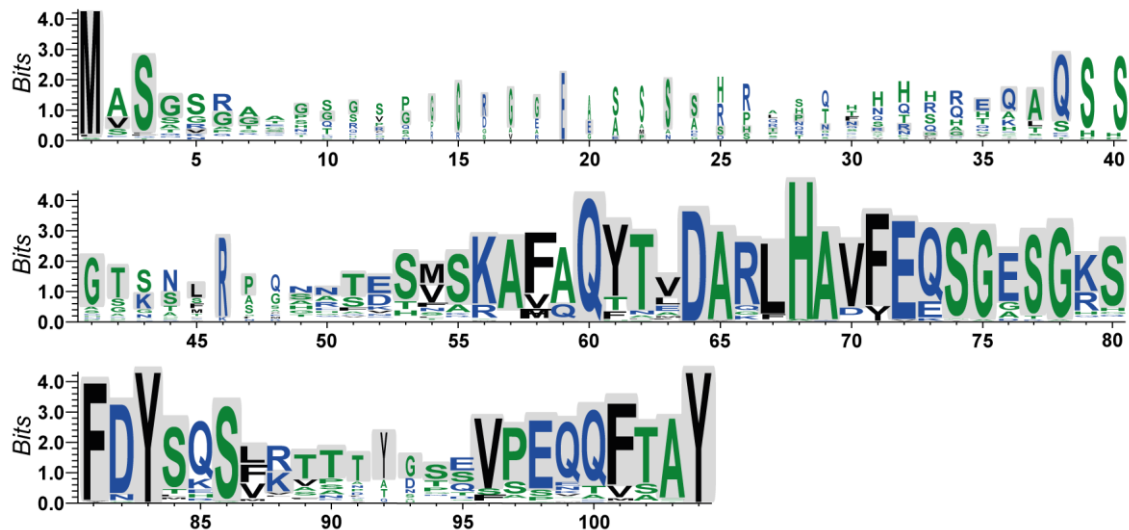


Abbildung 5.9: Sequenzalignment der N-terminalen Erweiterungen von Phytochrom B-Orthologen aus verschiedenen Pflanzen ($n = 55$; paarweise Sequenzidentität $< 90\%$). Die Höhe der Buchstabe steht für den Konservierungsgrad und wurde mittels des Servers *Weblogo*^{284,285} dargestellt. Die grau hinterlegten Bereiche markieren die Sequenz von *AtPhyB*.

Die ersten 50 Aminosäuren zeigen einen insgesamt geringen Konservierungsgrad. Augenfällig sind jedoch die konservierten Serine an den Positionen S3, S39 und S40. Der Bereich in dem für *AtPhyB* eine α -Helix vorhergesagt wird (M54-Q73), ist zwischen den PhyB aus verschiedenen Pflanzen sehr konserviert. Interessanterweise liegt im Bereich der Helix die Region (K56-I58), welche in den HDX-MS-Messungen eine lichtabhängige Änderung der Austauschrate zeigte. So ist zu vermuten, dass in allen PhyBs eine Helix im N-Terminus gebildet werden könnte, die durch die Photokonversion verkürzt wird. Für die zweite Region (S84-K88) mit einer lichtabhängigen Änderung konnte nur ein mäßiger Konservierungsgrad festgestellt werden. Die Rolle einzelner stark konservierter Rest, wie beispielsweise H68, F81 oder Y83 bleibt noch zu klären.

5.3.2 Scharnierregion

Die Struktur des bakteriellen Phytochroms *XccBphP* aus *Xanthomonas campestris* bei dem sich ebenfalls eine PAS Domäne an das photosensorische Modul anschließt, gibt einen Einblick, wie die Anordnung im pflanzlichen regulatorischen Modul aussehen könnte. PAS Domänen setzen sich aus circa 100 bis 130 Aminosäuren zusammen und besitzen trotz der geringe Sequenzähnlichkeiten eine konservierte dreidimensionale Faltung⁶⁸⁻⁷². Die Struktur von *XccBphP* zeigt, dass die PAS Domäne durch einen α -

helikalen Linker mit der PHY Domäne verknüpft ist und dass sich an das Ende der Helix die charakteristische Struktur einer PAS Domäne anschließt. Grundlage der Struktur bildet das fünfsträngige antiparallele β -Faltblatt, das von mehreren α -Helices umgeben wird (siehe Abbildung 5.10).

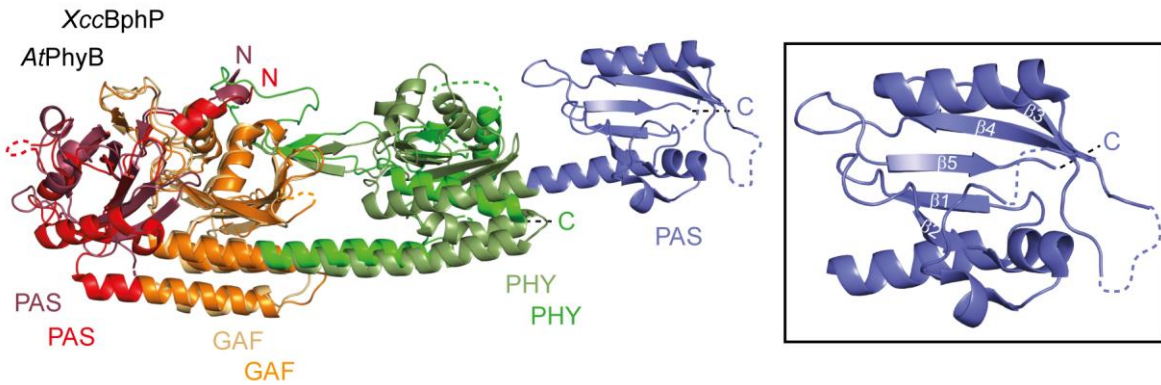


Abbildung 5.10: Vergleich der Kristallstrukturen von *Xanthomonas campestris* (*Xcc*) BphP und *Arabidopsis thaliana* (*At*) PhyB. Die PAS Domäne der Kette von AtPhyB ist in rot, die GAF Domäne in orange und die PHY Domäne in grün koloriert. Die PAS, GAF, PHY sowie eine weitere PAS Domänen von *Xcc*BphP sind in lila, beige, dunkelgrün und blau eingefärbt. (PDB Code: 4OUR (AtPhyB) und 5AKP (*Xcc*BphP)).

Eine Analyse der Sekundärstruktur der Scharnierregion von AtPhyB mittels des Servers PSIPRED ergab eine um acht Aminosäuren kürzere Helix gefolgt von zwei β -Strängen sowie einer weiteren Helix (siehe Abbildung 5.11).

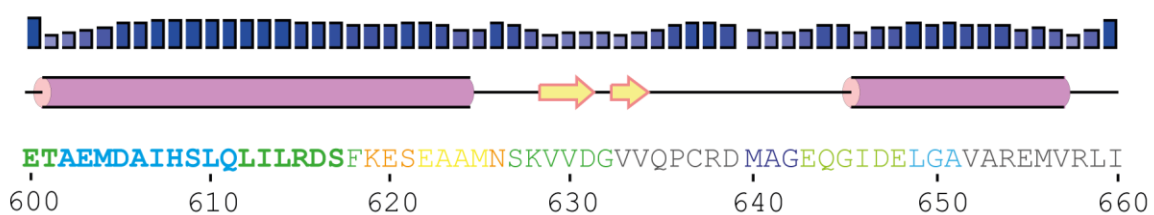


Abbildung 5.11: Sekundärstrukturvorhersage für die Scharnierregion von AtPhyB mittels des Servers PSIPRED. Helices sind als rosa als Zylinder, β -Stränge als gelbe Pfeile und ungeordneten Bereiche als schwarze Linie dargestellt. Das jeweilige Konfidenzintervall ist oberhalb der Vorhersage als blaue Kästen angegeben. Die Sequenz ist entsprechend der HDX-Austauschrate für den P_r Zustand eingefärbt. Die fett markierten Buchstaben der Sequenz zeigen das Ende der Kristallstruktur.

Da der Bereich zwischen Helix und dem zweiten β -Strang keine helixbrechende Aminosäuren enthält, wäre eine längere α -Helix ebenfalls möglich, analog der Struktur von *Xcc*BphP. Dieses würde die Bereiche mit einer erhöhten Austauschrate

(K619-N626) in den HDX-MS-Messungen erklären, da sie solvenzexponiert zwischen der PHY und PAS Domäne liegen würden. Der sich anschließende Bereich mit einer verminderten Austauschrate könnte durch die Interaktion der Helix mit einem β -Strang zustande kommen. Weiterhin wäre auch die Interaktion mit der N-terminalen Erweiterung als Ursache für die geringere Austauschrate denkbar.

Phosphorylierungen in der Scharnierregion konnten bislang nur für *AsPhyA* nachgewiesen werden¹⁰⁴ und könnten zu einer Deformation der Helix führen, was sich negativ auf die Stabilität der PHY Domäne auswirken könnte.

Das nukleare Lokalisierungssignal liegt ebenfalls am Beginn der PAS Domäne und da Vollängen-Phytochrome erst nach einer Anregung mit rotem Licht in den Kern gelangen können⁶², wird dieses wahrscheinlich in der P_r Form durch Wechselwirkungen innerhalb der PAS Domäne blockiert.

5.4 Anwendung pflanzlicher Phytochrome in der Optogenetik

Pflanzliche Phytochrome finden als optogenetische Werkzeuge Anwendung^{77,286}. Die Absorption- und Fluoreszenzeigenschaften der Phytochrome im roten und nahinfraroten Bereich machen die Familie interessant für den Einsatz in ganzen, lebenden Organismen, da Gewebe in diesem Wellenlängenbereich weniger streut²⁸⁷. Einen Nachteil stellt dagegen der benötigte Chromophor dar. So ist der natürliche Chromophor pflanzlicher Phytochrome, P Φ B in eukaryotischen Systemen nicht präsent. Für die Synthese werden zwei spezielle Helferplasmide benötigt, die ebenfalls in die Zellen eingebracht werden müssen²⁸⁶. Eine weitere Möglichkeit stellt die direkte Injizierung von P Φ B in die zu untersuchenden Zellen dar²⁸⁸.

Die Optogenetik erlaubt die präzise Kontrolle zellulärer Prozesse, wie etwa der Gentranskription, der Aktivierung spezifischer Signalkaskaden oder der Dimerisierung bestimmter Proteine. Dies kann verwendet werden um den Einfluss und die Aufgabe einzelner Proteine innerhalb bestimmter Signalkaskaden in lebenden Organismen genauer zu untersuchen. Die Eigenschaft der Phytochrome reversibel zwei (meta)stabile Zustände einnehmen zu können, von denen nur der P_{fr} Zustand die Proteine PIF3 und PIF6 bindet, macht sie zu einem geeigneten Target für

die Optogenetik. Diese Interaktion ist im Dunkeln stabil, kann aber mittels eines kurzen dunkelroten Pulses innerhalb von Sekunden wieder aufgehoben werden²⁸⁶.

Die bisherigen verwendeten Systeme basieren auf den natürlichen Proteinen. Diese Systeme funktionieren gut, doch könnten sie durch weitere Optimierung der Proteine noch verbessert werden. Hierbei stellt die Strukturaufklärung, und damit verbunden die Bestimmung der genauen Bindungsstellen, einen entscheidenden Schritt dar um die Größe der Systeme zu reduzieren. So zeigte sich, dass die NTE einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung von PIF3 und PIF6 hat. Weiterhin konnte die Bindungsstelle von PIF3 innerhalb der PAS Domäne lokalisiert werden²⁷⁰. Ausgehend von diesen Arbeiten könnten Minimalproteine generiert werden, die nur noch die Bereiche der Interaktion sowie die Bereiche, die für eine reversible Schaltung benötigt werden enthalten.

Durch den Einbau nicht-nativer Chromophore sowie die Generierung von weiteren Hybridsystemen innerhalb der kanonischen Phytochrome können die spektralen Eigenschaften weiter variiert und an die benötigten Bedingungen angepasst werden (siehe Kapitel 4.3).

Anstelle von PIFs könnten auch andere Interaktionsproteine in Betracht gezogen werden. So ist bekannt, dass PAPP2c ebenfalls lichtabhängig an Phytochrome bindet. Als Interaktionsstelle wurde die PHY Domäne identifiziert und weitere Studien konnten zeigen, dass PAPP2c ebenfalls an das cyanobakterielle Phytochrom *SynCph2* bindet, wodurch eine Bindung an die Zungenregion wahrscheinlich ist²⁵⁴. Die Größe der Phosphatase PAPP2c könnte durch die Identifikation der verantwortlichen Bereiche stark reduziert werden und eine Eignung des Systems somit erhöhen.

5.5 PAPP5 – Mechanismen der Aktivierung

Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen dienen zumeist als An-/Ausschalter in der Regulation zellulärer Aktivitäten in nahezu allen Systemen²⁸⁹. Die Übertragung einer Phosphatgruppe auf ein Protein hat oft tiefgreifende Effekte auf die Struktur und dadurch auf die funktionalen Eigenschaften. So kann die Phosphorylierung zum Beispiel eine Enzymaktivität durch die Initiation einer allosterischen konformationellen Änderung kontrollieren, welche dann die aktive

Tasche beeinflusst^{290,291}. Phosphorylierungen können auch die Interaktion von Proteinen inhibieren, die einen Komplex formen müssen um funktionieren zu können²⁹². Weiterhin benötigen einige Proteine die Phosphorylierung um ihren Zielort innerhalb der Zelle erreichen zu können. Fast alle Signalkaskaden in Pflanzen werden die reversible Phosphorylierung reguliert¹⁵². Das breite Spektrum dieser zellulären Funktionen wird reflektiert durch eine große Anzahl an Kinasen und Phosphatasen, die auch für Pflanzen durch die Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* bestätigt werden konnte. Für ein optimales Gleichgewicht müssen jedoch auch die Kinasen und Phosphatasen einer strengen Kontrolle unterliegen. Eine Möglichkeit der Regulation besteht in der Kontrolle der Expression. So konnten gezeigt werden, dass die Konzentration bestimmter PP2c Phosphatasen nach einer Verletzung der Pflanze oder bei anderen Stresssignalen erhöht wird^{293,294}. Weiterhin stellen Phosphorylierungen eine weitverbreitete posttranslationale Modifikation dar und werden auch für die Regulation der Aktivitäten von Phosphatasen verwendet^{295,296}. Auch andere Modifikationen wie die Acetylierung und Methylierung sind bekannt als Regulatoren von Phosphatasen^{297,298}. Häufig erfolgt die Regulation auch durch spezielle regulatorische Domänen oder Untereinheiten, welche für die Lokalisierung der Proteinkomplexe zu einem bestimmten subzellulären Bereich, die Modulation der Substratspezifität oder die Veränderung der katalytischen Aktivität zuständig sind. Interaktionen mit regulatorischen Proteinen stellen den häufigsten verwendeten Mechanismus zur Kontrolle der Aktivität im Menschen²⁹⁹ und wahrscheinlich auch in Pflanzen dar.

Drei Phosphatasen sind in Pflanzen bekannt, die Phytochrome dephosphorylieren: FyPP¹⁰⁸, PAPP5⁷⁴ und PAPP2c⁷⁵. Regulierungsmechanismen für die Phosphatasen müssen noch untersucht werden, lediglich die Autoinhibition von PAPP5 und deren Aktivierung durch Fettsäuren sind bisher bekannt^{118,137,139}.

5.5.1 PAPP5- Kontrolle der Aktivität durch Autoinhibition

PAPP5 gehört zur Familie der PP5 Phosphatasen, die ubiquitär in allen Organismen vertreten sind. Durch die geringe *in vivo* Aktivität wurde sie erst spät entdeckt. Die in dieser Arbeit gelöste Struktur von PAPP5 konnte die an der Inhibition der Phosphatase beteiligten Aminosäuren in der TPR Domäne und des C-terminalen inhibierenden Motivs identifizieren (siehe Abbildung 5.12).

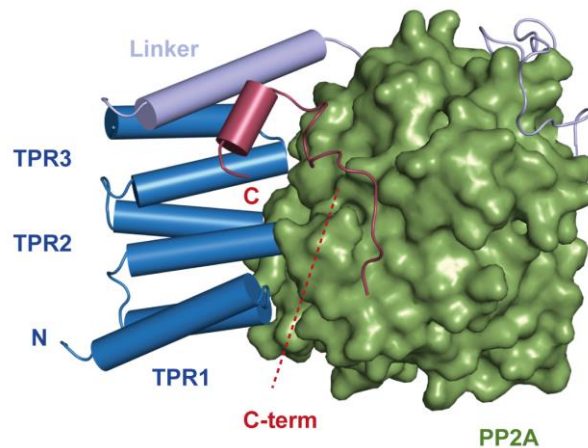


Abbildung 5.12: Schematische Präsentation von *AtPAPP5*. Die N-terminale TPR Domäne (blau) ist über eine lange α -Helix sowie einer Schleife (Linker; hellblau) mit der PP2A Domäne (grün) verbunden. Der C-Terminus der PP2A Domäne enthält ein inhibierendes Motiv (C-term) bestehend aus einer lange Schleife sowie einer Helix (rot).

Neben dem proteolytischen Verdau, bei dem die TPR Domäne und/oder die dreizehn C-terminalen Aminosäuren abgespalten werden¹³⁶, kann eine Aktivierung auch durch Zugabe von Arachidonsäure erreicht werden. Etwaige Bindungsstellen oder Bereiche, die eine strukturelle Änderung durch Zugabe von Arachidonsäure erfahren, sind allerdings noch nicht bekannt.

Die geringe, jedoch vorhandene *in vitro* Aktivität der Phosphatase kann durch eine hohe Beweglichkeit des C-Terminus und den damit verbundenen schwächeren Wechselwirkungen zur TPR Domäne erklärt werden. So waren in der Kristallstruktur heterogene Interaktionen der C-Termini zu beobachten, die auf ein solches Verhalten hinweisen. NMR Experimente, die nur von der TPR Domäne von PAPP5 zu verschiedenen Zeitpunkten aufgenommen wurden, zeigen, dass Reste im Bereich der zweiten und dritten Helix (*HsPAPP5*: S69 und D84) bereits eine größere Beweglichkeit aufweisen³⁰⁰. Dies spricht dafür, dass diese Region ohne die Wechselwirkungen zu der PP2A Domäne und des C-terminalen Motivs eine hohe Beweglichkeit aufweist.

Auch die DLS Ergebnisse zeigen das Auftreten einer etwas größeren Spezies über einen kurzen Zeitraum, welche sich anschließend wieder in die kleinere Form zurückbildet. Die Bindungen der TPR Domäne alleine zur PP2A Domäne scheinen nicht

ausreichend für eine komplette Inhibition zu sein, so dass eine geringe Aktivität vorhanden ist.

5.5.2 Die Vielseitigkeit der TPR Domäne

Die TPR Domäne der PP5-artigen Phosphatasen ist neben der Regulation der Phosphataseaktivität auch für die Spezifität zuständig, da sie Wechselwirkungen zu anderen Proteinen ausbilden kann. So konnte eine Bindung von *AtPAPP5* an das Chaperon HSP90 nachgewiesen werden¹⁴³. In PP5 aus *H. sapiens* formen die TPR Domänen, die bekannt dafür sind Protein-Protein Interaktionen auszubilden³⁰¹, einen amphipatischen Kanal, in den sowohl Hsp70 als auch HSP90 binden³⁰⁰. Hierbei interagiert ein C-terminales Motiv (EEVD) des Chaperons mit vier Resten (K32, R74, K97 und R101) der TPR Domäne³⁰² (siehe Abbildung 5.13).

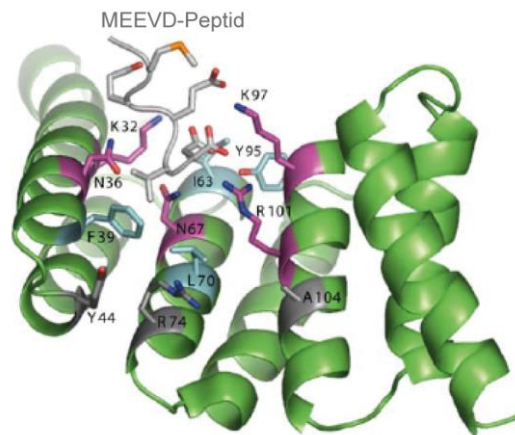


Abbildung 5.13: Bindung des Chaperons HSP90 an die TPR Domäne von PP5 aus *Homo sapiens*. Die TPR (engl.: *Tetratricopeptide repeat*) Domäne ist in grün dargestellt und die polaren Aminosäuren, die eine Klammer um das MEEVD Peptids aus Hsp90 (weiß) bilden, in lila. Weitere Reste der TPR Domäne, die an der Bindung beteiligt sind, sind in weiß koloriert³⁰⁰.

Weiterhin interagiert PAPP5 sowohl mit der TPR Domäne von PhyA als auch PhyB⁷⁴. Eine Beteiligung von PAPP5 an einem zytosolischen Proteinkomplex, der Mg-Photophorphyrin IX bindet, ist ebenfalls bekannt.

Für die menschliche PP5 Phosphatase konnte noch weitere Interaktionspartner identifiziert werden, so dass sie an der Regulation einer Vielzahl an Signaltransduktionsnetzwerken, wie etwa der Proliferation, der Migration, dem elektrolytischen Gleichgewicht, der Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt ist. Es existieren Beweise, welche eine Beteiligung von PP5 in mehreren Phosphorylierungskaskaden

nahe legen. So wurde PP5 als Regulator für die Inaktivierung von MAP (engl.: *Mitogen-activated protein*) Kinase Signalisierung identifiziert. Drei wichtige MAPK Signalisierungskomponenten, RAC GTPase, RAf (engl.: *Rapidly accelerated fibrosarcoma*) und ASK1 (engl.: *Apoptosis signal-regulating kinase 1*), werden durch PP5 beeinflusst. Zusätzlich scheint PP5 eine Rolle in mehreren Schritten der Zellzyklusprogression zu spielen. Die Behandlung von Zellen mit PP5 *antisense*-RNA führte zu einer Hyperphosphorylierung von p53 und einem subsequenten G1 Wachstumsstillstand³⁰³. PP5 bindet auch zwei Proteine, CDC16 und CDC27 (engl.: *Cell division cycle protein 16/27*), welche Teil des APC (engl.: *Anaphase-promoting complex*) sind – ein Komplex benötigt für die Initiation der Anaphase und einem Austritt aus der Mitose³⁰³. Schließlich ist PP5 dafür bekannt eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur und dem Zellzyklusarrest zu spielen durch ein Abschwächen der Aktivitäten von zwei verwandten Kinasen, ATM (engl.: *Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (engl.: *ATM and Rad3 related*)^{303,304} (Yong et al., 2007). Letztendlich wurde auch eine Interaktion mit den Cryptochromen CRY1 und CRY2 nachgewiesen^{98,99}. Eine Bindung von CRY2 an die TPR Domäne ist bekannt⁹⁸ für die weiteren Interaktionspartner ist eine Bindung an diese Domäne ebenfalls zu vermuten, da sie bekannt dafür ist Protein-Protein-Interaktionen auszubilden³⁰¹.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die TPR Domäne wichtig für die Stabilität der Phosphatase ist, da Varianten ohne TPR Domäne Oligomere bildeten. Die Oligomerisation führt wahrscheinlich zu einer Blockade der katalytischen Tasche, da die Oligomere keine Phosphataseaktivität mehr zeigten. HDX-MS Experimente zeigten zudem, dass die dritte TPR Domäne nach einer Aktivierung der Phosphatase mit Arachidonsäure wahrscheinlich noch intakt vorliegt, da die an einer Interaktion zu der PP2A Domäne beteiligten Aminosäuren (A93 und Y299) eine nur leicht erhöhte Austauschrate aufweisen (siehe Abbildung 4.33). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Deletionsvarianten der menschlichen Phosphatase PP5 in denen gezeigt wurde, dass der dritte TPR *Repeat* relevant für die Phosphataseaktivität ist³⁰⁵. Weiterhin zeigte die an einen Löslichkeitstag fusionierte PP2A Domäne eine geringere Dephosphorylierungsrate gegenüber Phytochromen als das Volllängenprotein⁷⁴.

5.5.3 Fettsäureaktivierung von Phosphatasen/Kinasen

Mitte der neunziger Jahre wurde die Funktion von Arachidonsäure als Botenstoff in vielen Säugetieren bestätigt³⁰⁶. In Pflanzen ist die Rolle von AA noch umstritten. Sie konnte bislang nur in den Plastiden von Algen und Moosen nachgewiesen werden, wo sie ebenfalls durch eine Kettenverlängerung der Linolsäure und anschließende Desaturation hergestellt wird. Die exogene Behandlung von Pflanzen mit Arachidonsäure löst den programmierten Zelltod sowie weitere Abwehrmechanismen aus³⁰⁷⁻³⁰⁹. Somit stellt sich die Frage, ob trotz der hohen strukturellen Identität zwischen den Mitgliedern der PP5 Familie nicht Arachidonsäure, sondern eine andere Fettsäure in Pflanzen für die Kontrolle der PP5-Aktivität verantwortlich ist.

Die *in vitro* Studien zur Bestimmung der Phosphataseaktivität wurden in wässrigen Systemen durchgeführt. Besitzt die für die Aktivierung verantwortliche Fettsäure nur eine geringe Löslichkeit, könnte die Aggregation der Fettsäure eine Aktivierung der Phosphatase inhibieren. Die kritischen Mizellenkonzentrationen (engl.: *Critical micelle concentration*; kurz: CMC) der getesteten Fettsäuren, Linolsäure (93 μM) und Ölsäure (86 μM) liegen im Bereich der Arachidonsäure (77 μM). Die CMC-Werte der Fettsäuren wurden alle unter den gleichen Bedingungen und in dem gleichen Puffer (50 mM HEPES pH 7,6; 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl_2 ; RT) bestimmt²⁶¹. Die in dieser Arbeit durchgeführten pNPP-Assays zeigten keine Aktivierung durch die Zugabe von Ölsäure oder Linolsäure. Letztere führte sogar zu einer weiteren Inhibition der Phosphatase PAPP5. Hingegen zeigte ein Vergleich mit der Literatur, dass dort eine aktivierende Wirkung von Ölsäure und Linolsäure im Bereich der Arachidonsäure beobachtet wurde. Jedoch ist hier zu beachten, dass die Assays unter Zusatz von Ethanol und Fusionierung der Phosphatase an einen GST-Tag durchgeführt wurden. Letztendlich können weder Linolsäure noch Ölsäure als potentielle Kandidaten ausgeschlossen werden. Da die verantwortliche Fettsäure in Pflanzen noch nicht identifiziert wurde und *in vitro* Studien zeigen, dass Arachidonsäure in der Lage ist PAPP5 zu aktivieren, wurden die Untersuchungen zur Identifikation eines Aktivierungsmechanismus in dieser Arbeit mit Arachidonsäure durchgeführt.

Die Aktivierung eines Signalproteins durch Zugabe von Arachidonsäure erfolgt nicht nur für die Phosphatasen der Familie PP5. Ein weiteres Beispiel stellt die Rho-Kinase

aus *Homo sapiens* dar. Diese wird durch eine C-terminale autoinhibitorische Untereinheit blockiert und die Zugabe von AA aktiviert die Kinase³¹⁰. Weiterhin ist eine inhibitorische Wirkung für die Phosphatase SM-PP1M (engl.: *Smooth muscle myosin light chain phosphatase*) bekannt. Hier wird durch AA eine Dissoziation der katalytischen Untereinheit ausgelöst, was eine Minderung der Dephosphorylierungseffizienz zur Folge hat, während die Affinität gegenüber einem anderem Substrat erhöht wird^{311,312}. Die Bindungsstellen und der genaue Mechanismus, nach dem die Aktivierung, beziehungsweise Inhibition abläuft, sind auch hier noch nicht bekannt. Weiterhin ist die Aktivierung durch Fettsäuren auch der grundlegendere Bestandteil der Marburger Hypothese zur Erklärung von Arteriosklerose. Hierbei erhöht die Anwesenheit ungesättigter Fettsäuren die Aktivität einer PP2C Phosphatase um das 12-fache, die wiederum BAD (engl.: *Bcl-2-antagonist of cell death*) dephosphoryliert und so eine Apoptose der Zelle auslöst^{313,314}.

Studien mit den Phosphatasen der Familie PP5 ergaben, dass eine Aktivierung entweder durch die Zugabe von Arachidonsäure, oder durch einen proteolytischen Verdau erreicht werden kann, bei dem die TPR Domäne und/oder die dreizehn C-terminalen Aminosäuren abgespalten werden¹³⁶. Mutationen der Aminosäure E61, welche in die katalytische Tasche bindet, und Q/L480, welche die C-terminale Helix stabilisiert, weisen eine erhöhte Phosphataseaktivität auf. Interessanterweise zeigt die Mutation der Aminosäure N477, die nicht in Wechselwirkungen zwischen den Domänen involviert ist, eine um 50 % geminderte Sensitivität gegenüber der Aktivierung durch Arachidonsäure¹³⁶. Dies widerspricht der Theorie, dass Arachidonsäure lediglich an die TPR Domäne bindet¹³⁷ und durch Wechselwirkungen mit den hydrophoben Aminosäuren eine Destabilisierung der α -helikalen Struktur der TPR Domäne bewirkt¹¹⁸.

5.5.4 Die Aktivierung von PAPP5 außerhalb der TPR Domäne

Die Struktur der Phosphatase PAPP5 zeigt, dass jeder TPR *Repeat* zwei amphipathische α -helikale Regionen ausbildet. Ein *Repeat* interagiert mit dem nächsten *via* hydrophober Protein-Protein-Wechselwirkungen, welche zudem durch die Interaktion sperriger Seitenketten mit kleineren Seitenketten des nächsten *Repeats* unterstützt werden. Die HDX-MS Experimente zeigen, dass nach der Zugabe von Arachidonsäure das Ende des TPR2 *Repeats* und der Beginn des TPR3 *Repeats* eine

erhöhte Austauschrate aufweisen. Dies spricht dafür, dass die Wechselwirkungen zwischen dem zweiten und dritten *Repeat* gebrochen wurden und eine zumindest teilweise Entfaltung dieses Bereiches stattgefunden hat, was die hohen Austauschraten erklären würde. Unterstützt wird diese Theorie durch den geringeren α -helikalen Anteil in Anwesenheit von Arachidonsäure, der durch CD-Messungen bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 5.14).

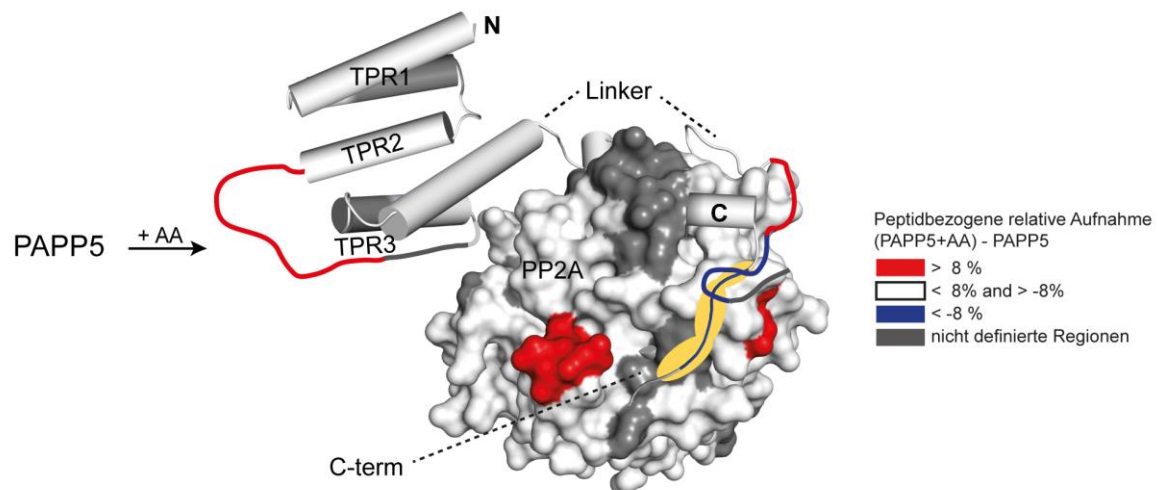


Abbildung 5.14: Modell zur Aktivierung von PAPP5 durch Fettsäuren. Die TPR Domäne, der Linker und das C-terminale inhibitorische Motiv sind mit ihren Sekundärstrukturen und die PP2A Domäne als Oberflächenmodell abgebildet. Die erhöhte Austauschrate der zweiten Helix des TPR2 *Repeats* sowie der ersten Helix des TPR3 *Repeats* nach Inkubation mit Arachidonsäure (engl.: *Arachidonic acid*; kurz AA) ist durch eine Entfaltung dieser Regionen zu erklären. Zudem zeigt ein Bereich der ehemaligen Interaktionsfläche der TPR und PP2A Domäne ebenfalls eine stark erhöhte Austauschrate. Weiterhin weisen eine Region am Ende des Linkers und eine andere am Anfang des C-terminalen Motivs(C-term) eine stark reduzierte Austauschrate auf. Eine Interaktion dieser beiden Regionen könnte ein möglicher Grund hierfür sein. Letztere enthält das Signal für den Eintritt in den Nukleus (gelb hinterlegt).

