

---

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN  
AN DER

FAKULTÄT FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE  
DER  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN



BIOCHEMISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG ZWEIER  
CYANOBAKTERIELLER PHYTOCHROME AUS *CALOTHRIX* PCC 7601

VORGELEGT VON BENJAMIN QUEST  
GEB. 7. MAI 1972, BERLIN-DAHLEM  
2003

---



## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13(3) der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

### Ehrenwörtliche Versicherung:

Ich versichere hiermit die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den angegebenen Mitteln angefertigt zu haben.

München, den .....

.....  
(Benjamin Quest)

Dissertation eingereicht am:

Datum der mündlichen Prüfung:

1. Berichterstatter ..... Prof. Dr. D. Oesterhelt

2. Berichterstatter ..... Prof. Dr. W. Gärtner



*meiner Großmutter zum 89. ¼ Geburtstag*

*Indem ein Mensch mit den ihm von der Natur gegebenen Gaben sich zu verwirklichen sucht, tut er das Höchste und einzig Sinnvolle, was er tun kann.  
(Hermann Hesse)*



Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Membranbiochemie am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, angefertigt.



*Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:*

Jorissen, H.J.M.M., Quest, B., Remberg, A., Coursin, T., Braslavsky, S.E., Schaffner, K., Tandeau de Marsac, N. and Gärtner, W. (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 2662-2671.

Jorissen, H.J.M.M., Quest, B., Lindner, I., Tandeau de Marsac, N. and Gärtner, W. (2002) Phytochromes with noncovalently bound chromophores: The ability of apophytochromes to direct tetrapyrrole photoisomerization. *Photochemistry & Photobiology*, **75**, 554-559.

Quest, B., Hübschmann, T. and Gärtner, W. (2003) Spectroscopy and signal transduction of the first homologously expressed Bacteriophytochrome with alternative chromophore binding site. In Vorbereitung.



# Inhaltsverzeichnis

## 1. EINLEITUNG

<b>1.1 Der Photorezeptor Phytochrom</b> .....	2
<b>1.2 Verbreitung der Phytochrome</b> .....	4
<b>1.3 Quartärstruktur der Phytochrome</b> .....	7
1.3.1 Domänenstruktur.....	7
1.3.2 Die Chromophore der Phytochrome.....	9
1.3.3 Pr-Pfr-Photokonversion und Pfr-Stabilität.....	13
1.3.4 Assemblierung von Phytochrom.....	13
<b>1.4 Die Bacteriophytochrome</b> .....	14
1.4.1 Cyanobakterielle Phytochrome, CphA und CphB.....	15
1.4.2 Phylogenetisch entferntere cyanobakterielle Phytochromhomologe.....	16
1.4.3 Weitere prokaryotische Phytochrome.....	17
<b>1.5 Zum Organismus <i>Calothrix</i> PCC7601</b> .....	18
<b>1.6 Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	20

## 2. MATERIAL UND METHODEN

<b>2.1 Geräte</b> .....	21
<b>2.2 Chemikalien, Enzyme</b> .....	23
2.2.1 Chemikalien.....	23
2.2.2 Enzyme und Antikörper.....	23
2.2.3 Kits.....	24
<b>2.3 Allgemeine Puffer</b> .....	24
<b>2.4 Mikrobiologische Methoden</b> .....	25
2.4.1 Bakterienstämme.....	25
2.4.1.1 Das Epicurian Coli-BL-21-CodonPlus™ RIL Expressionssystem.....	25
2.4.2 Nährmedien, Antibiotika.....	26
2.4.2.1 Medien für Cyanobakterien.....	26
2.4.2.2 Medien für <i>E. coli</i> .....	26
2.4.2.3 Antibiotika, Antimycotica (Mycostatika).....	27
2.4.3 Anzucht von <i>Calothrix</i> PCC7601 und <i>Fremyella diplosiphon</i> .....	27
2.4.4 Fermenteranzucht von <i>Calothrix</i> und <i>Fremyella diplosiphon</i> .....	28
2.4.5 Triparentale Konjugation.....	28
2.4.6 Plasmid „Rescue“ aus <i>Calothrix</i> .....	30
2.4.7 Phycobiliproteinbestimmung.....	30
2.4.8 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> .....	31
2.4.9 Transformation von <i>E. coli</i> .....	31
2.4.9.1 Elektroporation.....	31
2.4.9.2 TSS-Transformation.....	31
2.4.10 Herstellung von Dauerkulturen.....	32
2.4.10.1 <i>E. coli</i> .....	32

2.4.10.2 Cyanobakterien.....	32
2.4.11 Heterologe Expression.....	32
2.4.12 Zellaufschluß.....	33
2.4.12.1 <i>E. coli</i> .....	33
2.4.12.2 Cyanobakterien.....	33
<b>2.5 Verwendete Vektoren</b> .....	<b>33</b>
2.5.1 Der pMEX 8 -Vektor.....	33
2.5.2 Der pET28a (+) -Vektor.....	34
2.5.3 Der TOPO pCR2.1® -Vektor.....	34
2.5.4 Shuttle-Vektoren.....	34
<b>2.6 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>35</b>
2.6.1 Klonierungstechniken.....	35
2.6.1.1 Restriktionsverdau.....	35
2.6.1.2 Herstellung glatter Enden.....	35
2.6.1.3 Dephosphorylierung von 3' DNA-Enden.....	35
2.6.1.4 Ligation.....	36
2.6.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	36
2.6.2 Ortsgerichtete Mutagenese (site directed mutagenesis, SDM).....	37
2.6.3 Agarosegelelektrophorese.....	38
2.6.4 Präparation von DNA.....	39
2.6.4.1 Plasmidisolierung Minipräparation.....	39
2.6.4.2 Plasmidisolierung Midipräparation.....	39
2.6.4.3 Präparation genomischer DNA aus Cyanobakterien.....	39
2.6.4.4 Ethanol-fällung von DNA.....	39
2.6.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen mittels QiaexII TM.....	40
2.6.5 DNA Sequenzierung.....	40
<b>2.7 Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>41</b>
2.7.1 Proteinaufreinigung.....	41
2.7.1.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie.....	41
2.7.1.2 Gelfiltration.....	41
2.7.1.3 Anionenaustauscherchromatographie.....	42
2.7.1.4 Affinitätschromatographie mit Anti-FLAG Sepharose.....	43
2.7.1.5 Generierung spezifischer Affinitätschromatographiesäulen (NHS).....	43
2.7.2 Änderung von Proteinkonzentration und/oder Pufferbedingungen.....	44
2.7.2.1 PD-10 Entsalzungssäulen.....	44
2.7.2.2 Dialyse.....	44
2.7.2.3 Centricon® /Centriprep-Konzentratoren.....	44
2.7.3 Thrombinverdau.....	44
2.7.4 Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	45
2.7.5 Herstellung polyklonaler Anti-RcpA Hasen-Antikörper.....	45
2.7.5.1 Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern.....	45
2.7.6 Phosphotransfer von CphB auf RcpB.....	46
2.7.7 Phosphorylierung von RcpA und RcpB mit Acetylphosphat.....	46

<b>2.8 Proteinanalytische Methoden</b> .....	47
2.8.1 Proteinbestimmungen.....	47
2.8.2 Acrylamid-Gelelektrophorese.....	47
2.8.2.1 Proteinmarker.....	49
2.8.2.2 Visualisierung von Bilinchromophoren mittels Zn <sup>2+</sup> -Gelelektrophorese.....	49
2.8.2.3 Coomassie-Färbung.....	49
2.8.3 Westernblot.....	49
2.8.3.1 Immundetektion.....	50
2.8.3.2 Westernblot „Stripping“.....	50
2.8.4 Proteinsequenzierung.....	51
2.8.5 MS, MALDI, HPLC.....	51
<b>2.9 Spektroskopie</b> .....	51
2.9.1 Stationäre UV-Vis Spektroskopie.....	51
2.9.1.1 Verwendete Filter.....	52
2.9.1.2 Extinktionskoeffizienten der Chromophore.....	52
2.9.2 Messungen zur Pfr-Stabilität.....	52
2.9.3 Aufnahme von Assemblierungskinetiken.....	52
2.9.4 Lifetime associated difference absorbance spectroscopy (LADS).....	52
<b>2.10 Datenverarbeitung</b> .....	53
2.10.1 Auf DNA-Ebene:.....	53
2.10.1.1 Auswertung von Sequenzdaten.....	53
2.10.1.2 Oligonukleotid Analyse.....	53
2.10.1.3 Generierung von Vektorkarten.....	53
2.10.2 Phylogenie.....	53
2.10.2.1 Alignments.....	53
2.10.2.2 Phylogenetische Bäume.....	54
2.10.3 Strukturvorhersagen.....	54
2.10.3.1 Sekundärstrukturvorhersage.....	54
2.10.3.2 3D Modellierung.....	54
2.10.3.3 Vorhersage anderer Proteineigenschaften.....	54
2.10.4 Auswertungssoftware.....	54

### **3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

<b>3.1 Phylogenie</b> .....	55
3.1.1 Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Phytochrome.....	55
3.1.2 Alignment ausgewählter Bacteriophytochrome.....	58
<b>3.2 Strukturvorhersagen</b> .....	59
3.2.1 Sekundärstrukturvorhersage von CphA.....	59
3.2.2 3D Modellierung.....	60
3.2.3 Modell zur Bindung von PCB bzw. BV am Histidin.....	61
<b>3.3 Klonierungen</b> .....	63
3.3.1 Klonierung von cphA und rcpA und heterologe Expression.....	63

3.3.2 Klonierung von cphB und rcpB zur heterologen Expression.....	64
3.3.2.1 Klonierung von cphB und cphBm.....	64
3.3.2.2 Klonierung und Expression von rcpB.....	68
3.3.3 Klonierungen zur homologen Expression.....	68
<b>3.4 Punktmutagenese von cphA und cphB.....</b>	<b>72</b>
3.4.1 Punktmutagenese von cphA.....	73
3.4.2 Punktmutagenese von CphBm.....	73
<b>3.5 CphA aus heterologer Expression.....</b>	<b>75</b>
3.5.1 Aufreinigung von CphA.....	75
3.5.2 Assemblierung von CphA mit PCB.....	76
3.5.3 CphA Mutanten.....	77
3.5.4 Die Mutationen M267R und M267L.....	80
3.5.5 Die Mutationen N266V, A, D, G.....	82
3.5.6 Die Mutationen Y263H, N, D.....	84
3.5.7 Die Mutation H260R.....	85
3.5.8 Zusammenfassende Diskussion zu den CphA Mutanten.....	87
<b>3.6 CphBm-Konstrukte aus heterologer Expression .....</b>	<b>88</b>
3.6.1 Aufreinigung und Spektroskopie von CphBm, CphBmL266C und CphBm SPL→ANC (mit N-terminalem His(6)-tag).....	88
3.6.2 Aufreinigung von CphBm und CphBmLC (mit C-terminalem His(6)-tag).....	89
3.6.3 Spektroskopie und Assemblierung von CphBm.....	92
3.6.3.1 CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen, PCB-Addukt.....	92
3.6.3.2 CphBm unter reduzierenden Bedingungen, PCB-Addukt.....	93
3.6.3.3 Das BV-Addukt von CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen.....	94
3.6.3.4 Das BV-Addukt von CphBm unter reduzierenden Bedingungen.....	95
3.6.3.5 Assemblierung von CphBm mit PCB und BV unter nichtreduzierenden Bedingungen.....	97
3.6.4 Zusammenfassung CphBm.....	99
3.6.5 Spektroskopie und Assemblierung von CphBmLC „Chamäleochem“.....	100
3.6.5.1 Blockierung der Chromophorbindestelle durch nichtreduzierende Bedingungen und „Freischaltung“ durch Zugabe von DTT.....	101
3.6.5.2 Freies CphBmLC und erneute Blockierung durch Gelfiltration.....	103
3.6.5.3 Konversionskinetiken des PCB-Addukts von CphBmLC.....	104
3.6.5.4 Konversion aus der Pfr-Form von CphBmLC-PCB.....	106
3.6.5.5 Spektroskopie von CphBmLC-BV.....	108
3.6.5.6 „Konversionskinetik“ von CphBmLC-BV.....	109
3.6.5.7 Assemblierung von CphBmLC mit PCB und BV unter reduzierenden Bedingungen.....	110
3.6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zu CphBmLC.....	113
3.6.7 Assemblierungsdifferenzspektren von CphBm, CphBmLC und CphA.....	114
3.6.8 Effekt von Imidazol auf die PCB-Addukte von CphBm und CphBmLC.....	118
3.6.8.1 Assemblierung von CphBm unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen.....	118
3.6.8.2 Assemblierung von CphBmLC mit PCB unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen.....	120
3.6.8.3 Zeitlicher Verlauf des Chromophorverlusts aus CphBm(LC)-PCB.....	122
3.6.8.4 Der Imidazol-Einfluß auf CphBm-BV und CphBm-PCB unter reduzierenden Bedingungen.....	124

3.6.9 Effekt von NaCl auf CphBm.....	125
3.6.10 Experimente zur Chromophorkompetition.....	128
3.6.11 Zusammenfassende Diskussion zur Inhibition/Kompetition.....	133
3.6.12 Die Mutante H267A.....	134
3.6.13 Test auf Kovalenz der Chromophor-Protein Bindung.....	135
3.6.13.1 Nachweis mittels Zink-Fluoreszenz.....	135
3.6.13.2 Nachweis mittels Proteaseverdau und HPLC.....	136
<b>3.7 CphB aus homologer Expression CphBcy.....</b>	<b>138</b>
3.7.1 Expression von CphBcy im 12 Liter Fermenter.....	139
3.7.2 Aufreinigung von CphBcy.....	140
3.7.3 Spektroskopie von CphBcy.....	141
3.7.4 Pfr-Stabilität von CphBcy.....	144
3.7.5 Phosphotransfer von CphBcy auf RcpB.....	146
3.7.6 Identifikation von CphBcy über MS.....	150
3.7.7 Versuche zur Identifikation des nativen Chromophors.....	151
<b>3.8 Zusammenfassende Diskussion zu CphB.....</b>	<b>153</b>
<b>3.9 Homologe Expression von CphA.....</b>	<b>156</b>
<b>3.10 Homologe Expression von RcpA.....</b>	<b>158</b>
<b>3.11 Protein-Protein Wechselwirkungsstudien.....</b>	<b>159</b>
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b>	
<b>5. ANHANG</b>	
<b>5.1 Gensequenzen.....</b>	<b>164</b>
5.1.1 Das CphA/RcpA Operon.....	164
5.1.2 Das CphB/RcpB Operon.....	166
<b>5.2 Alignment.....</b>	<b>169</b>
5.2.1 Accession Nummern der verwendeten Proteinsequenzen.....	175
<b>5.3 Primersequenzen.....</b>	<b>176</b>
5.3.1 Sequenzierungsprimer.....	176
5.3.2 Mutationsprimer.....	177
<b>5.4 Peakliste des Proteinverdaus von CphB(cy).....</b>	<b>178</b>
<b>5.5 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>182</b>
<b>5.6 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>184</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	



# 1. Einleitung

*Wenn man darüber redet, wird auch das Einfachste gleich kompliziert und unverständlich. (H. Hesse)*

Ob Licht durch das Wort Gottes (1. Moses 1,3) oder aber durch Sekundäreffekte eines Urknalls (Abbé Georges Édouard Lemaître, 1927) entstanden ist, ist eine Frage der Weltanschauung. Völlig unzweifelhaft entscheidend ist dieser kleine Wellenlängen-Ausschnitt aus dem breiten Bündel elektromagnetischer Strahlung, den wir sichtbares Licht nennen, jedoch für das Leben auf der Erde. Schließlich stammt ein Großteil der Energie, die auf der Erde umgesetzt wird, aus dem Sonnenlicht, und die Atmosphäre, die für aerobe Lebewesen unverzichtbar ist, entstand durch die Nutzung der Sonnenenergie durch photosynthetische Organismen unter Spaltung von Wasser.

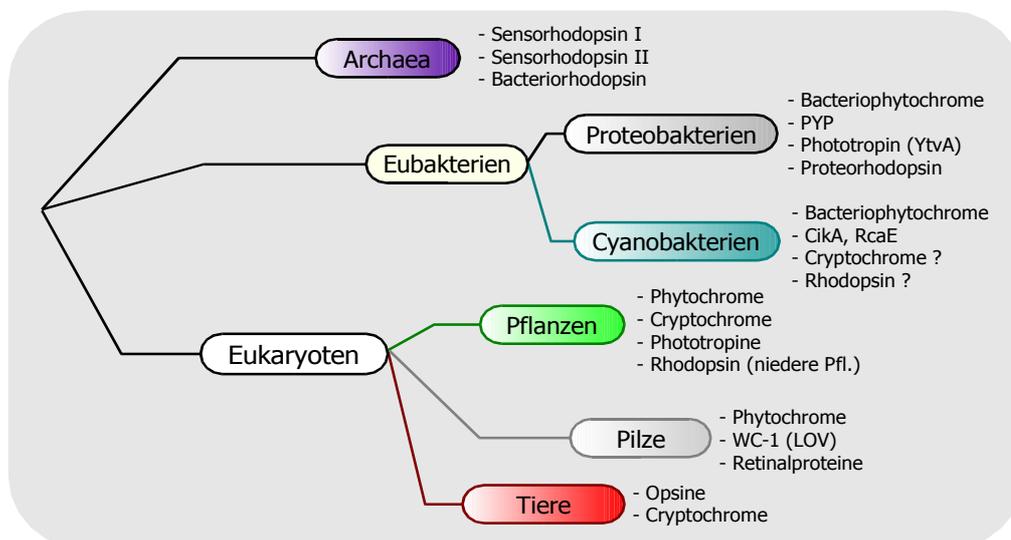
Um Lichtenergie effektiv nutzen zu können, ist es unerlässlich, Informationen über die spektrale Qualität, Richtung, Intensität und Dauer der Bestrahlung zu gewinnen. So ist es im Grunde genommen wenig verwunderlich, daß alle photosynthetisch lebenden Organismen über viele verschiedene Photoperzeptionssysteme verfügen. Da Licht zugleich eine Kraft sein kann, die zerstört, finden sich jedoch auch bei nichtphotosynthetischen Organismen Lichtperzeptionssysteme (vornehmlich Blaulichtrezeptoren), die den "lichtscheuen" Organismen die Präsenz schädlicher kurzwelliger Strahlung signalisieren. Da die spektrale Zusammensetzung des Lichts zusätzlich detaillierte Umweltinformationen transportiert, gibt es kaum ein Lebewesen, das nicht in der Lage wäre, auf Licht basierende (optische) Umweltreize wahrzunehmen und zu verarbeiten (Abb. 1.1).

Im Eukaryontenreich finden sich Rhodopsine als Sehpigmente in der Retina höherer Tiere <sup>1, 2</sup>, sowie Opsine, wie das Melanopsin, das zum Stellen der circadianen Uhr dient <sup>3, 4, 5</sup>. Desweiteren kommen auch mit Cryptochromen verwandte Photolyasen als Blaulichtrezeptoren im Tierreich vor <sup>6</sup>. In dem Pilz *Neurospora crassa* wurde ein Photolyase-homologer Blaulichtrezeptor charakterisiert, der die circadiane Rhythmik reguliert <sup>7, 8</sup>, und ein Rhodopsinhomolog gefunden <sup>9</sup>. Weiterhin wurde in *Aspergillus fumigatus* ein Phytochromhomolog gefunden <sup>@</sup>. In höheren Pflanzen, die wie keine andere Organismengruppe auf Licht angewiesen sind, wurden bisher drei Gruppen von Photorezeptoren charakterisiert: Phototropine und Cryptochrome dienen der Blaulichtrezeption <sup>10, 11, 12</sup> während die Gruppe der Phytochrome als Rot-/Dunkelrotlichtsensoren an vielen verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt und im Pflanzenreich nahezu ubiquitär verbreitet ist (siehe Kapitel 1.1), in *Chlamydomonas* wurden außerdem noch zwei Photorezeptoren des Rhodopsin-Typs gefunden <sup>13</sup>.

Bei den Archea sind die Sensor-Rhodopsine I und II des salzliebenden *Halobacterium salinarum* <sup>14</sup> direkt an der Lichtperzeption beteiligt <sup>15</sup>, während das Bacteriorhodopsin dort, wie die meisten anderen Proteine, die primär an der Umsetzung der Lichtenergie mitwirken,

<sup>@</sup> <http://tigrblast.tigr.org/ufmg>

lediglich über Sekundäreffekte Funktionen als Lichtrezeptor übernehmen kann. In nichtphotosynthetischen Bakterien wurden bisher neben dem *photoactive yellow protein* (PYP) <sup>16, 17, 18</sup>, sowie YtvA, einem Phototropin-Homolog aus *Bacillus subtilis* <sup>19</sup> auch Bacteriophytochrome gefunden <sup>20, 21</sup>. Cyanobakterien besitzen neben Bacteriophytochromen <sup>22</sup> noch weitere Phytochrom-Homologe, wie RcaE in *Fremyella diplosiphon* <sup>23, 24</sup>, CikA in *Synechococcus elongatus* <sup>25</sup> oder PlpA in *Synechocystis* <sup>26</sup>. Außerdem gibt es erste Hinweise für das Vorkommen eines Cryptochroms in *Synechocystis* <sup>27</sup> und physiologische Evidenzen für einen Photorezeptor des Rhodopsin-Typs in *Anabaena* und *Calothrix* (K.-H. Jung unpubliziert und <sup>28</sup>). Weiterhin wurde kürzlich sog. „Proteorhodopsin“ in einem nicht spezifizierten marinen Bakterium gefunden <sup>29</sup>. Die am intensivsten erforschte Photorezeptor-Klasse stellt jedoch die stetig wachsende Gruppe der Phytochrome dar.



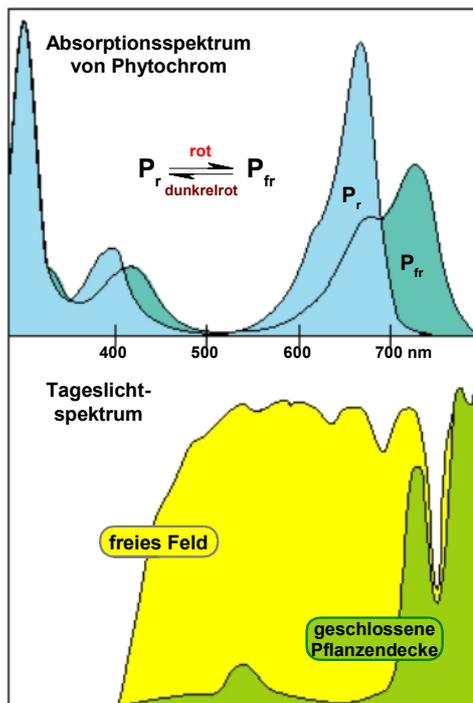
**Abbildung 1.1** Verbreitung verschiedener Photorezeptorsysteme in der belebten Natur.

Die jeweiligen Photorezeptorklassen sind benannt, CikA, RcaE sind phytochromähnliche Proteine, PYP steht für „photoactive yellow protein“, WC-1 („white collar“) ist ein Photolyasehomolog mit LOV Domäne.

## 1.1 Der Photorezeptor Phytochrom

Das initiale Experiment, welches zur Entdeckung eines Photorezeptors für rotes und dunkelrotes Licht führte, stammt aus den frühen fünfziger Jahren des vorigen Jahrhunderts <sup>30</sup>. Das Auskeimen von Samen von *Lactuca sativa* L. konnte durch dunkelrotes Licht inhibiert werden, anschließende Rotbelichtung hob diesen Effekt wieder auf. Entscheidend für die Keimung war allein die Lichtqualität, mit der die letzte Bestrahlung erfolgte. Die erste Charakterisierung des für diesen Prozeß verantwortlich gemachten Pigments gelang Butler *et al.* im Jahr 1959 <sup>31</sup> aus etiolierten Maiskeimlingen, wohingegen die erstmalige Aufreinigung des nativen 124 kDa Vollängenproteins aus *Avena sativa* erst 1982 der Arbeitsgruppe um Quail <sup>32</sup> gelang. Phytochrome sind globuläre Rezeptor-Dimere, die durch Absorption von rotem bzw. dunkelrotem

Licht frei zwischen zwei spektral verschiedenen Proteinkonformationen photokonvertierbar sind. Natives Haferphytochrom A (MW 124 kDa) besitzt in der  $P_r$ -Form Absorptionsmaxima von 666 nm und 360 nm sowie in der  $P_{fr}$ -Form Maxima bei 730 nm und 420 nm (Abb. 1.1.1 oben). Die  $P_{fr}$ -Form wird dabei als die physiologisch aktive Form betrachtet.



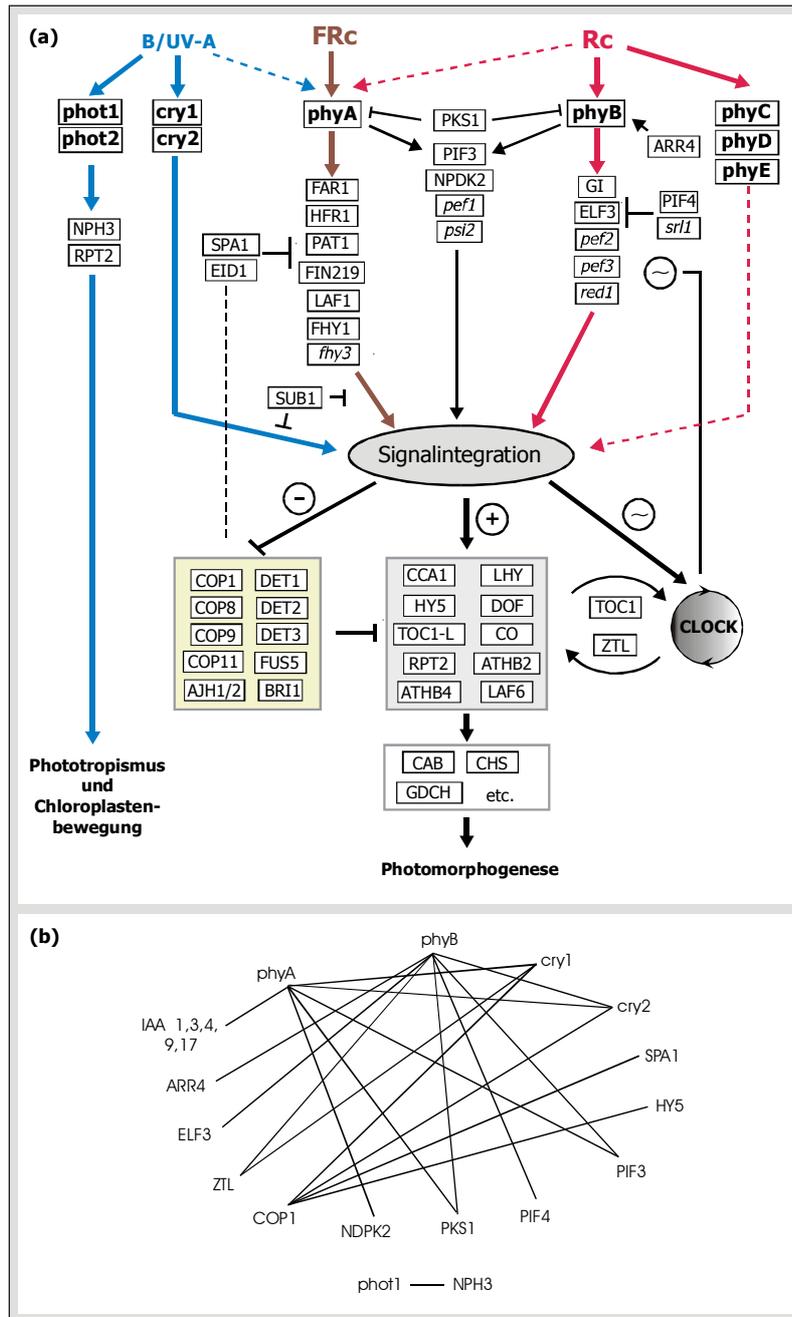
**Abbildung 1.1.1** Pflanzliches Phytochrom A und das Tageslichtspektrum.

Vergleich der Absorptionsspektren von pflanzlichem Phytochrom A und dem Tageslichtspektrum. Aus: Smith<sup>38</sup>, modifiziert.

komplexe Zusammenspiel der bisher bekannten Komponenten pflanzlicher Signaltransduktion ist in Abb. 1.1.2 dargestellt (für weitergehende Informationen siehe<sup>36, 39, 40</sup> und Referenzen darin). An erster Stelle der Signaltransduktion der Phytochrome A bis E steht häufig, nach der Photokonversion zur  $P_{fr}$ -Form, ihre Translokation in den Nukleus<sup>41, 42</sup>. Die physiologische Wirkung der verschiedenen Pflanzenphytochrome ist weiterhin auch abhängig von der Lichtintensität (HIR = *high irradiance response*, LFR = *low fluence response*, VLFR = *very low fluence response*)<sup>43</sup>.

Phytochrome werden, abhängig von ihrer Stabilität im Licht, in zwei Klassen eingeteilt. Typ-I Phytochrome (zu denen in *Arabidopsis* nur das phyA zählt) werden im Licht aktiv (über den pflanzlichen Ubiquitin-/Proteasom-Weg) degradiert und kommen daher in etiolierten (unbelichteten) Keimlingen in 100- bis 1000-facher Menge, verglichen mit de-etioliertem Gewebe vor. Die Typ-II Phytochrome B bis E liegen dagegen generell in sehr viel geringeren Mengen vor, ihre Konzentration ist jedoch weitgehend lichtunabhängig<sup>44, 45</sup>.

In *Arabidopsis* konnten fünf verschiedene Phytochrome (Phy A, B, C, D und E) identifiziert werden<sup>33</sup>, die in ihrer Sequenz nur leicht voneinander verschieden sind, jedoch aufgrund ihrer zeitlichen und räumlichen Verteilung innerhalb der Pflanze, sowie in ihrer Stabilität im Licht (phyA dominiert im etiolierten Keimling) klar voneinander unterscheidbar sind<sup>34</sup>. Beinahe alle lichtabhängigen Prozesse in Pflanzen, wie Keimung, Deetolierung, Differenzierung von Chloroplasten, das Wahrnehmen von konkurrierenden Nachbarpflanzen (siehe Abb. 1.1.1 unten), das Ausbilden von Reproduktions- und Speicherorganen, die Messung von Tageslänge, Lichtintensität und -richtung sowie die Wahrnehmung der Übergänge von Licht und Dunkelheit und die Ausprägung circadianer Rhythmik erfordern das Mitwirken eines oder mehrerer Phytochrome, zum Teil in Synergie zum Teil in Antagonie mit den Cryptochromen<sup>35, 36, 37, 38</sup>. Das komplexe



**Abbildung 1.1.2** Signaltransduktion pflanzlicher Phytochrome (aus <sup>36</sup>, modifiziert).

(a) Vereinfachtes Schema der vorgeschlagenen Signaltransduktionswege, basierend auf molekularen und genetischen Studien der lichtabhängigen Reaktionen von Arabidopsis Keimlingen. Blaulich- und UV-A (B/UV-A) Signale werden von den Phototropinen (phot1 und 2) und den Cryptochromen (cry1 und 2) perzipiert, die Rot-/Dunkelrot Perception läuft über die Phytochrome (phyA-E). phyA handelt primär als Rezeptor für kontinuierliches Dunkelrotlicht (FRC), phyB-E antworten hauptsächlich auf kontinuierliches Rotlicht (Rc). Der gestrichelte Pfeil deutet dort eine Mitbeteiligung von phyA an Rc- und B/UV-A Antwort an. Die Signaltransduktionswege konvergieren in einen mechanistisch undefinierten Signalintegrationsprozess. Komponenten, die bereits kloniert wurden, sind groß, solche, die bisher nur auf genetischer Ebene identifiziert wurden, sind kursiv gedruckt. Die circadiane Uhr ist rechts angedeutet. “~” bedeutet hier taktgebend, “-” inhibierend, “+” aktivierend. Die Proteinklasse COP / DET / FUS (gelber Kasten) agiert unterhalb der Signalkette der Phytochrome und Cryptochrome als lichtinhibierbarer Repressor der Photomorphogenese. Grauer Kasten: bekannte Transkriptionsfaktoren.

(b) Nachgewiesene molekulare Interaktionen zwischen Photorezeptoren und Signaltransduktionskomponenten.

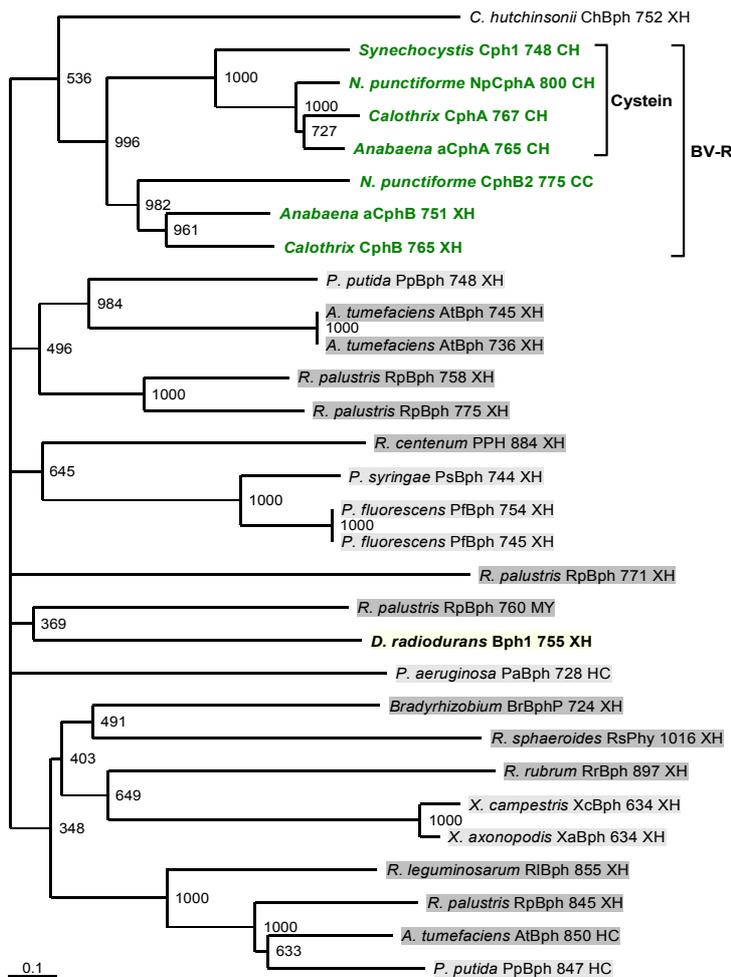
## 1.2 Verbreitung der Phytochrome

Den Phytochromen ist in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit geschenkt worden, da ihre Verbreitung zunächst lediglich auf das Reich der Pflanzen beschränkt schien, bis sie 1997 mit der Sequenzierung des ersten cyanobakteriellen Genoms (*Synechocystis* PCC6803) <sup>46, 47</sup> auch im Reich der Prokaryoten nachgewiesen werden konnten. Das darauffolgende Paradigma, daß Phytochrome nur in photosynthetischen Organismen zu finden seien, wechselte 1999 mit der Entdeckung des Bacteriophytochroms Bph1 in *Deinococcus radiodurans* <sup>20</sup>. Die Tabelle 1.2.1 fasst die bisher in Prokaryoten gefundenen Phytochromhomologen zusammen.

<i>Phylum / Name</i>	<i>C-Typ</i>	<i>B-Typ</i>	<i>andere</i>	<i>HO</i>	<i>BV-R</i>
<b>Cyanobacteria</b>					
<i>Synechocystis</i> PCC6803	Cph1	-	Cph2, PlpA	+	+
<i>Calothrix</i> PCC7601	CphA	CphB	RcaE	+	+
<i>Anabaena</i> PCC7120	1	1	(-)	+	+
<i>Nostoc punctiforme</i>	1	1	1, CC	+	+
<i>Pseudanabaena</i> sp. <sup>#</sup>	(-)	1	(-)	+	+
<i>Leptolyngbya</i> sp. <sup>*</sup>	1	(-)	(-)	+	+
<i>Stanieria</i> PCC 7473 <sup>#</sup>	1	(-)	(-)	+	+
<i>Geitlerinema</i> PCC 9228 <sup>#</sup>	(-)	1	(-)	+	+
<i>Oscillatoria</i> PCC 7821 <sup>#</sup>	(-)	1	(-)	+	+
<i>Nostoc</i> PCC 8009 <sup>#</sup>	(-)	1	(-)	+	+
<b>α-Proteobacteria</b>					
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	-	5	1, XX	+	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	2	2, HC	+	-
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	-	2	-	+	-
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	-	3	-	+	-
<i>Rhodospirillum centenum</i> <sup>*</sup>	(-)	PPH	(-)	(-)	(-)
<i>Rhodospirillum rubrum</i> <sup>*</sup>	(-)	1	(-)	(-)	(-)
<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278	-	BrBphP	(-)	+	-
<i>Rhizobium leguminosarum</i> <sup>*</sup>	(-)	(1)	(-)	+	(-)
<b>γ-Proteobacteria</b>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>*</sup>	-	1	-	+	-
<i>Pseudomonas putida</i> <sup>*</sup>	-	1	1, HC	+	-
<i>Pseudomonas syringae</i>	-	2	-	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> <sup>*</sup>	(-)	1	(-)	(-)	(-)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> <sup>*</sup>	(-)	1	(-)	(-)	(-)
<b>Sphingobacteria</b>					
<i>Cytophaga hutchinsonii</i> <sup>*</sup>	(-)	2	(-)	(-)	(-)
<b>Deinococcus-Thermus</b>					
<i>Deinococcus radiodurans</i>	-	Bph1	-	+	-
<b>Planctomyces</b>					
<i>Gemmata obscuriglobus</i> <sup>*</sup>	(-)	2	(-)	(-)	(+)

Tabelle 1.2.1 Prokaryotische Phytochrome

*C-Typ*, *B-Typ* = Art der Chromophorbindestelle; *HO* = Häm-Oxygenase; *BV-R* = Biliverdin-Reduktase; "andere" = Phytochromhomologe, die an der Chromophorbindestelle abweichen, AS an dieser Stelle; \* = aus unvollständiger Genomsequenzierung oder BLAST-Suche; # = über PCR aus genomischer DNA, Teilsequenz. + = ja, - = nein, (Klammern) = vorläufiges Ergebnis. Zahlen geben die Anzahl auf Sequenzebene identifizierter Proteine wieder, bereits untersuchte Proteine sind namentlich genannt.



**Abbildung 1.2.1** Phylogentischer Stammbaum der Bacteriophytochrome.

Angegeben sind die Namen der Organismen (vgl. Tabelle 1.2.1) mit (vorläufiger) Proteinbezeichnung, Länge des Proteins in AS und der beiden AS, die an der konservierten Chromophorbindestelle zu finden sind (CH entspricht der „klassischen“ Chromophorbindestelle, XH der alternativen Bindestelle). Cyanobakterien in grün,  $\alpha$ -Proteobakterien sind grau,  $\gamma$ -Proteobakterien hellgrau unterlegt.

die Bindung an das Cystein. Näheres zur Chromophorbiosynthese und den vorgeschlagenen Chromophorbindestellen in Kapitel 1.3.2. Im Phylum der Proteobakterien sind Bacteriophytochrome ebenfalls verbreitet, allerdings findet sich dort kein Vertreter mit der „klassischen“ Chromophorbindestelle (Cystein), und auch eine BV-Reduktase kann in diesen Organismen nicht gefunden werden. Dagegen ist die Häm-Oxygenase in allen bisher daraufhin untersuchten (und dahingehend untersuchbaren) Bacteriophytochrom-enthaltenen Mikroorganismen zu finden. Sie liegt bei diesen Organismen in der Regel auf einem Gen-Cluster oder ist mit dem entsprechenden Bacteriophytochrom in einem Operon organisiert, wohingegen sich in *Synechocystis* die Gene der Chromophorbiosynthese nicht in räumlicher Nachbarschaft zum Bacteriophytochrom-Gen befinden<sup>49, 103</sup>.

Die Tabelle 1.2.1 und der in Abb. 1.2.1 gezeigte phylogenetische Baum stellt den aktuellen (Oktober 2002) Stand der Verbreitung der Bacteriophytochrome dar. Auf ein strukturelles Merkmal der Phytochrome soll in diesem Zusammenhang bereits eingegangen werden: in Pflanzen wurde ein vollständig konserviertes Cystein in der N-terminalen Hälfte des Proteins als Chromophorbindestelle identifiziert<sup>48</sup>. Auffallend ist daher die Gruppe der Cyanobakterien, die als einzige Prokaryonten auch Proteine mit dem in Pflanzen konservierten Cystein in der Chromophorbindedomäne besitzen. Die Cyanobakterien sind bisher auch die einzigen Prokaryonten, die Phycocyanobilin (PCB) als Chromophor synthetisieren können, da sie sowohl eine Häm-Oxygenase, als auch eine Biliverdin-Reduktase besitzen. Dieser Chromophor eignet sich, im Gegensatz zum Biliverdin (BV), aufgrund seiner Struktur für

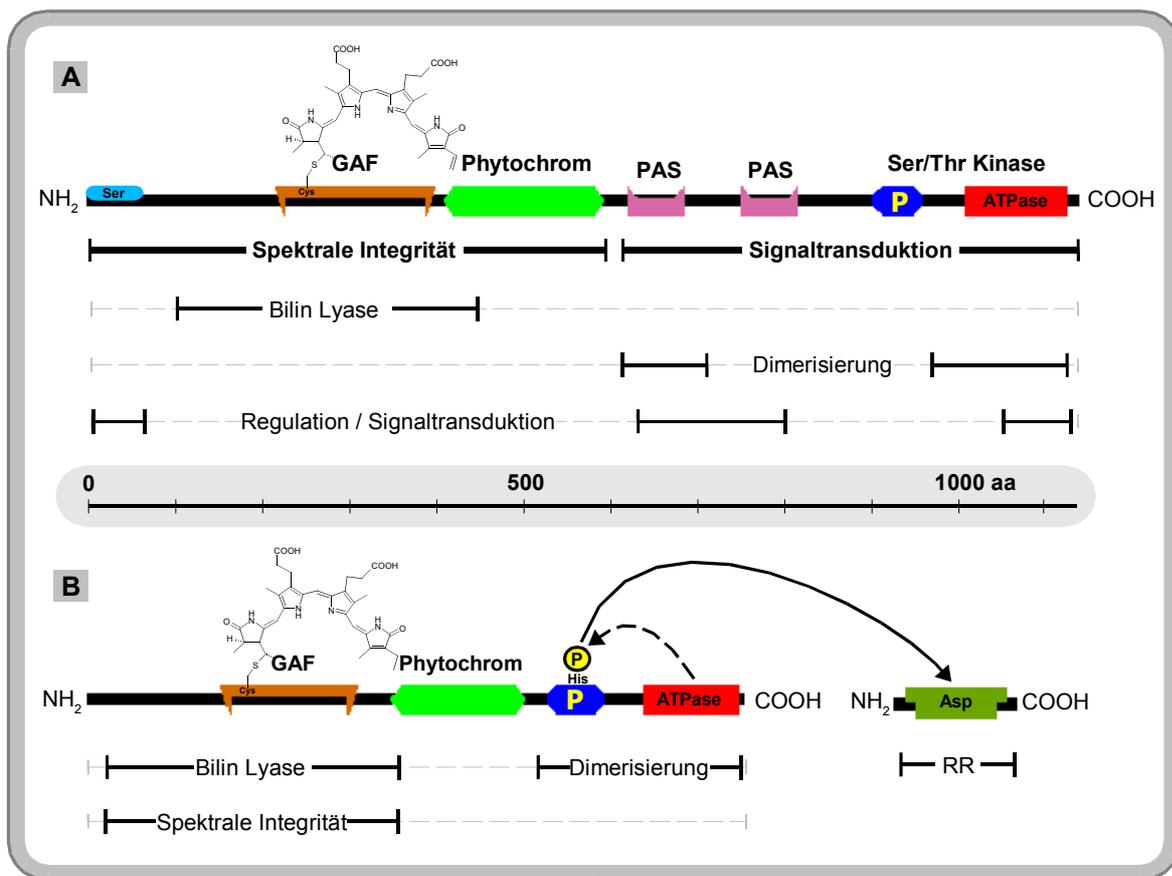
## 1.3 Quartärstruktur der Phytochrome

### 1.3.1 Domänenstruktur

Phytochrome setzen sich grundsätzlich aus zwei funktionell klar voneinander trennbaren Haupt-Domänen zusammen: die N-terminale Hälfte ist für den autokatalytischen Einbau des Chromophors verantwortlich und besitzt nahezu identische spektrale Eigenschaften wie das Vollängenprotein, während die C-terminale Domäne weitgehend für die biologische Aktivität verantwortlich ist<sup>50</sup> und die spektralen Eigenschaften kaum beeinflusst. In der Phytochromliteratur ist für den autokatalytischen Einbau des Chromophors der Begriff der „Bilin-Lyase-Aktivität“ geläufig, was aus dem ursprünglichen Vergleich der Phytochrome mit Bilin-Lyasen herrührt, die bei Phycobiliproteinen für den Einbau linearer Tetrapyrrole als Chromophore verantwortlich sind. Im C-terminalen Bereich weisen pflanzliche Phytochrome eine Homologie zu Histidinkinasen auf, obwohl ihnen ein konservierter Histidinrest, der in Histidinkinasen als Akzeptor der Phosphatgruppe dient, fehlt<sup>51</sup>. Bei den pflanzlichen Phytochromen konnte hingegen eine Serin-Threonin-Kinaseaktivität gefunden werden<sup>52, 53</sup>. Während die Pflanzenphytochrome (womöglich durch eine Duplikation der Kinase Domäne<sup>53, 54</sup>) etwa 125 kDa groß sind, besitzen die Bacteriophytochrome lediglich ein Größe von ~ 85 kDa.

Über die dreidimensionale Struktur der Phytochrome liegen nur wenige Informationen vor. Experimente zur quaternären Organisation ergaben, daß sowohl das *Avena sativa* Phytochrom A<sup>55</sup> als auch Cph1 von *Synechocystis* als Dimere vorliegen<sup>56</sup>, wobei die P<sub>r</sub>- bzw. P<sub>fr</sub>-Form von Cph1 leicht unterschiedliche Laufverhalten in der Gelfiltration aufweisen<sup>56</sup>. Weiterhin konnte bei Cph1 durch limitierte Proteolyse ermittelt werden, daß ein 32,5 kDa Proteolyse-Fragment (von Aminosäure 26 bis 314) für die spektrale Integrität von Cph1 ausreichend ist. Dieses Fragment besitzt auch die volle Bilinlyaseaktivität<sup>57</sup>. In pflanzlichen Phytochromen ist ein Fragment von 59 kDa nötig, um die Bilinlyaseaktivität und die spektralen Eigenschaften des Vollängenproteins zu erreichen, während ein 39 kDa Fragment zwar die Bilinlyaseaktivität besitzt, aber photochemisch trotz Fähigkeit zur Photoisomerisation starke Unterschiede zum Vollängenprotein zeigt<sup>58</sup> (Abb. 1.3.1 A und B).

Die Dimerisierung sowie die Signaltransduktion werden in beiden angesprochenen Phytochromsystemen durch die C-terminale Domäne initiiert, bei den Bacteriophytochromen erfolgt dies durch die Histidinkinase-Domäne<sup>59</sup>, bei den Pflanzenphytochromen sind sowohl die Kinase-Domäne, als auch die PAS-Domänen<sup>60</sup> für die Dimerisierung und die biologische Aktivität verantwortlich<sup>50, 61</sup>. Desweiteren spielt bei der Haferphytochrom A-vermittelten Signaltransduktion ein serinreicher Bereich am äußersten N-Terminus für die Regulation eine Rolle<sup>62</sup> (Abb.1.3.1).



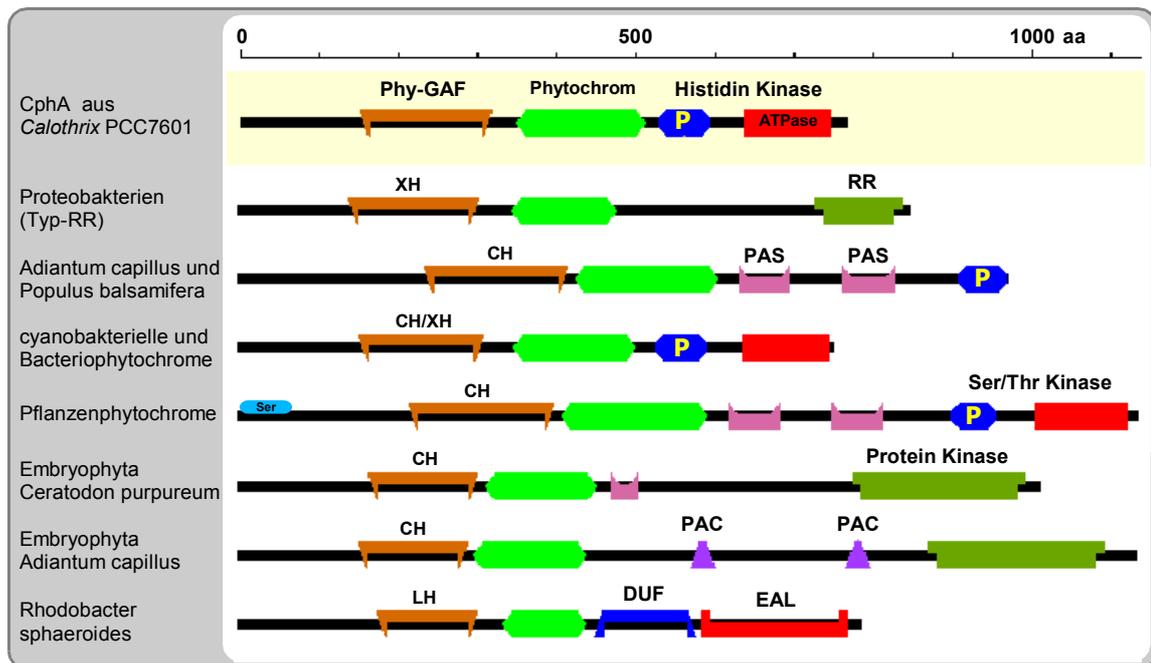
**Abbildung 1.3.1** Domänenstruktur von Phytochromen aus höheren Pflanzen und Bakterien

**A:** Pflanzenphytochrom mit bisher identifizierten funktionellen Bereichen. **B:** cyanobakterielles Phytochrom CphA mit Response Regulator, Zweikomponentensystem, mit bisher identifizierten funktionellen Bereichen, **His:** Histidin, **Asp:** Aspartat. **GAF:** Bilinlyase-Domäne, **Ser:** serinreiche Region **Phytochrom:** Phytochromspezifische Domäne, **PAS:** Per-Arnt-Sim-Domäne (auch LOV-Domäne = "light-oxygen-voltage"), **P:** Phosphoakzeptordomäne der Kinase, **ATPase:** ATPase-Domäne der Kinase, **eingekreistes P:** Phosphatgruppe, **gestrichelter Pfeil:** Autophosphorylierungsaktivität (in trans vom CphA-Dimer), **durchgezogener Pfeil:** Transphosphorylierung auf den Response Regulator (**RR**). Die angegebene Skala (Mitte) gilt für A und B.

Die cyanobakteriellen Phytochrome bilden mit ihren jeweiligen Response-Regulatoren, welche sich i.d.R. im gleichen Operon befinden, ein Zweikomponenten-Signaltransduktionssystem aus (Abb. 1.3.1 B). Auf die Signaltransduktion der bekannten cyanobakteriellen Phytochrome wird in Kap. 1.4 näher eingegangen.

Abschließend ist in Abb. 1.3.2 die Domänenstruktur der bisher identifizierten Phytochrome dargestellt, wobei solche Domänenstrukturanalysen @ mit Bedacht interpretiert werden sollten, da z.B. für Cph2, einem 145 kDa Phytochromhomolog aus *Synechocystis*<sup>63</sup> zwar eine GAF-Domäne, nicht aber eine Phytochrom-Domäne vorhergesagt wird (es ist aus diesem Grund nicht abgebildet), obwohl für die N-terminale Hälfte von Cph2 eine Bilinlyaseaktivität und P<sub>r</sub>-P<sub>fr</sub> Photochemie beobachtet wurde<sup>63, 64</sup>.

@ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>



**Abbildung 1.3.2** Domänenstruktur der bisher bekannten Phytochrome

**Phy-GAF:** GAF Domäne, Bilinlyase-Domäne, **XH/CH:** Chromophorbindestelle, **Phytochrom:** phytochromspezifische Domäne, **RR:** Response-Regulator Domäne, **PAS:** Per-Arnt-Sim-Domäne (s.o.), **PAC:** N-terminal verkürzte PAS-Domäne, **Ser:** serinreiche Sequenz in Pflanzenphytochromen, **DUF:** "domain of unknown function", Motiv in bakteriellen Signaltransduktionskomponenten mit ungeklärter Funktion, **EAL:** putative Phosphodiesterase Domäne, **Histidin Kinase:** Histidinkinase, bestehend aus **P:** Phosphoakzeptor-Domäne und **ATPase:** ATPase-Domäne. In pflanzlichen Phytochromen zeigt diese Domäne eine Serin-Threonin Kinaseaktivität.

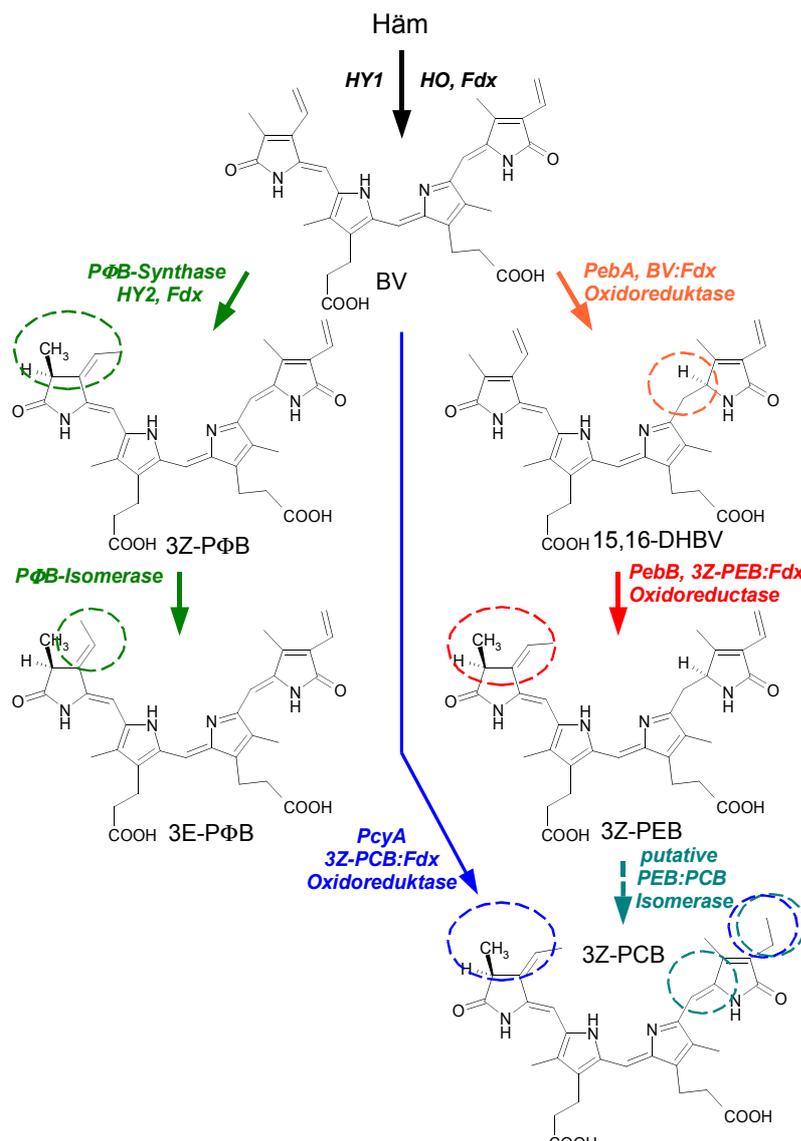
### 1.3.2 Die Chromophore der Phytochrome

In Pflanzen verläuft der Biosyntheseweg von der Hämgruppe ausgehend über eine Häm-Oxygenase (HY1) <sup>65, 66</sup> zu Biliverdin (BV), das aufgrund seiner 3'-Vinyl-Gruppe von Pflanzenphytochromen nicht als natürlicher Chromophor akzeptiert wird. Eine Ferredoxin-abhängige Phytochromobilin- (PΦB) Synthase (HY2) <sup>67, 68</sup> wandelt BV in 3Z-PΦB um, welches bereits vom Phytochrom eingebaut werden kann, aber von einer noch nicht identifizierten PΦB-Isomerase in 3E-PΦB, den nativen Chromophor, umgewandelt wird <sup>69</sup> (Abb.1.3.3). Die genaue Bedeutung dieses zusätzlichen Schritts ist ungeklärt.

In Cyanobakterien existieren mehrere Wege der Chromophorbiosynthese. Zum einen der in Abb. 1.3.3 rechts dargestellte Weg, der von Häm über BV durch eine Ferredoxin-abhängige Hämoxygenase HO1 <sup>70</sup>, über die ebenfalls Ferredoxin-abhängigen HY2-homologen Oxidoreduktasen PebA und PebB <sup>71, 72</sup> zu Dihydrobiliverdin (15,16-DHBV) und Phycoerythrobilin (PEB) verläuft, bevor schließlich eine noch nicht identifizierte PEB:PCB Isomerase die

Umwandlung zu Phycocyanobilin (PCB) vornimmt. Zum anderen existiert auch noch ein direkter Weg von BV zu PCB durch ein ebenfalls Ferredoxin-abhängiges Enzym PcyA<sup>72</sup> (Abb. 1.3.3 blauer Pfeil, Mitte). Mittlerweile ist es zwei unabhängigen Forschergruppen<sup>73, 74</sup> gelungen, die beiden Enzyme HO und PcyA aus *Synechocystis* funktionell in *E. coli* zu exprimieren und das cyanobakterielle Cph1 als Holoprotein (mit PCB als Chromophor) zu gewinnen.

Während die Chromophorbiosynthesemaschinerie (abzweigend von der Chlorophyllbiosynthese) der Chloroplasten in Pflanzen lediglich den Chromophor der Phytochrome

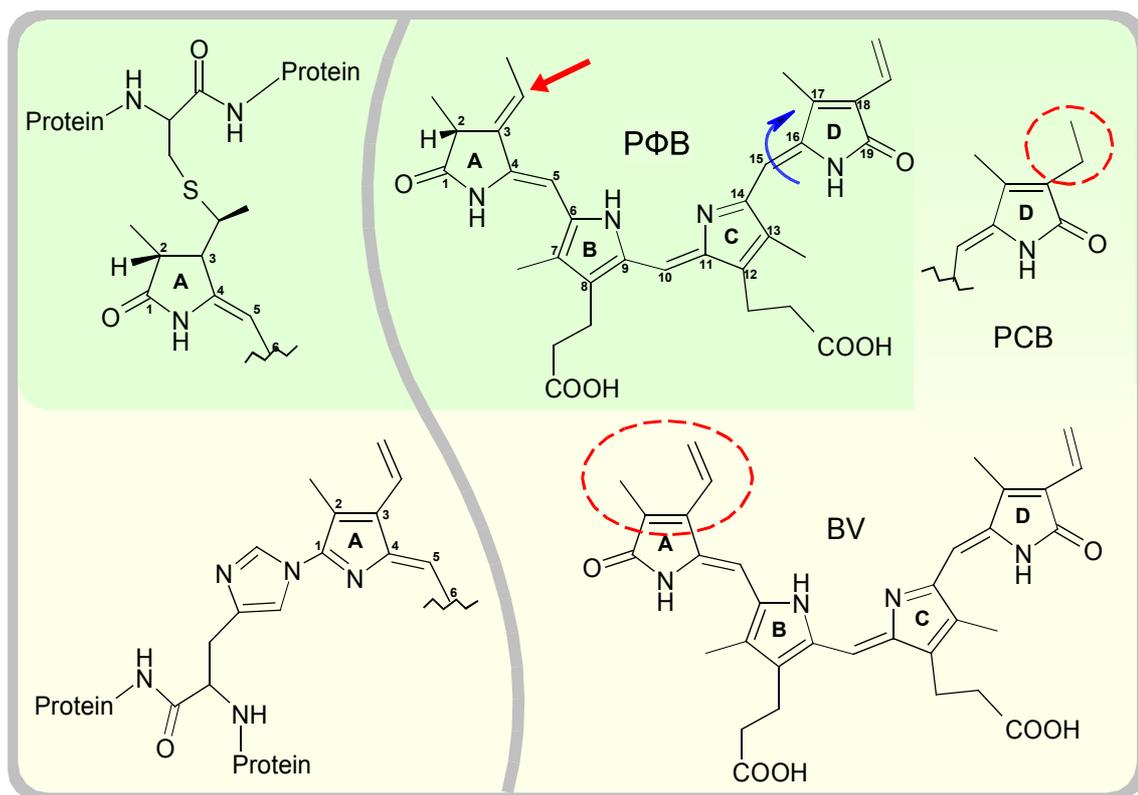


**Abbildung 1.3.3** Chromophorbiosynthese, Überblick

Alle Enzyme sind in kursiv und soweit bekannt mit Namen angegeben. Änderungen zum jeweiligen Edukt sind hervorgehoben. **Links:** Chromophorbiosyntheseweg der Pflanzen. **Rechts:** (und blauer Pfeil) Chromophorbiosynthese von Rotalgen und Cyanobakterien. **Häm:** Hämgruppe, **HO:** HämOxygenase **BV:** Biliverdin IX $\alpha$ , **PΦB:** Phytochromobilin, **PCB:** Phycocyanobilin, **PEB:** Phycoerythrobilin, **DHBV:** Dihydrobiliverdin, **Fdx:** Ferredoxin.

bereitstellen muß, müssen in Cyanobakterien auch die Phycobiliproteine der Lichtsammelkomplexe, die bis zu 60% des Gesamtproteins der Zellen ausmachen können, mit Chromophor versorgt werden. In Cyanobakterien existieren daher neben den in Abb. 1.3.3 dargestellten Bilinen Phycoerythrobilin (PEB) und Phycocyanobilin (PCB) auch noch Phycourobilin und Phycoviolobilin<sup>75</sup>. Diese Vielfalt von Chromophoren in der cyanobakteriellen Zelle wirft die Frage nach der Chromophorselektivität der cyanobakteriellen Phytochrome auf. Die Natur des nativen Chromophors dieser Phytochrome ist daher noch nicht in allen Fällen geklärt. Im cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 wurde durch Vergleich von *in vitro* assembliertem, heterolog exprimierten Apoprotein mit dem nativ aufgereinigten Protein PCB als Chromophor ermittelt<sup>76</sup>.

Wie bereits erwähnt, wurde als Chromophor der Pflanzenphytochrome das lineare Tetrapyrrol Phytychromobilin (PΦB) identifiziert<sup>77</sup>, das an ein konserviertes Cystein der Chromophorbindedomäne als Thioether gebunden wird<sup>48</sup> (Abb. 1.3.4 oben und links). Wegen der besseren Verfügbarkeit wird für *in vitro* Studien dagegen oft PCB (Abb. 1.3.4 oben rechts)



**Abbildung 1.3.4** Chromophore und Bindungstypen

Links sind die Bindungstypen dargestellt, rechts die entsprechenden Chromophore. **Oben links:** Thioetherbindung von PΦB oder PCB an Cystein. **Oben rechts:** Chromophore, die in Phytochromen eine Thioetherbindung mit dem Cystein eingehen. PΦB ist der native Chromophor der pflanzlichen Phytochrome, PCB derjenige der cyanobakteriellen Phytochrome, die ein Cystein in der Chromophorbindedomäne aufweisen. Der Unterschied zu PΦB ist hervorgehoben (Vinyl statt Ethyl an Pos 18). **Roter Pfeil:** Angriffsstelle des Cysteins bei Ausbildung einer kovalenten Bindung. Der **gebogene Pfeil** deutet die Z → E Isomerisierung bei der P<sub>r</sub>-P<sub>f</sub> Photokonversion an. **Unten links:** postulierte Bindung von Biliverdin an das hochkonservierte Histidin der Chromophorbindedomäne. **Unten rechts:** Biliverdin IXα (BV), Unterschied zu PΦB ist hervorgehoben.

verwendet, dieses kann in größeren Mengen aus Algen gewonnen werden. PCB unterscheidet sich von PΦB nur durch die Ethyl-Gruppe am C<sub>18</sub> des D-Rings. Entsprechend weisen die PCB Addukte der Pflanzenphytochrome aufgrund dieser Verkürzung des konjugierten π-Elektronensystems blauverschobene Spektren auf. In den Algen *Mesotaenium* und *Mougeotia scalaris* stellt PCB den natürlichen Chromophor dar<sup>78, 79</sup>. Zu anderen Chromophoren ist an dieser Stelle zu sagen, daß PEB von Pflanzenphytochrom eingebaut wird, aber aufgrund der fehlenden C<sub>15</sub>-C<sub>16</sub> Doppelbindung nicht photo-isomerisieren kann, während BV hingegen aufgrund seiner 3' Vinylgruppe an Ring A nicht als Chromophor akzeptiert wird<sup>80</sup>.