Die Aminosäuren der PP2A, die mit den TPR1 und TPR2 *Repeats* interagieren besitzen hohe Austauschraten, was auf eine räumliche Trennung dieser Aminosäuren hinweist. Da für den TPR1 *Repeat* und die erste Helix des TPR2 *Repeats* keine Änderungen der Austauschraten auftreten, werden die Wechselwirkungen zwischen den *Repeats* wahrscheinlich noch ausgebildet und die Helix des TPR2 *Repeats* könnte mit dem Linker oder der zweiten Helix dem TPR3 *Repeat* Wechselwirkungen eingehen. Dies würde auch die in der Gelfiltrationschromatographie auftretende größere Spezies nach Inkubation mit Arachidonsäure erklären.

Die zweite Helix des TPR3 *Repeats* weist keine Veränderung der Austauschrate bei Anwesenheit von Arachidonsäure auf, wie auch die Aminosäure Y299 der PP2A, die eine Wechselwirkung zu diesem *Repeat* ausbildet. Dies spricht dafür, dass die Helix weiterhin intakt ist und die gleiche Position in der Struktur besitzt.

Interessanterweise besitzt der Beginn des C-terminalen inhibierenden Motivs sowie das Ende der Linkerregion eine stark reduzierte Austauschrate. Da diese Bereiche die einzigen mit einem stark reduzierten Austausch sind, könnte dies dafür sprechen, dass sie miteinander interagieren. Auch eine Interaktion dieser Regionen mit der Arachidonsäure kann nicht ausgeschlossen werden. Interessanterweise befindet sich in der zweiten Region auch das nukleare Lokalisierungssignal.

Für die letzten fünf Aminosäuren des C-terminalen Motivs konnte keine Peptidabdeckung erreicht werden, so dass keine Aussage über ihr Verhalten bei Anwesenheit von Arachidonsäure getroffen werden kann. Allerdings weisen die direkt interagierenden Aminosäuren der TPR Domäne (T58 und L92) eine erhöhte Austauschrate auf, so dass ein Bruch der Interaktion zu vermuten ist. Weiterhin wäre eine Bindung der Arachidonsäure an die C-terminalen Aminosäuren möglich. Durch die Anlagerung der Fettsäure würde die Masse des Peptids sich verändern, so dass sie nicht mehr automatisch von dem Programm DynamX detektiert werden kann. Eine manuelle Suche nach einem entsprechenden Peptid mit gebundener Arachidonsäure blieb jedoch ohne Erfolg, kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Eine direkte Bindungsstelle der Arachidonsäure in der TPR Domäne konnte nicht identifiziert werden. Jedoch können durch die HDX-MS-Messungen nur die Änderungen im Proteinerückgrat verfolgt werden, so dass eine Bindung über die Seitenketten nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin wäre auch eine Bindung der Arachidonsäure an die Region des Linkers und des C-terminalen inhibierenden Motivs denkbar, da beide einen stark verminderten Austausch aufweisen. Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass allosterische Effekte nicht von potentiellen Bindungsstellen unterschieden werden können.

5.5.5 Photorezeptoren, Fettsäuren und Phosphatasen

Wechselwirkungen zwischen der Phosphatase PAPP5 konnten nicht nur mit Phytochromen beobachtet werden, sondern interessanterweise im Menschen auch

mit den Cryptochromen CRY1 und CRY2^{98,99}. Eine strengere Regulation der Phosphatase im Nukleus scheint notwendig zu sein, da in *Homo sapiens* eine Interaktion mit dessen Cryptochromen im Nukleus die Phosphataseaktivität weiter reduziert³¹⁵. Neben der Bindung von Cryptochromen an die TPR Domäne könnte eine zusätzliche Interaktion mit dem C-terminalen Motiv die Beweglichkeit der Phosphatase weiter einschränken, wodurch die reduzierte Aktivität erklärt werden könnte. Denkbar wäre auch, dass Cryptochrome oder andere Effektoren für die Regulation der Phosphatase nach deren Aktivierung durch Fettsäuren verantwortlich sind. In Pflanzen könnte die Aufgabe der Regulierung der Phosphatase auch von der Linolsäure übernommen werden, da Aktivitätsstudien in dieser Arbeit einen inhibierenden Effekt zeigen konnten (siehe Kapitel 4.2.3). Demzufolge würden Fettsäuren auch die Photorezeptorsignalwege beeinflussen. Jedoch sind weitere Experimente nötig um diesen Effekt zu bestätigen.

Einen definitiven Einfluss der Fettsäuren auf Phytochrome konnte durch Mutationen innerhalb der Phospholipase A nachgewiesen werden, die neben weiteren Phospholipasen für die Abspaltung der Fettsäuren von den Phospholipiden verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass die Abwesenheit der Fettsäuren zu einer gestörten Phytochrom-Signaltransduktion führt³¹⁶.

Interessanterweise befindet sich das nukleare Lokalisierungssignal (462-477) in einer der Regionen von PAPP5, welche nach Inkubation mit Arachidonsäure eine stark verminderte Austauschrate aufweisen. Dies könnte einen Regulationsmechanismus für die Phosphatase darstellen, da sie in Anwesenheit von Arachidonsäure nicht mehr vom Zytosol in den Nukleus eintreten kann. Dies könnte zwei Effekte bewirken. Zum einen wird die Interaktion mit PhyB inhibiert, welche bislang nur im Nukleus beobachtet wurde, und zum anderen, kann so die Konzentration der Phosphatase im Zytosol erhöht werden. Eine Interaktion mit Phytochromen im Zytosol wurde zwar noch nicht beobachtet, ist aber wahrscheinlich, da PAPP5 PhyA in der Scharnierregion dephosphoryliert und so die Affinität gegenüber dem zytosolischen Protein NDPK2 erhöht⁷⁴. Arachidonsäure (oder einer anderen Fettsäure in Pflanzen) könnte neben der Aktivierung auch für die Lokalisierung der Phosphatasen zuständig sein (siehe Abbildung 5.15). Diese Erkenntnis könnte auch die unterschiedlichen Ergebnisse der Lokalisierungsstudien für die menschliche und

die pflanzliche PP5 Phosphatase erklären, da die etwaige Anwesenheit von Fettsäuren nicht berücksichtigt werden konnten^{132,143}. Weitere Lokalisierungsstudien sind notwendig, welche den inhibierten Kerneintritt der Phosphatasen in Anwesenheit von Fettsäuren bestätigen.

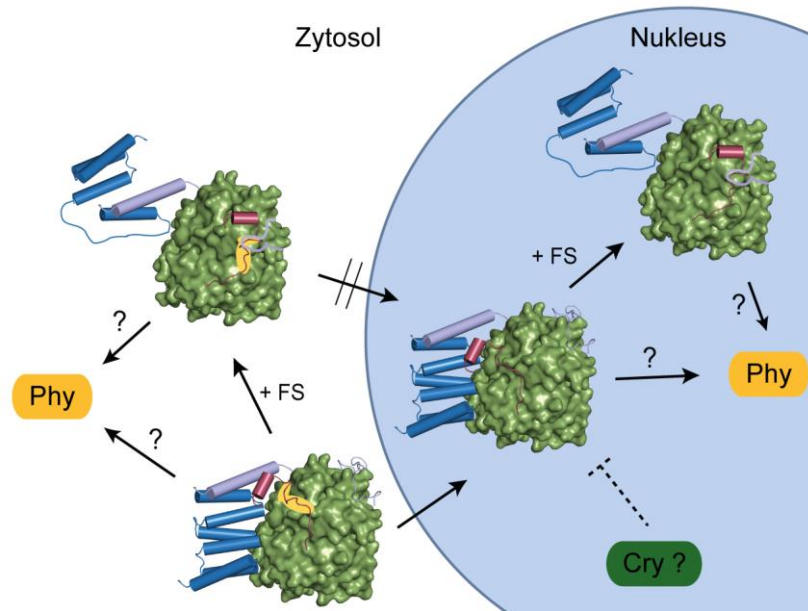


Abbildung 5.15: Einfluss von Fettsäuren auf die Lokalisierung von PAPP5. In der inaktiven Form von PAPP5 liegt das Lokalisierungssignal (orange unterlegt) oberflächenexponiert vor, wird jedoch bei Zugabe von Arachidonsäure blockiert, so dass eine Lokalisierung in den Kern nicht mehr möglich ist. Ob die Phosphatase für die Dephosphorylierung der Phytochrome erst mit einer Fettsäure (FS) aktiviert werden muss, ist noch nicht bekannt. Durch die Interaktion mit Cryptochromen im Kern wird die Phosphataseaktivität im Menschen weiter blockiert. Ob die Interaktion auch in Pflanzen erfolgt ist ungewiss. Phy = Phytochrom; Cry = Cryptochrom.

Unklar ist, ob eine Aktivierung der Phosphatasen durch Fettsäuren für die Dephosphorylierung von Phytochromen notwendig ist, oder dies auch von Phytochromen selbst übernommen werden kann. Phosphataseaktivitätsstudien haben gezeigt, dass die endogene Anwesenheit der HKR Domäne ebenfalls eine Steigerung der Aktivität um das 1.5-fache bewirkt (siehe Kapitel 4.2.5). Allerdings sind weitere Experimente notwendig, um diese Annahme zu bestätigen. Für die menschliche Phosphatase PP5 ist bekannt, dass die Bindung von Hsp90 ebenfalls eine Erhöhung der Phosphataseaktivität ermöglicht¹⁴⁰. Die Bindung an die TPR Domäne bewirkt eine Verschiebung der $\alpha 5$ Helix, wodurch sich vermutlich die $\alpha 7$ -Helix weiter auf die Helix des C-terminalen Motivs zubewegt und diese, um sterisch störenden Wechselwirkungen auszuweichen, von der katalytischen Tasche entfernt³⁰⁰.

Sowie für die HKR Domäne aus Phytochromen als auch für HSP90¹⁴⁰ ist die Steigerung der Phosphataseaktivität viel geringer als die resultierende Aktivierung durch Zugabe von Arachidonsäure. So könnte es sich bei der Aktivierung lediglich um einen unspezifischen Nebeneffekt handeln.

5.5.6 Aktivierung von PAPP5 - Ein Modell für alle PP5 Phosphatasen?

Trotz des omnipräsenten Vorkommens von PP5 Phosphatasen in allen Organismen, zeigen *Knockout* Mutanten von *AtPAPP5* und *Mus musculus* (*Mm*) PP5 verschiedene Phänotypen. Während durch die Abwesenheit von PAPP5 in Pflanzen ein Zwergwachstum verursacht wird⁷⁴, konnten bei Mäusen keine signifikanten äußerlichen Veränderungen gefunden werden. In Säugetieren wurde jedoch ein vermehrtes Tumorwachstum bei einer Überexpression von PP5 beobachtet³¹⁷⁻³¹⁹.

Um eine Aussage über die Übertragbarkeit unseres potentiellen Aktivierungsmechanismus für PAPP5 durch Fettsäuren auf die übrigen Mitglieder der PP5 Familie treffen zu können, wurden die Sequenzidentitäten der PP5 Phosphatasen aus verschiedenen Organismen überprüft und mittel des Servers *Consurf*^{320,321} auf die Struktur von PAPP5 übertragen. Es zeigt sich, dass die aktive Tasche und die Interaktionsfläche der PP2A Domäne mit der TPR Domäne stark konserviert vorliegen (siehe Abbildung 5.16).

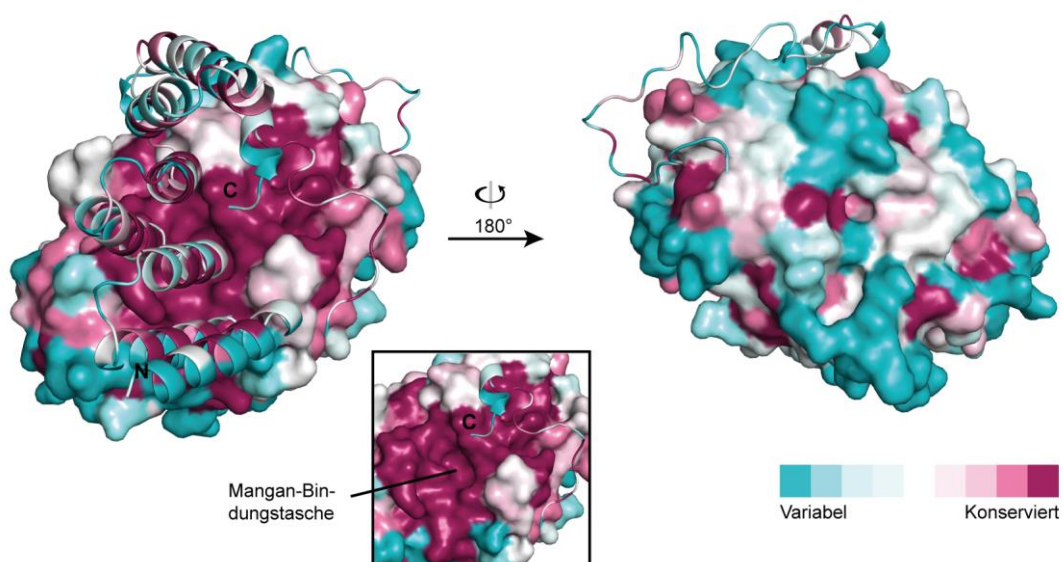


Abbildung 5.16: Einfärbung der PP5 Phosphatasen entsprechend dem Konservierungsgrad. Die TPR Domäne, der Linker und das C-terminale inhibierende Motiv sind mit ihren Sekundärstrukturen und die PP2A Domäne als Oberflächenmodell dargestellt. In der Vergrößerung ist die Manganbindungsstelle

abgebildet, welche streng konserviert in allen PP5 Phosphatasen vorliegt. Die Farbskala von türkis über weiß nach magenta gibt den Konservierungsgrad an, wobei türkis variable und magenta konservierte Aminosäuren markiert.

Das C-terminale inhibierende Motiv weist lediglich in dessen Mitte konservierte Aminosäuren auf. Die zehn C-terminalen Aminosäuren, die auch die C-terminale Helix ausbilden, liegen nicht konserviert vor. Jedoch zeigt ein Vergleich der Strukturen von *AtPAPP5* und *HsPP5*, dass L480 in *AtPAPP5* und Q495 in *HsPP5* beide die C-terminale Helix stabilisieren.

Interessanterweise sind die Aminosäuren in der TPR Domäne, welche mit der C-terminalen Helix interagieren (Y85 und L92), konserviert. Ebenfalls ist die Aminosäure E61, die in die aktive Tasche bindet, in allen PP5 Phosphatasen enthalten. Die weiteren Wechselwirkungen, die zwischen der TPR Domäne und der PP2A Domäne in der Kristallstruktur von PAPP5 beobachtet wurden, sind jedoch nicht konserviert (siehe Abbildung 5.17).

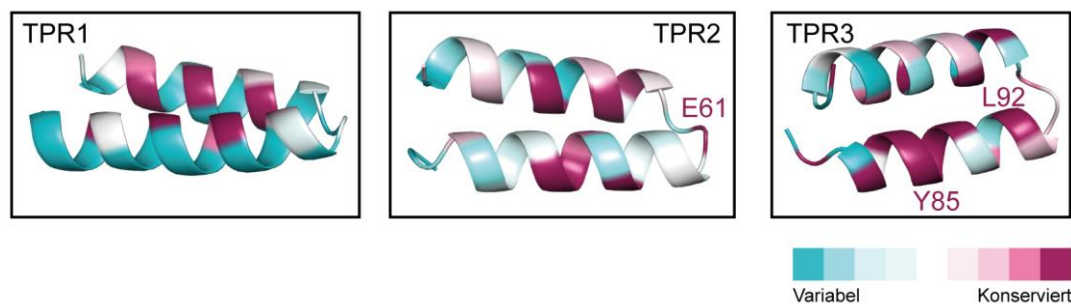


Abbildung 5.17: Einfärbung der PP5 Phosphatasen nach dem Konservierungsgrad der TPR Domänen. E61 bindet in die aktive Tasche der PP2A Domäne und ist in allen PP5 Phosphatasen konserviert. Weiterhin liegen die Reste Y85 und L92, die Wechselwirkungen mit dem C-terminalen Motiv eingehen ebenfalls konserviert vor. Die Farbskala von türkis über weiß nach magenta gibt den Konservierungsgrad an, wobei türkis variable und magenta konservierte Aminosäuren markiert.

Bei der Analyse der HDX-MS Daten vor und nach Inkubation mit Arachidonsäure sind drei Bereiche aufgefallen, die eine stark veränderte Austauschrate aufwiesen. Die zweite Helix des TPR2 *Repeats* und die erste Helix des TPR3 *Repeats* zeigten eine erhöhte Austauschrate nach Inkubation, jedoch liegt nur die erste Helix des TPR3 *Repeats* konserviert vor. Die zwei anderen Bereiche liegen am Ende des Linker und am Anfang der C-terminalen Helix und besitzen eine stark reduzierte Austauschrate nach der Fettsäureinkubation. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der PP5

Phosphatasen zeigte, dass der Bereich des Linkers lediglich drei konservierte Aminosäuren (Y162, G164 und P165) enthält. Im Gegensatz dazu liegt der Beginn des C-terminalen Motivs streng konserviert vor (siehe Abbildung 5.18). Jedoch ist in diesem Bereich auch das Signal für den Eintritt in den Nukleus (S462-N477) lokalisiert, so dass dies den hohen Konservierungsgrad erklären könnte. Auffällig ist jedoch der hohe Anteil an hydrophoben Aminosäuren im C-terminalen Bereich, die auf eine Fettsäurebindung hinweisen könnten.

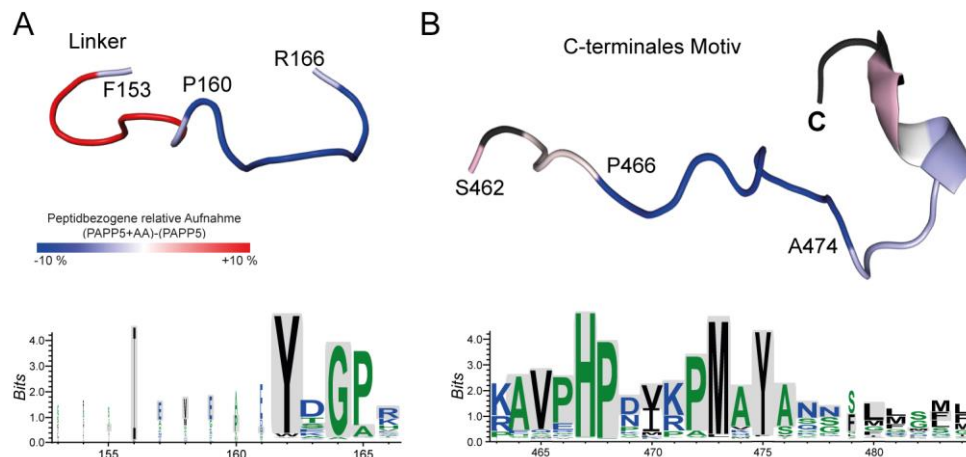


Abbildung 5.18: Vergleich zwischen der HDX-MS-Austauschrate und dem Konservierungsgrad des Linkers (A) sowie des C-terminalen Motivs (B). Die Höhe der Buchstabe steht für den Konservierungsgrad und wurde mittels des Servers *Weblogo*^{284,285} dargestellt ($n = 60$; paarweise Sequenzidentität $< 90\%$). Die grau hinterlegten Bereiche markieren die Sequenz von *AtPAPP5*.

Eine spezifische Bindungsstelle der Arachidonsäure konnte weder durch die HDX-MS Analyse von PAPP5 noch durch einen Sequenzvergleich der Mitglieder der PP5 Familie identifiziert werden. In der TPR Domäne wurde kein Bereich detektiert, der eine stark verminderte Austauschrate aufweist. Auch weisen diese Domänen keinen besonders hohen Konservierungsgrad auf. Weiterhin ist eine Bindung von Fettsäuren an TPR Domänen nicht für andere Proteine bekannt. Eine Bindung der Arachidonsäure kann aber nicht ausgeschlossen werden, da mit der HDX-MS-Messungen lediglich Änderungen am Proteinerückgrat detektiert werden können und eventuell in der Wechselwirkung involvierte Seitenketten die Bindung ausbilden könnten.

Zwei Bereiche mit einer erniedrigten Austauschrate sind besonders aufgefallen und eine Involvierung in die Arachidonsäurebindung ist möglich. Der Bereich im Linker weist drei konservierte Aminosäuren auf, während der Beginn des C-terminalen inhibierenden Motivs fast vollständig konserviert vorliegt. Dies spricht auch dafür,

dass die Inhibition der Lokalisierung durch Arachidonsäure universell für alle PP5 Phosphatasen gilt.

5.6 HDX-MS Analytik – Anwendung auf Photorezeptorproteine und Phosphatasen

In dieser Arbeit wurde die HDX-MS Methode verwendet, um die Regionen im PSM von *AtPhyB* zu identifizieren, in denen strukturelle Änderungen durch die Photokonversion ausgelöst werden. Außerdem konnte durch den Vergleich des Wildtyps mit der Δ NTE Variante ein Packungsmodell für die N-terminale Erweiterung entwickelt werden, die nicht Teil der Kristallstruktur war. Für PAPP5 konnte die Frage nach einem möglichen Aktivierungsmechanismus durch Fettsäuren mit der Identifikation der beteiligten Bereiche weiter vorangebracht werden. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass lediglich die Austauschraten der Wasserstoffatome am Proteinerückgrat unter dem gegebenen Messaufbau detektiert werden können. Eventuell in der Wechselwirkung involvierte Seitenketten weisen eine zu hohe Austauschrate auf, so dass sie während des *online* Verdaus bereits zurücktauschen. Schlussfolgernd kann eine Bindung, in die lediglich Seitenketten involviert sind, nicht *via* HDX-MS per se detektiert werden. Weiterhin können allosterische Effekte nicht von potentiellen Bindungsstellen unterschieden werden.

Wie näher im Anhang in Kapitel 8. 3 erläutert, müssen bei der Analyse von HDX-MS Daten einige Punkte berücksichtigt werden um keine falschen Ergebnisse zu produzieren. Hierbei ist besonders zu beachten, dass die zu untersuchenden Bereiche mit vielen Peptiden abgedeckt sind um aussagefähige Daten erhalten zu können. Eine weitere Möglichkeit die Qualität der erhaltenen Daten zu beurteilen, besteht in der Replikation des Experiments. Die Messungen des *PhyB* Wildtyps im P_{fr} Zustand wurden von Verena Gruth wiederholt um eine mögliche Interaktionsfläche mit PIF3 zu identifizieren²⁷⁰. Trotz der Auswertung unter Verwendung anderer Parameter zur Identifikation der t0-Peptide (siehe Tabelle 5.2), konnte eine insgesamt sehr hohe Reproduktion der Austauschraten der einzelnen Regionen erhalten werden (siehe Abbildung 8.3 und Abbildung 8.4).

Bei beiden Messungen konnte eine ähnliche maximale Austauschrate von 70 % (1. Messung) beziehungsweise 65 % (2. Messung) für die Bereiche (K88-A103) und

(S227-L237) erhalten werden. Dies zeigt, dass in unabhängigen Messungen zwar nicht unbedingt gleiche Peptide erhalten werden, jedoch gleiche Bereiche trotzdem eine hohe Reproduzierbarkeit bezüglich ihrer Austauschrate aufweisen.

Tabelle 5.2: Vergleich der verwendeten Parameter zur Identifikation der t0-Peptide für die P_{fr} Form von AtPhyB(1-651). AS = Aminosäuren.

	Messung 1	Messung 2 ²⁷⁰
Peptidanzahl	151	123
Sequenzabdeckung	83	78
Redundanz	2,2	2,7
Minimale Intensität	10000	20000
Länge der Peptidfragmente	4-16 AS	4-22 AS
Minimale Produkte	0	3
Minimale Produkte per AS	0,1	0,1
Wiederholungen der Peptide	6 aus 8	7 aus 8

Bei beiden Messungen konnte eine ähnliche maximale Austauschrate von 70 % (1. Messung) beziehungsweise 65 % (2. Messung) für die Bereiche (K88-A103) und (S227-L237) erhalten werden. Dies zeigt, dass in unabhängigen Messungen zwar nicht unbedingt gleiche Peptide erhalten werden, jedoch gleiche Bereiche trotzdem eine hohe Reproduzierbarkeit bezüglich ihrer Austauschrate aufweisen.

Insgesamt kann die hohe Qualität der Daten bereits durch die Betrachtung der N-terminalen Erweiterung festgestellt werden. So besitzt der Bereich von L67 bis D82 in beiden Messungen eine mittlere bis leicht erhöhte Austauschrate. Der sich anschließende Bereich Y83-L87, der die beiden Phosphorylierungsstellen (S84 und S86) enthält, besitzt in beiden Messungen eine erhöhte Austauschrate. Weiterhin zeigt die Region um Y276, dessen Mutation zu H einen P_{fr}-artigen Signalzustand ohne die Lichtkonversion P_r→P_{fr} verursacht, in beiden Messungen eine stark reduzierte Austauschrate. Leichte Variationen im Beginn der N-terminalen Erweiterung sowie in der Scharnierregion können auf die geringere Peptidabdeckung in der zweiten Messung zurückgeführt werden.

Probleme ergaben sich bei der Auswertung der ersten Messung von PhyB, da die Region L67-F71 laut *Heatmap* lichtunabhängig auch nach 2 min keinen Wasserstoff-

Deuterium-Austausch aufwies, so dass die Region sehr geschützt oder in starken Wechselwirkungen involviert sein müsste. Die Betrachtung der gesamten Peptidabdeckung für diesen Bereich zeigte jedoch, dass die Peptide in unmittelbarer Nachbarschaft eine höhere Austauschrate besitzen. Die Wiederholung der Messung der P_{fr} Form zeigte keine Peptide mit einem stark reduzierten Austausch in dieser Region, so dass es bei der 1. Messung beispielsweise ein *Carryover* oder eine unspezifische Bindung von Metallen stattgefunden haben könnte (siehe Abbildung 5.19).



Abbildung 5.19: Vergleich der zweier HDX-MS Analysen für einen Bereich in der N-terminalen Erweiterung von *AtPhyB* erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen Deuteriumaufnahme nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot zeigt die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot für eine hohe Aufnahme.

6 Ausblick

Die Kristallisation der pflanzlichen Phytochrome gestaltet sich schwierig und die vorhandenen P_r Struktur besitzt lediglich eine Auflösung von 3,5 Å. Aus diesem Grund kann der Einsatz der Massenspektrometrie in der Strukturaufklärung sowie der Untersuchung der Bindungspartner der Phytochrome neue Einblicke ermöglichen. Die HDX-MS des photosensorischen Moduls aus *Arabidopsis thaliana* von Phytochrom B identifizierte die Bereiche der Struktur die während der Photokonversion eine dynamische Änderung durchlaufen. Um die genauen Positionen der betroffenen Aminosäuren zu ermitteln, könnte Cross-linking-Massenspektrometrie (CX-MS) verwendet werden. Hierbei wird das zu untersuchende Protein mit einer Mischung aus bifunktionale Reagenzien verschiedener definierter Längen inkubiert, anschließend proteolytisch verdaut und die resultierende Peptide *via* Massen-spektrometrie analysiert. Der zwischen zwei Peptiden eingebaute Linker gibt einen Rückschluss auf den Abstand der Peptide in der dreidimensionalen Struktur³²²⁻³²⁴. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, mit der ebenfalls Abstände zwischen zwei Cysteinen bestimmt werden können, besteht in der schnelleren Durchführung, da bei der CX-MS gleichzeitig verschiedene Cross-Linker getestet werden können und nicht erst Cysteinmutanten aufwendig hergestellt werden müssen.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit durch den Vergleich einer Deletionsvariante ohne N-terminale Erweiterung mittels HDX-MS ein Packungsmodell der NTE gegen das PSM von PhyB entwickelt werden. Nichtsdestotrotz, ein direkter Beweis für den genauen Verlauf des Packungsmodells ist noch nicht erbracht. Hierzu wäre eine Kristallstruktur, welche die NTE umfasst, erstrebenswert, doch blieben bisherige Versuche ohne Erfolg. Eine weitere Möglichkeit das Packungsmodell zu bestätigen, besteht in der Vermessung durch SAXS (engl.: *Small angle X-ray scattering*), bei der die Proteinform abgebildet werden kann.

Des Weiteren stellt die CX-MS eine vielversprechende Methode dar um die HDX-MS Ergebnisse, die für die Fettsäureaktivierung von PAPP5 gefunden wurden, zu unterstützen. Ein weiterer Aspekt besteht in der Identifikation der Fettsäure, die in Pflanzen für die Aktivierung der PAPP5 Phosphatasen verantwortlich ist, da

Arachidonsäure üblicherweise nicht in Pflanzen vorkommt. Weiterhin bleibt der Einfluss von Linolsäure zu klären, da sich in dieser Arbeit ein stark inhibierender Effekt zeigte, der jedoch im Widerspruch zur Literatur steht, bei dem Linolsäure auf GST-PP5 Varianten allenfalls einen aktivierenden Effekt zeigte.

General könnten HDX-MS Messungen für die Identifikation der Bindungsstellen der Interaktionspartner von Phytochromen verwendet werden. Dies würde die Aufklärung von Signaltransduktionswegen und das Verständnis der Kommunikation von Pflanzen deutlich voranbringen. Es zeigte sich, dass Phosphorylierungen die Lebensdauer des aktiven Zustandes und die Affinität gegenüber Bindungspartnern deutlich beeinflusst. Ein Einfluss weiterer PTMs, wie beispielsweise Acetylierungen, Nitrosylierungen, Deamidierungen oder Lipidierungen steht jedoch noch aus.

7 Literaturverzeichnis

1. Nabors, M. W. *Botanik*. (Pearson Studium Deutschland, 2007).
2. Montgomery, B. L. Spatiotemporal phytochrome signaling during photomorphogenesis: From physiology to molecular mechanisms and back. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–8 (2016).
3. Heijde, M. & Ulm, R. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci.* **17**, 230–237 (2012).
4. Suetsugu, N., Mittmann, F., Wagner, G., Hughes, J. & Wada, M. A chimeric photoreceptor gene, neochrome, has arisen twice during plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13705–13709 (2005).
5. Litts, J. C., Kelly, J. M. & Lagarias, J. C. Structure-function studies on phytochrome. *J. Biol. Chem.* **258**, 11025–11031 (1983).
6. Vierstra, R. D. & Quail, P. H. Photochemistry of 124 kilodalton Avena phytochrome in vitro. *Plant Physiol.* **72**, 264–267 (1983).
7. Smith, H. Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585–591 (2000).
8. Clack, T., Mathews, S. & Sharrock, R. A. The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* **25**, 413–427 (1994).
9. Somers, D. E., Devlin, P. F. & Kay, S. A. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. *Science (80-)*. **282**, 1488–90 (1998).
10. Devlin, P. F. & Kay, S. A. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* **12**, 2499–2510 (2000).
11. Bae, G. & Choi, G. Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 281–311 (2008).
12. Rockwell, N. C., Su, Y.-S. & Lagarias, J. C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 837–58 (2006).
13. Rockwell, N. C. & Lagarias, J. C. A brief history of phytochromes. *ChemPhysChem* **11**, 1172–1180 (2011).
14. Anders, K., Daminelli-Widany, G., Mroginski, M. A., Von Stetten, D. & Essen, L. O. Structure of the cyanobacterial phytochrome 2 photosensor implies a tryptophan switch for phytochrome signaling. *J. Biol. Chem.* **288**, 35714–35725 (2013).
15. Park, C. M. *et al.* Chromophore-apoprotein interactions in Synechocystis sp. PCC6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry* **39**, 6349–6356 (2000).
16. Cherry, J. R. *et al.* Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* **5**, 565–75 (1993).
17. Essen, L.-O., Mailliet, J. & Hughes, J. The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14709–14 (2008).
18. Yang, X., Kuk, J. & Moffat, K. Crystal structure of Pseudomonas aeruginosa bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14715–20 (2008).
19. Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T. & Vierstra, R. D. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**, 325–331 (2005).
20. Wagner, J. R., Zhang, J., Brunzelle, J. S., Vierstra, R. D. & Forest, K. T. High resolution structure of Deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J. Biol. Chem.* **282**, 12298–12309 (2007).

21. Burgie, E. S., Bussell, A. N., Walker, J. M., Dubiel, K. & Vierstra, R. D. Crystal structure of the photosensing module from a red/far-red light-absorbing plant phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 10179–84 (2014).
22. Anders, K. & Essen, L.-O. The family of phytochrome-like photoreceptors: diverse, complex and multi-colored, but very useful. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **35**, 7–16 (2015).
23. Montgomery, B. L. & Lagarias, J. C. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* **7**, 357–366 (2002).
24. Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science (80-.)*. **277**, 1505–1508 (1997).
25. Auldrige, M. E. & Forest, K. T. Bacterial phytochromes: more than meets the light. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 67–88 (2011).
26. Yeh, K. C. & Lagarias, J. C. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13976–81 (1998).
27. Shin, A.-Y. *et al.* Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nat. Commun.* **7**, 11545 (2016).
28. Burgie, E. S. & Vierstra, R. D. Phytochromes: An atomic perspective on photoactivation and signaling. *Plant Cell Online* **26**, 4568–4583 (2014).
29. Hauser, B., Cordonnier-Pratt, M. M., Daniel-Vedele, F. & Pratt, L. H. The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Mol. Biol.* **29**, 1143–1155 (1995).
30. Mathews, S. & McBreen, K. Phylogenetic relationships of B-related phytochromes in the Brassicaceae: Redundancy and the persistence of phytochrome D. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**, 411–423 (2008).
31. Li, J., Li, G., Wang, H. & Wang Deng, X. Phytochrome signaling mechanisms. *Arabidopsis Book* **9**, e0148 (2011).
32. Ulijasz, A. T. *et al.* Cyanochromes are blue/green light photoreversible photoreceptors defined by a stable double cysteine linkage to a phycocyanobilin-type chromophore. *J. Biol. Chem.* **284**, 29757–29772 (2009).
33. Chen, Y. *et al.* Photophysical diversity of two novel cyanobacteriochromes with phycocyanobilin chromophores: Photochemistry and dark reversion kinetics. *FEBS J.* **279**, 40–54 (2012).
34. Sharrock, R. A. & Quail, P. H. Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* **3**, 1745–1757 (1989).
35. Elich, T. D., McDonagh, A. F., Palma, L. A. & Lagarias, J. C. Phytochrome chromophore biosynthesis: Treatment of tetrapyrrole-deficient *Avena* explants with natural and non-natural bilatrienes leads to formation of spectrally active holoproteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 183–189 (1989).
36. Elich, T. D., Lagarias, J. C., McDonagh, A. F., Palma, L. A. & Lagarias, J. C. Phytochrome chromophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **84**, 304–310 (1987).
37. Scheer, H. & Zhao, K. H. Biliprotein maturation: The chromophore attachment. *Mol. Microbiol.* **68**, 263–276 (2008).
38. Davis, S. J., Kurepa, J. & Vierstra, R. D. The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6541–6546 (1999).
39. Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T. & Lagarias, J. C. Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**, 965–978 (2001).
40. Chen, Y.-R., Su, Y. -s. & Tu, S.-L. Distinct phytochrome actions in nonvascular plants revealed by targeted inactivation of phytyl bilin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**,

- 8310–8315 (2012).
41. Siegelman, H. W., Turner, B. C. & Hendricks, S. B. The chromophore of phytochrome. *Plant Physiol.* **41**, 1289–92 (1966).
 42. Vitro, P. I. N., Lagarias, J. C. & Mercurio, M. Structure function studies on phytochrome. *J. Biol. Chem.* **260**, 2415–2423 (1985).
 43. Jones, A. M. & Quail, P. H. Quaternary structure of 124-kilodalton phytochrome from *Avena sativa* L. *Biochemistry* **25**, 2987–2995 (1986).
 44. Wagner, J. R. *et al.* Mutational analysis of *Deinococcus radiodurans* bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes. *J. Biol. Chem.* **283**, 12212–12226 (2008).
 45. Von Stetten, D. *et al.* Highly conserved residues Asp-197 and His-250 in Agp1 phytochrome control the proton affinity of the chromophore and Pfr formation. *J. Biol. Chem.* **282**, 2116–2123 (2007).
 46. Hahn, J. *et al.* Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis. *FEBS J.* **273**, 1415–1429 (2006).
 47. Hirose, Y. *et al.* Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4974–9 (2013).
 48. Mathews, S. Evolutionary studies illuminate the structural-functional model of plant phytochromes. *Plant Cell* **22**, 4–16 (2010).
 49. Cordonnier, M.-M., Greppin, H. & Pratt, L. H. Monoclonal antibodies with differing affinities to the red- absorbing and far-red-absorbing forms of phytochrome. *Biochemistry* **24**, 3246–3253 (1985).
 50. Vierstra, R. D., Quail, P. H., Hahn, T. R. & Song, P. S. Comparison of the protein conformations between different forms (Pr and Pfr) of native (124 kDa) and degraded (118/114 kDa) phytochromes from *Avena sativa*. *Photochem. Photobiol.* **45**, 429–32 (1987).
 51. Hahn, T. R., Song, P. S., Quail, P. H. & Vierstra, R. D. Tetranitromethane oxidation of phytochrome chromophore as a function of spectral form and molecular weight. *Plant Physiol.* **74**, 755–8 (1984).
 52. Jones, A. M., Vierstra, R. D., Daniels, S. M. & Quail, P. The role of separate molecular domains in the structure of phytochrome from etiolated *Avena sativa* L. *Planta* **164**, 501–506 (1985).
 53. Vierstra, R. D. & Quail, P. H. Native phytochrome: Inhibition of proteolysis yields a homogeneous monomer of 124 kilodaltons from *Avena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 5272–6 (1982).
 54. Cherry, J. R., Hondred, D., Walker, J. M. & Vierstra, R. D. Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 5039–5043 (1992).
 55. Wong, Y. S., Cheng, H. C., Walsh, D. A. & Lagarias, J. C. Phosphorylation of *Avena* phytochrome in vitro as a probe of light-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* **261**, 12089–12097 (1986).
 56. McMichael, R. W. & Lagarias, J. C. Phosphopeptide mapping of *Avena* phytochrome phosphorylated by protein kinases in vitro. *Biochemistry* **29**, 3872–8 (1990).
 57. Lapko, V. N., Jiang, X. Y., Smith, D. L. & Song, P. S. Posttranslational modification of oat phytochrome A: Phosphorylation of a specific serine in a multiple serine cluster. *Biochemistry* **36**, 10595–10599 (1997).
 58. Medzihradzky, M. *et al.* Phosphorylation of phytochrome B inhibits light-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 535–44 (2013).
 59. Nito, K., Wong, C. C. L. C. L., Yates, J. R. R. & Chory, J. Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell Rep.* **3**, 1970–1979 (2013).

60. Stockhaus, J. *et al.* Serine-to-alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Dev.* **6**, 2364–2372 (1992).
61. Su, Y. & Lagarias, J. C. Light-independent phytochrome signaling mediated by dominant GAF domain tyrosine mutants of Arabidopsis phytochromes in transgenic plants. *Plant Cell* **19**, 2124–2139 (2007).
62. Chen, M., Schwab, R. & Chory, J. Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14493–8 (2003).
63. Sharrock, R. A. & Clack, T. Heterodimerization of type II phytochromes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11500–5 (2004).
64. Clack, T. *et al.* Obligate heterodimerization of Arabidopsis phytochromes C and E and interaction with the PIF3 basic helix-loop-helix transcription factor. *Plant Cell* **21**, 786–99 (2009).
65. Hirschfeld, M., Tepperman, J. M., Clack, T., Quail, P. H. & Sharrock, R. A. Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of Arabidopsis as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* **149**, 523–535 (1998).
66. Monte, E. *et al.* Isolation and characterization of phyC mutants in Arabidopsis reveals complex crosstalk between phytochrome signaling pathways. *Plant Cell* **15**, 1962–80 (2003).
67. Möglich, A., Ayers, R. A. & Moffat, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. *Structure* **17**, 1282–94 (2009).
68. Erbel, P. J. A., Card, P. B., Karakuzu, O., Bruick, R. K. & Gardner, K. H. Structural basis for PAS domain heterodimerization in the basic helix-loop-helix-PAS transcription factor hypoxia-inducible factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15504–9 (2003).
69. Vreede, J., Van der Horst, M. A., Hellingwerf, K. J., Crielgaard, W. & Van Aalten, D. M. F. PAS domains. Common structure and common flexibility. *J. Biol. Chem.* **278**, 18434–18439 (2003).
70. Pandini, A. & Bonati, L. Conservation and specialization in PAS domain dynamics. *Protein Eng. Des. Sel.* **18**, 127–137 (2005).
71. Gilles-Gonzalez, M.-A. & Gonzalez, G. Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *J. Appl. Physiol.* **96**, 774–83 (2004).
72. Amezcua, C. A., Harper, S. M., Rutter, J. & Gardner, K. H. Structure and interactions of PAS Kinase N-terminal PAS domain: Model for intramolecular kinase regulation. *Structure* **10**, 1349–1361 (2002).
73. Wong, Y. S. & Lagarias, J. C. Affinity labeling of Avena phytochrome with ATP analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3469–73 (1989).
74. Ryu, J. S. *et al.* Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell* **120**, 395–406 (2005).
75. Phee, B.-K. *et al.* A novel protein phosphatase indirectly regulates phytochrome-interacting factor 3 via phytochrome. *Biochem. J.* **415**, 247–55 (2008).
76. Zhu, Y., Tepperman, J. M., Fairchild, C. D. & Quail, P. H. Phytochrome B binds with greater apparent affinity than phytochrome A to the basic helix-loop-helix factor PIF3 in a reaction requiring the PAS domain of PIF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13419–24 (2000).
77. Shimizu-Sato, S., Huq, E., Tepperman, J. M. & Quail, P. H. A light-switchable gene promoter system. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1041–4 (2002).
78. Ni, M., Tepperman, J. M. & Quail, P. H. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**, 781–784 (1999).
79. Tokuhisa, J. G., Daniels, S. M. & Quail, P. H. Phytochrome in green tissue: Spectral and immunochemical evidence for two distinct molecular species of phytochrome in light-

- grown *Avena sativa* L. *Planta* **164**, 321–332 (1985).
80. Furuya, M. Molecular properties and biogenesis of phytochrome I and II. *Adv. Biophys.* **25**, 133–67 (1989).
 81. Abe, H., Yamamoto, K. T., Nagatani, A. & Furuya, M. Characterization of green Tissue-specific phytochrome isolated immunochemically from pea seedlings. *Plant Cell Physiol.* **26**, 1387–1399 (1985).
 82. Casal, J. J., Cerdán, P. D., Staneloni, R. J. & Cattaneo, L. Different phototransduction kinetics of phytochrome A and phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **116**, 1533–1538 (1998).
 83. Wang, H. & Deng, X. W. Phytochrome signaling mechanism. *Arab. B.* **3**, 13419 (2004).
 84. Franklin, K. A., Allen, T. & Whitelam, G. C. Phytochrome A is an irradiance-dependent red light sensor. *Plant J.* **50**, 108–117 (2007).
 85. Hiltbrunner, A. *et al.* Nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor requires FHY1. *Curr. Biol.* **15**, 2125–30 (2005).
 86. Hiltbrunner, A. *et al.* FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol.* **47**, 1023–1034 (2006).
 87. Hisada, A. *et al.* Light-induced nuclear translocation of endogenous pea phytochrome A visualized by immunocytochemical procedures. *Plant Cell* **12**, 1063–78 (2000).
 88. Kim, L. *et al.* Light-induced nuclear import of phytochrome-A: GFP fusion proteins is differentially regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis*. *Plant J.* **22**, 125–133 (2000).
 89. Kircher, S. *et al.* Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**, 1541–55 (2002).
 90. Leivar, P. *et al.* Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness. *Curr. Biol.* **18**, 1815–1823 (2008).
 91. Park, E. *et al.* Degradation of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signaling. *Plant Cell Physiol.* **45**, 968–75 (2004).
 92. Yang, J. *et al.* Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**, 804–21 (2005).
 93. Seo, H. S. *et al.* LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **423**, 995–999 (2003).
 94. Saijo, Y. *et al.* The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.* **17**, 2642–7 (2003).
 95. Jang, I. C., Yang, J. Y., Seo, H. S. & Chua, N. H. HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **19**, 593–602 (2005).
 96. Matsushita, T., Mochizuki, N. & Nagatani, A. Dimers of the N-terminal domain of phytochrome B are functional in the nucleus. *Nature* **424**, 571–4 (2003).
 97. Ni, M., Tepperman, J. M. & Quail, P. H. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657–67 (1998).
 98. Más, P., Devlin, P. F., Panda, S. & Kay, S. a. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**, 207–211 (2000).
 99. Ahmad, M. & Cashmore, A. R. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162–6 (1993).
 100. Takagi, S., Kong, S.-G., Mineyuki, Y. & Furuya, M. Regulation of actin-dependent cytoplasmic motility by type II phytochrome occurs within seconds in *Vallisneria spiralis* epidermal cells. *Plant Cell* **15**, 331–45 (2003).

101. Tanada, T. A rapid photoreversible response of barley root tips in the presence of 3-indoleacetic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**, 376–80 (1968).
102. Jaedicke, K. *et al.* A phytochrome-phototropin light signaling complex at the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 12231–12236 (2012).
103. Fankhauser, C. *et al.* PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* **284**, 1539–41 (1999).
104. Kim, J. *et al.* Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein – protein interaction. **16**, 2629–2640 (2004).
105. Wang, H., Chevalier, D., Larue, C., Ki Cho, S. & Walker, J. C. The protein phosphatases and protein kinases of Arabidopsis thaliana. *Arab. B.* **5**, e0106 (2007).
106. Kerk, D., Templeton, G. & Moorhead, G. B. G. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. *Plant Physiol.* **146**, 351–67 (2008).
107. Olsen, J. V. *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635–648 (2006).
108. Kim, D., Kang, J. & Yang, S. A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in Arabidopsis. *Sci. ...* **14**, 3043–3056 (2002).
109. Kim, J.-I. *et al.* Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**, 2629–40 (2004).
110. Barford, D., Das, a K. & Egloff, M. P. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133–164 (1998).
111. Farkas, I., Dombrádi, V., Miskei, M., Szabados, L. & Koncz, C. Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci.* **12**, 169–76 (2007).
112. Goldberg, Y. Protein phosphatase 2A: Who shall regulate the regulator? *Biochem. Pharmacol.* **57**, 321–328 (1999).
113. McCright, B. & Virshup, D. M. Identification of a new family of protein phosphatase 2A regulatory subunits. *J. Biol. Chem.* **270**, 26123–8 (1995).
114. Wera, S. & Hemmings, B. A. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* **311** (Pt 1, 17–29 (1995).
115. Cohen, P. T. Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 245–51 (1997).
116. Andreeva, A. V., Evans, D. E., Hawes, C. R., Bennett, N. & Kutuzov, M. A. PP7, a plant phosphatase representing a novel evolutionary branch of eukaryotic protein Ser/Thr phosphatases. *Biochem Mol Biol Int* **44**, 703–715 (1998).
117. Andreeva, A. V. & Kutuzov, M. A. RdgC/PP5-related phosphatases: Novel components in signal transduction. *Cell. Signal.* **11**, 555–562 (1999).
118. Yang, J. *et al.* Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J.* **24**, 1–10 (2005).
119. Andreeva, A. V., Solov'eva, O. V., Kakuev, D. L. & Kutuzov, M. A. Purification of plant protein phosphatase PP7 and evidence for its redox regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* **396**, 65–70 (2001).
120. Bollen, M. & Beullens, M. Signaling by protein phosphatases in the nucleus. *Trends Cell Biol.* **12**, 138–45 (2002).
121. Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. & Barford, D. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.* **15**, 6798–809 (1996).
122. Egloff, M. P., Cohen, P. T., Reinemer, P. & Barford, D. Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate. *J. Mol. Biol.* **254**, 942–59 (1995).

123. Goldberg, J. *et al.* Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1. *Nature* **376**, 745–53 (1995).
124. Chattopadhyay, D. *et al.* Crystal structures and mutagenesis of PPP-family ser/thr protein phosphatases elucidate the selectivity of cantharidin and novel norcantharidin-based inhibitors of PP5C. *Biochem. Pharmacol.* **109**, 14–26 (2016).
125. Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M. & Rüegg, J. C. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin. *FEBS Lett.* **217**, 81–4 (1987).
126. Li, Y. M. & Casida, J. E. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11867–70 (1992).
127. Honkanen, R. E. Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. *FEBS Lett.* **330**, 283–6 (1993).
128. Swingle, M., Ni, L. & Honkanen, R. E. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol. Biol.* **365**, 23–38 (2007).
129. Bertini, I., Calderone, V., Fragai, M., Luchinat, C. & Talluri, E. Structural basis of serine/threonine phosphatase inhibition by the archetypal small molecules cantharidin and norcantharidin. *J. Med. Chem.* **52**, 4838–4843 (2009).
130. Lê, L. H. *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of fostriecin given as an intravenous bolus daily for five consecutive days. *Invest. New Drugs* **22**, 159–167 (2004).
131. Swingle, M. R. *et al.* Structure-activity relationship studies of fostriecin, cytostatin, and key analogs, with PP1, PP2A, PP5, and (beta12–beta13)-chimeras (PP1/PP2A and PP5/PP2A), provide further insight into the inhibitory actions of fostriecin family inhibitors. *J. Pharmacol Exp Ther.* **331**, 45–53 (2009).
132. Chen, M. X. *et al.* A novel human protein serine/threonine phosphatase, which possesses four tetratricopeptide repeat motifs and localizes to the nucleus. *EMBO J.* **13**, 4278–90 (1994).
133. Hinds, T. D. & Sánchez, E. R. Protein phosphatase 5. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **40**, 2358–2362 (2008).
134. Main, E. R. G., Xiong, Y., Cocco, M. J., D’Andrea, L. & Regan, L. Design of stable alpha-helical arrays from an idealized TPR motif. *Structure* **11**, 497–508 (2003).
135. Zeke, T., Morrice, N., Azquez-Martin, C. & Cohen, P. T. W. Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocodazole. *Biochem. J* **385**, 45–56 (2005).
136. Kang, H., Sayner, S. L., Gross, K. L., Russell, L. C. & Chinkers, M. Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry* **40**, 10485–90 (2001).
137. Chen, M. X. & Cohen, P. T. W. Activation of protein phosphatase 5 by limited proteolysis or the binding of polyunsaturated fatty acids to the TPR domain. *FEBS Lett.* **400**, 136–140 (1997).
138. Sinclair, C. *et al.* The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of Ser/Thr protein phosphatase 5. *J. Biol. Chem.* **274**, 23666–72 (1999).
139. Skinner, J. *et al.* Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J. Biol. Chem.* **272**, 22464–22471 (1997).
140. Ramsey, A. J. & Chinkers, M. Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. *Biochemistry* **41**, 5625–32 (2002).
141. Meek, S., Morrice, N. & MacKintosh, C. Microcystin affinity purification of plant protein phosphatases: PP1C, PP5 and a regulatory A-subunit of PP2A. *FEBS Lett.* **457**, 494–498 (1999).
142. de la Fuente van Bentem, S. *et al.* The subcellular localization of plant protein

- phosphatase 5 isoforms is determined by alternative splicing. *Plant Physiol.* **133**, 702–12 (2003).
143. Park, J. H., Kim, W. Y., Chae, H. B., Kim, M. G. & Lee, S. Y. Serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5) interacts with substrate under heat stress conditions and forms protein complex in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* **7**, 535–538 (2012).
144. Park, J. H. *et al.* Heat-induced chaperone activity of serine/threonine protein phosphatase 5 enhances thermotolerance in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **191**, 692–705 (2011).
145. Phee, B.-K. *et al.* Identification of phytochrome-interacting protein candidates in Arabidopsis thaliana by co-immunoprecipitation coupled with MALDI-TOF MS. *Proteomics* **6**, 3671–80 (2006).
146. Shen, Y., Kim, J. & Song, P. NDPK2 as a signal transducer in the phytochrome-mediated light signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 5740–5749 (2005).
147. Ruckle, M. E., DeMarco, S. M. & Larkin, R. M. Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 3944–3960 (2007).
148. Barajas-López, J. de D. *et al.* PAPP5 Is Involved in the Tetrapyrrole Mediated Plastid Signalling during Chloroplast Development. *PLoS One* **8**, e60305 (2013).
149. Ruckle, M. E. & Larkin, R. M. Plastid signals that affect photomorphogenesis in Arabidopsis thaliana are dependent on genomes incoupled 1 and cryptochrome 1. *New Phytol.* **182**, 367–79 (2009).
150. Xue, T. *et al.* Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **9**, 550 (2008).
151. Schweighofer, A., Hirt, H. & Meskiene, I. Plant PP2C phosphatases: Emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci.* **9**, 236–243 (2004).
152. Kerk, D. *et al.* The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**, 908–25 (2002).
153. Cohen, P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453–508 (1989).
154. Wang, W. M. *et al.* PAPP2C interacts with the atypical disease resistance protein RPW8.2 And negatively regulates salicylic acid-dependent defense responses in arabidopsis. *Mol. Plant* **5**, 1125–1137 (2012).
155. Studier, F. & Moffatt, B. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130 (1986).
156. Merck Millipore. pCDFDuet-1 Vektor. Available at: https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/pCDFDuet%25E2%2584%25A2-1-DNA---Novagen,EMD_BIO-71340.
157. Merck Millipore. pET-28a(+).
158. Landgraf, F. T. Expression von Holophytochrom in Escherichia coli. *Inst. für Allg. Bot. und Pflanzenphysiologie PhD*, 120 (2003).
159. Landgraf, F. T., Forreiter, C., Hurtado Picó, A., Lamparter, T. & Hughes, J. Recombinant holophytochrome in Escherichia coli. *FEBS Lett.* **508**, 459–462 (2001).
160. IDTDNA. Calculation of Tm for Oligonucleotide Duplexes. (2011). Available at: <http://eu.idtdna.com>.
161. Taylor, R. G., Walker, D. C. & McInnes, R. R. E.coli host strains. **21**, 1677–1678 (1993).
162. McEntee, K. Protein X is the product of the recA gene of Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5275–5279 (1977).
163. Grodberg, J. & Dunn, J. J. Ompt encodes the Escherichia-coli outer-membrane protease that cleaves T7-RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245–1253 (1988).

164. Fu, G. K. & Markovitz, D. M. The human LON protease binds to mitochondrial promoters in a single- stranded, site-specific, strand-specific manner. *Biochemistry* **37**, 1905–1909 (1998).
165. Jerpseth, M., Jerpseth, B., Briester, L. & Greener, A. No Title. *Strategies* **11**, 3–4 (1998).
166. Invitrogene. in *Genotypes of competent cells*
167. Stratagene. ArcticExpress (DE3) Competent Cells Instruction Manual.
168. Novy, R., Drott, D., Yaeger, K. & Mierendorf, R. Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression. *Innovations* 4–6 (2001).
169. Sambrook, M. F. *Molecular cloning: A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
170. K, M. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **51**, 263–273 (1986).
171. KB, M. & FA., F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzym.* **155**, 335–350 (1987).
172. Cranenburgh, R. M. An equation for calculating the volumetric ratios required in a ligation reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 200–202 (2004).
173. Sabelnikov, A. G., Avdeeva, A. V. & Ilyashenko, B. N. Enhanced uptake of donor DNA by Ca²⁺ treated Escherichia coli cells. *Mol Gen Genet.* **138**, 351–358 (1975).
174. Wood, R. D. *Nucleic Acids Research.* **17**, 8073–8091 (1989).
175. Mülhardt, C. *Der Experimentator - Molekularbiologie / Genomics*. (Spektrum akademischer Verlag, 2009).
176. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–7 (1977).
177. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598–599 (1975).
178. Arnold, F. H. Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Biotechnology. (N. Y.)* **9**, 151–6 (1991).
179. Hladky, S. B. & Haydon, D. A. 1970 Nature Publishing Group. *Group* **225**, 451–453 (1970).
180. Bennett, J. & Scott, K. J. Quantitative staining of Fraction I protein in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue. *Anal. Biochem.* **43**, 173–182 (1971).
181. Berkelman, T. R. & Lagarias, J. C. Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **156**, 194–201 (1986).
182. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4 (1979).
183. Kyhse-Andersen, J. Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polycrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203–209 (1984).
184. Berne R, B. J. & Pecora, R. *Dynamic Light Scattering: With Application to Chemistry, Biology and Physics*. (Dover Publications, 2000).
185. Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H. & Kern, D. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **40**, 372–382 (2012).
186. Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
187. Mallia, A. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid '. **85**, 76–85 (1985).
188. Greenfield, N. J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochem.* **235**, 1–10 (1996).

189. Kelly, S. & Price, N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 349–384 (2000).
190. Kaltashov, I., Bobst, C. & Abzalimov, R. H/D exchange and mass spectrometry in the studies of protein conformation and dynamics: is there a need for a top-down approach? *Anal. Chem.* **81**, 7892–7899 (2009).
191. DePristo, M. A., De Bakker, P. I. W. & Blundell, T. L. Heterogeneity and inaccuracy in protein structures solved by X-ray crystallography. *Structure* **12**, 831–838 (2004).
192. Cooke, R. M. Protein NMR extends into new fields of structural biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 359–364 (1997).
193. Liebert, M. A., Garcia, R. A., Pantazatos, D. & Villarreal, F. J. Investigating Protein-Ligand Interactions. **2**, (2004).
194. Maier, C. S. & Deinzer, M. L. Protein conformations, interactions, and H/D exchange. *Methods Enzymol.* **402**, 312–360 (2005).
195. Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Q Rev Biophys* **16**, 521–655. (1983).
196. Weis, D. D. No Title. (2013). Available at: <https://mvsc.ku.edu/content/hydrogen-deuterium-exchange-mass-spectrometry>. (Accessed: 1st July 2016)
197. Konermann, L., Pan, J. & Liu, Y.-H. H. Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 1224–1234 (2011).
198. Kim, K. S. & Woodward, C. Protein internal flexibility and global stability: effect of urea on hydrogen exchange rates of bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **32**, 9609–9613 (1993).
199. Krishna, M. M. G., Hoang, L., Lin, Y. & Englander, S. W. Hydrogen exchange methods to study protein folding. *Methods* **34**, 51–64 (2004).
200. Cawley, A. T. & Flenker, U. The application of carbon isotope ratio mass spectrometry to doping control. *J. Mass Spectrom.* **43**, 854–864 (2008).
201. Busenlehner, L. S. & Armstrong, R. N. Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 34–46 (2005).
202. Konermann, L., Tong, X. & Pan, Y. Protein structure and dynamics studied by mass spectrometry: H / D exchange , hydroxyl radical labeling , and related approaches. 1021–1036 (2008). doi:10.1002/jms
203. Lísal, J. *et al.* Functional visualization of viral molecular motor by hydrogen-deuterium exchange reveals transient states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 460–466 (2005).
204. Eswar, N. *et al.* *Comparative protein structure modeling using Modeller*. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 5**, (2006).
205. MacKintosh, C. *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*. (IRL Press, 1993).
206. Zhang, Z. Y. & VanEtten, R. L. Pre-steady-state and steady-state kinetic analysis of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. *J. Biol. Chem.* **266**, 1516–1525 (1991).
207. Duhr, S. & Braun, D. Thermophoretic depletion follows Boltzmann distribution. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 168301 (2006).
208. Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* **1**, 100 (2010).
209. Zelent, B., Troxler, T. & Vanderkooi, J. M. Temperature dependence for fluorescence of beta-NADH in glycerol/water solution and in trehalose/sucrose glass. *J. Fluoresc.* **17**, 37–42 (2007).
210. Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T. & Tanke, H. J. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **68**, 2588–2600 (1995).
211. Nanotemper. Available at: <http://www.nanotemper->

- technologies.com/products/monolith-series/monolith-nt115-series/. (Accessed: 22nd April 2016)
212. Seidel, S. A. I. *et al.* Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* **59**, 301–315 (2013).
 213. Jacobson, M. P., Friesner, R. A., Xiang, Z. & Honig, B. On the role of the crystal environment in determining protein side-chain conformations. *J. Mol. Biol.* **320**, 597–608 (2002).
 214. Søndergaard, C. R. *et al.* Structural artifacts in protein-ligand X-ray structures: Implications for the development of docking scoring functions. *J. Med. Chem.* **52**, 5673–5684 (2009).
 215. Jancarik, J. & Kim, S. H. Sparse matrix sampling. A screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **24**, 409–411 (1991).
 216. Qiagen. NeXtal Composition Tables. (2015). Available at: <http://www.qiagen.com/products/protein/crystallization/compositiontables/default.aspx>.
 217. Lesley, S. A. & Wilson, I. A. Protein production and crystallization at the Joint Center for Structural Genomics. *J. Struct. Funct. Genomics* **6**, 71–79 (2005).
 218. Newman, J. *et al.* Towards rationalization of crystallization screening for small- To medium-sized academic laboratories: The PACT/JCSG+ strategy. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **61**, 1426–1431 (2005).
 219. Page, R. *et al.* Shotgun crystallization strategy for structural genomics: An optimized two-tiered crystallization screen against the *Thermotoga maritima* proteome. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1028–1037 (2003).
 220. Saridakis, E. & Chayen, N. E. Improving protein crystal quality by decoupling nucleation and growth in vapor diffusion. *Protein Sci.* **9**, 755–757 (2000).
 221. Davies, D. R. & Segal, D. M. *Methods in Enzymology*. **22**, (Academic Press, 1971).
 222. Bergfors, T. M. *Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips*. (IUL Biotechnology Series, 1999).
 223. D’Arcy, A., Mac Sweeney, A. & Haber, A. Using natural seeding material to generate nucleation in protein crystallization experiments. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1343–1346 (2003).
 224. Rhodes, G. *Crystallography Made Crystal Clear*. (Academic Press, 2006).
 225. Drenth, J. *Principles of Protein X-Ray Crystallography*. (Springer, 2007).
 226. Powell, H. R., Johnson, O. & Leslie, A. G. W. Autoindexing diffraction images with iMosflm. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1195–1203 (2013).
 227. Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. W. iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 271–281 (2011).
 228. Massa, W. *Kristallstrukturbestimmung*. (Vieweg+Teubner, 2011).
 229. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132 (2010).
 230. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 795–800 (1993).
 231. Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 133–144 (2010).
 232. Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82 (2006).
 233. Hendrickson, W. A., Smith, J. L. & Sheriff, S. Direct phase determination based on anomalous scattering. *Methods Enzymol.* **115**, 41–55 (1985).
 234. Rossmann, M. G., Ford, G. C., Watson, H. C. & Banaszak, L. J. Molecular symmetry of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **64**, 237–245 (1972).