Nach dem autokatalytischen Einbau eines Chromophors (PCB, PΦB, bzw. bei Bakterien auch BV) liegt er in einer Z,Z,Z Konformation im Protein vor und bildet so die P<sub>r</sub>-Form. Durch die Photo-Isomerisierung der C<sub>15</sub>-C<sub>16</sub> Doppelbindung zwischen Ring C und D (Abb. 1.3.4, oben blauer Pfeil) erfolgt die Umlagerung des Chromophors in die Z,Z,E Konformation, und induziert damit die P<sub>fr</sub>-Form des Holo-proteins<sup>81, 82</sup>. Als einzige Ausnahme dieses Prinzips ist das Bacteriophytochrom aus *Bradyrhizobium* beschrieben, dieses Protein baut den Chromophor zwar zunächst auch in die P<sub>r</sub>-Form ein, lagert aber anschließend in die P<sub>fr</sub>-Form um<sup>83</sup>.

Einigen Bacteriophytochromen fehlt das konservierte Cystein in der Chromophorbindestasche (s. Abb. 1.3.5). Stattdessen wird von Davis *et al.*<sup>20</sup> das benachbarte Histidin, welches auch in anderen Phytochromen für die Bilinlyaseaktivität essentiell ist<sup>84</sup>, für die Bindung des Chromophors über eine Schiff-Base vorgeschlagen (genau genommen ist es ein Amidin, Abb. 1.3.4 unten links, ein detailliertes Modell findet sich in Abb. 3.2.3). Wie oben angesprochen, wurden bisher in den Bakterien, die ein Bacteriophytochrom enthalten, lediglich Hämoxxygenase-Homologe (oft in einem Operon mit dem jeweiligen Bacteriophytochrom) und keine weiteren Enzyme der Chromophorbiosynthese gefunden, daher liegt es nahe, daß in diesen Organismen BV der natürliche Chromophor ist. Die direkte Identifikation eines Chromophors aus einem homolog exprimierten Bacteriophytochrom ohne Cysteinbindestelle konnte jedoch bisher nicht erbracht werden.

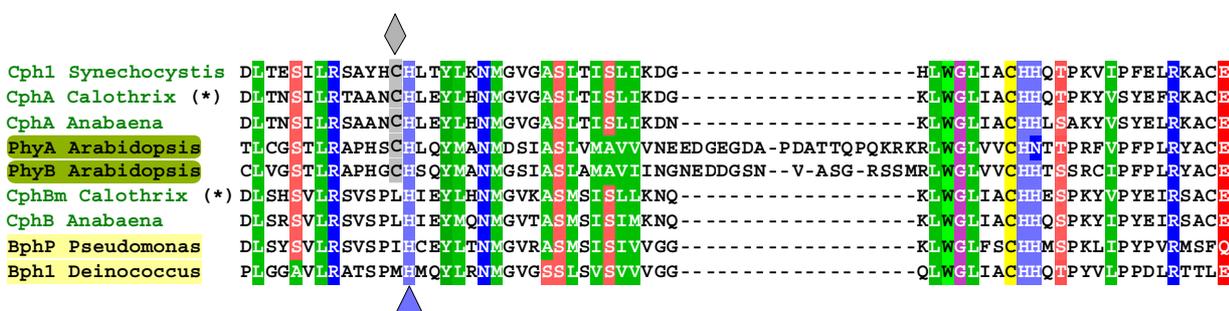


Abbildung 1.3.5 Alignment ausgewählter Pflanzen- und Bacteriophytochrome

Dargestellt ist nur der Bereich um die Chromophorbindestelle. Pflanzenphytochrome sind grün, Bacteriophytochrome gelb hinterlegt. Cyanobakterielle Phytochrome in grüner Schrift. (\*) = in dieser Arbeit untersuchte Phytochrome. Graue Raute: Chromophorbindendes Cystein. Blaues Dreieck: alternative Bindestelle am Histidin.

### 1.3.3 P<sub>r</sub>-P<sub>fr</sub>-Photokonversion und P<sub>fr</sub>-Stabilität

Die Belichtung der P<sub>r</sub>-Form von Phytochrom mit rotem Licht führt zu einer Z → E Isomerisierung der C<sub>15</sub>-C<sub>16</sub> Doppelbindung zwischen Ring C und D des Chromophors. Daraufhin erfolgt eine Serie konformeller Änderungen des Proteins, die distinkte spektrale Eigenschaften aufweisen und mit definierten Halbwertszeiten ineinander übergehen. Eine Methode, diesen molekularen Mechanismus aufzuklären, ist die zeitaufgelöste Differenz-Absorptionsspektroskopie (Blitzlicht-Photolyse). Im pflanzlichen System ist das erste identifizierbare Produkt der Photokonversion ein Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 700 nm, I<sub>700</sub>, gefolgt von einem Intermediat ähnlicher Absorptionseigenschaften und geringerem Extinktionskoeffizienten, I<sub>bl</sub> (für *bleached*)<sup>85</sup>. Über mindestens ein weiteres Intermediat I<sub>x</sub> erreicht das Protein die P<sub>fr</sub>-Form. Eine „Global-Fit“ Daten-Analyse der Photokonversionskinetik von Haferphytochrom spricht für die Existenz von sechs Intermediaten. Die dort ermittelten, aufeinander folgenden Intermediate zeigen paarweise ähnliche Charakteristika bezüglich ihrer Spektren und Zerfallszeiten. So sind jeweils zwei Intermediate im Mikrosekunden-, frühen Millisekunden- und späten Millisekundenbereich zu finden<sup>86</sup>. Die Photokonversionskinetiken der cyanobakteriellen Phytochrome werden in Kap. 1.4.1 besprochen.

Neben der Möglichkeit der Photokonversion von P<sub>fr</sub> nach P<sub>r</sub> durch die Absorption von dunkelrotem Licht zeigen viele Phytochrome auch eine lichtunabhängige Reversion zur P<sub>fr</sub>-Form. Untersuchungen zu dieser „thermischen Reversion“ ergaben, daß es sich dabei um eine intrinsische Eigenschaft des jeweiligen Proteins handelt<sup>87</sup>, die allerdings durch die Natur des eingebauten Chromophors<sup>88, 89</sup> oder durch die Anwesenheit von interagierenden Proteinen beeinflusst werden kann<sup>90</sup>. Der physiologische Hintergrund dieses Prozesses ist ein „Abschalten“ des Signals, das von der physiologisch aktiven P<sub>fr</sub>-Form ausgeht<sup>91</sup>.

### 1.3.4 Assemblierung von Phytochrom

Die Fähigkeit der Phytochrome zur autokatalytischen Inkorporation und kovalenten Bindung ihres Chromophors ermöglicht es, *in vitro* Untersuchungen zu dieser Eigenschaft durchzuführen<sup>92, 93</sup>. Dieser „Assemblierung“ genannte Prozeß ist in der Regel innerhalb weniger Minuten abgeschlossen. Durch den Einbau des Chromophors durchläuft das Protein konformelle Änderungen, die in einer erhöhten Proteaseresistenz der Chromophorbindedomäne<sup>57</sup>, verändertem Laufverhalten in der Gelfiltration<sup>56</sup> sowie einer meßbaren Zunahme an Sekundärstrukturelementen<sup>63</sup> einhergehen. Am augenfälligsten ist jedoch die Steigerung der Absorption, so besitzt freies PCB einen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) von etwa 18000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> bei 600 nm in freier Lösung, wohingegen dieser auf bis zu 132000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> bei 666 nm im Holophyto-

chrom steigen kann. Die prokaryotischen Phytochrome zeigen zum Teil auch eine veränderte Kinaseaktivität, sobald sie als Holoprotein vorliegen<sup>103, 104</sup>.

Die meisten Phytochrome zeigen eine biexponentielle Kinetik der Assemblierung im Sekunden- bis Minutenbereich<sup>89</sup>, wobei in den meisten Fällen etwa 50-90% der Reaktion innerhalb der ersten zehn Sekunden ablaufen und daher mit konventionellen Methoden nur schwer zu erfassen sind. Aufgrund der biexponentiellen Kinetik wird ein Zwei-Schritt-Modell der Assemblierung angenommen<sup>93, 94, 95</sup>, bestehend aus einem schnellen Anlagerungsschritt, bei dem der Chromophor nicht-kovalent an das Protein „assoziiert“ ist, und dem darauf folgenden langsamen Knüpfen der kovalenten Thioetherbindung. Der erste Schritt beinhaltet dabei auch das Überführen des Chromophors von der helikalen Konformation in Lösung in eine gestreckte Konformation an der Chromophorbindetasche.

In diesem Zusammenhang wurden auch „künstliche“, d.h. chemisch modifizierte Chromophore angeboten, um die strukturellen Anforderungen der Chromophorbindetasche an den Chromophor zu untersuchen<sup>96, 97, 98</sup>. Dabei wurde für Pflanzenphytochrome herausgefunden, daß einerseits die 3' Ethylidengruppe (Ring A, Abb. 1.3.4) für die Knüpfung der Thioetherbindung essentiell ist<sup>99</sup>, zum anderen, daß verschiedene Substituenten an anderen Positionen des A-Rings die spektralen Eigenschaften weitgehend unbeeinflusst lassen, während Modifikationen an den anderen Ringen (B-D) deutlichen Einfluß auf die spektralen Eigenschaften haben können<sup>97</sup>. Ein Vertauschen der Vinylgruppe am D-Ring von C<sub>17</sub> nach C<sub>18</sub> bewirkt beispielsweise eine Blauverschiebung der P<sub>fr</sub>-Form<sup>96, 98</sup>.

## **1.4 Die Bacteriophytochrome**

Die meisten prokaryotischen Signaltransduktionswege bestehen aus einem Phosphotransfersystem, das sich aus zwei funktionell konservierten Einheiten zusammensetzt, einer Sensor-histidinkinase und einem Response-Regulator (Zwei-Komponentensystem). Die Histidinkinase (Transmittermodul) autophosphoryliert nach dem Wahrnehmen eines Stimulus an einem Histidinrest. Diese aktivierte Phosphatgruppe wird anschließend auf einen Aspartatrest des Response-Regulators (Receivermodul) übertragen (Transphosphorylierung). Ein weiteres Kennzeichen dieser Systeme ist, daß Histidinkinasen sehr oft als Homodimere fungieren, wobei die ATPase Untereinheit des einen Monomers das Histidin der Phosphoakzeptordomäne des jeweils anderen Monomers phosphoryliert. Die Spezifität dieser Signaltransduktionskette ist dabei oft eine Mischung aus reizabhängiger Phosphorylierung und veränderter Affinität der phosphorylierten Histidinkinasedomäne zum Response-Regulator. Die Phosphorylierung des Response-Regulators bewirkt eine konformelle Änderung desselben, sodaß daraufhin Protein-

Protein Interaktionen mit anderen Komponenten der Signaltransduktionskette stattfinden können. Dies kann über eine sog. Outputdomäne des Response-Regulators stattfinden oder durch direkte Interaktion des Receivermoduls mit anderen Proteinen. Dieses allgemeine Schema existiert mit seinen modularen Einheiten in vielen verschiedenen Abwandlungen<sup>59, 100, 101</sup>.

Die Verbreitung des Zweikomponentensystems ist nicht auf das Prokaryotenreich beschränkt (wie früher angenommen wurde), auch in Pflanzen und Tieren wurden solche Systeme mittlerweile entdeckt<sup>100, 102</sup>.

Die meisten bisher charakterisierten Bacteriophytochrome, namentlich psBphP aus *Pseudomonas aeruginosa*<sup>49</sup>, Cph1 aus *Synechocystis*<sup>103</sup>, und CphA und CphB aus *Calothrix*<sup>104</sup> interagieren mit Response-Regulatoren des CheY-Typs und fungieren als lichtabhängige Zweikomponentensysteme (folgende Kapitel).

### 1.4.1 Cyanobakterielle Phytochrome, CphA und CphB

Neben Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 wurden bisher lediglich zwei weitere Phytochrome aus Cyanobakterien detaillierter auf Proteinebene untersucht, CphA und CphB aus *Calothrix* PCC7601. Diese beiden besitzen in ihrem Operon die Response-Regulatoren RcpA und RcpB (siehe Anhang)<sup>107</sup>, beides zu CheY homologe Proteine, deren Kristallstruktur kürzlich gelöst werden konnte (C. Benda *et al.*, eingereicht). Sie bilden damit zwei klassische Zweikomponentensysteme (Abb. 1.3.1 B). Bisher konnten diesen beiden Systemen jedoch keine physiologischen Antworten zugeordnet werden. Eine Deletion von CphA oder CphB in *Fremyella diplosiphon* zeigte lediglich sehr geringfügige Veränderungen im Pigmentierungsmuster dieses Organismus (N. Tandeau de Marsac, vorläufige Untersuchungen).

Während CphA in der Chromophorbindedomäne das in Pflanzen konservierte Cystein als Chromophorbindestelle besitzt und *in vitro* den Chromophor PCB autokatalytisch kovalent einbaut, stellt CphB ein typisches Bacteriophytochrom dar, dem dieses Cystein fehlt (Abb. 1.3.5). Es besitzt jedoch, wie alle bisher beschriebenen Phytochrome, das hochkonservierte Histidin in unmittelbarer Nachbarschaft zum Cystein und zeigte in bisherigen Studien eine nicht-kovalente Inkorporation von PCB und BV<sup>107</sup>. Der natürliche Chromophor dieser beiden Phytochrome ist nicht bekannt.

Die PCB-Addukte der cyanobakteriellen Phytochrome zeigen eine dem Pflanzensystem entsprechende Hellrot / Dunkelrot Photokonversion, eine in der P<sub>r</sub>-Form erhöhte Autophosphorylierungsaktivität sowie eine P<sub>r</sub> spezifische Transphosphorylierungsaktivität auf ihren jeweiligen Response-Regulator. Die Transphosphorylierung von CphA und CphB ist sehr spezifisch, eine Phosphatgruppenübertragung von CphA auf RcpB oder von CphB auf RcpA

findet nicht statt, zudem besitzen weder CphA noch CphB eine Phosphataseaktivität gegenüber RcpA und RcpB<sup>104</sup>.

Mit PCB *in vitro* assembliertes CphA weist Absorptionsmaxima von 663 nm und 707 nm für die P<sub>r</sub>- bzw. P<sub>fr</sub>-Form auf (ähnlich Cph1 aus *Synechocystis*), wohingegen das PCB Addukt von CphB Absorptionsmaxima von 686 nm und 734 nm besitzt. Der Unterschied von etwa 30 nm beruht offensichtlich auf der Tatsache, daß die Doppelbindung der 3' Ethylidengruppe bei CphB durch die fehlende Thioetherverknüpfung intakt bleibt, was bisher als weiteres Indiz für eine nicht-kovalente Bindung des Chromophors in CphB gewertet wurde.

Im Falle von Cph1 wurde, wie bereits erwähnt PCB als natürlicher Chromophor identifiziert, es hat P<sub>r</sub>-P<sub>fr</sub> Absorptionsmaxima von 656 nm bzw. 703 nm. Bei Cph1 wurde außerdem festgestellt, daß BV nicht als Chromophor eingebaut werden kann. Auch bei Cph1 findet die Autophosphorylierung und die Transphosphorylierung auf den Response-Regulator Rcp1 bevorzugt in der P<sub>r</sub>-Form des Proteins statt<sup>103</sup>. Diese P<sub>r</sub> spezifische Aktivität der cyanobakteriellen Phytochrome bildet einen Gegensatz zum pflanzlichen System, bei dem die physiologische Aktivität in der Regel von der P<sub>fr</sub>-Form ausgeht. Bei Cph1 / Rcp1 wurde weiterhin eine Regulation der beiden Proteine auf Transkriptionsebene festgestellt<sup>105</sup>, in Dunkelheit akkumulieren die Transkripte von *cph1* und *rcp1*, während sie im Licht herunterreguliert sind. Wie bei CphA und CphB sind jedoch bisher keine physiologischen Prozesse aufgeklärt worden, an denen Cph1 beteiligt ist. Der Deletionsstamm verhält sich unter allen bisher getesteten Bedingungen wie der Wildtyp<sup>106</sup>.

Bezüglich der Kinetik der P<sub>r</sub> - P<sub>fr</sub> Photokonversion wurden im cyanobakteriellen System bisher die Proteine CphA und CphB aus *Calothrix* PCC7601 und Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 untersucht<sup>107, 108, 109</sup>. Während im Falle von CphB durch die in diesem Protein schlechte Einbindung des Chromophors PCB lediglich zwei Intermediate aufgelöst werden konnten, wurden bei CphA und Cph1 jeweils sechs Intermediate, die jedoch spektral, als auch bezüglich ihrer Zerfallskonstanten leichte Unterschiede aufweisen, gefunden<sup>107, 108</sup>. Die Daten zeigen sich im Fall von CphA von der Anwesenheit von ATP (mögliche Autophosphorylierung der Histidinkinasedomäne) oder dem Response-Regulator RcpA<sup>107</sup> unbeeinflusst. Letzteres zeigt, daß die Interaktion des Response-Regulators in einer Domäne stattfindet, die nicht im unmittelbaren strukturellen Zusammenhang mit der Photokonversion steht.

## 1.4.2 Phylogenetisch entferntere cyanobakterielle Phytochromhomologe

In *Fremyella diplosiphon*, einem zu *Calothrix* eng verwandten Cyanobakterium wurde ein Gen *rcaE* gefunden, das eine Rolle bei der komplementären chromatischen Adaption (CCA) spielt<sup>23</sup>. Dieser Prozeß erlaubt einigen Cyanobakterien, die Ausstattung ihrer Lichtsammelkomplexe

mit Phycoerythrin (PE, rotes Pigment) bzw. Phycocyanin (PC, grünes Pigment) der Lichtqualität anzupassen und auf diese Weise eine annähernd konstante Photosyntheseleistung zu erzielen<sup>110, 111, 112</sup>. Das Aktionsspektrum dieser physiologischen Anpassung der Zellen weist Maxima im grünen (540 nm) und roten (650 nm) Bereich auf<sup>128</sup>, was auf die Beteiligung zweier verschiedener Lichtperzeptionssysteme hindeutet, einen mutmaßlichen Photorezeptor vom Retinal-Typ für die Grünlichtadaption und ein Phytochrom für die Rotlichtadaption<sup>113</sup>. RcaE weist in seiner N-terminalen Hälfte gewisse Homologie zu Phytochromen auf und besitzt auch ein Cystein, das für eine kovalente Bindung eines Chromophors geeignet wäre. Es fehlen jedoch außer dem für den Chromophoreinbau essentiellen Histidinrest weitere hochkonservierte Aminosäuren der Chromophorbinderregion. Bisher konnte noch kein photoaktives RcaE präsentiert werden. RcaE bildet mit den Proteinen RcaF (einem „normalen“ Response-Regulator) und RcaC (ein Protein mit zwei Receiver-Domänen, einer H2-Domäne und einem DNA-Bindemotiv) einen sog. „4-Schritt Phospho-Relay“<sup>114, 24</sup>, eine Abwandlung des Zweikomponentensystems. Mutantanalysen belegen eindeutig eine Beteiligung dieser Proteine an der Regulation der PE-Expression während der CCA mit RcaE als Photorezeptor<sup>115</sup>.

Das Protein CikA stellt ein weiteres Protein mit schwacher Homologie zu Phytochromen dar: Es besitzt Histidinkinase-Homologie in der C-terminalen Hälfte und ist verantwortlich für das Stellen der circadianen Uhr in *Synechococcus elongatus*<sup>25</sup>

In *Synechocystis* kommt neben Cph1 ein weiteres Protein mit einer N-terminalen Phytochrom-Domäne und einer weiteren C-terminalen GAF Domäne vor. Es besitzt keinerlei Histidinkinase-Domäne. In *in vitro* Studien konnte in Cph2 eine Assemblierung mit PCB und PΦB belegt werden, allerdings zeigte nur die N-terminale Domäne die phytochromtypische Photochemie<sup>63, 64</sup>. Dieses Protein spielt bei der Blaulicht-Phototaxis eine Rolle<sup>106</sup>.

Das ebenfalls in *Synechocystis* entdeckte Protein PlpA („*phytochrome like protein*“) besitzt, wie im Fall von CikA und RcaE eine Phytochrom-homologe Domäne, die im unmittelbaren Bereich der Chromophorbinderstelle etliche konservierte Aminosäurereste vermissen läßt. Interessanterweise verlieren *PlpA* Deletionsmutanten ihre Fähigkeit zu photoautotrophem Wachstum unter Blaulichtbedingungen<sup>26</sup>.

### 1.4.3 Weitere prokaryotische Phytochrome

Die in nicht-photosynthetischen Prokaryoten zu findenden Bacteriophytochrome zeigen alle eine gute Homologie zur klassischen Chromophorbinderdomäne der Pflanzen, ihnen fehlt jedoch das Cystein. In allen Organismen, in denen Bacteriophytochrome ohne dieses Cystein gefunden wurden, ist eine Häm-Oxygenase das einzige Enzym der Chromophorbiosynthese, das zudem oft in einem Operon mit dem Bacteriophytochrom liegt. Eine Co-Expression der

Häm-Oxygenase von *Deinococcus radiodurans* mit dem entsprechenden Bacteriophytochrom in *E. coli* ergab voll funktionsfähiges Holoprotein mit Absorptionsmaxima von 698 nm und 750 nm für die P<sub>r</sub>- bzw. P<sub>fr</sub>-Form<sup>49</sup>. Es ist daher wahrscheinlich, daß BV in diesen Systemen der native Chromophor ist. Als Chromophorbindestelle wurde im Fall von *in vitro* assembliertem Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* (u.a. durch Punktmutagenese) ein hochkonserviertes Histidin identifiziert<sup>20</sup>. Wie auch im cyanobakteriellen System besitzt ein Teil der Bacteriophytochrome einen Response-Regulator des CheY-Typs in seiner unmittelbaren Nachbarschaft. Ein solches Zweikomponentensystem aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde biochemisch charakterisiert. Hier konnte eine P<sub>fr</sub> spezifische Auto- und Transphosphorylierung festgestellt werden<sup>49</sup>, was dem Pflanzenmodell entspricht, in dem die P<sub>fr</sub>-Form die physiologisch aktive Form darstellt.

Ein Sonderfall bezüglich des Grundzustands des Phytochroms nach der Assemblierung im Dunklen stellt das Bacteriophytochrom BrBphP aus *Bradyrhizobium* dar: es lagert nach Einbau des Chromophors in die P<sub>r</sub>-Form ( $\lambda_{\max}$  676 nm) anschließend langsam in die P<sub>fr</sub>-Form ( $\lambda_{\max}$  752 nm) um<sup>83</sup>. In seinem C-Terminus weist dieses Protein jedoch keine Histidinkinase auf, sondern eine PAS S-Box Domäne. Diese Domänen sind dafür bekannt, sowohl Protein-Protein Interaktionen vermitteln zu können, als auch auf Änderungen von Sauerstoffkonzentration oder dem Redoxzustand der Zelle reagieren zu können<sup>116</sup>. Das BrBphP kontrolliert die lichtabhängige Expression des Photosystems. Als maximal wirksame Wellenlänge wurde dabei Licht der Wellenlänge um 750 nm ermittelt, was der P<sub>fr</sub>-Form des BrBphP entspricht, und damit die P<sub>r</sub>-Form des Proteins als die physiologisch aktive Form identifiziert<sup>83</sup>.

Einen weiteren Sonderfall stellt das in *Rhodospirillum centenum* gefundene Protein Ppr dar. Es weist neben dem Bacteriophytochrom-typischen Arrangement aus Phytochrom- und Histidinkinasedomäne im N-Terminus starke Homologien zu PYP (*photoactive yellow protein*) auf<sup>117</sup>. Die Einlagerung eines linearen Tetrapyrrols konnte noch nicht gezeigt werden, allerdings bindet Ppr kovalent p-Hydroxymethylsäure, den natürlichen Chromophor von PYP. Ppr ist an der blaulichtabhängigen Regulation der Chalcon-Synthase (ein Enzym der Anthocyan synthese) beteiligt, ein Prozeß, der in Pflanzen von Phytochrom und Cryptochrom reguliert wird<sup>117</sup>.

## **1.5 Zum Organismus *Calothrix* PCC7601**

Cyanobakterien repräsentieren eine der facettenreichsten Gruppen der Organismen mit nahezu ubiquitärer Verbreitung. Neben der generellen Anpassung einzelner Arten an ihr Habitat verdanken einige Cyanobakterien ihre hohe Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umweltbedingungen der für Prokaryoten erstaunlichen Variabilität ihrer Zellmorphologie<sup>118</sup>. So sind

hier neben der Fähigkeit, molekularen Stickstoff zu fixieren, im wesentlichen Anpassungsprozesse wie die komplementäre chromatische Adaption (CCA, s.o.), die Bildung von Hormogonien und die Ausprägung circadianer Rhythmik zu nennen. Hormogonien verkörpern eine transiente Zellform, die im wesentlichen der schnellen Verbreitung und dem Ortswechsel dienen. Sie zeichnen sich durch das Vorhandensein von Gasvesikeln und Pili aus, die den Zellen Motilität und Auftrieb verschaffen <sup>119</sup>. Die Hormogoniendifferenzierung kann durch den Wechsel der Lichtbedingungen (von Grünlicht auf Rotlicht) induziert werden und ist nach etwa 24-36 h abgeschlossen. Persistiert die gegebene Belichtung weiterhin, de-differenzieren die Zellen nach etwa 72 h wieder und es kommt zur CCA <sup>119</sup>.

Die CCA führt, wie bereits angesprochen, dazu, daß die Zellen bei Belichtung mit grünem Licht das rote Pigment PE (codiert auf dem *cpeBA* Operon) in ihren Phycobilisomen <sup>120</sup> anreichern, bei Belichtung mit rotem Licht jedoch zusätzliche grüne Pigmente (PC) einbauen. Die PC Untereinheiten werden von drei verschiedenen Operons kodiert: Das *cpc1* Operon wird konstitutiv exprimiert, das *cpc2* Operon dagegen nur im Rotlicht <sup>121</sup>. Dies ist ein transienter Prozeß, d.h. die vorhandenen Pigmente werden sukzessive von den neusynthetisierten ersetzt, es findet keine aktive Disassemblierung der Phycobilisomen statt. Die Zusammensetzung der Phycobilisomen reflektiert daher das Verhältnis von rotem zu grünem Licht. Das dritte Operon (*cpc3*) wird nur unter Schwefelmangel exprimiert, abgesehen von den Chromophorbindingen Cysteinen enthalten diese PC-Untereinheiten keinerlei Schwefelhaltigen Aminosäuren <sup>122</sup>.

Das filamentöse im Süßwasser lebende Cyanobakterium *Calothrix* PCC 7601 gehört zu den Vertretern der *Nostocales* und besitzt alle o.g. Merkmale. Es kann mit relativ einfachen Mitteln axenisch gezogen werden, daher eignet es sich als Modellorganismus zur Untersuchung lichtabhängiger physiologischer Antworten.

## **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

*Ein erreichtes Ziel ist kein Ziel. (H. Hesse)*

Das cyanobakterielle System mit CphA und CphB bietet ideale Voraussetzungen, sowohl den prokaryotischen Phytochrom-Typ (ohne das Cystein als Chromophorbindestelle), als auch den „klassischen“ Phytochromtyp in einem Organismus zu untersuchen. Da es so gut wie keine Strukturinformationen über Phytochrome gibt, erscheint dieses System ideal geeignet, um mittels zielgerichteter Punktmutagenese sowohl strukturgebende Aminosäuren der Chromophorbindestasche als auch für die Bilinlyaseaktivität wichtige Reste zu identifizieren. Die Untersuchung ob und welche dieser Aminosäuren in direktem Kontakt mit dem Chromophor stehen, oder welche Reste für die Selektivität der Phytochrome gegenüber verschiedenen Chromophore verantwortlich sind, soll in dieser Arbeit durchgeführt werden. Weiterhin soll in dieser Arbeit die Frage geklärt werden, ob, es sich bei dem konservierten Histidin „lediglich“ um eine katalytisch aktive Aminosäure handelt, oder ob dieses Histidin tatsächlich eine transiente (und evtl. persistente) Chromophorbindestelle darstellt.

In der Literatur herrschen widersprüchliche Ansichten über die Art der Bindung, mit der Bacteriophytochrome ihren Chromophor inkorporiert halten. Die Hauptfrage ist dabei, ob dies auf eine kovalente oder nicht-kovalente Art und Weise geschieht. In dieser Arbeit soll diesbezüglich CphB auf seine Fähigkeit, verschiedene Chromophore zu binden, genauer untersucht werden.

Das Cyanobakterium *Calothrix* PCC7601 ist zur CCA befähigt und enthält daher eine Vielzahl verschiedener möglicher Chromophore. Da über die Natur der nativen Chromophore der Bacteriophytochrome nur wenige Informationen vorliegen, sollten beide Phytochrome im Cyanobakterium *Calothrix* PCC7601 zur homologen Expression gebracht werden, um über eine Aufreinigung aus dem „Ursprungsorganismus“ den Chromophor des jeweiligen Bacteriophytochroms zu ermitteln.

Desweiteren sollte die Lichtabhängigkeit des bislang nur unzureichend charakterisierten CphB/RcpB Zweikomponentensystems aufgeklärt werden, sowie ein Versuch unternommen werden, die nächste Komponente dieses Signaltransduktionswegs mittels Protein-Protein Interaktionsstudien zu ermitteln.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Geräte

- Zentrifugen:..... Eppendorf; Centrifuge 5417 R, Festrotor  
Eppendorf; Centrifuge 5417 C, Ausschwingrotor  
Eppendorf; Centrifuge 5810 R, Rotor A-4-62  
Heraeus Sepateck; Minifuge RF, Ausschwingrotor 3360  
Beckmann; L7-55 Ultracentrifuge, Rotoren Ti 60, Ti 45  
Beckmann; Avanti™ J-25; Rotoren JLA 10.500 und  
JA25.500  
Beckmann; Avanti™ J-20; Rotor JLA 8.100  
Kontron; TGA-65 Ultracentrifuge
  
- Photometer:..... Shimadzu; UV 2401-PC mit TCC-240A Thermoblock  
Shimadzu; UV-160 A  
Pharmacia Biotech; Gene Quant II
  
- Gelsysteme:..... Agarose:  
Biometra; Agagel Mini 6,5 x 9 cm  
Biometra; Agagel Midi-Wide 20 x 10 cm  
Hofer; MightySlim SX250 PowerSupply  
SDS-PAGE, 0,8 mm:  
Hofer; MightySmall SE250  
Hofer; MightySmall Multiple Gel Caster SE200  
Hofer; MightySmall Dual Gel Caster SE245  
BioRad; PowerPac 3000 PowerSupply
  
- Blotting- Apparaturen:..... Hofer TE Transfer Electrophoresis Unit (Tankblot)  
HämoScan; SemiDryBlot
  
- Schüttler/Inkubatoren:..... Zellzucht:  
Infors; Multitron HT  
New Brunswick Scientific (NBS); Gyrotory G2  
NBS; Controlled Environment Incubator Shaker  
Mettler; Brutschrank  
B. Braun; Fermenter 880 137/1 (12 l Kulturvolumen)  
mit Belichtungsanlage 12x Sylvania GRO-Lux  
MPI-Eigenbau  
Sonstige:  
Boekel; MiniFridge II (Ligationsinkubator)  
Heizblock; Eigenbau MPI Biochemie
  
- Rührer/Schüttler:..... IKA; Combimag Rührer  
IKA; KS 250 Schüttler  
Multipoint HP; Variomag Rührer  
PSI Grünwald; Über-Kopf-Rotator  
LTF Labortechnik; Rocky Wippe  
Scientific Industries; Vortex Genie 2

- DNA-Sequenzierautomat:..... Perkin Elmer; ABI Prism 377 DNA Sequencer
- Thermocycler:..... Perkin Elmer; GeneAmp PCR System 9700  
Biometra; T3 Thermocycler
- Zellaufschluß:..... Aminco; French Pressure Cell Press  
Branson; Sonifier 450  
Branson; Sonifier Celldisrupter B15
- FPLC:..... Pharmacia Biotech; ÄKTA Basic  
Pharmacia Biotech; ÄKTA Explorer  
Pharmacia Biotech; SMART System
- Chromatographie:..... Pharmacia Biotech; ResourceQ<sup>®</sup>, 1 ml  
Pharmacia Biotech; MonoQ<sup>®</sup> HR 5/5  
Pharmacia Biotech; Superose<sup>®</sup> 12 HR 3.2/30  
Pharmacia Biotech; HiTrap<sup>®</sup> affinity columns  
NHS-activated, 1 ml  
Pharmacia Biotech; HiLoad<sup>®</sup> 16/60 und 26/60  
Superdex<sup>®</sup> 75 und 200 prep grade  
Pharmacia Biotech; Columns XK 16 und XK 26  
Pharmacia Biotech; DEAE Sepharose<sup>®</sup> FastFlow  
Pharmacia Biotech; HiTrap<sup>®</sup> Q ion exchange 1 ml  
Qiagen; Ni-NTA Superflow Agarose  
Sigma; Anti-FLAG<sup>®</sup> M2 Affinity Gel
- Waagen:..... Sartorius; BP 2100 S Feinwaage  
Mettler; AT 200 Waage
- Autoklaven:..... H+P Labortechnik; Varioklav  
Melag; Autoklav 23 Tischautoklav
- Elektroporationsgerät:..... BioRad; GenePulser<sup>®</sup>
- Lichtmessungen:..... Li-Cor; LI-250 Light Meter  
Li-Cor; 190 SA Quantum Sensor
- Begasung:..... Flaschendruckminderer FMD 502 – 18B  
Thomafluid<sup>®</sup>; Kleindurchflußmesser KDM 65-55650
- Sonstige Geräte:..... Bachhofer; SpeedVac Concentrator mit  
Vacubrand; RP 12 C Vakuumpumpe  
Millipore; MilliQ<sup>®</sup> Plus PF, Elix3  
Heraeus; HA 2448 GS Sterilbank  
WTW; pH526 pH-Meter  
Colora; UF 85-360 T -80°C Truhe  
Phillips; Digital Sound Processing Portable CD-Player  
Aktivboxen von Tevion  
Handelsübliche Mikrowellen, Kühl- und Gefrierschränke  
IBS; Fireboy

## 2.2 Chemikalien, Enzyme

### 2.2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien hatten die Qualitätsstufe *pro analysi* (> 99%). Sie wurden größtenteils von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) und ICN (USA) bezogen. Ausnahmen werden im folgenden aufgeführt:

- Chemikalie:.....	Hersteller:
Agarose	Biozym (Oldendorf)
Bacto-Agar und Bacto-Trypton	Difco (Detroit, USA)
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemica Heidelberg
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva Feinbiochemica Heidelberg
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ethanol und Methanol	Riedel de Haën
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim
Bacto Hefe-Extrakt	Difco (Detroit, USA)
IPTG	Gerbu
Proteaseinhibitor-Cocktail-Tabletten (EDTA-frei)	Roche Diagnostics
Protogel-Lösung	National Diagnostics
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	BioRad (Richmond, USA)
Triton X-100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Desweiteren wurden Whatman Filterpapiere und Immobilon™-P PVDF Membranen von Millipore benutzt.

### 2.2.2 Enzyme und Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammten von New England Biolabs, mit den folgenden Ausnahmen:

- Enzym:.....	Hersteller:
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Herculase DNA-Polymerase	Stratagene, USA
Ready-To-Go T4 DNA Ligase	Pharmacia Biotech
T4 DNA Ligase	Gibco BRL
Thrombin	Pharmacia Biotech
Lysozym	Boehringer Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Boehringer Mannheim

- Antikörper:.....	Hersteller:
Anti-FLAG®	Stratagene, USA
Anti-Penta-His, mouse IgG <sub>1</sub>	Qiagen
Anti-Maus, IgG, HRP-Konjugat, 172-1011	BioRad
Anti-His DIA 900	Dianova
Anti-rabbit IgG, Peroxidase-Konjugat A615-4	Sigma (München)

### 2.2.3 Kits

Es wurden die folgenden Kits in dieser Arbeit verwendet:

- verwendetes Kit:	Hersteller:
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
Qiaprep® Plasmid Midiprep Kit	Qiagen
NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit (Miniprep)	Macherey-Nagel
NucleoBond® AR genomic DNA prep Kit	Macherey-Nagel
BCA Protein Assay	Pierce
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
ECL™ Enhanced Chemiluminescence Kit	Amersham
BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD)	Boehringer Mannheim

## 2.3 Allgemeine Puffer

- PBS 10x:	81 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O 17,6 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 M NaCl pH 7,4 (andere pH-Werte nach Maniatis)
- TBS 20x:	0,4 M Tris/HCl pH 8,0 3 M NaCl in 1x optional: 1 mM β-Mercaptoethanol oder DTT in 1x optional: 1 mM EDTA in 1x optional: bis 250 mM Imidazol
- PBST, TBST:	PBS bzw. TBS mit 0,1% Tween 20
- HBS 20x:	0,4 M HEPES pH 8,0 3M NaCl
- Lysispuffer:	TBS 5 mM β-Mercaptoethanol 1 Tablette Protease Inhibitor Complete pro 50 ml optional: 1 mM EDTA optional: 10-40 mM Imidazol
- TE:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA

Weitere Puffer sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben. Ionenstärke (NaCl) und Additive wurden den Erfordernissen der jeweiligen Chromatographie angepaßt.

## 2.4 Mikrobiologische Methoden

### 2.4.1 Bakterienstämme

Die folgenden Bakterienstämme fanden im Verlauf dieser Arbeit Verwendung:

<i>Stamm</i>	<i>Genotyp oder Beschreibung</i>	<i>Referenz/Quelle</i>
<i>E. coli</i> Dh5 $\alpha$	<i>supE44 dlacU169</i> (p80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[Hanahan, <sup>123</sup> ]
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	[Boyer, Roulland-Dussoix, <sup>124</sup> ]
<i>E. coli</i> J53	<i>pro met</i> (λ)/RP4	[Hedges und Jakob <sup>125</sup> ]
<i>E. coli</i> BL21 DE3 RIL	B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal endA Hte</i> [ <i>argU, ileY, leuW, Cam</i> <sup>r</sup> ]	Stratagene
<i>E. coli</i> SCS110	<i>rpsL</i> (Str <sup>r</sup> ) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara ton tsx dam dcm supE44</i> Δ( <i>lac-proAB</i> )[F' <i>traD36 proAB lac<sup>d</sup> Z</i> ΔM15]	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue MR	Δ( <i>mcrA</i> )183 Δ( <i>mcrCB-hsdMR-mrr</i> ) 173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i>	Stratagene
<i>Calothrix</i> sp. PCC7601	Erste Isolation 1952 unter dem Namen <i>Fremyella diplosiphon</i> . Hormogonien, Proheterocysten, CCA	Institut Pasteur, FR
<i>Fremyella diplosiphon</i> SF33	Mutante von PCC7601 mit kurzen Filamenten, keine Hormogonien, funktionelle Heterocysten, CCA	University of Texas, Austin. UTEX 481, USA

#### 2.4.1.1 Das Epicurian Coli-BL-21-CodonPlus™ RIL Expressionssystem

Die effiziente Expression heterologer Proteine in *E. coli* wird oft durch die Seltenheit bestimmter tRNAs eingeschränkt, die im Ursprungsorganismus in höherer Konzentration auftreten. Dies ist durch unterschiedliche Codonbenutzung der verschiedenen Organismen begründet. Durch Fehlen dieser tRNAs wird eine hohe Expression begrenzt. In den *BL-21-Codonplus™-RIL* Stämmen sind im Genom zusätzliche Kopien der Gene für folgende tRNAs eingefügt, um deren Verfügbarkeit zu erhöhen: AGA-tRNA<sup>arg</sup>; AGG-tRNA<sup>arg</sup>; AUA-tRNA<sup>ile</sup> und CUA-tRNA<sup>leu</sup>. Desweiteren fehlen dem *Epicurian-Coli*-Stamm zwei Proteasen, die rekombinante Proteine abbauen könnten. Die Transformationseffizienz ist erhöht, da die Bakterien defizient in der Endonuclease I sind, was den Abbau von eingebrachter DNA minimiert. Der Stamm besitzt eine Chloramphenicol-Resistenz, daher wurde den Expressionskulturen 30 μg/ml Chloramphenicol zugesetzt.

## 2.4.2 Nährmedien, Antibiotika

### 2.4.2.1 Medien für Cyanobakterien

- GN (Standardmedium):	NaNO <sub>3</sub>	1,5 g/l	17,65 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 3 H <sub>2</sub> O	0,04 g/l	0,18 mM
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,075 g/l	0,3 mM
	CaCl <sub>2</sub> * 3 H <sub>2</sub> O	0,036 g/l	0,25 mM
	Zitronensäure	0,006 g/l	0,03 mM
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,04 g/l	0,38 mM
	Eisenammoncitrat	0,006 g/l	0,03 mM
	TMM (s.u)	1 ml pro Liter	
	<i>pH nach Autoklavieren auf 7,4 einstellen</i>		

Eine 10x Konzentration GN ist möglich, Stammlösungen können in der = 1000x Konzentration der Einzelsubstanzen hergestellt werden. Wenn mit 2% CO<sub>2</sub> begast wurde, wurden 5 mM NaHCO<sub>3</sub> aus einer 1 M Stammlösung (sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C) zugegeben. Für die Fermenteranzucht wurde 5 mM Phosphatpuffer [1 M] pH 7,5 zugegeben.

- TMM (Trace Metal Mix):	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g/l
	MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	1,81 g/l
	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,222 g/l
	NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,390 g/l
	CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,079 g/l
	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,049 g/l
- GO:	GN ohne NaNO <sub>3</sub>	
- Tester-Platten:	GN mit 0,02% (w/v) Casaminsäuren (Difco) 0,2% (w/v) Glucose 5% (v/v) LB Medium 1,5% (w/v) Agar (Difco)	
- GN-Platten:	2x GN und Agar (1,6% (w/v) gewaschener Agar, Sigma A-8678) <i>getrennt autoklavieren, GN vor dem Mischen gut rühren</i>	
- Mating-Platten:	GN mit 5% (v/v) LB Medium 0,8% (w/v) gewaschener Agar, Sigma A-8678)	

### 2.4.2.2 Medien für *E. coli*

- LB (Luria Bertami)-Medium:	Bacto Hefe-Extrakt	0,5%
	Bacto Trypton	1%
	NaCl	1%
	für Platten	15 g/l Agar

- TB (Terrific Broth)-Medium: ..... Bacto Hefe-Extrakt ... 2,4%  
 Bacto Trypton ..... 1,2%  
 Glycerin (87%) ..... 4,6 ml/l Medium  
*Ansatz zunächst auf 900 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen,  
 autoklavieren.  
 Zugabe von 100 ml autoklaviertem Phosphatpuffer [1M]  
 ad 100 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,5*
- SOB-Medium: ..... Bacto Hefe-Extrakt ... 0,5%  
 Bacto Trypton ..... 2%  
 NaCl ..... 10 mM  
 KCl ..... 5 mM  
*autoklavieren, steril zugeben:*  
 MgCl<sub>2</sub> ..... 10 mM  
 MgSO<sub>4</sub> ..... 10 mM
- SOC-Medium: ..... SOB mit 20 mM Glucose

#### 2.4.2.3 Antibiotika, Antimycotica (Mycostatika)

Angegeben sind die 1000x Konzentrationen der Stammlösungen, Lagerung bei -20°C:

- Kanamycin: ..... 50 mg/ml ..... in H<sub>2</sub>O  
*für Calothrix 35 mg/ml*
- Neomycin: ..... 25 mg/ml ..... in H<sub>2</sub>O
- Ampicillin: ..... 50 mg/ml ..... in H<sub>2</sub>O
- Chloramphenicol: ..... 30 mg/ml ..... in Isopropanol
- Nystatin: ..... 50 mg/ml ..... in H<sub>2</sub>O  
*keine Lagerung, frische Zugabe der Suspension*
- Amphotericin B: ..... 25 mg/ml ..... in DMSO

#### 2.4.3 Anzucht von *Calothrix* PCC7601 und *Fremyella diplosiphon*

Zur Anzucht von Cyanobakterien wurden 50-5000 ml Erlenmeyerkolben mit atmungsaktiven Stopfen versehen und zum Teil mit Pipetten zur Begasung mit 2% CO<sub>2</sub> (in synthetischer Luft) ausgestattet. Die Inkubation erfolgte unter mildem Rühren auf Magnetrührern bei Raumtemperatur oder bei 30°C unter Belichtung mit Sylvania GROLUX F18W/GRO Leuchtstoffröhren mit Lichtintensitäten zwischen 20 und 35 µE/m<sup>2</sup>s. Das verwendete GN-Medium wurde bei Bedarf mit 10 mM HEPES-Puffer pH 7,5 gepuffert. Beim Überimpfen unter der Sterilbank wurde je ein Tropfen der alten und der frisch angeimpften Kultur als Prozessierungskontrolle auf Testerplatten aufgebracht. Diese wurden im Dunklen bei 30°C inkubiert. Verunreinigungen mit fremden Mikroorganismen wurde mit Mycostatika (bei Pilzen) oder mehrfache Passagierung in frische Kulturen bzw. GN-Platten begegnet. Filtrationsversuche mit 25 µm Filtern

schlugen fehl. Der Einsatz von Mikromanipulatoren (wenn vorhanden) wird empfohlen. Die Kontrolle der optischen Dichte erfolgte bei 750 nm, da diese Wellenlänge außerhalb des Absorptionsbereichs von Chlorophyll A (Chla) liegt und Schwankungen im Chla-Gehalt der Zellen die Messung der Zelldichte daher nicht beeinflussen können.

#### 2.4.4 Fermenteranzucht von *Calothrix* und *Fremyella diplosiphon*

Die Wachstumsbedingungen von *Calothrix* wurden, soweit wie möglich auf das Fermenter-System übertragen, d.h. es wurde sichergestellt, daß die Wachstumstemperatur 30°C nicht überstieg, und daß die Emissionsspektren der Beleuchtung den Empfehlungen des Pasteur-Instituts entsprach (s.o.). Die zur Begasung der Kultur in Kleinansätzen verwendeten 2% CO<sub>2</sub> in synthetischer Luft wurden durch sterilgefilterte Pressluft ersetzt. Weiterhin war es nötig, das GN-Medium zu puffern, hier zeigte sich Phosphatpuffer gegenüber dem empfohlenen HEPES-Puffer dahingehend überlegen, daß mit Phosphatpuffer ein schnelleres Wachstum der Zellen beobachtet werden konnte. Die physiologischen Auswirkungen des auf diese Weise veränderten Phosphatstoffwechsels von *Calothrix* wurden für den Hintergrund der Expression von CphBcy außer acht gelassen. Bei der Zugabe von Schaumregulatoren zeigten sich die Zellen gegenüber Produkten auf Silikonbasis tolerant. Als Mycostatika wurden Nystatin und Amphotericin B in den vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Konzentrationen eingesetzt. Probenentnahme und pH-Kontrolle erfolgte über sterile Septen des Fermenters.

Die Zellernte erfolgte bei 15000g und 4°C für 10 min im JLA 10.500 Rotor. Das so erhaltene „Pellet“ (*Calothrix* pelletiert sehr schnell zu einem relativ weichen Pellet) wurde vorsichtig mit sterilen Pipetten abpipettiert und in Falcon Tubes für 5 min bei 2000 rpm in der Heraeus Sepatech Minifuge RF bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand kann dann abgetrennt werden. Bei Verunreinigungen mit dem Konjugationspartner (*E. coli*) wurden die Zellen so oft mit GN-Medium gewaschen und pelletiert, bis der Überstand keine Eintrübung durch *E. coli* Zellen mehr zeigte.

#### 2.4.5 Triparentale Konjugation

Die Transformation von *Calothrix* bzw. *Fremyella diplosiphon* kann entweder über Elektroporation stattfinden, wobei diese Methode für die Zellen einen höheren Stress bedeutet (N. Tandeau de Marsac, pers. Mitteilung), oder mittels triparentaler Konjugation erreicht werden

<sup>126</sup>

Das Plasmid RP4 ist ein 57 kb IncP Plasmid aus dem Gram-negativen Bakterium *Pseudomonas*, das u.a. für einen „broad host range“ Konjugationsapparat kodiert. Dieser wird benötigt, um mit anderen Gram-negativen in Kontakt zu treten <sup>127</sup>. Soll ein Plasmid (Zielpiasmid) durch RP4 mobilisiert werden, müssen zwei Prämissen erfüllt sein: Das Zielpiasmid

muß eine „*bom-site*“ enthalten (auch oft *oriT* genannt), und es muß ein „*mob-Gen*“ anwesend sein. *bom* ist die „*basis of mobilisation*“, die Erkennungssequenz für das *mob* Genprodukt, ein „nicking“ Enzym, das einen für die Übertragung des Zielplasmids notwendigen Einzelstrangbruch katalysiert. Bei RP4 Plasmiden, die zur Mobilisierung von Zielplasmiden benutzt werden, fehlt die *bom-site* und das *mob-Gen*, damit sie selbst im Verlauf der Konjugation nicht übertragen werden können. Im Zielplasmid ist die *bom-site* enthalten, nicht aber das *mob-Gen*. Letzteres wird im Fall der triparentalen Konjugation mittels eines dritten Plasmids, dem sog. Helferplasmid, bereitgestellt. So ist sichergestellt, daß das übertragene Zielplasmid nicht ohne weiteres durch ein späteres Konjugationsereignis den Empfängerorganismus wieder verlassen kann. Im Falle der in dieser Arbeit verwendeten Konjugationen enthielten die verschiedenen Helferplasmide z.T. zusätzliche Methylasegene für die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *SphI*, *Avall* und *FspI*, um einer Restriktion des Zielplasmids durch das Cyanobakterium entgegenzuwirken<sup>150, 151</sup>. *Calothrix* (und viele andere Cyanobakterien, wie *Anabaena sp.*, *Fremyella diplosiphon* und *Nostoc sp.*) besitzen Endonukleasen für diese Restriktionschnittstellen, was eine erfolgreiche Konjugation extrem erschwert<sup>126</sup>, sofern diese Schnittstellen im Zielplasmid vorhanden sind und nicht durch die entsprechende Methylase geschützt wurden. Zur Durchführung der Konjugation:

*Tag -3:*

- Ansetzen der *Calothrix*-Kultur in ca. 40 ml GN-Medium, Begasung (2% CO<sub>2</sub> in synthetischer Luft), 30°C
- Transformation des zu transferierenden Plasmids in den Helferstamm.

*Tag -1:*

- *E. coli*-Vorkulturen in 6 ml LB Medium mit entsprechenden Antibiotika, 37°C, 250 rpm

*Tag 0, Transformationstag:*

- *E. coli* Kulturen 1/40 verdünnen und 3 - 4 h (max.) bei 37°C wachsen lassen. (verwendetes Volumen: 1,5 ml plus 0,75 ml für jeden Ansatz)
- 10 min 5000 rpm RT abzentrifugieren, Pellet in LB ohne Antibiotikum aufnehmen
- Helfer-*Coli* (H) und RP4 1:1 mischen (ergibt 750 µl H + 750 µl RP4 und je 750 µl einzeln)
- 1 min 5000 rpm RT abzentrifugieren, Pellet in 60 µl LB ohne Antibiotikum aufnehmen
- *Calothrix*: OD<sub>750</sub> ca. 0,7 - 0,8; 20-fach ankonzentrieren (zentrifugieren), Filamente verkürzen (10-20 mal durch eine schmale sterile Kanüle pumpen), aliquotieren und erneut abzentrifugieren (10 - 15 min, 12000 rpm, 25°C)
- Pellet in 60 µl GN-Medium aufnehmen
- Konjugationsplatten: 1 Tropfen der Cyanokultur auf Testerplatte als Prozessierungskontrolle
- sterile Nitrocellulosefilter (Milipore HATF 08250, 0,45 µ, 82 mm) auf Mating-Platten
- Dots: je 5 µl/Stamm: Cyano; Cyano + Helfer; Cyano + RP4; Cyano + Helfer + RP4 (mit verschiedenen Cyano-Verdünnungen)
- Platten bei 30°C, 6 - 7 µE/m<sup>2</sup>s inkubieren

*Trafotag* + 2: nach 48 h Filtertransfer auf GN Platten ohne LB mit Antibiotikum.

*Trafotag* + 8 bis 9: Lichtintensität erhöhen, in den nächsten Tagen Wachstum beobachten, rechtzeitig in Flüssigkulturen überimpfen (die Platten sollten nicht austrocknen und die Kulturen sollten eine satte, tiefgrüne Farbe haben). Anmerkung: Die Transformationseffizienz von *Calothrix* PCC7601 ist sehr schlecht, es lohnt sich, mehrere Ansätze parallel zu konjugieren.

#### 2.4.6 Plasmid „Rescue“ aus *Calothrix*

Zur Verifizierung der erfolgreichen Transfers der Plasmide in *Calothrix* wird eine geringe Zellmenge (5-15 ml einer Kultur mit einer  $OD_{750}$  von 0,5) an zentrifugiert und mittels Sonifizieren (Microtip Stufe 5, 15 s un gepulst) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden bei 10000 rpm in der Eppendorfzentrifuge pelletiert. 5  $\mu$ l des Überstands werden per Elektroporation in *E. coli* transformiert. Von zufällig ausgewählten Kolonien werden Plasmidisolationen durchgeführt, die im Anschluß eine Identifikation der Plasmide durch Restriktionsverdau, analytische PCR oder Sequenzierung ermöglichen.

#### 2.4.7 Phycobiliproteinbestimmung

Zur Bestimmung des Phycobiliproteingehalts von *Calothrix* und *Fremyella diplosiphon* wurde die von Tandeau de Marsac und Houmard beschriebene Methode eingesetzt<sup>128</sup>. Hierzu werden 4 ml Cyanobakterium-Kultur (mit einer  $OD_{750}$  von etwa 0,5) abzentrifugiert, das Pellet mit 4 ml 20 mM pH 5,5 Natriumacetat, 3 mM  $NaN_3$ , 10 mM EDTA versetzt und ein Zellaufschluß durchgeführt. Die Zelltrümmer werden in einer Eppendorfzentrifuge bei 4°C 10000 rpm für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit 1% (w/v) Streptomycinsulfat versetzt und erneut bei 4°C 10000 rpm für 15 min an zentrifugiert (dies dient der Entfernung Chlorophyll A-haltiger Membran-Micellen). Der Überstand kann anschließend spektrometrisch vermessen werden.

Dabei errechnet sich der Gehalt der Probe an Phycocyanin (PC), Allophycocyanin (AP) und Phycoerythrin (PE) in mg/ml nach den folgenden Gleichungen:

$$(1) \quad [AP] = \frac{OD_{650} - 0.19 \cdot OD_{620}}{5.65}$$

$$(2) \quad [PC] = \frac{OD_{620} - 0.7 \cdot OD_{650}}{7.38}$$

$$(3) \quad [PE] = \frac{OD_{565} - 2.8 \cdot [PC] - 1.34 \cdot [AP]}{12.7}$$

## 2.4.8 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Eine Vor-Vorkultur (50 ml LB) wird mit dem gewünschten *E. coli*-Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Aus dieser Kultur wird die eigentliche Vorkultur (50 ml LB) angeimpft. Dieser Schritt dient zur Entfernung etwaiger Glycerin- oder DMSO-Reste des Ausgangsmaterials. Die Hauptkulturen (600 ml SOC in 2 l Schikanekolben) werden mit 6 ml der Vorkulturen angeimpft und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,8 (logarithmische Phase) geschüttelt.

Die weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Die Kultur wird in sterilen Gefäßen bei 4°C und 3000 rpm im JLA 10.500 Rotor für 15 min abzentrifugiert. Die Pellets werden dreimal mit eiskaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgt mit 100% des Ausgangsvolumens, der zweite mit 50% und der dritte mit 10% des Ausgangsvolumens. Das Pellet wird dann in 250-500 µl 10% Glycerin resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgt nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C. Ein Aliquot wird zur Kontrolle auf die gängigen Antibiotika-Platten ausgestrichen.

## 2.4.9 Transformation von *E. coli*

### 2.4.9.1 Elektroporation

50 µl der elektrokompenten Bakterien werden mit 5 µl plasmidhaltiger Lösung (Ligationsansatz, 0,1-1 µl bei superspiralisierten Plasmiden) gemischt und in eine BIORAD Genepulser-Küvette (2mm Elektrodenabstand) überführt. Zur Kontrolle wird ein Ansatz mit 5 µl sterilem Wasser elektroporiert. Diese Küvette wird mit einem BIORAD Genepulser einem Strompuls mit 1,5 kV bei 800 Ω ausgesetzt. Direkt danach wird die Küvette mit 750 µl eisgekühltem LB-Medium (ohne Antibiotikum) aufgefüllt. Typische Abklingzeiten liegen bei 7-14 ms, bei kürzeren Abklingzeiten sowie bei Ligationen wurde aufgrund der herabgesetzten Transformationseffizienz statt lediglich 50-200 µl der gesamte Ansatz nach der phänotypischen Expression ausplattiert.

### 2.4.9.2 TSS-Transformation

Diese Methode eignet sich aufgrund ihrer geringen Effizienz ausschließlich für die Transformation intakter Plasmide. Der Vorteil dieser Methode ist die schnelle und unkomplizierte Handhabung und die Tatsache, daß keine vorbereiteten *E. coli* Zellen dafür benötigt werden. Sie funktioniert mit Zellen, die von Platten geerntet werden, sowie mit allen chemisch- und elektrokompenten Zellen.

Ein kleines Pellet einer Tageskultur oder anderer *E. coli* Zellen wird mit 1-2 µl Plasmid vermengt und auf Eis gestellt. Dann wird 100 µl kalte (4°C) TSS-Lösung zugegeben und

gemischt. Nach 30 min auf Eis erfolgt die Zugabe von 500 µl LB (erwärmtes LB erhöht die Effizienz etwas). Nach der phänotypischen Expression (30 – 60 min bei 37°C) erfolgt der Ausstrich auf Antibiotikaplatten.

- TSS-Lösung: ..... LB mit:  
 PEG 6000 / 8000 ..... 10% (w/v)  
 DMSO ..... 5% (v/v)  
 MgSO<sub>4</sub> ..... 50 mM  
*pH 6,5, sterilfiltrieren, evtl. erwärmen*

## 2.4.10 Herstellung von Dauerkulturen

### 2.4.10.1 *E. coli*

Um Dauerkulturen von *E. coli* zu erhalten, wurde eine Tageskultur in LB-Medium angezogen und mit dem gleichen Volumen 87% Glycerin gemischt. Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Kulturen wurden bei -80°C gelagert.

### 2.4.10.2 Cyanobakterien

Für Dauerkulturen von *Calothrix* oder *Fremyella diplosiphon* wurden entweder direkt ankonzentrierte Zellpellets verwendet und eingefroren, oder stark ankonzentrierte Kulturen wurden mit 5% (v/v) Methanol und 8% (v/v) DMSO versetzt und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

## 2.4.11 Heterologe Expression

Mit durchsequenzierten Ziel-Plasmiden werden elektrokompetente *Epicur*-Zellen durch Elektroporation transformiert. Nach einer Nacht bei 37°C werden von einzeln pickbaren Klonen 25ml LB-Amp bzw. LB-Kan Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 300 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag werden mit diesen Übernachtskulturen je 2,5 l TB-Medium (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum) angeimpft. Die TB-Großkulturen wurden bei 18°C-37°C (je nach Protein) und 120-150 rpm in 5 l-Schikanekolben kultiviert und wurden nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,8 mit 1 ml IPTG-Lösung [0,4 M] pro Liter Kultur induziert. Nach weiteren 2-16 h Expression werden die Kulturen durch Zentrifugation (5min bei 17000g und 4°C) geerntet und zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

## 2.4.12 Zellaufschluß

### 2.4.12.1 *E. coli*

a) Mittels French Press: Gefrorene Zellpellets bis 15 g Feuchtgewicht wurden in 25 ml Lysispuffer resuspendiert, mit einer Spatelspitze Lysozym und einer Spatelspitze DNaseI versehen und in der gekühlten French Pressure Cell bei einem Druck von 1100 psi durch einmalige Passage aufgeschlossen. Die Zellrückstände wurden bei eine Stunde bei 100000g und 4°C (45000 rpm im Ti60 Rotor) ultrazentrifugiert und der sterilfiltrierte Überstand chromatographischen Methoden zugeführt. Für spezielle Anwendungen wurde der Lysispuffer der verwendeten Methode angepaßt (für Anionentauscher NaCl-frei, für Ni-NTA mit 10 mM Imidazol und ohne EDTA, für Koppelungen an NHS-aktiviertes Säulenmaterial diente HBS als Lysispuffer-Grundlage).

b) Mittels Sonifizieren: Alle Schritte erfolgten analog zu a) mit der Ausnahme, daß für den Zellaufschluß eine Macrotip auf Stufe 7 mit 50% Puls eingesetzt wurde. Zwischen den drei Beschallungseinheiten à 90 Sekunden wurde die Temperatur der Probe geprüft und die Pausen der auf Eis befindlichen Probe den Notwendigkeiten angepaßt.

### 2.4.12.2 Cyanobakterien

Für Cyanobakterien wurde in dieser Arbeit der Aufschluß mittels French Press wie für *E. coli* bereits beschrieben durchgeführt, da, wie mikroskopische Untersuchungen ergaben, diese Methode im Vergleich zum Sonifizieren wesentlich bessere Ergebnisse zeigte. Nach der Ultrazentrifugation folgten noch ein bis mehrere Zugaben von Streptomycinsulfat zum Überstand mit erneutem Zentrifugieren (hierdurch werden restliche Membranbestandteile abgetrennt), bis kein weiteres Pellet mehr erhalten wurde. Der letzte Überstand wurde anschließend sterilfiltriert weiterverarbeitet (Dialyse, Chromatographie, Konzentration).

## 2.5 Verwendete Vektoren

### 2.5.1 Der pMEX 8 -Vektor

Das pMEX-Plasmid ist ein Expressionssystem der Firma MoBiTec (Göttingen). Das pBR322-Derivat enthält eine *multiple cloning site* (MCS) mit 18 Restriktionsschnittstellen und einen tac-Promotor mit einem lac-Operator. Die Schnittstellen sind so angeordnet, daß vor dem eingefügten Gen im gewünschten Leseraster ein Startcodon entstehen kann. In der Region nach dem eingefügten Gen steht in jedem Raster ein Stopcodon. Zusätzlich sind ein Replikationsursprung und eine Ampicillinresistenz zur Selektion (*bla*-Gen) enthalten.

### 2.5.2 Der pET28a (+) -Vektor

Der pET28-Vektor der Firma Novagen (Madison, USA) enthält einen T7-Promotor kombiniert mit einem lac-Operator sowie wahlweise, abhängig von der Wahl der Klonierungsschnittstellen ein N- bzw. C-terminales His(6)-tag. Hinter der MCS ist ein T7-Terminator lokalisiert. Der N-terminale His(6)-tag ist durch die Erkennungssequenz der Thrombinprotease von der MCS getrennt. pET28 enthält weiterhin eine Kanamycinresistenz, den lac-Repressor (*lacI*) und den ColE1 Replikationsursprung. Dieser Vektor bildet mit den *Epicurian coli* BL-21-Codon-Plus™ RIL, welche die T7 Polymerase genomisch unter lacI Repressor-Kontrolle kodieren, ein feinregulierbares Expressionssystem.

### 2.5.3 Der TOPO pCR2.1® -Vektor

Dieser kommerzielle Vektor der Firma Invitrogen ist für das schnelle Einklonieren Taq-PCR-amplifizierter DNA-Fragmente optimiert. Dies beruht auf zwei Besonderheiten:

- Der gelieferte, offene Vektor hat 3'-T-Überhänge, die mit den von der Taq-Polymerase obligatorisch angehängten 5'-A-Überhängen als klebrige Enden reagieren
- In der Plasmidlösung befindet sich Topoisomerase I, die bei durch negative Super-spiralisierung gehemmter Ligation diese relaxiert.