235. Crick, F. H. C. & Magdoff, B. S. The theory of the method of isomorphous replacement for protein crystals. I. *Acta Cryst* **9**, 901–908 (1956).
236. Hendrickson, W. A. Analysis of protein structure from diffraction measurement at multiple wavelengths. *Trans. Am. Crystallogr. Assoc.* **21**, (1985).
237. Taylor, G. The phase problem. *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* **59**, 1881–1890 (2003).
238. Rossmann, M. G. & Blow, D. M. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr.* **15**, 24–31 (1962).
239. Huber, R. Die automatisierte Faltmolekulmethode. *Acta Crystallogr.* **19**, 353–356 (1965).
240. DiMaio, F. *et al.* Improved molecular replacement by density- and energy-guided protein structure optimization. *Nature* **473**, 540–3 (2011).
241. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674 (2007).
242. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221 (2010).
243. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255 (1997).
244. Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W. & Adams, P. D. The phenix refinement framework. *CCP4 Newsl. protein Crystallogr.* **42**, 1–7 (2005).
245. Rhodes, G. *Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models.* (Academic Press, 2006).
246. Blow, D. *Protein Crystallography for Biologists.* (Oxford University Press, 2002).
247. Messerschmidt, A. *X-Ray Crystallography of Biomacromolecules.* (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007).
248. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Storoni, L. C. & Read, R. J. Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **61**, 458–464 (2005).
249. Winn, M. D., Murshudov, G. N. & Papiz, M. Z. Macromolecular TLS Refinement in REFMAC at Moderate Resolutions. *Methods Enzymol.* **374**, 300–321 (2003).
250. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10037–41 (2001).
251. Sharrock, R. A. & Clack, T. Patterns of expression and normalized levels of the five Arabidopsis phytochromes. *Plant Physiol.* **130**, 442–56 (2002).
252. Velazquez Escobar, F. *et al.* Conformational heterogeneity of the Pfr chromophore in plant and cyanobacterial phytochromes. *Front. Mol. Biosci.* **2**, 37 (2015).
253. Vierstra, R. D. & Zhang, J. Phytochrome signaling: Solving the gordian knot with microbial relatives. *Trends Plant Sci.* **16**, 417–426 (2011).
254. Klasen, R. Interaktionsstudien zwischen dem pflanzlichen Phytochrom B und seiner assoziierten Phosphatase PAPP2c. (Philipps-Universität Marburg, 2016).
255. Mroginski, M. A. *et al.* Structure of the chromophore binding pocket in the Pr state of plant phytochrome phyA. *J. Phys. Chem. B* **115**, 1220–1231 (2011).
256. Salewski, J. *et al.* Structure of the biliverdin cofactor in the Pfr state of bathy and prototypical phytochromes. *J. Biol. Chem.* **288**, 16800–16814 (2013).
257. Strass, S. Lokalisierung der lichtabhängigen Konformationsänderung von Photorezeptor Appendizes. (Philipps-Universität Marburg, 2016).
258. Papers, J. B. C. *et al.* Crystallographic and electron microscopic analyses of a bacterial phytochrome reveal local and global rearrangements during photoconversion. *J. Biol.*

- Chem.* **289**, 24573–24587 (2014).
259. Mailliet, J. *et al.* Spectroscopy and a high-resolution crystal structure of Tyr263 mutants of cyanobacterial phytochrome Cph1. *J. Mol. Biol.* **413**, 115–127 (2011).
260. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
261. Glick, J., Santoyo, G. & Casey, P. J. Arachidonate and related unsaturated fatty acids selectively inactivate the guanine nucleotide-binding regulatory protein, G. *J. Biol. Chem.* **271**, 2949–2954 (1996).
262. Horsten, S. von. Funktionelle Analyse C-terminaler Phytochromdomänen. (Philipps-Universität Marburg, 2012).
263. Mailliet, J. Structural characterisation of cyanobacterial phytochrome Cph1. (Justus-Liebig-Universität Gießen, 2011).
264. Yang, Z. R., Thomson, R., McNeil, P. & Esnouf, R. M. RONN: The bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **21**, 3369–3376 (2005).
265. Marshall, J. & Oberwinkler, J. The colourful world of the mantis shrimp. *Nature* **401**, 873–874 (1999).
266. Marshall, J., Cronin, T. W. & Kleinlogel, S. Stomatopod eye structure and function: A review. *Arthropod Struct. Dev.* **36**, 420–448 (2007).
267. Giraud, E. *et al.* A new type of bacteriophytochrome acts in tandem with a classical bacteriophytochrome to control the antennae synthesis in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Biol. Chem.* **280**, 32389–32397 (2005).
268. Ulijasz, A. T. *et al.* Characterization of two thermostable cyanobacterial phytochromes reveals global movements in the chromophore-binding domain during photoconversion. *J. Biol. Chem.* **283**, 21251–21256 (2008).
269. Anders, K. *et al.* Spectroscopic and photochemical characterization of the red-light sensitive photosensory module of Cph2 from *synechocystis* PCC 6803. *Photochem. Photobiol.* **87**, 160–173 (2011).
270. Gruth, V. Biophysikalische Interaktionsanalysen zwischen dem pflanzlichen Phytochrom B und Phytochrom- Interaktionsfaktoren. (Philipps-Universität Marburg, 2016).
271. Otero, L. H. *et al.* Structure of the Full-Length Bacteriophytochrome from the Plant Pathogen *Xanthomonas campestris* Provides Clues to its Long-Range Signaling Mechanism. *J. Mol. Biol.* **428**, 3702–3720 (2016).
272. Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Suzuki, T. & Tokutomi, S. Functional Analysis of a 450 – Amino Acid N-Terminal Fragment of Phytochrome B in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2104–2116 (2004).
273. Bellini, D. & Papiz, M. Z. Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor. *Structure* **20**, 1436–1446 (2012).
274. Burgie, E. S., Zhang, J. & Vierstra, R. D. Crystal structure of *Deinococcus* phytochrome in the photoactivated state reveals a cascade of structural rearrangements during photoconversion. *Structure* **24**, 448–457 (2016).
275. Li, H., Zhang, J., Vierstra, R. D. & Li, H. Quaternary organization of a phytochrome dimer as revealed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 10872–10877 (2010).
276. Wang, C. *et al.* Mechanistic insights revealed by the crystal structure of a histidine kinase with signal transducer and sensor domains. *PLoS Biol.* **11**, (2013).
277. Stock, A. M., Robinson, V. L. & Goudreau, P. N. Two-component signal transduction. *Reactions* **69**, 183–215 (2000).
278. Diensthuber, R. P., Bommer, M., Gleichmann, T. & Möglich, A. Full-length structure of a sensor histidine kinase pinpoints coaxial coiled coils as signal transducers and

- modulators. *Structure* **21**, 1127–1136 (2013).
279. Blom, N., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–62 (1999).
280. Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. & Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633–1649 (2004).
281. Kikis, E. A., Oka, Y., Hudson, M. E., Nagatani, A. & Quail, P. H. Residues clustered in the light-sensing knot of phytochrome B are necessary for conformer-specific binding to signaling partner PIF3. *PLoS Genet.* **5**, e1000352 (2009).
282. Oka, Y., Matsushita, T., Mochizuki, N., Quail, P. H. & Nagatani, A. Mutant screen distinguishes between residues necessary for light-signal perception and signal transfer by phytochrome B. *PLoS Genet.* **4**, 1–13 (2008).
283. von Horsten, S. *et al.* Mapping light-driven conformational changes within the photosensory module of plant phytochrome B. *Sci. Rep.* **6**, 34366 (2016).
284. Schneider, T. D. & Stephens, R. M. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6097–100 (1990).
285. Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J.-M. & Brenner, S. E. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* **14**, 1188–90 (2004).
286. Levskaya, A., Weiner, O. D., Lim, W. A. & Voigt, C. A. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature* **461**, 997–1001 (2009).
287. Piatkevich, K. D., Subach, F. V. & Verkhusha, V. V. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 3441–52 (2013).
288. Buckley, C. E. *et al.* Reversible optogenetic control of subcellular protein localization in a live vertebrate embryo. *Dev. Cell* **36**, 117–126 (2016).
289. Krebs, E. G. The growth of research on protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 439 (1994).
290. Johnson, L. N. *et al.* Crystallographic binding studies on the allosteric inhibitor glucose-6-phosphate to T state glycogen phosphorylase b. *J. Mol. Biol.* **232**, 253–67 (1993).
291. Johnson, L. N. & O'Reilly, M. Control by phosphorylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 762–769 (1996).
292. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573–80 (1995).
293. Cheong, Y. H. *et al.* Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **129**, 661–677 (2002).
294. Meskiene, I. *et al.* MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1938–1943 (1998).
295. Berndt, N., Dohadwala, M. & Liu, C. W. Y. Y. Constitutively active protein phosphatase 1 α causes Rb-dependent G1 arrest in human cancer cells. *Curr. Biol.* **7**, 375–386 (1997).
296. Chen, J., Parsons, S. & Brautigan, D. L. Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**, 7957–7962 (1994).
297. Tran, H. T. *et al.* Arabidopsis thaliana histone deacetylase 14 (HDA14) is an alpha-tubulin deacetylase that associates with PP2A and enriches in the microtubule fraction with the putative histone acetyltransferase ELP3. *Plant J.* **71**, 263–272 (2012).
298. Sents, W., Ivanova, E., Lambrecht, C., Haesen, D. & Janssens, V. The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: A tightly regulated process creating phosphatase specificity. *FEBS J.* **280**, 644–661 (2013).
299. Uhrig, R. G., Labandera, A.-M. M. & Moorhead, G. B. Arabidopsis PPP family of

- serine/threonine protein phosphatases: Many targets but few engines. *Trends Plant Sci.* **18**, 505–513 (2013).
300. Cliff, M. J., Harris, R., Barford, D., Ladbury, J. E. & Williams, M. A. Conformational diversity in the TPR domain-mediated interaction of protein phosphatase 5 with Hsp90. *Structure* **14**, 415–426 (2006).
 301. Lamb, J. R., Tugendreich, S. & Hieter, P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem. Sci.* **20**, 257–9 (1995).
 302. Russell, L. C., Whitt, S. R., Chen, M. S. & Chinkers, M. Identification of conserved residues required for the binding of a tetratricopeptide repeat domain to heat shock protein 90. *J. Biol. Chem.* **274**, 20060–3 (1999).
 303. Chinkers, M. Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 28–32 (2001).
 304. Yong, W. *et al.* Mice lacking protein phosphatase 5 are defective in ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **282**, 14690–4 (2007).
 305. Fukuda, H. *et al.* Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B1, a mycotoxin. *Biochem Biophys Res Commun* **220**, 160–165 (1996).
 306. Axelrod, J. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 503–7 (1990).
 307. García-Pineda, E., Castro-Mercado, E. & Lozoya-Gloria, E. Gene expression and enzyme activity of pepper (*Capsicum annuum* L.) ascorbate oxidase during elicitor and wounding stress. *Plant Sci.* **166**, 237–243 (2004).
 308. Knight, V. I. *et al.* Hydroperoxides of fatty acids induce programmed cell death in tomato protoplasts. *Physiol Mol Plant Pathol* **59**, 277–286 (2001).
 309. Bostock, R. M., Kuc, J. A. & Laine, R. A. Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. *Science* **212**, 67–9 (1981).
 310. Araki, S. *et al.* Arachidonic acid-induced Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction through activation of Rho-kinase. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **441**, 596–603 (2001).
 311. Gong, M. C. *et al.* Arachidonic acid inhibits myosin light chain phosphatase and sensitizes smooth muscle to calcium. *J. Biol. Chem.* **267**, 21492–21498 (1992).
 312. Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* **372**, 231–6 (1994).
 313. Schwarz, S., Hufnagel, B., Dworak, M., Klumpp, S. & Krieglstein, J. Protein phosphatase type 2C α and 2C β are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis* **11**, 1111–1119 (2006).
 314. Klumpp, S., Thissen, M. C. & Krieglstein, J. Protein phosphatases types 2C α and 2C β in apoptosis. *Biochem Soc Trans* **34**, 1370–1375 (2006).
 315. Zhao, S. & Sancar, A. Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serine/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. *Photochem. Photobiol.* **66**, 727–31 (1997).
 316. Effendi, Y. *et al.* Mutants of phospholipase A (pPLA-I) have a red light and auxin phenotype. *Plant, Cell Environ.* **37**, 1626–1640 (2014).
 317. Ghobrial, I. M. *et al.* Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray. *Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray.* **105**, 3722–3730 (2011).
 318. Shima, H., Nakagama, H. & Fukuda, H. Expression in hepatomas and chromosomal localization of rat protein phosphatase 5 gene. 909–912 (2000).
 319. Zheng, X. *et al.* Knockdown of protein phosphatase 5 inhibits ovarian cancer growth in vitro. *Oncol. Lett.* **11**, 168–172 (2016).
 320. Glaser, F. *et al.* ConSurf: identification of functional regions in proteins by surface

- mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics* **19**, 163–164 (2003).
321. Landau, M. *et al.* ConSurf 2005: The projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Res.* **33**, 299–302 (2005).
322. Cohen, S. L. & Chait, B. T. Mass spectrometry as a tool for protein crystallography. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 67–85 (2001).
323. Sinz, A. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 663–682 (2006).
324. Young, M. M. *et al.* High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5802–6 (2000).
325. Berger, a & Linderstrom-Lang, K. Deuterium exchange of poly-DL-alanine in aqueous solution. *Arch. Biochem. Biophys.* **69**, 106–118 (1957).
326. Marcisisin, S. R. & Engen, J. R. Hydrogen exchange mass spectrometry: what is it and what can it tell us? *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 967–72 (2010).
327. Morgan, C. R. & Engen, J. R. Investigating solution-phase protein structure and dynamics by hydrogen exchange mass spectrometry. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **58**, 17.6.1-17.9.17 (2009).
328. Wales, T. E. & Engen, J. R. Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom. Rev.* **25**, 158–170 (2006).
329. Fang, J., Rand, K. D., Beuning, P. J. & Engen, J. R. False EX1 signatures caused by sample carryover during HX MS analyses. *Int. J. Mass Spectrom.* **302**, 19–25 (2011).
330. Weis, D. D., Wales, T. E., Engen, J. R., Hotchko, M. & Ten Eyck, L. F. Identification and characterization of EX1 kinetics in H/D Exchange Mass spectrometry by peak width analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 1498–1509 (2006).
331. Kazazic, S. *et al.* Automated data reduction for hydrogen/deuterium exchange experiments, enabled by high-resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 550–8 (2010).
332. Zhang, Z., Li, W., Logan, T. M., Li, M. & Marshall, A. G. Human recombinant [C22A] FK506-binding protein amide hydrogen exchange rates from mass spectrometry match and extend those from NMR. *Protein Sci.* **6**, 2203–17 (1997).

8.2 Peptidabdeckung nach HDX-MS

8.2.1 Phytochrom B (1-654)

P_r Form

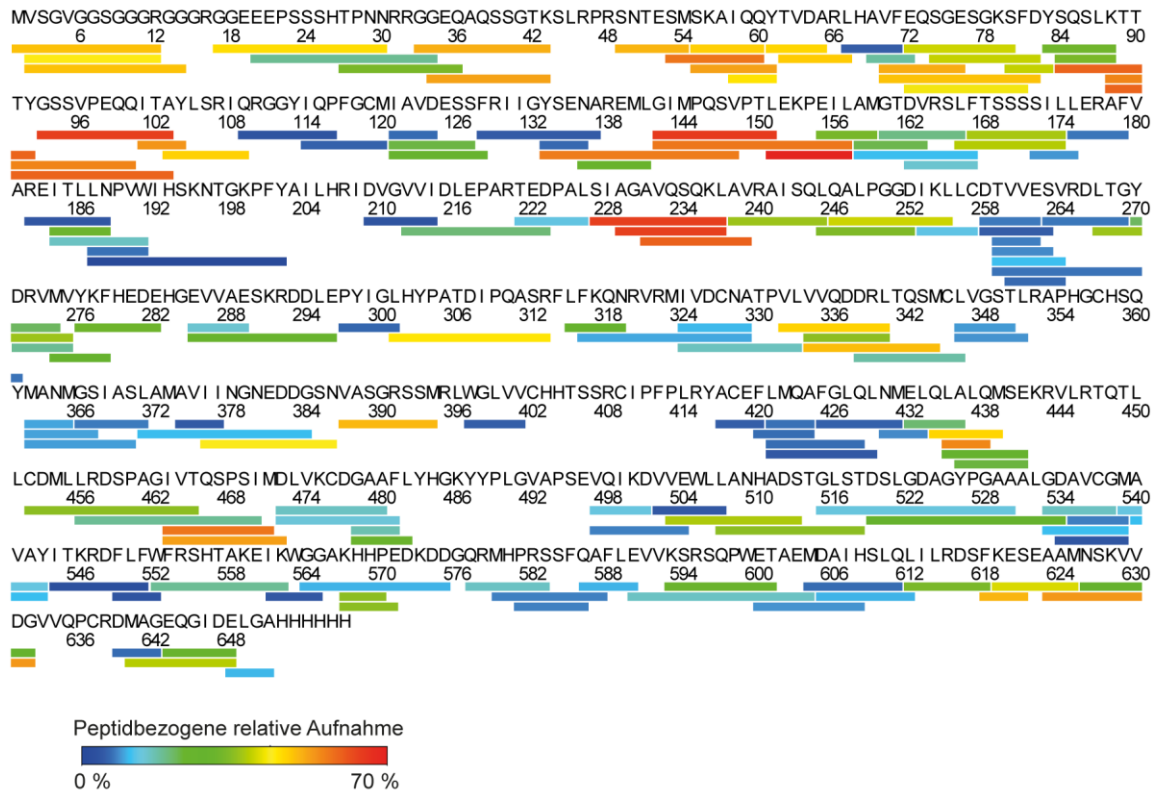


Abbildung 8.2: Darstellung der nach dem Verdau von PhyB WT erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen fraktionierten Deuteriumaufnahme für den P_r Zustand nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot zeigt hierbei die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot eine hohe Aufnahme.

8.2.2 Phytochrom B (1-654)

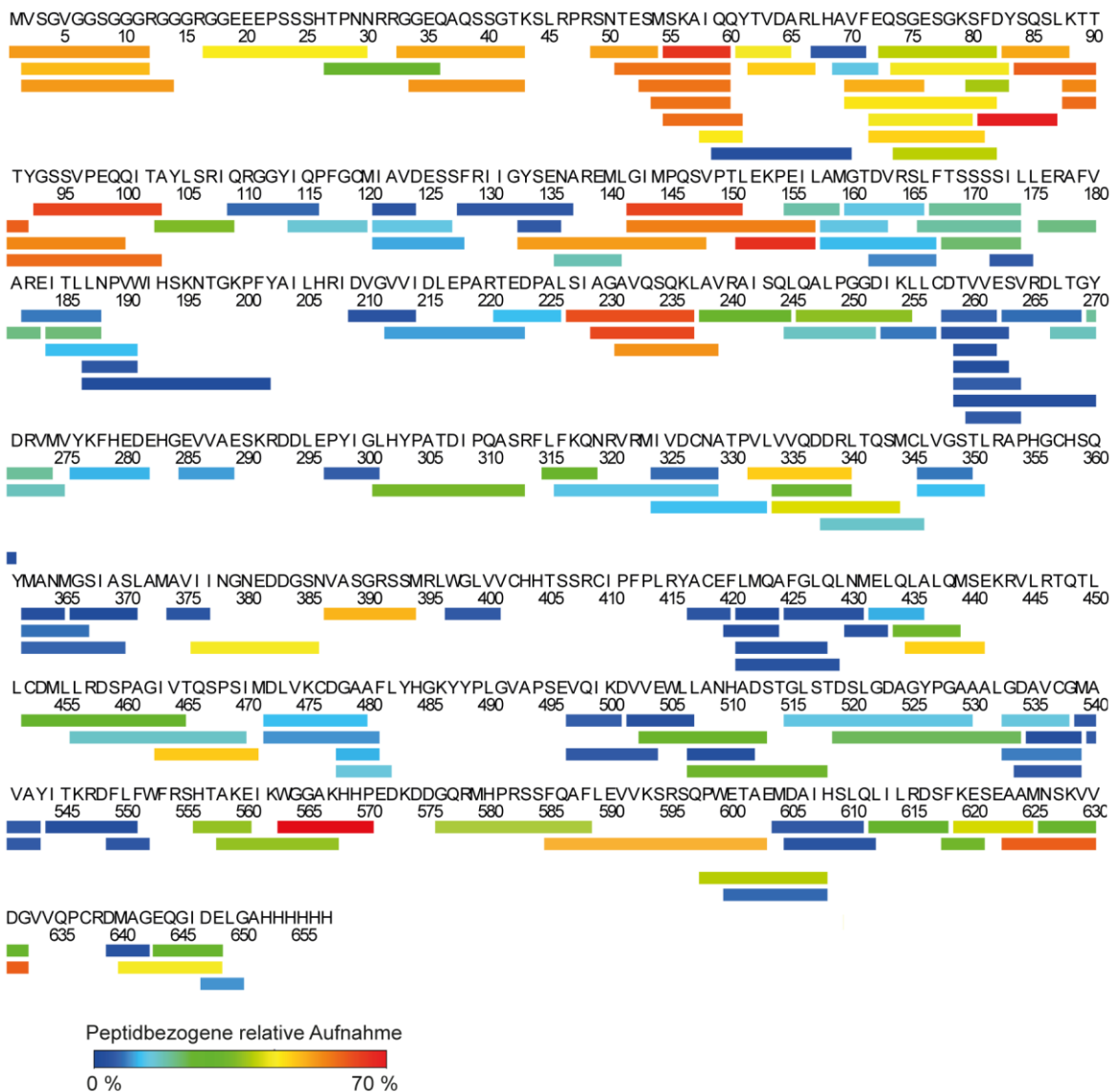
P_{fr} Form

Abbildung 8.3: Darstellung der nach dem Verdau von PhyB WT erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen fraktionierten Deuteriumaufnahme für den P_{fr} Zustand nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot zeigt hierbei die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot eine hohe Aufnahme.

8.2.3 Phytochrome B(1-651) – Auswertung von Verena Gruth²⁷⁰

P_{fr} Form

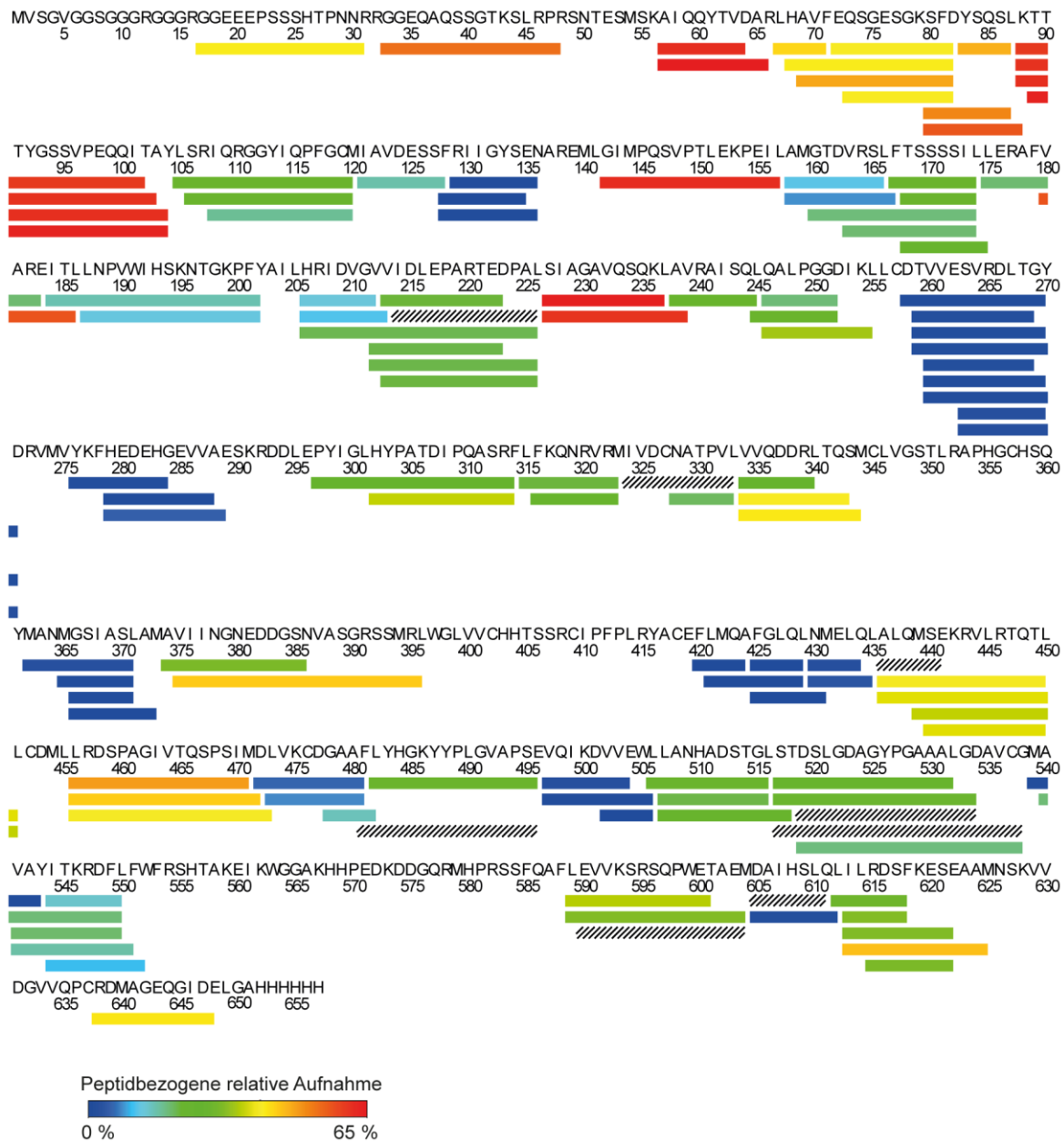


Abbildung 8.4: Darstellung der nach dem Verdau von PhyB WT erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen fraktionierten Deuteriumaufnahme für den P_{fr} Zustand nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot zeigt hierbei die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot eine hohe Aufnahme. Die schraffierten Kästen zeigen Peptide an, die nur im PhyB-PIF-Komplex vorlagen.

8.2.4 Phytochrom B (90-654)

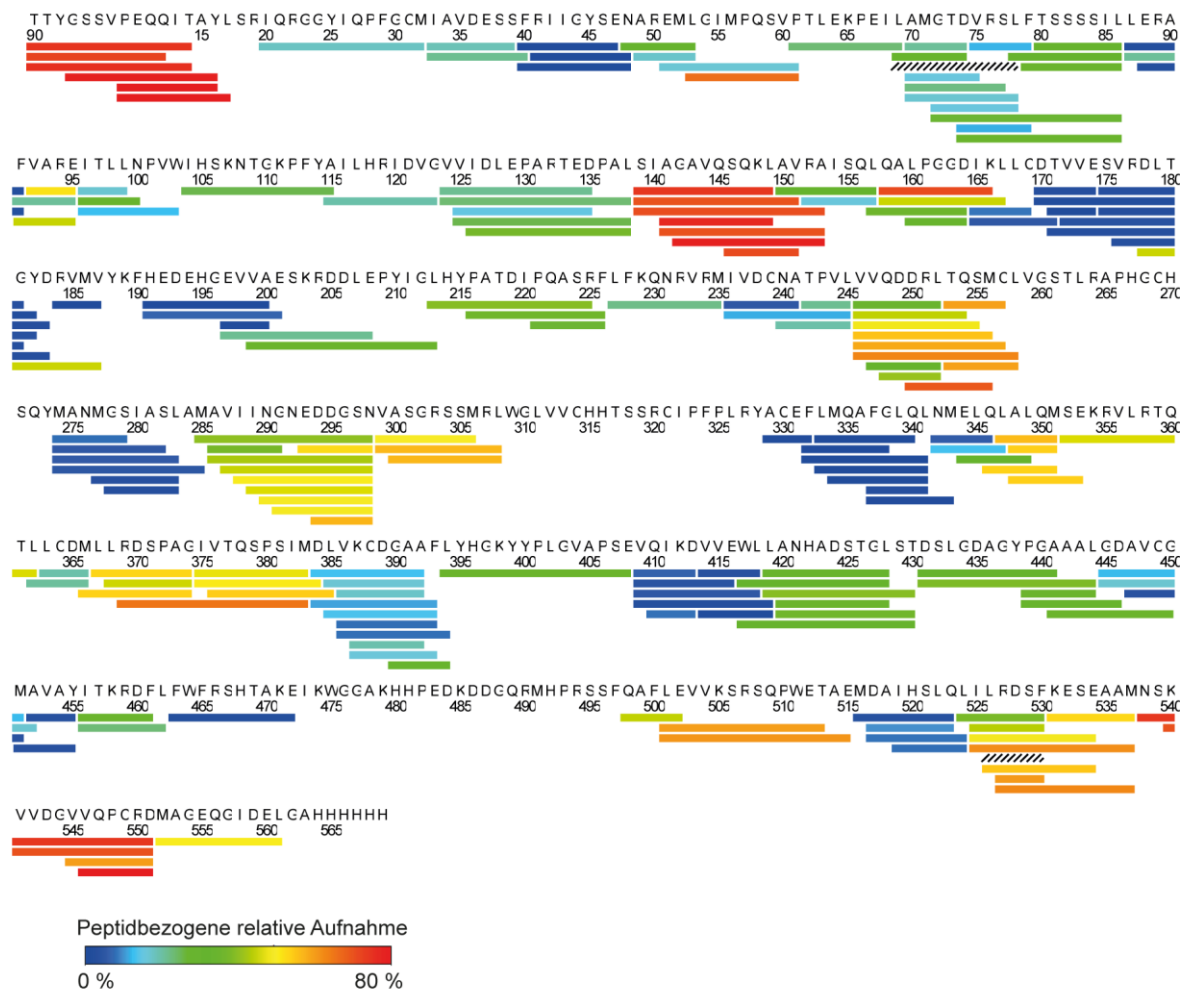
P_r Form

Abbildung 8.5: Darstellung der nach dem Verdau von PhyB ΔNTE erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen fraktionierten Deuteriumaufnahme für den P_r Zustand nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über grün nach rot zeigt hierbei die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot eine hohe Aufnahme. Die schraffierten Kästen zeigen Peptide an, die nur in der P_r Form vorlagen.

8.2.5 PAPP5

(PAPP5+AA) - PAPP5

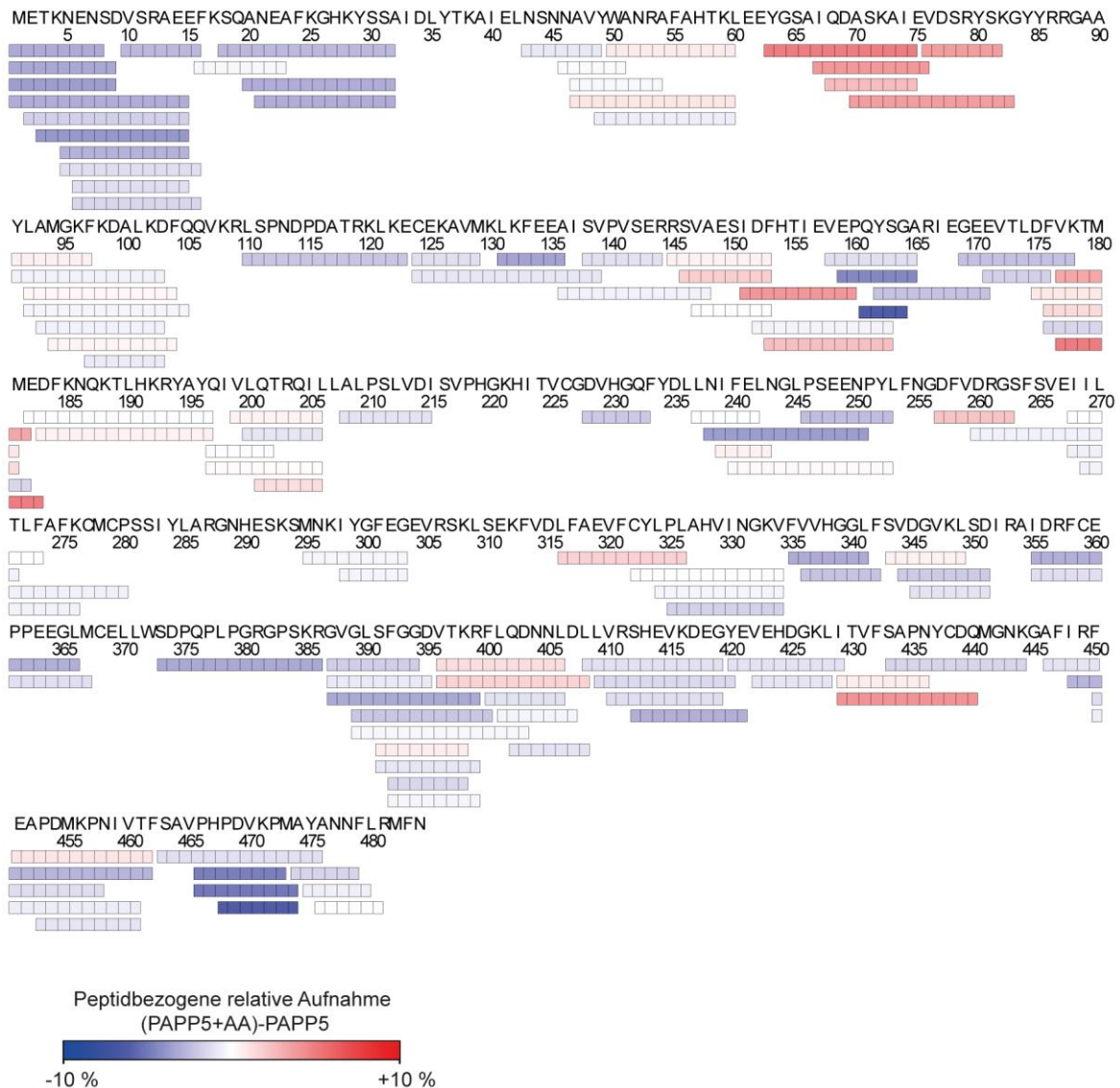


Abbildung 8.6: Darstellung der nach dem Verdau von PAPP5 erhaltenen Peptidfragmente inklusive ihrer relativen fraktionierten Deuteriumaufnahme nach 30 s. Der Farbverlauf von blau über weiß nach rot zeigt hierbei die Deuteriumaufnahme an. Blau steht hierbei für keine bis eine geringe und rot eine hohe Aufnahme.

8.3 SDS-Page und Größenausschlusschromatografie des Cph1-PhyB-PhyA-Hybrids

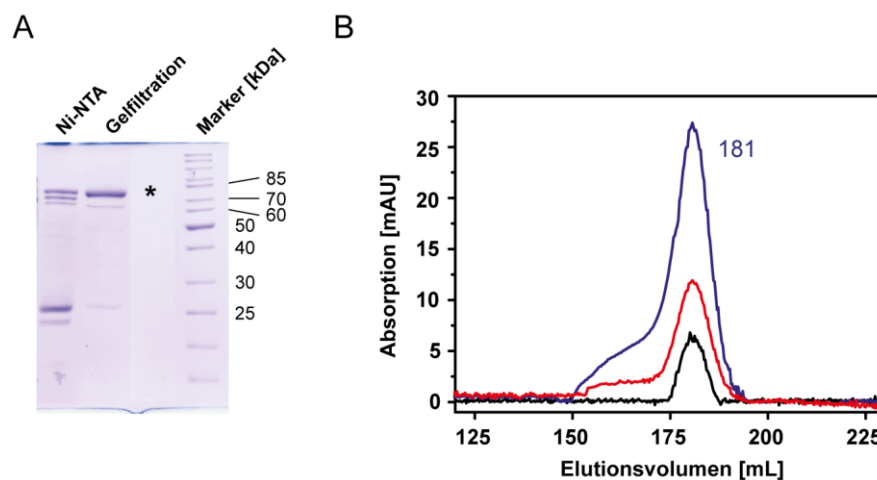


Abbildung 8.7: Reinigung des *in vivo* assemblierten Hybrids Cph1(PASGAF)PhyB(PAS)PhyA(PASPAS). (A) Die SDS-PAGE der Reinigung zeigt, dass das Phytochrom bei einer Masse von circa 80 kDa migriert (markiert durch einen Stern), was in etwa der berechneten Masse von 84 kDa entspricht. Als Referenz für die SDS-Page wurde der *Page Ruler Unstained Protein Ladder* von *Fermentas* eingesetzt. (B) Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigt einen Peak bei 280 nm (schwarz), 650 nm (rot) und 700 nm (blau), der einer Größe des Proteins von circa 102 kDa entspricht.

8.4 Guidelines zur Analyse von HDX-MS Daten

Der Wasserstoff-Deuterium-Austausch wurde bereits 1958 durch Linderstrom-Lang³²⁵ entdeckt. Jedoch lieferte erst die Kombination dieses Vorgangs mit der Massenspektrometrie eine Untersuchungsmethode zur Charakterisierung von Biomakromoleküle und deren Verhalten in Lösung. So können zum Beispiel Bindungsstellen oder posttranslational modifizierte Aminosäuren identifiziert werden.

Die Entwicklung des automatisierten Messablaufs hat die Dauer eines Experimentes deutlich verkürzt und die Möglichkeit von Triplett-Messungen ermöglicht. Eine weitere Erleichterung stellte die Entwicklung von Computerprogrammen dar, mit denen eine automatisierte Peptidzuordnung möglich ist. Hierbei werden Massenspektren eines typischen LC-MS Laufs vor und nach einer Deuteriuminkorporation analysiert und aus der Verschiebung des Zentroids die Deuteriumaufnahme berechnet. Für eine gute Auswertung muss die Instrumentation sensitiv genug gegenüber den folgenden Parametern sein: Monoisotopische und mittlere Masse,

Masse-zu-Ladungsverhältnis, Ladungszustand des Peptidions, Retentionszeit, mögliche Isotope des Peptidions sowie eine Gewährleistung, dass die Signale größer sind als das Hintergrundsignal. Eine sich der Automation anschließende manuelle Kontrolle der Peptide ist notwendig, um Fehler des Programms auszuschließen, erfordert jedoch umfangreiche Kenntnisse des Benutzers.

Probleme können sich bei der Auswertung durch einen eventuellen Rücktausch der Deuteriumionen mit Wasserstoffionen auf der Pepsinsäule ergeben. Dies führt zu einer veränderten Form des Peaks und zu einer niedrigeren Austauschrate. Die Notwendigkeit diese mittels eines Korrekturfaktors neu zu berechnen wird für viele Experimente in Frage gestellt³²⁶⁻³²⁸. Für die Ermittlung des Korrekturfaktors muss experimentell die maximale Deuteriumaufnahme des entfalteten Proteins bestimmt werden. Durch eine anschließende Analyse des deuterierten und verdauten Proteins kann ein eventueller Rücktausch festgestellt werden. Weiterhin kann es bei einigen Peptiden zu einem erhöhten Rücktausch kommen, wenn Peptide mit dem Säulenmaterial der Trennsäule interagieren und so erst bei einem späteren Lauf eluiert werden (engl.: *Carryover*). Durch den Rücktausch der Peptide können sie eine falsche Aussage über die Austauschrate generieren oder bei einer Vermischung eine EX1-Kinetik vermuten lassen³²⁹. Diese tritt jedoch bei Messungen der Proteine unter physiologischen Bedingungen nur sehr selten auf³³⁰. Bislang gibt es keine Richtlinien, wie die Daten dieser theoretisch möglichen Kinetik in der Auswertung berücksichtigt werden sollten.

Weiterhin können bei großen Proteinen Überlagerungen der Isotopenverteilungen auftreten. Oft kann dieses Problem durch die Auswertung eines anderen Ladungszustandes des Peptids gelöst werden, da die Überlagerung meist nicht alle betrifft. Sollte dies jedoch der Fall sein, besteht die Möglichkeit bei hochauflösenden Massenspektrometern auf Dekonvolutionsmethoden zurückzugreifen, um die überlappenden Signale voneinander zu extrahieren. Weiterhin könnte auch eine längere Trennsäule verwendet werden, birgt jedoch die Gefahr eines höheren Rücktausches^{331,332}. Weiterhin kann eine Überlagerung der Daten auftreten, wenn das Protein nicht konformationell homogen, sondern in mehreren Zuständen vorliegt. Die P_{fr} Form von pflanzlichen Phytochromen kann experimentell nicht als Reinform erhalten werden, so dass maximal 70 % in der P_{fr} erhalten werden können, auf Grund des photoche-

mischen Gleichgewichts bei Bestrahlung mit Rotlicht. Der Vergleich der erhaltenen Chromatogramme konnte kein Peptid zeigen, das gleichzeitig in der P_r und P_{fr} Form vorlag. Weiterhin haben die Raman-Messungen die Anwesenheit zweier P_{fr} Formen bestätigt, die jedoch nicht in den HDX-MS Auswertungen beobachtet werden konnten. Entweder ist der strukturelle Unterschied zwischen den beiden P_{fr} Formen zu gering, so dass dieser sich noch innerhalb des Fehlerbereichs befand oder die Peptide wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, da auf Grund einer zu starken Überlagerung die Auswertung der Peptide nicht möglich war. Letzteres war jedoch nur für einige wenige Peptide der Fall und nicht für ganze Bereiche, so dass dieser Grund nahezu ausgeschlossen werden kann.

Sowohl für die Grundeinstellungen zur Detektion der Peptide, als auch für die Bewertung der finalen Daten, wurden noch keine einheitlichen Parameter definiert. Dies ist jedoch notwendig, um die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der produzierten Daten beurteilen zu können. Zurzeit wird ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Zuständen durch die Ermittlung eines Konfidenzintervalls bestimmt. Hierfür wird zunächst der Mittelwert der durchschnittlichen Fehler der Deuteriumaufnahme errechnet und anschließend der Standardfehler gebildet. Abschließend wird das Konfidenzintervall mittels eines t-Test bestimmt. Neben der Frage der Eignung eines t-Tests müssen auch noch weitere Parameter ermittelt werden, die eine Beurteilung der Daten erlauben. So kann aus der Redundanz eine Aussage über die Peptidabdeckung pro Aminosäure gezogen werden. Hierbei wird von dem Programm *DynamX* jedoch lediglich ein gemittelter Wert aller Aminosäuren angegeben, so dass keine Rückschlüsse über einzelne interessante Regionen gezogen werden können. Eine hohe Abdeckung des gesamten Proteins ist zwar vorteilhaft, aber nicht notwendigerweise erforderlich, wenn einzelne Regionen analysiert werden sollen.

8.4.1 Darstellung der Austauschraten

Die erhaltenen Austauschraten werden zumeist mittels eines Farbschemas in einer *Heatmap* dargestellt, die auf eine eventuell vorhandene Struktur übertragen werden kann. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass jeder Aminosäure ein Austauschwert zugeordnet wird, der sich aus dem kürzesten Peptid ergibt, in dem die jeweilige Aminosäure enthalten ist. Weiterhin wird in dem Programm *DynamX* per Definition

die Austauschrate des C-terminalen Peptids übernommen, wenn zwei gleichgroße Peptide existieren. Den kürzeren Peptiden wird eine höhere Gewichtung zugeordnet, da durch sie eine genauere Lokalisierung der Änderung möglich ist. Allerdings sollten die aus der *Heatmap* erhaltenen Ergebnisse stets kritisch mit der Gesamtpeptidabdeckung (engl.: *Coverage map*) verglichen werden, um zu überprüfen, ob andere Peptide mit einer ähnlichen Länge in diesem Bereich dieselbe Austauschrate zeigen. Jedoch zeigen Peptide immer nur eine gemittelte Austauschrate, so dass längere Peptide nicht notwendigerweise die vergleichbare Werte aufweisen müssen wie etwa kürzere, da strukturelle Änderungen oder eine Bindung von Interaktionspartnern auch über nur sehr kurze sehr Segmente erfolgen kann. Auf Grund der gemittelten Aufnahme der Peptide können auch nur Aussagen über Bereiche getroffen und nicht die genauen Aminosäuren bestimmt werden. Hierfür wären eine weitere Fragmentierung der Peptide mittels ETD (engl.: *Electron-transfer dissociation*) nötig.

Eine weitere beliebte Darstellungsmethode der HDX-MS Ergebnisse ist der *Butterfly plot*. Hierbei wird im Gegensatz zur *Heatmap* der Mittelpunkt jedes Peptids gegen die Austauschrate aufgetragen (siehe Abbildung 8.8). Dies hat zur Folge, dass die *Heatmap* und der *Butterfly Plot* nicht zwingend übereinstimmen müssen.

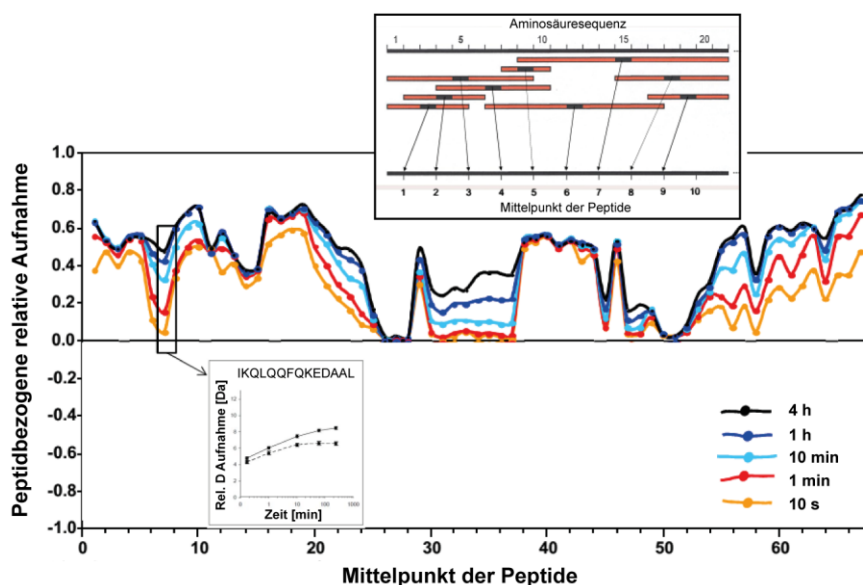


Abbildung 8.8: Beispielhafte Abbildung der relativen Deuteriumaufnahme zu verschiedenen Zeiten durch einen Butterfly Plot. Hierfür wird für jedes Peptid der Mittelpunkt (obere Vergrößerung) bestimmt und gegen die entsprechende relative Aufnahme (untere Vergrößerung) aufgetragen.

Der *Butterfly Plot* eignet sich sehr gut zur Darstellung blockierte Regionen, welche durch die Bindung von Interaktionspartnern hervorgerufen wurden. Probleme ergeben sich jedoch, wenn bei der Auswertung auch längere Peptide berücksichtigt werden, da deren Deuteriumaufnahme nicht der kürzerer Peptide entsprechen muss.

8.5 Alignment der N-terminalen Erweiterung

```

tr|A0A061S9U0|A0A061S9U0_9CHLO          -----FGYFRKAMS-----
tr|A0A059UBB6|A0A059UBB6_9SPER          -----MASSRGT--
tr|A0A059UGL8|A0A059UGL8_WELMI          -----MASSKASA-
tr|A0A059UBC1|A0A059UBC1_ENCBA          -----MSTSRADC-
tr|T2FEJ1|T2FEJ1_PICAB                   MGTPCHKNDIINIKKKIDDYTNENLDVVFLITQHCD SMP----TGALSITLHICRVTK-
tr|A0A059UJQ7|A0A059UJQ7_PINPR          -----MESSKAAC-
tr|A0A059UFE2|A0A059UFE2_ENCBA          -----MSSSRPTF-
tr|A0A059UFD7|A0A059UFD7_9SPER          -----MASSSSNPYS-
tr|A0A059UK40|A0A059UK40_TAICR          -----MASTKPTS-
tr|A0A078CGB3|A0A078CGB3_BRANA          -----MVSGVSGAG
tr|A0A087H1X5|A0A087H1X5_ARAAL          -----MVSGSGGEG
sp|P14713|PHYB_ARATH                      -----MVSGVGGSG
tr|ROHWE8|ROHWE8_9BRAS                    -----MAS
tr|C4TGE0|C4TGE0_9BRAS                    -----MVSGGGGGS
tr|V4M7A1|V4M7A1_EUTSA                    -----MVSGG----
tr|V9P9W5|V9P9W5_BRACM                    -----MVSGVGGGG
tr|A0A087HFM1|A0A087HFM1_ARAAL           -----MVSGVGGSG
tr|R0F2P7|R0F2P7_9BRAS                    -----
tr|Q5G874|Q5G874_ARAHA                    -----MVSGGGSKT
tr|Q9SEW2|Q9SEW2_PEA                      -----
tr|A2Q2V6|A2Q2V6_MEDTR                    -----MASTRGEK
tr|I1H664|I1H664_BRADI                    -----MASGSRATP
tr|W5EHK6|W5EHK6_WHEAT                    -----MASGSRATPTRSPSSDPRAVAMASGSRATP
sp|P93527|PHYB_SORBI                      -----MASGSRATP
tr|Q6XFQ2|Q6XFQ2_MAIZE                    -----MASDS--RP
tr|B9F830|B9F830_ORYSJ                    -----
tr|N0DLK1|N0DLK1_LOTJA                    -----MASASRRGG
tr|A0A059UBB0|A0A059UBB0_ENCBA           -----MAFTSRAT-
tr|K7ZLU4|K7ZLU4_9ASTR                    -----MASGSR TSS
tr|E3TPY7|E3TPY7_HELAN                    -----
tr|W9SBW5|W9SBW5_9ROSA                    -----MASGSRAAH
tr|J7MDP2|J7MDP2_FRAAN                    -----MASASGKA-
tr|C9E8M9|C9E8M9_AQUFO                    -----MSSG-----
tr|Q717V7|Q717V7_STELP                    -----
sp|P42499|PHYB_SOYBN                      -----MLQQ-----
tr|F2Y9I7|F2Y9I7_POPTN                    -----MASQSQRQ-
tr|Q333Z1|Q333Z1_POPTN                    -----MASQSQRQ-
tr|Q9SWS6|Q9SWS6_SOLLC                    -----MASGSGSRG
tr|A0A059VC47|A0A059VC47_9ROSI           -----MESNSRAA-
tr|O24117|O24117_NICPL                    -----MASGSR TKH
tr|A0A0A0L825|A0A0A0L825_CUCSA           -----MVSSNRAT-
tr|V4MK39|V4MK39_EUTSA                    -----MVSGGCET
tr|M5Y944|M5Y944_PRUPE                    -----
tr|W1P5B9|W1P5B9_AMBTC                    -----MASGRRGAY
tr|B9RZR1|B9RZR1_RICCO                    -----MASGGRNSQ
tr|A0A067JVA7|A0A067JVA7_JATCU           -----MASGGRAG
tr|A0A061EQ17|A0A061EQ17_THECC          -----MASGGRAVH
tr|F6H723|F6H723_VITVI                    -----MSSGNRGT-
tr|V4U025|V4U025_9ROSI                    -----MASNSQHQQ
tr|B4YB10|B4YB10_SOYBN                    -----MASASGAAN
tr|V7BQN0|V7BQN0_PHAVU                    -----MASASGAEN
tr|I1MGE5|I1MGE5_SOYBN                    -----MASASGAEN
tr|S8CUX3|S8CUX3_9LAMI                    -----GGG-----
tr|A0A022S2J5|A0A022S2J5_ERYGU          -----
tr|A0A059DB78|A0A059DB78_EUCGR          -----MASTSKAGS

```



```

tr|A0A061S9U0|A0A061S9U0_9CHLO
tr|A0A059UBB6|A0A059UBB6_9SPER
tr|A0A059UGL8|A0A059UGL8_WELMI
tr|A0A059UBC1|A0A059UBC1_ENCBA
tr|T2FEJ1|T2FEJ1_PICAB
tr|A0A059UJQ7|A0A059UJQ7_PINPR
tr|A0A059UFE2|A0A059UFE2_ENCBA
tr|A0A059UFD7|A0A059UFD7_9SPER
tr|A0A059UK40|A0A059UK40_TAICR
tr|A0A078CGB3|A0A078CGB3_BRANA
tr|A0A087H1X5|A0A087H1X5_ARAAL
sp|P14713|PHYB_ARATH
tr|R0HWE8|R0HWE8_9BRAS
tr|C4TGE0|C4TGE0_9BRAS
tr|V4M7A1|V4M7A1_EUTSA
tr|V9P9W5|V9P9W5_BRACM
tr|A0A087HFM1|A0A087HFM1_ARAAL
tr|R0F2P7|R0F2P7_9BRAS
tr|Q5G874|Q5G874_ARAHA
tr|Q9SEW2|Q9SEW2_PEA
tr|A2Q2V6|A2Q2V6_MEDTR
tr|I1H664|I1H664_BRADI
tr|W5EHK6|W5EHK6_WHEAT
sp|P93527|PHYB_SORBI
tr|Q6XFQ2|Q6XFQ2_MAIZE
tr|B9F830|B9F830_ORYSJ
tr|N0DLK1|N0DLK1_LOTJA
tr|A0A059UBB0|A0A059UBB0_ENCBA
tr|K7ZLU4|K7ZLU4_9ASTR
tr|E3TPY7|E3TPY7_HELAN
tr|W9SBW5|W9SBW5_9ROSA
tr|J7MDP2|J7MDP2_FRAAN
tr|C9E8M9|C9E8M9_AQUFO
tr|Q717V7|Q717V7_STELP
sp|P42499|PHYB_SOYBN
tr|F2Y9I7|F2Y9I7_POPTN
tr|Q333Z1|Q333Z1_POPTN
tr|Q9SWS6|Q9SWS6_SOLLC
tr|A0A059VC47|A0A059VC47_9ROSI
tr|O24117|O24117_NICPL
tr|A0A0A0L825|A0A0A0L825_CUCSA
tr|V4MK39|V4MK39_EUTSA
tr|M5Y944|M5Y944_PRUPE
tr|W1P5B9|W1P5B9_AMBTC
tr|B9RZR1|B9RZR1_RICCO
tr|A0A067JVA7|A0A067JVA7_JATCU
tr|A0A061EQ17|A0A061EQ17_THECC
tr|F6H723|F6H723_VITVI
tr|V4U025|V4U025_9ROSI
tr|B4YB10|B4YB10_SOYBN
tr|V7BQN0|V7BQN0_PHAVU
tr|I1MGE5|I1MGE5_SOYBN
tr|S8CUX3|S8CUX3_9LAMI
tr|A0A022S2J5|A0A022S2J5_ERYGU
tr|A0A059DB78|A0A059DB78_EUCGR

```

```

-----PGGAP-----WAQQIQLHLADVRLAQRFVEAAGGTQETSARADTYGYHEGSQL
-----ASSSTNRSKTNARIMAQTTLDAKIHADYEES-----GRGFDYLRs---
-----SSSSTANKSKTskRIMTQTTMDAKIHADFEES-----GYGFDYLRs---
-----SSRSVGRSKQGARIVAQTTVDARLHAEYEES-----GNSFDYTRS---
-----W-PGSSSRQTHNARAMAQTTVDARIHAVFEES-----GHHFDYMKs---
-----S-QGSSGRQSHNARAMAQTTMDARLHADFEY-----GKHFDMYKs---
-----S-SGSSTRSKHSARI IAQTTVDARLHADYEES-----GHHFDYSKs---
-----S-SGNSGRSRHSARIMAQTTIDARLHADFEES-----GHQFDYSKs---
-----S-SGSSARSRSARIMAQTTLDASLHADFEES-----GQQFDYSKs---
-----SHTESMSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----GKSFYDYSHS---
-----Q-P-P-GGGTESVSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----SNTESMSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----ESVSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----N-Q-PQSHTVSMKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----Q-P-QSHTDSMSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----S-QTESISKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----Q-PPPQSNTEMSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSHS---
-----YLRNCSFVSVDVSKAIQQFTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----QQPQNHGAGTESTSKAIQQYTTVDARLHAVFEQS-----SGKSFYDYSQs---
-----SNNNNNRNKRESLSMRKAIQAQYTEDARLHAVFEKSGD-----SFDYASQs---
ITTTKEPEQQNNNNKSMKKAIAQYTEDARLHAVFEQSGD-----SFDYSQs---
EGGGGGGAAASAAATESVSKAVAQYTLDAGLHAVFEQSGA-----SGRSFDYSQs---
-----AAATESVSKAVAQYTLDAGLHAVFEQSGA-----SGRSFDYSQs---
-GGGGTAATATATATESVSKAVAQYTLDAHLHAVFEQSGA-----SGRSFDYSQs---
-----AAATESVSKAVAQYNLDAHLHAVFEQSGA-----SGRSFDYSQs---
-----ADAATESVSKAVAQYTLDAHLHAVFEQSGA-----SGRSFDYTSQs---
EEKLKRGGGGGESVMMRKAIAQYTEDARLHAVFEQS-----SFDYSHS---
-----SNHRSSNPNTNMTAMAQYNEDARLHAVFEKSGE-----SGQSFYDYSQs---
-QNQSQNEQASTSVVNSMSKAIQAQYAVDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----STPSTARSVDMSKAIQAQYALDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
HHHHQQQQQQPTESVNMSKAVAQYTLDAHLHAVFEQSG-----SGRSFNYSQs---
-----QQQNRNSTAAATESVSKAVAQYTTVDARLHAVFEQS-E-----SGKSFYDYSQs---
NTITTTTTTTTTNQTESVNKAIQAQFTVDARLHAVFEQSG-----SGKPFYDYSQs---
EGSRTNNNNNNPDTMSRAIAQYTTIDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
EQRLSHSSNNNNIDSMSKAIQAQYTED-VHAVFEQSG-----SGRSFNYSSES---
-----RQHHTATESVSKAIQAQYTTVDAQLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----RQHHTATESVSKAIQAQYTTVDAQLHAVFEQSG-----TGKSFYDYSKs---
HQPKNQSQFSGTNTNALSKAQAQYTTDARLHAQFQSG-----SGKNFYDYSQs---
QQQQQQQQPQTESVTVSKAIQAQYTTVDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----NVNYKDISKAIQAQYTTADARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----TSNLRSHRTDISKAIQAQYTTVDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----KPQNHGGAGGTESMSKATQQFTLDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----RAKHNNTESVSKAIQAQYTTVDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----R-----THNNTETISKAIQAQYNADARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----LRAHNTEMSKAIQAQYTTVDAQLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----LRVHNTEVSKAIQAQYTTVDAQLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----RAPRGRHNHQADSVSKAIQAQYTTVDARLHAVFEQSG-----TGKSFYDYSQs---
-----LRVYHTDSMSKAIQAQYTTMDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----RA-HHNATESMTVSKAIQAQYTTVDARLHAVFEQSG-----SGKSFYDYSQs---
-----NNNIDSMSKAIQAQYTEDARLHAVFEQSG-----SGRSFNYSSES---
-----QNIIDSMSKAIQAQYTEDARLHAVFEQSG-----SGRSFYDYSQs---
-----N-NNNNNNIDSTSKAIQAQYTEDARLHAVFEQSG-----SGRSFYDYSQs---
-----S-RRDNHAGDLSKAVAFSADARLHAFYEESG-----SGRSFDYSQs---
-----MSKAVAQFTADARLHAVFEQSG-----SGRSFNYSQs---
-----G-RGTHPATDSVSKAIQAQYTTQDARLHAVFEQSG-----SGRSFDYSQs---