Zur Selektion sind Kanamycin und Ampicillin-Resistenzen im Vektor kodiert. Zusätzlich ist das lacZ Alpha-Komplement in die MCS eingearbeitet, was ein Blau-Weiß Screening ermöglicht (die Platten wurden dann mit X-Gal (40 µl, 20 mg/ml in DMSO) und IPTG (4 µl, 200 mg/ml) behandelt). Die Durchführung der TOPO-TA Klonierung folgte dem Protokoll des Herstellers. Das Selektionsantibiotikum wurde so gewählt, daß *nicht* auf verunreinigende Template Plasmide aus der PCR-Reaktion selektiert wurde.

Diese Methode funktioniert *nicht* mit von *Pfu* Polymerase generierten Fragmenten. Sollte eine TOPO Klonierung solcher Fragmente unerlässlich sein, muß die *Pfu* Polymerase zunächst durch Ethanol-fällung oder Gelextraktion entfernt werden, bevor das Fragment mit 2,5 U Taq Polymerase, dem entsprechenden Taq-Puffer und 1,25 mM ATP für 30 min bei 70°C inkubiert werden kann.

### 2.5.4 Shuttle-Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten (generierten) Shuttle-Vektoren werden in Kap. 3.3.3 eingehender besprochen. Das Plasmid pPL2.7 wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um N. Tandeau de Marsac, Institut Pasteur, Paris, bereitgestellt. Die Plasmide pBQ7, 9, 10 und 11 stellen pET28a Derivate dar, die den cyanobakteriellen Replikationsursprung aus pPL2.7 ent-

halten, und mit einem tac-Promotor ausgestattet wurden. All diesen Plasmiden ist gemein, daß sie keine Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *FspI*, *SphI* und *AvaII* besitzen.

## **2.6 Molekularbiologische Methoden**

### **2.6.1 Klonierungstechniken**

#### 2.6.1.1 Restriktionsverdau

Sämtliche restriktionsendonukleolytischen Spaltungen wurden mit Enzymen und Puffern von New England Biolabs (NEB) durchgeführt. War ein Doppelverdau in einem Puffer unvorteilhaft (wenn die Enzyme nach Herstellerangaben eine Aktivität von kleiner 75% im verwendeten Puffer zeigten), wurde das DNA-Fragment über Ethanol-fällung oder Gelextraktion aufgereinigt und sequentiell verdaut. Für methylierungssensitive Schnittstellen wurde Plasmid-DNA von Plasmid-Präparationen aus *E. coli* SCS110 oder *E. coli* XL1 Blue MR verwendet. Es wurde darauf geachtet, daß die Enzyme weniger als 1/10 des Reaktionsansatzvolumens beitrugen, um negative Effekte des Glycerins aus dem Lagerungspuffer der Enzyme auszuschließen. Der Verdau erfolgte im Heizblock bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur. Bei Bedarf erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75°C.

#### 2.6.1.2 Herstellung glatter Enden

a) Auffüllen von 5'-überhängenden Enden: 5'-überhängende Enden wurden mit dem (großen) Klenow-Fragment (NEB) durchgeführt. Zu 20 µl Restriktions-Ansatz werden 0,6 µl dNTP-Mix [1,25 mM] (entspricht 33 µM im Ansatz) und 5U Klenow gegeben. Der Ansatz wird für 15 min bei 25°C inkubiert, anschließend zur Deaktivierung mit 0,4 µl 500 mM EDTA (= 10 mM im Ansatz) versetzt und für 10 min auf 75°C erhitzt, falls das Klenow-Enzym nicht durch einen folgenden Schritt (Gelextraktion, Ethanol-fällung) abgetrennt wurde. Alternativ wurde T4-DNA-Polymerase von Boehringer Mannheim entsprechend der Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

b) Verdau von 3'-überhängenden Enden: Bei 3'-überhängenden Enden wurde analog zu a) verfahren, mit dem Unterschied, daß keine dNTP's zugesetzt wurden und die Inkubationszeit eine Stunde betrug.

#### 2.6.1.3 Dephosphorylierung von 3' DNA-Enden

Vektor-DNA neigt bei komplementären und glatten Enden stark zur Selbst-Religation. Um dies zu verhindern, wurden die 5'-Enden der geschnittenen Vektor-DNA mit dem Enzym „Shrimp Alkaline Phosphatase“ (SAP) dephosphoryliert. Zunächst wurde, sofern noch vorhanden, die Restriktionsendonuklease inaktiviert. Dann wurde in den Ansatz 1/10 Volumen

SAP-Puffer und 1 µl SAP (pro 10 µl Probenansatz) zugegeben und für 10 min (klebrige Enden) bzw. 60 min (glatte Enden) bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend entweder hitzeinaktiviert (15 min bei 65°C) oder erneut aufgereinigt der Ligation zugeführt.

#### 2.6.1.4 Ligation

Zur Ligation wurde stets T4-DNA-Ligase von NEB eingesetzt. Die Ligationen erfolgten in 10 µl Endvolumen, wobei Vektor- und Insert-DNA in verschiedenen Mengenverhältnissen eingesetzt wurden. Als Negativkontrolle wurde immer auch Vektor und Insert-DNA einzeln sowie eine Blindprobe mit Wasser ligiert. Bei klebrigen Enden wurde für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C im Ligationsinkubator inkubiert, bei glatten Enden erfolgte die Ligation über Nacht in der PCR Maschine mit folgendem Programm:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>
1	24°C	15 min
2	24°C	2 min
3	18°C	2 min
4	12°C	2 min
5	12°C	2 h
6	4°C	halten

Die Schritte 2-4 werden in 99 Zyklen wiederholt.

Es wurden jeweils 5 µl der verschiedenen Ansätze in *E. coli* elektroporiert und auf entsprechende Antibiotikaplatten ausgebracht.

#### 2.6.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Durchführung von analytischen PCRs wurde hausintern hergestellte Taq-Polymerase verwendet, wohingegen für präparative PCR entweder Herculase (Stratagene) oder in den meisten Fällen *Pfu*-Polymerase eingesetzt wurde. Bei Genamplifikationen aus genomischer DNA wurde das Verhältnis von Template und verwendeten Oligonukleotiden über einen weiten Bereich variiert. Bei Problemen, die nicht auf fehlerhafte Oligonukleotide zurückzuführen waren, wurde dem Ansatz bis zu 10% DMSO zugesetzt und/oder ein sog. „hot start“ durchgeführt (dabei wird die Polymerase erst während des Anfangsaufschmelzens zugegeben).

Beim Primerdesign wurde darauf geachtet, daß die 3'-Enden der Primer mit Guanin oder Cytosin endeten, um eine sicherere Initiation der PCR zu gewährleisten. Die Primer wurden im Internet mit dem *Oligonucleotide Properties Calculator*® auf Haarnadelbildung

® <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>

und Selbst-Paarung überprüft. Folgende Formel wurde zu Berechnung der Schmelztemperatur herangezogen:

$$T_m = (81.5 + 0.41 \cdot (\%GC)) - \left(\frac{675}{N}\right) - \%Fehlpaarung$$

mit %GC = GC-Gehalt des Primers in %,  $N$  = Länge des Primers in Nukleotiden und %Fehlpaarung = Anteil fehlgepaarter Nukleotide bei Primern für die SDM.

Bei längeren, nicht paarenden Überhängen wurde die Anlagerungstemperatur pro fünf ungepaarter Nukleotide um ein halbes Grad gesenkt. Das Standard-PCR Programm in unten stehender Tabelle wurde bezüglich Anlagerungstemperatur und Elongationszeiten variiert.

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Phase</i>
1	94°C	30 s bis 5 min	Anfangsaufschmelzen
2	94°C	30 s	Produkt schmelzen
3	$T_m$	30 s bis 1 min	Primeranlagerung
4	68°C 72°C	2 min/kb Template <i>Pfu</i> 1 min/kb Template Taq	Polymerisation
5	4°C	halten	Lagerung des Ansatzes

Die Schritte 2-4 werden in 15-20 Zyklen wiederholt.

### 2.6.2 Ortsgerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*, SDM)

Mit dieser Methode ist es möglich, gezielt Punktmutationen in ein Plasmid einzufügen, oder ungewünschte Mutationen rückgängig zu machen. Die Punktmutagenese beruht auf dem Prinzip von zwei komplementären Primern, die die gewünschte Mutation als Fehlpaarung enthalten. Die Primer sollten auf beiden Seiten der Mutation ca. 15 korrekt mit dem Template paarende Basen besitzen und werden im Überschuß zum Template-Plasmid eingesetzt. Es wird eine PCR-Reaktion durchgeführt, bei der die *Pfu*-Polymerase, die eine extrem niedrige Fehlerrate besitzt, das ganze Plasmid vervielfältigt. Im Verlauf der PCR entstehen so Plasmide mit der gewünschten Mutation. Als Negativ-Kontrolle dient ein Ansatz ohne Mutageneseprimer. Die Ansätze werden bis zur Überführung in die PCR-Maschine auf Eis gekühlt. Das PCR-Programm ist dem Kap. 2.6.1.5 zu entnehmen (Variante mit *Pfu*-Polymerase). Anschließend wird der PCR-Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* behandelt. Dazu wird das PCR-Produkt eine Stunde mit *DpnI* (10 U) bei 37°C inkubiert. Dieses Enzym schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und verdaut damit lediglich die (durch den *E. coli* methylierte) Template DNA und nicht die während der PCR neusynthetisierten Plasmide. 3 - 5 µl des Restriktionsverdau-Ansatzes wird abschließend in *E. coli* elektroporiert.

Der PCR-Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 5 µl 10-fach Reaktionspuffer (100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 mg/ml Nuklease-freies BSA)
- 5-500 ng dsDNA Template-Plasmid
- 0,2-0,4 µM von jedem Primer im Ansatz
- 8 µl dNTP-Mix [1,25mM]
- 1 µl DMSO
- H<sub>2</sub>O zum Endvolumen von 50 µl
- 2,5 U *Pfu*- oder *Pfu*Turbo DNA-Polymerase

Es wurden pro Ansatz zwischen 10 und mehreren 100 Kolonien erhalten, die in 30% bis 90% der Fälle die gewünschte Mutation enthalten.

### 2.6.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid aus unterschiedlich verknüpften Galactoseeinheiten. Sie löst sich beim Erhitzen auf und geliert beim Abkühlen in Lösung, wodurch ein Gel entsteht. Beim Gelieren bilden die Polysaccharidstränge Doppelhelices, die sich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern. Dadurch entsteht ein Netzwerk mit recht großen Poren bei hoher Stabilität. Benutzt wurden je nach Bedarf 0,8% - 2%ige (w/v) Agarosegele. Als Laufpuffer und Grundflüssigkeit für das Gel dient TAE-Puffer:

- TAE-Puffer:..... 40 mM Tris-Acetat, pH 8,0  
1 mM EDTA
- 10x Auftragspuffer:..... Orange G; Xylencyanol und Bromphenolblau je 2 mg/ml  
40 mM Tris-Acetat, pH 8,0  
50% w/v Saccharose  
1mM EDTA

Zu 40 ml Gel werden 2 µl Ethidiumbromidlösung [10 mg/ml] als Indikator zugesetzt. Die Laufzeit der Gele beträgt 45-90 min bei konstanten 80 mA (kleine Gelkammer) bzw. 200 mA (große Gelkammer).

Der verwendete Marker war die 1 kb DNA-Leiter von Life Technologies (Invitrogen, Gibco BRL, Karlsruhe). Sie enthält 1-12 Repeats eines 1018 bp-DNA-Fragments. Zusätzlich sind von 75-1636 bp Fragmente des Vektorplasmids pBR322 als Markerbanden vorhanden.

## 2.6.4 Präparation von DNA

### 2.6.4.1 Plasmidisolierung Minipräparation

Die Minipräparation erfolgt nach Vorschrift und mit Materialien und Lösungen des Macherey-Nagel NucleoSpin® Plasmid Kits. Dieses Kit beruht auf der Lyse der Zellen mit einem basischen, SDS-haltigen Lysepuffer und einer nachfolgenden Präzipitation von denaturierten Proteinen, Zelltrümmern und der an der Zellmembran verankerten genomischen DNA. Das Präzipitat wird abzentrifugiert und der Überstand wird in eine NucleoSpin® Plasmidsäule (1 ml-Minisäule mit Silicamembran) gegeben und zentrifugiert. Dabei adsorbiert die Plasmid-DNA an die Membran, Restproteine und niedermolekulare Zellinhaltsstoffe werden bei der Zentrifugation und dem nachfolgenden Waschschrift mit dem Durchlauf abgetrennt. Die auf der Membran verbliebene Plasmid-DNA wird im letzten Schritt mit Elutionspuffer (5mM Tris-HCl pH 8,5) eluiert.

### 2.6.4.2 Plasmidisolierung Midipräparation

Die Minipräparation erfolgte nach Vorschrift und mit Materialien und Lösungen des Qiaprep® Plasmid Midiprep Kits. Das Aufreinigungsprinzip ist weitgehend mit dem des NucleoSpin® Plasmid-Kits von Macherey-Nagel identisch, mit dem Unterschied, daß im Verlauf des Protokolls eine Isopropanolfällung zur weiteren Reinigung der Plasmid-DNA durchgeführt wird. Die erhaltene DNA wurde mittels eines GeneQuant II Photometers auf Reinheit und DNA-Konzentration vermessen.

### 2.6.4.3 Präparation genomischer DNA aus Cyanobakterien

Die Präparation genomischer DNA aus Cyanobakterien wurde mit Hilfe des NucleoBond® AR genomic DNA prep Kits der Firma Macherey-Nagel nach dem Protokoll des Herstellers für genomische DNA aus Bakterien durchgeführt. Als Ausgangskultur diente eine 500 ml Cyanobakterien-Kultur einer  $OD_{750}$  von etwa 0,5. Die erhaltene DNA wurde mit einem GeneQuant II Photometer auf Reinheit und DNA-Konzentration geprüft.

### 2.6.4.4 Ethanolfällung von DNA

Die DNA-Lösung wird mit dem zweifachen Volumen eiskaltem ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) Ethanol abs. und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat versetzt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 rpm in der Eppendorffzentrifuge für 45 min abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Pellet wird mit 500  $\mu\text{l}$  eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wird im gewünschten Volumen Wasser oder TE aufgenommen.

### 2.6.4.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen mittels QiaexII™

In der Methode des QiaexII-Kits (Qiagen) wird das ausgeschnittene (Agarose-) Gel-Stückchen unter Erwärmen in einem Puffer mit hoher Konzentration an chaotropen Salzen gelöst. Unter den Hochsalzbedingungen adsorbiert die DNA an die Partikel des zugefügten Glasmehls. Die Durchführung folgte den Vorgaben des Herstellers, zur Elution wurde TE verwendet.

## 2.6.5 DNA Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde das Sangerverfahren (Didesoxyverfahren) verwendet. Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf enzymatisch katalysierter Synthese von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die nach ihrer Größe getrennt werden können. Ausgehend von einem Primer wird durch die DNA-Polymerase der zum Matrizenstrang komplementäre Gegenstrang synthetisiert. Anders als bei der PCR sind neben den dNTPs auch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehene Didesoxynukleotide (ddNTPs) in geringer Konzentration beigefügt. Baut die Polymerase ein solches Nukleotid in einer Elongationsreaktion in den neuen Strang ein, wird dieser terminiert, da keine weitere Phosphodiesterbindung geknüpft werden kann. Man erhält damit statistisch terminierte Fragmente von je einem Nukleotid unterschiedlicher Länge.

- Reaktionsansatz: ..... 4 µ BD-MIX (s.u.)  
 2,5-4 µl Template-Plasmid (300-600 ng DNA)  
 5 µl Sequenzierungsprimer [2µM]  
 1 µl DMSO  
 ddH<sub>2</sub>O ad 20 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde folgendem PCR Programm unterzogen:

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Phase</i>
1	95°C	30s	Anfangsaufschmelzen
2	95°C	10s	Produkte schmelzen
3	60°C	4min	Primeranlagerung, Polymerisation
4	4°C	halten	Lagerung des Ansatzes

Die Schritte 2 und 3 werden in 30 Zyklen wiederholt.

In dieser Arbeit wurde das ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosciences verwendet. Dies enthält BigDye Terminatoren, dNTPs, AmpliTaq FS-Polymerase, Magnesiumchlorid und Reaktionspuffer in einem vorgefertigten Reaktionsmix (BD-Mix). Das Produkt dieser Sequenzierungsreaktion wurde über AutoSeq™

G-50 Gelfiltrationssäulchen gereinigt, um die überschüssigen dNTPs und Fluoreszenzterminatoren abzutrennen. Das Eluat wurde 45 min mit einer Speedvac eingetrocknet. Die Sequenzierung erfolgte per Gelelektrophorese in einem DNA-Sequenzierer. Die Elektropherogramme wurden mit dem Programm *Staden Package* analysiert.

## **2.7 Proteinchemische Methoden**

### **2.7.1 Proteinaufreinigung**

#### 2.7.1.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Um die Aufreinigung der Proteine nach der Expression zu erleichtern, erhielten sie einen auf dem Vektor kodierten His(6)-tag. Dies ist ein C- oder N-terminaler Abschnitt aus mehreren aufeinanderfolgenden Histidinresten. Der His-tag kann durch Koordination der  $\tau$ -Stickstoffe der Imidazol-Reste des Histidins an Metalloberflächen oder -ionen binden. Dies wird in der *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) ausgenutzt. In dieser Methode werden Metallionen durch an Säulenmaterial fixierte Chelatliganden immobilisiert und können durch freie Koordinationsstellen, die im unbeladenen Zustand von Wassermolekülen besetzt sind, mit Komponenten der chromatographierten Lösung interagieren. Dabei zeigen die mit His-tag markierten Proteine eine besonders hohe Affinität. Eluiert wird mit Imidazol (Kompetition).

Es wurde das Säulenmaterial Nickel-Nitrilotriessigsäure-Superflow (Ni-NTA-Superflow, Qiagen) verwendet. Bei diesem Material werden Nickelionen durch die vierzählige Nitrilotriessigsäure besonders stark an das Säulenharz (Superflow™) gebunden. Die beiden freien Koordinationsstellen des Nickelions interagieren mit dem His-tag. Es wurden zwei Varianten dieses Verfahrens angewendet:

- eine chromatographische Variante mit Nickel-NTA als Säulenmaterial für eine Äkta-FPLC-Chromatographie
- eine Batch-Variante, bei der das Ni-NTA-Material direkt zur zu reinigenden Probe gegeben wird. Waschschrte und Elution erfolgen in einer kleinen Säule oder mittels Zentrifugation in Falcon-Röhrchen.

Regeneration des Säulenmaterials erfolgte nach Vorgaben des Herstellers.

#### 2.7.1.2 Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Methode, um Moleküle nach ihrem apparentem Molekulargewicht zu trennen. Dabei handelt es sich um eine Ausschlußchromatographie, die gelöste Proteine nach ihrer Größe trennt und auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit definierter Porengröße basiert. Die mobile Phase dient lediglich als

Lösungsmittel. Verantwortlich für das Trennverhalten ist das hydrodynamische Volumen der Probenmoleküle: je kleiner die Moleküle sind, desto mehr Volumen steht ihnen zur Verfügung, da sie häufiger in die Poren des Säulenmaterials eindringen können. Die kleinsten Komponenten haben somit die längste Aufenthaltsdauer in den Poren und werden als letzte eluiert.

Es wurden als Säulenmaterialien Superdex 200 sowie Superdex 75 der Firma Pharmacia Biotech verwendet, das in 16/60 bzw. 26/60 HiLoad HPLC-Säulen gepackt vorlag. Die Säulen wurden mit einer Flußrate von 1 ml/min TBS-Puffer gefahren. Zur Kalibrierung wurde ein Proteingemisch von fünf Komponenten verwendet:

<i>Eichprotein</i>	<i>Molekulargewicht</i> [kDa]
Albumin aus Hühnereiklar	45
Albumin aus Rinderserum (BSA)	68
Aldolase	158
Katalase	240
Ferritin	450

Die Eichgerade erhält man, indem man die Logarithmen der Molekulargewichte der Eichproteine gegen den Wert  $K_{av}$  aufträgt.  $K_{av}$  errechnet sich wie folgt:

$$(1) \quad K_{av} = \frac{V_{Ret} - V_0}{V_{tot} - V_0}$$

mit  $V_{Ret}$  = Retentionsvolumen des Peaks,  $V_0$  = Totvolumen der Säule,  $V_{tot}$  = Säulenvolumen total

Damit ergibt sich das Molekulargewicht (MW) durch die lineare Beziehung vom dekadischen Logarithmus des MW zu  $K_{av}$  dann aus:

$$(2) \quad 10^{\frac{K_{av} - A}{B}}$$

mit  $A$  und  $B$  = Werte der linearen Regression der Eichgerade  $y = A + Bx$ .

### 2.7.1.3 Anionenaustauscherchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie beruht auf an einem Harz immobilisierten geladenen Gruppen, die durch elektrostatische Wechselwirkungen entgegengesetzt geladene Analyten aus der zu chromatographierenden Lösung binden. Eluiert wird durch Konkurrenz mit einem Salzgradienten.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich das Säulenmaterial MonoQ™ sowie DEAE-Sephrose der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Dabei handelt es sich um Anionenaustauscher, bei denen entweder Trimethylaminomethylgruppen (MonoQ™, starker Anionenaustauscher) an Monobeads™, einem hydrophilen Harz mit Körnchengröße von 10 µm immobilisiert

sind, oder um an Fast-Flow-Sepharose™ gekoppelte Diethylaminoethan-Gruppen (DEAE-Sepharose, schwacher Anionentauscher).

#### 2.7.1.4 Affinitätschromatographie mit Anti-FLAG Sepharose

Zur Reinigung der Proteine, die mit dem FLAG-Peptid fusioniert wurden, wurde eine Anti-FLAG M2 Affinitätssäule verwendet. Das Säulenmaterial besteht aus Agarose, an die Anti-FLAG Antikörper gekoppelt wurden.

Verwendet wurde eine 1 ml-Säule mit Schlauchpumpe, UV-Detektor mit Schreiber und Fraktionssammler. Alle Schritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Säule wird mit Bindepuffer (s.u.) voräquilibriert. Dann wird die Probe, die das gewünschte FLAG-markierte Protein enthält, aufgetragen und anschließend mit Bindepuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm nahe Null ist. Die Elution erfolgt durch einen Puffer mit niedrigem pH-Wert. Diese Verringerung des pH-Werts führt zu einer Konformationsänderung der Antikörper, was zu einer Freisetzung der FLAG-markierten Proteine führt. Alternativ kann mit TBS Puffer, der 100 µg/ml FLAG Peptid enthält, kompetitiv eluiert werden. Nach der Elution wird die Säule wieder mit Bindepuffer re-äquilibriert und bei 4°C gelagert.

- Bindepuffer: ..... 20 mM HEPES pH 7,4  
150 mM NaCl
- Elutionspuffer 1: ..... 100 mM Glycin/HCl pH 3,5
- Elutionspuffer 2: ..... TBS mit 100 µg/ml FLAG-Peptid (DYKDDDDK)

#### 2.7.1.5 Generierung spezifischer Affinitätschromatographiesäulen (NHS)

N-Hydroxy-succinimidyl (NHS) aktivierte Sepharose™ sowie vorgefertigte 1 ml Säulen wurden von Pharmacia bezogen. Bei diesen Säulen ist der NHS-Ester mittels Epichlorhydrin über einen 6-Aminohexansäure Spacer an Sepharose gekoppelt. Diese Veresterung hinterläßt einen reaktiven NHS-Ester, der mit primären Aminen eine stabile Amidbindung eingeht. Der aktivierte Ester ist in Abwesenheit von Wasser stabil. Der Beladungsgrad mit aktivierten Gruppen liegt bei etwa 10 µmol/ml Säulenvolumen.

Zur Koppelung von RcpA und RcpB wurde exakt nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Zu beachten ist, daß die Proteine in diesem Fall selbstverständlich *nicht* in Tris-Puffern, sondern in HBS präpariert wurden. Zur Koppelung von möglichen Interaktionspartnern an die Response-Regulator-Säulen wurden verschiedene Cytosolpräparationen aus Cyanobakterien mit reduzierter Ionenstärke mehrfach über die Säulen gepumpt. Die Elution erfolgte anschließend mit einem Salzgradienten (50 mM bis 1M NaCl). Eine abschließende Elution mit Harnstoff wurde nicht durchgeführt.

## 2.7.2 Änderung von Proteinkonzentration und/oder Pufferbedingungen

### 2.7.2.1 PD-10 Entsalzungssäulen

Die PD-10 Entsalzungssäulchen der Firma Pharmacia Biotech enthalten 8,3 ml Sephadex G-25 und ermöglichen einen schnellen Puffertausch, bzw. ein schnelles Entsalzen der Proteinprobe nach Ni-NTA-Aufreinigung oder Anionenaustauscherchromatographie. Die Ausschlußgröße dieses Materials beträgt 5 kDa für globuläre Proteine. Die Säule wird mit 25 ml des gewünschten Endpuffers voräquilibriert, dann wird die Proteinprobe in 2 ml Volumen aufgetragen. Nachdem das Auftragsvolumen in das Gelbett eingesunken ist, wird mit 3 ml Puffer eluiert.

### 2.7.2.2 Dialyse

Zur Dialyse wurden entweder Dialyserahmen der Firma Pierce (Slide-A-Lyzer<sup>®</sup>, 10 kDa Ausschlußgröße) oder Dialyseschlauch von Sigma (D-0655, Cellulosemembran, 12 kDa Ausschlußgröße) verwendet. Die Dialyse erfolgte stets bei 4°C im Kühlraum. Die Puffer sowie die Volumina und Inkubationszeiten wurden den Anforderungen der jeweiligen Probe angepaßt.

### 2.7.2.3 Centricon<sup>®</sup>/Centriprep-Konzentratoren

Die Centriprep-Einengung beruht auf einer Ultrafiltrationsmembran, durch die Lösungsmittel und gelöste Stoffe unterhalb der Ausschlußgrenze hindurchfiltriert werden. Unter dem Druck der Zentrifugation haben die Lösungsmittelspiegel der verwendeten Centricon<sup>®</sup>-Ultrafiltrationseinheiten (Millipore, Bedford, USA) die verstärkte Tendenz, sich zu äquilibrieren, was die Triebkraft der Ultrafiltration ausmacht. Um eine stärkere Einengung zu erreichen, wird der durchfiltrierte Anteil in der inneren Kammer entfernt und der Zentrifugationsvorgang mehrfach wiederholt. Es fanden je nach Protein die Einheiten YM-10, YM-30 oder YM-50 (mit Ausschlußgrößen von 10, 30 oder 50 kDa) Verwendung.

## 2.7.3 Thrombinverdau

Die mit Thrombinschnittstellen ausgestatteten Konstrukte wurde z.T. nach der Aufreinigung der His(6)-tags abverdaut. Die Proben wurden in Thrombin-Puffer umgepuffert und mit 0,5 U Thrombin pro mg Protein versetzt. Der Verdau erfolgte entweder bei 16-18°C über Nacht oder über das Wochenende bei 4°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (ad 0,1 mM) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (ad 2 mM) gestoppt.

- Thrombin-Puffer:..... 20 mM Tris/HCl pH 8,0  
150 mM NaCl  
2,5 mM CaCl<sub>2</sub>

### 2.7.4 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Ziel einer Co-IP ist es, spezifische Bindungspartner/Interaktionspartner eines Proteins in der Zelle zu ermitteln. Im Gegensatz zur klassischen Co-IP mit polyklonalen Antikörpern und Protein-A Sepharose wurde in dieser Arbeit versucht, die mit FLAG Epitopen ausgestatteten Proteine RcpA und RcpB (RcpX) mittels FLAG-Sepharose (siehe Kap. 2.7.1.4) bzw. die mit His(6)-tag versehenen Varianten über Ni-NTA Agarose zu präzipitieren. Hierzu wurden aufgereinigtes RcpX erneut an das entsprechende Säulenmaterial gebunden und in Cytosolpräparationen (mit Proteaseinhibitoren) von *Calothrix* gegeben. Als Negativkontrollen dienten jeweils Ansätze mit Zugaben des jeweiligen Säulenmaterials ohne Protein. Die Proben wurden in einem Über-Kopf-Rotator bei 4°C für 2 h inkubiert. Das Säulenmaterial wurde durch Zentrifugation pelletiert, kurz gewaschen, und anschließend wurde mit dem entsprechenden Elutionspuffer (Elutionspuffer1 bei FLAG-Sepharose, Kap. 2.7.1.4; TBS 150 mM Imidazol bei Ni-NTA-Agarose) eluiert. Das Eluat wurde auf Schägger-Gelen analysiert.

### 2.7.5 Herstellung polyklonaler Anti-RcpA Hasen-Antikörper

RcpA wurde wie beschrieben aufgereinigt. Für die erste Injektion (Grundimmunisierung) wurden etwa 200 µg des gereinigten Proteins mit 750 µl Freund's Adjuvans Complete durch intensives Vortexen vermischt. Injiziert wurden zweimal je 400 µl subkutan mit einer 0,9 mm Kanüle. Um den Antikörpertiter zu erhöhen, erfolgte nach 4 Wochen eine zweite Injektion von 200 µg Protein in 750 µl Freund's Adjuvans Incomplete. 10 Tage nach der zweiten Injektion wurde aus der Seitenvene des Ohrs 5 ml Blut abgenommen, stocken gelassen und vom Meniskus etwa 20 µl Serum abgenommen. Mit diesem Serum wurde ein Testblot durchgeführt. In dieser Arbeit wurde daraufhin weitere Male 200 µg Protein injiziert, bis der Antikörpertiter ausreichend war. Der crcp1-Hase (getauft am 23.10.99) wurde am 1.2.00 ausgeblutet (RIP) und das Serum durch Zentrifugation bei 500g für 20 min bei 4°C nach Stocken abdekantiert.

#### 2.7.5.1 Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern

Eine weitere Aufreinigung des Serums erfolgte über an NHS-Säulen immobilisiertes RcpA. Hierzu wurde das 1:1 mit TBS verdünnte Serum fünfmal über die Säule gegeben und anschließend mit fünf Säulenvolumen TBS und 10 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in zwei Schritten. Die erste Elution erfolgte mit niedrigem pH-Wert (Elutionspuffer A) als 1 ml Fraktionen in Röhrchen, die mit 100 µl Tris/HCl pH 8,5 [2M] enthielten. Nach pH-Re-Äquilibrierung mit TBS erfolgte die zweite Elution mit Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer (Elutionspuffer B). Die Eluate wurden gegen TBS dialysiert, mit 0,1% NaN<sub>3</sub> versetzt und bei -80°C gelagert.

- Waschpuffer:..... 20 mM Tris/HCl pH 7,4  
500 mM NaCl  
0,2% Triton X-100
- Elutionspuffer A:..... 200 mM Glycine/HCl pH 2,0  
150 mM NaCl
- Elutionspuffer B:..... TBS mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid

Die verschiedenen Eluate können unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Spezifität und Hintergrund aufweisen, daher dürfen sie nicht vereinigt werden.

### 2.7.6 Phosphotransfer von CphB auf RcpB

Autophosphorylierung von CphB und Phosphotransfer fanden in Phospho-Transfer-Puffer unter Belichtung mit Interferenzfiltern ( $658 \pm 10$  nm zur Generierung der  $P_{fr}$ -Form bzw.  $720 \text{ nm} \pm 12$  nm zur Generierung der  $P_r$ -Form) statt. Einzelreaktionen enthielten 3  $\mu\text{g}$  CphB und 0,75  $\mu\text{g}$  RcpB in einem Endvolumen von 15  $\mu\text{l}$ . Die Autophosphorylierungen wurden durch die Zugabe von ( $\gamma^{32}\text{P}$ )-ATP gestartet und durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer und Erhitzen ( $55^\circ\text{C}$ , 5 min) beendet. Die phosphorylierten Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf PVDF Membranen übertragen. Alle Arbeiten erfolgten bei Raumtemperatur. Die Signale der getrockneten Membranen wurden mit Hyperfilm MP (Pharmacia Biotech) aufgenommen.  $^{32}\text{P}$ -markierte Produkte wurden mit einem Phosphoimager (GS-525 von BioRad) quantifiziert.

- Phospho-Transfer-Puffer :..... 50 mM Tris/HCl pH 7,8  
50 mM KCl  
1 mM DTT  
0,5 mM  $\text{MgCl}_2$   
10  $\mu\text{M}$  ATP  
0,2  $\mu\text{M}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (110 TBq/mmol)

### 2.7.7 Phosphorylierung von RcpA und RcpB mit Acetylphosphat

RcpA oder RcpB wurden in Phosphorylierungspuffer mit 1,25 fachem molarem Überschuss an Acetyl[ $^{32}\text{P}$ ]phosphat (2,96 TBq/mmol, Hartmann Analytik, Braunschweig) versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiges Acetylphosphat wurde über G-50 MicroSpin Säulchen (siehe DNA-Sequenzierung) abgetrennt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Proben erfolgte über eine Proteinbestimmung und Quantifizierung der Radioaktivität mittels Szintillationsgerät (Packard Tri-Carb 2100TR).

## **2.8 Proteinanalytische Methoden**

### **2.8.1 Proteinbestimmungen**

a) BCA-Methode: Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) beruht wie der Lowry-Assay auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  und der Bildung eines Farbkomplexes mit den  $\text{Cu}^+$ -Ionen. Die Reduktion kann durch Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und die Peptidbindung erfolgen; die Komplexbildung beteiligt zwei Moleküle BCA und erzeugt einen Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist.

Es wurde das BCA-Kit von Pierce (Rockford, USA) nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Nach Mischen der Reagenzlösung mit der Probe wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Kalibrieren der Methode wurde mit unterschiedlichen BSA-Konzentrationen eine Eichgerade aufgenommen. Durch Einsetzen der Probenwerte in die Geradengleichung der Regressionsgeraden erhält man die gesuchte Proteinkonzentration der Probe.

b) Spektroskopische Methode: Bei Proben, die mit DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt waren, wurde entweder eine UV-spektroskopische Proteinbestimmung nach Warburg und Christian durchgeführt oder, bei ausreichend sauberen (d.h. nukleinsäure-freien) Proben, direkt auf den theoretischen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm zurückgegriffen. Die klassische Proteinabsorption liegt bei 280 nm und wird durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (hauptsächlich) und Tyrosin hervorgerufen. Da allerdings die Nukleinbasen ebenfalls bei dieser Wellenlänge absorbieren, muss ein Korrekturfaktor eingeführt werden. Als Maß für die Verunreinigung mit Nukleinsäuren wird die Absorption bei 260 nm verwendet. Zur Errechnung der effektiven Proteinkonzentration (bis zu einer Verunreinigung mit Nukleinsäuren von ca. 20%) wird nach Christian und Warburg folgende Formel benutzt:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = 1,55 \cdot A_{280} - 0,76 \cdot A_{260}$$

Diese Methode eignet sich bei Proteinkonzentrationen von 20 bis 3000  $\mu\text{g/ml}$  und ist – im Gegensatz zur  $A_{205}$ -Methode – weniger störanfällig gegenüber Nichtproteinsubstanzen.

### **2.8.2 Acrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Standardanalyse von Proteinen diente die Polyacrylamidelektrophorese nach Schägger und von Jagow<sup>129</sup>. Hierbei wurden diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele (11,3% Acrylamid im Trenngel; 3,8% im Sammelgel) verwendet. Oft besteht bei kleinen Proteinen das Problem, daß sie im Sammelgel nicht vom freien SDS getrennt werden können. Die hohe Auflösung der Schägger-Gele im Molekulargewichtsbereich auch unter 10 kDa beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten der Folge-Ionen Glycin in der klassischen Disk-Elektrophorese nach Lämmli<sup>130</sup> und dem in diesem Fall benutzten Tricin. Tricin hat einen um 1,4 Punkte niedrigeren  $\text{pK}_s$

(8,15) und eine höhere elektrophoretische Mobilität. Es läuft daher schneller als große Proteine, die dadurch keinen so starken Stapelungs-Effekt erfahren, maximiert jedoch das Spannungsgefälle zwischen SDS-Front und kleinen bis mittelgroßen Proteinen, so daß hier ein deutlich erhöhter Stapelungs-Effekt auftritt. Da die Trennung im oberen Molekulargewichtsbereich aufgrund der logarithmischen Mobilitätsskala meist weniger Probleme aufwirft, wird eine bessere Gesamtauftrennung in einem größeren Bereich erreicht. Durch das bevorzugt zwitterionische Tricin kann der pH-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel im Vergleich zur klassischen Methode relativ klein gehalten werden, was sich ebenfalls positiv auf die Trennleistung auswirkt.

- Gel Puffer: ..... 3M Tris/HCl pH 8,4  
0,3% SDS
- Anoden Puffer: ..... 0,2 M Tris/HCl pH 8,9
- Kathoden Puffer: ..... 0,1 M Tris/HCl pH 8,25  
0,1% SDS  
0,1 M Tricine
- Auftragspuffer: ..... 0,15 M Tris/HCl pH 6,8  
3,5% SDS  
50% Glyzerin  
10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,1% Bromphenolblau

<i>Mengen für 11 Gele im 10er Block</i>	<i>Sammelgel</i>	<i>Trenngel</i>
30% Acrylamid mit 0,8% BIS	2,5 ml	17,6 ml
Gel Puffer	4,8 ml	15,2 ml
Glyzerin (87%)	--	4,5 ml
H <sub>2</sub> O	12,5 ml	9,5 ml
10% APS (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	133 $\mu$ l	312 $\mu$
TEMED	31,2 $\mu$ l	62,4 $\mu$ l

Vor dem Auftrag werden die Proben mit 5x Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese von Hoefer-Minigelen dauert ca. 90 min bei 110V (konst.). Anschließend erfolgte eine Coomassie-Färbung bzw. ein Westernblot.



Kathodenpuffer, Gel, Blotmembran, eine Lage Whatman mit Anodenpuffer I und zwei Lagen Whatmanpapier mit Anodenpuffer II. Dieser Stapel wurde auf die Anodenseite der Blotapparatur gelegt. Anschließend wurde mit 80 mA pro Minigel für 1.5 h geblottet.

- Anodenpuffer I: ..... 300 mM Tris/HCl pH 10,4  
10 % Methanol
- Anodenpuffer II: ..... 25 mM Tris/HCl pH 10,4  
10 % Methanol
- Kathodenpuffer: ..... 25 mM Tris/HCl pH 9,4  
40 mM Glycin  
10 % Methanol
- Towbin Puffer: ..... Protein-Transfer-Puffer für Tankblot  
Tris/HCl pH 8,3 ..... 25 mM  
Glycin ..... 192 mM  
SDS ..... 0,1% (w/v)  
Methanol ..... 20% (v/v)

Nach der Immundetektion wurde die Membran in Coomassie-Lösung (s. Färben von SDS-Gelen) eingelegt und mit 80% MeOH, 20% Eisessig entfärbt.

### 2.8.3.1 Immundetektion

Nach dem Westernblot wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran für 1 h in Blockingpuffer (PBS mit 10% (v/v) Blocking-Solution von Roche) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wird die Membran mit dem ersten Antikörper für 1 h (wahlweise 4°C über Nacht) in Blockingpuffer inkubiert (Verdünnung 1:1000 oder höher). Nach erneutem dreimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-Konjugat, 1:2000 bis 1:5000 in Blockingpuffer) für eine Stunde. Nach Waschen der Membran mit PBST erfolgte ein letzter Waschschrift mit PBS, um störendes Tween zu entfernen. Die Detektion erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Detektions-Kit von Boehringer entsprechend den Angaben des Herstellers. Es wurden Kodak Xomat AR Filme verwendet.

### 2.8.3.2 Westernblot „Stripping“

Bestand die Möglichkeit und die Notwendigkeit, einen Blot mittels zweier verschiedener erster Antikörper zu untersuchen, wurde die Membran mit Stripping-Puffer für 30 min bei 50°C unter mildem Schwenken inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen. Die zweite Detektion erfolgte nach dem Protokoll für Immundetektion.

- Stripping-Puffer: ..... 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7  
100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
2% (w/v) SDS

### 2.8.4 Proteinsequenzierung

Die N-terminale Proteinsequenzierung wurde hausintern in der Arbeitsgruppe Proteinanalytik von Prof. Lottspeich nach der Edman-Methode durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurden die zu sequenzierenden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran überführt (s. Westernblot). Nach Anfärben der Bande wurde dieselbe ausgeschnitten und für die Sequenzierung eingesetzt.

### 2.8.5 MS, MALDI, HPLC

Die Identifikation von Proteinen über ihre Masse mittels MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) und die Untersuchungen mittels HPLC wurden hausintern in der Gruppe von Dr. Frank Siedler durchgeführt. Dafür wurde die entsprechende Proteinbande aus dem Coomassie-gefärbten Schägger-Gel ausgeschnitten, eluiert und mit Trypsin verdaut. Die Cysteine wurden durch Behandlung mit Iodacetamid in Carboxyamidomethyl-Cystein und die Methionine in ihre Methioninsulfoxid-Form umgewandelt. Die spezifische Massenverteilung des verdauten Proteins erlaubte seine Identifizierung.

Probenvorbereitung: Die Bande wurde aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und dreimal alternierend in 50 % Acetonitril-Lösung (ACN) und einer 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung (ABC) entfärbt. Anschließend erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 56°C mit ABC, 10 mM DTT, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation mit ABC, 55mM Iodacetamid. Abschließend wurde wie eingangs gewaschen. Der Trypsinverdau erfolgte über Nacht bei 37°C in TBS, 1 mM CaCl<sub>2</sub> (1:40 Protease:Protein (w/w)). Die weitere Verarbeitung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Frank Siedler.

## 2.9 Spektroskopie

### 2.9.1 Stationäre UV-Vis Spektroskopie

Die Spektren werden im UV-Vis-Bereich mit einem Shimadzu UV2401 PC-Zweistrahlfotometer aufgenommen. Als Referenz diente eine Probe ohne zugegebenen Chromophor oder der Puffer, in dem die Proteinprobe gelöst war. Vor den Messungen wurde eine Basislinie mit identischem Küvetteninhalt erstellt. Die zu messende Apophytochrom-Proben wurden mit Chromophorlösung (PCB oder BV in DMSO) versetzt und mit Rotlicht bzw. Dunkelrotlicht bis zur vollständigen (möglichen) Photokonversion bestrahlt. Die Differenz vom Spektrum der dunkelrot- und der rotbelichteten Probe ergibt das Differenzspektrum der Probe.

### 2.9.1.1 Verwendete Filter

Im blauen Spektralbereich: Interferenzfilter 374, 405 und 438 nm  
Im roten Spektralbereich: Interferenzfilter 636, 680 und 693 nm  
Im dunkelroten Spektralbereich: Interferenzfilter 730, 788 und 792 nm sowie Kantenfilter RG9

Die Spaltbreiten der Interferenzfilter bewegen sich zwischen 8 und 14 nm. Als Lichtquellen wurden Diaprojektoren von Noristar mit 150 W Halogenlampen eingesetzt.

### 2.9.1.2 Extinktionskoeffizienten der Chromophore

Biliverdin (BV):  $\epsilon_{674} = 13000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Phycocyanobilin (PCB):  $\epsilon_{600} = 16000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (lt. <sup>56</sup>)

BV wurde von Fluka in der Reinheit 90% bezogen, PCB wurde dankenswerterweise von Helene Steffen und Tanja Berndsen (beide MPI für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr) aus *Spirulina platensis* isoliert und aufgereinigt bereitgestellt.

## 2.9.2 Messungen zur $P_{fr}$ -Stabilität

Für die Messung der  $P_{fr}$ -Stabilität wurde zu Beginn und am Ende des Versuchs zur Kontrolle der Proteinintegrität je ein Differenzspektrum aufgenommen. Die Phytochromproben wurden mit dem entsprechenden Rotlicht bis zur maximal möglichen Photokonversion bestrahlt und im Dunklen bei 10°C aufbewahrt. Um die spektralen Änderungen der Proben zu beobachten, wurden in regelmäßigen Zeitintervallen Spektren von 500-800 nm gemessen.

## 2.9.3 Aufnahme von Assemblierungskinetiken

Um den Einbau von Chromophoren (BV, PCB) in ein Phytochrom zu messen, wurden nach Zugabe des Chromophors (gelöst in DMSO) zur Apophytochromlösung in TBS nach sofortigem Mischen durch Auf- und Abpipettieren, Spektren der Probe von 500 nm bis 800 nm aufgenommen. (Photometereinstellungen: Spaltbreite: 2 nm, Scangeschwindigkeit: schnell). Als Referenz dient TBS-Puffer. Die Zeitmessung startete mit der Zugabe von Chromophor, das erste Spektrum wurde so nach ca. 10 Sekunden, weitere Spektren im Abstand von 30 Sekunden aufgenommen. Zur Auswertung dienten die jeweiligen Absorptionswerte der Proteine an ihrem  $\lambda_{\max}$ .

## 2.9.4 Lifetime associated difference absorbance spectroscopy (LADS)

Diese Methode gibt Aufschluß über die Anzahl und die Kinetik von Intermediaten der Photokonversion sowie deren Zerfallskonstanten. Zusätzlich können die spektralen Eigenschaften

dieser Intermediate ermittelt werden, sofern die Probe es erlaubt, die Konversion mit einer ausreichenden Anzahl an Meß-Wellenlängen zu verfolgen.

Die P<sub>r</sub>-P<sub>fr</sub>-Photokonversion wurde analog zu Schmidt *et al.*<sup>86</sup> und Ruddat *et al.*<sup>88</sup> bei 10°C zeitaufgelöst bei zehn verschiedenen Wellenlängen gemessen und die so erhaltenen zusammengesetzten Konversionskinetiken der verschiedenen Wellenlängen wurden mittels einer Global-Fit Analyse<sup>131, 132</sup> evaluiert, die auf einer „singular value decomposition“ (SVD) Matrix beruht. Die Messungen und die Datenauswertung wurden von Leja Jorissen am MPI für Strahlenchemie (Mülheim an der Ruhr) durchgeführt.

## **2.10 Datenverarbeitung**

### **2.10.1 Auf DNA-Ebene:**

#### 2.10.1.1 Auswertung von Sequenzdaten

Zur Auswertung der Sequenzierdaten wurde das Staden-Package<sup>133</sup> verwendet, das von folgender URL für wissenschaftliche Zwecke kostenfrei gegen Registrierung heruntergeladen werden kann: [http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/staden\\_home.html](http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/pubseq/staden_home.html). Diese Software ermöglicht es, große Mengen an Sequenzdaten auf einmal zu analysieren. Die Qualität der Elektropherogramme wird dabei automatisch evaluiert.

#### 2.10.1.2 Oligonukleotid Analyse

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden auf der Homepage des *Oligonucleotide Properties Calculator* auf Haarnadelschleifenbildung und Selbstpaarungsverhalten analysiert: <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>

#### 2.10.1.3 Generierung von Vektorkarten

Die Sequenzdatenverarbeitung von Vektorkarten sowie die Planung von Klonierungen erfolgte mit dem kommerziellen Programm CloneManager.

### **2.10.2 Phylogenie**

#### 2.10.2.1 Alignments

Für die Sequenzalignments von Aminosäuresequenzen wurde das Programm ClustalW in der Programmversion 1.8<sup>137</sup> in den Standardeinstellungen verwendet.

Eine aktualisierte Programmversion (ClustalX 1.8.1) kann über die folgende URL heruntergeladen werden: <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>

### 2.10.2.2 Phylogenetische Bäume

Zur Erstellung phylogenetischer Bäume wurde ebenfalls das Programm ClustalW verwendet. In diesem Fall wurde die Bootstrapping-Methode angewandt, bei der aus einem bereits bestehenden Alignment eine bestimmte Anzahl an Bäumen erstellt wird (in diesem Fall 1000) aus denen dann ein Konsensusbaum errechnet werden kann. Der Baum wurde anschließend mit dem Programm NjPlot <sup>134</sup> (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) visualisiert und mit einem Vektorgrafikprogramm (CorelDraw) nachbearbeitet.

## **2.10.3 Strukturvorhersagen**

### 2.10.3.1 Sekundärstrukturvorhersage

Die Sekundärstrukturvorhersagen wurden auf dem PsiPred-Server <sup>143</sup> durchgeführt. Der dort (<http://insulin.brunel.ac.uk/psipred.html>) verwendete Algorithmus beruht unter anderem auf der Anwendung von neuronalen Netzen und ist eine aktuelle Möglichkeit, von der Primärstruktur auf die Sekundärstruktur eines Proteins zu schließen <sup>135</sup>.

### 2.10.3.2 3D Modellierung

Die 3D-Modellierung erfolgte mit dem Programm SwissPDB-Viewer <sup>136</sup> unter freundlicher Mithilfe von Steffi Offermann. Das Programm kann kostenfrei auf der Homepage der Entwickler (<http://www.expasy.ch/spdbv/index.html>) heruntergeladen werden.

### 2.10.3.3 Vorhersage anderer Proteineigenschaften

Die weiteren Proteineigenschaften wie theoretischer IP, Masse, Massen der Peptide eines tryptischen Verdaus sowie die Extinktionskoeffizienten bei 274 bis 284 nm wurden auf dem *ExpASy Molecular Biology Server* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) durchgeführt.

## **2.10.4 Auswertungssoftware**

Zur Auswertung wurden folgende Programme benutzt: Origin 6.1 SP2, OpenOffice 1.0.1 (<http://www.openoffice.org>), CorelDraw 9, Micrografx Designer 7, Ulead Photoimpact 5, Endnote 4.

## **3. Ergebnisse und Diskussion**

*Man soll auf alles achten, denn man kann alles deuten. (H. Hesse)*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Bacteriophytochrome, CphA und CphB, aus *Calothrix* PCC7601 untersucht. Neben heterologer Expression zur Mutantanalyse wurden beide auch homolog exprimiert, um ihre nativen Chromophore zu identifizieren. Über eine biochemische Charakterisierung der Bilinlyaseaktivität der beiden Proteine sollten die unterschiedlichen Bindungsverhältnisse der Chromophore in diesen beiden Proteinen analysiert werden. Im Falle von CphB wurde auch der Phosphotransfer auf den zugehörigen Response Regulator, RcpB durchgeführt.

### **3.1 Phylogenie**

#### **3.1.1 Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter Phytochrome**

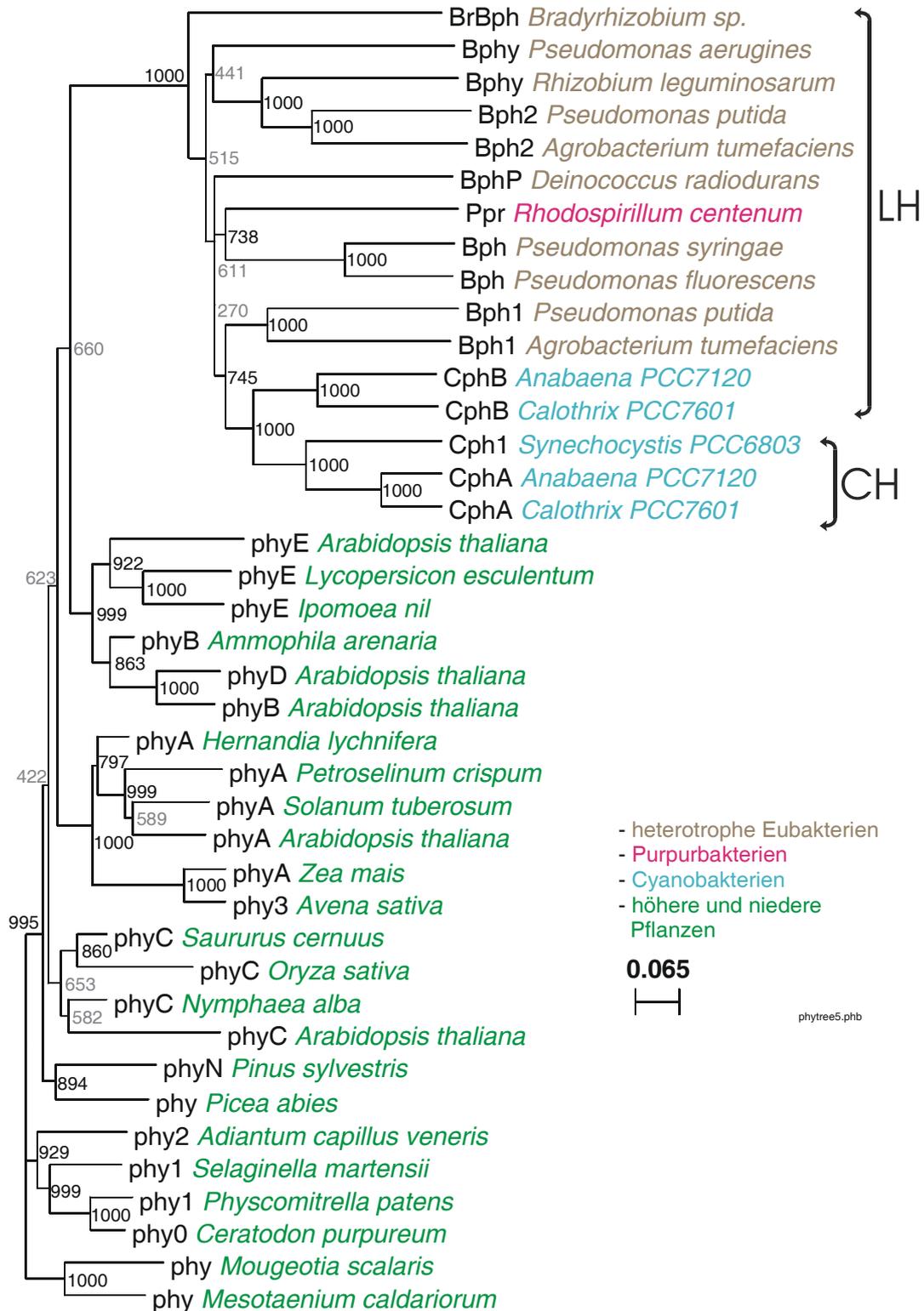
Zur phylogenetischen Einordnung der beiden Bacteriophytochrome CphA und CphB aus *Calothrix* PCC7601, insbesondere der Klassifizierung von CphB in Bezug zu Phytochromen aus nichtphotosynthetischen Mikroorganismen, wurde eine größere Auswahl an eukaryotischen Phytochromen zusammen mit den bisher veröffentlichten prokaryotischen Phytochromen (= Bacteriophytochrome) analysiert.

Die zum Alignment verwendeten Sequenzen finden sich im Anhang (Kap 5.2). Die Einstellungen und Parameter der verwendeten Programme sind im Methodenteil Kap. 2.10.2 beschrieben. Aus dem Alignment wurde mittels der Bootstrap-Methode von ClustalW<sup>137</sup> der in Abbildung 3.1.1 dargestellte Baum errechnet. Dabei generiert das Programm aus dem Alignment zunächst eine bestimmte Anzahl von phylogenetischen Bäumen (in diesem Fall 1000) und errechnet aus diesen dann einen Konsensus-Baum. Wichtig sind die Zahlenwerte an den Bifurkationen (Teilungen). 1000 bedeutet, daß jeder Baum die Teilung der Daten an dieser Stelle enthält, und ist damit Hinweis für eine zuverlässige Teilung. Bifurkationen, bei denen die Werte unter ca. 40% (hier 400) gehen, sind unbrauchbar, dort sollte man die Teilung herausnehmen, der Baum wird an diesen Stellen dann "kammartig".

Im dem Baum in Abb. 3.1.1 zugrunde liegenden Alignment wurden die Vollängensequenzen der jeweiligen Phytochrome verglichen, was oberflächlich betrachtet zu einer augenfälligen Trennung der pflanzlichen von den bakteriellen Phytochromen führt. Diese Trennung rührt daher, daß die pflanzlichen Phytochrome im C-terminalen Bereich sowohl Homologien zu Serin/Threonin-Kinasen, als auch (in geringerem Maße) zu Histidin-Kinasen aufweisen<sup>51, 54</sup>, eine Tatsache, die auf ein Duplikationsereignis im Verlauf der Evolution zurückgeführt wird<sup>53, 138</sup>. Bei genauerer Betrachtung wird jedoch nach der ersten Bifurkation hinter der Dreiteilung, die den Ursprung des Baums bildet, durch die niedrigeren Bootstrapwerte (422,

623, 660) eine Kammstruktur angedeutet, was bedeutet, daß lediglich die Algen-, Moos-, und Gymnospermen-Phytochrome (Bootstrapwert 995) von den restlichen Phytochromen phylogenetisch eindeutig getrennt sind. Die Phytochrome der Angiospermen und die der Eubakterien lassen demnach einen gemeinsamen Vorfahren vermuten. Die pflanzlichen Phytochrome sind einerseits gut in die verschiedenen Genera gegliedert, so finden sich z.B. Farne und Moose (*Selaginella*, *Adiantum*) in einer Gruppe, die Algen (*Mesotaenium*, *Mougeotia*) und Gymnospermen (*Pinus*, *Picea*) in zwei weiteren Gruppen, andererseits teilen sie sich jedoch auch in die verschiedenen Phytochrom-Gruppen (phyA, B, C, D und E) auf (z.B. *Arabidopsis* phy A-E).

Bei den Bacteriophytochromen befinden sich die cyanobakteriellen Vertreter in einer Gruppe, wohingegen die restlichen eubakteriellen Phytochrome, auch aufgrund der zahlreichen *Pseudomonas*-Sequenzen, die dem Alignment an dieser Stelle eine „artspezifische“ Gewichtung geben, eher in einer kammartigen Struktur gegliedert sind. Man könnte daher einen gemeinsamen Vorfahren von cyanobakteriellen und eubakteriellen Phytochromen vermuten. Interessanterweise findet man keine deutliche Abgrenzung zwischen Bacteriophytochromen, die ein Cystein als Chromophorbindestelle tragen, und solchen, denen dieses Cystein fehlt und in denen das benachbarte Histidin als wahrscheinliche Chromophorbindestelle diskutiert wird. Diese Tatsache deutet auf ein eher junges Mutationsereignis hin. Die hier mit den Vollängensequenzen erhaltenen Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen, die zuvor mit einem Vergleich von Teilsequenzen (der Chromophorbinderegion) verschiedener Pflanzen- und Bakterienphytochrome erhalten wurden<sup>22</sup>. Nicht abgebildet sind in diesem Zusammenhang die Proteine RcaE<sup>23, 24</sup> (ein bei der komplementären chromatischen Adaptation (CCA) involvierter Photorezeptor) und CikA<sup>25</sup> (ein für das Stellen der circadianen Uhr verantwortlicher Rezeptor). Beide Proteine zeigen nur schwache Homologien zu Phytochromen bzw. Bacteriophytochromen und wurden in den hier vorgenommenen phylogenetischen Untersuchungen stets ausgruppiert. Auch wurde bei diesen beiden Proteinen noch keine Einlagerung von linearen Tetrapyrrolen nachgewiesen, was zwar ihre Fähigkeit, grundsätzlich als Photorezeptorsystem zu wirken, nicht in Frage stellt, ihre Einordnung in die Klasse der Phytochrome jedoch fraglich erscheinen lässt.



**Abbildung 3.1.1** Phylogenetischer Baum

Phylogenetischer Stammbaum ausgewählter eukaryotischer Phytochrome, sowie einiger als Vollängensequenzen bekannten Bacteriophytochrome. Die phylogenetische Distanz ist mit dem Balken gegeben (= Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Position), die Zahlenwerte an den Teilungen sind die Bootstrapwerte. Zahlenwerte in *grau* bedeuten, daß an dieser Stelle besser eine Kammstruktur angenommen werden sollte. LH = Bacteriophytochrome mit Histidin als wahrscheinliche Chromophorbindestelle, CH = Bacteriophytochrome mit Cystein als wahrscheinliche Chromophorbindestelle.

### 3.1.2 Alignment ausgewählter Bacteriophytochrome

Seit der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* PCC6803 im Jahr 1997<sup>46, 48</sup> wurden in vielen Cyanobakterien, sowie auch in anderen, nicht photoautotrophen Eubakterien, Phytochromhomologe gefunden<sup>22, 49, 83</sup>. In Abbildung 3.1.2 ist die hohe Sequenzhomologie im Bereich der Chromophorbindedomäne dokumentiert. Fast alle identischen Aminosäuren dieses Alignments finden sich auch in den Sequenzen der pflanzlichen Phytochrome.

Der hohe Grad an Sequenzhomologie der verschiedenen Bacteriophytochrome ist unabhängig davon, ob sie ein Cystein als Chromophorbindestelle besitzen oder nicht (mit der in Abb. 3.3.3 gezeigten Ausnahme). Das markierte Histidin wird als alternative Chromophorbindestelle diskutiert<sup>20, 49</sup> und ist auch in Pflanzenphytochromen und Bacteriophytochromen, die das Cystein aufweisen, für den autokatalytischen Einbau linearer Tetrapyrrole als essentiell nachgewiesen worden<sup>84, 175, 176</sup>. In den bisherigen Untersuchungen von Hafer- und Erbsenphytochromen (<sup>175, 176, 84</sup>) wurden lediglich Aminosäuresubstitutionen in der unmittelbaren Umgebung (auf der Ebene der Primärsequenz) des Cysteins untersucht. Dieses Vorgehen läßt jedoch den Aspekt außer acht, daß in der Primärsequenz weit entfernte Aminosäuren durch die Faltung des Proteins in unmittelbare Nähe des Chromophors gelangen und Auswirkungen auf die spektralen Eigenschaften und die Fähigkeit des autokatalytischen Einbaus des Chromophors haben können, wie von Wu *et al.*<sup>139</sup> gezeigt. Ebenso können Aminosäuren, die in der Primärsequenz (unmittelbar) benachbart sind, durch die Ausbildung von gängigen Sekundärstrukturelementen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt) zu weit entfernt sein, um mit dem Chromophor interagieren zu können. Aus diesem Grund wurde die Teilsequenz der Chromophorbindedomäne einer Sekundärstrukturanalyse unterworfen (siehe dazu Kap. 3.2.1).

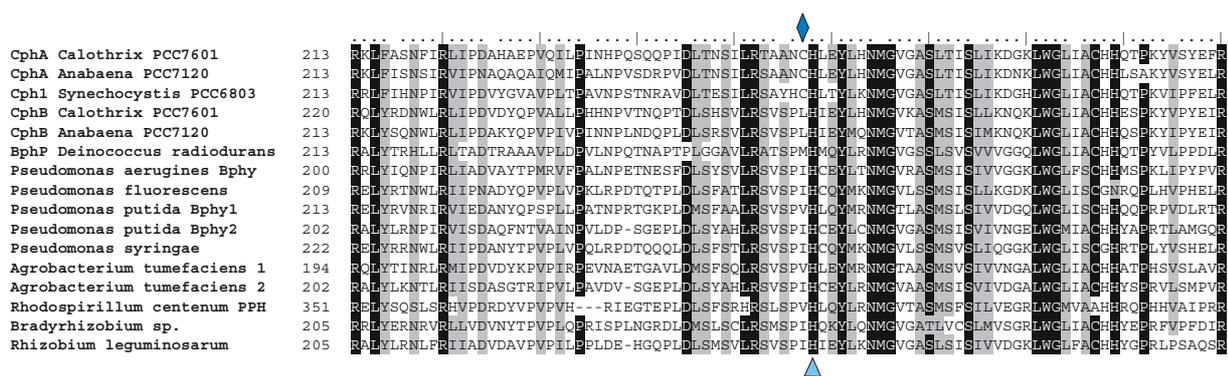


Abbildung 3.1.2 Alignment verschiedener Bacteriophytochrome (Chromophorbinderegion).