```

* * : : : : : *

8.6 Alignment der PP5 Phosphatasen

```

UniRef90_D8STJ8_8_474 -----AEAEQLKEQANAAAFQ-----ACKFSHARELYTRAIELD-----GSNPV
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484 --NVTQAEKIKCRANKAFT-----AHKYAQAIIDLTYQAIELN-----NQNAI
UniRef90_MOT4F1_11_495 --NIDRAEEIKLSANEAFK-----ANKFSQAIIDLYSQAIELN-----GNSAV
UniRef90_AOA0K9QTK6_11_537 ---VSRAEELKSSANEAFK-----AHKYSQAIIDLYSQAIELN-----DQNAV
UniRef100_AOA178VPU7 ---DVSRAEEFKSQANEAFK-----GHKYSQAIIDLTYKAIELN-----SNNAV
UniRef90_AOA078FNX0_45_576 --DVSRAEEMKQANEAFK-----GHKFSNAIDLTYKAIELN-----GNSAV
UniRef90_AOA176VES9_12_482 --DLEKSEELKAAANVAFQ-----AHRFSRAVDLYTKAIELN-----ADNAV
UniRef90_A9SHX7_31_487 -----HKFASALNLYTQAIELN-----PKNAV
UniRef90_AOA061S339_16_496 ----ASAEAKSDGNECFK-----AKKYAQAIVNYTKAINLD-----PNNAV
UniRef90_A8IHM8_28_504 ---IAQAEKAKEANANFK-----AKHFTASIAGYTRAIELN-----PNNAI
UniRef90_GOS7H5_156_623 ----EQAIQFKNQGNKFAFA-----VHDWQTAIDFYTKAIELN-----DKIPT
UniRef90_AOA015K1X2_20_490 ----KAEIEKAEANKLFL-----AKKYEAAIEKYSEAINLN-----PNVAA
UniRef90_AOA0L0HQ92_36_509 ---DKQKAETAKEANKCFA-----AKKYDEAVERYTEAISHN-----PNVAA
UniRef90_K3WPM4_21_494 ----ARAEELKTEGNAALA-----QKFFAAAVELYSKAIELF-----PTAI
UniRef90_AOA0N4ZPG3_69_541 ---ERAIKIKDEANNYFA-----KKNYDIAIKLYTKAIEND-----DTSAV
UniRef90_Q9NES8_27_495 ----EKAGMIKDEANQFFK-----DQYDVADLYSVAIEIH-----PT-AV
UniRef90_AOA0D8Y839_968_1458 --DEAKASRIKKEANQFFK-----DQAYDVAIELYSMAIEHH-----PT-AV
UniRef90_AOA0R3PZM2_24_495 --DEAKASRIKKEANQFFK-----DQAYDVAIELYTMAIERH-----PT-AV
UniRef90_AOA0B2VWV6_56_536 ---EKALRIKDEANQFFNEGKIKVDLGRKQAYDVADLYTKAIELD-----RSVAV
UniRef90_AOA0R3QMW3_22_508 ----QRALKIKDEANQFFH-----DQAYDVAIELYTKAIELD-----DQOAL
UniRef90_F2TYQ3_5_477 ----AEEAKAGNECFK-----KKQFHEAIEHYTAAIELD-----PSVPA
UniRef90_V9KU36_6_448 ----SEAESLKSANQCFK-----DKDYDNAIKYSDAIELS-----AGNAI
UniRef90_AOA0X3PE57_31_508 ----QANELKSKANEYFA-----SGDYTDALAYYSKAIELH-----ETAV
UniRef90_AOA075A2N4_68_546 ----EKADAFKKEANKFFK-----DGEYDKAIENYTKALQLK-----ESAI
UniRef90_G4V8L2_8_486 ----DEAEALKEEANKFFK-----DGDYKAIIDAYTKAIER-----ETAV
UniRef90_AOA0D2WLJ2_19_490 --DQKQADKILKDEGNAAFK-----DGKWLAEIKYSAIDLN-----PTLAP
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488 --DRLKAEKFKKEANHLFK-----DKKYEAIIDLTYKAIENV-----PKSAV
UniRef90_AOA1B0FFW4_42_522 ---IALAEKCKNEGNDLYLK-----SKDFTKAIQMYTKAIELM-----PSNAI
UniRef90_AOA1A9U516_1216_1685 ---AKADELARGNEYFK-----EQKYEQAIALYTEAIECT-----PNER
UniRef90_Q17B79_38_508 --NKARAEELKSQANEHFK-----NKDNDKAIQLYTEAIELD-----GSNAI
UniRef90_U5EJ72_10_479 ----KAEIYKREANEFFK-----NKDYKNAIKLYSEAIELD-----TKNAV
UniRef90_AOA0V1FGY6_15_491 ----NIAEAKRLRQANEFCFK-----NEQYERAIELYSALKYT-----PSDPQ
UniRef90_UPI000811946D_28_500 --DPRSAEELKSQANEHFR-----KKEYEDAIQLYTKAIKDK-----PKNHI
UniRef90_AOA132ABP3_46_513 ----DQLRIEANEHFK-----RKNYDSAIMLYSLAIEKD-----SNNAI
UniRef90_AOA0B6ZF25_29_501 --DKSKAEELKEEANKFFK-----KEDYVKAIEKYSAALKLN-----PPTAA
UniRef90_AOA0L8GY16_12_484 ---DKMKAEEKKEANKVFFK-----NEDYNQAVTFYSQAVDLN-----PHVAA
UniRef90_UPI000698CB06_32_507 --DARRAEELKEKANEFFK-----KKDYQGSITYYTEAIELN-----PYITA
UniRef90_K1R1F4_39_482 ----NEYFK-----NGDYSQAITYYSSQAIQON-----PYVAA
UniRef90_S4RL16_2_457 -----KDYDNAIKFYTDALCALC-----ADNAI
UniRef90_Q6GPS6_20_490 ----KTAEELKEQANEYFR-----VKDYDHAVQYTTQAIIDL-----PDTAI
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499 ---LERAELVKLQANDFFK-----AKDYENAVKYYTQAIELN-----PANAI
UniRef90_UPI000395501A_56_492 ---LERAELKARANEFFK-----AKDYENAVRLYSSAIELN-----PSSAV
UniRef90_AOA146ZYP3_6_500 ----EAELLKKEANKFFK-----EKDYENAIKYYTEALELN-----PSNAI
UniRef90_AOA0P7TY93_3_479 ----LA-----EKDYDNAIKYSEALELN-----PDNAI
UniRef90_T2MF70_18_488 ----EAEKLDKEANNFFR-----DGKYDKSVEFYTKAIELN-----PYVAA
UniRef90_AOA0K2T5Q1_9_480 --DKKRAEELFKQANKHFQ-----EEHYNIAIECTYKAIELD-----PSNAV
UniRef90_T1KA06_24_492 ----KAIALKDKANEYFK-----NQDYLKAILLYSEAIELD-----GTQAA
UniRef90_UPI00026588CB_8_477 ---SQAIELKEKANAFK-----EQRYEEAVQLYSEAIIEA-----PSAI
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488 ----RAEELKKEANRFA-----QQCYEEAINRYSMCKLN-----PDKAI
UniRef90_UPI0006D50113_15_483 ----AEEYKEKANSLFK-----SQQYEGAIYYTKAIELD-----PNNAI
UniRef90_AOA0A9YSW2_13_477 ----EELKKAANQFFK-----EQHFPQAITLYSRAIELD-----PTNAV
UniRef90_AOA069DUA9_1_470 ----AEVFKKEKANEHFK-----KQHYNEAIEFYSKAIECN-----PKNAV
UniRef90_T1IV53_38_511 --DKQKAEDLKEKANTFFK-----EKEFDNAASLYTEAINLN-----PNNAV
UniRef90_AOA1B6G6A4_13_485 --DAKRAESVKEEANKVFFK-----KGFNFKAIELYSTAIEVN-----PNNAV
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480 ---KAEELKEKANKVFFK-----NKDFDKAIEYSEAIQHN-----PNNAV
UniRef90_W4ZJE4_27_500 ----DREKAEALKDKANTYFK-----AQDFQQAITYYSEALEIN-----PTVAA
UniRef90_X1WX57_13_492 --DITHAERMKEEANKVFFK-----AKRYADAIIDYYSKAIAMCESSSTKPHNFAA
UniRef90_UPI000718DE84_18_491 ---DIARADKIKKEANEFFK-----IQAYDKAIELYTEAIKLN-----PNVAL
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490 ----AEAQRFKKEANEYFK-----NGNYDEAISLYTKAIELQ-----PC-AI
UniRef90_F4W6F7_19_491 --DAAKAEYKKEANEYFK-----NQVYDKAIELYTKAIELN-----PSVAI
UniRef90_UPI00073822B2_15_488 --NVAAEAEKFKEVANDFFK-----NQNYEKAIEFYTKAIESN-----PNVAT
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490 --DVQAAEKFKKEANEFFK-----AQNYDDAISLYTKAIELN-----PNVAI
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488 ---DITQAEKYKEANKFFK-----HQNYDAAISLYTKAIELN-----PTIAI
UniRef90_AOA0P5YQA0_6_512 ---NLEKADTLKEEANELFK-----KQNYVKAITLYSNAIECN-----PTSVA
UniRef90_AOA0P6FCD4_29_503 ---NLEKADTLKEEANELFK-----KQNYVKAITLYSNAIECN-----PTSVA
UniRef90_AOA0P5VL74_6_511 ---NLEKADTLKEEANELFK-----KQNYVKAITLYSNAIECN-----PTSVA
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474 ----LFL-----EQEFDKAIIDFYTQAIELN-----PTVSV
UniRef90_L7LV99_32_538 ----ELAACYKEEANEHFK-----KQEFNAAIELYSKAIIEAD-----PYKAV
UniRef90_G3MP14_32_502 ----DLAAKYKEEANDHFK-----KQEFNAAIELYSKAIIEAD-----PYKAV
UniRef90_W0FSW2_16_489 --DIEAAEKLKNEANEYFK-----KQNYNAAIELYSKAIIEKN-----GKNAV
UniRef90_AOA0N1PJ88_15_540 --DIEAAEKLKNEANEFFK-----KQNYDAAIELYTKAIEKN-----PNNAV
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482 ----EAEVHKLKANEFFQ-----KQNYDKAIEFYSKAIECN-----SEPI
UniRef90_EOV119_16_487 ---ITTAENLKEEANEFFK-----KQMYEKAIEMYTKAIEMN-----PTVAA
UniRef90_N6UI05_289_759 VSDASIEKEESHAGKVLMLR-----KQSYNAAIELYTKAIEQN-----PNVPV
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485 ---VEEAEKIKNVANEYFK-----KQDYQEAINYTTQAIELN-----PRNAI
UniRef90_W0FW1_25_498 --DIENAERYKNEANEYFK-----KQDYNAAIELYSKAIIEAN-----PTSVAI

```

: * : :

UniRef90_D8STJ8_8_474	-----VCKIVPKDPDAMRKIREC-----EN
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484	-----LKKMCPNDPDTIRKLKEC-----EK
UniRef90_M0T4F1_11_495	HSLSETSSVKKICPNDDPATKLLKEC-----EK
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537	-----VKRICPNDDPAAKLLKEC-----EK
UniRef100_A0A178VPU7	-----VKRLSPNDPDAATRLKKEC-----EK
UniRef90_A0A078FNX0_45_576	-----VKRICPNDDPAARKLKEC-----EK
UniRef90_A0A176VES9_12_482	-----VCKIVPKDPDAMKLLKEC-----EK
UniRef90_A9SHX7_31_487	-----VQRIVPKDPDALKKVREC-----EK
UniRef90_A0A061S339_16_496	-----AARVAPKDPDLRRKLAAC-----EK
UniRef90_A8IHM8_28_504	-----AAKVAPRDPDLRKKLAEC-----EK
UniRef90_G0S7H5_156_623	-----CVKLDPNNRDAKQKLAEC-----EK
UniRef90_A0A015K1X2_20_490	-----VMKRSRDDKAKAKFTEC-----EK
UniRef90_A0A010HQ92_36_509	-----VCRVAPNDTDARKKLSEC-----EK
UniRef90_K3WPM4_21_494	-----VVRMKPQDKDARAKLKLK-----EK
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541	-----CMKAKPNNDIVQKYNEC-----KK
UniRef90_Q9NES8_27_495	-----VVKVCPNDKDARAKFDEC-----SK
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458	-----VVRAPHNDADAKRKYDEC-----QK
UniRef90_A0A0R3PZM2_24_495	-----VVRAQPSDADAKRKYDEC-----QK
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536	-----VRKARPSDKDAMRKYTEC-----QK
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508	-----IRKAVPNNIDAKQKYDEC-----QK
UniRef90_F2TYQ3_5_477	-----VLKVRPNDKDAQKKFKEV-----DK
UniRef90_V9KU36_6_448	-----VVKVCPNDKDAMKMYQEC-----NK
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508	-----VVRKYPNSKDARQKYDEC-----FK
UniRef90_A0A075A2N4_68_546	-----VLRNAPQDKTARAKHTAC-----QK
UniRef90_G4V8L2_8_486	-----VIRVAPSDKMAREKLTEC-----RK
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490	-----VVKVAPNDKDAQTKMREC-----EK
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488	-----IVKVRPTDKDARMKYTAC-----SK
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522	-----VSKCRPNDKDAKLKFTTEC-----NK
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685	-----VAKRCPSAKDAQDKYQEC-----KK
UniRef90_Q17B79_38_508	-----VAKRCPNDKDAQLKYTEC-----NK
UniRef90_U5EJ72_10_479	-----VAKRCPNDKVAQEKYNEC-----NK
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491	-----VVKVPRQDKDAKNKLAEC-----RR
UniRef90_UPI000811946D_28_500	-----VTKFCPRDQDAKAKYTEC-----KK
UniRef90_A0A132ABP3_46_513	-----VVKFCPNDRDAKNKYSEC-----KK
UniRef90_A0A0B6ZF25_29_501	-----VTKARPSDRDARILKYDEC-----NK
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484	-----VVKVRPNDKDAKTKYQEC-----RK
UniRef90_UPI000698CB06_32_507	-----VTKARPSDKDAQORNYHEC-----NK
UniRef90_K1R1F4_39_482	-----VVKVRPNDKDARAKFNEC-----KK
UniRef90_S4RL16_2_457	-----VVKVCPNDKDAKLKYQEC-----SK
UniRef90_Q6GPS6_20_490	-----VVKVRPHDKDAQMKFQEC-----NK
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499	-----VVKVCPNDKDAKMKYVEC-----NK
UniRef90_UPI000395501A_56_492	-----VVKVRPHDKDAKLKFQEC-----HR
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500	-----VVRVRPNDKDARMKYQEC-----NK
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479	-----VVRVRPNDKDAKMKYQEC-----NK
UniRef90_T2MF70_18_488	-----VAKACPNDRDARLKYNEC-----KK
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480	-----VHKARPNDKDAKTKYVEC-----RK
UniRef90_T1KA06_24_492	-----ILKISQAGKETRLRLNEC-----KK
UniRef90_UPI00026588CB_8_477	-----VTNACPNDDAKKRYLEC-----KK
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488	-----VMKARPNDRDAVMKFNEC-----YK
UniRef90_UPI0006D50113_15_483	-----VSKACPNDRDARLKYNEC-----SK
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477	-----VHKATPGVDAKKKFLEC-----SK
UniRef90_A0A069DUA9_1_470	-----VVKACPNSDQAKLNRNEC-----QK
UniRef90_T1IV53_38_511	-----VTKYKPSDKDAKMKYLEC-----SK
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485	-----VVKARFPKNDARLKFQEC-----SK
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480	-----VTARPNDRDAKTKFLEC-----SK
UniRef90_W4ZJE4_27_500	-----VVKYRPNDKDAKTKYTECSKL-----
UniRef90_X1WX57_13_492	-----VVKALPNDRDAKVYAEC-----NK
UniRef90_UPI000718DE84_18_491	-----VCNARPNNDACVRYKEC-----YK
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490	-----VTKIRPNDRDAKLKFTTEC-----QK
UniRef90_F4W6F7_19_491	-----VVKARPNDRDASDRCSEC-----SK
UniRef90_UPI00073822B2_15_488	-----VTRARPNDKDAKLKYTEC-----NK
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490	-----VMKVRPKDQDAKMKYTEC-----NK
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488	-----VMKARPKDKDAKLKFTTEC-----NK
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512	-----VFKARPNDRDAKLKFNECSKIVRQQAIFERAXXXXXXPNDRDAKLKFNECSK
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503	-----VFKARPNDRDAKLKFNEC-----SK
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511	-----VFKARPNDRDAKLKFNEC-----SK
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474	-----VTKACPNDRDAKMKFTEC-----NK
UniRef90_L7LV99_32_538	-----VTKARPNDRDASAKYSEC-----LK
UniRef90_G3MP14_32_502	-----VTKARPNDRDASAKYSEC-----LK
UniRef90_W0FSW2_16_489	-----VTKVRPKDQDAKMKYNEC-----NK
UniRef90_A0A0N1PJ88_15_540	-----VTKVRPNDDQDAKMKYTEC-----NK
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482	-----VVKVRPSDKDAKLKFTTEC-----QK
UniRef90_N6UI05_289_759	-----VKKAKPNDRDAQMKFMEC-----NK
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485	-----VTKVRPNDRDAKLKLNNEC-----SK
UniRef90_W0FW71_25_498	-----VIKARPNDRDAKRNYTEC-----NK
	-----VTKVKPNDRDAKMKFTEC-----NK

UniRef90_D8STJ8_8_474
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484
UniRef90_M0T4F1_11_495
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537
UniRef100_A0A178VPU7
UniRef90_A0A078FNX0_45_576
UniRef90_A0A176VES9_12_482
UniRef90_A9SHX7_31_487
UniRef90_A0A061S339_16_496
UniRef90_A8IHM8_28_504
UniRef90_G0S7H5_156_623
UniRef90_A0A015K1X2_20_490
UniRef90_A0A0L0HQ92_36_509
UniRef90_K3WPM4_21_494
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541
UniRef90_Q9NES8_27_495
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458
UniRef90_A0A0R3PZM2_24_495
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508
UniRef90_F2TQ3_5_477
UniRef90_V9K36_6_448
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508
UniRef90_A0A075A2N4_68_546
UniRef90_G4V8L2_8_486
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685
UniRef90_Q17B79_38_508
UniRef90_U5E72_10_479
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491
UniRef90_UPI000811946D_28_500
UniRef90_A0A132ABP3_46_513
UniRef90_A0A0B6ZPF25_29_501
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484
UniRef90_UPI000698CB06_32_507
UniRef90_K1R1F4_39_482
UniRef90_S4RL16_2_457
UniRef90_Q6GVS6_20_490
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499
UniRef90_UPI000395501A_56_492
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479
UniRef90_T2MF70_18_488
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480
UniRef90_T1KA06_24_492
UniRef90_UPI00026588CB_8_477
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488
UniRef90_UPI0006D50113_15_483
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477
UniRef90_A0A069DUA9_1_470
UniRef90_T1IV53_38_511
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480
UniRef90_W4ZJE4_27_500
UniRef90_X1WX57_13_492
UniRef90_UPI000718DE84_18_491
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490
UniRef90_F4W6F7_19_491
UniRef90_UPI00073822B2_15_488
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474
UniRef90_L7LV99_32_538
UniRef90_G3MP14_32_502
UniRef90_W0FSW2_16_489
UniRef90_A0A0N1PJ88_15_540
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482
UniRef90_E0VI19_16_487
UniRef90_N6U105_289_759
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485
UniRef90_W0WF71_25_498
AIIKLRFEAEAVAS---DERRSVAGTI--DYSAF-----
AIGKLNSEEVVAAP-VPETDSVTNSI--DVHRI-----
AVQKLRFEAEIAVH-ESEKRSIADSI--DFHTI-----
AVMKLKFEAEIAVP-VAQRRSVADSI--DYRSIVARMTTSSVLVTA AAAAVLAAALMAAN
AVMKLKFEAEISVP-VSERRSVAESI--DFHTI-----
AVMKMKFEAEISAP-VSERRSVAESI--DYHTIGNKPRSSSFLPTKTALAAVVAAMVVVA
AVAKAKFEAEIALD-S---QSVATTL--DYRTI-----
AITKAKFEAEIATE-DEKKHVSADSL--DYHTI-----
AMREMRFAAALATP-EEEMKIFSNVT--DFSM-M-----
EVKRLRFEAEALAGP-DEEVMSTLEKL--DLAIYD-----
IVRQLAFFAAIEIG-DE--PSAAEG--LDVDSI-----
IVKRMAFEKAI EVD-SP--KNLAET--FDVNTI-----
ELKRRTFEAAIAFE-DR--KRSAEELIGDVESM-----
IIKEAFAAAIQSE---RNLPLSETI--DVNGI-----
IIKQIAFAKAI ST--EFDNKEIVDTI--NFEQL-----
IVRRQKFEAAI ST--DHDKKTVAETL--DINAM-----
IVRRIAFERAISV--DHRKSISESI--DLSTM-----
IVRRIAFERAISV--DHRKSISESI--DLSTM-----
IVKKAFAFEKAI SV--DSDQRSIANSI--NIDTI-----
LMRKIAFEKAI SV--DHRKSIAESI--NVDTIGYKVL-----
IVRRLAFEKAITVGEAGVKRDVVQIMTEAMEKM-----
IVKQKAFERAIAS-DELK-KSVVDSL--DIESM-----
RQRLRAFAKAIAS--EEK-PSPLENF--DPSSI-----
IYRRRLFQAI AV--EDK-ASALTSF--DPASV-----
IIRKAFEKAI AV--EDQ-PSPLESF--DLSTI-----
IVKRIAFEKAI AA--DDK-KPCIDMA--EVNDL-----
IVKQKAFEKAI AC-EDNK-KLVSESI--NLDNI-----
IVKMRAFERAI AV-DKPE-KTLAEM-FRDLENI-----
MVNKIAFEKAI SV-QHQE-KSVEKM-CRDLEFA-----
IVKMAFERAI AV-DKQE-KSLEEM-CRDLESA-----
IVKQKAFERAI AV-QHQE-KSLTEM-CREFESS-----
IVKQLAFAKAI SV-ETSE-KSAVDSI--NLESI-----
IVSQKAFEKAI SV-DTVK-KSVAESI--DFDSM-----
IVNQKAFEKAI SV-DTK--KPVSELI--NFEAM-----
ICKRLAFEKAI AT-DDGK--CVAD--TIDINSL-----
IVQRKAFEKAI SG-EEPK--SLAE--QIDIESM-----
IVKRQAFMKAI SV-DDHK-KPVAVTIEEELANM-----
IVQMQAFQKAI AV-EENH-KSVADSI--DLASM-----
IVKRKAFERAI AS-DDSK-KSVADAL--DLDSM-----
LVRQKAFERAI AC-EQHN-RSVVDSL--DIEGM-----
IVKQKAFERAI AS-EEHK-RSVVDSL--DIESM-----
MVKQKAFERAI AS-DEHK-RSVVDSL--DIESM-----
IVKQKAFERAI AS-DDKK-KSVVDSL--DIESM-----
IVKQKAFERAI AS-DELK-KSVVDSL--DIENMMC-----
IVHQHAFAKAI KI--DDQ-KSIIESL--DIESM-----
MVQQIAFNKAI AV-EEKV-VSIVDSL--NLASM-----
LLRKQAFEKAI SV--DYD-KSVAASI--DPDHM-----
IVQRIAFENAI RV-DDVK-KSVADAL--DLDSM-----
LVKKLAFEKAI AV-ESYT-KSAVDSI--DFDKM-----
LIIKLAFAEKAI AV-NDEK-KSVVDSI--NFDISI-----
LVKKIAFEKAI AV-EDTR--SAFEQV--NLDSM-----
LITRLAFEKAI AD--DNR-KSLEETI--DYESI-----
IVKRIAFERAI AV-DDTK-KSVSETI--DLESM-----
IVKKLAFEKAI AV-DDTK-KSIADSI--DFESM-----
IVKRKAFENAI SV-EETK-KSVADSL--NLETM-----
-VKQKAFERAI RGHTEEK-KSVIDTI--NLENM-----
LVKRLAFEKAI SV-EDT--KSVSEQL--DIESM-----
TLKIKSFEEAICV-QENE-ESLALLI--DLNIR-----
IVKKLAFEKAI AV-DENK-KSVADSI--DLSAM-----
MIKVSANFKAI SV-ED-K-KNIADTI--NLEDM-----
IVKKIAFEKAI SV-EENQ-KNVADSI--DLEAM-----
IVKKIAFEKAI AV-EENK-KSIADTI--NLDIM-----
IVKILAFEKAI AV-EENK-KTIADSV--KLEAM-----
IVRQKAFERAI AV-DTVK-KSVSESI--NIDSM-----
IVRQKAFERAI AV-DTVK-KSVSESI--NIDSM-----
IVRQKAFERAI AV-DTVK-KSVSESI--NIDSM-----
IVRRMAFEKAI AV-DDCR-KSVADTI--DLENM-----
VVRRAFERAI AV-DDSK-KSIADSI--DIEAM-----
VVRRAFERAI AV-DDSK-KSVADSI--DIDAM-----
IVKKIAFEKAI SV-DKKE-VNIADSI--NLDAM-----
IVKKIAFEKAI AV-DKKE-VNIADSI--NLDAM-----
IVQQMLFQKAI AV-DDDK-KSVADSI--NLDAM-----
IVKKIAFEKAI AV-EDTK--SIADII--DLESI-----
VVKLAFEKAI SV-EDKK-KFIADTI--NLDAM-----
IVKKIAFQKAI SV-KETK-KKGADSI--NLDSM-----
IVKKIAFEKAI SV-EDTK-KNIASTI--NLDAM-----

```

UniRef90_D8STJ8_8_474 -----VVEDSYTGAR-----IQGQHLDLAFVKQMMQ
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484 -----DVPEQYSGAR-----IEGDTITLDFVKKMID
UniRef90_M0T4F1_11_495 -----EVESQYIGAR-----IEGEVVTLEFVKKMMD
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537 LISIGAVLAIMALAASIVV---VFSPLAQVPEPQYSGAS-----IEGDTVLEFVKKMLE
UniRef100_A0A178VPU7 -----EVEPQYSGAR-----IEGEVTLDFVKKTME
UniRef90_A0A078FNX0_45_576 VRGFATTEILMVLVSVVLGTYWWSFGSSEVPEPQYSGAR-----IEGEEVTLFVVKQMME
UniRef90_A0A176VES9_12_482 -----EVEDSYQGAR-----IE-DKITLDFVKKMMD
UniRef90_A9SHX7_31_487 -----VVDDSYQGAR-----IEEDNITLDFVTKMID
UniRef90_A0A061S339_16_496 -----PVDDKYTGPRMQGNDEEGYITLDFVVKQMIQ
UniRef90_A8IHM8_28_504 -----NIEESYTGPRMAGSAAEGYITAEFVEAMIA
UniRef90_GOS7H5_156_623 -----HVDDSYDGVRLG-G-----QMTQEFIDDMME
UniRef90_A0A015K1X2_20_490 -----VVPEPSYDGPKLEDG-----KITKEFIEEMME
UniRef90_A0A0L0HQ92_36_509 -----VVEASYDGPRLGDE-----GVTLEFVTQLLE
UniRef90_K3WPM4_21_494 -----VVDPYSYDGPHLAAEPT---ATKPDFVVALME
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541 -----KVEDDYDGPRFDE-----NITLDFVKNLIQ
UniRef90_Q9NES8_27_495 -----AIEDSYDGPRLD-----KITKEFVLQLIK
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458 -----IVEENYDGPHLDD-----VISVEFVNEMIA
UniRef90_A0A0R3PZM2_24_495 -----IVEENYDGPHLDE-----VISVEFVNELIA
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536 -----EVESYDGPVLEE-----PISAEFMVELIK
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508 -----RHIKEIWIHFF--LEVEATYDGPVLEN-----DITLDFMKELE
UniRef90_F2TYQ3_5_477 -----EVKDSYDGPRLDGD-----ITPEFMEELMQ
UniRef90_V9KU36_6_448 -----TIEDDYTGPKLEEG-----QVTVQFMKDLMQ
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508 -----CIEPSYAGPHLEQKDDGTYVTQKFMVELLE
UniRef90_A0A075A2N4_68_546 -----TVEPSYDGPHLESDMGNYVVTESFMLALIE
UniRef90_G4V8L2_8_486 -----TVESYDGPHLEQDSNGKYFVTESFMLALME
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490 -----SIDNSYDGPHLPEQ-----ITSEFVLAMIE
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488 -----TVEESYNGPRIPE-----GINAEFKNLVQ
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522 -----TIEDDYKGPALD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685 -----TIEDDYNGPKLDNG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_Q17B79_38_508 -----TIESDYEGPKLEEG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_U5EJ72_10_479 -----TIDESYTGPRLDNG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491 -----TVEDDYEGPVLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI000811946D_28_500 -----TIDDSYDGPVMDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A132ABP3_46_513 -----TIDNDFGPKIIDN-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0B6ZF25_29_501 -----VIEPSYDGPHLQDE-----QVTRQFVDDLLE
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484 -----TIEDDYDGPPELQGG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI000698CB06_32_507 -----VIEDDYQGPCIGEE-----GITLQFMKDLIE
UniRef90_K1R1F4_39_482 -----SIEDDYQGPREFD-----GVTLEFMDLME
UniRef90_S4RL16_2_457 -----AIEDDYTGPKVDNG-----QVTFMKELE
UniRef90_Q6GPS6_20_490 -----TIEDEYTGPKLQDG-----NVTDFMLELMQ
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499 -----TIEDEYSGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI000395501A_56_492 -----TIEDEYSGPKLEEG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500 -----TIEDDYVGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479 -----LCH--TVIEDDYTGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_T2MF70_18_488 -----AIESEYTGPKLQDG-----TVTFMDELII
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480 -----VVDDTYTGPRLNPD--NFAITRDFMTELLQ
UniRef90_T1KA06_24_492 -----QVEPNYDGPVHIVNG-----KVDLEFVSLIK
UniRef90_UPI00026588CB_8_477 -----SIDDDYDGPCLDEK-----GITAEFMEQLID
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488 -----TIEEYKGPQLQDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI0006D50113_15_483 -----TIEEDYSGPALEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477 -----LIEPDYTGPHLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A069DUA9_1_470 -----AVEDDYKGPVIVGG-----KITTEFVNQLID
UniRef90_T1IV53_38_511 -----TIDDDYQGPVLDNG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485 -----AIEDEYNGPALEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480 -----TIEDCYNGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_W4ZJE4_27_500 -----TIEGDEYGPALD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_X1WX57_13_492 -----NIENDYSGPCLNDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI000718DE84_18_491 -----GAKEDDEGSPLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI00069CD71_19_490 -----TIEGDEYSGPKLEDD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_F4W6F7_19_491 -----AIEGDEYTGPKLVDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI00073822B2_15_488 -----TIDDDYTGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490 -----SIEDEYTGPKLEDD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488 -----TIADEYTGPKLEDD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512 -----AVESTYSGPHLVNG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503 -----AVESTYSGPHLVNG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511 -----AVESTYSGPHLVNG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474 -----CIEEDYTGPKLENG-----KVTDFIKELMQ
UniRef90_L7LV99_32_538 -----CIEDDYKGPQLQNG-----QVTLDFMKELE
UniRef90_G3MP14_32_502 -----CIEDDYRGPQLQDG-----RVTLEFMDLME
UniRef90_W0FSW2_16_489 -----TIEDEYGPALD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_A0A0N1PJ88_15_540 -----TIEDEYGPMLD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI00084FAF07_10_482 -----TIEDNYDGPALD-----KVTLEFMDLME
UniRef90_EOVI19_16_487 -----VIEDEYTGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_N6UI05_289_759 -----TIEDNYSGPKLEDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485 -----TIENEYNGPELVDG-----KVTLEFMDLME
UniRef90_W0FW71_25_498 -----TIENEYNGPELEDG-----KVTLEFMDLME

```

* *: :


```

UniRef90_D8STJ8_8_474
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484
UniRef90_M0T4F1_11_495
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537
UniRef100_A0A178VPU7
UniRef90_A0A078FNX0_45_576
UniRef90_A0A176VES9_12_482
UniRef90_A9SHX7_31_487
UniRef90_A0A061S339_16_496
UniRef90_A8IHM8_28_504
UniRef90_G0S7H5_156_623
UniRef90_A0A015K1X2_20_490
UniRef90_A0A010HQ92_36_509
UniRef90_K3WPM4_21_494
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541
UniRef90_Q9NES8_27_495
UniRef90_A0A08Y839_968_1458
UniRef90_A0A0R3PZM2_24_495
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536
UniRef90_A0A0R3QMM3_22_508
UniRef90_F2TYQ3_5_477
UniRef90_V9KU36_6_448
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508
UniRef90_A0A075A2N4_68_546
UniRef90_G4V8L2_8_486
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522
UniRef90_A0A1A9U516_1216_1685
UniRef90_Q17B79_38_508
UniRef90_U5EJ72_10_479
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491
UniRef90_UPI000811946D_28_500
UniRef90_A0A132ABP3_46_513
UniRef90_A0A0B6ZF25_29_501
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484
UniRef90_UPI000698CB06_32_507
UniRef90_K1R1F4_39_482
UniRef90_S4RL16_2_457
UniRef90_Q6GPs6_20_490
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499
UniRef90_UPI000395501A_56_492
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479
UniRef90_T2MF70_18_488
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480
UniRef90_UPI00071KA06_24_492
UniRef90_UPI00026588CB_8_477
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488
UniRef90_UPI0006D50113_15_483
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477
UniRef90_A0A069DUA9_1_470
UniRef90_T1IV53_38_511
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480
UniRef90_W4ZJE4_27_500
UniRef90_X1WX57_13_492
UniRef90_UPI000718DE84_18_491
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490
UniRef90_F4W6F7_19_491
UniRef90_UPI00073822B2_15_488
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474
UniRef90_L7LV99_32_538
UniRef90_G3MP14_32_502
UniRef90_W0FSW2_16_489
UniRef90_A0A0N1PJ88_15_540
UniRef90_UPI00084FAD7_10_482
UniRef90_EOVII19_16_487
UniRef90_N6UI05_289_759
UniRef90_UPI00083BCAFB_13_485
UniRef90_W0FW71_25_498
PDK--CHITVCGDIHGQYDILLNI FEMNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEG--KCITVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PNG--HHFTVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--KNFTVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PHG--KHITVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PNG--KHFTVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PPN--GHFTVCGDIHGQFYDILLNI FQNLGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--GHFTVCGDIHGQYDILLNI FKLNGLPSKENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
DAD--QHFTVCGDVHGFYDILLNI FELNGYPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDD--KHFTVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEADNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEG--VELTVCGDTHGQYFDLMEL FRLNGLPKSPDKHWYLFNGDFVDRGFSWSTEIA-----
PQD--SNLTVCGDVHGFYDFINI FKINGVPSNTMNYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PSG--KGLTICGDIHGQFYDILLNI FDLNGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSECV-----
PETADAHITVCGDIHGQFYDVCNI FALNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEV-----
PDK--QKFTICGDIHGQFYDILLNI FDLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PTG--KKFTICGDIHGQFYDLCNI FEINGYPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PSK--QRFTICGDIHGQFYDLCNI FDLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PSK--QRFTICGDIHGQFYDLCNI FDLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--QKFTICGDIHGQFYDLCNI FDLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PPE--KKFTICGDIHGQFYDLCNI FALNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
EED--GKMTVCGDVHGFYDVLNI FELNGLPSPSNPYLFNGDFVDRGFSFSEVM-----
SQE--ESITVCGDIHGQYDILLNI FEYGGFPDPS-NYLFGLDYDRGKQSLTI-----
PDG--AKFTVCGDVHGFYDLVNI FELNGLPSTENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PED--TKFTICGDIHGQFYDLNMI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEK--SKFTVCGDIHGQFYDLNMI FQNLGLPSKDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
SKT--TKFTICGDIHGQFYDLNMI FEKNGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
EKD--DQLTVCGDVHGFYDMLNMI FALNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
AGT--SKFTICGDIHGQFYDLNMI FDLNGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDS--QKFTICGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDE--CKFTVCGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--KKFTVCGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSPNNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PKD--KKFTICGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSPDENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDD--KKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PKG--QKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSPQNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDK--SKFTICGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--KKFTICGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PKG--KKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PKG--EKFTVCGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
KDEQGDMITVCGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
EKS--QQVTVCGDIHGQFYDILLNI FHLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
KET--EKVTVCGDTHGQYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
--T--EKVTVCGDTHGQYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
KET--EKITICGDIHGQYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
KEA--EKITICGDIHGQYDILLNI FELNGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEN--EKLTVCGDIHGQFYDILLNI FKINGYPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PPS--NKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDE--SKFTVCGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSPSTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--QKFTICGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
GDD--EKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKINGYPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
GDE--EKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSPSNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
GND--DKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
EDD--EKFTVCGDIHGQFYDILLNI FQNLGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDS--NKFTVCGDVHGFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
GDN--DKFTVCGDIHGQFYDILLNI FDLNGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEN--DKFTVCGDIHGQFYDILLNI FEMNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEG--KKFTICGDIHGQFYDILLNI FEINGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
KSD--EKFTVCGDIHGQYDILLNI FELNGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PED--SKFTICGDIHGQYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDD--AKFTICGDIHGQYDILLNI FQNLGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEE--NKFTICGDIHGQYDILLNI FKLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDD--SKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
GDT--DKFTVCGDIHGQYDILLNI FEKNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDN--EKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEE--SKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSTENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PEE--SKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSTENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDG--KKFTICGDIHGQYDILLNI FQNLGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PPE--CKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEDNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PSD--CKFTICGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDE--AKFTVCGDIHGQYDILLNI FKLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDD--KKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDD--SKFTVCGDIHGQFYDILLNI FKLNGLPSPSNPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
EPD--AKFTVCGDIHGQFYDILLNI FDLNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
PDK--EKFTVCGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSPNTNAYLWNGDFVDRGFSFSEVI-----
GDD--NTFTVCGDIHGQFYDILLNI FALNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----
ADD--QKFTVCGDIHGQFYDILLNI FELNGLPSEENPYLFNGDFVDRGFSFSEVI-----