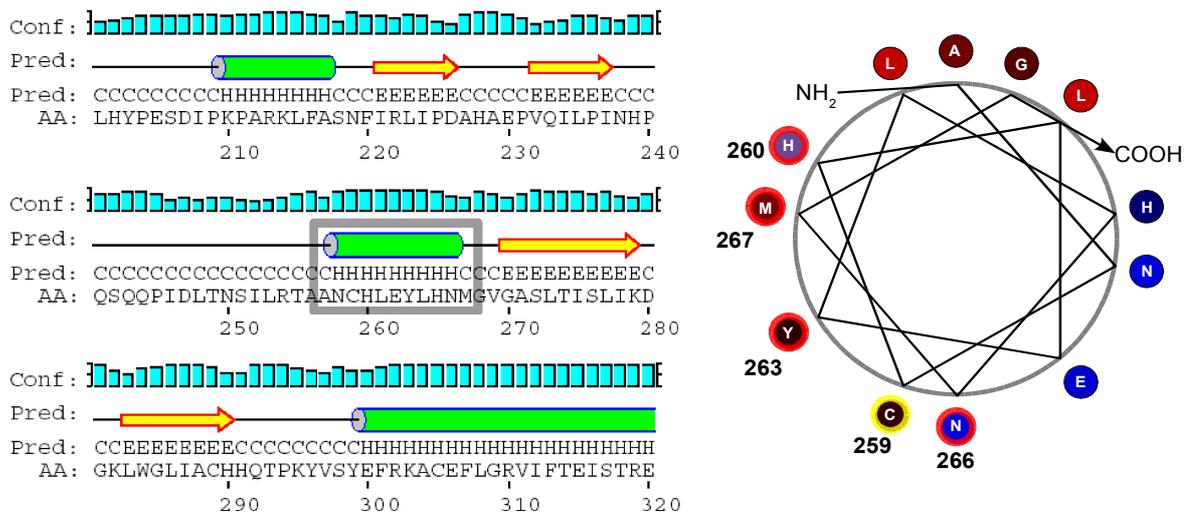
Die Positionsangaben entsprechen der Numerierung der jeweiligen Vollängensequenzen. Dunkelblaue Raute: Chromophorbindestelle der pflanzlichen Phytochrome und der Bacteriophytochrome mit Cystein. Hellblaues Dreieck: wahrscheinliche Chromophorbindestelle der Phytochrome ohne Cystein als Chromophorbindestelle. Im Alignment wurde der Schattierungsgrenzwert auf 90% gesetzt, **identische** Aminosäuren sind schwarz, **homologe** Aminosäuren grau hinterlegt. Das vollständige Alignment, sowie die *Swissprot* Accession Nummern der verwendeten Sequenzen finden sich im Anhang.

## 3.2 Strukturvorhersagen

Die Praxis sollte das Ergebnis des Nachdenkens sein, nicht umgekehrt. (H. Hesse)

### 3.2.1 Sekundärstrukturvorhersage von CphA

Um eine gezieltere Auswahl an zu mutierenden Aminosäureresten im Bereich der Chromophorbindestelle zu erhalten wurde mangels einer vorliegenden Phytochrom-Kristallstruktur auf Sekundärstrukturvorhersagen zurückgegriffen. Der Bedeutung der Sekundärstrukturvorhersage von Proteinen kommt durch die Entwicklung immer zuverlässigerer Algorithmen in den letzten Jahren ein immer höherer Stellenwert zu. Heute ist die Strukturvorhersageforschung soweit, daß eine Treffergenauigkeit von bis zu knapp 80% erreicht werden kann<sup>140, 141, 142</sup>. Die Sekundärstrukturvorhersage der Chromophorbindedomäne von CphA erfolgte mit der PSIPRED-Methode, die auf der Auswertung von multiplen Alignments durch neuronale Netze beruht<sup>143</sup>. Da bisher keine Struktur eines Phytochroms gelöst werden konnte, bieten Strukturvorhersagen zur Zeit die einzige Möglichkeit zumindest im Ansatz strukturelle und räumliche Vorstellung über Phytochrome zu erhalten.



**Abbildung 3.2.1** Sekundärstrukturvorhersage der Chromophorbindedomäne von CphA

H = Helix, E = Faltblatt, C = ungeordnet, Conf.: Grad der Verlässlichkeit der Vorhersage. Rechts: Helical-Wheel-Darstellung der Positionen 257 bis 268 im CphA (grauer Kasten). Hochkonservierte Aminosäuren **rot** umkreist, Chromophorbindestelle **gelb** umkreist. Blau: geladene AS, rot/braun: hydrophobe AS.

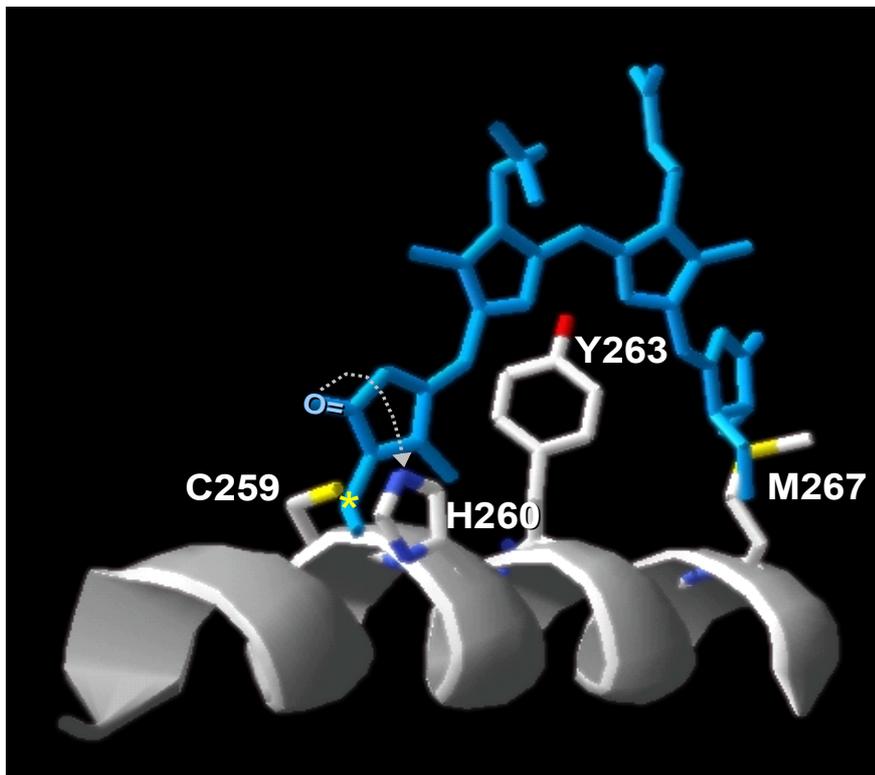
Mit Hilfe der durch Sequenzalignments identifizierte hochkonservierte Aminosäuren (siehe Anhang Alignment) und der in Abb. 3.2.1 links dargestellten Sekundärstrukturvorhersage<sup>@</sup> wurde für CphA eine Mutationsstrategie erarbeitet. Die Sekundärstrukturanalyse nimmt für den unmittelbaren Bereich der Chromophorbindestelle mit hoher Verlässlichkeit eine Helixstruktur an. Die Primärsequenz von CphA kann anschließend als „helical wheel“ dar-

<sup>@</sup> <http://insulin.brunel.ac.uk/psipred>

gestellt werden. Wie aus Abb. 3.2.1 rechts ersichtlich, liegen alle hochkonservierten Aminosäuren auf einer Seite der Helix. Die in dieser Arbeit angewandte Mutationsstrategie trägt dieser Erkenntnis mit den Mutanten H260, Y263, N266 und M267 Rechnung (Kap. 3.5.3).

### 3.2.2 3D Modellierung

Um eine genauere räumliche Vorstellung der Chromophorhelix in Bezug auf einen linearen Tetrapyrrol zu bekommen, wurde die Chromophorhelix mit Hilfe des Swiss-PDB-Viewers modelliert. Die Strukturdaten des Chromophors wurden aus dem Datensatz der Phycobilisomen-Struktur des Allophycocyanins von *Spirulina platensis* extrahiert und geben nicht notwendigerweise die natürliche (Z,Z,Z-anti, syn, anti) Konformation des Chromophors im Phytochrom wider. Leider lassen nur wenige Programme zur Strukturanalyse ein strukturelles Editieren solcher prosthetischer Gruppen zu. Um jedoch eine Abschätzung der Abstände vornehmen zu können, ist das in Abb. 3.2.2 gezeigte Modell vollkommen ausreichend.



**Abbildung 3.2.2** 3D-Modell der CphA Chromophorbindedomäne

3D Helixmodell der chromophorbindenden Helix von CphA. **Gelber Stern " \* "**: Ligationsstelle zum C259. **Gestrichelter Pfeil**: Durch Neigung von Ring A mögliche Bindung an H260. Weitere möglicherweise mit dem Chromophor interagierende Aminosäuren sind gekennzeichnet.

Man erkennt in der Abbildung, daß es unter der Annahme, daß der Chromophor die in der Abbildung gezeigte Orientierung zur Helix hat, durch Neigen von Ring A konformell einerseits möglich ist, die Ethyliden-Gruppe von Ring A (markiert mit gelbem Stern) zum Chromophor-

akzeptierenden Cystein 259 weisen zu lassen, oder aber andererseits die Ketofunktion von Ring A in die Nähe von Histidin 260 zu bringen (angedeutet mit gestricheltem Pfeil). Desweiteren ist ersichtlich, daß sich sowohl Y263 als auch M267 noch in der Reichweite des Chromophors befinden. Die Auswirkungen von Mutationen dieser erwähnten Aminosäuren wird in gesonderten Kapiteln behandelt.

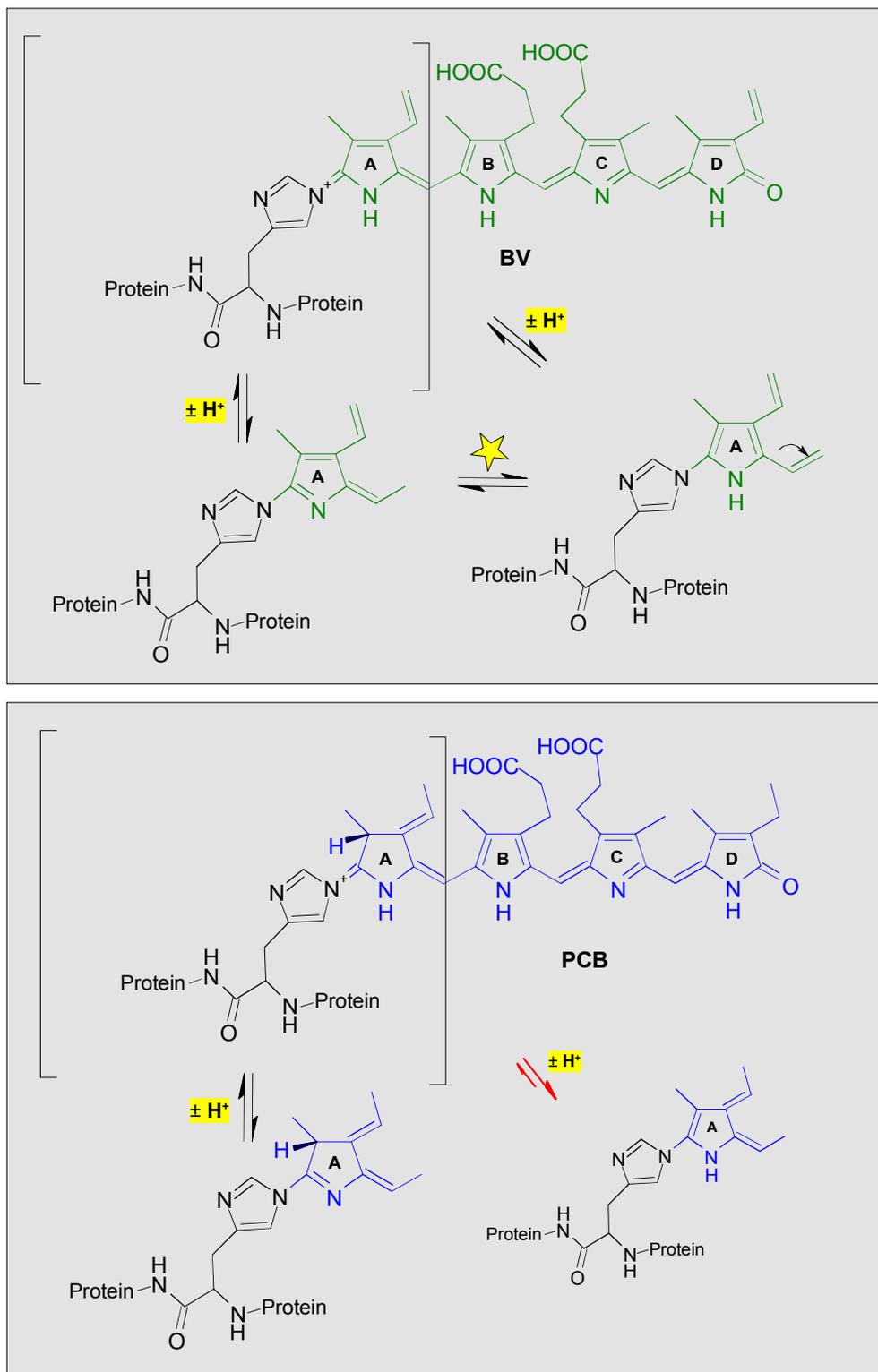
### 3.2.3 Modell zur Bindung von PCB bzw. BV am Histidin

Die von Davis *et al.*<sup>20</sup> als Schiff-Base postulierte Verknüpfung von PCB oder BV (Kap. 1.3.2) durch die Bindung einer der Carbonylgruppen des PCB oder BV an das Stickstoffatom des Histidin-Imidazolrings ist höchstwahrscheinlich sehr reaktiv und Hydrolyse-empfindlich. Es ist daher anzunehmen, daß diese Bindung eine der in Abb. 3.2.3 vorgestellten Umlagerungen vollzieht. Die resultierende mögliche Enamin-Amidin-Tautomerie stellt eine in biologischen Systemen bisher nicht gefundene und auch in der organischen Chemie sehr seltene Form der Mesomerie dar.

Aus dem vorgeschlagenen Zwischenzustand der Chromophor-Histidin-Bindung heraus (Abb. 3.2.3, eckige Klammern), ist eine Deprotonierung des Ring A-Stickstoffatoms, was zu den jeweils unten links abgebildeten Strukturen führt, sowohl bei BV als auch bei PCB wahrscheinlicher als die Reaktion zu den jeweils unten rechts dargestellten Strukturen. Beim BV ist jedoch auch noch die rechts dargestellte Struktur möglich, die beim PCB nicht ohne weiteres gebildet werden kann, da eine Deprotonierung am C<sub>1</sub> Kohlenstoffatom von Ring A sehr unwahrscheinlich ist. Während der Hydrolyse-empfindliche Zwischenzustand im Fall von BV durch eine mesomere Grenzstruktur des  $\pi$ -Elektronensystems von Ring A „umgangen“ werden kann (wobei eine Protonenverschiebung stattfindet), ist diese Stabilisierung beim PCB nicht möglich, da dafür das Spalten bzw. Verknüpfen einer C-H Bindung stattfinden müßte (was *spontan* nicht auftritt). Das macht die Bindung im Fall von PCB anfälliger gegen nukleophile Angriffe, und das Gleichgewicht in wässriger Lösung liegt sehr wahrscheinlich eher auf Seiten der hydrolysierten Bindung.

Diese Argumentation liefert auch eine Erklärung dafür, warum Davis *et al.*<sup>20</sup> in ihren Versuchen mit Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* mittels Bromcyanspaltung (das Histidin dieses Proteins ist von Methioninen eingerahmt) ein PCB-Histidyl-Homoserin-Lacton massenspektrometrisch nachweisen konnten: Sie führten die Bromcyanspaltung unter 70% Ameisensäure durch, unter diesen Bedingungen ist die Hydrolyse der Histidin-Chromophor-Bindung wahrscheinlich stark unterdrückt.

Die Versuche mit CphBm in dieser Arbeit sollten im folgenden unter anderem die Bindung von PCB bzw. BV am Histidin untersuchen.



**Abbildung 3.2.3** Mögliche Histidin-Addukte von BV und PCB

Die vorgeschlagene Bindung von BV bzw. PCB an Histidin, ausgehend von einer positiv geladenen Schiff-Base zwischen der Ring-A Carbonylgruppe und einem benachbarten Histidinrest. Mesomerieformen sind durch Doppelpfeile verbunden. Instabile Formen in großen eckigen Klammern. **Oben:** Fall mit BV (grün), der Stern zeigt die Enamin-Amidin-Tautomerie an. **Unten:** Addukt mit PCB (blau). Rote Doppelpfeile zeigen die nichtfavorisierte Form an.

### **3.3 Klonierungen**

Wie Eingangs erwähnt, sollte in dieser Arbeit einerseits die heterologe Expression der beiden Zweikomponentensysteme zur weitergehenden Charakterisierung verfolgt werden, als auch versucht werden, die Komponenten homolog zu exprimieren, um Aufschluß über die Natur der Chromophore von CphA und CphB zu erhalten. Um diesen beiden Ansätzen gerecht zu werden, wurden zwei verschiedene Klonierungsstrategien verfolgt. Zum einen sollte die heterologe Expression in Bezug auf die Ausbeute an Protein sowie die optimale Aktivität der Proteine verbessert werden (Kap.3.3.1 und 3.3.2), zum anderen wurde versucht, neben dem bereits vorhandenen Shuttle-Vektor ein besser handhabbares Konstrukt herzustellen (Kap. 3.3.3).

#### **3.3.1 Klonierung von *cphA* und *rcpA* und heterologe Expression**

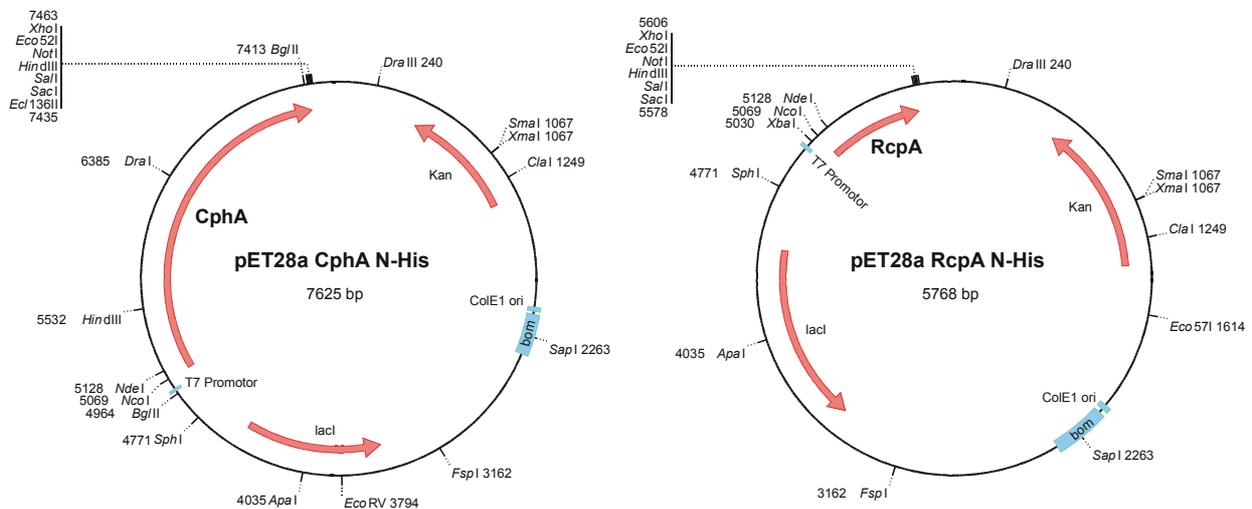
Die Konstrukte standen bereits als Versionen mit C-terminalem His(6)-tag im Vektor pMEX8 zur Verfügung<sup>104</sup>, wurden jedoch in den pET28a(+)-Vektor umkloniert, um sie mit einem N-terminalen His(6)-tag mit Thrombinschnittstelle auszustatten und so eine spätere Abtrennung des His(6)-tags zu ermöglichen. Im Falle von CphA führte die Expression in pET28a(+) nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen, da das Protein lediglich unvollständig translatiert aufgereinigt werden konnte, wobei überwiegend Molekulargewichte von 18 bis 60 kDa erhalten wurden. Dennoch wurde das pET28-CphA Konstrukt für weitere Klonierungen (zur homologen Expression) verwendet. Die Punktmutagenesen von *cphA* wurden in dem Vektor pMEX8-CphA durchgeführt. Die Sequenzen der Gene finden sich im Anhang (Anhang Gensequenzen).

Zur Klonierung wurden die folgenden Primer verwendet. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, Startcodon bzw. Stopcodon fett gedruckt und alle Sequenzen in 5´-> 3´-Richtung dargestellt:

RcpA:            oBQ29 crcp1 N-His1: (5´NdeI)  
                   catatgagcgtagaaacggaagac  
                   oBQ31 crcp1 N-His2: (3´SacI)  
                   gagctctcactccgacggcaatgtcgccg

CphA:            oBQ32 phyC N-His1: (5´NdeI)  
                   catatggtaaccgaattccaagcaciaaag  
                   oBQ30 phyC N-His2: (3´SacI)  
                   gagctctcatcctcgacccaaaaagatc

Die Gene wurden nach der Klonierung in pET28a mit den Primern phyC seq 1 bis 8 bzw. crcp seq 1 und 2 (Sequenzen siehe Anhang, Tabelle Sequenzierungsprimer), sowie den jeweiligen Klonierungsprimern sequenziert.



**Abbildung 3.3.1** Vektoren zur heterologen Expression (mit N-terminalem His(6)-tag)

Vektorkarten der Plasmide pET28a CphA N-His und pET28a RcpA N-His. Es sind ausgewählte Restriktionsschnittstellen gezeigt. Die Gene wurden mit NdeI und SacI einkloniert.

Die Expressionsbedingungen für CphA im pMEX8-Vektor ergaben Ausbeuten von bis zu 6 mg assemblierbarem Protein pro Liter Kultur, die Ausbeuten von RcpA in pET28a lagen bei über 12 mg pro Liter Kultur. Die Ausbeutensteigerung im Vergleich zu früheren Expressionsbedingungen (ca. 1,1 mg CphA bzw. 2,2 mg RcpA pro Liter *E. coli*-Kultur, <sup>144</sup>) liegt u.a. darin begründet, daß das verwendete Medium wesentlich höhere Zelldichten zuließ. Im Falle von CphA und CphBm ist jedoch auch die zum Teil erheblich niedrigere Expressionstemperatur sowie die Verwendung des *Epicurian coli* BL21 DE3 RIL für die Erhöhung der Ausbeute an funktionellem Protein verantwortlich.

### 3.3.2 Klonierung von *cphB* und *rcpB* zur heterologen Expression

#### 3.3.2.1 Klonierung von *cphB* und *cphBm*

Das vorhandene pMEX8 Konstrukt <sup>104</sup> wurde in pET28a umklontiert, um es mit einem N-terminalen His(6)-tag mit Thrombinschnittstelle auszustatten und damit eine spätere Abtrennung des His(6)-tags analog zu *cphA* zu ermöglichen. Im Falle von *cphB* wurde aufgrund des uneindeutigen Genanfangs (Abb. 3.3.2 und s.u.) <sup>107</sup>, <sup>144</sup> zusätzlich ein alternatives Konstrukt (*cphBm*) aus genomischer DNA von *Calothrix* PCC7601 amplifiziert.

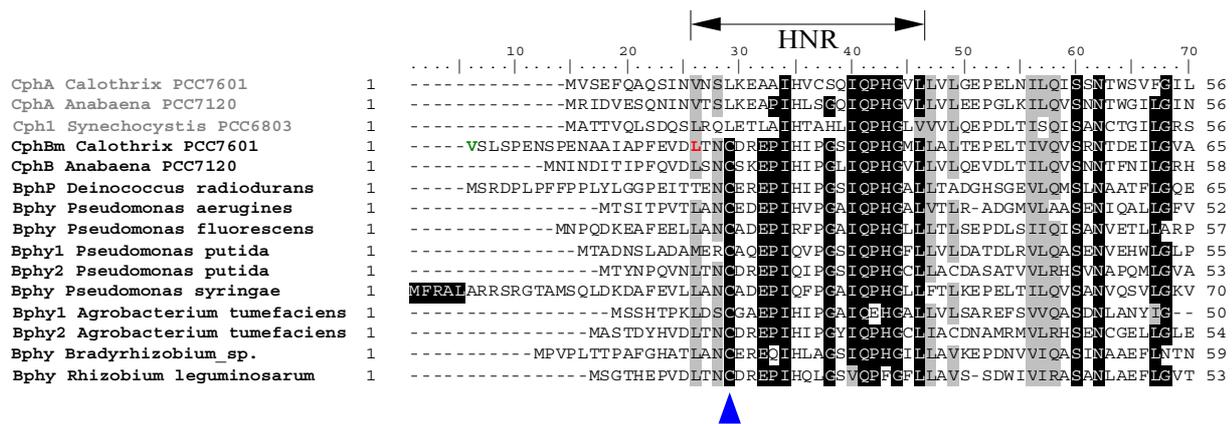
2	ACT	TTT	ATG	TTC	TAT	TTA	TTT	GAG	ATA	TTG	AGA	ATT	TAA	TAT	TTT	46
1	T	F	M	F	Y	L	F	E	I	L	R	I	*	Y	F	15
47	GGT	TTT	ATG	CTC	CAA	TAT	TTT	CAG	ACA	AAA	TGT	TAT	TTT	AAT	GAG	91
16	G	F	M	L	Q	Y	F	Q	T	K	C	Y	F	N	E	30
92	AGA	AAG	GTA	CTA	TAT	TTT	ATG	TCT	TTT	TTG	ACT	<b>TAT</b>	<b>TAA</b>	<b>TTT</b>	<b>AAT</b>	136
31	R	K	V	L	Y	F	M	S	F	L	T	Y	*	F	N	45
137	<b>TTA</b>	<b>TAT</b>	CTG	AAG	GTA	GAT	GTT	GAA	GAG	AAA	<b>ATA</b>	<b>AAA</b>	<b>TTT</b>	<b>TTA</b>	<b>AAA</b>	181
46	L	Y	L	K	V	D	V	E	E	K	I	K	F	L	K	60
182	ATA	TTA	<u>AGG</u>	TTT	<b>TAA</b>	<b>TTG</b>	TTG	CAG	TTA	<b>ATT</b>	<b>TAT</b>	AAC	AAT	TTT	ATT	226
61	I	L	R	F	*	L	L	Q	L	I	Y	N	N	F	I	75
227	<b>GTG</b>	AGC	TTA	AGT	CCT	GAA	AAT	TCT	CCA	GAA	AAT	GCT	GCG	ATC	GCA	271
76	V	S	L	S	P	E	N	S	P	E	N	A	A	I	A	90
272	CCT	TTT	<u>GAG</u>	<u>GTG</u>	GAC	<b>TTG</b>	ACG	AAT	TGC	GAT	CGC	GAA	CCA	ATT	CAC	316
91	P	F	E	V	D	L	T	N	C	D	R	E	P	I	H	105
317	ATC	CCT	GGC	TCA	ATT	CAG	CCG	CAT	GGG	ATG	CTA	TTG	GCG	TTG	ACG	361
106	I	P	G	S	I	Q	P	H	G	M	L	L	A	L	T	120

### Abbildung 3.3.2: Genanfang von *CphB* auf genomischer Ebene

Anfang des *cphB* Operons. Mögliche Pribnow-Boxen in **fett**, mögliche Shine-Dalgarno Sequenzen unterstrichen. **Rot** hinterlegt: Genanfang von *CphB*. **Grau** hinterlegt: Alternativer Genanfang (beide Konstrukte nach Dissertation Jorissen <sup>144</sup> und Ref. <sup>107</sup>). **Grün** hinterlegt: Hier eingeführter Genanfang von *CphBm*.

Im Operon von *cphB* finden sich diverse mögliche Pribnow-Boxen, zu denen die erwarteten „-35“-Sequenzen jedoch nicht oder nicht im korrekten Abstand zu finden sind. Die Promotor Erkennungssequenzen in Cyanobakterien sind noch nicht vollständig aufgeklärt <sup>145</sup>, <sup>146</sup>. Die Shine-Dalgarno Sequenz (SD) <sup>147</sup>, <sup>148</sup>, deren Anwesenheit für die Wahl der bisher gewählten Genanfänge von *cphB* ausschlaggebend war <sup>144</sup>, stellt jedoch keine zwingende Notwendigkeit für eine erfolgreiche Translationsinitiation dar, zumal die der SD komplementäre 3' Sequenz der 16S RNA von *Calothrix* PCC7601 nicht bekannt ist (N. Tandeau de Marsac, pers. Mitteilung). Daher wurde der alternative Genanfang von *cphBm* in dieser Arbeit aufgrund eines Sequenz-Alignments mit anderen cyanobakteriellen Phytochromen gewählt (Abb. 3.3.3). Eine BLAST Suche im Genom vom nahe verwandten Organismus *Nostoc punctiforme*, das zur Zeit nur in Form von Rohsequenzdaten bereitgestellt wird <sup>@</sup>, sowie speziell der Vergleich mit der Sequenz aus dem eng verwandten Organismus *Anabaena* PCC7120 unterstützen die Vermutung, daß *cphB* *in vivo* evtl. nicht den vorher verwendeten in Abb. 3.3.2 rot hinterlegten Genanfang besitzt. Endgültige Aufklärung bräuchte ein Experiment zur Primerextension, was aber aufgrund des extrem niedrigen Transkriptionslevels von *cphB* in *Calothrix* Zellen <sup>107</sup> schwer durchführbar ist.

<sup>@</sup> <http://genome.ornl.gov/microbial/npun/>



**Abbildung 3.3.3** Alignment der N-terminalen Sequenzen verschiedener Bacteriophytochrome

Gen- und Organismennamen in **grau** = mit Cystein in der Chromophorbindetasche, in **schwarz** = ohne Cystein in der Chromophorbindetasche.

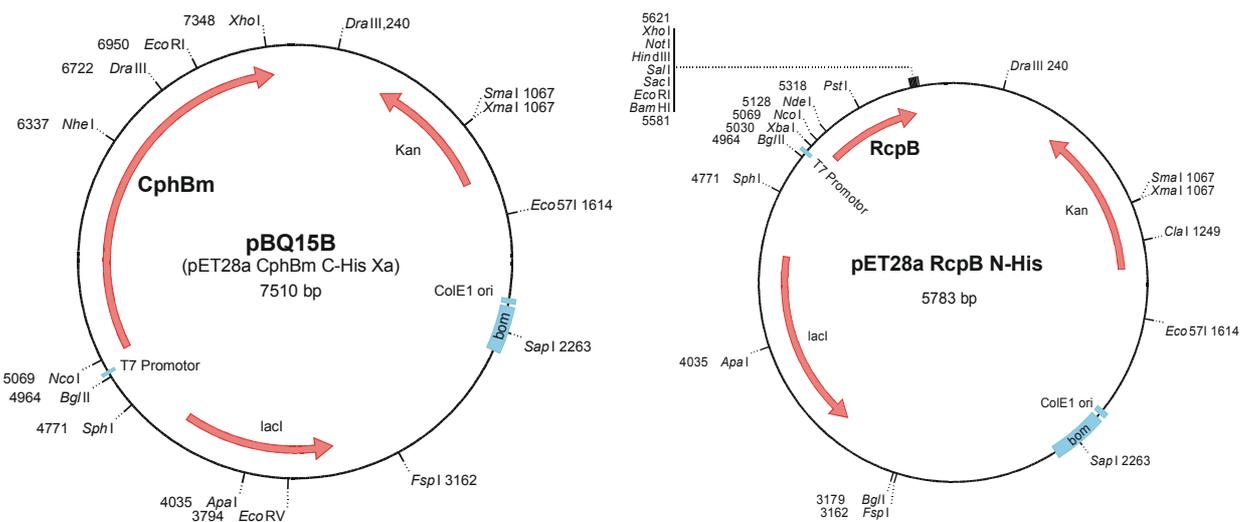
Alignment: **Schwarz hinterlegt**: identische AS in 12 von 15 Sequenzen, **grau hinterlegt**: ähnliche AS in 12 von 15 Sequenzen. HNR = hochkonservierte N-terminale Sequenz, **blaues Dreieck**: konserviertes Cystein in Bacteriophytochromen ohne Cystein in der Chromophorbindetasche.

Zur Klonierung wurden die folgenden Primer verwendet. Die Restriktionsschnittstellen, die zur Klonierung verwendet wurden, sind unterstrichen, Startcodon bzw. Stopcodon sind fett gedruckt, und alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung dargestellt:

CphB: oBQ35 phyL N-His1: (5'NdeI)  
catatgacgaattgcatcgcaacc  
 oBQ36 phyL N-His2: (3'BamHI)  
ggatccttatttgacctcctgcaatgtgaaatag

CphBm: oBQ98 CphBm 5': (5'NdeI)  
catatgagcttaagtctgaaaattctccag  
 oBQ36 CphBm 3': (3'SacI)  
gaqctcttatttgacctcctgcaatgtgaaatag

Die Gene wurden nach der Klonierung in pET28a mit den Primern phyL seq 1 bis 11 (Sequenzen siehe Anhang, Tabelle Sequenzierungsprimer) sowie den entsprechenden Klonierungsprimern sequenziert.



**Abbildung 3.3.4** Vektorkarten zur heterologen Expression von *CphBm* und *RcpB*

Vektorkarten der Plasmide *pBQ15B* (*pET28a CphBm C-His Xa*) und *pET28a RcpA N-His*. *RcpA* wurde in *NdeI* *BamHI* einkloniert, *CphBm* wurde in *NcoI*, *XhoI* einkloniert.

Die Proteine der beiden Konstrukte von *cphB* (*CphB* und *CphBm*) wurden unter den initialen Expressionsbedingungen zum größten Teil lediglich als Einschlußkörperchen erhalten, der lösliche Anteil dieser N-terminal getaggten Proteine konnte zudem nicht als Vollängenproteine aufgereinigt werden. Wie im Falle von *CphA* wurden lediglich Fragmente bis ca. 60 kDa und nur wenig Vollängenprotein aufgereinigt. Daher wurde das *CphBm* mit C-terminalem His(6)-tag und Faktor Xa Proteaseschnittstelle ausgestattet (siehe Abb. 3.3.4, links). Hierzu wurde das Gen im passenden Leserahmen vor den C-terminalen His(6)-tag und das anschließende Stopcodon des *pET28a* kloniert.

Zu dieser Klonierung wurden die unten angegebenen Primer verwendet. Die Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, das Startcodon ist fett, die Faktor Xa Proteaseschnittstelle kursiv gedruckt. Alle Sequenzen sind in 5' → 3'-Richtung dargestellt:

*CphBm* CHis :      oBQ146 *CphBm* CH5: (5'*NcoI*)  
                           tataccatgggcttaagtctctgaaaattctccag  
                           oBQ147 *CphBm* CH3: (3'*XhoI*)  
                           aaactcgagccggcctcaat<sup>ttt</sup>gacctctgcaatgtgaaatagaacg

Durch Herabsetzen der Expressionstemperatur von 37 °C auf 18-20 °C konnte die Ausbeute an assemblierbarem Vollängenprotein von 0,180 mg/l *E. coli*-Kultur<sup>144</sup> auf bis zu 6 mg pro Liter Kultur gesteigert werden.

### 3.3.2.2 Klonierung und Expression von *rcpB*

Das vorhandene pMEX8 Konstrukt<sup>104</sup> wurde in pET28a umkloniert, um es mit einem N-terminalen His(6)-tag samt Thrombinschnittstelle auszustatten und damit eine spätere Abtrennung des His(6)-tags wie bei den zuvor beschriebenen Konstrukten zu ermöglichen (Abb. 3.3.4 rechts).

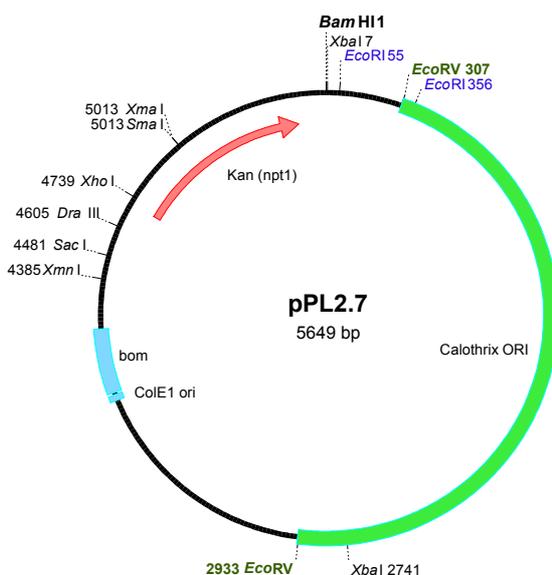
Es wurden die folgenden Primer verwendet. Hervorhebungen s.o., alle Sequenzen sind in 5' -> 3'-Richtung dargestellt:

RcpB: oBQ48b lrcp N-His1: (5'NdeI)  
catatggtaggaaacgctactcaaccgtggc  
 oBQ49 lrcp N-His2: (3'BamHI)  
 ggatccttaacccatctcaggaagtacaac

*rcpB* wurde nach der Klonierung in pET28a mit den Primern lrcp seq 1 und 2 sowie den entsprechenden Klonierungsprimern sequenziert (Sequenzen siehe Anhang, Tabelle Sequenzierungsprimer).

Die Expressionsbedingungen ergaben im Fall von RcpB durchschnittliche Ausbeuten von über 15 mg gereinigtem Protein pro Liter Kultur (zuvor erhaltene Ausbeuten lagen bei 1,6 mg/l Kultur<sup>144</sup>).

### 3.3.3 Klonierungen zur homologen Expression



**Abbildung 3.3.5** Vektor pPL2.7

Shuttle-Vektor pPL2.7 mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen. Das entsprechende Konstrukt ohne Fragment zwischen *EcoRI* ist pPL2.8

Cyanobakterien der Ordnung *Nostocales* (zu denen neben *Nostoc* auch *Anabaena*, *Fremyella*, und *Calothrix* zählen) besitzen als Schutzmechanismus gegen das Einbringen von Fremd-DNA bis zu fünf verschiedene Restriktionseendonukleasen<sup>149, 150</sup>. Daher ist es für eine effiziente Transformation oder Konjugation von *Calothrix* oder *Fremyella* unabdingbar, daß das zu übertragende Plasmid die Schnittstellen für *AvaII*, *SphI* und *FspI* nicht enthält<sup>151</sup>. Darüber hinaus ist für die Replikation des Plasmids in Cyanobakterien ein eigener Replikationsursprung nötig<sup>152</sup>. Die Plasmide pPL 2.7<sup>152, 153, 154</sup>, pPL 2.8 (Abb. 3.3.5) und die eigenen Derivate von pET28a(+) (Abb. 3.3.6) erfüllen diese Prämissen. Als quasi

konstitutiver Promotor in Cyanobakterien wurde der *tac* Promotor beschrieben<sup>155, 145, 146</sup> und in dieser Arbeit für die homologe Expression in *Calothrix* PCC7601 bzw. *Fremyella diplosiphon* SF 33 verwendet.

Die Klonierungsstrategie für das eigene Shuttlevektor-Konstrukt ist in Abb. 3.3.6 dargestellt. Das Plasmid pPL2.8 wurde durch *EcoRI* Verdau und Religation von pPL2.7 (Abb. 3.3.5) generiert. Auf diese Weise wurden im Vergleich zu pPL2.7 zwei weitere Einzelschnittstellen erhalten. Die Klonierungsprodukte der verschiedenen Gene in eine dieser neuen Einzelschnittstellen (*EcoRV*) konnten jedoch nicht erfolgreich transformiert werden. Die Plasmide pBQ9b und pBQ11b entsprechen den Plasmiden pBQ9 und pBQ11 mit der Ausnahme, daß die vorhandene *BamHI* Schnittstelle durch Schneiden, Auffüllen und Religieren entfernt wurde.

Die jeweiligen kompletten Konstrukte (inkl. *tac* Promotor und T7 Terminator) der Plasmide pBQ7, 9b, 10 und 11b wurden mittels der folgenden Primer mit *BamHI* Schnittstellen ausgestattet und in die *BamHI* Schnittstelle von pPL2.8 inkloniert (Hervorhebungen s.o.) und ergeben die Konstrukte pPL7b, 9b, 10b und 11b:

```

oBQ88 tac BamHI: (5'BamHI)
cgggatcctgcacggtgcaccaatgcttc
oBQ89 T7term BamHI: (3'BamHI)
acggatccaaaaaacccctcaagaccgc

```

Sämtliche Gen-Konstrukte wurden per Sequenzierung mit den entsprechenden Sequenzierungsprimern (siehe Anhang) verifiziert, das Entfernen von Restriktionsschnittstellen wurde lediglich mittels Restriktionsverdau überprüft.

Die erhaltenen Derivate von pPL2.8 und die eigenen Shuttle-Vektorderivate pBQ7, pBQ9, pBQ10, pBQ11 wurden mittels triparentaler Konjugation (siehe Kap. 2.4.5) in *Calothrix* bzw. *Fremyella diplosiphon* transferiert. Mittels Elektroporation von *Calothrix* (bzw. *Fremyella diplosiphon*<sup>156</sup>) konnten keine Transformanten erhalten werden. Auch die Konjugationsversuche führten erst nach mehrmaliger Wiederholung zu resistenten Klonen. Bei der Konjugation mit *Fremyella diplosiphon* wurde hingegen schon beim ersten Versuch ein positiver Klon erhalten. Dennoch wurde aufgrund der ungewöhnlich niedrigen Transformations-effizienz<sup>157</sup> darauf verzichtet, die vollständigen Plasmid-Serien in beide Organismen zu transformieren, da eine homologe Expression der beschriebenen Konstrukte aufgrund identischer Promotoren und Replikationsursprünge weitgehend unabhängig vom Plasmidrückgrat oder dem Organismus sein sollte. Eine Übersicht der zur Konjugation benutzten Plasmide zeigt Tabelle 3.1.1.

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>
pBQ7	pET28a mit: tac Promotor, N-His <sub>6</sub> , Thrombinschnittstelle, <b>CphA</b> , T7 Terminator, EcoRV Fragment aus pPL 2.7 ( <i>Calothrix</i> ori)
pBQ9	pET28a mit: tac Promotor, N-His <sub>6</sub> , Thrombinschnittstelle, <b>CphB</b> , T7 Terminator, EcoRV Fragment aus pPL 2.7 ( <i>Calothrix</i> ori)
pBQ10	pET28a mit: tac Promotor, N-His <sub>6</sub> , Thrombinschnittstelle, <b>RcpA</b> , T7 Terminator, EcoRV Fragment aus pPL 2.7 ( <i>Calothrix</i> ori)
pBQ11	pET28a mit: tac Promotor, N-His <sub>6</sub> , Thrombinschnittstelle, <b>RcpB</b> , T7 Terminator, EcoRV Fragment aus pPL 2.7 ( <i>Calothrix</i> ori)
-----	-----
pPL7	Apal/Sacl Fragment (blunt mit T4-Klenow) aus <b>pBQ7</b> in EcoRV von pPL2.8
pPL9	Apal/Sacl Fragment (blunt mit T4-Klenow) aus <b>pBQ9</b> in EcoRV von pPL2.8
pPL10	Apal/Sacl Fragment (blunt mit T4-Klenow) aus <b>pBQ10</b> in EcoRV von pPL2.8
pPL11	Apal/Sacl Fragment (blunt mit T4-Klenow) aus <b>pBQ11</b> in EcoRV von pPL2.8
-----	-----
pPL7b	oBQ88/oBQ89 PCR Fragment aus <b>pBQ7</b> in BamHI von pPL2.8
pPL9b	oBQ88/oBQ89 PCR Fragment aus <b>pBQ9</b> in BamHI von pPL2.8
pPL10b	oBQ88/oBQ89 PCR Fragment aus <b>pBQ10</b> in BamHI von pPL2.8
pPL11b	oBQ88/oBQ89 PCR Fragment aus <b>pBQ11</b> in BamHI von pPL2.8

**Tabelle 3.3.1:** Zur Konjugation eingesetzte Plasmide

Die folgenden Stämme konnten durch triparentale Konjugation erhalten werden:

*Calothrix* PCC7601 pBQ10 (RcpA)

*Calothrix* PCC7601 pBQ11 (RcpB)

*Calothrix* PCC7601 pPL7b (CphA)

*Fremyella diplosiphon* SF33 pPL9b (CphB)

Eine Verifizierung der Konjugation durch „Plasmid-Rescue“ wurde bisher nicht durchgeführt, da die Kulturen noch nicht vollständig von den Helferstämmen befreit werden konnten (sie tragen zwangsläufig die gleiche Resistenz). Zwar läßt sich der *E. coli*-Anteil durch vorsichtiges Pellettieren der Cyanobakterien auf einen für die Proteinisolierung vernachlässigbar geringen Anteil herabsetzen, ein erneutes (und stets durch das GN-Medium limitiertes) Auswachsen der Helfer-*E. coli* konnte jedoch bisher nicht unterbunden werden.

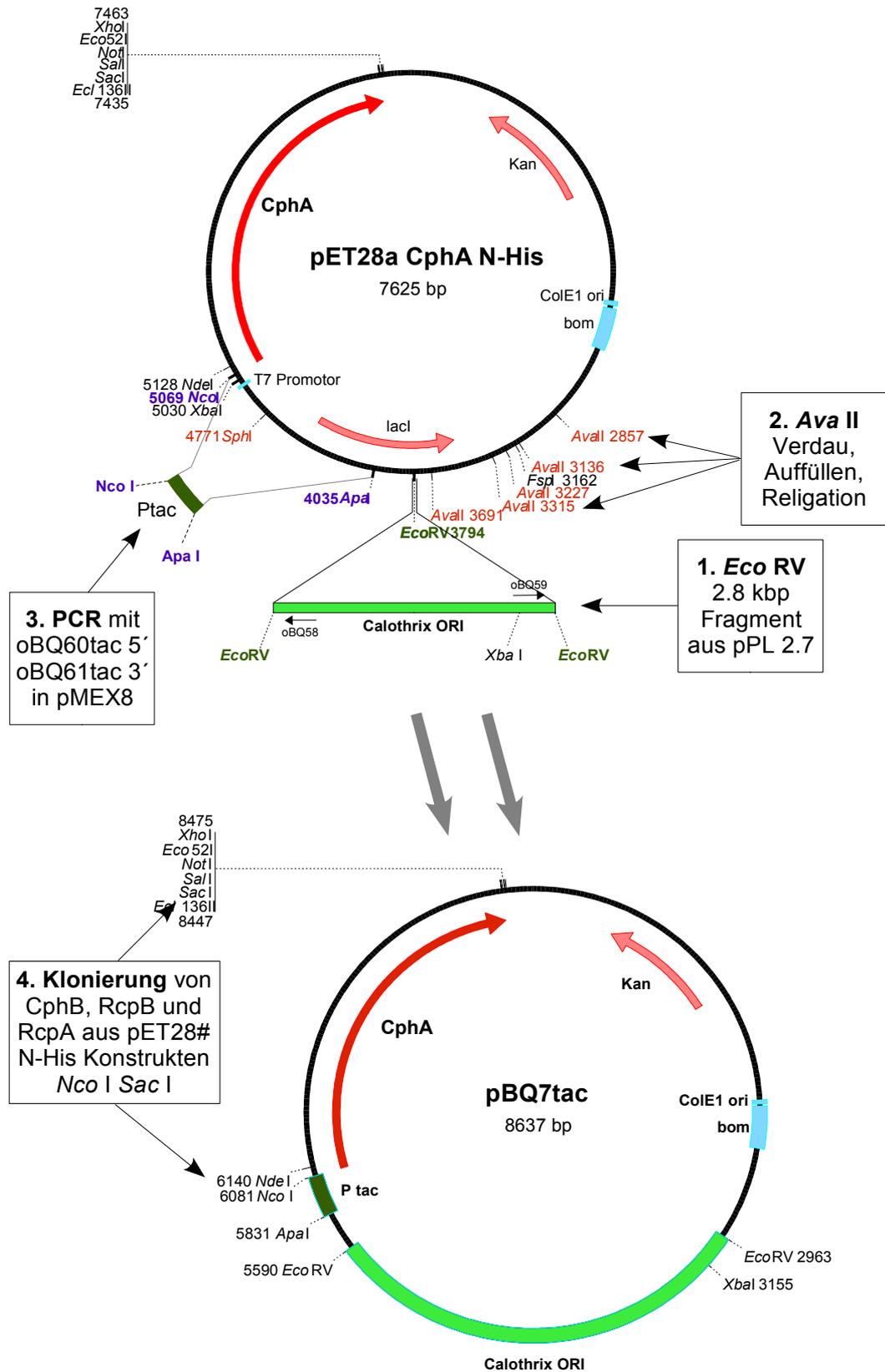


Abbildung 3.3.6 Klonierungsstrategie der pBQ-Konstrukte

Ptac = tac Promotor, bom = "basis of mobilisation", ori = origin of replication, bp = Basenpaare, Kan = Kanamycinresistenzkassette, lacI = lac Repressor ColE1 = ori für E. coli. Schnittstellen für cyanobakterielle Endonukleasen in rot.

### 3.4 Punktmutagenese von *cphA* und *cphB*

Aufgrund der Tatsache, daß bisher keine Phytochromstruktur vorgelegt werden konnte und lediglich die Domänenorganisation der verschiedenen Phytochrome auf Basis von Homologievergleichen bekannt ist, bietet sich der experimentelle Ansatz der Punktmutagenese zur Aufklärung der Subdomänenstruktur an. Auf diese Weise sollten Aminosäuren identifiziert werden, die für den autokatalytischen Einbau des Chromophors verantwortlich sind und damit einen Teil der Bindetasche darstellen. Problematisch an solchen Studien ist jedoch, daß sich die Ergebnisse nicht immer eindeutig interpretieren lassen. So ist häufig nicht zu unterscheiden, ob der Einfluß einer Mutation durch strukturelle Veränderungen eines evtl. weiter entfernten Bereichs (z.B. durch Störung von essentiellen Sekundärstrukturelementen) herrührt, oder ob es sich bei der Mutation um eine für die jeweilige Funktion (oder die spektralen Eigenschaften) essentielle Aminosäure handelt. Daher wurde bei der Punktmutagenese von *cphA* an den Stellen, die in der Nähe der Chromophorbindestelle liegen, darauf geachtet, neben nicht-konservativen auch konservative Punktmutationen zu setzen, bei denen keine besonderen strukturellen Irritationen zu erwarten waren.

Mutation CphA	Expression/Aufreinigung	Spektroskopie	Pfr-Stabilität	LADS
E189Q	(+)	(-)	n.d.	n.d.
D207N	+	+	(!)	n.d.
R213I	+	+	(!)	n.d.
L248P, Q, R	+, (+), +	+, (+), +	+, n.d., +	n.d.
S251P, A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L253P, R	+, +	(-), n.d.	n.d.	n.d.
R254T, I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Y263H, Q, D	+, +, +	(-, -, -)	n.d.	n.d.
N266V, A, D, G	+, +, +, +	+, +, +, +	n.d., +, +, +	n.d., !, !, n.d.
M267L, R	+, +	+, !	+, !	+, n.d.
S272P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
W284R, G	+, +	(-, -)	n.d.	n.d.
G285V, E	+, +	(-, -)	n.d.	n.d.
H290R, L	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H260L, P, R	+, +, +	n.d., n.d., (!)	n.d., n.d., (!)	n.d.
Mutation CphBm				
L266C	+	!	+	n.d.
SPL -> ANC	+	!	n.d.	n.d.
H267T, A	+	n.d., !	n.d., !	n.d.

**Tabelle 3.4.1:** Mutationen in *CphA* und *CphBm*

Die Numerierung bezieht sich auf die Aminosäuresequenz von *CphA*. Die Mutationen von *CphBm* sind im Text beschrieben. +: wie wt, -: negativ oder nicht auswertbar, (Klammern): vorläufiges Ergebnis, n.d.: nicht durchgeführt, !: abweichend vom wt. Die Mutante SPL->ANC bezieht die Positionen von 264 bis 266 der *CphBm* Sequenz ein.

Tabelle 3.4.1 gibt eine Übersicht der erhaltenen Mutanten und der bisher durchgeführten Experimente. Expression/Aufreinigung bezieht sich hier auf die Eigenschaften des Proteins während der Expression und Aufreinigung (Tendenz zu Inklusionskörperbildung, gesteigerte Aggregationsneigung), Spektroskopie bezeichnet die Durchführung von Absorptions- und Differenzabsorptionsspektroskopie. Die Spalte „P<sub>fr</sub>-Stabilität“ gibt die Durchführung von P<sub>fr</sub>-Stabilitätsmessungen an. Mit LADS („Lifetime Associated Difference Spectra“) sind Ergebnisse aus Flash-Photolyse-Experimenten angezeigt, die in Kooperation mit Leja Jorissen (MPI für Strahlenchemie in Mülheim, Ruhr) durchgeführt wurden. Leider konnten aufgrund der sehr aufwendigen Durchführung bisher nur wenige Mutanten untersucht werden. Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse zu den einzelnen Mutanten findet sich in den entsprechenden Unterkapiteln (CphA-Mutanten in Kap. 3.5.8, CphB-Mutanten in Kap. 3.8).

### 3.4.1 Punktmutagenese von *cphA*

Über einen Sequenzvergleich von pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen wurden hochkonservierte Aminosäuren der Chromophorbindedomäne ermittelt (vgl. Kap 3.1.2), von denen eine Auswahl mittels Punktmutagenese (Kap. 2.6.2) verändert wurde. Die verwendeten Mutationsprimer sind dem Anhang (Tabelle Mutationsprimer) zu entnehmen. Die Mutationen wurden mittels Sequenzierung verifiziert. Tabelle 3.4.1 zeigt die erhaltenen Mutanten von CphA und CphBm. Die Nummerierung bezieht sich auf die Position der entsprechenden Aminosäure in der CphA- bzw. CphBm-Sequenz (Anhang, Gensequenzen). Die Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf der Proteinebene werden in gesonderten Kapiteln behandelt.

### 3.4.2 Punktmutagenese von CphBm

Die Punktmutationen von CphBm sollten die Frage beantworten, ob CphBm durch „Rekonstitution“ des Cysteins an der Chromophorbindestelle die Fähigkeit zur stabilen kovalenten Bindung von PCB erlangt.



**Abbildung 3.4.1** Chromophorbindestellen von *CphA* und *CphB*

Die Mutation **SPL→ANC** ist im Alignment fett und unterstrichen. Raute: Chromophorbindestelle von *CphA*, Dreieck: putative Chromophorbindestelle von *CphB* (Histidin 267).

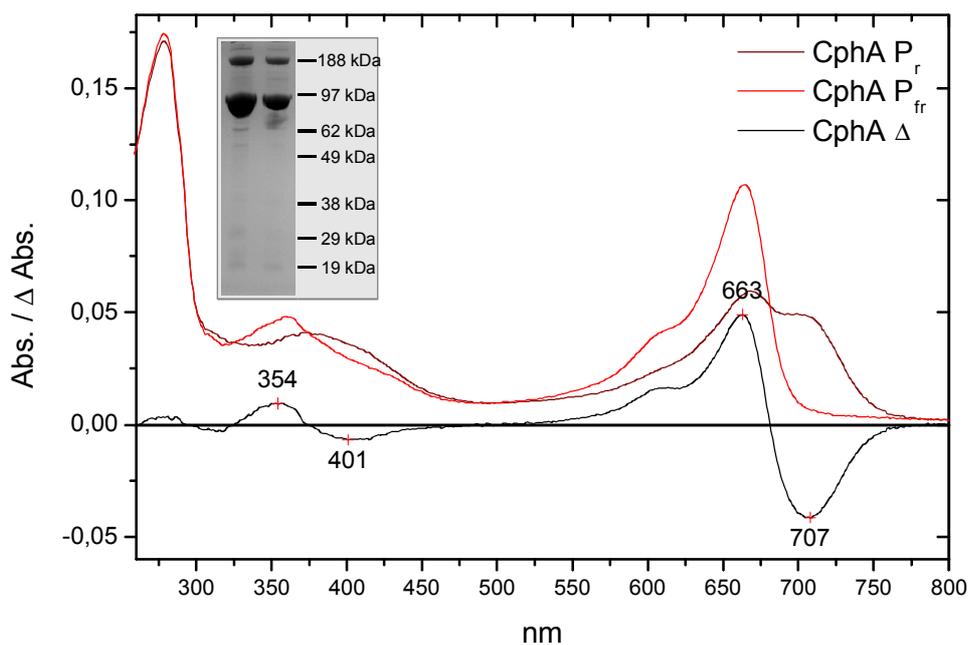
Die Position, an der in pflanzlichen (und einigen cyanobakteriellen) Phytochromen ein Cystein die stabile kovalente Thioether-Bindung mit PCB, PEB oder PΦB eingeht, ist beim CphB(m) mit einem Leucin besetzt. Diese Aminosäure wurde in der Mutante L266C gegen ein Cystein getauscht. Die Mutation SPL→ANC (Abb. 3.4.1) ändert die Positionen 264-266 und wurde vorgenommen, um die Chromophorbindestelle von CphB derjenigen von CphA anzupassen und damit mögliche strukturelle Einflüsse des Prolins aus der CphB-Sequenz auszuschalten. Die Mutation H267T/A adressiert das Histidin als alternative Chromophorbindestelle <sup>49</sup>.

## 3.5 CphA aus heterologer Expression

### 3.5.1 Aufreinigung von CphA

Die heterologen Expressionen von CphA wurden mit dem C-terminal getaggten Protein aus pMEX8 und den daraus erhaltenen Mutanten analog zu <sup>144</sup> durchgeführt. Die Proteine wurden zumeist nicht im Rohlysat assembliert, sondern als Apoproteine aufgereinigt, um eine Charakterisierung der Bilin-lyaseaktivität zu ermöglichen. Durchschnittliche Ausbeuten an photoaktivem Protein lagen bei etwa 6 mg pro Liter Kultur. Die eigenen Konstrukte von CphA boten entweder geringere Ausbeuten an assemblierbarem Protein (C-terminal His(6) getaggt CphA in pET28a) oder wurden nicht als Vollängenprotein exprimiert bzw. aufgereinigt (N-terminal His(6) getaggt CphA in pET28a).

Bei einigen Mutanten wurde eine zum Teil erheblich eingeschränkte Proteinstabilität beobachtet, was sich durch sehr geringe Expressionsniveaus oder durch die Bildung von Einschlusskörperchen während der Expression bemerkbar machte.



**Abbildung 3.5.1** CphA nach Ni-NTA Aufreinigung und Umpuffern.

*Insert:* Coomassie-Gel mit CphA. Die CphA-Dimerbande ist ebenfalls deutlich zu erkennen.

Die Aufreinigung des CphA-Wildtypproteins sowie der Mutanten erfolgte über eine optimierte Ni-NTA Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration oder Dialyse. Ein typisches Ergebnis einer CphA-Aufreinigung ist in Abb. 3.5.1 dargestellt. Als typischerweise verwendetes Maß für den Aufreinigungsgrad von Phytochromen ist die „specific absor-

“*bance ratio*“, kurz SAR, gebräuchlich. Sie beschreibt das Verhältnis von Absorptionsmaximum der P<sub>r</sub>-Form zur Absorption bei 280 nm und liegt für Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 bisher bei maximal 1,0<sup>56</sup> und bei hochaufgereinigtem *Avena sativa* Phytochrom bei maximal 1,1 (Vollängenprotein, nativ aufgereinigt<sup>158</sup>) bis 1,6 (heterologe Expression des 65 kDa Fragments<sup>159</sup>). Durch eine zusätzliche Anionenaustauscher-Chromatographie konnte für das CphA-Wildtypprotein eine maximale SAR von 0,857 erreicht werden. Der aus diesem Wert und dem Extinktionskoeffizienten bei 280 nm<sup>@</sup> errechenbare Extinktionskoeffizient bei 663 nm liegt mit ca. 73000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> etwas unter dem Wert, der für das homologe Protein aus *Synechocystis* PCC6803 ermittelt wurde ( $\epsilon_{660\text{nm}}$  von Cph1 = 85000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,<sup>56</sup>).

### 3.5.2 Assemblierung von CphA mit PCB

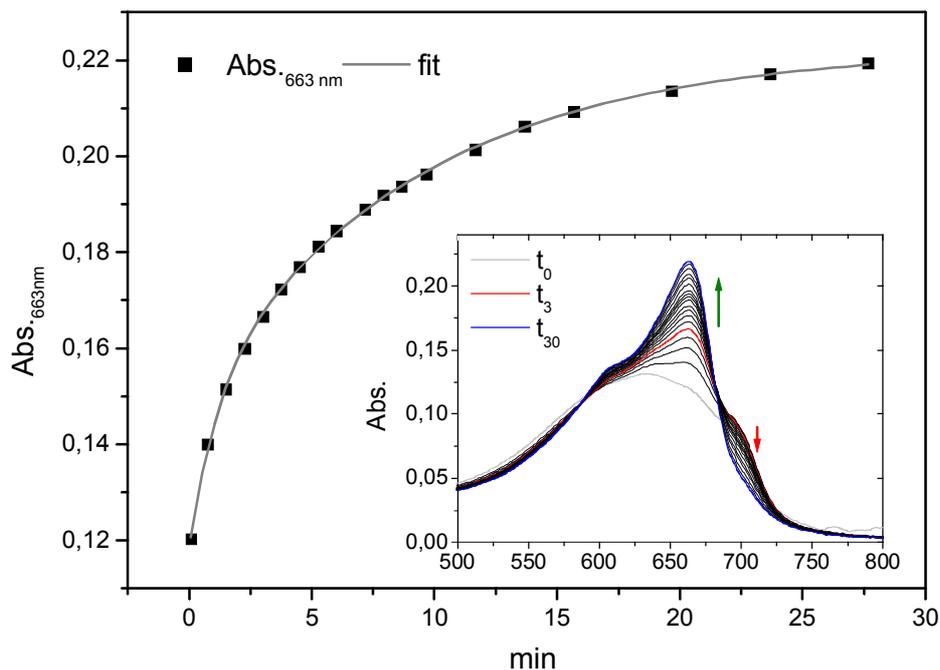
CphA zeigt, ebenso wie Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803<sup>56</sup>, während der Assemblierung ein Intermediat bei etwa 700 nm. Die Natur dieses Intermediats ist noch nicht geklärt, es wird im Fall von Cph1 jedoch vermutet, daß während des Einbaus eine Protonierung des Chromophors stattfindet<sup>56</sup>, was in diesem speziellen Fall mit dem Auftreten von Protonierungs- /Deprotonierungsreaktionen des Proteins während der Photoisomerisierung<sup>108</sup> begründet wird (dies kann aber auch lediglich eine Seitenkette des Proteins betreffen). In Abb. 3.5.2 ist die Assemblierungskinetik von CphA gezeigt. Die weitergehende Diskussion des Assemblierungsdifferenzspektrums bzw. der Assemblierungsintermediate erfolgt in Kap. 3.6.7 auf Seite 114. Bei den Assemblierungskinetiken ist zu beachten, daß ein Großteil der Reaktion (ca. 60-70%) zum Zeitpunkt der ersten Messung bereits beendet ist, wodurch die Werte über den Rahmen der Fit-Genauigkeit hinaus von Experiment zu Experiment etwas schwanken können.

Die Reaktion folgt einem biexponentiellen Fit mit den folgenden Zeitkonstanten für  $t_1$  und  $t_2$  ( $\pm$  Fehlerwerte aus dem biexponentiellen Fit):

$$\text{CphA-PCB:} \quad 65 \text{ s } (\pm 9\%); \quad 9 \text{ min } (\pm 5\%)$$

Diese Assemblierung fand noch unter einem Restimidazolgehalt von ca. 120 mM statt. Wie später herausgefunden wurde, kann Imidazol die Assemblierungsgeschwindigkeit deutlich beeinflussen, so daß weitere Untersuchungen unter definierten Imidazolbedingungen durchgeführt wurden (Kap. 3.6.8.2). Dennoch konnten in einem Vergleich zu dem durch Punktmutation mit einem Cystein versehenen CphBmLC nahezu identische Zeitkonstanten für die Assemblierung mit PCB unter dieser Imidazolkonzentration (64 s ( $\pm$  8%) und 10 min ( $\pm$  16%)), siehe Kap. 3.6.8.2) ermittelt werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der grundlegende Mechanismus der Assemblierung in diesen beiden Proteinen identisch abläuft.

<sup>@</sup> <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>



**Abbildung 3.5.2** Assemblierungskinetik von CphA mit PCB

Die Kurve folgt einem biexponentiellen Fit mit den Zeitkonstanten  $t_1 = 65$  s und  $t_2 = 9$  min.

**Insert:** Rohdaten. Die Spektren der Zeitpunkte  $t_0 = 10$  s,  $t_3 = 3$  min und  $t_{30} = 30$  min sind in grau, bzw. rot, bzw. blau gekennzeichnet. Der grüne Pfeil zeigt eine Absorptionszunahme, der rote Pfeil eine Absorptionsabnahme an.

### 3.5.3 CphA Mutanten

*Die Natur hat zehntausend Farben, und wir haben uns in den Kopf gesetzt, die Skala auf zwanzig zu reduzieren. (H. Hesse)*

Eine Übersicht aller erstellten Mutanten ist in Tabelle 3.4.1 gegeben (Kap. 3.3.3). Aus all diesen, die möglicherweise wichtig für Funktion und Spektroskopie sein könnten, wurden bisher die in Tabelle 3.2.1 aufgeführten für genauere Analysen bearbeitet. Die Mutanten D207N, L248PR, R213I und M267L verhielten sich in den bisherigen Untersuchungen und unter den gegebenen experimentellen Bedingungen wie Wildtyp-CphA. Die Mutanten G285V und G285N, W284R und W284G, sowie L253P ergaben in vorläufigen Untersuchungen keine Phytochrom-ähnlichen Spektren oder photoaktiven Addukte, allerdings war bei diesen Mutanten die Expression und Aufreinigung problematisch (Inklusionskörperbildung, geringe Ausbeute an löslichem Vollängenprotein). Sie sollten daher unter solchen Bedingungen wiederholt werden, die auch im Fall von CphB (Kap. 3.6.2) zu erheblichen Ausbeutensteigerungen geführt haben. Ebenso konnte mit der Mutante E189Q kein photochemisch aktives Addukt erhalten werden; diese Mutation wurde bereits vorher als essentiell für die Bilinlyaseaktivität beschrieben<sup>139</sup>.

Mutante	$P_r/P_{fr}$	Isos	SAR	Anmerkungen
CphA wt	663 / 707	681	0,857	bisheriger $\epsilon_{663} = 73000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
R213I	658 / 707	678	n.d.	(geringe Ausbeute)
L248P	658 / 706	679	0,130	(wie wt)
L248R	656 / 706	n.d.	n.d.	(sehr geringe Ausbeute)
H260R	!	!	!	keine Photoreversibilität
Y263H	658 / 697	676	n.d.	(extrem langsame Assemblierung, sehr geringe Ausbeute)
Y263N	662 / 706	680	n.d.	(extrem langsame Assemblierung, sehr geringe Ausbeute)
N266A	662 / 704	680	0,580	LADS abweichend vom wt
N266D	662 / 705	680	0,390	LADS abweichend vom wt
N266G	659 / 707	680	0,590	(wie wt)
N266V	662 / 705	681	0,390	(wie wt)
M267L	661 / 707	680	0,550	wie wt
M267R	661 / !	!	[0,34]	keine echte $P_{fr}$ -Form, relaxiert thermisch innerhalb von Minuten

**Tabelle 3.5.1** CphA Mutanten

$P_r / P_{fr}$ : Maximum / Minimum des Differenzspektrums; **Isos**: Isosbestischer Punkt der  $P_r$  und  $P_{fr}$  Formen; **SAR**: "specific absorbance ratio", Grad der Aufreinigung (optimaler Wert liegt derzeit bei ca. 1 für CphI aus *Synechocystis* PCC6803<sup>56</sup>); **LADS**: "lifetime associated difference absorbance spectra"; Anmerkungen in **Klammern** geben vorläufige Ergebnisse an. **!**: deutliche Abweichung vom wt, es kann kein Wert angegeben werden. Spektren siehe Abb. 3.5.3.

In Abb. 3.5.3 sind die Spektren derjenigen CphA Mutanten abgebildet, welche sich weitgehend wie das Wildtyp-Protein verhalten. Ein Teil dieser Mutanten wurde in Zusammenarbeit mit Leja Jorissen (MPI für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr) analysiert, die auch die zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse (LADS) von N266A, N266D und dem wtCphA vornahm. Die Mutanten Y263H und Y263N assemblierten sehr langsam, ihre Spektren wurden erst nach drei Tagen Inkubation mit PCB erhalten und zeigen noch den deutlichen Überschuss an Chromophor. Die Spektren von L248R wurden bisher nur im Rohlysate aufgenommen, alle anderen abgebildeten Mutanten wurden im Rohlysate assembliert und zeigen das jeweilige Protein nach Ni-NTA Aufreinigung und Umpuffern.

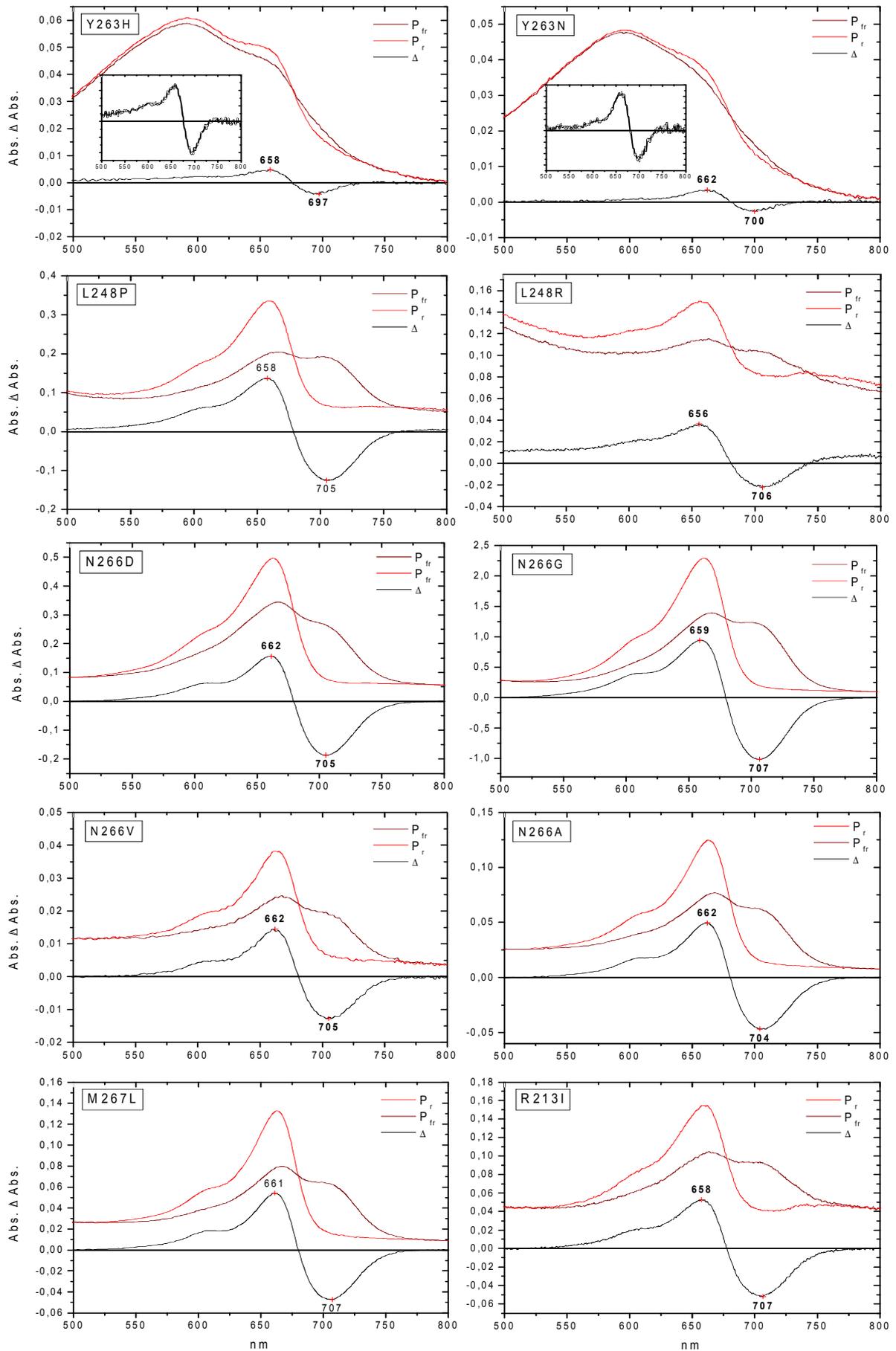
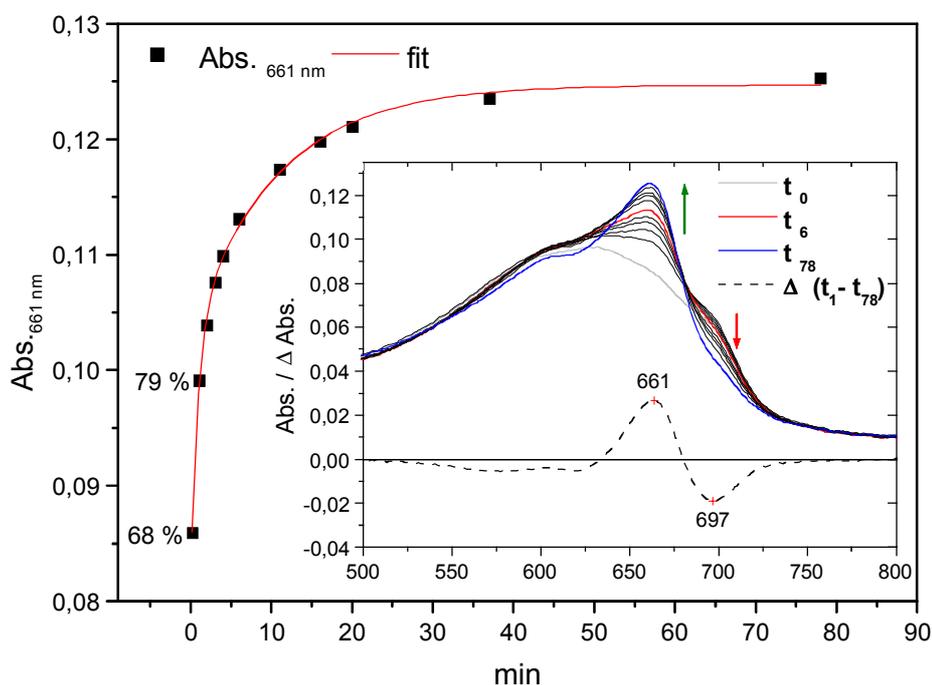


Abbildung 3.5.3 Spektren verschiedener CphA Mutanten, Anmerkungen siehe Text.

### 3.5.4 Die Mutationen M267R und M267L

Die Position M267 stellt eine der hochkonservierten Aminosäuren in wahrscheinlich unmittelbarer Nähe des Chromophors dar (Abb. 3.4.1 und 3.2.2). Die Mutation M267L ist ein sehr konservativer Aminosäureaustausch und zeigt keinerlei signifikante Änderungen gegenüber wtCphA bezüglich der spektralen Eigenschaften (Abb. 3.5.3, unten links) oder der Assemblierung mit PCB (Abb. 3.5.4).



**Abbildung 3.5.4** Die Mutante M267L. Assemblierungskinetik und biexponentieller Fit.

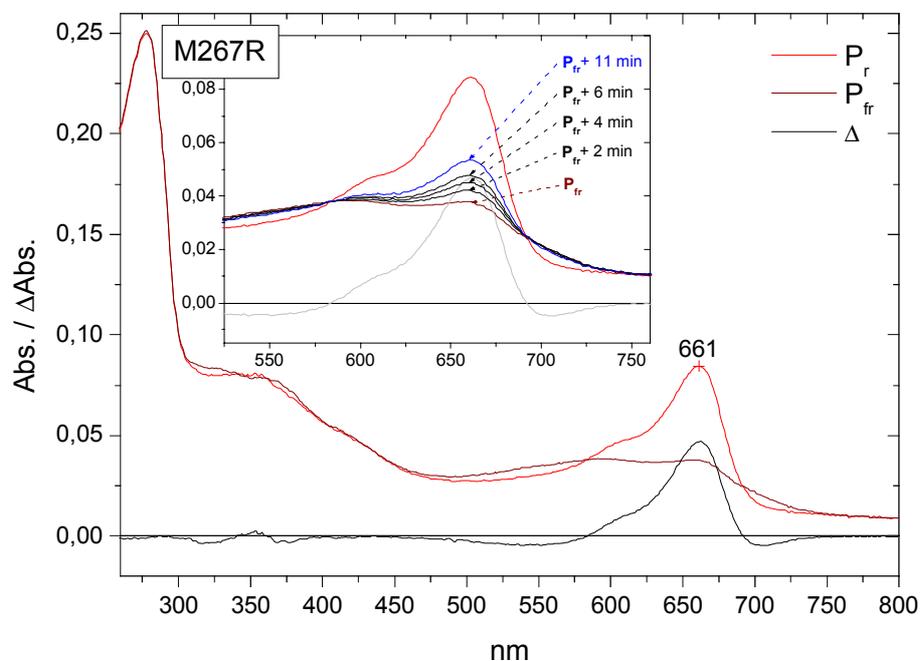
*CphA* wurde als Apoprotein aufgereinigt und mit einem 3fach molaren Überschuss an PCB bei 15°C im Dunklen assembliert. Die Prozentangaben beziehen sich auf das Ende der Reaktion (=100%). **Insert:** Spektren der Assemblierung und Assemblierungsdifferenzspektrum.

Die Assemblierungsdaten folgen einem biexponentiellen Fit mit folgenden Zeitkonstanten für  $t_1$  und  $t_2$  ( $\pm$  Fehlerwerte aus dem Fit):

$$\text{CphA M267L: } \quad 52 \text{ s } (\pm 15\%); \quad 10 \text{ min } 37 \text{ s } (\pm 12\%)$$

Diese Daten liegen eng an den mit wtCphA ermittelten Werten (65 s, 9 min). Wie ebenfalls aus Abb. 3.5.4 zu entnehmen, zeigt auch M267L während der Assemblierung ein Intermediat bei ca. 700 nm analog zu CphA.

Die Mutation M267R stellt eine nichtkonservative Aminosäuresubstitution dar, bei der eine positive Ladung in die Chromophorbindetasche eingefügt wird. Wie in Abb. 3.5.5 zu sehen, ruft diese Mutation extreme Veränderungen der spektralen Eigenschaften hervor, läßt die Bilinlyaseaktivität von CphA aber grundsätzlich intakt. Erste Messungen zur Assemblierungskinetik zeigten ein eher normales Assemblierungsverhalten. Besonders auffällig ist aber die beinahe achromatische  $P_{fr}$ -Form von M267R, die nicht wieder durch Dunkelrotbelichtung in die  $P_r$ -Form zurückbelichtet werden kann. Die Reversion zur  $P_r$ -Form findet jedoch innerhalb kurzer Zeit durch eine spontane thermische Relaxation statt. Das beobachtete Differenzspektrum ähnelt in seiner Form stark dem des tryptischen 39 kDa Verdaufragments von Haferphytochrom A <sup>58</sup>.



**Abbildung 3.5.5** Die Mutante M267R

**Insert:** Hier ist die schnelle Dunkelreversion von M267R gezeigt, das Differenzspektrum ist in grau angedeutet, Pfeile markieren die  $P_{fr}$ -Formen zu verschiedenen Zeitpunkten.

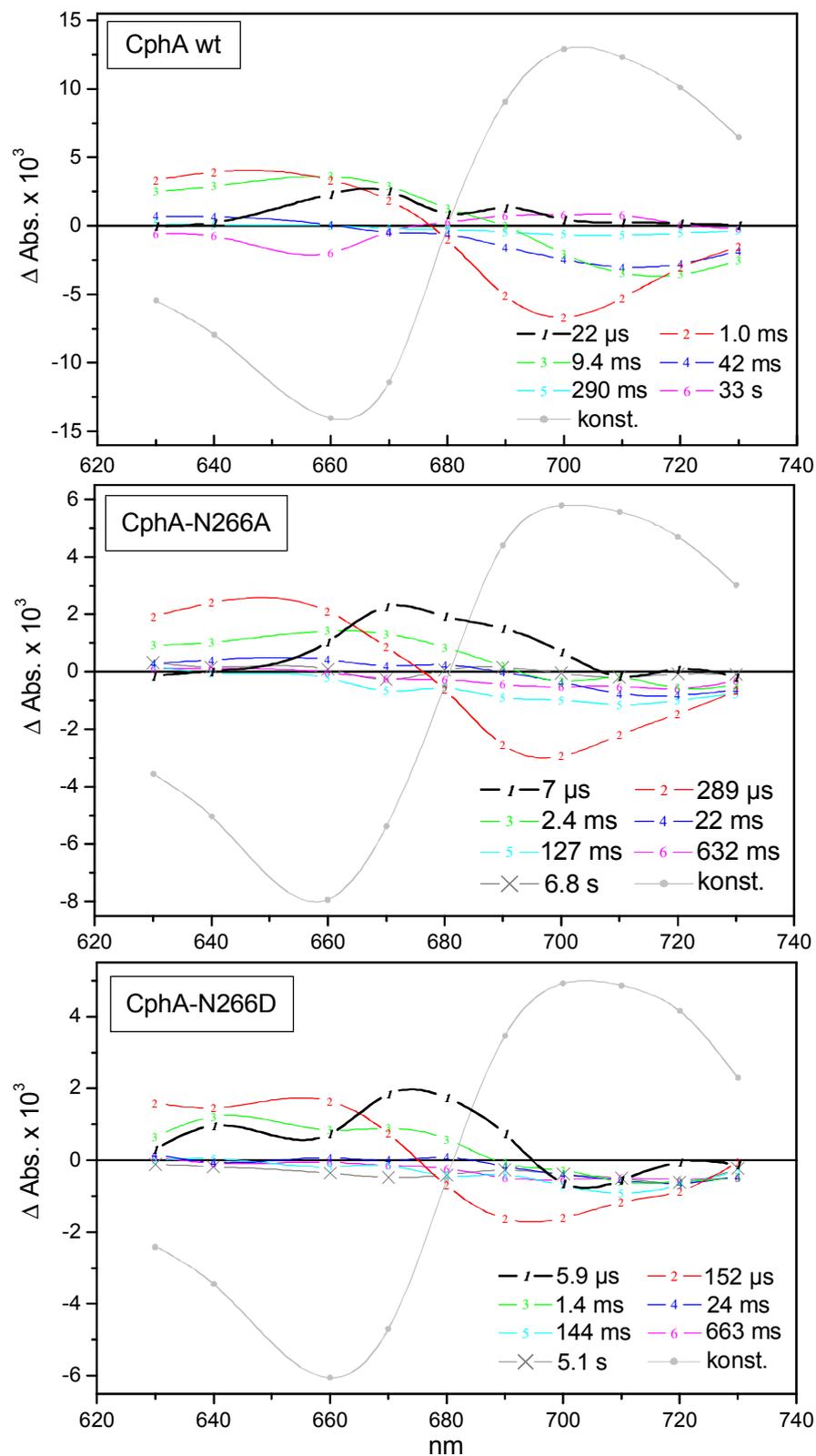
Die extremen Änderungen der  $P_{fr}$ -Form von M267R lassen die Vermutung zu, daß sich das eingefügte Arginin in unmittelbarer Nähe des D-Rings D von PCB befindet. So erzeugt ein Vertauschen der Ethylidengruppe von  $C_{17}$  nach  $C_{18}$  am D-Ring von PCB im Haferphytochrom eine Blauverschiebung der  $P_{fr}$ -Form <sup>96</sup>. Andere Modifikationen an Ring D zeigten ebenfalls deutliche Beeinträchtigungen der  $P_{fr}$ -Form von Phytochrom B <sup>97</sup>. Das sehr flache und breite  $P_{fr}$ -Spektrum (sehr ähnlich dem freien Chromophor in Lösung) läßt mutmaßen, daß die Photoisomerisierung der  $C_{15}$ - $C_{16}$  Doppelbindung durch sterische oder ionische Wechselwirkungen

mit dem Arginin eventuell zu einem Herausstoßen des Chromophors aus der Bindetasche führt (wobei er natürlich am Cystein gebunden bleibt). Desweiteren fällt auf, daß diese aberrante Photoisomerisierung nach Rotbelichtung des M267R fast vollständig abläuft, im Gegensatz zu allen anderen Mutanten und dem wtCphA, die nach Rotbelichtung immer noch einen großen Anteil P<sub>r</sub>-Form im P<sub>fr</sub>-Spektrum aufweisen. Dies könnte an der Anomalie der P<sub>fr</sub>-Form liegen, die bei der gegebenen Belichtungswellenlänge nicht photorevertieren kann. Die beobachtete Reversion entspräche dann einem „Zurückfinden“ des Chromophors in die ZZZ-Konformation.

### 3.5.5 Die Mutationen N266V, A, D, G

Die Position 266 befindet sich ebenfalls in der chromophorbindenden Helix von CphA, allerdings in einer Position, die nicht zwingend in direktem Kontakt mit dem Chromophor steht. In Abb. 3.2.2 ist das N266 *nicht* zu sehen, da es sich auf der vom Betrachter abgewandten Seite der Helix befindet. Die stationären Spektren aller vier Mutanten von N266 zeigen keine auffälligen Besonderheiten (siehe Abb. 3.5.3, Reihe drei und vier von oben). Entsprechende Versuche zeigten, daß diese Mutationen keinen Einfluß auf die Dunkelreversion der P<sub>fr</sub>-Formen haben. Ihren Anteil an der Chromophorbindedomäne zeigen die Mutationen N266A und N266D durch einen Einfluß auf die Kinetik der P<sub>r</sub>-P<sub>fr</sub> Photokonversion, wie mittels LADS (Kap. 2.9.4) ermittelt werden konnte. Die erhaltenen LADS mit den zugehörigen Zeitkonstanten sind in Abb.3.5.6 dargestellt. Positive Amplituden ergeben durch den verwendeten Rechenalgorithmus eine Absorptionsabnahme, negative Amplituden dagegen eine Absorptionzunahme. Das Differenzspektrum („konst.“) ist hier nach Konvention das P<sub>fr</sub> minus P<sub>r</sub> Differenzspektrum der Probe nach dem Laserpuls, negative Werte bedeuten eine Absorptionsabnahme, positive Werte eine Absorptionzunahme.

Zunächst fällt auf, daß die spektralen Eigenschaften der jeweiligen Intermediate in allen drei untersuchten Mutanten sehr ähnlich sind. Für die Interpretation der LADS ist es wichtig, zu beachten, daß sie von den apparenten kinetischen Konstanten der Datenspur bei den entsprechenden Wellenlängen aus der Photokonversion konstruiert werden und daher nicht die transienten Absorptionen der Intermediate wiedergeben, sondern Differenzspektren von einem Intermediat und dem darauf folgenden Intermediat darstellen. Der Globale Fit der Daten erfordert beim wtCphA sechs kinetische Komponenten mit Zeitkonstanten von 22 µs, 1.0 ms, 9.4 ms, 42 ms, 290 ms und 33 s<sup>107</sup>. Die erste frühe Kinetik (22 µs bei wtCphA, 7 µs bzw. 5.9 µs bei N266A bzw. N266D) zeigt einen relativ breiten Zerfall mit einem Maximum um ca. 680 nm (bei wtCphA meßfehlerbedingt etwas „eingedrückt“, Jorissen,<sup>144</sup>). In der zweiten Kinetik (1.0 ms bei wtCphA) beobachtet man einen Zerfall um 650 nm und eine Zunahme bei 700 nm, der Weg zum dritten Intermediat führt über einen Zerfall bei etwas über



**Abbildung 3.5.6** LADS von CphAwt, N266A und N266D

Die angegebenen Zeitkonstanten ergeben sich aus dem Globalen Fit der Daten und sind für das jeweilige Protein charakteristisch. Positive Amplituden bedeuten eine Absorptionsabnahme, negative Amplituden eine Absorptionzunahme, außer bei **konst.** (grau), das dem Differenzspektrum der Probe vor und nach dem Laserlichtpuls entspricht.

660 nm und einen Anstieg der Absorption zwischen 710 nm und 720 nm mit einer Zeitkonstanten von 9.4 ms (bei wtCphA). Bei der vierten Kinetik (wtCphA = 42 ms) findet ein weiterer Anstieg in diesem Wellenlängenbereich statt. Die späteren Kinetiken zeigen nur noch relativ schwache Absorptionsänderungen (die 33 s Kinetik von CphA deutet schon eher auf eine leichte  $P_{fr}$ -Reversion hin). Dieses Gesamtbild der spektralen Charakteristika der Intermediate zeigt sich bis zum vierten Intermediat auch für die Mutanten N266A und N266D. Die LADS aller weiteren Intermediate, die aus dem Globalen Fit für diese Mutanten resultieren, verlaufen sehr flach und zeichnen die Form des vierten Intermediats nach. Die auffälligsten Unterschiede dieser Mutanten sind die im Vergleich zu wtCphA drastisch verkürzten Lebenszeiten aller Intermediate. So ist die erste, frühe Mikrosekunden-Kinetik bei beiden Mutanten um den Faktor 3-4 schneller, und die späte Mikrosekunden-Kinetik sowie die frühe Millisekunden-Kinetik sind um den Faktor vier (N266A, 289  $\mu$ s und 2,4 ms) bis sieben (N266D, 152  $\mu$ s und 1,4 ms) beschleunigt. Der Zeitpunkt, an dem keine signifikanten Absorptionsänderungen mehr stattfinden, ist bei beiden Mutanten damit wesentlich früher erreicht als beim wtCphA oder bei Cph1 aus *Synechocystis* PCC 6803<sup>109</sup>. Desweiteren ist bei den Mutanten für einen optimalen Fit der Daten ein weiteres Intermediat im späten Millisekundenbereich notwendig, das jedoch nur sehr geringe Absorptionsänderungen zeigt.

Der Grund für diese extrem schnelle Photokonversion ist entweder die Änderung der Partialladung dieser Subdomäne zusammen mit möglichen (und möglicherweise daraus resultierenden) strukturellen Änderungen der Chromophorbindetasche oder aber rein sterischer Natur.

### 3.5.6 Die Mutationen Y263H, N, D

Wie bereits eingangs erwähnt, zeigen die Mutationen Y263H und Y263N, beides wenig konservative Aminosäuresubstitutionen, deutliche Effekte auf die Effizienz der Bilinlyaseaktivität. Zwar konnte bei diesen Mutanten immer noch ein Einbau von PCB beobachtet werden, allerdings erfolgte dieser etwa um den Faktor 20 bis 40 langsamer als beim wtCphA. Aufgrund dieses extrem langsamen Einbaus war es bisher nicht möglich, eine quantitative Analyse dieses Vorgangs durchzuführen, zumal für den bisherigen Versuch zusätzlich ein weit höherer Überschuss an PCB zugesetzt werden mußte, der eine Auswertung der gebildeten  $P_r$ -Form stark erschwerte. Zusätzlich war die Ausbeute an photoaktivem Material sehr gering. Die spektralen Eigenschaften der jeweiligen PCB-Addukte (Abb. 3.5.3, erste Reihe) zeigten eine Blauverschiebung der  $P_{fr}$ -Formen (697 nm und 700 nm für Y263H und Y263N) verglichen mit wtCphA (707 nm). Bei der Mutante Y263D war die Ausbeute an löslichem Protein sehr gering und es konnte bisher kein PCB-Addukt erhalten werden. Die Ergebnisse mit einer entsprechen-

enden Mutante von Haferphytochrom A (Y327F) zeigten keinerlei Beeinträchtigung der Bilinlyaseaktivität<sup>175</sup>, was zeigt, daß es sich hierbei offensichtlich nicht um eine katalytisch essentielle Aminosäure handelt.

Da die Position 263 im CphA, wie in Abb. 3.2.2 gezeigt, theoretisch in unmittelbarem Kontakt mit dem Chromophor stehen kann, könnte es eine wesentliche Rolle bei der korrekten Positionierung des Chromophors für die nachfolgenden Reaktionen der Thioetherverknüpfung spielen (hier störte auch der konservative Aminosäureaustausch von Y nach F nicht). Eventuell ist Y263 auch für die allgemeine strukturelle Integrität von CphA wichtig, was durch die relativ niedrigen Ausbeuten an löslichem Protein (gerade bei Y263D) angedeutet wird. Die geringe, aber dennoch sichtbare Beeinträchtigung der Photoreversibilität stimmt mit der exakten theoretischen Position des Y263 auf Höhe des C<sub>10</sub> Kohlenstoffatoms von PCB (zwischen Ring B und Ring C) überein, die eine Photoisomerisierung der C<sub>15</sub>-C<sub>16</sub> Doppelbindung nicht beeinträchtigen sollte.

### 3.5.7 Die Mutation H260R

Das dem Cystein benachbarte Histidin (H260 in CphA, H322 in phyA von Hafer, H324 in phyA aus Erbse, siehe auch Alignment im Anhang) ist in allen bisher veröffentlichten Phytochromsequenzen, ob eukaryotischen oder prokaryotischen Ursprungs, konserviert. Die Mutation dieser Aminosäure in phyA von Hafer und Erbse unterbindet die Bildung photoaktiver Addukte<sup>176, 175, 84</sup>, obwohl in einigen Fällen nach der Assemblierung eine Zn<sup>2+</sup>-Fluoreszenz detektiert werden kann<sup>176, 175</sup>. Eine Mutation dieser Aminosäure in Bacteriophytochromen wurde bisher nur in Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* durchgeführt<sup>49</sup>, in dem das benachbarte Cystein, welches in pflanzlichen Phytochromen die Chromophorligationsstelle darstellt, nicht vorhanden ist. Bph1 verliert nach Mutation des Histidins seine chromatischen Eigenschaften (wie auch CphB H267T, Kap. 3.6.12) und zeigt keinerlei Chromophoreinbau mehr<sup>20</sup>.

Bei der Mutante H260R konnten mit PCB keine photoaktiven Addukte erhalten werden. Es konnte desweiteren kein sukzessiver Einbau von Chromophor beobachtet werden, was den Schluß nahelegt, daß das Histidin 260 im CphA die gleiche Aufgabe übernimmt wie in den pflanzlichen Phytochromen. Da Histidin aufgrund seines relativ neutralen pK<sub>a</sub>-Werts sowohl als Protonendonator als auch als Protonenakzeptor dienen kann, ist es häufig an katalytischen Prozessen beteiligt. Für die Thioetherverknüpfung ist eine Protonierung von C<sub>3</sub> des (PΦB) Chromophors im Verlauf der Reaktion nötig<sup>176</sup>. Für diese Reaktion käme das Histidin nicht in Frage, wenn es im CphA als transiente Chromophorbindestelle fungiert. Eine Mutation des Cysteins von Cph1 (Position 259) aus *Synechocystis* PCC6803 zeigte mit PCB spektrale Eigenschaften, die ähnlich denen des PCB-Addukts von CphBm sind (Jon Hughes,

persönliche Mitteilung). Es liegt daher nahe, daß das Histidin in CphA und Cph1 eine ähnliche Rolle spielt wie in den Bacteriophytochromen ohne Cystein in der Chromophorbindetasche, indem es den Chromophor über die Ketofunktion des A-Rings von PCB bindet und, im Falle von Cph1 und CphA, für den darauffolgenden Angriff des Cysteins positioniert.

### 3.5.8 Zusammenfassende Diskussion zu den CphA Mutanten

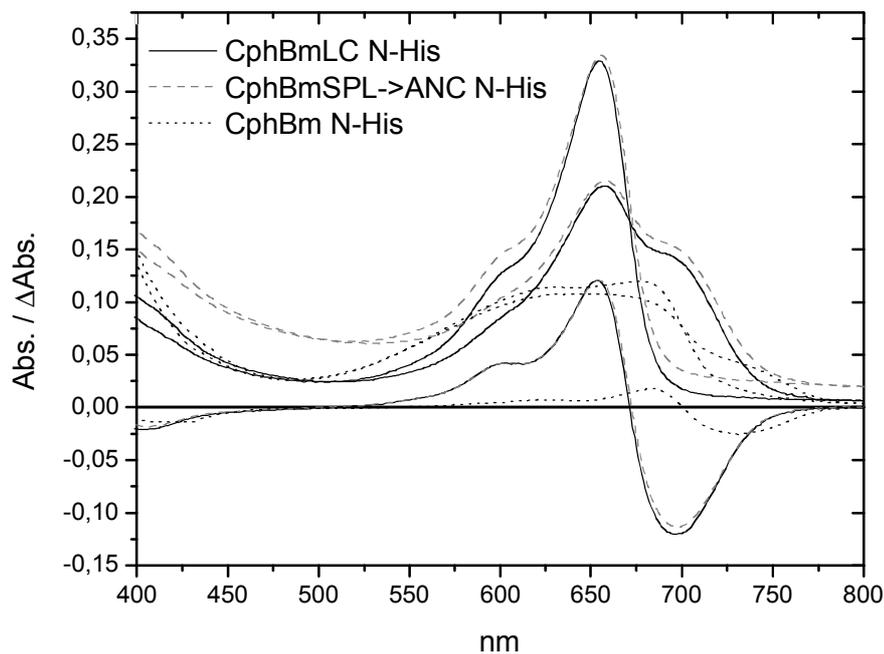
Zusammenfassend konnten aus den Experimenten mit CphA folgende Ergebnisse erhalten werden:

- 1) Die Ausbeute von photoaktivem wtCphA konnte im Vergleich zu früheren Arbeiten ver-sechsfacht werden. Eine noch weitergehende Steigerung der Ausbeute und der Qualität erscheint nach den mit CphBm gewonnenen Erkenntnissen (folgende Kapitel) möglich.
- 2) Der Großteil der eingefügten Mutationen wirkt sich nicht unmittelbar auf die spektralen Eigenschaften von CphA aus.
- 3) Ein Teil der Mutationen hat Einflüsse auf die strukturelle Integrität (W284R und W284G, G285V und G285N). Die Mutante W284 wurde schon in Haferphytochrom A (dort Pos. W366) als wichtig für die Proteinstabilität beschrieben <sup>84</sup>, und die Position 285 im CphA entspricht einer Arabidopsis phyA Mutante (phyA109, Pos. G367), die deutlich reduzierte Mengen an phyA aufweist <sup>160</sup>. Dies spricht dafür, daß das hochkonservierte Motiv LWGL für die strukturelle Integrität von Phytochromen wichtig ist. Gleiches könnte für die Mutationen R213I, L248R und L253P zutreffen. Bei diesen CphA Mutanten konnten bisher ebenfalls keine photoaktiven Proteine erhalten werden.
- 4) Die Aminosäure E189 ist nach bisherigen Untersuchungen essentiell für die Bilinlyase-aktivität.
- 5) Das Asparagin 266 ist wahrscheinlich nicht in unmittelbarem Kontakt mit dem Chromo-phor, stellt aber einen Bestandteil der Chromophorbindetasche dar, was durch die extrem beschleunigte Photokonversion der Mutanten N266A und N266D angezeigt wird.
- 6) Die Mutante M267R zeigt keine echte  $P_{\beta}$ -Form mehr und die Rückkehr zur  $P_r$ -Form erfolgt über thermische Relaxation, was den Schluß nahelegt, daß sich M267 in CphA in unmittel-barer Nähe des D-Rings von PCB befindet. Damit erscheint die in Abb. 3.2.2 vorgeschla-gene Orientierung des Chromophors wahrscheinlich.
- 7) Das Histidin 260 ist für die Chromophorligation (wie schon für pflanzliche Phytochrome berichtet <sup>84</sup>) essentiell. Experimente mit CphBmLC (Kap. 3.6.5) weisen auf eine Aufgabe als transiente Chromophorbindestelle hin.
- 8) Offene Fragen: Die bei Cph1 berichtete Chromophorselektivität <sup>56</sup> sollte in CphA durch Austausch der N-Termini von CphA und CphBm (Abb. 3.3.3) untersucht werden. Die Rolle des Histidins als transiente Chromophorbindestelle könnte durch eine Mutation des Cysteins aufgeklärt werden.

## 3.6 CphBm-Konstrukte aus heterologer Expression

### 3.6.1 Aufreinigung und Spektroskopie von CphBm, CphBmL266C und CphBm SPL→ANC (mit N-terminalem His(6)-tag)

Wie bereits in Kapitel 3.3.2 erwähnt, führte die Aufreinigung der N-terminal His(6) markierten Konstrukte letztlich zur Erkenntnis, daß sie für eine detaillierte Charakterisierung ungeeignet sind, da sie unter den angewandten Expressionsbedingungen nicht vollständig translatiert wurden, die unfertigen Fragmente aber aufgrund des N-terminalen His(6)-tags mit aufgereinigt wurden. Eine Abtrennung dieser Fragmente mittels Gelfiltration war durch den extrem niedrigen Anteil an Vollängenprotein nicht sinnvoll. Die Dreifach-Mutante CphBm SPL→ANC (Positionen 264 bis 266 in CphBm) wurde ausschließlich als N-terminal markierte Variante untersucht. Dies erschien gerechtfertigt, da sie identische spektrale Eigenschaften zeigte wie das N-terminal His(6) markierte CphBmLC, das in den folgenden Kapiteln als C-terminal His(6) markiertes Vollängenprotein (wie auch CphBm) eingehender charakterisiert wird.



**Abbildung 3.6.1** Spektrale Eigenschaften von CphBm, CphBmLC und CphBm SPL→ANC

Absorptions- und Absorptionsdifferenzspektren der N-terminal mit His(6)-tag ausgestatteten Konstrukte. PCB-Addukte von CphBm vor, CphBmLC und CphBm SPL→ANC nach Ni-NTA Aufreinigung. Die Spektren von CphBmLC und CphBm SPL→ANC wurden der besseren Vergleichbarkeit halber normiert.

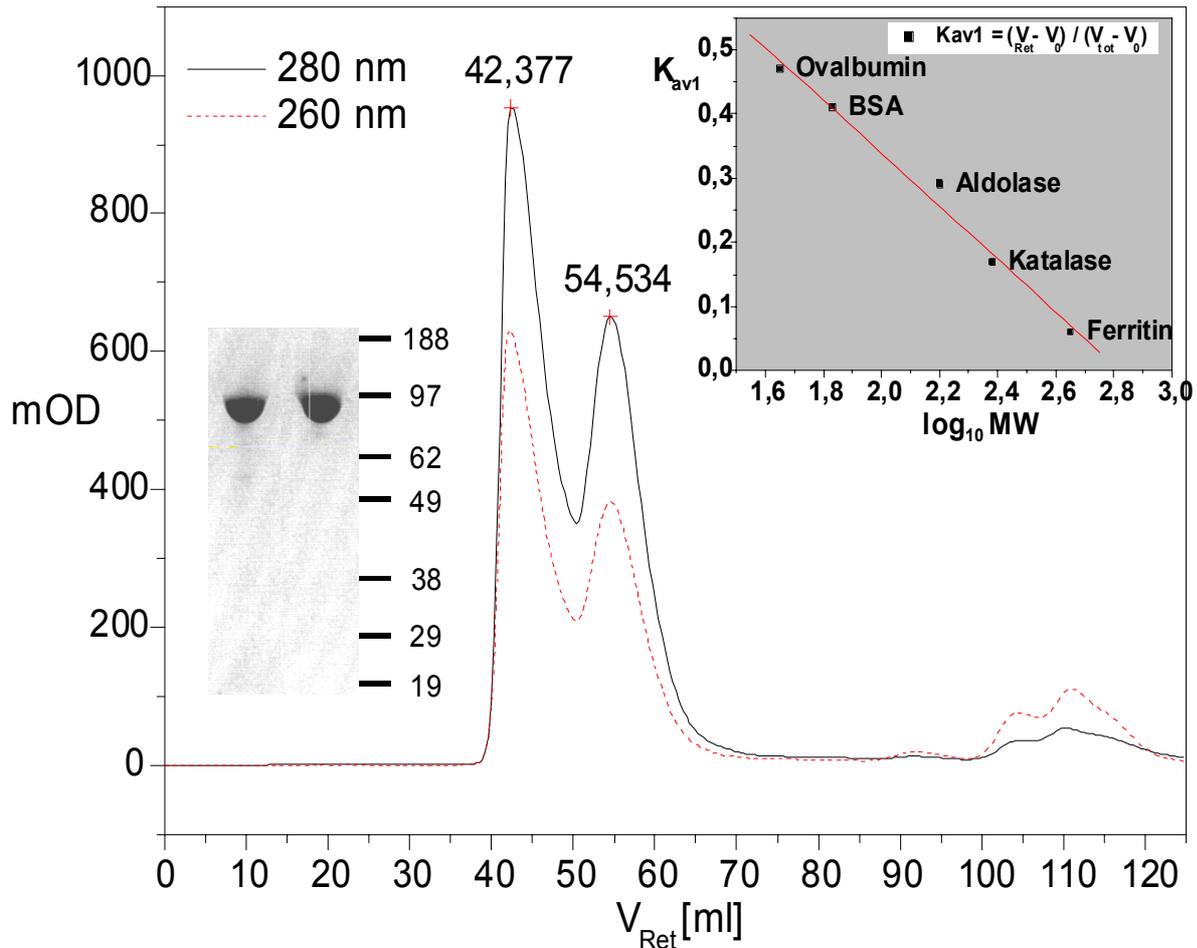
Wie in Abb. 3.6.1 zu erkennen, weisen die PCB-Addukte von CphBmLC und CphBm SPL→ANC gegenüber dem Wildtyp-CphBm eine hypsochrome Verschiebung von etwa 30 nm für beide Maxima auf. Aufgrund der fast identischen Spektren der beiden mit Cystein versehenen Proteine wurde mit den C-terminal His(6) markierten Konstrukten von CphBmLC und CphBm weitergearbeitet, da die hier beschriebenen Proteine nur zu einem geringen Anteil als Vollängenproteine aufgereinigt werden konnten und für die weiteren Untersuchungen keine Heterogenität der Proben erwünscht war.

### 3.6.2 Aufreinigung von CphBm und CphBmLC (mit C-terminalem His(6)-tag)

Alle folgenden Ergebnisse aus der heterologen Expression von CphB wurden mit dem N-terminal verlängerten, C-terminal getaggten Protein CphBm(LC) erhalten. Die Proteine wurden, wenn nicht anders angegeben, nicht im Rohlysate assembliert, sondern als Apoproteine aufgereinigt, um eine Charakterisierung der Bilin-lyaseaktivität zu ermöglichen.

Die Aufreinigung erfolgte über eine optimierte Ni-NTA Affinitätschromatographie mit anschließender Gelfiltration oder Dialyse. Die Anfangsbedingungen zur Aufreinigung von CphB und CphBmLC beinhalteten in den hier geschilderten Experimenten nicht die Verwendung von reduzierenden Agentien wie DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol, was insbesondere beim CphBmLC drastische Auswirkungen auf die Eigenschaften dieses Proteins hat (siehe Kap. 3.6.5). Generell zeigten die Proteine eine starke Neigung zur Aggregation, was sich dadurch äußerte, daß sie in den Gelfiltrationsläufen zunächst stets in den Durchbruchfraktionen zu finden waren (Peak bei 42,4 ml  $V_{Ret}$ , Abb. 3.6.2). Die Zugabe von 1 mM DTT verbesserte dieses Verhalten lediglich geringfügig, die Erprobung anderer Additiva, wie Glycerin, PEG oder milder Detergentien wurde noch nicht im Detail untersucht. Nur durch eine unmittelbare Abfolge der beiden Aufreinigungsschritte (Ni-NTA und Gelfiltration) konnte CphBmLC sowie die Mutante H267A (ohne Abb.) auf der Gelfiltrationssäule als Dimer dargestellt werden (Peak bei 54,5 ml  $V_{Ret}$ , Abb. 3.6.2). Wie diese Abbildung ebenfalls zeigt, liegt CphBmLC bereits 16 Stunden nach der Ni-NTA Aufreinigung zu über 50% als Agglomerat vor.

Das experimentell ermittelte Molekulargewicht von Apo-CphBmLC errechnet sich wie in Kap. 2.7.1.2 beschrieben. Das gemittelte Ergebnis aus zwei Gelfiltrationsläufen für CphBmLC beträgt  $230 \pm 10$  kDa und entspricht damit in etwa dem Wert, der für das Apo-Cph1 aus *Synechocystis* gemessen wurde<sup>56, 161</sup>. Für Cph1 wurde jedoch berichtet, daß das Apoprotein zu einem größeren Anteil als Monomer eluiert, wohingegen das Holo protein als Dimer auftritt<sup>56</sup>, welches darüber hinaus in der  $P_r$ - bzw.  $P_{fr}$ -Form leicht unterschiedliche Laufverhalten aufweist<sup>56</sup>.



**Abbildung 3.6.2** Gelfiltrationslauf von CphBmLC

Rechts oben: Eichgerade mit den benannten Proteinen, MW in kDa. Links: Coomassie-Gel je einer Fraktion aus Peak  $V_{Ret} = 42,4$  ml (links) und  $V_{Ret} = 54,5$  ml (rechts), Molekulargewichtsmarker schematisch, Angaben in kDa.

Es wurden bisher keine weiteren Experimente zur Konzentrationsabhängigkeit oder dem Einfluß von milden Detergenzien auf die Dimerenbildung von Apo-CphBm(LC) durchgeführt. Die bisherigen Versuche mit assembliertem CphBmLC waren bezüglich des Dimerisierungszustands nicht auswertbar, da das Holo-CphBmLC lediglich in den Durchbruchfraktionen zu finden war. Daher können noch keine Aussagen über eine  $P_r$ - bzw.  $P_{fr}$  spezifische Retention, wie bei Cph1 beobachtet<sup>56</sup>, getroffen werden.

Dimerisierung stellt bei Histidinkinase eine übliche und auch funktionell relevante Eigenschaft dar<sup>59</sup>, da es sich bei der Phosphorylierung der beiden Moleküle im Dimer um eine Überkreuz-Phosphorylierung handelt. Die Aggregationsneigung des CphB und auch das Fehlen einer monomeren Form läßt jedoch die Möglichkeit zu, daß es sich bei dem beobachteten Dimer eventuell lediglich um die kleinste mögliche Aggregationseinheit handelt. Versuche zur Autophosphorylierung von CphB(cy) im Rahmen von Phosphotransfer-Experimenten mit CphBcy (Kap. 3.7.5) sowie mit heterolog exprimiertem CphB<sup>104</sup> zeigen jedoch, daß CphB die

Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt, was bei dimerisierungsdefizientem Cph1 nicht mehr beobachtet werden konnte<sup>56</sup>. Dies läßt den Schluß zu, daß es sich bei dem hier beobachteten Dimer um die native Form von CphBm(LC) handelt.

CphBm(LC) konnte durch das hier beschriebene Verfahren zur Homogenität aufgereinigt werden. Es waren, wie in Abb. 3.6.2 zu sehen, keine weiteren Coomassie-Banden erkennbar. Der höchste in dieser Arbeit erhaltene SAR-Wert für CphBmLC ist 0,832 nach der Assemblierung mit einem 10-fachen Überschuß an PCB und anschließender zweiter Gelfiltration. Mit dem theoretisch ermittelten<sup>162</sup> Extinktionskoeffizient bei 280nm von  $99480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für Apo-CphBmLC<sup>@</sup> ergibt sich daraus ein Extinktionskoeffizient bei 656 nm von  $82600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, daß durch weitere Optimierung der Expressionsbedingungen bezüglich IPTG-Konzentration und Dauer der Expression ein geringfügig höherer Wert erhalten werden könnte, jedoch liegt der hier erhaltene Wert bereits sehr nah am veröffentlichten Wert für Cph1 aus *Synechocystis*. Der höchste bisher für Cph1 erreichte SAR-Wert liegt bei 1,0, der daraus errechnete maximale Extinktionskoeffizient bei 656 nm liegt bei  $85000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>56</sup>. Der maximale SAR-Wert vom PCB-Addukt des CphBm ist bisher 0,608. Der Grund für diesen vergleichsweise niedrigen Wert liegt höchstwahrscheinlich in der instabilen (nichtkovalenten) Einlagerung des Chromophors in das Protein, was zur Folge hat, daß man keine vollständig assemblierte Probe erhalten kann. Eventuell wirkt sich aber auch die andersartige Konformation des Chromophors in der Binde-tasche auf den Extinktionskoeffizienten der P<sub>r</sub>-Form im CphBm-PCB aus. In den Versuchen zur Spektroskopie und zur Assemblierung konnten bisher keine Unterschiede zwischen agglomerierten und nicht-agglomerierten Proteinen festgestellt werden. Mehrere Wochen alte Proben verhielten sich bezüglich ihrer Chromophoreinbaukinetik und ihrer spektralen Eigenschaften wie frische Proben. Offensichtlich scheinen die Chromophorbindingdomäne und die für die Chromophorligation notwendigen Bereiche des Proteins demnach von dieser Agglomeration weitgehend unbeeinflusst zu bleiben.

---

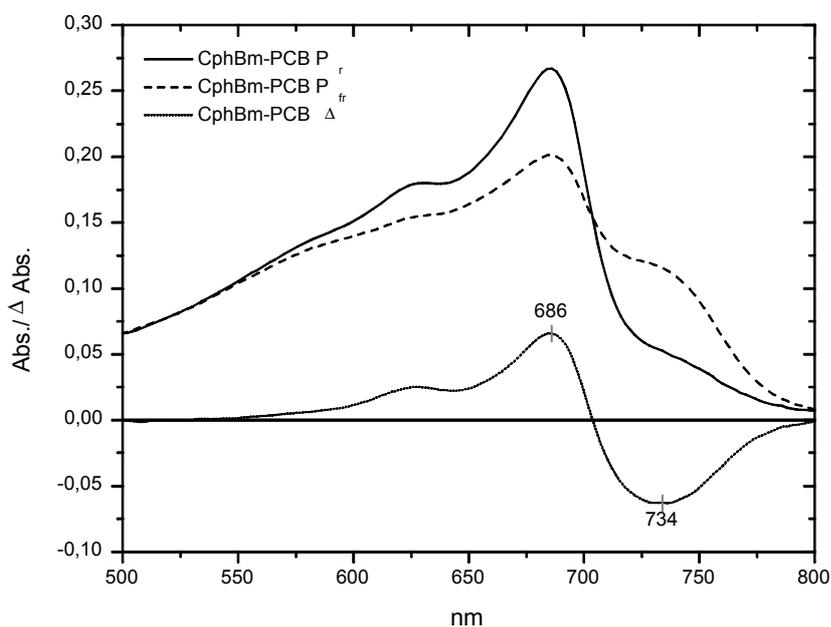
<sup>@</sup> <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>

### 3.6.3 Spektroskopie und Assemblierung von CphBm

#### 3.6.3.1 CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen, PCB-Addukt

Wie eingangs erwähnt, wurde die Aufreinigung zunächst unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Assemblierungen fanden, wenn nicht anders angegeben, mit einem 2-3 fachen molaren Chromophorüberschuß, bei einem pH-Wert von 8,0 und einer Temperatur von 10°C statt. Die weiteren Parameter zur Spektroskopie sind dem Methodenteil Kap. 2.9 zu entnehmen.

Die in Abb. 3.6.3 dargestellten Spektren zeigen das PCB-Addukt von CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen. Die Maxima und Minima des Differenzabsorptionsspektrums liegen bei 686 nm und 734 nm. Die deutliche Schulter bei ca. 580 nm ist auf den Überschuß an PCB in nichtreduzierendem Milieu zurückzuführen. Verglichen mit CphA sind die Spektren von CphBm-PCB um ca. 25 nm rotverschoben, was darauf hindeutet, daß die 3-3' Doppelbindung an Ring A des PCB (die Ethyliden-Gruppe) intakt bleibt, während sie beim CphA (663/708 nm) durch die Thioether-Verknüpfung verloren geht und das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem dadurch verkürzt wird.



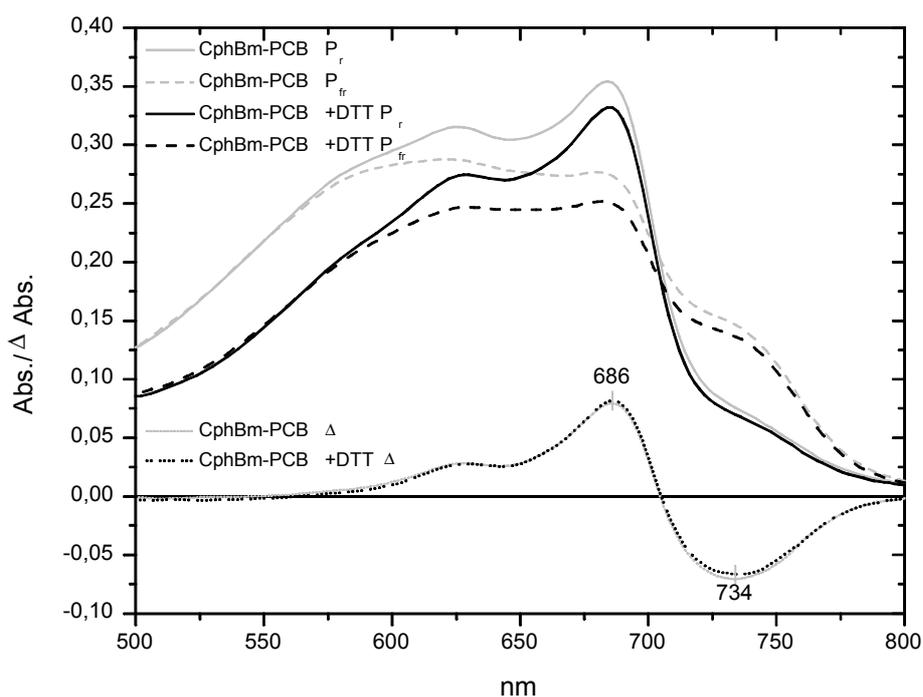
**Abbildung 3.6.3** CphBm-PCB unter nichtreduzierenden Bedingungen

PCB Addukt von CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen. Abs.: Absorption,  $\Delta$  Abs.: Differenzabsorption  $P_r$  minus  $P_{fr}$ .

## 3.6.3.2 CphBm unter reduzierenden Bedingungen, PCB-Addukt

Unter leicht reduzierenden Bedingungen (1 mM DTT) verhielt sich das CphBm-PCB Addukt genauso wie unter nichtreduzierenden Bedingungen. Den in Abb. 3.6.4 gezeigten Spektren von CphBm-PCB liegt die identische Apoprotein-Probe zugrunde wie in Abb. 3.6.3, lediglich mit 4-fachem statt 2-fachem Chromophorüberschuß (in grau) und unter 1 mM DTT (in schwarz). Die Absorptionsabnahme über den Wellenlängenbereich  $< 500$  nm bis ca. 750 nm nach Zugabe von DTT konnte experimentell auf den Einfluß von DTT auf PCB in freier Lösung zurückgeführt werden, dieser Effekt wurde in noch stärkerem Maße auch bei BV gefunden (vgl. Abb. 3.6.6).

Bei Zugabe von reduzierenden Agentien sinkt der apparente Extinktionskoeffizient bei 600 nm von freiem PCB um ca. 25%, was mit einer leichten bathochromen Verschiebung einhergeht. Bei freiem BV sinkt der apparente Extinktionskoeffizient bei 675 nm um 50-70%. Die jeweiligen Maxima der Chromophore im kurzwelligen Bereich werden allerdings nicht in diesem Ausmaß beeinflusst.



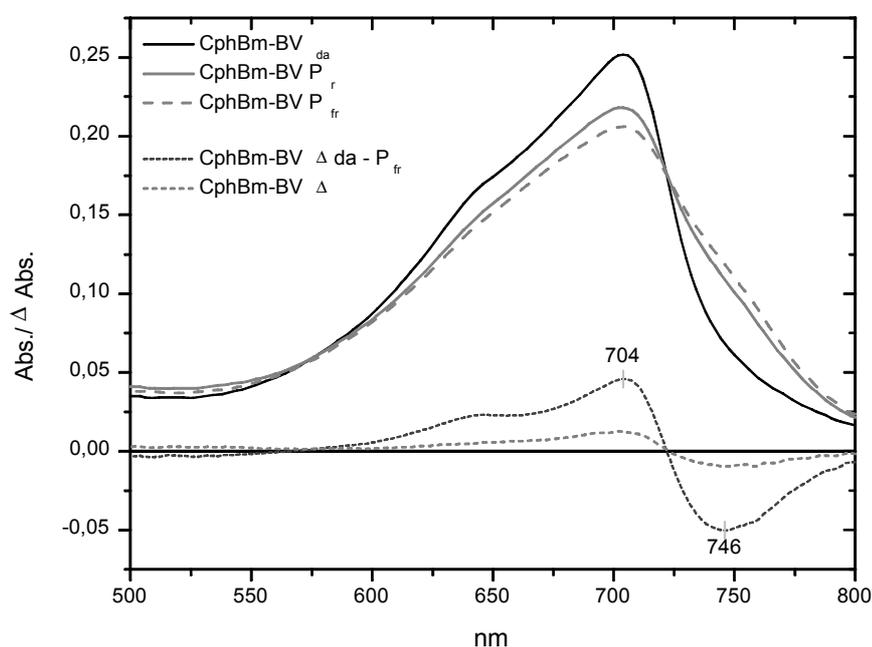
**Abbildung 3.6.4** CphBm-PCB mit 1mM DTT

PCB Addukt von CphBm unter reduzierenden Bedingungen. Abs.: Absorption,  $\Delta$  Abs.: Differenzabsorption  $P_r$  minus  $P_{fr}$ . Spektren ohne DTT in grau, identische Probe ad 1 mM DTT in schwarz.

Wie deutlich zu erkennen ist, hat DTT keinerlei Einfluß auf die Amplitude oder die Lage der Maxima des Differenzspektrums von CphBm-PCB (siehe aber Kap. 3.6.8.4), es wirkt sich hier ausschließlich auf die Absorption des noch vorhandenen freien Chromophors aus.

### 3.6.3.3 Das BV-Addukt von CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen

Die Assemblierung von CphBm mit BV ergab unter nichtreduzierenden Bedingungen die in Abb. 3.6.5 gezeigten Spektren. Die Assemblierung im Dunklen zeigt dabei das relativ gesehen deutlichste  $P_r$ -Spektrum (CphBm-BV  $da$  = dunkelassembliert) mit einem  $\lambda_{max}$  von 686 nm. Durch Rotbelichtung (636 nm bzw. 693 nm Interferenzfilter) erhielt man ein schwach ausgeprägtes  $P_{fr}$ -Spektrum, durch eine anschließende Dunkelrotbelichtung konnte jedoch die dunkel assemblierte ( $da$ )  $P_r$ -Form nicht wieder in vollem Umfang regeneriert werden. Es wurden sowohl ein 730 nm als auch ein 788 nm Interferenzfilter verwendet, das erreichbare  $P_r$ - $P_{fr}$ -Verhältnis blieb dabei aber identisch. Dennoch ist eine photochemisch aktive Spezies vorhanden, die durch wiederholte Belichtungszyklen ineinander umwandelbar bleibt. Die Differenzspektren zeigen hierbei in beiden Fällen im Vergleich zum CphBm-PCB um ca. 20 nm rotverschobene Maxima/Minima (704 nm und 746 nm). Dies ist offensichtlich der zusätzlichen Vinylgruppe an Ring D und der damit einhergehenden Verlängerung des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems zuzuschreiben.



**Abbildung 3.6.5** CphBm-BV unter nichtreduzierenden Bedingungen

BV-Addukt von CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen, Abs.: Absorption,  $\Delta$  Abs.: Differenzabsorption  $P_r$  minus  $P_{fr}$ , bzw.  $da$  minus  $P_{fr}$ .  $P_r$ : Diese  $P_r$ -Form wird aus der  $P_{fr}$ -Form durch Dunkelrotbelichtung erhalten. In *grau*: nach vier Belichtungszyklen,  $da$ : dunkelassembliert, unbelichtet.

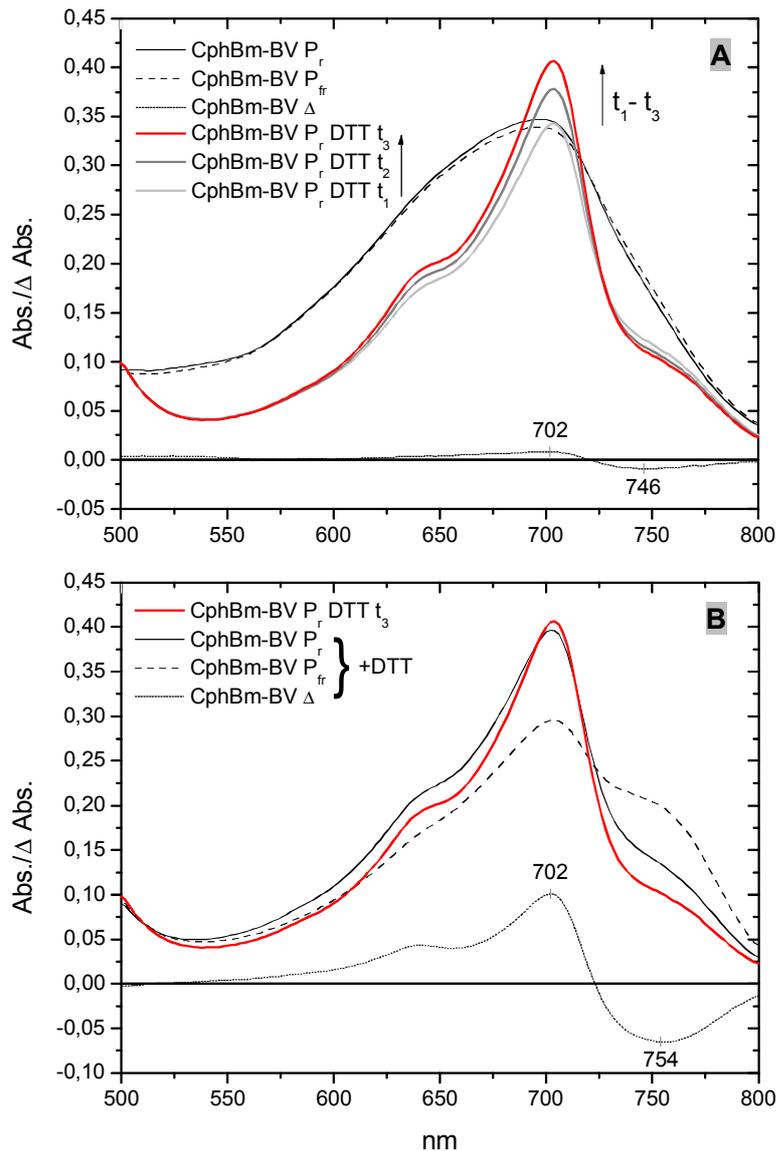
Die Anwesenheit der dunkelassemblierten (= da)  $P_r$ -Form und einer photoreversiblen  $P_r$ -Form deuten auf eine Inhomogenität der Probe bezüglich ihrer Fähigkeit zur Photo-reversibilität hin, d.h. es existieren entweder zwei  $P_{fr}$ -Formen, eine photoreversible, und eine „statische“  $P_{fr}$ -Form oder aber zwei  $P_r$ -Formen, eine „unbelichtete“  $P_r$ -Form, die bei der Assemblierung entsteht, und eine photoreversible  $P_r$ -Form. Eine alternative Möglichkeit ist, daß bei jedem der verwendeten Dunkelrotfilter auch ein wenig der erzeugten  $P_r$ -Form photochemisch angeregt und instantan wieder zur  $P_{fr}$ -Form zurückgeführt wird, so daß die ursprüngliche  $P_r$ -Menge nicht mehr erreicht werden kann. Versuche, die Probe zuerst mit dunkelrotem Licht zu bestrahlen, zeigten jedoch keinen nennenswerten Unterschied, es wurde lediglich ein geringer Anteil an  $P_{fr}$ -Form generiert, was in diesem Falle dem Absorptionsverlauf der  $P_r$ -Form zuzuschreiben ist, die in dem Wellenlängenbereich der verwendeten Dunkelrotfilter bereits eine geringe Absorption zeigt. Oder aber die durch Dunkelassemblierung generierte  $P_r$ -Form ist sterisch gehindert und kann durch Rückbelichtung nicht mehr erzeugt werden. Ein vergleichbares Phänomen tritt bei pflanzlichem Phytochrom B auf, hier wurde beobachtet, daß dieses Phytochrom in der  $P_r$ -Form aktiv ist sofern es aus der  $P_{fr}$ -Form zurückbelichtet wird<sup>163</sup>. Es bestehen dort also zwei Konformere der  $P_r$ -Form, eine unbelichtete inaktive und eine aktive, die einen Photozyklus durchlaufen hat.