```

```

.*:** ***:.* .: . *      : : * ** * *

```

```

UniRef90_D8STJ8_8_474 -----LTLFAFKCLYPQGIYLARGNHESQSMNKIY-----
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484 -----LTLFAVKCMSPSAIHLSRGNHESKTMNKMY-----
UniRef90_MOT4F1_11_495 -----LTLFAFKCMSPTAMYLRSRGNHESKSMNKIY-----
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537 -----LTLFAFKCMCPSAMYLARGNHESRSMNKIY-----
UniRef100_A0A178VPU7 -----LTLFAFKCMCPSSIYLARGNHESKSMNKIY-----
UniRef90_A0A078FNX0_45_576 -----LTLFAFKCMSPSSIYLARGNHESKSMNKIY-----
UniRef90_A0A176VES9_12_482 -----FTLFAFKCLYPTGLYLSRGNHESKSMNKIY-----
UniRef90_A9SHX7_31_487 -----LTLFAFKCLYPTGLYLSRGNHESKSMNKIY-----
UniRef90_A0A061S339_16_496 -----LVLMAFKLLYPSSVHLARGNHESASMNKMY-----
UniRef90_A8IHM8_28_504 -----FSLLAYKLLFPEHMLHTRGNHESKSMNKVY-----
UniRef90_G0S7H5_156_623 -----LVLVANKWLRPNCFINRGNHETDDMNKIY-----
UniRef90_A0A015K1X2_20_490 -----LTLFAYKWLYPKSLYLTRGNHETDDMNKVY-----
UniRef90_A0A0L0HQ92_36_509 -----TTLFAFKLLYPNSIFLSRGNHETDDMNKVY-----
UniRef90_K3WPM4_21_494 -----MTLFAMKLVFPNHVHLLRGNHESKSMNKIY-----
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541 -----FTLLSLKLLYPNHFYMSRGNHECDAMNKIY-----
UniRef90_Q9NES8_27_495 -----FTMIGFKLLYPNHFMSRGNHESDVMNKMY-----
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458 -----FTMFSYKLLYPNHFFLSRGNHESDVMNKVGRRCNF-----
UniRef90_A0A0R3P2M2_24_495 -----FTMFSYKLLYPNHFFLSRGNHESDVMNKMY-----
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536 -----FTLFGFRLLYPNHFMSRGNHESDVMNKMY-----
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508 -----FTLFGFKLLYPEHFFMSRGNHESDVMNKMY-----
UniRef90_F2TYQ3_5_477 -----LTFGFRLLYPNHFFLSRGNHESINMNQMY-----
UniRef90_V9KU36_6_448 -----CLLLAYKIQFPENFLLRGNHECASINRIY-----
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508 -----FTLIGFKLLYPNHFMSRGNHESVNMNOMY-----
UniRef90_A0A075A2N4_68_546 -----FTLFGFKLLYPKHFFYLSRGNHESNMNRLY-----
UniRef90_G4V8L2_8_486 -----FTLFGFKLLYPDKFFYLSRGNHESEHMNRLY-----
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490 -----LTLFAFKLLYPNHFFLNRGNHETDNNMKVY-----
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488 -----LVLFGYKILLPNKPHLVRGNHETDYMNQMY-----
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522 -----FTLFGFKLLYPHFYLSRGNHESINMNQMY-----
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685 -----FTLFGFKLLYPNHFFLARGNHESFMNQIY-----
UniRef90_Q17B79_38_508 -----FTLFGFKLLYPNHFFLSRGNHESVNMNOMY-----
UniRef90_U5EJ72_10_479 -----FTLFGFKLLYPDNFFLSRGNHESINMNQMY-----
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491 -----FTLFSYKLLYPRHVFLSRGNHESELNRMRY-----
UniRef90_UPI000811946D_28_500 -----LVLFGFKLLYPNHLFIARGNHESETMNKIF-----
UniRef90_A0A132ABP3_46_513 -----LILFAYKIIYPNHLFIARGNHESETMNKIF-----
UniRef90_A0A0B6ZF25_29_501 -----MTLLSYKLLYPKHFFMARGNHESLTMNQMY-----
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484 -----FTLFSFKLLYPDHFMSRGNHESSTMNQMY-----
UniRef90_UPI000698CB06_32_507 -----LTLWGFKLLYPSHFYMSRGNHESSTMNQMY-----
UniRef90_K1R1F4_39_482 -----VVLFCFKLLYPNHFMMARGNHESVTMNQMY-----
UniRef90_S4RL16_2_457 -----LVLFGFKLLYPDHFHLMRGNHETDNNMQMY-----
UniRef90_Q6GPS6_20_490 -----VTLFGFKLLYPAHFHLRGNHETDMMNQMY-----
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499 -----LTLFGFKLLYPDHFHLLRGNHETDMMNQIY-----
UniRef90_UPI000395501A_56_492 -----LTLFGFKLLYPDHFHLLRGNHETDMMNQMY-----
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500 -----LTLFGFKLLYPDHFHLLRGNHETDMMNQMY-----
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479 -----FTLFGFKLLYPDSFHLRGNHETDMMNQMY-----
UniRef90_T2MF70_18_488 -----LVLFSYKLLYPNHFMMARGNHESATMNQMY-----
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480 -----FTLIGFKLLYPNHFMSRGNHESNMNKMRY-----
UniRef90_T1KA06_24_492 -----LTLFAFKALYPNHFMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_UPI00026588CB_8_477 -----LVLFGFKLLYPNHFYMSRGNHESHTMNRMY-----
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488 -----FTLFSFKLLYPDKFFMSRGNHESQTMNQIY-----
UniRef90_UPI0006D50113_15_483 -----FTLFSFKLLYPDKFFMSRGNHESHTMNQMY-----
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477 -----FTLFSKLLLPNHFMSRGNHESKTMNQMY-----
UniRef90_A0A069DUA9_1_470 -----FTLFAFKLLYPDKFFMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_T1IV53_38_511 -----FVLFGFKLLYPNHFYMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485 -----FVLFGFKLLYPDTFYMARGNHESLTMNQMY-----
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480 -----FTLFGFKLLFPNHFMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_W4ZJE4_27_500 -----LTLFGFKLLYPDHFHLSRGNHESDMMNQMY-----
UniRef90_X1WX57_13_492 -----FTLFGFKLLFPDKFFMSRGNHESVTMNRMY-----
UniRef90_UPI000718DE84_18_491 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESATMNQMY-----
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESAAMNHMY-----
UniRef90_F4W6F7_19_491 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESATMNQMY-----
UniRef90_UPI00073822B2_15_488 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESAIMNHMY-----
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESIIMNQIY-----
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488 -----FTLFGFKLLYPKYFFMSRGNHESATMNHMY-----
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512 -----FTLFGFKLLYPNHFMMARGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503 -----FTLFGFKLLYPNHFMMARGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511 KLLYPXXXXXXXXFVDRGSFSVECI FTLFGFKLLYPNHFMMARGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474 -----FTLFSFKLLYPNHFMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_L7LV99_32_538 -----FTLLGFKLLYPNHFYMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_G3MP14_32_502 -----FTLLGFKLLYPDHMYMSRGNHESQTMNQMY-----
UniRef90_W0FSW2_16_489 -----FVLFSFKLLYPDHMYMSRGNHETLDMNRMY-----
UniRef90_A0A0N1P388_15_540 -----FTLFSFKLLYPDHFMSRGNHESLDMNRMY-----
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482 -----FTLFGYKLLYPNHFMSRGNHESVTMNQMY-----
UniRef90_E0VI19_16_487 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESQTMNQIY-----
UniRef90_N6UI05_289_759 -----FTLFGYKLLYPDHFYMSRGNHESATMNQMY-----
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485 -----FTLFGFKLLYPNHFMSRGNHESAMNHLIY-----
UniRef90_W0FW71_25_498 -----FTLFGFKLLYPNHFYMSRGNHESATMNQMY-----
: : * . : ***** :*:

```



```

UniRef90_D8STJ8_8_474 -----GFDGEVKAKYFSDVMPEYFSEIFCALPLAHVLN---SKVFVV---
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484 -----GFEGEVKTKL-NGTFVELFAEVFCCLPLAYVLN---EKVFVV---
UniRef90_MOT4F1_11_495 -----GFEGEVRSKL-GETFVELFAEVFCCLPLAHVIN---DKIFVV---
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537 -----GFEGEVRSKL-SETFVELFAEVFCCLPLAHVIN---QKVFVV---
UniRef100_A0A178VPU7 -----GFEGEVRSKL-SEKFDLFAEVFCYLPLAHVIN---GKVFVV---
UniRef90_A0A078FNX0_45_576 -----GFEGEVRSKL-SEKFDLFAEVFCYLPLAHVIN---EKIFVV---
UniRef90_A0A176VES9_12_482 -----GFDGEVKTkf-NDTMSEMFTFVFCCLPLANVIN---RKVFVV---
UniRef90_A9SHX7_31_487 -----GFEGEVNAKF-NETMKNLFTFIFCCLPLANVLN---NKVFVV---
UniRef90_A0A061S339_16_496 -----GFYGEVTAKY-SNFMSEVPRETFWCWPLLAHLISGXSSRVFVV---
UniRef90_A8IHM8_28_504 -----GFDGEVKAKY-NGTMVDCFRELFCALPLSYCLN---GRVLVL---
UniRef90_GOS7H5_156_623 -----GFEGECKAKY-NERVFKLFSSESFSALPLAHLIG---KKYLVL---
UniRef90_A0A015K1X2_20_490 -----GFEGEVKAKF-SEEMFELFSETFSTLPLAHLIN---QKILVV---
UniRef90_A0A010HQ92_36_509 -----GFEGEVKAKY-SEAAFKLSEIFNAVPIGNVVN---EKILVV---
UniRef90_K3WPM4_21_494 -----GFEGEVKHKY-DDTVMQLFTEVFNWLPAAVLE---DKVLVV---
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541 -----GFEGEVKAKY-NTKMAEFFTDIFCTLPLCHVIN---KKIFTC---
UniRef90_Q9NES8_27_495 -----GFEGEVKAKY-TQCMCDMFTETFCWLPPLCHLIN---EKIFVC---
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458 RRNLVFSSILPFRCMVLKERLKKKY-TSQMAEFFTEIFCHLPLCHLIN---RKVFVC---
UniRef90_A0A0R3PZM2_24_495 -----GFEGEVKKKY-TSQMADFFTEIFCQLPLCHLIN---RKIFVC---
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536 -----GFEGEVRSKY-TSQMAAFFTEIFNHLPLCHLIN---KKIFVC---
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508 -----GFEGEVKSKY-TAQMADFFTEIFDYLPPLCHLIN---NKIFVC---
UniRef90_F2TYQ3_5_477 -----GFFGEVKAKY-TDDLADLFTFVFNWLPGLHLID---NKIFCV---
UniRef90_V9KU36_6_448 -----GFYDECKRKY-NIKLWKTFTDCFNCLPIAAIVD---EKIFCC---
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508 -----GFEGEVKSKY-NADMADSFTEVFNWLPPLCHLIN---SRILVM---
UniRef90_A0A075A2N4_68_546 -----GFEGEVKSKY-SMEMVDIFTDLFNWLPLSHLIN---ERILVM---
UniRef90_G4V8L2_8_486 -----GFEGEVKSKY-SSEVANMFTDIFNWLPLCHLIN---ERILVM---
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490 -----GFDGEVKAKY-SDRMVTLFHEVFLWLPPLAHVVA---EKVLVV---
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488 -----GFEGEVKAKY-GGNMMLGFSEVFNWLPPLSYCIN---KVLVIM---
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522 -----GFNGEVTAKY-TSTMADMFTQVFNWLPPLCHLIN---EKILVM---
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685 -----GFTGEVSKY-SQNADMFTLVYNWLPPLCHLIN---KVLVIM---
UniRef90_Q17B79_38_508 -----GFTGEVVKY-SQTMSEMFTIVYNWLPPLCHLIN---KVLVIM---
UniRef90_U5EJ72_10_479 -----GFTGEVIAKY-SQTMADMFTQVFNWLPPLCHLIN---NQVLVM---
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491 -----GFEGEVRSKF-SSQMAELFTEVFNALPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_UPI000811946D_28_500 -----GFEGEVKNKF-SQQMYDLFAEVFEYLPLAHLIN---DKVLVM---
UniRef90_A0A132ABP3_46_513 -----GFEGEVKEKY-SKQMYDLFTEVFNWLPPLAHLIN---GKVLVM---
UniRef90_A0A0B6ZF25_29_501 -----GFEGEVKSKY-SSQCELFTEVFNWLPPLAHLIN---NKILVM---
UniRef90_A0A018GY16_12_484 -----GFEGEVKTKY-TQQMVLDLFTFVFNWLPPLCHLIN---NKVLVM---
UniRef90_UPI000698CB06_32_507 -----GFDGEVKAKY-TNQMAELFTEVFNWLPPLSHLIN---EKILAM---
UniRef90_K1R1F4_39_482 -----GFEGEVKSKY-TSQMADLFTFIFNWLPLAHLIN---NKILVM---
UniRef90_S4RL16_2_457 -----GFEGEVKAKY-TAQMFDFSEVFNWLPPLAMCIN---SRVLIM---
UniRef90_Q6GPs6_20_490 -----GFEGEVKAKY-SAQMFQLFSEVFNWLPPLAMCIN---SRVLIM---
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499 -----GFEGEVKAKY-TAQMFELFSEVFNWLPPLAQCIN---GKILVRA---
UniRef90_UPI000395501A_56_492 -----GFEGEVKAKY-TAQMFALFSEVFNWLPPLAQCIN---GKVLIM---
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500 -----GFEGEVKAKY-TAQMFQLFSEVFNWLPPLAQCIN---SKVLVM---
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479 -----GFEGEVKAKY-TAQMFQLFSEVFNWLPPLAQCIN---SKVLVM---
UniRef90_T2MF70_18_488 -----GFEGEVKEKY-SAKMADLFTFVFNWLPPLSHLIN---KVLVIM---
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480 -----GFEGEVKSKY-SSVMADLFTFVFNWLPPLCHLIN---EKVLVM---
UniRef90_T1KA06_24_492 -----GFEGEVKSKY-SSTMVLDLFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_UPI00026588CB_8_477 -----GFDGEVRSKY-TEHMAQLFTEVFNWLPPLAHVIN---KKIFVT---
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488 -----GFEGEVRKAY-SSQMVVFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVLVM---
UniRef90_UPI0006D50113_15_483 -----GFEGEVRSKY-TAEMADLFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477 -----GFEGEVTAKY-SAQMAEVFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVLIM---
UniRef90_A0A069DUA9_1_470 -----GFEGEVKAKY-SGPMVEVFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_T1IV53_38_511 -----GFEGEVKAKY-STQMVLGFTFVFNWLPPLAHLIN---KKVLVM---
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485 -----GFEGEVKAKY-TSQMAELFTEVFNWLPPLTHCLN---NRVLVM---
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480 -----GFEGEVKAKY-SSQSELFTFVFNWLPPLCHLIN---NRVLVM---
UniRef90_W4ZJE4_27_500 -----GFYGEVRSKY-TNQMADLFOEVFNWLPPLAQLIN---KQVMVM---
UniRef90_X1WX57_13_492 -----GFEGEVKSKY-SVEMANLFTFVFNWLPPLAHLIN---RRVLVM---
UniRef90_UPI000718DE84_18_491 -----GFDGEVRTKY-CPAMAEVFTDVYNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490 -----GFEGEVKSKY-TPQMAKLFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_F4W6F7_19_491 -----GFDGEVKAKY-SVQMAELFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_UPI00073822B2_15_488 -----GFDGEVKAKY-TAQMAQLFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVLVM---
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490 -----GFEGEVKAKY-TAQMADLFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVMT---
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488 -----GFEGEVKAKY-SAKMADLFTFVFNWLPPLAHLIN---EKILVM---
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512 -----GFEGEVKSKY-SLQMAELFTFVFNWLPPLCHLIN---QRLVIM---
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503 -----GFEGEVKSKY-SLQMAELFTFVFNWLPPLCHLIN---QRLVIM---
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511 -----GFEGEVKSKY-SLQMAELFTFVFNWLPPLCHLIN---QRLVIM---
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474 -----GFEGEVKAKY-PLI LYEC-----
UniRef90_L7LV99_32_538 -----GFEGEVKAKY-TPNMAELFTFVFNWLPPLAHLXX---XQYGFEGE
UniRef90_G3MP14_32_502 -----GFEGEVKAKY-TPKM-----
UniRef90_W0FSW2_16_489 -----GFRGEVSSKY-TSQMADLFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVMM---
UniRef90_A0A0N1PJ88_15_540 -----GFRGEVTFKY-TAQMADLFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVLVMMGG
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482 -----GFEGEVKSKY-SSQMGDLFTFVFNWLPPLCHLIN---KVLVIM---
UniRef90_EOV119_16_487 -----GFEGEVKSKY-TAQMAEFFTEVFNWLPPLAHLIN---NRVLVM---
UniRef90_N6UI05_289_759 -----GFDGEVKFKY-NAQMAELFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
UniRef90_UPI00083BCAFB_13_485 -----GFEGEVKAKY-TTHMAELFTFVFNWLPPLAHLIN---NRVVM---
UniRef90_W0FW71_25_498 -----GFDGEVKAKY-TAQMAELFTFVFNWLPPLAHLIN---KVLVIM---
: . :

```

```

UniRef90_D8STJ8_8_474 -----HGGLFSTDN
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484 -----HGGLFSVDG
UniRef90_MOT4F1_11_495 -----HGGLFSVDG
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537 -----HGGLFSVDG
UniRef100_A0A178VPU7 -----HGGLFSVDG
UniRef90_A0A078FNX0_45_576 -----HGGLFSVDG
UniRef90_A0A176VES9_12_482 -----HGGLFSSDG
UniRef90_A9SHX7_31_487 -----HGGLFSSDG
UniRef90_A0A061S339_16_496 -----HGGLFSKDG
UniRef90_A8IHM8_28_504 -----HGGLFSNDG
UniRef90_G0S7H5_156_623 -----HGGLFSDDN
UniRef90_A0A015K1X2_20_490 -----HGGLFSRDD
UniRef90_A0A0L0HQ92_36_509 -----HGGLFSRDD
UniRef90_K3WPM4_21_494 -----HGGLFSDEN
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541 -----HGGLFKEDG
UniRef90_Q9NES8_27_495 -----HGGLFKEDG
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458 -----HGGLFKEDG
UniRef90_A0A0R3PZM2_24_495 -----HGGLFKEDG
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536 -----HGGLFKDNN
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508 -----HGGLFKDDD
UniRef90_F2TYQ3_5_477 -----HGGLFSEDG
UniRef90_V9KU36_6_448 -----HGGL-SPDL
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508 -----HGGLFSQED
UniRef90_A0A075A2N4_68_546 -----HGGLFSNDD
UniRef90_G4V8L2_8_486 -----HGGLFERDN
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490 -----HGGLFSDDN
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488 -----HGGLCEKDG
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522 -----HGGLFSAKN
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685 -----HGGLFSKDN
UniRef90_Q17B79_38_508 -----HGGLFSTSG
UniRef90_U5EJ72_10_479 -----HGGLFSKDN
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491 -----HGGLFSEDG
UniRef90_UPI000811946D_28_500 -----HGGLFNKDN
UniRef90_A0A132ABP3_46_513 -----HGGLFNKEN
UniRef90_A0A0B6ZP25_29_501 -----HGGLFSTDD
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484 -----HGGLFEDDN
UniRef90_UPI000698CB06_32_507 -----HGGLFSEDN
UniRef90_K1R1F4_39_482 -----HGGLFKDDN
UniRef90_S4RL16_2_457 -----HGGLFSEDG
UniRef90_Q6GPS6_20_490 -----HGGLFSEDG
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499 -----RVGGERSIGG
UniRef90_UPI000395501A_56_492 -----HGGLFSEDG
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500 -----HGGLFSEDG
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479 -----HGGLFSEDG
UniRef90_T2MF70_18_488 -----HGGLFSNDN
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480 -----HGGLFSNDD
UniRef90_T1KA06_24_492 -----HGGLFSSDT
UniRef90_UPI00026588CB_8_477 -----HGGLFSEDD
UniRef90_UPI00006CF0CB6_18_488 -----HGGLFAKDG
UniRef90_UPI0006D50113_15_483 -----HGGLFANDG
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477 -----HGGLFANDG
UniRef90_A0A069DUA9_1_470 -----HGGLFSKDG
UniRef90_T1IV53_38_511 -----HGGLFSRDD
UniRef90_A0A1B6G6A4_13_485 -----HGGLFSKDG
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480 -----HGGLFSEPG
UniRef90_W4ZJE4_27_500 -----HGGLFSQDN
UniRef90_X1WX57_13_492 -----HGGLFSKDN
UniRef90_UPI000718DE84_18_491 -----HGGLFSRDN
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490 -----HGGLFSKDD
UniRef90_F4W6F7_19_491 -----HGGLFSRDD
UniRef90_UPI00073822B2_15_488 -----HGGLFSRDN
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490 -----HGGLFSRDD
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488 -----HGGLFSRDD
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512 -----HGGLFSRDG
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503 -----HGGLFSRDG
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511 -----HGGLFSRDG
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474 -----
UniRef90_L7LV99_32_538 V-----MYISDHTEVFVFNWVPLAHCVNNRVLIMHGGLFSQDD
UniRef90_G3MP14_32_502 -----KAKYTPNMAELFTEVFVFNWVPLAHLINGRVLVMHGGLFSDDN
UniRef90_W0FSW2_16_489 -----AELFTEVFVFNWVPLAHLINKRVLVMHGGLFSDDN
UniRef90_A0A0N1P388_15_540 -----
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482 LFSSDDVTLDDIRNVDRNKQPPEDAQMADLFTEVYNWVPLAHCINNRRVLVMHGGLFSDD
UniRef90_E0VI19_16_487 -----HGGLFSSDT
UniRef90_N6UI05_289_759 -----HGGLFSKEN
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485 -----HGGLFSRDD
UniRef90_W0FW71_25_498 -----HGGLFSRDD
: **