#### 3.6.3.4 Das BV-Addukt von CphBm unter reduzierenden Bedingungen

Im Gegensatz zum soeben diskutierten Verhalten des PCB-Addukts von CphBm, das sich indifferent gegenüber den reduzierenden Bedingungen zeigte, ist das Verhalten von CphBm-BV unter reduzierenden Bedingungen signifikant verschieden vom Verhalten der DTT-freien Probe. Abb. 3.6.6 A zeigt die schwache Photochemie der CphBm-BV Probe aus Abb. 3.6.5 mit dem flachen Differenzspektrum (702 nm/746 nm) und das sofortige Entstehen einer „schönen“  $P_r$ -Form nach Zugabe von DTT ad 1 mM in diese Probe. Diese Beobachtung kann nicht auf einen hypochromen Effekt von DTT auf das freie BV in der Lösung zurückgeführt werden. Diese Hypochromie über einen breiten Wellenlängenbereich erklärte zwar, daß die dem Chromophorspektrum untergelagerte  $P_r$ -Form des CphBm-BV „herausgearbeitet“ wird, nicht jedoch, daß eine höhere Absorption bei ca. 700 nm erreicht wird. Es wird also durch DTT-Addition entweder ein weiterer Einbau von BV ermöglicht, oder die Absorptionseigenschaften des gebundenen bzw. eingelagerten BV werden durch die nachfolgenden Konformationsänderungen des Proteins geändert.

Abb. 3.6.6 B zeigt die Photochemie der Probe nach DTT-Zugabe (ad 1 mM, bei einer Proteinkonzentration von ca. 4  $\mu$ M). Die Spektren können nun eindeutig als Phytochrom-Spektren bezeichnet werden. Dennoch zeigt CphBm-BV auch unter diesen Bedingungen einen Anteil an nicht photoaktivierbarer  $P_{fr}$ -Form (vgl. Abb. 3.6.5), wie die 750 nm-Schulter der  $P_r$ -

Form verdeutlicht, d.h. auch hier kann der  $P_r$ -Anteil nicht vollständig durch Belichtung regeneriert werden. Allerdings wurde diese Eigenschaft des Proteins auch beim homolog exprimierten CphBcy beobachtet (Kap. 3.7.3) und stellt demnach möglicherweise eine intrinsische Eigenschaft des BV-Addukts von CphB dar. Der Einbau des Chromophors findet im CphBm-BV offensichtlich - wie allgemein für Phytochrome beobachtet - in die  $P_r$ -Form statt: das letzte  $P_r$ -Spektrum ( $t_3$ ) der unbelichteten Probe nach DTT Zugabe zeigt einen höheren Anteil an  $P_r$  und einen niedrigeren  $P_{fr}$ -Anteil als die belichtete Probe.



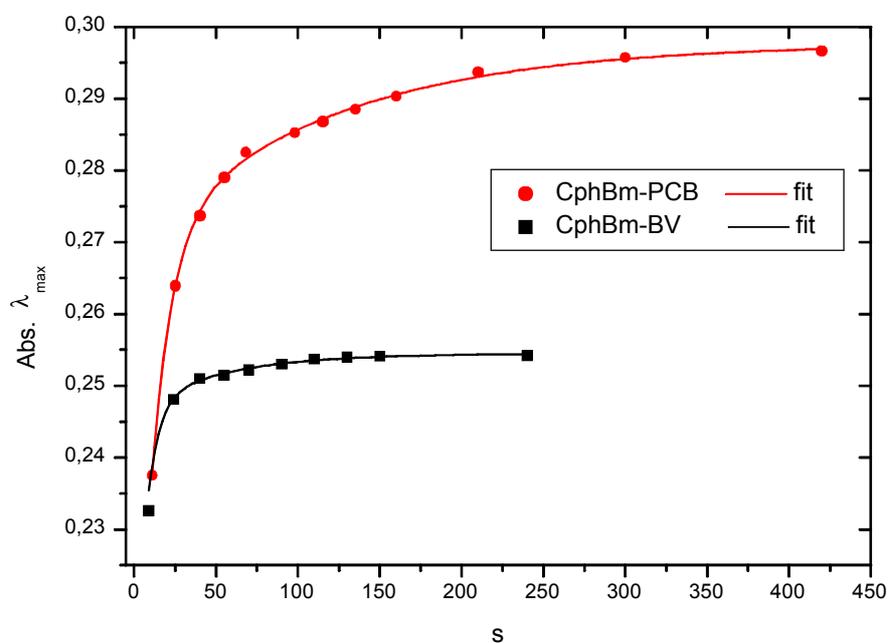
**Abbildung 3.6.6** Effekt von DTT auf die spektralen Eigenschaften von CphBm-BV

BV-Addukt von CphBm unter reduzierenden Bedingungen, Abs.: Absorption,  $\Delta$  Abs.: Differenzabsorption  $P_r$  minus  $P_{fr}$ . **A:** ohne DTT und direkt nach Zugabe ad 1 mM DTT zu drei verschiedenen Zeitpunkten  $t_1 = 5$  min,  $t_2 = 15$  min,  $t_3 = 45$  min. **B:**  $P_r$ ,  $P_{fr}$  - und Differenzspektren nach DTT Zugabe (schwarz) und letztes unbelichtetes Spektrum ( $t_3$ ) nach DTT-Zugabe (grau).

Vergleicht man die Differenzspektren der CphBm-BV Proben mit und ohne DTT, so zeigt das Differenzspektrum der unter reduzierenden Bedingungen aufgenommenen Probe deutliche Änderungen gegenüber der nicht behandelten Probe. Zunächst fällt die um ein vielfaches höhere Amplitude des Differenzspektrums, das unter reduzierenden Bedingungen aufgenommen wurde, auf. Während das  $P_r$ -Maximum durch Zugabe von DTT unverändert bei 702 nm bleibt, ist das  $P_{fr}$ -Minimum des Differenzspektrums in Anwesenheit von DTT mit einem Wert von 754 nm um 8 nm rotverschoben (Abb. 3.6.6 A und B). Auch dies deutet an, daß im Bereich des D-Rings des Chromophors deutliche konformelle Veränderungen stattfinden, die einen Einfluß auf die Photoreversibilität nehmen.

### 3.6.3.5 Assemblierung von CphBm mit PCB und BV unter nichtreduzierenden Bedingungen

Der zeitliche Verlauf des Chromophoreinbaus wurde durch Aufnahme von Spektren in möglichst kurzen Zeitintervallen bei 10°C bisher nur unter nichtreduzierenden Bedingungen ermittelt. Die Einschränkung der hier angewandten Methode ist, wie bereits bei CphA erwähnt, daß auch hier das erste Spektrum frühestens 10 Sekunden nach Chromophorzugabe aufgenommen werden kann, alle schnelleren Prozesse können mit der hier durchgeführten Methode zeitlich nicht aufgelöst werden. Daher reflektieren diese Daten nur die späten Reaktionen, die bei der Assemblierung vonstatten gehen.



**Abbildung 3.6.7** Zeitlicher Verlauf der Absorption bei  $\lambda_{max}$  der  $P_r$ -Formen von CphBm-PCB und CphBm-BV

Abs.: Absorption, s: Sekunden nach Chromophorzugabe, fit: biexponentieller Fit der Daten. Es wurden Aliquots der gleichen Apo-Protein Probe genommen und mit dem gleichen Chromophorüberschuß assembliert.

Die Werte aus dem zeitlichen Verlauf der Absorption bei  $\lambda_{\max}$  der jeweiligen P<sub>r</sub>-Form (siehe Abb. 3.6.7) folgen dem Fit einer biexponentiellen Kinetik mit folgenden Zeitkonstanten:

CphBm-PCB:	12 s und	115 s
CphBm-BV:	7 s und	52 s

Diese Werte wurden nicht statistisch validiert, was für eine exakte Angabe der Zeitkonstanten nötig wäre, da gerade der erste Wert aufgrund des experimentellen Aufbaus starken Schwankungen unterliegt. Die hier gewonnenen Werte für CphBm-PCB liegen jedoch eng an bereits ermittelten Daten für CphB aus <sup>144</sup> (15 s und 103 s) und sind damit in etwa doppelt so groß wie die Werte von CphBm-BV.

Die unterschiedlichen Endwerte der Assemblierung deuten, wie auch in Kap. 3.6.3.4 beobachtet, entweder auf eine unvollständige Assemblierung beim CphBm-BV, oder einen deutlich niedrigeren Extinktionskoeffizienten (unter nichtreduzierenden Bedingungen) hin. Wie Experimente zur Spektroskopie von CphBm-BV in Anwesenheit von 1 mM DTT später zeigten, ist die vermutete maximale Extinktion von CphBm-PCB und CphBm-BV bei den  $\lambda_{\max}$  der P<sub>r</sub>-Formen nicht wesentlich verschieden und für das BV-Addukt eher größer als für das PCB-Addukt (Abb. 3.6.22). Die hier beobachtete Assemblierungskinetik von BV könnte demnach durch die in Kap. 3.6.3.4 diskutierte Heterogenität der Probe stark verfälscht sein und aufgrund der festgestellten mangelhaften Einlagerung von BV unter nichtreduzierenden Bedingungen vielleicht eher als eine *Anlagerungskinetik* betrachtet werden. Der in Abb. 3.6.6 beobachtete, nachträgliche Einbau von BV nach Zugabe von DTT läßt eher auf einen P<sub>r</sub>-Endwert in der Größenordnung jener schließen, die für CphBmLC-BV ermittelt wurden (siehe Kap. 3.6.5.7).

Die gefundenen Assemblierungsintermediate von CphBm werden in Kap. 3.6.7 vergleichend diskutiert.

### 3.6.4 Zusammenfassung CphBm

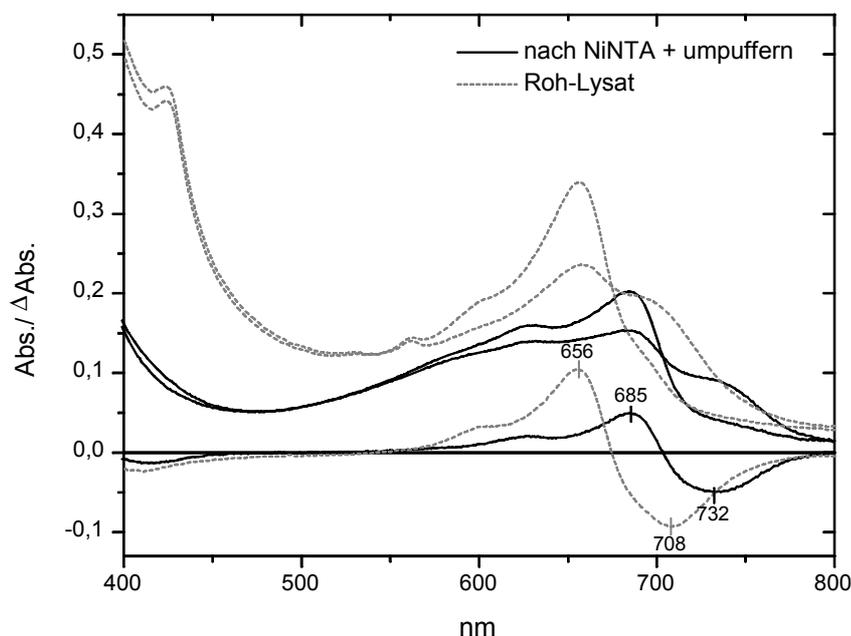
Zusammenfassend lassen sich aus den mit CphBm erhaltenen Ergebnissen folgende Schlußfolgerungen ableiten:

- 1) Die „Konstitution“ (bzw. Faltung) des CphBm kann mit DTT dahingehend verbessert werden, daß eine effektive Photochemie mit BV möglich ist.
- 2) Für eine vollständige Assemblierung von CphBm mit BV (die zu einem weitgehend photoaktiven Addukt führt) sind reduzierende Bedingungen notwendig.
- 3) Die Photochemie von CphBm-PCB bleibt, im Gegensatz zu CphBm-BV, von DTT unbeeinflusst. Das deutet im Vergleich zu BV auf eine andere Konformation des PCB in der Bindetasche von CphB hin, welche dem Chromophor mehr „Bewegungsfreiheit“ und damit eine „unbehinderte“ Photochemie auch unter nichtreduzierenden Bedingungen erlaubt. Dies könnte daran liegen, daß PCB durch die Ethyl-Gruppe an Ring D geringere Wechselwirkungsmöglichkeiten hat als BV, das eine Vinylgruppe an Ring D trägt.
- 4) Es ist möglich, daß BV durch die höheren strukturellen Anforderungen an die Chromophorbindetasche mehr van-der-Waals Kontakte, welche die Bindung von BV an eine alternative Chromophorbindestelle stabilisieren können, ausbilden kann als PCB, sofern es zu einer erfolgreichen Einlagerung kommt (daher auch niedrigere Kompetitierbarkeit mit Imidazol, siehe hierzu Abb. 3.6.22). Man könnte spekulieren, daß es „schwerer“ in die Chromophorbindetasche „hineinzubekommen“ ist, dann aber dafür fester gebunden bleibt (bei einem ersten Ni-NTA Test-Lauf zeigte das assemblierte CphBm-BV im Gegensatz zu assembliertem CphBm-PCB lediglich einen geringen Chromophorverlust).
- 5) Es konnte später gezeigt werden (Kap. 3.6.8.4), daß unter reduzierenden Bedingungen CphBm-BV einen höheren Extinktionskoeffizienten besitzt als CphBm-PCB.

### 3.6.5 Spektroskopie und Assemblierung von CphBmLC „Chamäleochrom“

*Unsere Bestimmung ist, die Gegensätze richtig zu erkennen, erstens nämlich als Gegensätze, dann aber als Pole einer Einheit. (H. Hesse)*

In der Mutante CphBmLC wurde das in CphA und pflanzlichen Phytochromen chromophorbindende Cystein in die Chromophorbindedomäne eingeführt (L266C). Bei dieser Mutante hat die Ab- bzw. Anwesenheit von reduzierenden Agentien während der Aufreinigung des **Apo**-Proteins eine sehr drastische Änderung der Absorptionseigenschaften zur Folge. Das beobachtete Phänomen ist in Abb. 3.6.8 gezeigt. Ein im Rohaufschluß mit PCB assembliertes Aliquot einer CphBmLC-Aufbereitung zeigt mit Werten für  $\lambda_{\max}$  bzw.  $\lambda_{\min}$  des Differenzspektrums von 656 nm bzw. 708 nm ein Absorptionsprofil, das dem von CphA stark ähnelt (663 nm / 708 nm) und daher auf eine kovalente Thioetherbindung zwischen Chromophor und Protein analog zu CphA (und pflanzlichen Phytochromen) schließen läßt. Die Aufreinigung des **Apo**-CphBmLC unter nichtreduzierenden Bedingungen liefert bei Assemblierung mit PCB jedoch ein Addukt, das die spektralen Eigenschaften des unmutierten CphBm zeigt (685 nm / 732 nm; CphBm-PCB: 685 nm / 735 nm). Dieses „Umschalten“ des Absorptionsverhaltens kann anschließend durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT zum Apo-CphBmLC oder zu bereits assembliertem CphBmLC-PCB rückgängig werden (es findet offensichtlich ein „Freischalten“ des Cysteins statt, siehe unten Abb. 3.6.9 bis 3.6.11).



**Abbildung 3.6.8** Apo-CphBmLC, vor und nach Ni-NTA Aufreinigung assembliert

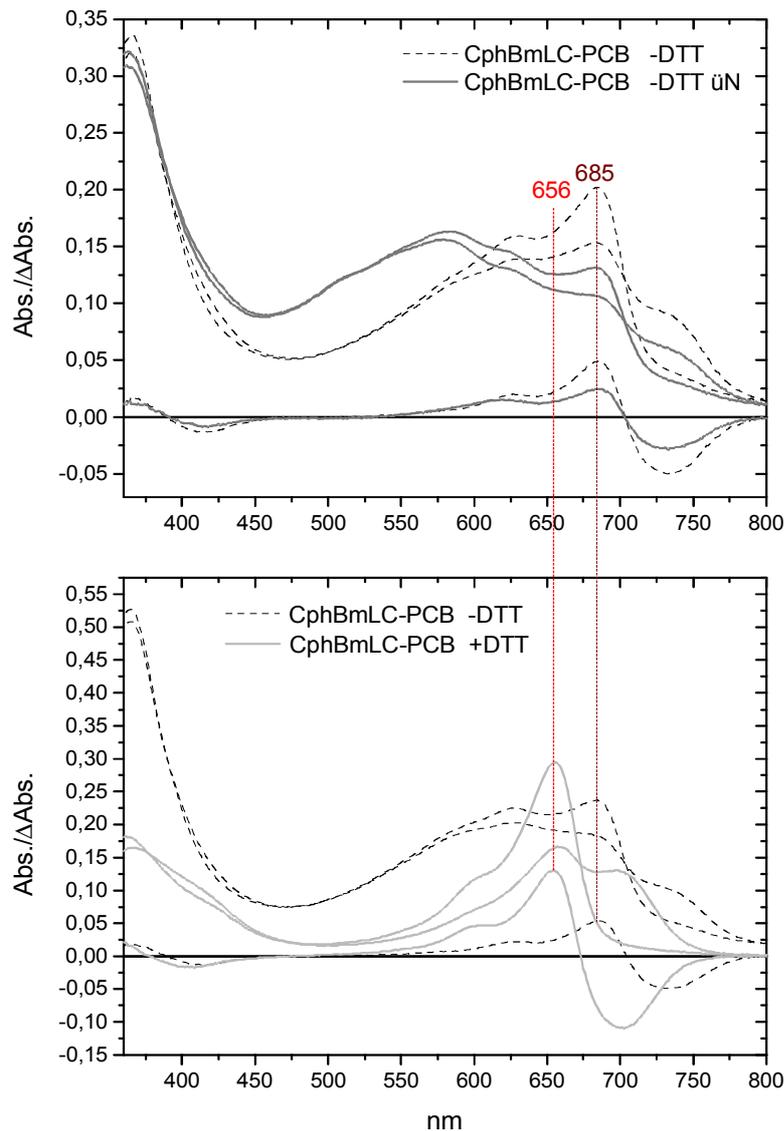
In *grau*, gestrichelte Linien: Probe vor Ni-NTA Reinigung mit für Rohlysate typischem Peak bei 420 nm (Cytochrom). In *schwarz*, durchgezogene Linien: Probe nach Ni-NTA Aufreinigung. Die CphBmLC Konzentrationen der Proben sind nicht miteinander vergleichbar.

Da die Aufreinigung via Ni-NTA mit einem langsamen Umpuffern in TBS ohne DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol einhergeht, kommen für dieses Verhalten mehrere mögliche Erklärungen in Frage. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß das neu eingefügte Cystein durch Faltungsfehler, die in anderer Gestalt auch schon für das CphBm-BV sichtbar waren, eine interne Disulfid-Brücke mit einem anderen freien Cystein des Apo-Proteins eingeht und daher nicht mehr für eine Thioetherbindung zur Verfügung steht. Das würde allerdings auf Grund der wahrscheinlich recht großen strukturellen Beeinträchtigung auch die beobachtete (CphBm-ähnliche) Einlagerung des Chromophors unwahrscheinlich machen. Eventuell führt eine partielle Fehlfaltung des Apo-Proteins an anderer Stelle als Sekundäreffekt zu einer geringeren Reaktivität des Cysteins. Desweiteren könnte das im Aufschlußpuffer vorhandene  $\beta$ -Mercaptoethanol ein gemischtes Disulfid mit dem Apo-Protein eingegangen sein<sup>164, 165</sup>, eine Möglichkeit, die in Ausnahmefällen auch für DTT beobachtet werden konnte<sup>166</sup>, obwohl Dithiole eine deutlich geringere Neigung zur Ausbildung von gemischten Disulfiden mit Proteinen zeigen<sup>164</sup>. Durch einen solchen Fall, der eine Stabilisierung dieses gemischten Disulfids durch das Apo-Protein voraussetzt, wäre das Cystein ebenfalls blockiert. Die Tatsache, daß Apo-CphBmLC nach „Freischaltung“ durch DTT bei erneutem Umpuffern in nichtreduzierende Bedingungen wieder blockiert, spricht jedoch eher für die Ausbildung einer Disulfidbrücke oder die Änderung des Proteinarrangements. Es ist auch durchaus denkbar, daß durch eine leichte Konformationsänderung des Apo-Proteins eine für die Thioetherverknüpfung essentielle Aminosäure „deplaziert“ wird und es daher zu keiner kovalenten Verknüpfung mehr kommt.

In jedem der erwähnten Fälle sollte ein „Freigeben“ des Cysteins mit  $\beta$ -Mercaptoethanol oder DTT erreicht werden können, wie in den folgenden Abschnitten eindeutig gezeigt werden konnte.

#### 3.6.5.1 Blockierung der Chromophorbindestelle durch nichtreduzierende Bedingungen und „Freischaltung“ durch Zugabe von DTT

Unter nichtreduzierenden Bedingungen verhielt sich das PCB-Addukt von CphBmLC auch bezüglich seiner Unfähigkeit, den Chromophor über längere Zeit zu halten (Abb. 3.6.9 oben), wie CphBm, das ebenfalls mit der Zeit einen Verlust von PCB aus der Bindetasche zeigt (siehe Kap. 3.6.8). Spektral ist es zudem nicht von CphBm unterscheidbar, was die Schlußfolgerung nahelegt, daß das Cystein der Apo-CphBmLC Probe unter nichtreduzierenden Bedingungen vollständig unreaktiv ist.



**Abbildung 3.6.9** Einfluß von DTT auf CphBmLC-PCB

**Oben:** **Schwarz**, gestrichelte Linien: PCB Addukt, direkt nach Assemblierung mit zweifach molarem Überschuß an PCB. **Grau**, durchgezogene Linien: identische Probe nach Inkubation bei 4°C über Nacht. Keinerlei DTT Zugabe. **Unten:** identische Apo-Proteinproben mit 2,5 fachem molarem Überschuß an PCB. **Schwarz**, gestrichelte Linien: unbehandelte Probe. **Grau**, durchgezogene Linien: mit 2 mM DTT vorbehandelte Probe.

Eine Vorinkubation des Apo-CphBmLC mit 2 mM DTT ergab bei der anschließenden Assemblierung mit PCB sofort ein Spektrum, das im Vergleich zu CphBm und der nicht mit DTT vorinkubierten Probe um ca. 30 nm blauverschoben ist (Abb. 3.6.9 unten) und dem Spektrum von CphA ähnelt. Das Spektrum des CphBmLC mit DTT ist - bei Verwendung gleicher Mengen an Apoprotein und Chromophor - im Vergleich Probe ohne DTT mehr als doppelt so groß (siehe dazu auch Abb. 3.6.10). Diese Hypochromie des blockierten CphBmLC kann an einer Verschiebung des Gleichgewichts von gebundenem zu ungebundenem PCB am Histidin

liegen oder auf einen niedrigeren Extinktionskoeffizienten von PCB im histidingebundenen Zustand zurückzuführen sein. Ein weitere Möglichkeit könnte eine herabgesetzte Zugänglichkeit der Bindetasche bei Abwesenheit von Reduktionsmittel und eine daraus resultierende unvollständige Assemblierung sein. Diese Möglichkeit konnte später jedoch durch das in Abb. 3.6.11 gezeigte Experiment ausgeschlossen werden.

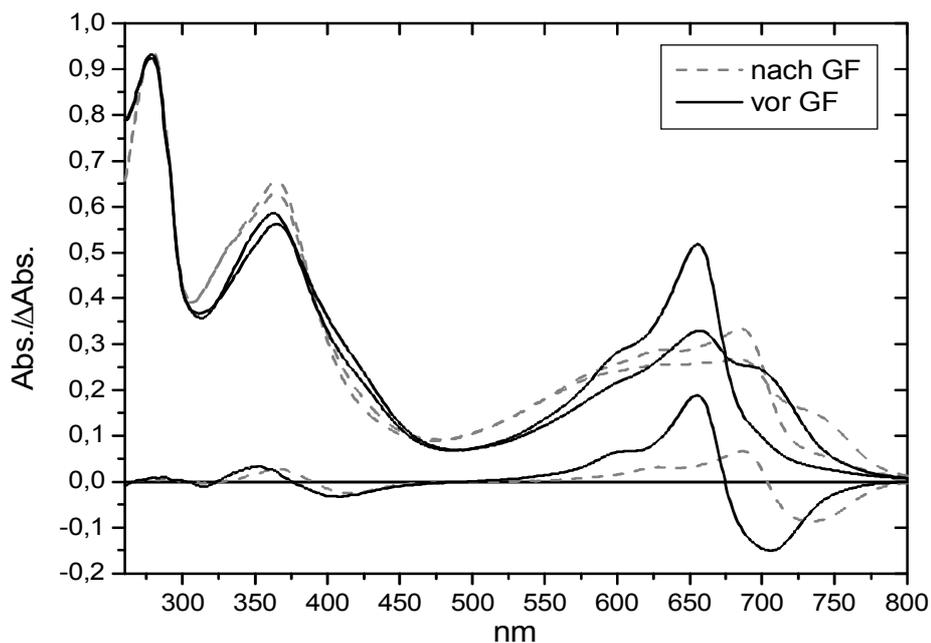
Der zu beobachtende Verlust von PCB aus der blockierten Bindetasche des CphBmLC (Abb. 3.6.9 oben) legt nahe, daß das niedrigere Differenzspektrum zu einem nicht unerheblichen Teil aus einer instabilen (Hydrolyse-empfindlichen oder nichtkovalenten) Bindung von PCB an das Histidin 267 des blockierten CphBmLC herrührt. Der sehr breite Peak der über Nacht inkubierten Probe bei ca. 580 nm (oben, durchgezogene Linien) zeigt degradiertes PCB, das zum Zeitpunkt der Assemblierung noch nicht beobachtet werden konnte. Ein Gleichgewichtszustand von gebundenem und ungebundenem PCB ermöglichte eine Diffusion von PCB aus der Bindetasche mit anschließender langsamer Degradation des PCB. Desweiteren ist die Amplitude des Differenzspektrums der über Nacht inkubierten Probe lediglich halb so groß (53%) wie die des frisch assemblierten Proteins. Es handelt sich damit definitiv um einen Verlust von PCB aus der Bindetasche.

Dieser Verlust resultiert nicht aus Proteindegradation, da exakt diese Probe in einem Kontrollexperiment (ohne Abbildung) nach Zugabe von DTT ein Differenzspektrum ergab, daß ca. 75% so groß war wie bei dem mit DTT vorinkubierten CphBmLC (es wurde in diesem speziellen Fall kein weiterer, frischer Chromophor zugegeben, was die Höhe des Differenzspektrum eventuell weiter erhöht hätte). Bei einer Proteindegradation von 53% wäre auch nach DTT Zugabe nur ein etwa halb so großes Differenzspektrum zu erwarten gewesen.

### 3.6.5.2 Freies CphBmLC und erneute Blockierung durch Gelfiltration

Der „chamäleochochrome“ Effekt des CphBmLC ist vollständig reversibel. Wie in Abb. 3.6.10 gezeigt, kann ein nach der Ni-NTA Aufreinigung mit DTT „freigeschaltetes“ Cystein des Apo-Proteins durch eine Gelfiltration, die unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt wird, wieder blockiert werden (ebenso wie durch Umpuffern in DTT-freien Puffer, nicht gezeigt). Eine nachträgliche Blockierung von assembliertem freigeschaltetem CphBmLC-PCB ist nicht möglich.

Wie aus Abb. 3.6.10 ersichtlich, ergeben identische Proteinmengen, die mit dem zweifachen molaren Überschuß an PCB assembliert wurden, unter den verschiedenen Pufferbedingungen nicht die gleiche Höhe des Differenzspektrums. Das Differenzspektrum der blockierten Probe (686 nm / 734 nm) nach Gelfiltration unter nichtreduzierenden Bedingungen ist weniger als halb so hoch (45%) wie das der „freigeschalteten“ Probe vor der Gelfiltration (655 nm / 704 nm). Mögliche Gründe dafür wurden in Kap. 3.6.5.1 bereits diskutiert.



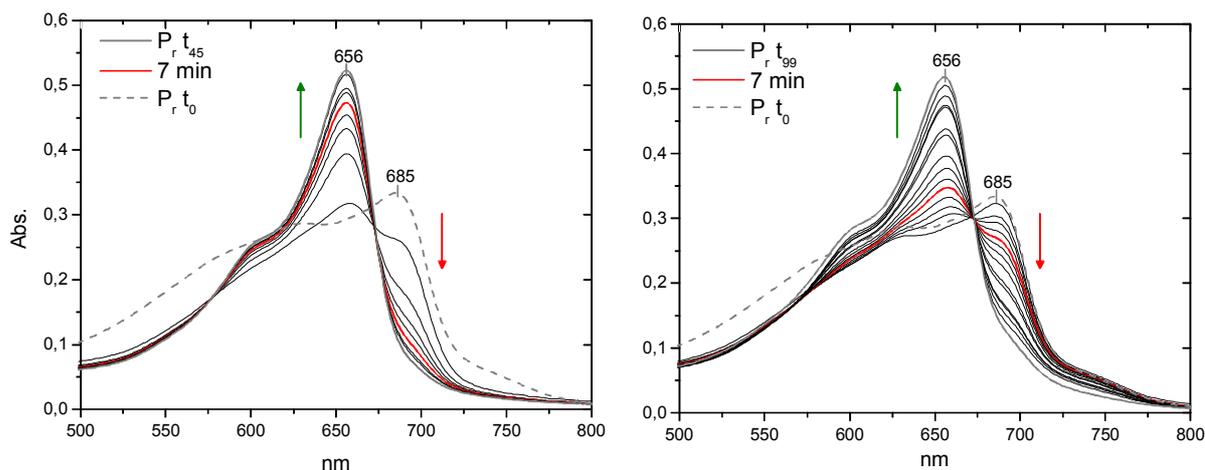
**Abbildung 3.6.10** Blockierung von „freigeschaltetem“ Apo-CphBmLC durch Gelfiltration

In **schwarz**, durchgezogene Linien: Aliquot DTT behandeltes Apo-CphBmLC assembliert mit zweifach-molarem Überschuß an PCB. In **grau**, gestrichelte Linien: gleiche Apo-Proteinprobe assembliert nach Gelfiltration (ohne DTT). Beide Proben mit gleicher Proteinkonzentration.

### 3.6.5.3 Konversionskinetiken des PCB-Addukts von CphBmLC

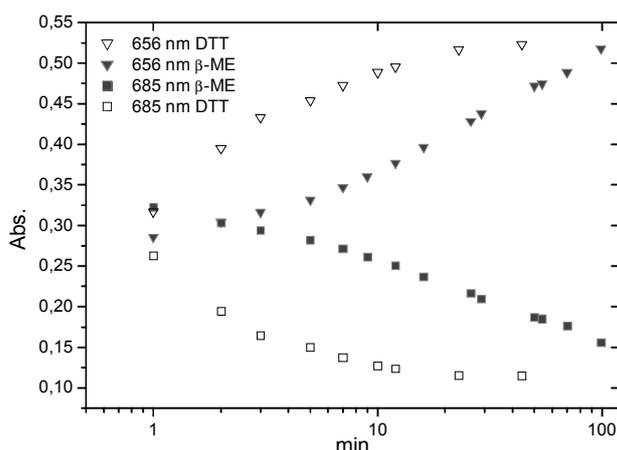
Die Umlagerung der blockierten Form von CphBmLC (mit dem „instabilen“ Bindungszustand von PCB) zur „freigeschalteten“ Form von CphBmLC (mit der stabilen Verknüpfung des Thioethers) wurde ausgehend vom blockierten und assemblierten CphBmLC-PCB hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs in Abhängigkeit vom Reduktionsmittel beobachtet (Abb. 3.6.11).

Hierzu wurden Aliquots von aufgereinigtem CphBmLC mit zweifach molarem Überschuß an PCB versetzt, bis keine weitere Erhöhung des  $P_r$ -Spektrums beobachtet werden konnte. Anschließend wurde DTT (ad 2 mM, Abb. 3.6.11 links) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol (ad 4 mM, Abb. 3.6.11 rechts) zugegeben, und der Prozeß bis zum Ende der Reaktion (nach 45 bzw. 99 min) verfolgt. Durch die Addition von DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol wird eine direkte Umlagerung von der (blockierten) quasi-CphBm  $P_r$ -Form in die (freigeschaltete) CphBmLC  $P_r$ -Form ausgelöst, die gleichzeitig mit einer Steigerung der Absorption einhergeht. Diese Konversion geht mit DTT wesentlich schneller vonstatten als mit  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die sich ausbildenden isobestischen Punkte belegen, daß es sich hier um eine einfache Umlagerung von (wahrscheinlich) Histidin-gebundener zu Cystein-gebundener  $P_r$ -Form ohne Beteiligung weiterer Zwischenprodukte handelt.



**Abbildung 3.6.11** Einfluß von Reduktionsmitteln auf blockiertes CphBmLC-PCB

Jeweils gleiche Proteinkonzentration und zweifacher molarer Überschuß an PCB. Gestrichelte Linien: Spektrum vor Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol bzw. DTT. **Links:** CphBmLC-PCB nach Zugabe von DTT ad 2 mM. **Rechts:** CphBmLC-PCB nach Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol ad 4 mM. Die Endspektren wurden nach 45 (links) bzw. 99 Minuten (rechts) erreicht. **Grüne** Pfeile zeigen eine Absorptionzunahme, **rote** Pfeile eine Absorptionsabnahme an



**Abbildung 3.6.12** Konversionskinetik CphBmLC

Halblogarithmische Skala. Dreiecke: Absorption an der Wellenlänge 656 nm. Quadrate: Absorption an der Wellenlänge 685 nm. Offene Symbole: DTT. Gefüllte Symbole:  $\beta$ -Mercaptoethanol

Der beobachtete Unterschied der verschiedenen Reduktionsmittel wurde auch in anderen Systemen, z. B. der Renaturierung von Ribonuclease A<sup>167</sup>, Keratinkinase<sup>168</sup> oder bei der Faltung von Thioredoxin<sup>165</sup> beobachtet. Dithiolreagentien besitzen die Eigenschaft, eine vorhandene Disulfidbrücke (oder ein gemischtes Disulfid aus Protein und  $\beta$ -Mercaptoethanol) mit nur einem Molekül vollständig zu reduzieren. Die Bildung von gemischten Disulfiden ist bei DTT durch seine Fähigkeit, über eine intramolekulare Disulfidbindung zu zyklisieren, stark unterdrückt<sup>169</sup>, es wird daher oft als Faltungshelfer verwendet<sup>170</sup>.

Aus Abb. 3.6.12 wird ersichtlich, daß die Konversion mittels  $\beta$ -Mercaptoethanol (geschlossene Symbole) nach einer kurzen flacheren Anfangsphase einen nahezu monoexponentiellen Verlauf nimmt, während mit DTT eher biexponentiell verläuft. Die höhere Geschwindigkeit der DTT-vermittelten Konversion liegt daran, daß DTT sich, wie oben bereits angesprochen, nach Bindung an das Protein durch Selbstzyklisierung abspalten kann, so daß daraufhin in jedem Fall ein freies Cystein zurückbleibt, wohingegen bei der Reaktion mit  $\beta$ -Mercaptoethanol in der Hälfte der Fälle lediglich das proteingebundene  $\beta$ -Mercaptoethanol ausgetauscht wird, bzw. das chromophorbundene Cystein blockiert (im Falle einer proteino-

genen Disulfidbrücke) oder unzugänglich (im Falle einer konformellen Inhibition) bleibt. Daher beträgt die Gleichgewichtskonstante für die Reduktion eines Disulfids durch DTT etwa 13 und für  $\beta$ -Mercaptoethanol ca. 1 (nach <sup>171</sup>).

Die mit DTT biexponentielle Konversionskinetik läßt sich nur schwer erklären. Eine Möglichkeit ist, daß es sich bei dieser Reaktion um einen zweistufigen Prozeß (Bindung, Zyklisierung) handelt, eine andere, daß weitere Prozesse (Proteinfaltung) eine Rolle spielen, die bei  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht auftreten. In der Tat wurden Unterschiede dieser beiden Agentien in ihrer Wirkung auf Proteine schon häufig beobachtet <sup>172</sup>. Eine exakte Aussage zur unterschiedlichen Wirkungsweise dieser beiden Agenzien auf CphBmLC kann mit den erhaltenen Daten jedoch nicht getroffen werden.

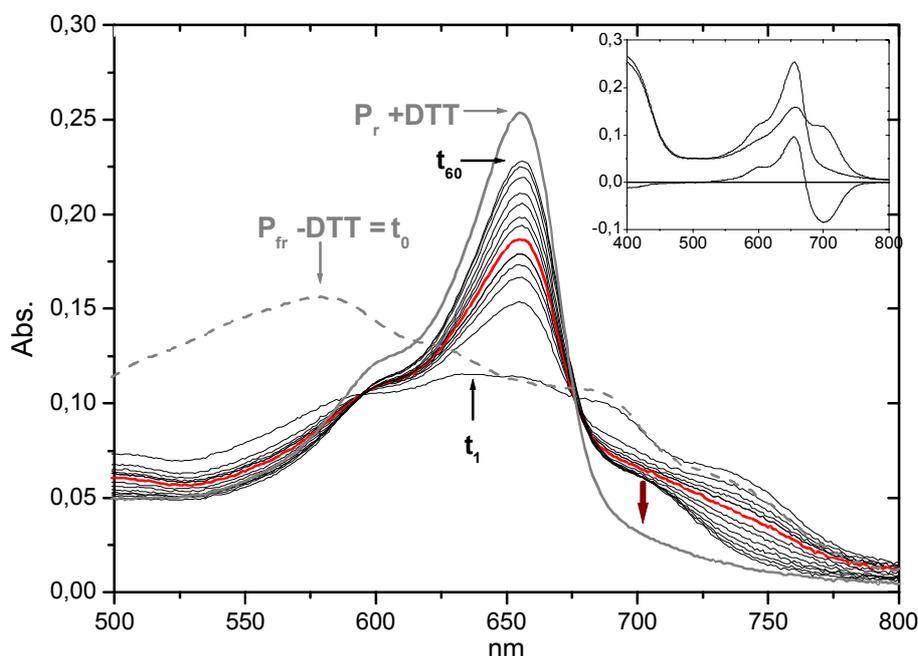
#### 3.6.5.4 Konversion aus der $P_{fr}$ -Form von CphBmLC-PCB

Dieser Versuch zeigt zwei neue Eigenschaften des CphBmLC auf. Zum einen geschah die Freischaltung des chromophorbindenden Cysteins aus der  $P_{fr}$ -Form des blockierten CphBmLC's, zum anderen handelte es sich um eine über Nacht bei 4°C in Dunkelheit inkubierte Probe (Chromophorverlust). Neben der DTT-vermittelten Neubildung der Cystein- $P_r$ -Form des CphBmLC zeigte sich nach Belichtung mit 730 nm, daß auch noch Cystein- $P_{fr}$ -Form vorhanden gewesen ist. Zum Anderen wird durch den Chromophorverlust eindeutig belegt, daß die PCB-Bindung zum blockierten CphBmLC nicht kovalent ist.

Eine blockierte CphBmLC Probe wurde mit PCB versetzt und anschließend in der  $P_{fr}$ -Form über Nacht im Dunkeln bei 4°C stengelassen (gestrichelte Linie  $P_{fr}$ -DTT  $t_0$  in Abb. 3.6.13). Auch in diesem Fall ist deutlich der Anteil an degradiertem PCB zu sehen (breiter Peak bei ca. 580 nm), die relativ flachen Proteinspektren resultieren vom Verlust des Chromophors aus der Bindetasche des blockierten CphBmLC-PCB (vgl. Kap. 3.6.5.1). Anschließend wurde im Dunklen DTT zugegeben, woraufhin primär eine Neubildung der (freigeschalteten) Cystein- $P_r$ -Form von CphBmLC stattfand (Abb. 3.6.13, Spektren  $t_1$ - $t_{60}$ ). Gleichzeitig verschob sich aber auch das Maximum der vorhandenen  $P_{fr}$ -Form um ca. 30 nm zu kürzeren Wellenlängen, diese „konvertierte“ Cystein- $P_{fr}$ -Form konnte nach dem Abschluß der Dunkelassemblierung durch Dunkelrotbelichtung ebenfalls in die Cystein- $P_r$ -Form überführt werden (Abb. 3.6.13, Spektrum  $P_r$  + DTT).

Die Konversion vom (potentiell) Histidin-gebundenen zum Cystein-gebundenen Zustand scheint nicht die Stereochemie der C-15-Doppelbindung zu beeinflussen, da die Probe nach der Konversion zur Cystein- $P_r$ -Form immer noch den  $P_{fr}$ -Anteil der blockierten Probe aufwies (siehe Abb. 3.6.13, Pfeil bei ca. 700 nm) und anschließend noch photoisomerisiert werden konnte. Die hypsochrome Verschiebung durch den Verlust der 3-3' Doppelbindung

des PCB ist dabei sowohl bei der  $P_r$ -Form als auch bei der (restlichen)  $P_{fr}$ -Form zu beobachten ( $Z,Z,Z$  bleibt  $Z,Z,Z$ ;  $Z,Z,E$  bleibt  $Z,Z,E$ , der Neueinbau erfolgt in  $Z,Z,Z$ ).



**Abbildung 3.6.13** Konversionsverlauf nach Inkubation über Nacht

*CphBmLC-PCB* wurde über Nacht in der  $P_{fr}$ -Form stehengelassen (gestrichelte Linie,  $P_{fr}$ - $DTT = t_0$ ), anschließend mit DTT ad 2 mM versetzt ( $t_1$  bis  $t_{60}$ ,  $t_7$  in rot) und dann dunkelrot belichtet ( $P_r + DTT$ ). **Insert:** Spektren nach vollständiger Konversion.

In der Regel ist PCB nach einer Nacht in wässriger Lösung nicht mehr assemblierfähig, es ist daher erstaunlich, daß die Menge an PCB in der Probe dennoch ausreichte, um ein Differenzspektrum zu ergeben, dessen  $\Delta\Delta$ -Wert (= die Höhe der Amplitude des Differenzspektrums) etwa 75% des Werts eines frisch freigeschalteten CphBmLC Aliquots aufwies. Entweder wurde also das PCB der Probe durch das CphBmLC vor Hydrolyse geschützt (z.B. "vorassembliert" am Protein), oder vorhandenes evtl. oxidiertes PCB wurde durch DTT Zugabe regeneriert. Die Hypochromie und die Rotverschiebung des breiten 580 nm-Peaks durch DTT wurde auch bei freiem PCB beobachtet, allerdings in weniger deutlichem Ausmaß.

Die hier mit CphBmLC-PCB beobachteten Effekte sind grundlegend verschieden von den Einflüssen des Reduktionsmittels auf CphBm-BV, bei dem ein effizienter BV-Einbau nur durch Zugabe von Reduktionsmittel erreicht werden konnte (Kap. 3.6.3.4). Hier findet, gezeigt durch die hypsochrome Verschiebung des  $\lambda_{max}$  der  $P_r$ -Form um 30 nm, eine direkte Veränderung der mit dem Cystein eingefügten Chromophorbindestelle statt, die es beim CphBm nicht gibt. Ob Faltungseffekte des CphBmLC-PCB, wie sie beim CphBm-BV beobachtet werden konnten, eine zusätzliche Rolle spielen, kann letztlich zwar nicht eindeutig bestimmt

werden, allerdings spielten diese Effekte des Reduktionsmittels beim CphBm für die Einbindung von PCB keine Rolle (Kap. 3.6.3.1 und 3.6.3.2).

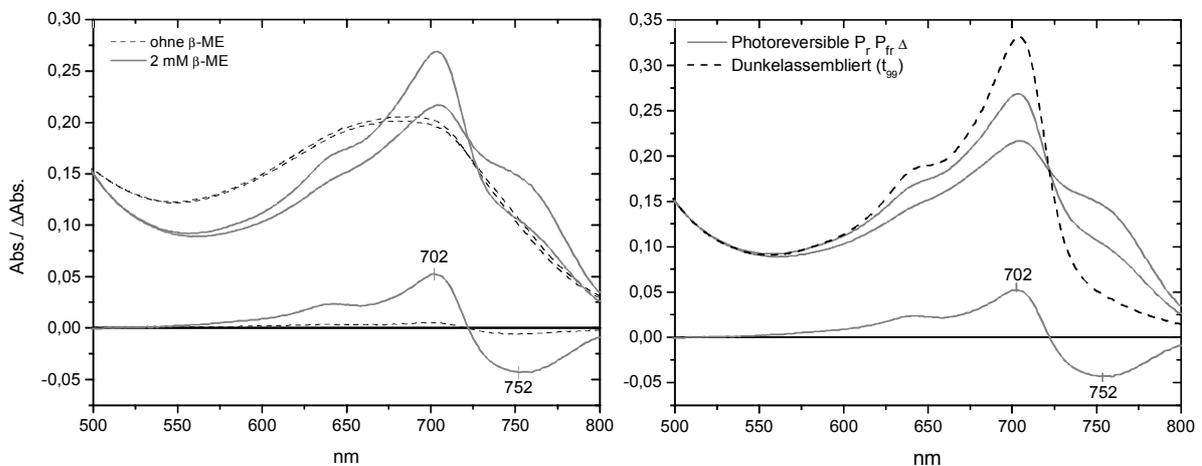
#### 3.6.5.5 Spektroskopie von CphBmLC-BV

Die Neuausstattung der Chromophorbindetasche mit einem Cystein sollte theoretisch auf den Einbau von BV in CphBmLC kaum Auswirkungen haben, da die Vinylgruppe des A-Rings von BV in pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen mit Cystein als Chromophorbindestelle nicht über einen Thioether eingebunden wird<sup>144</sup>. Dennoch wurden bereits bei CphBm-BV Effekte des Reduktionsmittels auf die spektralen Eigenschaften beobachtet, die vermuten lassen, daß BV speziellere Anforderungen an eine Chromophorbindetasche stellt als PCB. Die zentrale Frage dieses Versuchs ist jedoch: Findet beim CphBmLC-BV eine DTT-vermittelte spektrale Verschiebung statt?

Das in Abb. 3.6.14 dargestellte Experiment der Assoziation von CphBmLC mit BV ist weitgehend identisch zu dem in Abbildung 3.6.6 (Kap. 3.6.3.4) gezeigten Experiment mit CphBm. Ohne Reduktionsmittel zeigt CphBmLC-BV eine sehr schwache Photochemie (Abb. 3.6.14, links, gestrichelte Linien). Durch Präinkubation des Apoproteins mit Reduktionsmittel sowie durch nachträgliche Addition von Reduktionsmittel zum „vorassemblierten“ Protein konnte die Photochemie gegenüber der unbehandelten Probe stark verbessert werden (Abb. 3.6.14, links, durchgezogene Linien). Erfolgte die Zugabe von DTT und die darauffolgende Inkubation im Dunklen, konnte ein höherer Anteil P<sub>r</sub>-Form erhalten werden (Abb. 3.6.14, rechts, gestrichelte Linie) als durch Bestrahlung mit Dunkelrotlicht nach einem Belichtungszyklus. Die Lage der Absorptionsmaxima blieb allerdings in allen Fällen gleich. Im Gegensatz zum CphBm-BV ist die *Photochemie* der CphBmLC-BV Probe unter nichtreduzierenden Bedingungen jedoch noch schlechter, und die Diskrepanz zwischen dunkelassemblierter P<sub>r</sub>-Form und belichteter P<sub>r</sub>-Form noch deutlicher.

Die „Eigenarten“ des CphBm-BV, wie die schlechte Einbindung des BV unter nichtreduzierenden Bedingungen und die unvollständige Photokonversion zur P<sub>r</sub>-Form wurden also mit dem BV-Addukt des CphBmLC weitgehend reproduziert, und wurden durch das eingefügte Cystein verstärkt (vgl. Abb. 3.6.6 und Abb. 3.6.14). Dies ist ein eindeutiges Indiz, daß sich das Cystein in direkter Umgebung des Chromophors befindet, und daß BV auf eine sehr ähnliche Weise in der Proteintasche eingelagert wird wie das PCB im Falle einer kovalenten Bindung. Die Verbesserung der Photoreversibilität hingegen ist ein vom *eingefügten* Cystein unabhängiger Vorgang. Eine weitere Kernaussage dieser Ergebnisse ist, daß beim Einbau von BV keinerlei Hypsochromie durch das Einstellen reduktiver Bedingungen auftrat, wie es bei der Assemblierung und Freischaltung des PCB-Addukts beobachtet wurde. Das CphBmLC verhält sich hier exakt wie das unveränderte CphBm. Das heißt, es findet bei BV, anders als

bei PCB, keine kovalente Einbindung unter Verlust einer Doppelbindung an das Cystein über einen Thioether statt.



**Abbildung 3.6.14** CphBmLC-BV

**Links:** gestrichelte Linien: nichtreduzierende Bedingungen, durchgezogene Linien: identische Probe mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ad 2 mM, nach dem dritten Belichtungszyklus. **Rechts:** durchgezogene Linien: Probe mit 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und letztes Spektrum der Dunkelassembly nach Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol (gestrichelte Linie).

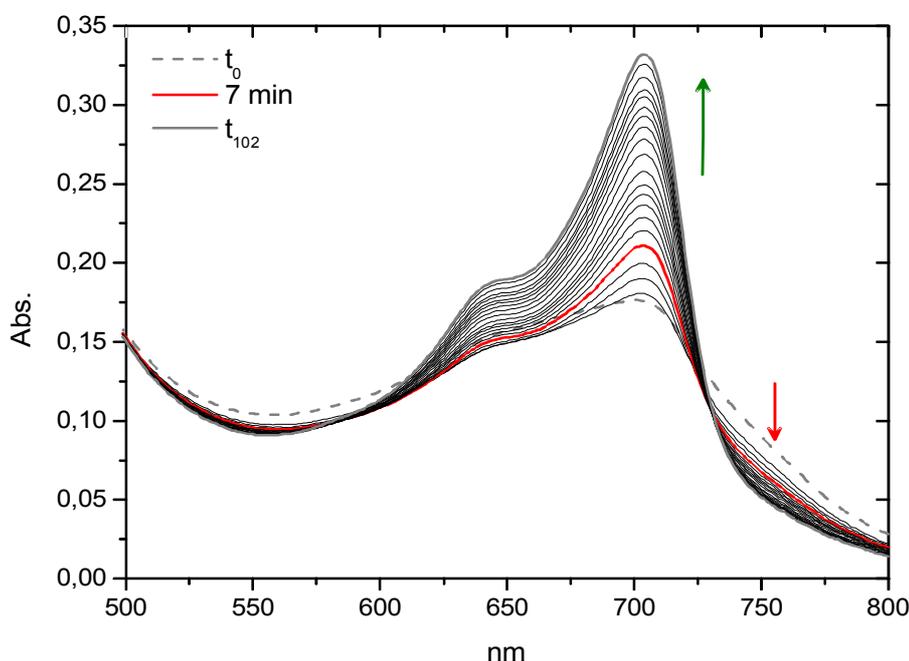
Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, wieso BV zwar in CphBmLC eingebaut wird, jedoch nicht in Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803<sup>56</sup>. Offensichtlich wird die Selektivität gegen BV als Chromophor bei Cph1 aus *Synechocystis* (und wahrscheinlich auch bei CphA) nicht allein durch die Anwesenheit des Cysteins verursacht. Vielleicht könnte die nur in Bacteriophytochromen ohne Cystein als Chromophorbindestelle vorkommende HNT-Region (siehe Abb. 3.3.3) bei der Selektivität gegenüber Chromophoren eine Rolle spielen. Weitere Versuche sollten die Rolle der hochkonservierten Aminosäuren dieser Region zum Ziel haben, darüber hinaus könnte ein Austausch der N-Termini von CphA und CphBmLC die Frage der Chromophorselektivität eventuell klären.

### 3.6.5.6 „Konversionskinetik“ von CphBmLC-BV

Analog zum Versuch der Konversion von CphBmLC mit PCB sollte in diesem Versuch untersucht werden, welche Auswirkungen die „Freischaltung“ des Cysteins auf die Assemblierung mit BV hat. Wie bereits in Kap. 3.6.5.5 und 3.6.3.4 angesprochen, hat DTT neben dem „Freischalten“ des Cysteins drastische Auswirkungen auf die Photoreversibilität von CphBmLC.

Eine unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgereinigte („blockierte“) CphBmLC-Probe wurde mit BV versetzt, und anschließend ein weitergehender Einbau von BV durch die

Zugabe von DTT induziert. Der Prozeß wurde bis zum Ende der Reaktion (nach 102 min) verfolgt.



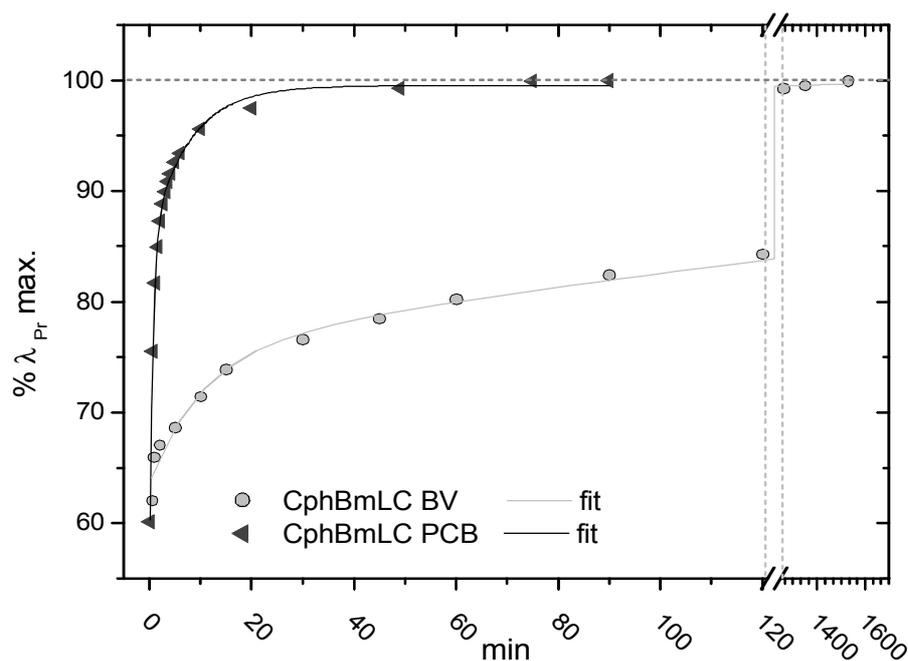
**Abbildung 3.6.15** "Konversionskinetik" von CphBmLC-BV durch DTT-Zugabe

Gestrichelte Linie: vor Zugabe von DTT, durchgezogene Linien: verschiedene Zeitpunkte nach Zugabe ad 2 mM DTT. Grüner Pfeil: Absorptionszunahme, roter Pfeil Absorptionsabnahme.

So kann in Abb. 3.6.15 lediglich ein weitergehender Einbau von BV in die Chromophorbinde-tasche (analog Kap. 3.6.3.4) beobachtet werden. Erwähnenswert ist außerdem das Auftreten eines Assemblierungsintermediats bei ca. 750 nm (Abb. 3.6.15, roter Pfeil); dies wird ausführlicher in Kap. 3.6.7 besprochen.

### 3.6.5.7 Assemblierung von CphBmLC mit PCB und BV unter reduzierenden Bedingungen

Um die bereits beobachteten Unterschiede im Verhalten der beiden Chromophore weitergehender zu charakterisieren und eventuell bestehende grundlegende Unterschiede des Chromophoreinbaus aufzudecken wurden Assemblierungskinetiken mit CphBmLC durchgeführt. Diese Assemblierungen von CphBmLC fanden unter *reduzierenden* Bedingungen statt. Der zeitliche Verlauf der Absorption bei den verschiedenen Absorptionsmaxima der P<sub>r</sub>-Formen ist in Abb. 3.6.16 wiedergegeben. Die beiden Kurven wurden aus unterschiedlichen Experimenten gewonnen und sind daher bezüglich ihres Maximalwerts skaliert.



**Abbildung 3.6.16** Assemblierungskinetik von CphBmLC unter reduzierenden Bedingungen

**Grau:** Verlauf der Absorption bei 702 nm von CphBmLC mit 2,5 fachem molaren Überschuss an BV. **Schwarz:** Verlauf der Absorption bei 656 nm von CphBmLC mit 2,5 fachem molaren Überschuss an PCB. „**fit**“ = biexponentieller Fit der Daten. Die Kurven stammen aus unterschiedlichen Experimenten und wurden daher normalisiert.

Die Werte aus dem biexponentiellen Fit ergeben folgende Zeitkonstanten:

CphBmLC-PCB:	39 s ( $\pm$ 8%);	7 min 30 s ( $\pm$ 13%)
CphBmLC-BV:	10,2 min ( $\pm$ 20%);	288 min ( $\pm$ 10%)

Eine statistische Validierung dieses Experiments konnte zwar noch nicht vorgenommen werden, dennoch liegen die Werte von CphBmLC-PCB sehr nah an denen aus der CphA-PCB Assemblierung (65 s ( $\pm$  9%) und 9 min ( $\pm$  5%), Kap. 3.5.2). Die Assemblierung von CphA fand unter ca. 150 mM „Rest“-Imidazol statt, die Werte der CphBmLC Assemblierung bei 125 mM Imidazol (Kap. 3.6.8.2) sind mit 64 s ( $\pm$  8%) und 10 min ( $\pm$  16%) nahezu deckungsgleich. Die Assemblierung von BV in CphBmLC ist hier unter reduzierenden Bedingungen um eine Größenordnung langsamer als die Assemblierung mit PCB. Ein Mitgrund für diese verlangsamte Assemblierung des CphBmLC-BV könnte ein erschwertes Strecken des Chromophors in die Bindetasche des CphBmLC durch das im Vergleich zum PCB verlängerte  $\pi$ -Elektronensystem des BV sein.

Ein direkter Vergleich dieser Daten mit denen von CphBm aus Kap. 3.6.3.5 ist schwer zu führen, da hier reduzierende Bedingungen herrschten, die für eine „korrekte“ Assem-

blierung von CphBmLC mit den beiden Chromophoren unerlässlich sind (siehe Abb. 3.6.9 und 3.6.14). Auffällig ist jedoch die deutlich schnellere Assemblierung von CphBm mit BV (7 s und 52 s) oder PCB (12 s und 115 s) unter nichtreduzierenden Bedingungen. Zurückzuführen ist das Verhalten des CphBm-BV, wie bereits in Kap. 3.6.3.5 diskutiert, auf die schnelle und unvollständige Inkorporation (oder möglicherweise nur Anlagerung) von BV in CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen (ebenso wie bei blockiertem CphBmLC, voriges Kapitel). Beim PCB-Addukt des CphBmLC könnte jedoch die auch die Ausbildung der kovalenten Thioetherbindung die Reaktion verlangsamen.

Es konnte bei der Assemblierung mit BV ein Assemblierungsintermediat bei ca. 750 nm gefunden werden, wohingegen während der Assemblierung mit PCB (im deutlichen Gegensatz zu CphA-PCB) kein Assemblierungsintermediat aufgelöst werden konnte. Die gefundenen Assemblierungsintermediate von CphBmLC werden in Kap. 3.6.7 vergleichend diskutiert.

### 3.6.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zu CphBmLC

Zusammenfassend können aus den mit CphBmLC erhaltenen Ergebnissen folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

- 1) Es ist gelungen, das Cystein in die Chromophorbindetasche funktionell einzufügen und damit eine kovalente Einbindung von PCB wie im CphA zu erreichen. Die Chromophorbindetasche des CphBm besitzt damit offensichtlich die Fähigkeit, eine Thioetherbindung mit PCB zu knüpfen sofern das Cystein als Chromophorbindestelle vorhanden ist. Anzeigt wird dies durch die hypsochrome Verschiebung des  $\lambda_{\max}$  der  $P_r$ -Form um 30 nm. Diese Fähigkeit ist jedoch empfindlich gegenüber konformellen Änderungen des Apo-Proteins oder der Chromophorbindestelle, die durch nichtreduzierende Bedingungen verursacht werden können (siehe auch 2).
- 2) Das Apo-Protein ist in der Lage, abhängig von den (einstellbaren) reduktiven Bedingungen zwei verschiedene „Modi“ anzunehmen. Unter reduzierenden Bedingungen kann das chromophorbindende Cystein eine Thioetherbindung mit PCB eingehen, unter nichtreduzierenden Bedingungen wird diese Reaktion verhindert (sei es durch Proteinkonformation, Blockade des Cysteins durch eine proteinogene Disulfidbrücke oder ein gemischtes Disulfid, bzw. durch Delokalisation einer katalytisch aktiven Aminosäure). Blockiertes CphBmLC-PCB ist spektral von CphBm-PCB nicht unterscheidbar, kann jedoch durch Zugabe von Reduktionsmittel in die Thioether-Form umlagern.
- 3) Das eingefügte Cystein wirkt sich nicht auf die spektralen Eigenschaften bezüglich der  $\lambda_{\max}$  von  $P_r$ - und  $P_f$ -Form des BV-Addukts von CphBmLC aus, CphBmLC-BV verhält sich diesbezüglich wie das unveränderte CphBm-BV.
- 4) Auch im CphBmLC-BV sind reduzierende Bedingungen für eine effektive Photochemie erforderlich, das eingefügte Cystein wirkt sich hierbei verstärkend auf diese Eigenschaft aus (die Photochemie ist verglichen mit CphBm-BV unter nichtreduzierenden Bedingungen noch schlechter).
- 5) Die Stereochemie der C-15-Doppelbindung von PCB bleibt während der Konversion von potentiell Histidin-gebundener (blockierter) zu Cystein-gebundener (freigeschalteter) Form unverändert. (Z,Z,Z bleibt Z,Z,Z; Z,Z,E bleibt Z,Z,E), der Neueinbau von PCB erfolgt in die  $P_r$ -Form (Z,Z,Z-Konformation).
- 6) Die Assemblierung mit BV läuft deutlich langsamer ab als mit PCB, die gefundenen Assemblierungsintermediate von CphBmLC werden in Kap. 3.6.7 vergleichend diskutiert.

## 3.6.7 Assemblierungsdifferenzspektren von CphBm, CphBmLC und CphA

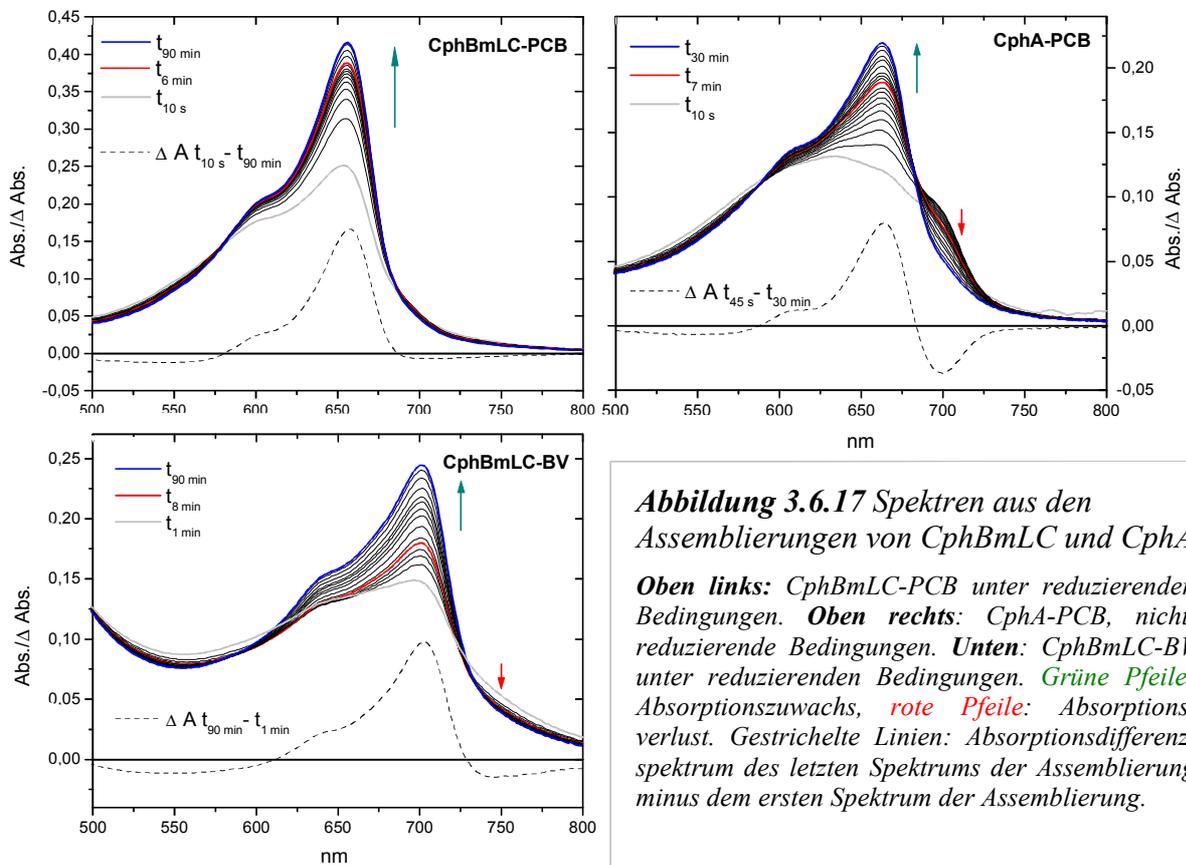


Abbildung 3.6.17 Spektren aus den Assemblierungen von CphBmLC und CphA

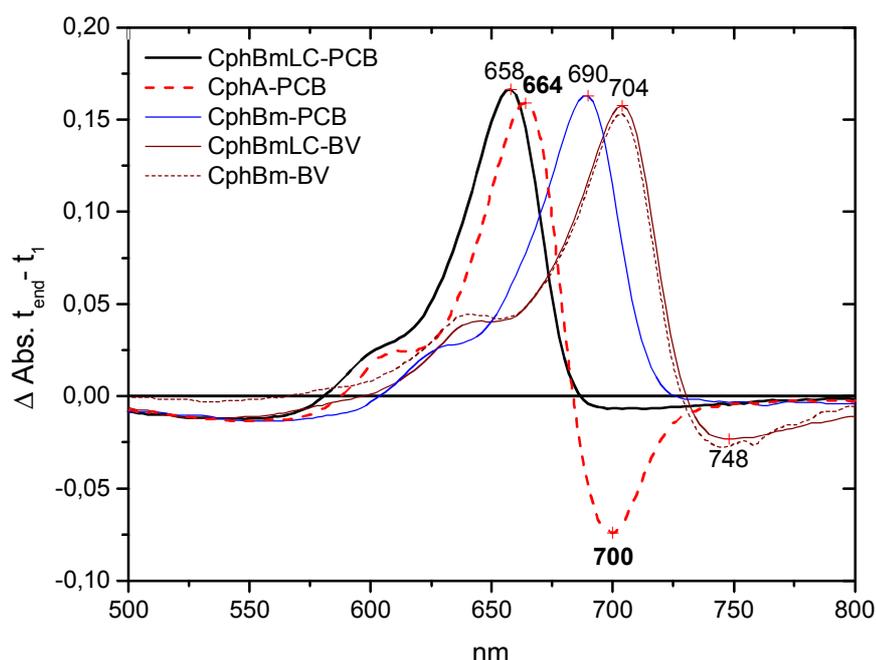
Oben links: CphBmLC-PCB unter reduzierenden Bedingungen. Oben rechts: CphA-PCB, nicht-reduzierende Bedingungen. Unten: CphBmLC-BV unter reduzierenden Bedingungen. Grüne Pfeile: Absorptionssuwachs, rote Pfeile: Absorptionsverlust. Gestrichelte Linien: Absorptionsspektren des letzten Spektrums der Assemblierung minus dem ersten Spektrum der Assemblierung.

Ein weiteres Charakteristikum von Phytochromen ist ihre Fähigkeit, während der Assemblierung mehr oder weniger stark ausgeprägte längerwellige Intermediate auszubilden. Eine gängige Methode, diese zu visualisieren, ist das erste Spektrum einer Assemblierung vom Spektrum nach Abschluß der Assemblierung zu subtrahieren (siehe Abb. 3.6.17). Diese Assemblierungsdifferenzspektren geben dann genauen Aufschluß über die Intensität und das  $\lambda_{\text{max}}$  später Intermediate der Chromophorassemblierung. In Abb. 3.6.18 sind vergleichend die Assemblierungsdifferenzspektren von CphA, CphBm und CphBmLC gezeigt, positive Werte bedeuten dabei einen Zuwachs an Absorption, negative Werte bedeuten ein Verschwinden der Absorption an der entsprechenden Wellenlänge. Die abgebildeten Differenzspektren sind zur besseren Vergleichbarkeit bezüglich der  $P_r$ -Absorption normiert.

Bei CphA tritt während der Assemblierung mit PCB ein charakteristisches, auch beim Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 gefundenes<sup>56</sup> Intermediat bei 700 nm auf (siehe Kap.3.5.2, Seite 76). Es könnte sich dabei um ein Histidin-gebundenes Zwischenprodukt oder eine  $P_{fr}$ -ähnliche Form handeln. Im Falle des Cph1 deuten Ergebnisse darauf hin, daß der gestreckte

Chromophor als Anlagerungsintermediat eine bathochrome Verschiebung durch eine Protonierung erfährt<sup>173, 174, 108</sup>. Weder CphBm-PCB noch CphBmLC-PCB zeigen dieses Intermediat. Die Möglichkeit, den Chromophor kovalent an das eingefügte Cystein zu binden, führt im Falle vom CphBmLC-PCB zwar zu sehr ähnlichen Zeitkonstanten in der Assemblierungskinetik sowie zu sehr ähnlichen spektralen Eigenschaften, jedoch nicht zu den gleichen Assemblierungsintermediaten, eine Eigenschaft, die demnach wahrscheinlich nicht von möglichen Histidin-gebundenen Intermediaten, sondern von der exakten Architektur der Chromophorbindetasche abhängig ist. Auch scheint hier keine (späte) Protonierung des PCB stattzufinden, was bedeutet, daß diese entweder nicht für eine erfolgreiche Thioetherverknüpfung essentiell ist oder aber zeitgleich mit der Ausbildung der P<sub>r</sub>-Form erfolgt.

Das 700 nm-Assemblierungsintermediat von Cph1 konnte durch die Behandlung des Proteins mit Iodacetamid (IAA), einem Reagenz, das kovalent mit Cysteinen reagieren kann, in der stationären Absorptionsspektroskopie beobachtet werden<sup>56</sup>. Eine Untersuchung mit IAA erweist sich jedoch als problematisch, da es auch mit Methioninresten reagieren kann, von denen in der unmittelbaren Umgebung des Chromophors ein in allen Phytochromen hochkonserviertes zu finden ist. In der Mutante CphA M267R zeigte der Austausch dieser Aminosäure mit die stärksten Veränderungen der spektralen Eigenschaften, die in Phytochromen bisher bekannt sind (Abb. 3.5.5) (abgesehen von Mutanten, in denen die Chromophorligation vollständig unterbunden ist). Zwar ist die Reaktivität mit Methioninresten unter den in Lamparter *et al.*<sup>56</sup> angegebenen Bedingungen wahrscheinlich eher gering, jedoch ist die Reaktivität und Selektivität von seitenkettenmodifizierenden Reagenzien oft von der Mikroumgebung abhängig. Desweiteren kann IAA ebenfalls, wenn auch schwächer, mit Histidinresten reagieren. Das hochkonservierte Histidin in unmittelbarer Nachbarschaft des Cysteins ist in bisher allen dahingehend untersuchten Phytochromen für die Bindung von Chromophoren essentiell, sei es als katalytisch aktive Aminosäure<sup>(176, 175, 84)</sup> oder sogar als alternative Chromophorbindestelle, wie im Falle der Bacteriophytochrome ohne Cystein in der Chromophorbindetasche vorgeschlagen wurde<sup>49</sup>. Die Mutante CphBm H267A (Kap. 3.6.12) beispielsweise zeigt mit PCB ebenfalls ein Anlagerungs-Intermediat bei einer Wellenlänge von ca. 700 nm analog dem IAA-blockierten Cph1.



**Abbildung 3.6.18** Assemblierungsdifferenzspektren von *CphA*, *CphBm* und *CphBmLC*

Differenzspektren aus dem letzten minus dem ersten Spektrum der Assemblierung. Die Spektren wurden der Vergleichbarkeit halber bezüglich der  $P_r$ -Absorption angepaßt. Alle Differenzspektren mit Ausnahme von *CphA* und *CphBm-PCB* unter reduzierenden Bedingungen. Die Legende liest die Spektren von links nach rechts.

Das Spektrum von *CphBm-BV* (+ DTT) zeigt wie *CphBmLC-BV* (+ DTT) ein Assemblierungs-Intermediat bei ca. 748 nm. Beide inkorporieren den Chromophor offensichtlich auf identische Art und Weise. Das Auftreten eines Intermediats bei *CphBmLC-BV* und *CphBm-BV* mit einer bathochromen Verschiebung von 48 nm analog dem Intermediat von *CphA* läßt vermuten, daß es sich dabei eher um späte Umlagerungsreaktionen des Chromophors (auf der „Suche“ nach dem optimalen Fit) handelt als um Histidin-gebundene Zwischenprodukte, welche in diesem Fall nur beim *CphA* zu beobachten wären. Ein Histidin-gebundenes Zwischenprodukt könnte beim *CphA* allerdings für die wesentlich deutlichere Ausprägung des 700 nm Intermediats mitverantwortlich sein (zu den vorgeschlagenen Protein-Chromophor-Bindungen siehe Abb. 3.2.3, Seite 62).

Das Spektrum von *CphBm-BV* (- DTT) wurde nur von 625 nm bis 775 nm aufgenommen und ist nicht abgebildet. Wie in Abb. 3.6.7 gezeigt, „assembliert“ *CphBm-BV* in Abwesenheit von DTT sehr schnell, das Differenzspektrum war dementsprechend flach. Es zeigte keinerlei Intermediate, die im Zeitrahmen des Experiments aufgelöst werden konnten. Die DTT-freie Faltung des *CphBm* könnte den vollständigen BV-Einbau also auch dadurch erschweren, daß es keine für einen „korrekten“ Einbau nötigen Umlagerungen zuläßt, wie sie

von CphBm und CphBmLC unter reduzierenden Bedingungen gezeigt wurden. Wahrscheinlich handelt es sich beim CphBm-BV (- DTT) eher um ein spätes Anlagerungsprodukt, das die (für eine effektive Photochemie) notwendigen Umlagerungen aufgrund partieller Fehlfaltung des CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen nicht durchführen kann. Dafür spricht auch der in Abb. 3.6.6 A gezeigte, sofortige Einbau von weiterem BV in CphBm nach Zugabe von DTT und die Konversion / Assemblierung von CphBmLC mit BV in Abb. 3.6.15. Das blockierte CphBmLC sowie das CphBm unter nichtreduzierenden Bedingungen assemblierten problemlos mit PCB und zeigten eine weitgehend normale Photochemie, was den Schluß erlaubt, daß PCB geringere sterische Anforderungen an die Bindetasche des CphBm stellt, als BV (sich sozusagen „ungehinderter“ bewegen kann). Dies könnte auch der Grund sein, warum mit PCB weder bei (sowohl blockierten, als auch „freigeschalteten“) CphBmLC noch bei CphBm detektierbare Assemblierungsintermediate beobachtet wurden. Insgesamt ist es daher sehr wahrscheinlich, daß Assemblierungsintermediate auf einen „induced fit“ des Chromophors in seine Bindetasche zurückzuführen sind.

### 3.6.8 Effekt von Imidazol auf die PCB-Addukte von CphBm und CphBmLC

Wie in früheren Arbeiten festgestellt wurde<sup>107, 144</sup>, neigt CphBm-PCB im Gegensatz zu CphA dazu, während der Ni-NTA Aufreinigung den Chromophor nahezu vollständig zu verlieren. Da es für Bacteriophytochrome gute Hinweise dafür gibt, daß ein hochkonserviertes Histidin als alternative Chromophorbindestelle dienen kann<sup>20, 49</sup>, wurde mit Kenntnis der Instabilität der PCB-Einlagerung in CphBm ein möglicher kompetitiver Effekt von Imidazol untersucht. Daß das Histidin eine Rolle bei der Chromophorligation spielt, sei es als chromophorakzeptierende<sup>20</sup> oder als katalytisch essentielle<sup>84, 175, 176</sup> Aminosäure, wurde in einigen vorhergehenden Arbeiten bereits nachgewiesen und sollte hier im Vergleich mit CphBmLC mit mechanistischem Aspekt untersucht werden.

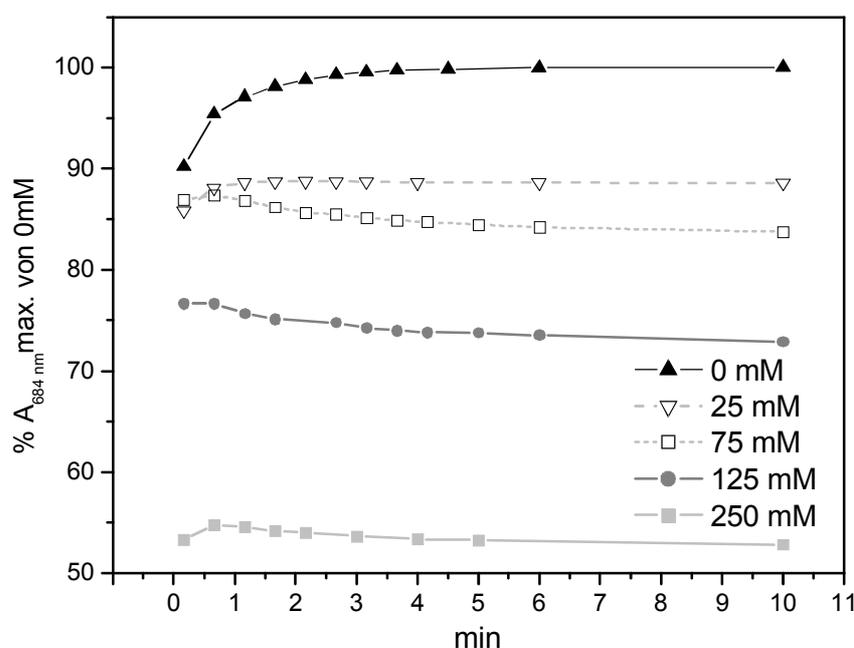
Zu beachten ist, daß die Versuche zur Assemblierung von CphBm in Anwesenheit von Imidazol unter nichtreduzierenden Bedingungen durchgeführt wurden, während die Assemblierungskinetiken von CphBmLC - um einen kovalenten Einbau an das Cystein zu erlauben - unter reduzierenden Bedingungen stattfanden. Versuche zum zeitlichen Verlauf der Assemblierung von CphBm und CphBmLC mit BV unter Imidazoleinfluß wurden bisher nicht durchgeführt.

#### 3.6.8.1 Assemblierung von CphBm unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen

Apo-CphBm wurde wie beschrieben (Kap. 3.6.2) aufgereinigt und mit einer 5 M Imidazol-Stammlösung (gepuffert auf pH 8,0) auf verschiedene Imidazolkonzentrationen eingestellt (siehe Abb. 3.6.19).

Besonders auffällig ist die sehr schnelle Einlagerung von PCB in CphBm. Während die Kurve der 0 mM Probe im Rahmen der bisherigen Beobachtungen liegt (siehe Kap. 3.6.3.5), läuft die Einlagerung des PCB bei den anderen Imidazolkonzentrationen praktisch instantan ab. Allerdings wurde hier das erste Spektrum im Vergleich zu Abb. 3.6.7 einige Sekunden später aufgenommen, daher ergibt sich der hier gezeigte, „flache“ Kurvenverlauf. Das Ausmaß der PCB-Einlagerung ist dabei umgekehrt proportional zur Imidazolkonzentration. Trägt man die Imidazolkonzentration gegen die maximale Absorption auf, stellt sich zudem heraus, daß das Verhältnis von Chromophoreinlagerung und Imidazolkonzentration annähernd linear ist. Weiterhin ist bei den imidazolhaltigen Proben nach 15 Minuten bereits eine leichte Hypochromie zu beobachten. Es findet also nicht nur eine kompetitive Inhibition der Einlagerung von PCB statt, sondern darüberhinaus kann man einen Verlust von PCB aus der Chromophorbindetasche beobachten. Dieser Prozeß wird in Kap. 3.6.8.3 weitergehend beschrieben, ebenso

wie die Höhe der Differenzspektren (der  $\Delta\Delta$ -Abs. Wert), die sich ebenfalls umgekehrt proportional zur Imidazolkonzentration verhält. Der 100 % Wert der 0 mM Probe ergab in diesem Experiment ein  $\lambda_{\max}$  von 0,39 bei einer Apoprotein-Konzentration von 4,9  $\mu\text{M}$ . Dies entspricht einem apparentem Extinktionskoeffizienten von  $79700 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . (wobei der Anteil des überschüssigen Chromophors zu beachten ist).



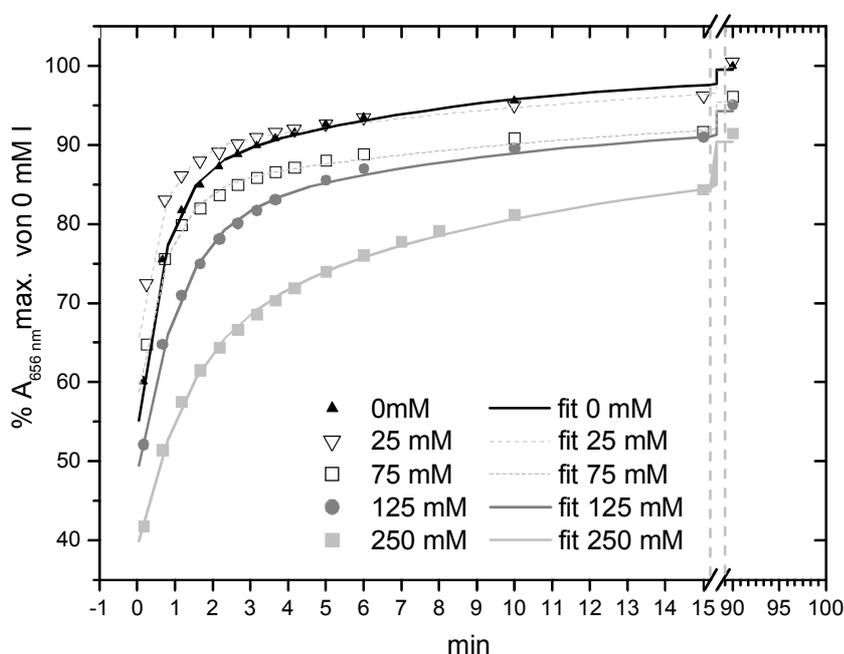
**Abbildung 3.6.19** Assemblierung von CphBm unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen

Verlauf der Absorption fünf identischer CphBm-Proben bei 684 nm unter den angegebenen Imidazolkonzentrationen. Es wurde jeweils der 2,5 fache molare Chromophorüberschuß zugegeben. Die Werte sind normalisiert auf das maximale Spektrum von CphBm-PCB bei 0 mM Imidazol. 100% entsprechen hier einer  $A_{684}$  von 0,39 bei einer Proteinkonzentration von ca. 0,54 mg/ml

Die Bindung von PCB an CphBm scheint ein Gleichgewichtszustand von (kovalent?) gebundenem und angelagertem (ungebundenem) Chromophor zu sein. Dieses Gleichgewicht wird von Imidazol in Richtung des ungebundenen und photochemisch inaktiven Zustands verschoben. Ob hierbei das Imidazol als Inhibitor in der Chromophorbindetasche mit dem Imidazolring des hochkonservierten Histidins als Bindungspartner für das PCB kompetiert oder durch sterische oder ionische Wechselwirkungen eine stabile Einlagerung des PCB verhindert, kann mit diesem Experiment nicht geklärt werden. Imidazolbedingte Einflüsse auf Protonierungs- oder Deprotonierungsreaktionen können jedoch eher ausgeschlossen werden, da eine pH-Abhängigkeit der Bindung in anderen Puffersystemen bisher nicht beobachtet werden konnte<sup>144</sup>.

### 3.6.8.2 Assemblierung von CphBmLC mit PCB unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen

Wenn die Imidazol-abhängige Assemblierung jedoch mit der LC-Mutante durchgeführt wird, ergibt sich aufgrund der Fähigkeit des Proteins zur kovalenten Chromophorbindung ein anderes Verhalten. Apo-CphBmLC wurde wie beschrieben (Kap. 3.6.2) aufgereinigt und mit einer 5 M Imidazol-Stammlösung (gepuffert auf pH 8,0) auf verschiedene Imidazolkonzentrationen eingestellt (siehe Abb. 3.6.20). Die hier beobachteten Unterschiede der Endwerte in der maximalen Absorption bei 656 nm konnten experimentell auf eine leichte Hypochromie von freiem PCB durch Imidazol zurückgeführt werden (-12%), der Einfluß auf die Höhe der Differenzspektren wird in Kap. 3.6.8.3 diskutiert.



**Abbildung 3.6.20** Assemblierung von CphBmLC mit PCB unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen

Verlauf der Absorption fünf identischer CphBmLC-Proben bei 656 nm unter den angegebenen Imidazolkonzentrationen. Es wurde jeweils der 2,5 fache molare Chromophorüberschuß zugegeben. Die Werte sind normalisiert auf das maximale Spektrum von CphBmLC-PCB bei 0 mM Imidazol. 100% entsprechen hier einer  $A_{656}$  von 0,42 bei einer Proteinkonzentration von ca. 0,44 mg/ml

Der 100 % Wert der 0 mM Probe ergab in diesem Experiment eine maximale Absorption von 0,416 bei einer Apoprotein-Konzentration von 3,9  $\mu\text{M}$ . Dies entspricht einem apparentem Extinktionskoeffizienten von  $106000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (wobei auch hier der Anteil überschüssigen Chromophors zu beachten ist). Dieser Wert ist im Vergleich zum CphBm-PCB etwa 30%

höher und zeigt, daß die Thioetherform des PCB einen deutlich höheren Extinktionskoeffizienten besitzt, als die im CphBm gebundene Form (siehe dazu auch Abb. 3.6.9 unten, Kap. 3.6.5.1 sowie Abb. 3.6.10).

Im deutlichen Gegensatz zu CphBm findet beim CphBmLC unter Imidazoleinfluß eine weitgehend normale Assemblierung von PCB, vergleichbar mit CphA (Kap. 3.5.2), statt. Wie aus Abbildung 3.6.20 jedoch eindeutig hervorgeht, ist die Geschwindigkeit der Assemblierung mit steigender Imidazolkonzentration verlangsamt. Die Daten der hier gezeigten Assemblierungen können biexponentiell gefittet werden, die Zeitkonstanten finden sich in Tabelle 3.6.1.

<i>mM</i> Imidazol	$t_1$	$\pm$ Fehler	$t_2$	$\pm$ Fehler
0	39 s	3 s	7:30 min	1:00 min
25	34 s	3 s	12:30 min	1:30 min
75	42 s	3,5 s	12:42 min	1:40 min
125	64 s	5,5 s	10:10 min	1:40 min
250	71 s	8,4 s	9:40 min	0:52 min

**Tabelle 3.6.1:** Zeitkonstanten und Fehlerwerte aus dem biexponentiellen Fit der Assemblierung von CphBmLC mit PCB unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen (Abb. 3.6.20).

Die Zeitkonstante der frühen Reaktion ( $t_1$ ) nimmt mit steigender Imidazolkonzentration zu, die Zeitkonstanten der späteren Reaktion ( $t_2$ ) sind unter Imidazoleinfluß zwar ebenfalls erhöht, jedoch läßt sich dort keine direkte Korrelation zur Imidazolkonzentration erkennen. Hierbei ist zu beachten, daß die zweite Zeitkonstante überwiegend die späten Umlagerungsprozesse beschreibt, die während der Assemblierung auftreten. Entsprechend sollte, wie hier beobachtet,  $t_2$  kaum beeinflusst sein. Da die Thioetherbindung zudem gegenüber Imidazol inert ist, findet beim CphBmLC-PCB auch über einen längeren Zeitraum keine Verdrängung von PCB aus dem Protein statt (siehe auch Kap. 3.6.8.3).

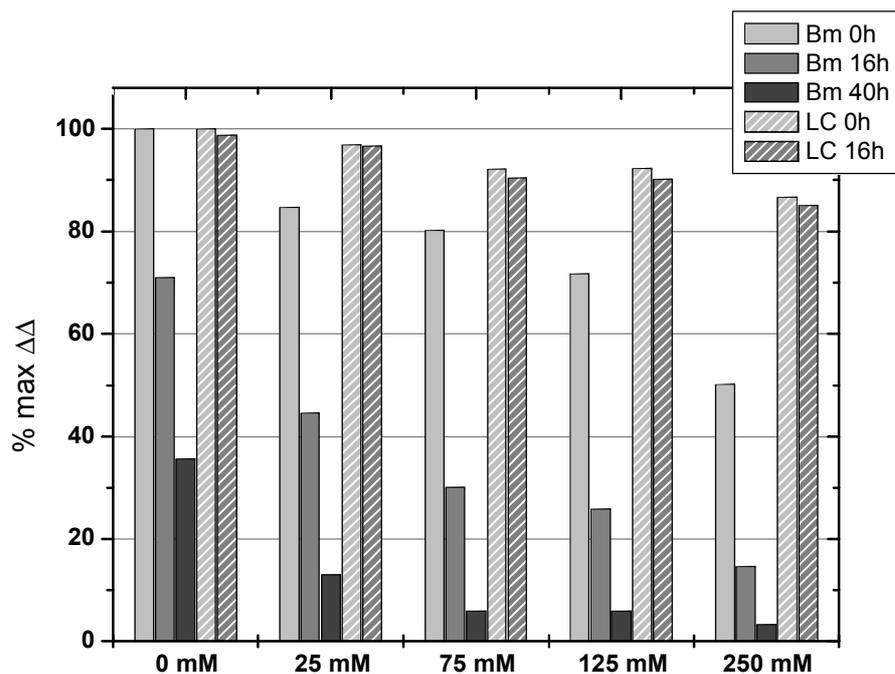
Das konservierte Histidin 267 ist für einen kovalenten Einbau von PCB in Phytochrom A von Hafer und Erbse (<sup>84, 175, 176</sup>) sowie Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* (<sup>20</sup>) essentiell. Falls das Histidin im CphBm analog zu Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* als Chromophorbindestelle dient, hätte eine Gleichgewichtsverschiebung zu ungebundenem bzw. angelagertem Chromophor eine herabgesetzte Assemblierungsgeschwindigkeit für CphBmLC zur Folge. Genau dies konnte mit diesem Experiment gezeigt werden. Histidin 267 stellt damit im CphBmLC also sehr wahrscheinlich eine transiente Chromophorbindestelle dar, die den Chromophor für einen nukleophilen Angriff des Cysteins positioniert. Bisher wird für die Chromophorligation ein Zwei-Stufen-Modell diskutiert <sup>56, 177</sup>, das einen schnellen Anlagerungsschritt und einen langsamen katalytischen Schritt (Thioetherverknüpfung) annimmt. Aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse über Bacteriophytochrome ist es notwendig, dieses Modell zu

erweitern. Nach einem schnellen Anlagerungsschritt, der das Strecken des Chromophors beinhalten kann (wie bei der CphA Mutante H267A evtl. zu beobachten), folgt die Bindung über das hochkonservierte Histidin, eine Reaktion, die durch Imidazol inhibiert werden kann. Anschließend erfolgt bei Phytochromen mit Cystein als Chromophorbindestelle die langsame Thioetherverknüpfung des (geeigneten) Chromophors. Dies wird im Verhalten der CphBmLC Mutante unter Imidazoleinfluß deutlich: die frühe Reaktion ( $t_1$ ) ist bei steigender Imidazolkonzentration verlangsamt, während die Zeitkonstante der langsamen Reaktion (Thioetherverknüpfung) keinem eindeutigen Trend folgt. Als letzter Schritt der Chromophorbinding könnten die beobachteten Umlagerungsprozesse bzw. Protonierungs- / Deprotonierungsreaktionen sein, wie sie sich in den späten Assemblierungsintermediaten zeigen. Ein Modell zur Chromophorbinding wird in Kap. 3.8 diskutiert.

### 3.6.8.3 Zeitlicher Verlauf des Chromophorverlusts aus CphBm(LC)-PCB

Zur Überprüfung des Einflusses von Imidazol auf die Stabilität von PCB im CphBm und CphBmLC wurden die assemblierten Proteine verschiedenen Imidazolkonzentrationen ausgesetzt und über einen längeren Zeitraum inkubiert. Dies sollte die beim CphBm PCB-Addukt aufgetretenen Fragen klären, ob es sich bei der Assemblierung um ein Gleichgewicht handelt, und ob der Chromophor vollständig aus dem Protein abdissoziieren kann (und damit einer Degradation im Puffer preisgegeben wird).

Zu diesen Experimenten wurden Aliquots von CphBm bzw. CphBmLC mit 2,5-fach molarem Überschuß assembliert, bis keine weitere Erhöhung der  $\Delta\Delta$ -Abs. Werte beobachtet werden konnte. Für die Höhe der Differenzspektren spielte es keine Rolle, ob die Proteine zuerst mit Chromophor und dann mit Imidazol inkubiert wurden oder umgekehrt. Zugabe von Imidazol ad 250 mM zu voll assembliertem CphBm-PCB halbierte den  $\Delta\Delta$ -Abs. Wert sofort, ebenso stellte sich während der Assemblierung der mit 250 mM Imidazol *vorinkubierten* CphBm-Probe verglichen mit der 0 mM-Probe von vornherein nur ein halb so großes Differenzspektrum ein. Die  $\Delta\Delta$ -Werte von CphBmLC zeigten sich ungeachtet des Zeitpunkts der Imidazolzugabe generell nur geringfügig beeinflusst. Im Kontrollexperiment zeigte Imidazol einen schwachen Einfluß auf das Spektrum von freiem PCB. Dieser leichte hypochrome Effekt wirkt vornehmlich auf die P<sub>r</sub>-Formen der Proteine und hat damit auch auf die  $\Delta\Delta$ -Abs. Werte Auswirkungen, die im Bereich von maximal 10-12% der Gesamthöhe des Differenzspektrums bei 250 mM Imidazol liegen. Die in Abb. 3.6.21 angegebenen Werte sind bezüglich dieses Effekts nicht korrigiert.



**Abbildung 3.6.21** Zeitlicher Verlauf des Chromophorverlusts aus CphBm und CphBmLC bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen.

$\Delta\Delta$  = Höhe des Differenzspektrums, die Werte wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf das maximale  $\Delta\Delta$  der Ausgangsproben normalisiert.

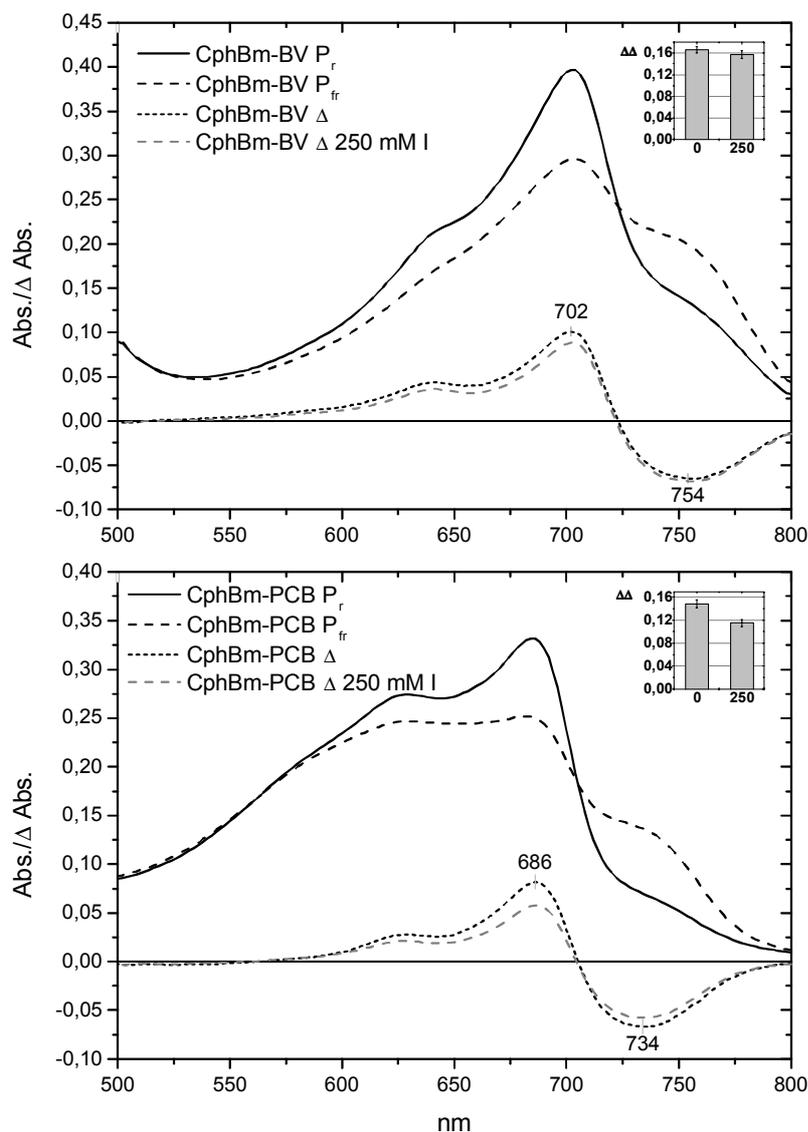
Besonders auffällig ist zunächst, daß die  $\Delta\Delta$ -Abs. Werte von CphBmLC von der Imidazolkonzentration weitgehend unberührt bleiben. Die Reduktion der  $\Delta\Delta$ -Abs. Werte liegt dort im Bereich des soeben diskutierten Einflusses vom Imidazol auf freies PCB in Puffer. Die Inkubation über Nacht ändert an den Werten von CphBmLC nichts, der Chromophor bleibt stabil im Protein gebunden.

Die Werte von CphBm jedoch werden sofort und direkt proportional zur Imidazolkonzentration beeinflusst. Weiterhin nehmen dort die Werte fast linear mit der Zeit der Inkubation ab. Davon zeigt sich im übrigen auch die imidazolfreie Probe betroffen, die nach 40 h nur noch 38% des ursprünglichen  $\Delta\Delta$ -Abs. Werts aufweist. Die Menge an photoaktivem CphBm ist in allen Proben mit mehr als 25 mM Imidazol nach 40 h auf unter 10% des Ausgangswerts gesunken. In den Spektren konnten zudem eindeutig die gelben Abbauprodukte des PCB identifiziert werden. Die Verschiebung des Bindungsgleichgewichts von PCB an CphBm resultiert also offensichtlich in einem höheren Anteil an ungebundenem Chromophor, der dann durch das Protein nicht mehr gegen einen Abbau im Puffer geschützt wird.

Die beobachteten Verluste der Photoaktivität im Fall von CphBm beruhen nicht auf Proteindegradation, da alle Proben nach dem Experiment durch erneute Zugabe von frischem PCB fast vollständig re-assembliert werden konnten.

### 3.6.8.4 Der Imidazol-Einfluß auf CphBm-BV und CphBm-PCB unter reduzierenden Bedingungen

Dieses Experiment wurde als Weiterführung der Versuche aus Kap. 3.6.8.3 durchgeführt, um herauszufinden, ob das BV-Addukt von CphBm unter Einwirkung von Imidazol ebenfalls einen Chromophorverlust bzw. eine Verschiebung des Bindungsgleichgewichts zeigt wie das CphBm-PCB-Addukt. Außerdem wurden reduzierende Bedingungen eingestellt, die für eine effektive Einbindung von BV in CphBm notwendig waren (Kap. 3.6.3.4). Das bedingte die Möglichkeit, das Verhalten von CphBm-PCB unter diesen Bedingungen vergleichend zu untersuchen.



**Abbildung 3.6.22** Effekt von Imidazol auf CphBm-PCB und CphBm-BV

Identische Apo-CphBm Proben (1 mM DTT) wurden mit einem zweifach molaren Überschuß an jeweiligem Chromophor versehen und nach Abschluß der Assemblierung mit einer gepufferten ImidazolstammLösung auf 250 mM Imidazol gebracht. Die Differenzspektren unter Imidazoleinfluß sind grau gestrichelt. **Inserts:** Höhe der Differenzspektren bei 0 mM und 250 mM Imidazol.

Die beobachtete Verschiebung des Bindungsgleichgewichts am Histidin tritt, wie hier mit jeweils vollständig assembliertem CphBm unter *reduzierenden* Bedingungen gezeigt, bei BV drastisch schwächer auf als bei PCB, was erneut für eine wesentlich stabilere Einbindung des BV in die Chromophorbindetasche von CphBm spricht (Abb. 3.6.22). Die Wirkung von Imidazol auf das PCB-Addukt von CphBm ist im Vergleich zum Experiment unter nicht-reduzierenden Bedingungen allerdings (evtl. aufgrund besserer Faltung des Proteins) ebenfalls deutlich abgeschwächt (vgl. Abb. 3.6.21 CphBm 0 mM Probe nach 0 h in 250 mM Imidazol). Die PCB-CphBm Bindung erreicht aber nicht die Stabilität des BV-Addukts (Abb. 3.6.22 Inserts). Während die  $\Delta\Delta$ -Abs. Verringerung beim BV vollständig auf den Einfluß von Imidazol auf freies BV zurückgeführt werden kann, geht sie beim PCB-Addukt noch deutlich über diesen Effekt hinaus. Das BV kann also nicht instantan durch Imidazol aus der Bindetasche „verdrängt“ werden, was beim PCB trotz der verbesserten „Konstitution“ des Proteins weiterhin möglich ist. Nichtsdestotrotz wird hier zum ersten Mal ein Reduktionsmittelbedingter Unterschied der PCB-Addukte von CphBm deutlich, da der Chromophorverlust unter reduzierenden Bedingungen eindeutig gehemmt ist.

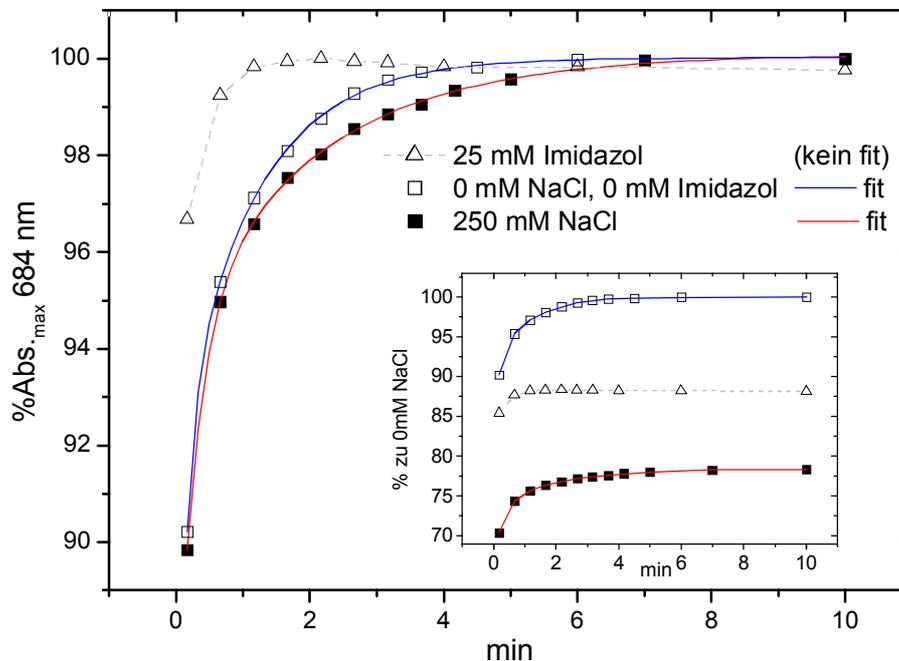
Darüberhinaus kann man in Abb. 3.6.22 erkennen, daß mit BV (vor der Zugabe von Imidazol) ein höheres maximales Differenzspektrum erreicht wird als bei der mit PCB assemblierten Probe, was dafür spricht, daß bei gleichen Chromophor-Protein Verhältnissen entweder mehr photoaktives BV Addukt gebildet wird, oder der Extinktionskoeffizient des gebundenen BV's in der Bindetasche größer ist als jener von PCB (oder beides). Auch diese Beobachtung unterstützt die Vermutung, daß die Chromophorbindetasche für die Inkorporation von BV besser geeignet ist als für PCB. Das wird auch durch die Experimente zur Chromophorkompetition bestätigt (Kap. 3.6.10).

### 3.6.9 Effekt von NaCl auf CphBm

Um auszuschließen, daß es sich bei dem Effekt mit Imidazol um einen ausschließlich ionischen Effekt handelt, wurde im Rahmen der Versuche mit Imidazol (voriges Kapitel) ein Kontrollexperiment unter Zusatz von 250 mM NaCl durchgeführt (die Gesamtkonzentration an NaCl betrug demnach 400 mM NaCl).

Wie bereits erwähnt, verläuft die Assemblierungsreaktion bei CphBm mit PCB sehr schnell, die Werte in Abb. 3.6.23 beginnen daher bereits bei etwa 90%. Der Verlauf der Assemblierung der Probe mit 25 mM Imidazol ist zum Vergleich ebenfalls dargestellt, um zu verdeutlichen, daß NaCl auf den Verlauf der Reaktion einen vollkommen anderen Einfluß hat als Imidazol. Während mit Imidazol praktisch instantan ein Gleichgewicht von gebundenem und ungebundenem Chromophors entsteht (bei höheren Imidazolkonzentrationen wird dies

noch deutlicher, siehe Kap. 3.6.8, Abb. 3.6.19), findet unter Anwesenheit von NaCl eine vergleichsweise ungestörte Reaktion statt.



**Abbildung 3.6.23** Effekt von NaCl auf die CphBm-PCB Assemblierungskinetik

Der Assemblierungsverlauf für identische Apoprotein-Proben unter TBS + 25mM Imidazol (offene Dreiecke), TBS + 250 mM NaCl (Quadrate) und Probe in TBS (offene Quadrate) bezogen auf den Maximalwert der jeweiligen Reaktion. **Insert:** Darstellung der Werte bezogen auf den Maximalwert der Probe in TBS. Dies verdeutlicht die unterschiedlichen Endwerte der Assemblierung.

Die beiden Kurven können mit folgenden Zeitkonstanten für  $t_1$  und  $t_2$  biexponentiell gefittet werden:

CphBm-PCB TBS :	8 s und	68 s
CphBm-PCB TBS + 250 mM NaCl :	18 s und	122 s

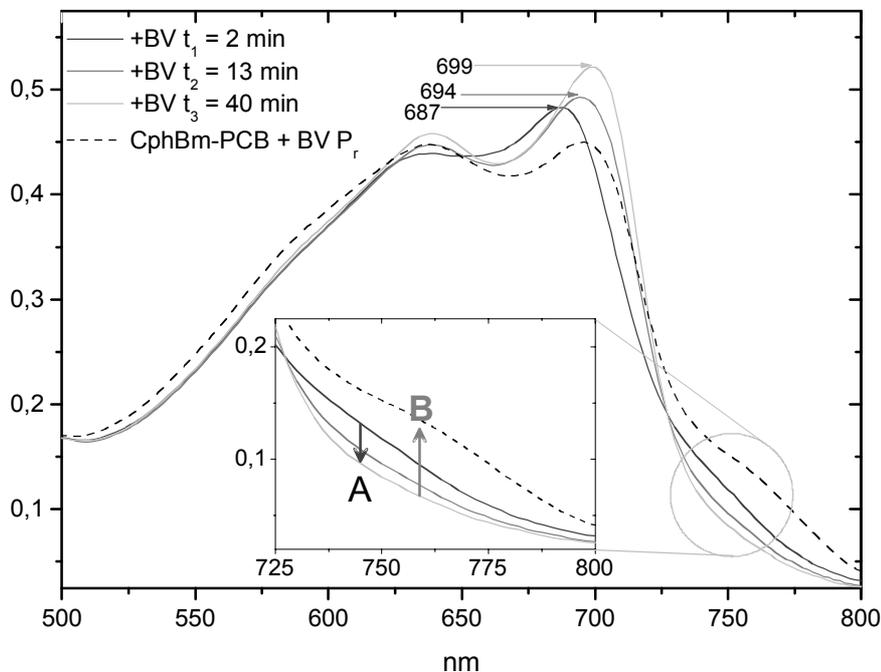
Die Werte für CphBm-PCB weichen in diesem Experiment von den in Kap. 3.6.3.5 ermittelten Werten für eine andere Präparation von CphBm ab (12 s und 115 s), was unterstreicht, daß diese Messungen für eine exakte Bestimmung kinetischer Daten oft wiederholt werden sollten. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnis kann man die Assemblierungsreaktion der Probe mit 250 mM NaCl aber dennoch als leicht verlangsamt bezeichnen.

Der wichtigste Unterschied besteht hier in der deutlich reduzierten Amplitude des Absorptionsmaximums der Probe unter erhöhter Salzkonzentration (ca. 78% der unbehandelten Probe), es scheint jedoch, daß der Extinktionskoeffizient des Proteins (evtl. durch beginnende

Auflösung von Sekundär- oder Tertiärstrukturelementen) bei einer Salzkonzentration von 450 mM (TBS + 250 mM NaCl) reduziert ist. Die in diesem Versuch beobachtete leichte Verzögerung des Chromophoreinbaus kann ebenso auf beginnende Denaturierung zurückzuführen sein oder aber polare Wechselwirkungen während der Chromophoreinlagerung andeuten. Weitere Untersuchungen über die Konzentrationsabhängigkeit des NaCl-Einflusses konnten noch nicht durchgeführt werden.

### 3.6.10 Experimente zur Chromophorkompetition

Wie die bisherigen Experimente zeigten, führt die Verwendung von BV oder PCB zu Chromoproteinen mit merklich unterschiedlichen spektralen Eigenschaften. Um festzustellen, welcher der beiden Chromophore, BV oder PCB, eine stärkere Chromophor-Protein-Interaktion im Fall der instabilen kovalenten (oder nicht-kovalenten) Bindung zeigt, wurde mit den Proteinen CphBm und CphBmLC eine Chromophorkompetition durchgeführt. Die hier angewandte Methode stellt eine Abwandlung von Lindner *et al.*<sup>99</sup> dar, die durch Konkurrenz mit PCB die nicht-kovalente Bindung von 3'-Methoxy-PCB in Haferphytochrom nachwies.



**Abbildung 3.6.24** Konversion der CphBm-PCB  $P_r$ -Form zur CphBm-BV  $P_r$ -Form.

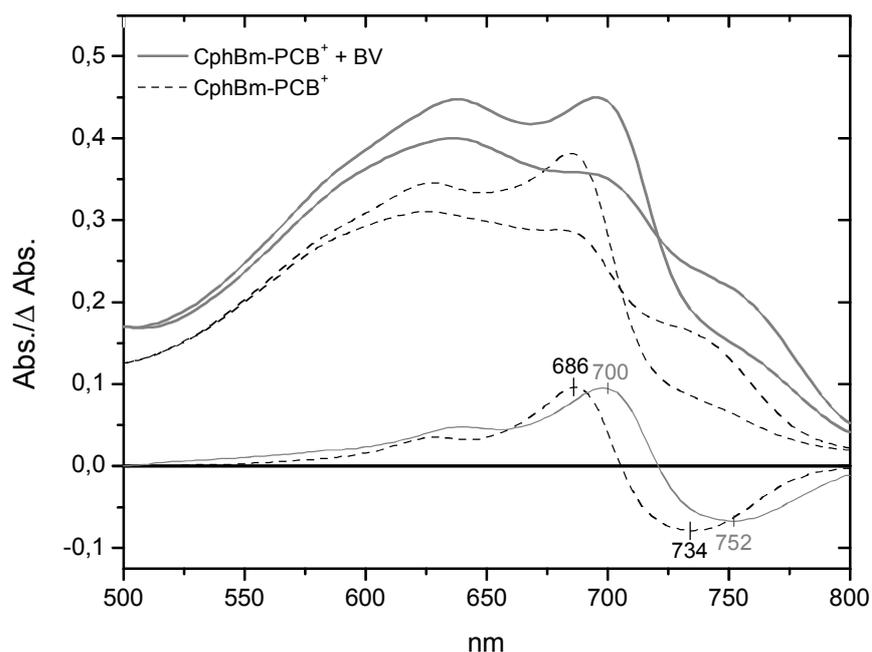
Eine CphBm-PCB Probe wurde nach Zugabe einer äquimolaren Menge von zusätzlichem PCB nach  $P_r$  belichtet und anschließend mit einem 2-fach molaren Überschuss an BV versetzt. Spektren nach 2 min, 13 min bzw. 40 min nach BV-Zugabe ( $t_1$ ,  $t_2$ , bzw.  $t_3$ ) und das Spektrum der Probe nach vollständiger Konversion und mehreren Belichtungszyklen (gestrichelte Linie).

Im **Insert** sind zwei Prozesse hervorgehoben: **A**: Das Verschwinden der restlichen  $P_{fr}$ -Form von CphBm-PCB. **B**: der charakteristische, hohe  $P_{fr}$ -Anteil der  $P_r$ -Form von CphBm-BV nach einem vollständigen Belichtungszyklus.

In dem hier beschriebenen Experiment wurden die Proteine jeweils mit dem 2,9-fach molaren Überschuss an Chromophor assembliert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte eine weitere, frische Zugabe einer äquimolaren Menge des bereits vorgelegten Chromophors, um bereits aus der Bindetasche verlorengegangenen Chromophor zu ersetzen und

darüberhinaus auch einen Überschuß für den kompetitiven Charakter des Experiments einzustellen. Anschließend wurden die Proben mit dem zweifachen Überschuß des jeweils *anderen* Chromophors versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten genommene Spektren dokumentieren den Verlauf des Chromophoraustausches.

Abbildung 3.6.24 gibt den Verlauf der Konversion von der P<sub>r</sub>-Form von CphBm-PCB zur P<sub>r</sub>-Form von CphBm-BV wieder. Es findet nach Zugabe von BV eine eindeutige bathochrome Verschiebung des P<sub>r</sub>-Maximums von 687 nm nach 699 nm statt, das bereits nach 40 Minuten vollständig dem P<sub>r</sub>-Maximum des CphBm-BV Adduktes entspricht. Gleichzeitig kann das Verschwinden des (nach Belichtung vorhandenen) P<sub>r</sub>-Anteils der P<sub>r</sub>-Form von CphBm-PCB beobachtet werden. Der charakteristische, hohe P<sub>r</sub>-Anteil der P<sub>r</sub>-Form von CphBm-BV nach einem vollständigen Belichtungszyklus zeigt ebenfalls, daß hier das PCB binnen 40 Minuten vollständig von BV aus der Chromophorbindetasche verdrängt werden konnte. Die Abbildung 3.6.25 zeigt dazu das Protein vor und eine Stunde nach BV Zugabe.



**Abbildung 3.6.25** CphBm-PCB vor und nach BV Zugabe.

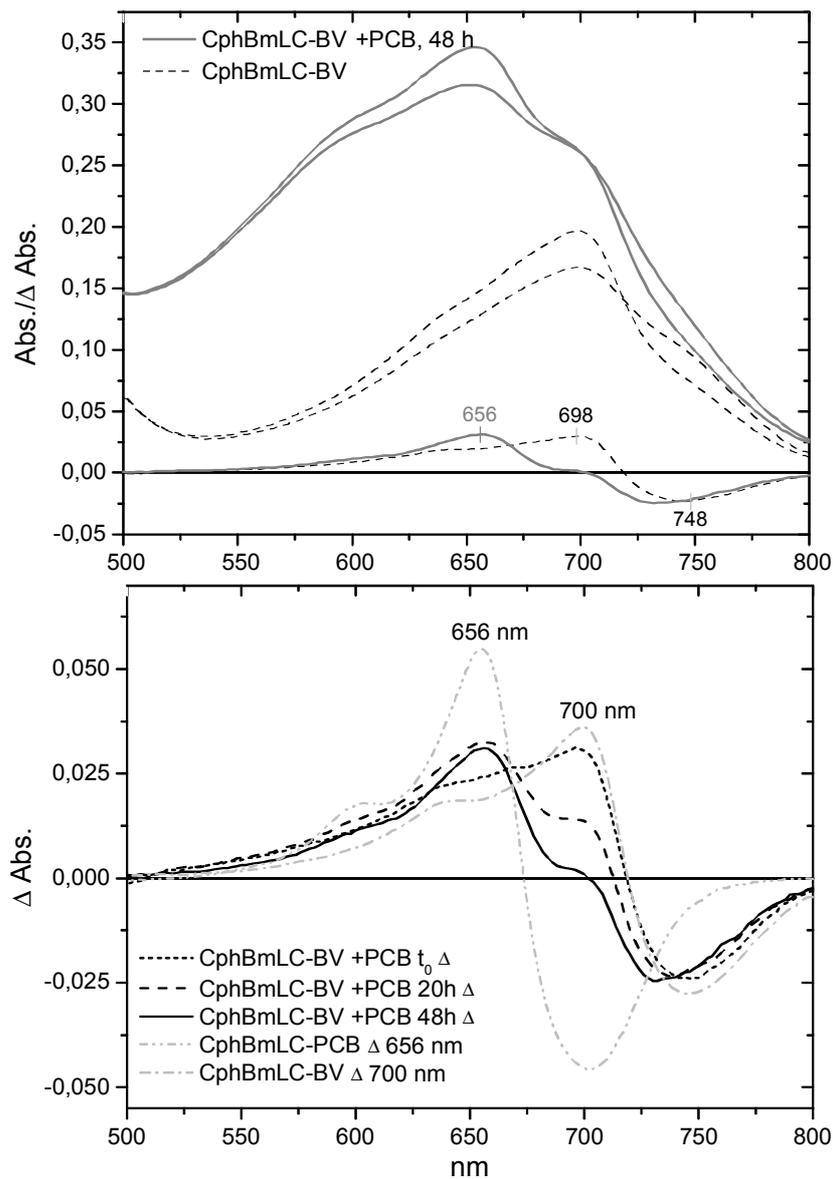
*Gestrichelte Linien: CphBm mit ca. vierfachem molarem Überschuß an PCB.  
Durchgezogene Linien: Spektren 1 h nach Zugabe eines zweifach molaren Überschusses von BV.*

Im umgekehrten Versuch blieb das mit BV vorassemblierte CphBm gegenüber der Nachassemblierung mit PCB auch nach 48 h vollständig inert, es fand keinerlei Chromophoraustausch statt (ohne Abbildung). Dieser Versuch belegt endgültig, daß CphBm eine höhere Affinität zu BV besitzt als zu PCB, eine Schlußfolgerung, die durch die Assemblierungs-

kinetiken (Abb. 3.6.7) und durch die Belichtungseffekte (Abb. 3.6.6) in dieser Klarheit nicht gezogen werden konnte und über die bisher veröffentlichten Erkenntnisse hinausgeht.

Auf diesem Hintergrund ist das identische Experiment mit dem CphBmLC besonders aufschlußreich. Da hier das BV bereits eine Chromophorbindetasche vorfindet, die abgesehen vom eingefügten Cystein sterisch optimal sein sollte, adressiert dieses Experiment die Frage, ob es sich bei der Bindung von BV zum Protein um eine kovalente Bindung oder - wie bei der Bindung von PCB an CphBm - um ein Bindungsgleichgewicht handelt (und damit um eine nichtkovalente oder instabile kovalente Bindung). Da die Thioetherbindung stabiler sein sollte als die vorgeschlagene Enamin/Amidin-Tautomerie des BV-Addukts (Abb. 3.2.3, Kap. 3.1.1), sollte PCB das BV aus der Chromophorbindetasche von CphBmLC verdrängen können, sofern das BV nicht dauerhaft stabil (kovalent) am Protein sitzt und dadurch eine Einlagerung von PCB und damit auch eine kovalente Verknüpfung an das Cystein verhindert.

Die Differenzspektren in Abbildung 3.6.26 zeigen eindeutig, daß es zumindest teilweise möglich ist, BV durch Zugabe von PCB aus CphBmLC zu verdrängen (wenn auch nicht vollständig). Das nach 48 h resultierende Differenzspektrum weist ein Maximum bei 656 nm auf, das der P<sub>r</sub>-Form von CphBmLC-PCB zuzuschreiben ist. Das PCB muß dabei in diesem Fall eine Thioetherbindung mit dem Cystein eingegangen sein, da man ansonsten eine P<sub>r</sub>-Form mit einem  $\lambda_{\max}$  von 686 nm wie beim CphBm-PCB beobachten sollte. Wie im unteren Teil der Abbildung zu erkennen, liegt die P<sub>fr</sub>-Form von CphBmLC-PCB im gleichen Wellenlängenbereich wie die P<sub>r</sub>-Form von CphBmLC-BV, sodaß sich bei einer Mischung der beiden Spezies beide Absorptionen an dieser Stelle auslöschen. Da die Photokonversion zur P<sub>fr</sub>-Form in beiden Addukten nicht annähernd vollständig ist, wird die P<sub>fr</sub>-Form des CphBmLC-PCB im 48 h Differenzspektrum von der nicht photokonvertierten P<sub>r</sub>-Form des CphBmLC-BV überlagert. Dies ist der Grund, warum das 48 h Differenzspektrum einen deutlichen „Sattelpunkt“ bei ca. 700 nm aufweist. Die Form des 48 h Differenzspektrums kann mathematisch aus den Differenzspektren der beiden einzelnen Chromophor-Addukte errechnet werden - dadurch kann eine Verteilung von 60% CphBmLC-PCB zu 40% CphBmLC-BV ermittelt werden.



**Abbildung 3.6.26** CphBmLC-BV vor und nach PCB Zugabe.

**Oben:** CphBmLC-BV vor (gestrichelte Linien) und 48 h nach PCB Zugabe (durchgezogene Linien), es ist deutlich der Überschuss an freiem Chromophor nach Zugabe von PCB zu erkennen. **Unten:** In **grau:** Differenzspektren identischer Apoprotein-Proben mit dem jeweiligen Chromophor einzeln ( $\lambda_{\max} = 700 \text{ nm}$  für BV,  $\lambda_{\max} = 656 \text{ nm}$  für PCB). In **schwarz:** Die Differenzspektren der Probe vor PCB-Addition sowie 20 h und 48 h nach PCB Addition.

Der Chromophoraustausch ist aller Wahrscheinlichkeit nach deshalb nicht vollständig abgelaufen, weil der Austausch von BV gegen PCB sehr langsam vonstatten geht. Das freie PCB in der Lösung kann darüberhinaus über den relativ langen Zeitraum degradiert werden, da es durch die Belegung der Chromophorbindetasche mit BV nicht durch eine Vorassemblierung, wie im Versuch mit blockiertem CphBmLC, vor Degradation geschützt wird. Demzufolge steht ein großer Teil des PCB wahrscheinlich nicht mehr für einen Einbau ins Protein

zur Verfügung. Dieses Experiment zeigt, daß BV fester in der Chromophorbindetasche des CphBmLC gebunden ist als PCB in der Bindetasche des CphBm (sonst ginge der Austausch schneller und vollständiger). Weiterhin wird jedoch deutlich, daß es sich bei der Bindung von BV an CphBmLC (und damit auch an CphBm) *nicht* um eine vollständig stabile Bindung handelt. Das Bindungsgleichgewicht liegt im Vergleich zu PCB bei BV jedoch viel weiter auf der Seite des eingelagerten (Histidin-gebundenen) Chromophors.

Das Kontrollexperiment mit vorassembliertem CphBmLC-PCB und nachträglicher Addition von BV ergab keine Änderung der Absorptionseigenschaften des CphBmLC-PCB, was wiederum zeigt, daß die Thioetherbindung vom PCB zum CphBmLC inert und unter den gegebenen Bedingungen stabil ist.

Die Versuche zur Chromophorkompetition ergeben folgende Reihe der Bindungsstärken von Chromophor und Protein (Nummerierung bezogen auf die Aminosäuresequenz von CphBm):

PCB an H267 <<<< BV an H267 << PCB an C266
--

CphBm: BV verdrängt PCB von H267, PCB verdrängt im Gegenzug nicht BV von H267.

CphBmLC: PCB verdrängt BV von H267 und bindet an C266, PCB an C266 wird nicht von BV verdrängt.

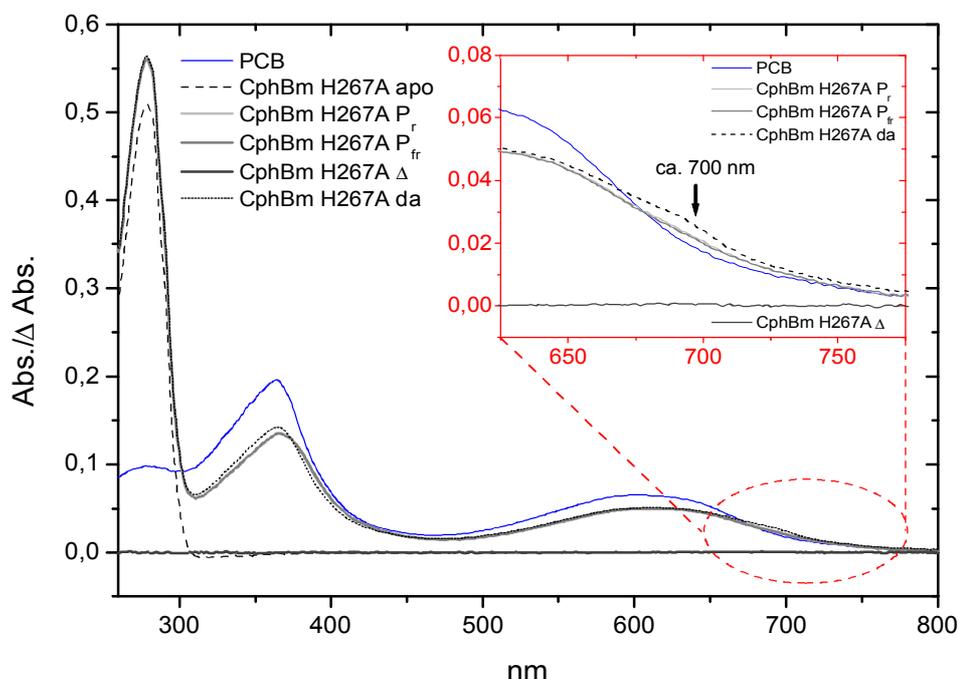
### 3.6.11 Zusammenfassende Diskussion zur Inhibition/Kompetition

Resümierend können aus den Experimenten der Imidazolkompetition und dem Einfluß von NaCl sowie der Chromophorkompetition folgende Aussagen abgeleitet werden:

- 1) Unter dem Einfluß von Imidazol erfolgt eine praktisch instantane Assemblierung von CphBm mit PCB. Es findet darüberhinaus eine Gleichgewichtsverschiebung von Histidin-gebundenen zu ungebundenem PCB beim CphBm statt. Unter 250 mM Imidazol konnte lediglich halb so viel photoaktives CphBm erhalten werden. Diese Gleichgewichtsverschiebung äußert sich im weiteren zeitlichen Verlauf durch einen vollständigen Verlust von PCB aus der Bindetasche.
- 2) Imidazol wirkt sich auch auf den ersten Schritt der Assemblierung von CphBm<sub>LC</sub> aus, nicht jedoch auf die Thioetherverknüpfung von CphBm<sub>LC</sub> zu PCB. Diese Verlangsamung kann mit der Gleichgewichtsverschiebung eines Histidin-gebundenen Zwischenzustands begründet werden, da sich vor allem die erste Zeitkonstante des biexponentiellen Fits von steigender Imidazolkonzentration beeinflusst zeigt. Das Histidin stellt demnach sehr wahrscheinlich eine transiente Bindungsstelle dar.
- 3) Die beobachtete Gleichgewichtsverschiebung im PCB-Addukt von CphBm ist unter reduzierenden Bedingungen stark abgeschwächt, was, wie schon in Kap. 3.6.3.3 diskutiert, auf eine bessere Faltung von CphBm zurückschließen läßt.
- 4) Das BV-Addukt von CphBm zeigt sich deutlich weniger von Imidazol beeinflusst als das PCB Addukt. Dies kann durch eine bessere Passform der Chromophorbindetasche oder durch die Mesomeriestabilisierung der Bindung von BV zum Histidin herrühren.
- 5) NaCl verlangsamt den Einbau von PCB in CphBm, und wirkt sich wahrscheinlich nicht auf das Gleichgewicht gebundenen und ungebundenen Chromophors, sondern auf den Extinktionskoeffizienten des PCB-Addukts von CphBm aus. Diese Aussage sollte durch ein Experiment mit vollständig assembliertem CphBm<sub>LC</sub> verifiziert werden können.
- 6) BV ist in der Lage, PCB aus CphBm zu verdrängen, die Bindung von PCB ist demnach transient, es handelt sich um ein Gleichgewicht von gebundenem und ungebundenem Chromophor.
- 7) PCB ist nicht in der Lage, BV aus CphBm zu verdrängen. BV ist damit eindeutig der energetisch begünstigte Chromophor im CphBm.
- 8) PCB ist in der Lage, BV aus CphBm<sub>LC</sub> (teilweise) zu verdrängen. Die Thioetherbindung ist demnach energetisch begünstigt gegenüber der Enamin-Amidin-Tautomerie des BV.