```


UniRef90_D8STJ8_8_474	NNLDLVRSHEVKPEGEGEHEHKKLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484	NNLDLVRSHEVKDEGYEIAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_M0T4F1_11_495	NNLDLVRSHEVKDEGYEIEHNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0K9QTK6_11_537	NNLDLVRSHEVKDEGYEIDHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef100_A0A178VPU7	NNLDLVRSHEVKDEGYEVEHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A078FNX0_45_576	NNLDLVRSHEVKDEGYEVDHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A176VES9_12_482	NNLDLVRSHEVKDEGYEETHDGLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A9SHX7_31_487	NNLELVRSHEVKDEGYELDHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0618339_16_496	NDIDLIIRSHEVKDDGYEIEHDGYLVTVFSAPNYC-----
UniRef90_A8IHM8_28_504	NGLDLVRSHEVKDEGYEVEHDGRLITVFSAPNYC-----
UniRef90_G0S7H5_156_623	NGLEAIIRSHEVKMEGYEIEHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A015K1X2_20_490	NNLELLIIRSHEVKENGYVIEHNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0L0HQ92_36_509	NGLEVLIRSHEVKQEGYQVDHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_K3WPM4_21_494	NNLELLVRSHEVKDEGYELVEHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0N4ZPG3_69_541	NDLLYIVRSHEVKDQGFEAHHSNKCFITVFSAPNYC-----
UniRef90_Q9NES8_27_495	NGIEYVRSHEVKPEGYEMHNGQCFTVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0D8Y839_968_1458	NGVQYVRSHEVKDEGYEVHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0R3P2M2_24_495	NGVQYVRSHEVKPEGYEVHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0B2VWT6_56_536	NSLEYVRSHEVKPEGYEVHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0R3QMW3_22_508	NGLDYVIRSHEVKDEGYEVHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_F2TYQ3_5_477	NDLKLIVRSHEVMKEGYEIAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_V9KU36_6_448	HDLDLICRAHQVVEDGYEFFAKRQLVTLFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0X3PE57_31_508	NGLDMIIRSHEVKNEGYEVAHNGRCITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A075A2N4_68_546	NGLDYIIRSHEVKDEGYEVAHGGRCITVFSAPNYC-----
UniRef90_G4V8L2_8_486	NGLDYIIRSHEVKDEGYEVAHNGRCITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0D2WLJ2_19_490	NNLSYIVRSHEVKDLGYEVAHNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488	NGLDYIIRSHECKNGGYEIEHQNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A1B0FFW4_42_522	NNLEYIIRSHEVKDMGYEVTHNSKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A1A9U5I6_1216_1685	NNLDYIIRSHEVKAEGYEVHDNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_Q17B79_38_508	NKLDYIIRSHEVKDDGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_U5EJ72_10_479	NNLSYIIRSHEVKDLGYEETHNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0V1FGY6_15_491	NNLDYIVRSHEVKPTGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI000811946D_28_500	NKLDYIIRSHEVKETGYEIAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A132ABP3_46_513	NNLDYIIRSHEVKDNGYEVTHSGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0B6ZP25_29_501	NKLDYVRSHEVKDNGYECMHNKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0L8GYI6_12_484	NKLDYIIRSHEVKNEGYEIQHEGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI000698CB06_32_507	NNLEYIVRSHEVKDNGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_K1R1F4_39_482	NNLEYIIRSHEVKPEGYEVMDHGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_S4R1L6_2_457	NNLELLIIRSHE-KPDGYEVAHDGRCVTVFSAPNYC-----
UniRef90_Q6GPS6_20_490	NGLDYIIRSHEVKDEGYEVSHNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499	NKLDYIIRSHEVKPEGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI000395501A_56_492	NHLELLIIRSHEVKPEGYEVAHDGRCVTVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A146ZYP3_6_500	NKLDYIVRSHEVKAQGYEVTHSEKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0P7TY93_3_479	NKLDYIIRSHEVKDEGYEVTHSGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_T2ME70_18_488	NNLEYIIRSHEVKPEGYEVMDHGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0K2T5Q1_9_480	NNLEYIVRSHEVKDEGYEVSHNGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_T1KA06_24_492	NNLDYIIRSHEVKDNGYEVLAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI00026588CB_8_477	NNLEYVRSHEVKLQGYEVVHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488	NNLDYIIRSHEVKDNGYEVTHSGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI0006D50113_15_483	NNLDYIVRSHEVKDNGYEVNAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0A9YSW2_13_477	NSLDYIVRSHEVKDNGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A069DUA9_1_470	NNLDYIIRSHEVKPDGYEEHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_T1IV53_38_511	NKLDYIIRSHEVKAEGYEVTHSHKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0P5YQA0_6_512	NKLDYIIRSHEVKDNGYEVVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0P6FCD4_29_503	NKLDYIIRSHEVKADGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0P5VL74_6_511	NKLDYIIRSHEVKADGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474	NKLEYIIRSHEVKPEGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_L7LV99_32_538	NNLDYIVRSHEVKAEGYEVVAHQKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_G3MP14_32_502	NELDYIVRSHEVKADGYEVAHQKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_W0FSW2_16_489	NRLDYIIRSHEVKDNGYELVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_A0A0N1PJ88_15_540	NHLDYIIRSHEVKSNGYEVVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI00084AFAD7_10_482	NNLDYIIRSHEVKDDGYEVSHGGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_E0VI19_16_487	NKLDYIIRSHEVKDNGYEEAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_N6U105_289_759	NKLDYIIRSHEVKDNGYEVVAHEGRCITVFSAPNYC-----
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485	NNLDYIIRSHEVKDNGYEVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
UniRef90_W0FW71_25_498	NKLDYIVRSHEVKDNGYEVVAHDGKCLITVFSAPNYC-----
	: : : *:*: *: .*:****:*


```

UniRef90_D8STJ8_8_474
UniRef90_UPI0007DCA110_10_484
UniRef90_MOT4F1_11_495
UniRef90_AOA0K9QTK6_11_537
UniRef100_A0A178VPU7
UniRef90_AOA078FNX0_45_576
UniRef90_AOA176VES9_12_482
UniRef90_A9SHX7_31_487
UniRef90_AOA061S339_16_496
UniRef90_A8IHM8_28_504
UniRef90_GOS7H5_156_623
UniRef90_AOA015K1X2_20_490
UniRef90_AOA0L0HQ92_36_509
UniRef90_K3WPM4_21_494
UniRef90_AOA0N4ZPG3_69_541
UniRef90_Q9NES8_27_495
UniRef90_AOA0D8Y839_968_1458
UniRef90_AOA0R3PZM2_24_495
UniRef90_AOA0B2VWT6_56_536
UniRef90_AOA0R3QMW3_22_508
UniRef90_F2TYQ3_5_477
UniRef90_V9KU36_6_448
UniRef90_AOA0X3PE57_31_508
UniRef90_AOA075A2N4_68_546
UniRef90_G4V8L2_8_486
UniRef90_AOA0D2WLJ2_19_490
UniRef90_UPI0000523A7E_16_488
UniRef90_AOA1B0FFW4_42_522
UniRef90_AOA1A9U516_1216_1685
UniRef90_Q17B79_38_508
UniRef90_U5EJ72_10_479
UniRef90_AOA0V1FGY6_15_491
UniRef90_UPI000811946D_28_500
UniRef90_AOA132ABP3_46_513
UniRef90_AOA0B6ZF25_29_501
UniRef90_AOA0L8GYI6_12_484
UniRef90_UPI000698CB06_32_507
UniRef90_K1R1F4_39_482
UniRef90_S4RL16_2_457
UniRef90_Q6GPS6_20_490
UniRef90_UPI00074FF54D_25_499
UniRef90_UPI000395501A_56_492
UniRef90_AOA146ZYP3_6_500
UniRef90_AOA0P7TY93_3_479
UniRef90_T2MF70_18_488
UniRef90_AOA0K2T5Q1_9_480
UniRef90_T1KA06_24_492
UniRef90_UPI00026588CB_8_477
UniRef90_UPI0006CF0CB6_18_488
UniRef90_UPI0006D50113_15_483
UniRef90_AOA0A9YSW2_13_477
UniRef90_AOA069DUA9_1_470
UniRef90_T1IV53_38_511
UniRef90_AOA1B6G6A4_13_485
UniRef90_UPI00077FBF98_10_480
UniRef90_W4ZJE4_27_500
UniRef90_X1WX57_13_492
UniRef90_UPI000718DE84_18_491
UniRef90_UPI0006C9CD71_19_490
UniRef90_F4W6F7_19_491
UniRef90_UPI00073822B2_15_488
UniRef90_UPI0006C9635F_16_490
UniRef90_UPI0005CF077A_15_488
UniRef90_AOA0P5YQA0_6_512
UniRef90_AOA0P6FCD4_29_503
UniRef90_AOA0P5VL74_6_511
UniRef90_UPI0006B06E80_10_474
UniRef90_L7LV99_32_538
UniRef90_G3MP14_32_502
UniRef90_W0FSW2_16_489
UniRef90_AOA0N1PJ88_15_540
UniRef90_UPI00084FAF07_10_482
UniRef90_EOVI19_16_487
UniRef90_N6UI05_289_759
UniRef90_UPI00083BCABF_13_485
UniRef90_W0FW71_25_498
-----DQIGNKGAFVRFVAP-----HMK-PEFTTFKDVPHPSVKPMAYAPQ-----
-----DQMGNKGAFIRFEAP-----DMK-PTIVTFSVAVPHPDVKPMAYANFFQ-FFQ
-----DQMGNKGAFIRFTAP-----DLK-PDIVSFSVAVPHPDVKPMAYANSFLQMF
-----DQMGNKGALIRFEAP-----ELK-PNIVTFSVAVSHPDVKPMAYANFLRMFS
-----DQMGNKGAFIRFEAP-----DMK-PNIVTFSVAVPHPDVKPMAYANFLRMFN
-----DQMGNKGAFIRFEAP-----DMK-PNIVTFSVAVPHPDVKPMAYANFLRMFN
-----DQMGNKGAFIRFEAP-----DLK-PKFTTFSVAVPHPAIRPMQYANFFSML-
-----DQMGNKGAFIRFQAP-----DMK-PQFTKFSSVWHPNVRPMQYANFFSLL-
-----DQMGNKGAFILKLGK-----DMS-PQFTTFSVAVPHPEVKPMAYANSFLNFL-
-----DQMGNKGAFVVFNGN-----DMV-PHFTTFSVAVPHPDVKPMAYANSYL-----
-----DMTENKGAYINIGSD-----YK-LRFAQFEAVPHPDVKPMAYAHNAL-----
-----DTIGNKGALINITSD-----LK-LDYKTFEAVPHPNIRPMAYASQFGLF-
-----DSVGNKGAYIHVTPD-----RK-LTYHQFAAVEHPPVVRAMQYAGMFGNMM-
-----DQMGNKGAFIRFEKD-----MK-PRFTQFTAVEHPPIRPMAYAGNMGGMFG-
-----DTMGNKGAFITITGD-----NLYPPRFTSFDVAVPHPDVKAMVYAQNMFGL-
-----DQMNNKGAFITITGD-----NLT-PRFTPFDAVPHPKLPPMAYANSFLGF--
-----DQMGNKGAFITITGE-----DLT-PKFTTFSVAVPHPMIPPMVYANSFLGF--
-----DQMGNKGAFITITGD-----NLT-PKFTSFGAVPHPMIPPMVYANSFLGF--
-----DTMGNKGAFITIRGD-----DLK-PRFTSFSVAVPHSVRPMAYASSFLGF--
-----DTLGNKGAFITIRGD-----NLT-PRFTSFTAVDHPGSLKMQGIVNFSNI--
-----DSMGNKGAFIKLDR-----HE-PEIVQFEAVPHPDVKPMAYAGGLSLLG
-----GEFDNAGAMMSVDEL-----M-----
-----DTMHNKGAFIVFRGSKKPGEMK-PEFTSFKVPHPDVVRPMAYANSLLSLL-
-----DTMHNKGAFITLIGKRKPAPMK-PEFTSFKVPHPDVVRPLAVVNPFLSFF-
-----DTMHNKGAFITLIGSDEPGEMS-PMFTSFTAVPHPDVVRPMAYVNPPLSMF-
-----DQMGNKGAFITL-GP-----SLE-PNFTTTFDAVPHPNVKPMAYASGMGMF-
-----DQMGNKGAFITLRAP-----DLI-PKFTQFEAVKHPEVQPMAYANSFMRM--
-----DTMGNMGAFITIKGN-----DLK-PNFKSFEAVPHPDVKPMAYANSLMSLL-
-----DQMKNLGAFITLKGK-----DLT-PKFTTYSSEPHPLIRPMAYAYSLSMS-
-----DTMNLGAFINMKGN-----DLT-PQKYTYAAVPHPKVKPMAYASSL-----
-----DTMGNMGAIITLKGK-----DLK-PVFITYKAVPHPNVQPMAYASSLMN---
---YVDTIGNKGAFIVINGS-----DLT-PKFTTDAVDHDKVTPMAYANQFFAALQ
-----DQMGNLGAFINFKGG-----DLK-PQFTSFKVPHPDVKKPMCYSSNLFNF-
-----DRVGNLGAFINFTGD-----DLT-PKYTTFKEVPHPDVKRPMCYSSNLSMM-
-----DTMGNKGAYINITGE-----NLK-PKFTSFEAVPHPNVKPMAYANPFGLF-
-----DTMGNKGAFITLKGK-----DLK-PKYSSFEAVPHPEVKPMAYASPLFGLF-
-----DTMGNKGAFIVIRGD-----DLT-PQFTSFEAVPHPNVKPMAYANSLSMF-
-----DTMGNQGAFLITITGD-----DLT-PKFTSFDVS-----
-----DQMGNKGSYIHLTAP-----ALK-PEFHEFAAVPHPNVKPMAYANALMRM-
-----DQMGNKGSYIHLGSG-----DLK-PKFHQFEAVPHPNVKPMAYANSLLQM--
-----DQMGNKGSYIHLKGS-----DLR-PEFHQFTAVPHPNVKPMAYANSLLQL--
-----DQMGNKGSYIHLRGS-----DLR-PDFHQFTAVDDDK-----
-----DQMGNKGSYIHLRGS-----DLK-PEFHQFTAVPHPNVKPMAYANTLMQL--
SVVPSDQMGNKGSYIHLRGS-----DLK-PEFHQFSVAV-----
-----DQMGNKGAFITLR-T-----DLK-PVFTTYEAVPHPAVKPMAYANMMSMF
-----DITGNKGAFINIKGD-----DLT-PKYITYEAVPHPNVKPMAYAN-----
-----DAIGNLGAITMTGK-----TLI-PDFHTYSEVPHPDVKPMAYASSFFGL-
-----DQMGNKGAFINITGG-----DLT-PKYTVYEAVPHPNIRPMAYASSLVNI--
-----DTMGNLGAFISLTGK-----TME-PKIFTYDAVEHPPVPMVYANSLLSLL-
-----DTMGNKGAFITLNGH-----DMK-PKFTSFSVAVPHPDVKPMAYANPLLSL-
-----DTMGNKGAFITLNGK-----DMK-PKFTTYQAVPHPKVQPMAYANSLL-----
-----DTMGNKGAFITLNGK-----TLK-PEYTTYEAVPHPNVKPMAYANSFLNLLS
-----DTMGNKGAFITMTGN-----DLT-PNFTTYAAVPHPNVKPMAYANSLSIF-
-----DSMGNKGAFITLKGK-----DMK-PQFTTYEAVPHPNVKPMAYANALLNL-
-----DTMGNKGAFITLKGK-----DMK-PNFTTYEAVPHPNVKPMAYASSLLAFM-
-----DQIGNKGAFINL-GA-----DLK-PNFKTYEAVPHPNVRPMAYANSFMFGM-
-----DTMGNKGAFITLEGO-----CLK-PKFTTYTAVPHPPVKPLMYANSFLNFL-
-----DTMDNRGAFITLNGK-----DMT-PCFTSFEAVPHPNVKPMIYANPLIKFM-
-----DSMGNQGAFITLNGK-----DMI-PKFTSFDVAVPHPNVKPMAYASSFLNFM-
-----DTMGNRGAFITLNGS-----DMK-PYFTSYDAMPHPNVRPMAYANSLLKFM-
-----DTMGNRGAFITLTKG-----DMK-PNFTTYEAVPHPNIRPMQYATSLIKFM-
-----DQIGNKGAFITLNGK-----DMI-PNFTTYEAVPHPNVRPMAYANPLLKAMS
-----DTIGNLGAFITLTKG-----NMR-PTFTMYEAVPHPNVRPMAYANSLLKYM-
-----DTMGNKGAFITMNGK-----DMK-PRFTTYDAVPHPDVKPMAYANSMSLFG
-----DTMGNKGAFITMNGK-----DMK-PRFTTYDAVPHPDVKPMAYANSMSLFG
-----DTMGNKGAFITMNGK-----DMK-PRFTTYDAVPHPDVKPMAYANSMSLFG
-----DTMGNKGAFITTEGK-----TLK-PKFVTYEAVPHPNVKPMAYANSLLGF--
-----DTMGNKGAFITMNGR-----DLK-PKFTTYEAVPHPNVKPMAYASSLLAL--
-----DTMGNKGAFITMNGK-----DLK-PKFTTYEAVPHPNVKPMAYASSLLAL--
-----DTMGNKGAFITMNGK-----DLK-PIFTTYEAVPHPDVKPMAYANSFLSML-
-----DTMANLGAFITMNGK-----DLK-PNFTTYEAVPHPNVRPMIYAHPPFS---
-----DTMGNKGAFINLQGD-----TME-PKYVTVSAVEHPPVKPMAYANSLLRFLS
-----DQMGNKGAFITLEK-----SMK-PKYTVYDSVPHPDVKPMIYASSIMNLL-
-----DTMGNKGAFINLTGE-----SMV-PKYIVYDAVPHPDVVRPMIYASTN-----
-----DTMGNLGAFITLQGK-----DMV-PQFTTYAAVPHPNVKPMAYANSFLSMM-
-----DTMGNKGAFITLKGK-----DME-PKYTTYEAVPHPNVKPMAYANHSLLSML-

```

* * :

8.7 Produzierte und analysierte Proteine

Arabidopsis thaliana PhyB(1-651)

MVSGVGGSGG GRGGGRGGEE EPSSSHTPNN RRGGEQAQSS GTKSLRPRSN TESMSKAIQQ
 YTV DARLHAV FEQSGESGKS FDYSQSLKTT TYGSSVPEQQ ITAYLSRIQR GGYIQPFQGM
 IAVDESSFRI IGYSENAREM LGIMPQSVPT LEKPEILAMG TDVRSFLTSS SSILLERAFV
 AREITLLNPV WIHKNKTKGP FYAILHRIDV GVVIDLEPAR TEDPALSIAAG AVQSQKLAVR
 AISQLQALPG GDKLLCDTV VESVRDLTGY DRVMVYKFHE DEHGEVVAES KRDDLEPYIG
 LHYPATDIPQ ASRFLFKQNR VRMIVDCNAT PVLVVQDDRL TQSMCLVGST LRAPHGCHSQ
 YMANMGSIAS LAMAVIINGN EDDGSNVASG RSSMRLWGLV VCHHTSSRCI PFPLRYACEF
 LMQAFGLQLN MELQLALQMS EKRVLRTQTL LCDMLLRDSP AGIVTQSPSI MDLVKCDGAA
 FLYHGKYYPL GVAPSEVQIK DVVEWLLANH ADSTGLSTDS LGDAGYPGAA ALGDAVCGMA
 VAYITKRDFL FWFRSHTAKE IKWGGAKHHP EDKDDGQRMH PRSSFQAFLE VVKRSRQPWE
 TAEMDAIHSL QLILRDSFKE SEAAMNSKVV DGVVQPCQDM AGEQGIDELG AHHHHHH

Arabidopsis thaliana PhyB(90-651)

MTTYGSSVPE QQITAYLSRI QRGGYIQPFQ CMAVDESSF RIIGYSENAR EMLGIMPQSV
 PTLEKPEILA MGTDVRSFLT SSSSILLERA FVAREITLLN PVWIHKNKTKG KPFYAILHRI
 DVGVIDLEP ARTEDPALSIA AGAVQSQKLA VRAISQLQAL PGGDIKLLCD TVVESVRDLT
 GYDRVMVYKF HEDEHGEVVA ESKRDDLEPY IGLHYPATDI PQASRFLFKQ NRVRMIVDCN
 ATPVLVVQDD RLTQSMCLVG STLAPHGCH SQYMANMGSI ASLAMAVIIN GNEDDGSNVA
 SGRSSMRLWG LVVCHHTSSR CIPFPLRYAC EFLMQAFGLQ LNMELQLALQ MSEKRVLRTQ
 TLLCDMLLRD SPAGIVTQSP SIMDLVKCDG AAFLYHGKYY PLGVAPSEVQ IKDVVEWLLA
 NHADSTGLST DSLGDAGYPG AAALGDVAVCG MAVAYITKRD FLFWFRSHTA KEIKWGGAKH
 HPEDKDDGQR MPRSSFQAF LEVVKSRSQP WETAEMDAIH SLQLILRDSF KESEAAMNSK
 VVDGVVQPCR DMAGEQGIDE LGAHHHHHH

Arabidopsis thaliana PAPP5(1-484)

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH **M**ETKNENS DVSRAEEFKSQ ANEAFKGHKY SSAIDLTYKA
 IELNSNNNAV WANRAFAHTK LEEYGSAIQD ASKAIEVDSR YSKGYRGA AYLAMGKFKD
 ALKDFQQVVR LSPNDPDATR KLKECEKAVM KLFEEAISV PVSERRSVAE SIDFHTIEVE
 PQYSGARIEG EEVTLDFVKT MMEDFKNQKT LHKRYAYQIV LQTRQILLAL PSLVDISVPH
 GKHITVCGDV HGQFYDLLNI FELNGLPSEE NPYLFNGDFV DRGSFSVEII LTLFAFKCMC
 PSSIYLARGN HESKSMNKIY GFEGEVRSKL SEKFVDLFAE VFCYLPLAHV INGKVFVHVH
 GLFSVDGVKL SDIRAI DRFC EPPEEGLMCE LLWSDPQPLP GRGPSKRGV LSFGGDVTKR
 FLQDNNLDLL VRSHEVKDEG YEVEHDGKLI TVFSAPNYCD QMGNGAFIR FEAPDMKPN
 VTFSAVPHPD VKPMAYANNF LRMFN

Arabidopsis thaliana PAPP5(136-484)

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH **M**PDATRKLKE CEKAVMKLKF EEAISVPVSE RRSVAESIDF
 HTIEVEPQYS GARIEGEEVT LDFVKTMMED FKNQKTLHKR YAYQIVLQTR QILLALPSLV
 DISVPHGKHI TVCGDVHGQF YDLLNIFELN GLPSEENPYL FNGDFVDRGS FSVEIILLTF
 AFKCMCPSSI YLARGNHESK SMNKIYGFEG EVRSKLSEKF VDLFAEVFCY LPLAHVINGK
 VFVHVHGLFS VDGVKLSDIR AIDRFCEPPE EGLMCELLWS DPQPLPGRGP SKRGVGLSFG
 GDVTKRFLQD NNLDLLVRSH EVKDEGYEVE HDGKLITVFS APNYCDQMG N KGAFIRFEAP
 DMKPNIVTFS AVPHPDVKPM AYANNFLRMFN

Arabidopsis thaliana PAPP5(136-472)

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH **M**PDATRKLKE CEKAVMKLKF EEAISVPVSE RRSVAESIDF
 HTIEVEPQYS GARIEGEEVT LDFVKTMMED FKNQKTLHKR YAYQIVLQTR QILLALPSLV
 DISVPHGKHI TVCGDVHGQF YDLLNIFELN GLPSEENPYL FNGDFVDRGS FSVEIILLTF
 AFKCMCPSSI YLARGNHESK SMNKIYGFEG EVRSKLSEKF VDLFAEVFCY LPLAHVINGK
 VFVHVHGLFS VDGVKLSDIR AIDRFCEPPE EGLMCELLWS DPQPLPGRGP SKRGVGLSFG

GDVTKRFLQD NNLDLLVRSH EVKDEGYEVE HDGKLITVFS APNYCDQMGN KGAFIRFEAP
DMKPNIVTFS AVPHPDVKPM

***Arabidopsis thaliana* PAPP2c(1-287)**

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MGKFCCEFTS ASEVVGGQSS SRSGKGRSDE GMIKYGFSLV
KGGANHPMED YHVANFINIQ DHELGLFAIY DGHMGDSVPA YLQKRLFSNI LKEVKTKKKG
EFWVDPRRSI AKAYEKTDQA ILSNSSDLGR GGSTAVTAIL INGRKLWIAN VGDSRAVLSH
GGAITQMSTD HEPRTERRSI EDRGGFVSNL PGDVPRVNGQ LAVSRAFGDK GLKTHLSSEP
DIKEATVDSQ TDVLLLASDG IWKVMTNEEA MEIARRVKDP QKAAKELTAE ALRRESKDDI
SCVVVRF

***Arabidopsis thaliana* PAPP2c(36-472)**

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MIKYGFSLV KGGANHPMED YHVANFINIQ DHELGLFAIY
DGHMGDSVPA YLQKRLFSNI LKEVKTKKKG EFWVDPRRSI AKAYEKTDQA ILSNSSDLGR
GGSTAVTAIL INGRKLWIAN VGDSRAVLSH GGAITQMSTD HEPRTERRSI EDRGGFVSNL
PGDVPRVNGQ LAVSRAFGDK GLKTHLSSEP DIKEATVDSQ TDVLLLASDG IWKVMTNEEA
MEIARRVKDP QKAAKELTAE ALRRESKDDI SCVVVRF

***Arabidopsis thaliana* PhyA(873-1122)**

MGSSHHHHHH SQDFQ^QLASHE LQQALHVQRL AERTAVKRLK ALAYIKRQIR NPLSGIMFTR
KMIEGTELGP EQRRLQ^TSA LCQKQLSKIL DDSLESIE GCLDLEMKEF TLNEVLTAST
SQVMMKSNKG SVRITNETGE EVMSDTLYGD SIRLQ^QVLAD FMLMAVNFTP SGGQLTVSAS
LRKDQLGRSV HLANLEIRLT HTGAGIPEFL LNQMFGTEED VSEEGLSLMV SRKLVKLMNG
DVQYLRQAGK SSFIITAE^LA AANK

***Synechocystis* sp. PCC 6803 Cph1(1-318) *Arabidopsis thaliana* PhyA(403-593)**

MATTVQLSDQ SLRQLETLAI HTAHLIQPHG LVVVLQEPDL TISQISANCT GILGRSPEDL
LGRTLGEVFD SFQIDPIQSR LTAGQISSLN PSKLWARVMG DDFVIFDGVF HRNSDGLLVC
ELEPAYTSDN LPFLGFYHMA NAALNRLRQQ ANLRDFYDVI VEEVRRMTGF DRVMLYRFDE
NNHGDVIAED KRDDMEPYLG LHYPESDIPQ PARRLFIHNP IRVIPDVYGV AVPLTPAVNP
STNRAVDL^TE SILRSAYHCH LTYLKNMGVG ASLTISLIKD GHLWGLIACH HQTPKVIPFE
LRKACEFFGR VVFSNISAE^L ELDNQMV^EKN ILRTQTLLCD MLMRDAPLGI VSQSPNIMDL
VKCDGAALLY KDKIWKLGTT PSEFHLQ^EIA SWLCEYHMDS TGLSTDSLHD AGFP^RALS^LG
DSVCGMAAVR ISSKDMIFWF RSHTAGEVRW GGAKHDPDDR DDARRMHPRS SFKAFLEVVK
TRSLPWKDYE MDAIHSLQLI LRNAFKDSET THHHHHH

***Synechocystis* sp. PCC 6803 Cph1(1-318) *Arabidopsis thaliana* PhyB(434-624)**

MATTVQLSDQ SLRQLETLAI HTAHLIQPHG LVVVLQEPDL TISQISANCT GILGRSPEDL
LGRTLGEVFD SFQIDPIQSR LTAGQISSLN PSKLWARVMG DDFVIFDGVF HRNSDGLLVC
ELEPAYTSDN LPFLGFYHMA NAALNRLRQQ ANLRDFYDVI VEEVRRMTGF DRVMLYRFDE
NNHGDVIAED KRDDMEPYLG LHYPESDIPQ PARRLFIHNP IRVIPDVYGV AVPLTPAVNP
STNRAVDL^TE SILRSAYHCH LTYLKNMGVG ASLTISLIKD GHLWGLIACH HQTPKVIPFE
LRKACEFFGR VVFSNISAE^L QLALQMSEKR VLRTQTLLCD MLLRDS^PAGI VTQSPS^IMDL
VKCDGAALY HGKYYPLGVA PSEVQIKDVV EWLLANHADS TGLSTDSLGD AGYPGAAALG
DAVCGMAVAY ITRKDFLFWF RSHTAKEIKW GGAKHHPEDK DDGQRMHPRS SFQAFLEVVK
SRSQPWETA^E MDAIHSLQLI LRDSFK^ESEA AHHHHHH

***Synechocystis* sp. PCC 6803 Cph1(1-318) *Arabidopsis thaliana* PhyB(434-608)**

***Arabidopsis thaliana* PhyA(528-831)**

MATTVQLSDQ SLRQLETLAI HTAHLIQPHG LVVVLQEPDL TISQISANCT GILGRSPEDL
LGRTLGEVFD SFQIDPIQSR LTAGQISSLN PSKLWARVMG DDFVIFDGVF HRNSDGLLVC

ELEPAYTSDN LPFLGFYHMA NAALNRLRQQ ANLRDFYDVI VEEVRRMTGF DRVMLYRFDE
 NNHGDVIAED KRDDMEPYLG LHYPESDIPQ PARRLFIHNP IRVIPDVYGV AVPLTPAVNP
 STNRAVDLTE SILRSAYHCH LTYLKNMGVG ASLTISLIKD GHLWGLIACH HQTPKVIPFE
 LRKACEFFGR VVFSNISAEEL QLALQMSEKR VLRTQTLLCD MLLRDSPLGI VTQSPSIMDL
 VKCDGAAFLY HGKYYPLGVA PSEVQIKDVV EWLLANHADS TGLSTDLSGD AGYPGAAALG
 DAVCGMAVAY ITKRDFLFWF RSHTAGEVRW GGAKHDPDDR DDARRMHPRS SFKAFLEVVK
 TRSLPWKDYE MDAIHSLQLI LRNAFKDSET TDVNTKVIYS KLNDLKIDGI QELEAVTSEM
 VRLIETATVP ILAVDSGDLV NGWNTKIAEL TGLSVDEAIG KHFLTLVEDS SVEIVKRMLE
 NALEGTEEQN VQFEIKTHLS RADAGPISLV VNACASRDH ENVVGVCFVA HDLTGQKTVM
 DKFTRIEGDY KAIIQNPPL IPPIFGTDEF GWCTEWNPM SKLTGLKREE VIDKMLLGEV
 FGTQKSCCRL KNQEAFTVNLG IVLNNAVTSH HHHHH

***Synechocystis* sp. PCC 6803 Cph1(1-318) *Arabidopsis thaliana* PhyB(434-863)**

MATTVQLSDQ SLRQLETLAI HTAHLIQPHG LVVVLQEPDL TISQISANCT GILGRSPEDL
 LGRTLGEVFD SFQIDPIQSR LTAGQISSLN PSKLWARVMG DDFVIFDGVF HRNSDGLLVC
 ELEPAYTSDN LPFLGFYHMA NAALNRLRQQ ANLRDFYDVI VEEVRRMTGF DRVMLYRFDE
 NNHGDVIAED KRDDMEPYLG LHYPESDIPQ PARRLFIHNP IRVIPDVYGV AVPLTPAVNP
 STNRAVDLTE SILRSAYHCH LTYLKNMGVG ASLTISLIKD GHLWGLIACH HQTPKVIPFE
 LRKACEFFGR VVFSNISAEEL QLALQMSEKR VLRTQTLLCD MLLRDSPLGI VTQSPSIMDL
 VKCDGAAFLY HGKYYPLGVA PSEVQIKDVV EWLLANHADS TGLSTDLSGD AGYPGAAALG
 DAVCGMAVAY ITKRDFLFWF RSHTAGEIKW GGAKHHPEDK DDGQRMHPRS SFQAFLEVVK
 SRSQPWETAE MDAIHSLQLI LRDSFKESAE AMNSKVVDGV VQPCRDIMAGE QGIDELGAVA
 REMVRLIETA TVPIFAVDAG GCINGWNAKI AELTGLSVEE AMGKSLVSDL IYKENEATVN
 KLLSRALRGD EEKNVEVKLK TFSPELQGA VFVVVNACSS KDYLNNIVGV CFVGGQDVTSQ
 KIVMDKFINI QGDYKAIVHS PNPLIPPIFA ADENTCCLEW NMAMEKLTGW SRSEVIGKMI
 VGEVFGSCCM LKGPDALTKF MIVLHNAIGG HHHHHH

9 Abkürzungen

A	Adenosin
Å	Angström
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
AnPixJ	CBCR aus <i>Anabaena (Nostoc)</i> sp.
APC	<i>Anaphase-promoting complex</i>
AS	Aminosäure
ASK1	<i>Apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AtPhy	Phytochrom aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
AvPhyA	Phytochrom aus <i>Avena sativa</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BphP	Bakteriochrome
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Biliverdin
C	Cytosin
CBCR	Cyanobakteriochrome
CD	Zirkulardichroismus
CDC16/27	<i>Cell division cycle protein 16/27</i>
c-di-GMP	zyklisches Diguanylat
COP1	<i>Constitutive photomorphogenic 1</i>
CRY	Cryptochrom
CX-MS	<i>Cross-Linking</i> Massenspektrometrie
Da	Dalton
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2'-Desoxynukleotide
DrBphP	Bakteriochrom aus <i>Deinococcus radiodurans</i>
ϵ	Extinktion
EB	Elutionspuffer (<i>elution buffer</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FHY1	<i>Far-red elongated hypocotyl 1</i>
FHL	<i>FHY1-like</i>
FMN	Flavinmononukleotid
FyPP	<i>Flower-specific phytochrome associated protein phosphatase</i>

g	Gramm
G	Guanin
GAF	cGMP Phosphodiesterase, Adenylat Zykklase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HAMP	Histidinkinase/Adenylatzyklase/Methyl-akzeptierende Phosphatase
HDX	Wasserstoff-Deuterium-Austausch
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFR1	<i>Long hypocotyl in far-red 1</i>
HKR	Histidinkinase verwandte Domäne
<i>Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HY5	<i>Long hypocotyl 5</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
K	Kelvin
KOAc	Kaliumacetat
λ	Wellenlänge
L	Liter
LAF1	<i>Long after far-red light 1</i>
m	Meter
M	Molar (mol/L)
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MCP	Methyl-akzeptierendes Chemotaxis Protein
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
min	Minuten
MST	Themophorese im Mikromaßstab
5,10-MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
NaOH	Natriumhydroxid
NDPK2	Nukleare Diphosphatkinase 2
NLS	Nukleares Lokalisierungssignal
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NTE	N-terminalen Erweiterung
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm
ORI	Replikationsursprung
<i>PaBphP</i>	Bakteriochrom aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamidelektrophorese
PAS	PER, ARNT, SIM
PAPP2c	Phytochrom assoziierte Proteinphosphatase des Typs 2c
PAPP5	Phytochrom assoziierte Proteinphosphatase des Typs 5
PCB	Phycocyanobilin
P ϕ B	Phytochromobilin
PCR	Polymerasekettenreaktion

PCR	Polymerasekettenreaktion
P _{fr}	Dunkelrotlicht absorbierende Form der Phytochrome
Phy	Phytochrom
PHY	Phytochrom-spezifische GAF Domäne
pI	Isoleletrischer Punkt
PIF	Phytochrominteraktionsfaktoren
PIL	<i>PIF3</i> -ähnlich
PKS1	Proteinkinase Substrate 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNPP	Para-Nitrophenylphosphat
PPIase	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase
PPM	Metallionenabhängige Proteinphosphatasen
PPP	Phosphoprotein Phosphatasen
P _r	Rotlicht absorbierende Form der Phytochrome
Psi	<i>Pound per square inch</i> (1 psi = 6895 Pa)
PSM	Photosensorisches Modul
PUB	Phycourobilin
PVB	Phycoviolobin
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RBS	Ribosomale Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RM	Regulatorisches Modul
r.m.s.	<i>Root mean square</i>
RR	Regulatorische Region
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep	Streptomycin
SynCph1	Cyanobakterielles Phytochrom 1 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
SynCph2	Cyanobakterielles Phytochrom 2 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
T	Thymin
TEMED	Tetramethyldiamin
TM	Transmembran-ständig
TPR	<i>Tetratricopeptide repeat</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
UVR8	UV-Licht-Resistenz-Lokus 8
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

9.1 Aminosäuren

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

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seinem Arbeitskreis diese Arbeit anzufertigen. Danke für die stetige Unterstützung und die Freiheit auch meine eigenen Ideen verfolgen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Norbert Hampp für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission.

Meinen Kooperationspartner David Buhrke (AG Hildebrandt) Hanna Helizon (AG Zeidler), Nils Hellwig (AG Morgner) und Sintayehu Shenkutie (AG Hughes) danke ich für die gute Zusammenarbeit und die spannenden Diskussionen. Nicht zu vergessen ist hier auch die massenspektrometrische Abteilung des Fachbereichs Chemie unter Leitung von Herrn Dr. Uwe Linne. Die Zusammenarbeit und gemeinsamen Tüfteleien bei der HDX-MS Analyse haben mir stets viel Spaß gemacht.

Meinen aktuellen und ehemaligen Arbeitskollegen – Katrin Anders, Ankan Banerjee, Sophie Franz, Yann Geisselbrecht, Petra Gnau, Sebastian Hepp, Elisabeth Ignatz, Vitali Kalugin, Stephan Kiontke, Michael Kock, Timo Kraushaar, Manuel Maestre-Reyna, Thomas Marcellino, Barbara Mertins, George Psakis, Ralf Pöschke, Vasundhara Srinivasan und Marian Vogt – danke ich für die gute Atmosphäre im Labor aber auch für die zahlreichen tollen Ausflüge. Besonders möchte ich hier die Bio-Crew hervorheben, mit der ich das Abenteuer „Umzug in die Biologie“ erleben durfte. Danke, dass wir nie verlernt haben zu Lachen und so auch die kleinen und etwas größeren Probleme überstanden haben.

Meinen drei Masterstudenten Ramona Klasen, Simon Straß und Verena Gruth danke ich, dass sie mit mir die Begeisterung für mein Thema geteilt haben und die tolle gemeinsame Zeit. Ihr seid spitze. Weiterhin danke ich meinen Vertiefern: Manuela Harloff, Fabian Rüger, Yodita Asfaha, Sabine Düwel, Ramona Klasen, Nilofar Feizy, Simon Straß, Verena Gruth und Andreas Schwaba für ihren Beitrag zu dieser Arbeit.

Zum Schluss danke ich Andi von ganzem Herzen für den Halt, die Liebe und den Ausgleich, den er mir gegeben hat. Danke, dass du immer für mich da bist.