### 3.6.12 Die Mutante H267A

Die Rolle des Histidins als chromophorakzeptierende oder als für die Chromophor-Ligation essentielle Aminosäure sollte mit der Mutation H267A untermauert werden.



**Abbildung 3.6.27** Spektrale Eigenschaften von CphBm H267A

Spektrum von freiem PCB in blau; da = unbelichtet, direkt aus der Assemblierung; apo = Apo-CphBmH267A;  $P_r$  = nach Dunkelrot-  $P_{fr}$  = nach Rotbelichtung;  $\Delta$  = Differenzspektrum  $P_r$  minus  $P_{fr}$ . **Insert:** Ausschnittsvergrößerung des Bereichs um 700 nm. Hinweis: Das Differenzspektrum ist nahezu identisch mit der Nulllinie.

Wie in Abb. 3.6.27 zu sehen ist, ergab die Assemblierung von CphBm H267A kein photochemisch aktives Addukt mit PCB. Es konnte allerdings eine Art Anlagerungsprodukt, ähnlich dem in Ref. <sup>56</sup> beschriebenen Fall beobachtet werden. Die Absorption dieses Anlagerungsprodukts bei ca. 700 nm geht über die Absorption des freien Chromophors hinaus, was eine Interaktion der Chromophorbindetasche mit dem Chromophor andeuten könnte. Frisch assembliertes CphBm H267A zeigte zudem wie frisch assembliertes CphBm-PCB eine  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenz (siehe Kap. 3.6.13), die um Größenordnungen intensiver war als die einer artifiziellen Referenz (mit Chromophor versetztes Rinderserumalbumin). Das deutet ebenfalls auf eine gewisse Spezifität der Chromophor-Protein Wechselwirkung hin. Dennoch erscheint eine kovalente Chromophoreinbindung ins Protein aufgrund der völligen Abwesenheit phytochromähnlicher Spektren eher unwahrscheinlich, nicht zuletzt auf dem Hintergrund der ein-

wandfreien Photochemie von CphBm-PCB und CphBmLC-PCB, die belegt, daß sowohl das Histidin-gebundene PCB als auch das Cystein-gebundene PCB zu freier Photoreversibilität in der Lage ist.

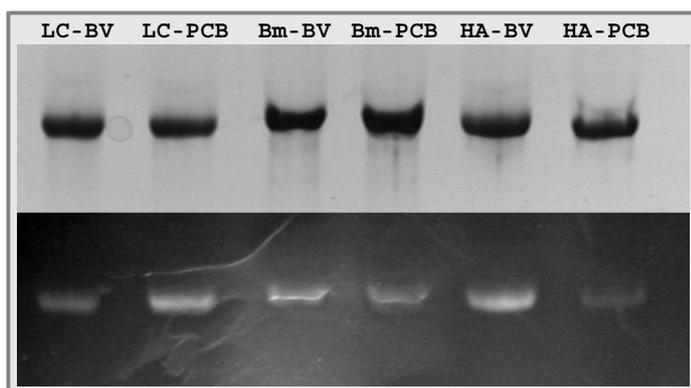
Dieses Ergebnis unterstützt weitgehend die bisherigen Informationen über die Bedeutung des Histidins in Bacteriophytochromen <sup>20, 49</sup>, indem es eindeutig belegt, daß ohne das hochkonservierte Histidin keine Einlagerung des Chromophors, die zu einem photoaktiven Addukt führt, stattfinden kann.

### 3.6.13 Test auf Kovalenz der Chromophor-Protein Bindung

#### 3.6.13.1 Nachweis mittels Zink-Fluoreszenz

Die bisherige, anerkannte Methode, kovalente Wechselwirkungen von verschiedenen Bilin-chromophoren und Proteinen nachzuweisen, beruht auf der intensiven Fluoreszenz der Komplexe von Bilin-Chromophoren und  $Zn^{2+}$  in denaturierenden SDS Gelen oder - alternativ - auf daran anschließenden Westernblots <sup>178, 179</sup>, wobei der Nachweis letztendlich darauf beruht, daß die  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenz auf Höhe der Proteinbande gefunden wird. In dieser Arbeit konnte jedoch wiederholt der Fall beobachtet werden, daß auch für Phytochrome mit nichtkovalent gebundenem Chromophor (was z. B. durch den Verlust an Photoreversibilität im Verlauf der Zeit und der Möglichkeit, diese Proteine daraufhin nachzuassemblieren, klar gezeigt werden konnte, Kap. 3.6.8.3) eine eindeutige Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, sofern der zeitliche Abstand zwischen Assemblierung und  $Zn^{2+}$ -Gel kurz genug war (wie in Abb. 3.6.28). Im Extremfall gelang es sogar eine schwache  $Zn^{2+}$ -induzierte Fluoreszenz mit BSA zu erhalten, was eindeutig zeigt, daß auch unspezifische Wechselwirkungen mit Bilin-chromophoren mit Hilfe dieser Technik visualisiert werden. Offensichtlich reicht der Prozeß der Probenaufbereitung zusammen mit der anschließenden, „denaturierenden“ Gelelektrophorese nicht aus, um unspezifische oder nicht-kovalente Wechselwirkungen von Proteinen mit Bilin-chromophoren zu unterbinden. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Bhoo *et al.* <sup>175</sup> berichtet; in jener Arbeit wurde nach der Mutation des dem Cystein benachbarten Histidins zwar per  $Zn^{2+}$ -Blot eine Fluoreszenz, jedoch keine Photochromizität mehr festgestellt. Aus der experimentellen Vorgehensweise geht hervor, daß dort das  $Zn^{2+}$ -Gel ebenfalls unmittelbar nach der Assemblierung durchgeführt wurde.

Nichtsdestotrotz kann diese Methode zum Nachweis von Biliproteinen dienen, sofern sichergestellt ist, daß in der Probe kein Überschuß an freiem Chromophor vorhanden ist und die Probe ausreichend lange inkubiert wurde, um unspezifisch oder schwach gebundenen Chromophor zu verlieren. Dieser Nachweis gelingt mit allen pflanzlichen Phytochromen sowie Cph1 aus *Synechocystis* und Bph1 aus *Deinococcus radiodurans*. Er konnte in dieser Arbeit



**Abbildung 3.6.28**  $Zn^{2+}$ -Gel Analyse

**Oben:** Coomassie-Gel LC = CphBmLC, Bm = CphBm, HA = CphBm H267A. **Unten:** identisches Gel, unter UV-Transillumination, 4 sec Integrationszeit. Alle Proteine wurden mit dem dreifach-molaren Überschuß vom angegebenen Chromophor für 3 h bei RT inkubiert.

bisher nur für CphBcy und CphBmLC-PCB geführt werden; bei diesen beiden Proteinen bleibt der Chromophor über die gesamte Zeit der Aufreinigung und des  $Zn^{2+}$ -Gels am Protein gebunden. Assembliert wurde im Fall von CphBmLC im Rohlysate, bei CphBcy handelt es sich um die native Aufreinigung aus *Calothrix* (Kap. 3.7.2). Die CphBm-Addukte mit PCB und BV, das BV-Addukt von CphBmLC sowie die beiden Addukte von CphBm H267A

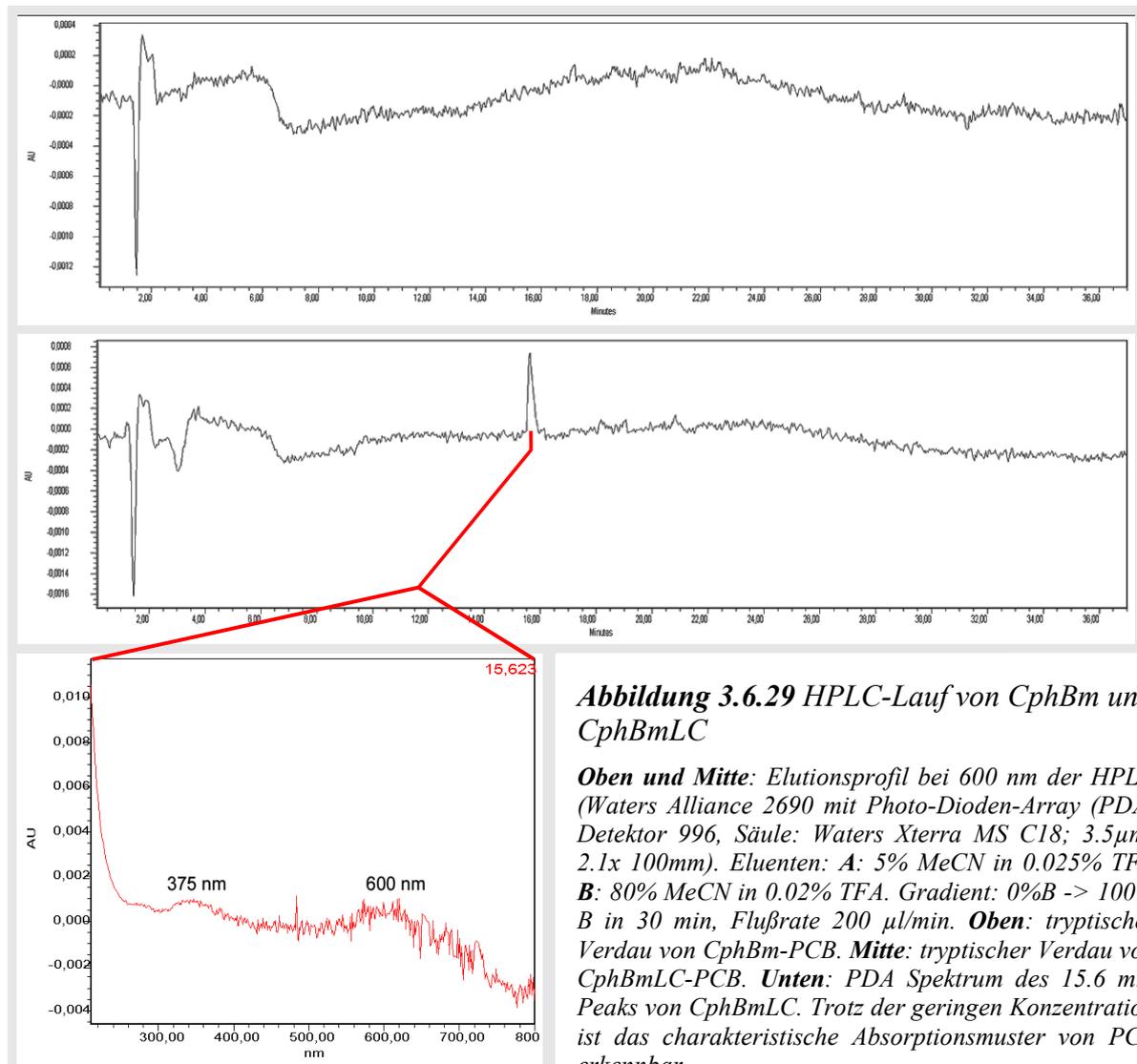
wurden bisher nur direkt nach der Assemblierung analysiert (Abb. 3.6.28). Wie man erkennt, zeigen alle Protein-Chromophor-Addukte eine deutliche  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenz. Trotz sehr ähnlicher Proteinmengen und Protein-Chromophor Verhältnisse kann man aus den Fluoreszenzintensitäten nur bedingt Rückschlüsse ziehen, wie unabhängige Wiederholungen ergaben. Zur Kovalenz der Chromophor-Protein-Bindung dieser Addukte müssen also die spektroskopischen Untersuchungen mit in Betracht gezogen werden, bei CphBm und CphBmLC ist dabei Kapitel 3.6.8 sowie die Chromophorkompetition (Kap. 3.6.10) und bei H267A das Kap. 3.6.12 zu berücksichtigen.

### 3.6.13.2 Nachweis mittels Proteaseverdau und HPLC

Ein weiterer Versuch, die Kovalenz der Bindung von PCB in CphBm und CphBmLC zu untersuchen, bestand darin, die jeweiligen Proteine einem tryptischen Verdau zu unterziehen und anschließend in der HPLC Chromopeptide zu detektieren. Dieser Versuch war als Vorversuch zum Nachweis des nativen Chromophors von CphBcy gedacht und sollte lediglich die generelle Tauglichkeit dieser Methode zum Nachweis von Chromopeptiden zu testen. Daher wurde CphBmLC-PCB verwendet und nicht CphBm-BV, da das PCB-Addukt mit Sicherheit kovalent gebunden sein sollte.

Die Abb. 3.6.29 zeigt einen HPLC-Lauf mit tryptisch verdaulichem CphBmLC-PCB bzw. CphBm-PCB. Dieser Versuch zeigt, daß im Elutionsprofil von CphBmLC ein Peak nach 15.6 Minuten auftritt, welcher bei der eingestellten Detektorwellenlänge von 600 nm eine signifikante Absorption zeigt, während ein solcher Peak bei der identisch aufbereiteten CphBm-PCB Probe fehlt. Das Spektrum des Peaks wurde über einen Photo-Dioden-Array Detektor aufgezeichnet (Abb. 3.6.29 unten) und zeigt die für Bilinchromophore typischen Peaks bei ca.

600 nm und 375 nm, wobei zu berücksichtigen ist, daß die Phytochrom-typische Absorption des Chromoproteins natürlich unter den denaturierenden Bedingungen verloren geht. In den übrigen Bereichen des Elutionsprofils wurde sonst kein vergleichbares Spektrum aufgezeichnet.



**Abbildung 3.6.29** HPLC-Lauf von CphBm und CphBmLC

**Oben und Mitte:** Elutionsprofil bei 600 nm der HPLC (Waters Alliance 2690 mit Photo-Dioden-Array (PDA) Detektor 996, Säule: Waters Xterra MS C18; 3.5µm; 2.1x 100mm). Eluenten: **A:** 5% MeCN in 0.025% TFA **B:** 80% MeCN in 0.02% TFA. Gradient: 0%B -> 100% B in 30 min, Flußrate 200 µl/min. **Oben:** tryptischer Verdau von CphBm-PCB. **Mitte:** tryptischer Verdau von CphBmLC-PCB. **Unten:** PDA Spektrum des 15.6 min Peaks von CphBmLC. Trotz der geringen Konzentration ist das charakteristische Absorptionmuster von PCB erkennbar.

Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß im Fall von CphBmLC der Chromophor während des Trypsin-Verdau und der HPLC peptidgebunden blieb, während er bei CphBm nicht mehr visualisiert werden konnte. Entweder eluiert der Chromophor dort über einen relativ breiten Bereich oder er war schon so weit degradiert, daß seine Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorherigen Experimente und zeigt, daß eine etwaige Bindung von PCB an das Histidin des CphBm weitaus anfälliger ist als die Thioetherbindung von PCB zum Cystein.

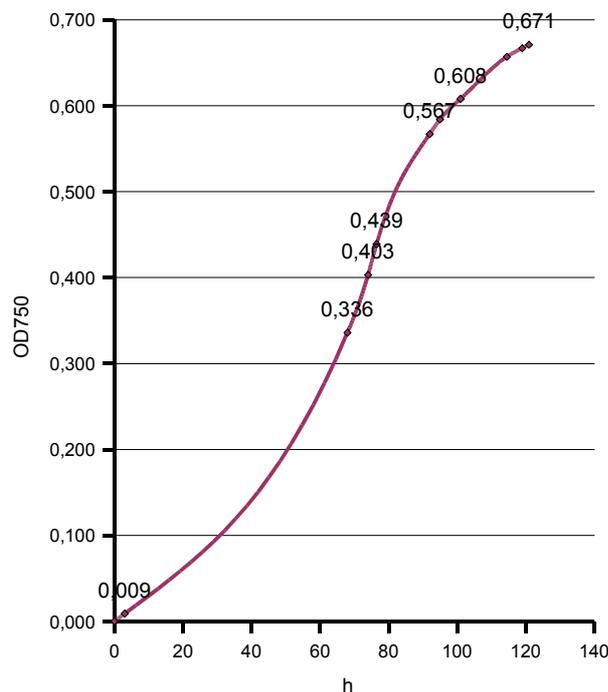
### **3.7 CphB aus homologer Expression CphBcy**

Bisher konnte noch kein Bacteriophytochrom ohne Cystein in der Chromophorbindetasche aus seinem Ursprungsorganismus isoliert werden, daher stützen sich die bisherigen Kenntnisse über die Natur des Chromophors solcher Proteine auf die heterologe Co-Expression von Genen der Chromophorbiosynthese, die im selben Operon oder in unmittelbarer Nähe des betreffenden Bacteriophytochroms gefunden wurden<sup>49, 83</sup>. Im Fall von *Deinococcus radiodurans* ist dies eine Häm-Oxygenase, die dem Bacteriophytochrom-Gen direkt vorgeschaltet ist, eine Anordnung, die auch in *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. fluorescens* sowie in *Rhizobium leguminosarum* gefunden wurde<sup>49</sup>. Da in diesen Organismen bisher keine weiteren homologen Proteine der aus photosynthetischen Organismen bekannten *späteren* Schritte der Chromophorbiosynthese<sup>75</sup> gefunden wurden, ist eine Ausstattung der Bacteriophytochrome dieser Organismen mit BV als nativem Chromophor sehr wahrscheinlich. Im cyanobakteriellen System hingegen liegt BV, das in der Regel nur als Zwischenprodukt der PEB- und hauptsächlich der PCB-Synthese auftritt, in wesentlich geringeren Konzentrationen in der Zelle vor als PCB und PEB, die den Hauptanteil in ihrer Funktion als Chromophore der Lichtsammel-pigmente (Phycobiliproteine) bilden. Mit der homologen Expression und Aufreinigung von CphB sollte der native Chromophor dieses Proteins identifiziert werden.

Der in Kap. 3.3.3 bereits erwähnte Cyanobakterienstamm *Fremyella diplosiphon* SF33, der für die homologe Expression herangezogen wurde, enthielt nach erfolgreicher Konjugation das Plasmid pPL9b mit dem CphB-Gen hinter dem P<sub>tac</sub>-Promotor (auch gelegentlich als P<sub>lacUV5</sub>-Promotor bezeichnet). Dieser Promotor wurde als funktioneller Promotor in *Calothrix* PCC 7601 beschrieben<sup>146</sup>, was durch die erfolgreiche homologe Expression von CphB in dieser Arbeit noch einmal bestätigt wird. Da die Konjugationsexperimente noch mit den ursprünglichen Gen-Konstrukten (siehe Kap. 3.3.2 sowie<sup>144</sup>) durchgeführt wurden, hat CphB in diesem Fall den in Abb. 3.3.2 rot gekennzeichneten Genanfang (das Leucin wurde in dem Fall durch ein Methionin ersetzt) und ist mit einem N-terminalem His(6)-tag mit Thrombinschnittstelle ausgestattet. Dieses Konstrukt wird im folgenden mit CphBcy bezeichnet.

### 3.7.1 Expression von CphBcy im 12 Liter Fermenter

Die Bedingungen, die zu Beginn der Arbeit zur Kultivierung von *Calothrix* PCC 7601 mittels Schikanekolben und Magnetrührern eingestellt wurden, erlaubten nur in bedingtem Maße die Gewinnung einer größeren Menge an Zellen, da die räumlichen Kapazitäten und die Anforderungen an die Beleuchtung mit steigendem Kulturvolumen nicht mehr zu erfüllen waren. Daher wurde für diesen Zweck ein für Algen bereits etabliertes Fermentersystem erprobt und für die Anforderungen der verwendeten Cyanobakterien optimiert.

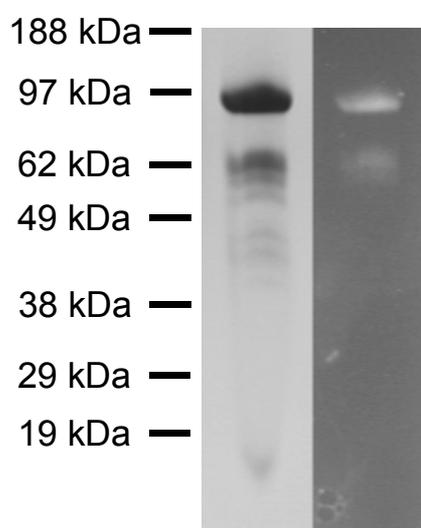


**Abbildung 3.7.1** Wachstumskurve von *Fremyella diplosiphon* pPL9b im 12 Liter Fermenter

Die Wachstumskurve in Abb. 3.7.1 zeigt einen typischen Wachstumsverlauf einer 12 Liter Fermenterkultur mit Verdopplungszeiten von ca. 20 h (während der logarithmischen Phase) und eine maximale OD<sub>750</sub> von 0,7 bis 0,75. Dies entspricht Werten, die auch in kleineren Ansätzen standardmäßig erhalten wurden. Die typische Zellausbeute aus einem Fermenter beträgt ca. 50 g Frischgewicht.

### 3.7.2 Aufreinigung von CphBcy

Die Aufreinigung von CphBcy erfolgte im wesentlichen wie in Kap. 3.6.2 beschrieben. Während das CphBcy der ersten Präparation aus frisch geernteten Zellen eine satte grüne Farbe aufwies, zeigten später durchgeführte Präparationen aus eingefrorenen Zellen einen starken Gelbanteil. Aus den Gelfiltrationen, bei denen sich bisher kein CphBcy-Dimer, sondern nur höhermolekulare Aggregate darstellen ließen, konnte die gelbe Spezies in den frühen Durchbruchfraktionen und die grüne Spezies in den späteren Durchbruchfraktionen erhalten werden. Wie massenspektrometrische Untersuchungen ergaben, handelte es sich in beiden Fällen zweifelsfrei um CphBcy. Die gelbe Spezies war nicht photoreversibel, aber dennoch in der Lage, eine  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenz zu zeigen, die Spektroskopie der grünen Spezies wird im Detail in Kap. 3.7.3 besprochen.



**Abbildung 3.7.2** Aufgereinigtes CphBcy

CphBcy nach Ni-NTA Aufreinigung. **Links:** Coomassie-Färbung. Durch den N-terminalen His(6)-tag werden auch kleinere Fragmente aufgereinigt. (Bande bei 62 kDa) **Rechts:** Identisches Gel,  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenz.

Das Spektrum der gelben Spezies gleicht in einigen Punkten dem Spektrum von Bilirubin, was andeuten könnte, daß der Chromophor dieses Proteins durch eine Reduktion der  $C_{10}$ - $C_{11}$  Doppelbindung verändert wurde. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß das Protein durch den Vorgang des Einfrierens und wieder Auftauens teilweise denaturierte und damit den Chromophor stärker als sonst dem Lösungsmittel aussetzte. Wässrige Lösungen mit freiem Chromophor (BV oder PCB) zeigen nach Einfrieren, Lagerung und Auftauen ebenfalls starke Gelbanteile.

Wie in Abb. 3.7.2 zu sehen, zeigt CphBcy auf den  $Zn^{2+}$ -Gelen nach der Ni-NTA Aufreinigung Fluoreszenz. Das bedeutet, daß das Protein nach der Aufreinigung über Ni-NTA noch mit Chromophor ausgestattet blieb (während heterologes CphB-PCB über Nacht die Fähigkeit zur  $Zn^{2+}$ -Fluoreszenz verliert; nicht gezeigt).

Während bei der heterologen Expression der N-terminal getaggten Varianten von CphB und CphBm in pET28a auch bei 25°C Expressionstemperatur kaum Vollängenprotein erhalten werden konnte, sind nach der homologen Expression bei 28°C erfreulich wenig unfertig translatierte Fragmente auf dem Gel zu erkennen. Dies kann entweder auf das im Vergleich zum heterologen System niedrigere Expressionsniveau des Proteins zurückgeführt

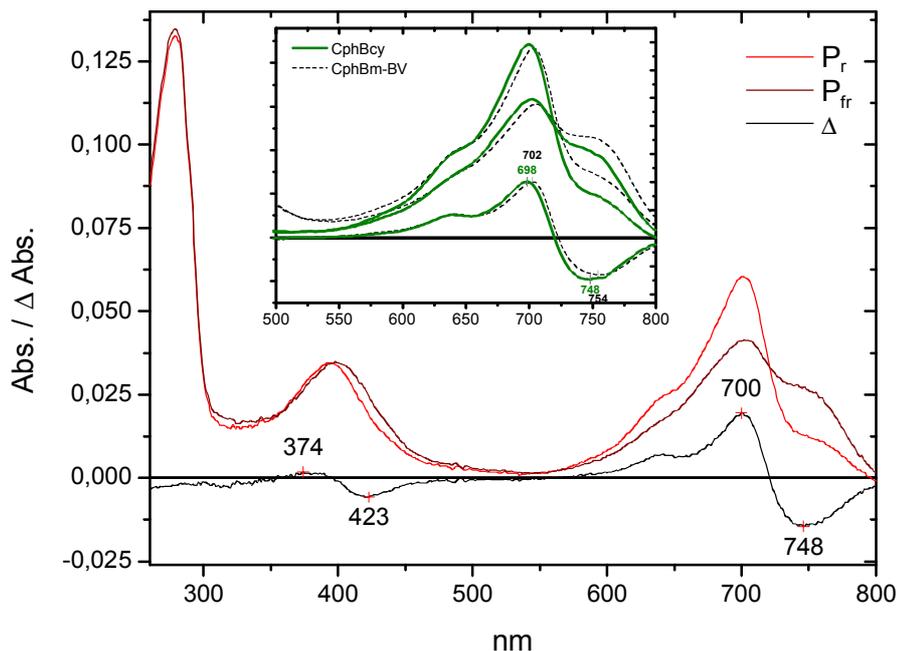
werden – nach 5 Tagen Fermenterzucht konnten aus 15 g Zellen bei der ersten Präparation ungefähr 3 mg an Protein erhalten werden – oder daraus resultieren, daß das Cyanobakterium dieses eigene Protein in besserer Qualität exprimieren kann. Der verwendete  $P_{tac}$  Promotor ist in jedem Fall deutlich schwächer als sein zur heterologen Expression benutztes virales Pendant (T7-Promotor). Vielleicht führt auch die frühere (*in vivo*) Ausstattung des Proteins mit seinem Chromophor zu einer erhöhten Stabilität des Proteins, so daß auch weniger Degradationsprodukte entstehen. Auf Westernblots mit Anti-His Antikörper konnte zudem ein gewisser Anteil an dimerem *CphBcy* beobachtet werden.

Durch Westernblot und per Proteinsequenzierung wurde der His(6)-tag und der Anfang der Thrombinschnittstelle identifiziert. Es konnte auf Westernblots keine (Kreuz-) Reaktion des Proteins mit monoklonalen Antikörpern gegen *CphA* beobachtet werden. Die endgültige Identifizierung erfolgte mittels Trypsin-Verdau und Analyse der Verdaufragmente per Massenspektrometrie (Kap. 3.7.6). Damit ist *CphBcy* bis dato das zweite homolog exprimierte Bacteriophytochrom neben *Cph1* aus *Synechocystis* PCC6803 <sup>6</sup> und das erste, das zu der Gruppe der Cys-defizienten Proteine gehört.

### 3.7.3 Spektroskopie von *CphBcy*

Das Spektrum von *CphBcy* ist in Abb. 3.7.3 dargestellt. Der maximale SAR-Wert, der für *CphBcy* erhalten werden konnte, ist 0,53. Die Werte des Differenzspektrums variierten bei verschiedenen Aufreinigungen zwischen 698 nm / 750 nm und 700 nm / 746 nm. Sie sind damit dem Differenzspektrum des heterolog exprimierten *CphBm*-BV-Addukts (702 nm / 754 nm) sehr ähnlich und deutlich verschieden vom vorher besprochenen PCB-Addukt von *CphBm*. Das maximale  $P_r/P_{fr}$ -Verhältnis liegt bei 0,7 mit Bestrahlung bei Wellenlängen von 638 nm für Rotbelichtung und 788 nm für Dunkelrotbelichtung.

Eine Nachassemblierung des *CphBcy* mit PCB führte zu keinerlei Änderung der spektroskopischen Eigenschaften und zeigt damit, daß *CphBcy* während der Aufreinigung vollständig assembliert blieb. Bei dieser Nachassemblierung konnte keine Verdrängung des Chromophors aus *CphBcy* beobachtet werden. Desweiteren zeigt die  $P_r$ -Form des unter normalen Labor-Lichtbedingungen präparierten *CphBcy* noch einen deutlichen Anteil an  $P_{fr}$ -Form, ähnlich belichtetem *CphBm*-BV. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß es sich bei dem nativen Chromophor von *CphBcy* um BV handelt. Ein Entfernen des N-terminalen His(6)-tags mittels Thrombinspaltung führte zu keinerlei Änderung der Absorptionseigenschaften. Ein Einfluß durch  $\beta$ -Mercaptoethanol auf die spektroskopischen Eigenschaften konnte nicht beobachtet werden.



**Abbildung 3.7.3** CphBcy nach Ni-NTA Aufreinigung, Thrombinverdau und Gelfiltration.

Absorptions- und Absorptionsdifferenzspektren. **Insert:** Vergleich von CphBcy (grün, durchgezogene Linien) und CphBm-BV (schwarz, gestrichelte Linien). Die Maxima der verschiedenen Spektren wurden normiert.

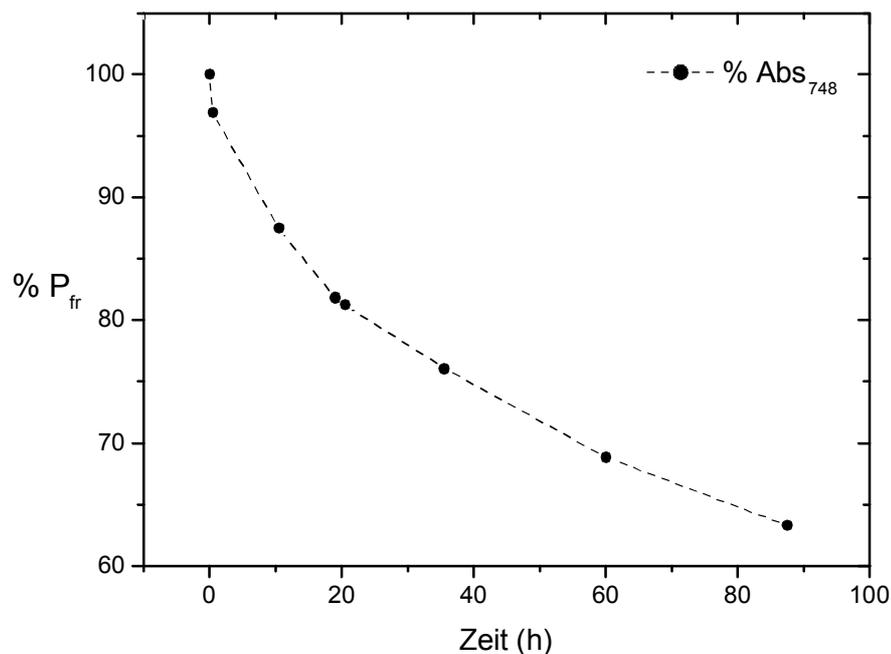
Die leichten Unterschiede im Spektrum von homolog zu heterolog exprimierten Bacteriophytochromen wurden schon bei Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 beobachtet<sup>96</sup> (dort war das  $\lambda_{\max}$  der P<sub>fr</sub>-Form um 2-3 nm blauverschoben). Weitere Experimente mit Cph1 legen nahe, daß diese Unterschiede durch die Anwesenheit von Chromophor während der Expression und damit von einer etwas anderen Konformation des Proteins herrühren<sup>180</sup> könnten.

Durch den deutlichen Blauanteil des CphBcy-Spektrums veranlaßt, wurden auch erstmalig Versuche zur Photoreversibilität unter Hellblau- bzw. Dunkelblaubelichtung (mit Kantenfiltern 438 nm respektive 374 nm, jeweils  $\pm 7$  nm) durchgeführt. Dabei stellte sich unabhängig vom Ausgangszustand des Proteins (P<sub>r</sub>- oder P<sub>fr</sub>-Form) ein lichtspezifisches Gleichgewicht von P<sub>r</sub>- zu P<sub>fr</sub>-Form ein. Aufgrund der starken spektralen Überlappung in diesem Wellenlängenbereich ergab eine Belichtung mit 374 nm keine vollständige Konversion zur P<sub>fr</sub>-Form, und entsprechend war mit 438 nm Belichtung keine vollständige Konversion zur P<sub>r</sub>-Form möglich. Der  $\Delta\Delta$ -Abs. Wert eines Blaulicht-Differenzspektrums entsprach 40% des auf „normale“ Weise erhaltenen Differenzspektrums. Somit könnte CphBcy dem Cyanobakterium auch als Blaulichtrezeptor analog zu Beobachtungen mit phyA aus *Nicotiana*

*tabacum*<sup>181</sup> dienen, da durch Belichtung mit Blaulicht bei CphBcy in jedem Fall ein gewisser Anteil an P<sub>fr</sub>-Form entsteht. Dies wäre im Hinblick auf die möglichen physiologischen Reaktionen dahingehend interessant, daß die Bildung von Gasvesikeln oder allgemein die Veränderung des Auftriebs von *Calothrix* durch Perzeption von Rotlicht nicht nur im Rahmen von Beschattungsphänomenen durch andere photoautotrophe Organismen induziert werden könnte, sondern auch durch die Perzeption des mit der Wassertiefe zunehmenden Blaulichtanteils. Neuere Erkenntnisse lassen jedoch eher vermuten, daß Flavoproteine für die Blaulichtperzeption in Prokaryonten zuständig sind<sup>19</sup>. Aufgrund der spektroskopischen Eigenschaften von CphBcy erscheint es jedoch möglich, daß Blaulicht die von CphBcy verursachten physiologischen Antworten beeinflussen oder modulieren kann.

### 3.7.4 P<sub>fr</sub>-Stabilität von CphBcy

Die P<sub>fr</sub>-Stabilität von CphBcy wurde bei 15°C in TBS-Puffer (pH 8,0) mit 1 mM β-Mercaptoethanol verfolgt. Die Kurve in Abb. 3.7.4 ist bereits bezüglich der leichten Unterschiede der Differenzspektren vor und nach dem Experiment – der  $\Delta\Delta$ -Abs. Wert war am Ende um 10% niedriger – korrigiert. Während die P<sub>fr</sub>-Form von heterolog exprimiertem CphA über etliche Tage vollständig stabil bleibt<sup>107</sup>, nimmt der Anteil der P<sub>fr</sub>-Form von CphBcy, wie in Abb. 3.7.4 zu sehen, über einen längeren Zeitraum betrachtet, kontinuierlich ab. Bisherige Ergebnisse<sup>144</sup> mit heterolog exprimiertem CphB-PCB ergaben keinerlei P<sub>fr</sub>-Dunkelreversion innerhalb von zwei Stunden. Längere Messungen der P<sub>fr</sub>-Stabilität des PCB Addukts heterolog exprimierten CphBms können durch den Verlust des Chromophors aus diesem Protein (Kap. 3.6.8) nicht sinnvoll ermittelt werden. Ein Vergleich mit CphBm-BV steht noch aus.



**Abbildung 3.7.4** P<sub>fr</sub>-Stabilität von CphBcy bei 15°C.

Die Kurve wurde bereits bezüglich der Unterschiede der Differenzspektren von Experimentanfang und -ende korrigiert.

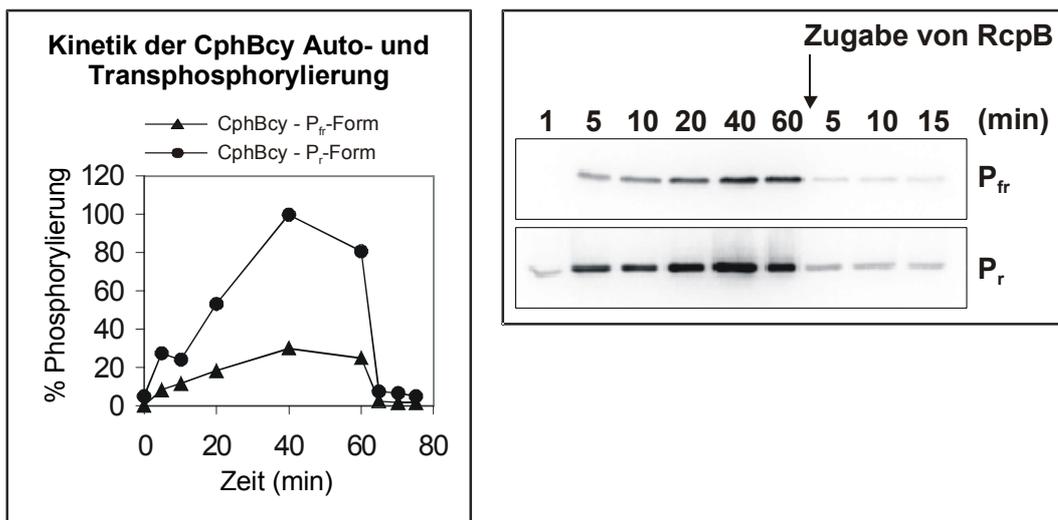
CphBcy unterscheidet sich bezüglich der P<sub>fr</sub>-Dunkelreversion von Phytochromen aus höheren und niederen Pflanzen, die meist kürzere P<sub>fr</sub>-Lebensdauern in der Größenordnung von wenigen Stunden besitzen; *Arabidopsis* phyA, phyB, phyC und phyD Messungen in Hefe zeigen 40%, 20%, 50% und 50% Dunkelreversion innerhalb von zwei Stunden<sup>87</sup>; Das Phytochrome aus *Mougeotia scalaris* in Volllänge bzw. das 66 kDa-Fragment zeigen Dunkel-

reversionen von 47% nach 150 min bzw. 40% nach 14 h <sup>144</sup>, *Anemia phyllitidis* Phytochrom 3 als Vollängenprotein sowie das 67 kDa-Fragment revertieren zu 75-80% innerhalb von zwei Stunden <sup>144</sup>, während Hafer Phytochrom A lediglich 20% der P<sub>fr</sub>-Form innerhalb von 60 h verliert <sup>89</sup>.

Eine physiologische Relevanz der langsamen Dunkelreversion von CphBcy ist schwer zu begründen, da neben dieser spektralen Eigenschaft des Proteins auch Faktoren wie z.B. die P<sub>fr</sub>-Stabilität sowie die generelle Stabilität des Proteins im physiologischen Kontext oder eine mögliche (Licht-) Regulation der Transkription wie im Falle von Cph1 aus *Synechocystis* <sup>182</sup> eine Rolle spielen. Falls die P<sub>fr</sub>-Stabilität des Proteins unter physiologischen Bedingungen jedoch die hier beobachtete ist, und keine spezifische Degradation der P<sub>fr</sub>-Form stattfindet, ist eine Beteiligung von CphBcy an *circadianen* Prozessen eher unwahrscheinlich. Die beobachtete Halbwertszeit der P<sub>fr</sub>-Form übersteigt die Generationsdauer einer exponentiell wachsenden *Calothrix*-Kultur und fällt in den zeitlichen Rahmen langwieriger Anpassungsprozesse wie Hormogonien-Differenzierung (und De-Differenzierung) oder CCA <sup>183</sup>, die oft mit einer stark reduzierten Zellteilungsrate einhergehen. Eine Stabilisierung der P<sub>fr</sub>-Form von CphBcy durch RcpB, wie sie im Fall von *Arabidopsis* durch Interaktion mit dem Response-Regulator-Homolog ARR4 beobachtet werden konnte <sup>90</sup>, wurde nicht getestet.

### 3.7.5 Phosphotransfer von CphBcy auf RcpB

Die Charakterisierung der ersten Schritte der Signaltransduktion von cyanobakteriellen Phytochromen, die Autophosphorylierung und der anschließende Phosphatgruppenübertrag auf ihren Response-Regulator wurden sowohl für Cph1 aus *Synechocystis*<sup>103</sup>, als auch für die heterolog exprimierte Proteine CphA und CphB bereits bestimmt<sup>104</sup>, allerdings wurde bei letzterer Arbeit mit dem relativ instabilen PCB-Addukt von CphB gearbeitet. Diese Versuche wurden als Grundlage genommen, um die Fähigkeit des homolog exprimierten CphBcy zur Auto- und Transphosphorylierung zu untersuchen. Die Ergebnisse bestärken zum Teil die bereits mit dem PCB-Addukt erhaltenen Resultate und klären eindeutig die bisher offene Frage der Lichtspezifität der CphBcy-Reaktionen. Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Hübschmann (Institut für Biologie/Molekulare Genetik, Humboldt-Universität, Berlin) durchgeführt.



**Abbildung 3.7.5** Kinetik und Lichtabhängigkeit der Auto- und Transphosphorylierung von CphBcy

CphBcy wurde nach Belichtung mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP versetzt und anschließend im Dunkeln bei RT inkubiert. P<sub>fr</sub>: P<sub>fr</sub>-Form von CphBcy, P<sub>r</sub>: P<sub>r</sub>-Form von CphBcy. In den angegebenen Abständen wurden Aliquots entnommen und die Reaktion durch Transfer in Stopp-Puffer und Erhitzen auf 60°C terminiert. Das Abfallen der Werte nach 65 min ist durch die Zugabe von RcpB und die dadurch ermöglichte Transphosphorylierung bedingt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Blots (rechts) wurden mittels Autoradiographie und Phosphorimager quantifiziert.

In Abb. 3.7.5 ist die lichtabhängige Autophosphorylierung von CphBcy dargestellt. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Arbeiten (bei denen kein signifikanter Unterschied der Autophosphorylierung festgestellt wurde) ist hier die Autophosphorylierung der P<sub>r</sub>-Form von

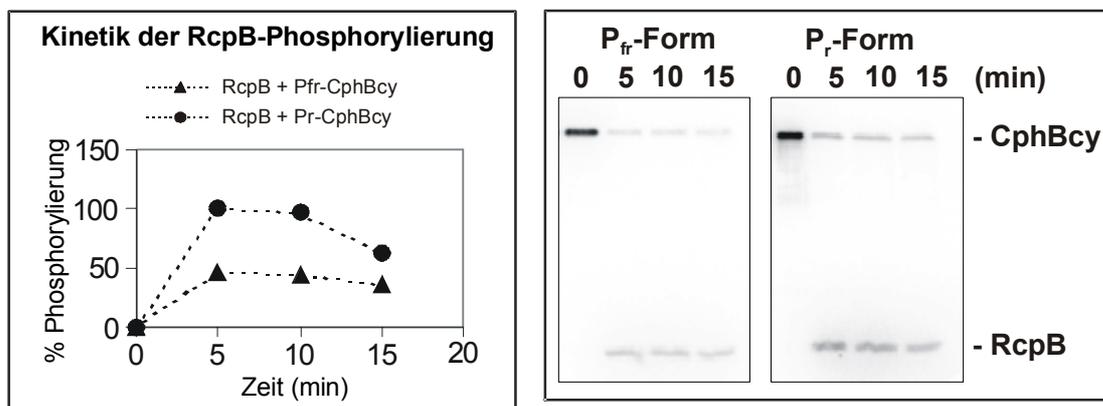
CphBcy um den Faktor fünf stärker als die der P<sub>fr</sub>-Form. Wenn weiterhin beachtet wird, daß die P<sub>fr</sub>-Form von CphBcy immer einen deutlich ausgeprägten P<sub>r</sub>-Anteil besitzt (siehe auch Abb. 3.7.3), ergibt sich, daß die *reine* P<sub>fr</sub>-Form von CphBcy eine sehr geringe, wenn nicht sogar gar keine Autophosphorylierungsaktivität besitzt. Die Autophosphorylierung von P<sub>r</sub>-CphBcy verläuft im Vergleich zu früheren Arbeiten etwas langsamer ab und liegt nun im Bereich des für CphA ermittelten Werts<sup>104</sup>. Allerdings liegen diese quantitativen Unterschiede möglicherweise im Bereich der Meßgrenze. Durch die Zugabe von RcpB kann eine sofortige Abnahme an phosphoryliertem CphBcy und, hier nicht gezeigt, eine Übertragung des Phosphats auf den Response Regulator festgestellt werden (Abb. 3.7.5).

Zur Einordnung dieser Ergebnisse sollte angemerkt werden, daß Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 (wie auch CphA) ebenfalls als P<sub>r</sub>-Form eine höhere Autophosphorylierungsaktivität besitzt als in der P<sub>fr</sub>-Form<sup>103</sup>, und auch die Transphosphorylierungsreaktion findet bei den erwähnten cyanobakteriellen Phytochromen bevorzugt von der P<sub>r</sub>-Form ausgehend statt. Im Gegensatz dazu ist die Autophosphorylierungsrate der P<sub>fr</sub>-Form von PsBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* (ein homologes Protein zu Bph1 aus *Deinococcus radiodurans*) etwa zwanzigfach höher als die der P<sub>r</sub>-Form. Dort findet auch eine P<sub>fr</sub>-bevorzugte Transphosphorylierung auf den Response-Regulator des *Deinococcus radiodurans* Bacteriophytochroms, DrBphR, statt<sup>49</sup>.

Die hohe Selektivität der Transphosphorylierung von CphA und CphB auf ihre „passenden“ Response-Regulatoren RcpA und RcpB (es findet kein „cross-talk“ zwischen den beiden Signaltransduktionsketten statt<sup>144, 104</sup>), sowie die Tatsache, daß die Phosphorylierung an einem konservierten Histidinrest stattfindet, wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (für Cph1<sup>103</sup>), (für CphA<sup>144, 104</sup>), und mit CphBcy nicht wiederholt. Gleiches gilt für die Stabilität von Phospho-RcpB gegenüber CphB. CphB weist weder in der P<sub>r</sub>-Form, noch in der P<sub>fr</sub>-Form eine Phosphataseaktivität gegenüber RcpB auf.

Die Transphosphorylierungsreaktion auf RcpB wird von der P<sub>r</sub>-Form von CphBcy in doppelt so starkem Maße initiiert wie von der stabil vorliegenden P<sub>fr</sub>-Form, was eindeutig die Lichtspezifität der Transphosphorylierung belegt. Zieht man den relativ hohen P<sub>r</sub>-Anteil der P<sub>fr</sub>-Form von CphBcy in Betracht, so kann die Transphosphorylierung ohne weiteres als P<sub>r</sub>-spezifisch bezeichnet werden (Abb. 3.7.6). Das verglichen mit vorigen Arbeiten niedrige Phosphorylierungsniveau von RcpB beruht vermutlich auf der Tatsache, daß RcpB schon während der heterologen Expression in BL21DE3 RIL zu ca 25% phosphoryliert wird (Ergebnis nicht gezeigt). Zudem ist die Phosphorylierung von RcpB, verglichen mit anderen Response-Regulatoren, wie CheY<sup>184</sup>, relativ stabil (ähnlich VirG aus *Agrobacterium tumefaciens*<sup>185</sup>), was bedeutet, daß der Anteil an phosphorylierbarem RcpB im Ansatz unter

den angewandten Expressionsbedingungen niedriger gewesen sein muß als in den vorangegangenen Arbeiten. Systematische Versuche dazu wurden jedoch nicht unternommen. Die Phosphorylierung von RcpB erfolgt in *E. coli* nicht über spezifische Protein-Protein Wechselwirkung, sondern höchstwahrscheinlich über Acetylphosphat, das in der Lage ist, RcpB zu phosphorylieren<sup>144, 104</sup> und das in geringem Maße als natürliches Stoffwechselintermediat in *E. coli* vorkommt<sup>186</sup>. Auch im *Anabaena* PCC7120 Genom kann sowohl eine Acetat-Kinase gefunden werden, als auch ein Protein mit einer schwachen Phosphat-Acetyl-Transferase-Homologie (ca. 20-24% Sequenzidentität), was ungeachtet der Unkenntnis der Regulation dieser Enzyme die Notwendigkeit einer Dephosphorylierung des RcpB durch weitere Interaktionspartner bestärkt, sei es durch einen Phosphorelay (mit einer anschließenden Dephosphorylierung des Interaktionspartners) oder durch eine Interaktionspartner-vermittelte Destabilisierung der Phosphatgruppe.



**Abbildung 3.7.6** Kinetik der RcpB-Phosphorylierung unter verschiedenen Lichtbedingungen

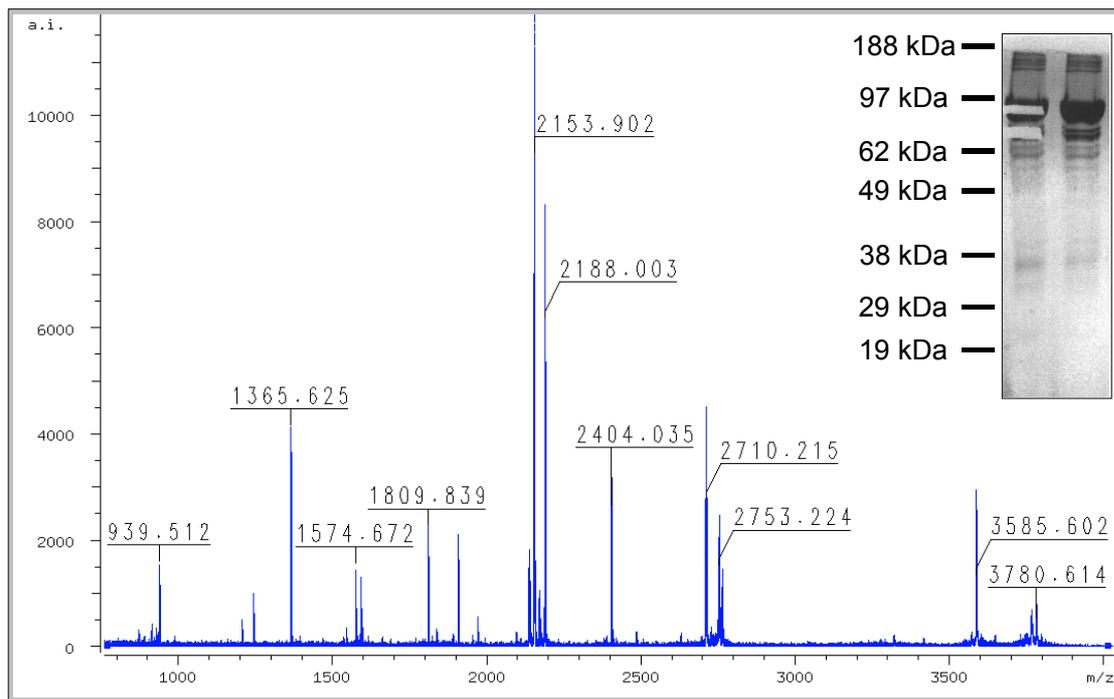
*CphBcy* wurde mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP versetzt und anschließend durch Belichtung in die P<sub>r</sub>- bzw. P<sub>fr</sub>-Form überführt. Anschließend wurde RcpB in äquimolarer Menge zugegeben. In den angegebenen Zeitabständen wurden Aliquots entnommen, und die Reaktion durch Transfer in 60°C Stopp-Puffer beendet. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF Membranen geblottet. Die Quantifizierung der Westernblots erfolgte mittels Phosphoimager.

Die hohe Stabilität der Phosphoryl-Gruppe von RcpB findet ihre physiologische Begründung in den in eher längeren Zeiträumen stattfindenden Anpassungen von *Calothrix* an seine Umwelt. Gleichzeitig bedeutet dies jedoch, daß es für die Abschaltung dieses Signaltransduktionswegs (und damit die vollständige Regulation) in *Calothrix* weitere Mechanismen geben muß, da keine Autoregulation mittels instabilem Phospho-RcpB stattfinden kann. Versuche, eine RcpB-spezifische Phosphatase zu finden, waren bisher nicht erfolgreich (Kap. 3.11).

Als Stimulus dieses Zweikomponentensystems konnte hier Licht der Wellenlänge um 730 nm identifiziert werden (bzw. Dunkelheit nach Neusynthese). Da der Chromophoreinbau bei der Neusynthese jedoch in die physiologisch aktive (auto- und transphosphorylierende) P<sub>r</sub>-Form des CphBcy erfolgt, bedeutet dies, daß das von CphBcy ausgehende Signal lediglich durch anhaltende Rotbelichtung abgeschwächt werden kann (und ebenfalls, wenn auch geringer, durch Belichtung mit blauem Licht, siehe Kap. 3.7.3). Unter normalen, physiologisch relevanten Belichtungsverhältnissen wird RcpB wahrscheinlich von CphB phosphoryliert. Ob die phosphorylierte Form von RcpB nun die aktive oder die inaktive Form darstellt, sollte Ziel zukünftiger Untersuchungen sein. Da nichts über die Regulation der CphBcy-Expression bekannt ist, könnte CphBcy auch Prozesse steuern, die in *Abwesenheit* von Licht aktiviert werden müssen (z.B. durch CphBcy-Degradation im Licht und Neusynthese in die P<sub>r</sub>-Form im Dunklen). Da Signaltransduktionsprozesse oft keinen binären Charakter haben (also *nicht* zu 100% aktiviert oder zu 100% inaktiviert sind), sondern mit Schwellenwerten arbeiten, die erst später in einer definierten Antwort enden können<sup>187</sup>, ist jedoch eine Rolle von CphBcy als Rotlichtsensor keineswegs ausgeschlossen.

### 3.7.6 Identifikation von CphBcy über MS

Zur eindeutigen Identifizierung von CphBcy mit dem Versuch ein chromophortragendes Peptid nachzuweisen wurde eine Präparation von CphBcy im SDS-Gel mit Trypsin verdaut, anschließend eluiert und mittels MALDI-TOF analysiert. Die erhaltenen Massen-Peaks wurden mit der Peakliste eines theoretischen Verdauens<sup>@</sup> (Methionine nicht oxidiert, Trypsinverdau, Cysteine reduziert) von CphBcy verglichen.



**Abbildung 3.7.7** Ausschnitt eines MALDI-TOF Spektrums von CphBcy

**Insert:** Die dem Experiment zugrunde liegende Probe von CphBcy nach Ni-NTA Aufreinigung. Die ausgeschnittenen Proteinbanden wurden anschließend im Acrylamid-Gel tryptisch verdaut und die erhaltenen Fragmente wurden eluiert. Das Eluat wurde auf einer Maldi Reflex III von Bruker analysiert. Eine vollständige Liste der erhaltenen sowie der vorhergesagten Peaks findet sich im Anhang.

Entsprechend der theoretischen Vorhersage waren Peptide über 5000 Da aufgrund der Vollständigkeit des Trypsinverdauens nicht zu sehen. In späteren Versuchen (Kap. 3.7.7) konnte mittels MS-MS eine Sequenzabdeckung von ca. 95% erreicht werden (siehe Anhang Peakliste des Proteinverdauens von CphBcy). CphBcy wurde aber bereits durch diesen Versuch eindeutig identifiziert. Ein Chromopeptid der erwarteten Masse, 2391,2 für das PCB- bzw. 2387,2 für das BV-Addukt des 1822,94 Da-Peptids (siehe Anhang), konnte in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

<sup>@</sup> <http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>

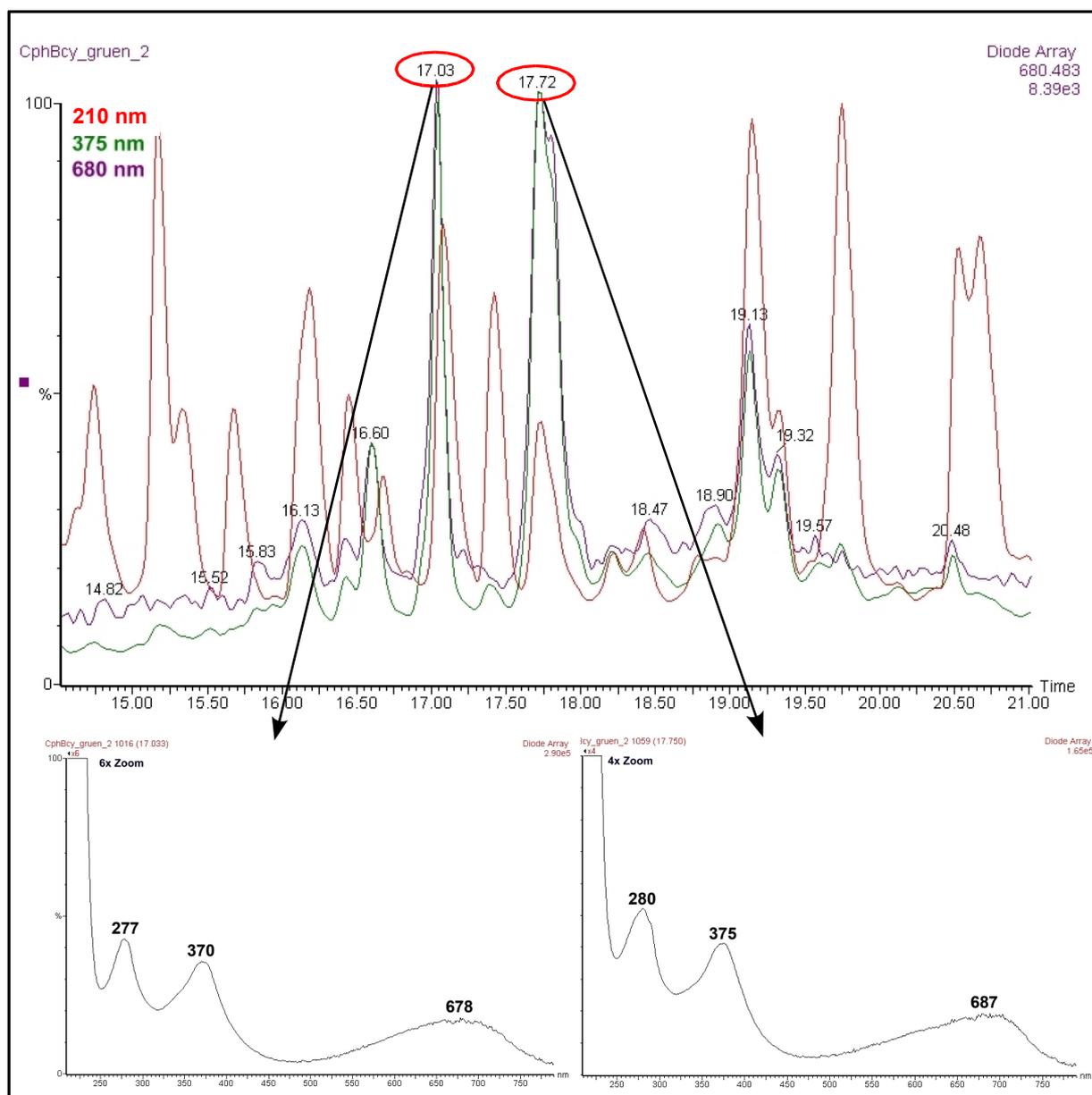
### 3.7.7 Versuche zur Identifikation des nativen Chromophors

Durch die Untersuchungen von Davis *et al*<sup>20</sup> mit Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* ermutigt, wurde ebenfalls versucht, ein chromophortragendes Peptid des homolog exprimierten CphBcy massenspektrometrisch nachzuweisen.

Die Verwendung einer Bromcyanspaltung analog den Experimenten mit Bph1 aus<sup>20</sup> bot sich im Falle von CphBcy nicht an, da dies kein Spaltprodukt handhabbarer Größe im Bereich der Chromophorbindedomäne ergeben hätte (Peptide über 3000 Da verhalten sich auf der verwendeten MS problematisch). Stattdessen wurde wie zuvor beim CphBmLC (Kap. 3.6.13.2) eine proteolytische Spaltung mit Trypsin durchgeführt. Die zur Auftrennung der Peptide verwendete LC war mit einem PDA Detektor ausgestattet und mit einer MS-MS in Reihe geschaltet, d.h. die Peaks, die im PDA Detektor der LC detektiert wurden, korrelierten mit einer definierten zeitlichen Verzögerung mit den Massenspektren der MS-MS.

In Abb. 3.7.8 ist das Elutionsprofil der LC sehen. Im Besonderen fallen hier zwei Peaks auf, bei denen eine hohe Absorption bei 375 nm und 680 nm detektiert werden kann. Der spätere Peak mit einer Retentionszeit von 17.75 min ist insofern interessant, da hier zum einen der Verlauf der Absorption bei 210 nm, 375 nm und 680 nm parallel verläuft (ähnlich dem Peak bei 19.13 min), was das Vorhandensein eines Chromopeptids andeutet, und zum anderen das Verhältnis der Absorption bei 375 nm bzw. 680 nm zu 210 nm am höchsten ist (in der Abbildung sind die *relativen* Absorptionen wiedergegeben). Bei dem Peak nach 17.03 min kann zwar ein relativ hohes Verhältnis 375 nm / 210 nm beobachtet werden, die Absorptionen verlaufen dort jedoch nicht parallel, daher könnte es sich auch um eine Co-elution von freigesetztem Chromophor handeln. Beim Peak mit der Retentionszeit 19.13 min kann zwar ein paralleler Absorptionsverlauf gefunden werden, das 375 nm / 210 nm Verhältnis ist jedoch eher niedrig. Bei letztgenanntem Peak wurden jedoch ebenfalls ähnliche Spektren wie die in Abb. 3.7.8 dargestellten aufgezeichnet. Selbstverständlich reflektiert in diesem Experiment ein Peak nicht zwingend ein homogenes Einzelpeptid, daher kann der Verlauf der Absorption bei den verschiedenen Wellenlängen auch durch eine Co-Elution von normalen Peptiden und Chromopeptiden herrühren.

Auf der MS konnte lediglich das zweifach geladene Peptid der Chromophorbindestelle (mit der Masse 1823,94 Da) ohne Chromophor im Zeitfenster des Peaks bei 17.75 min identifiziert werden. Eine Masse von 2387,2 für das BV-Addukt oder 2391,2 für das PCB-Addukt dieses Peptids konnte auch hier nicht gefunden werden. Dies könnte entweder daran liegen, daß die vorgeschlagene BV-Proteinbindung schon während des Trypsinverdaus hydrolysiert wurde und auf der LC dementsprechend nur freier Chromophor coelulierend mit Peptiden detektiert wurde, oder daß die Bindung durch die Ionisierung für die MS aufgebrochen wurde.



**Abbildung 3.7.8** LC-Lauf von CphBcy

**Oben:** Ausschnitt des Elutionsprofils bei 210 nm (rot), 375 nm (grün) und 680 nm (violett) eines LC-Laufs mit CphBcy (grüne Spezies) auf Waters CAP LC mit PDA, Säule: Waters Symmetry C18; 5 $\mu$ ; 0.32x 150 mm. Eluenten: **A:** 0.025% TFA in H<sub>2</sub>O, **B:** MeCN 0.02% TFA. Gradient: 5' 5% B, 5% B  $\rightarrow$  45%B in 25', 45% B  $\rightarrow$  90% B in 3', 7' 90% B. Flußrate 10  $\mu$ l/min. Probe: 5  $\mu$ l CphBcy (16.2 pM). Aufgetragen sind die relativen Intensitäten gegen die Zeit in Minuten. **Unten: Links,** Spektrum des Peaks mit der Retentionszeit 17.03 min. **Rechts,** Spektrum des Peaks mit der Retentionszeit 17.75 min.

Leider kann aus den PDA-Spektren (Abb. 3.7.8) nicht direkt auf die Art des Chromophors geschlossen werden, da nachträgliche Versuche zeigten, daß sowohl freies PCB als auch freies BV unter den Bedingungen der LC (also bei ca. 25% MeCN, 0.025% TFA) relativ ähnliche Absorptionsspektren besitzen.

### 3.8 Zusammenfassende Diskussion zu CphB

Es konnte mittels präparativer Gelfiltrationen der Dimercharakter von heterolog exprimiertem CphBm, der aus Auto- und Transphosphorylierungs-Experimenten vermutet wurde, bestätigt werden. Die Präparationsmethode konnte dabei soweit optimiert werden, daß mit dem PCB-Addukt der Mutante CphBmLC ein Extinktionskoeffizient erreicht werden konnte, der den aktuell veröffentlichten Werten von Cph1 aus *Synechocystis* entsprach. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den spektroskopischen Untersuchungen ist in Tabelle 3.8.1 wiedergegeben. Die jeweiligen Assemblierungsintermediate wurden in Kap. 3.6.7 bereits ausführlich diskutiert.

Protein/Bedingung	$P_r/P_{fr}$	$\lambda_{isos}$	$t_1/t_2$	Anmerkungen
CphBm-PCB -DTT	686/734	705	12 s / 2:30 min	max. SAR=0,608
CphBm-PCB +DTT	686/734	705	n.d.	Erhöhte Stabilität gegenüber Imidazol verglichen mit -DTT
CphBm-BV -DTT	704/746	722	7 s / 52 s	schlechte Photochemie
CphBm-BV +DTT	702/754	722	n.d.	gute Photochemie, sehr ähnlich zu CphBcy
CphBmLC-PCB -DTT	686/734	704	n.d.	umwandelbar in CphA-ähnliche Spektren mit DTT bzw. $\beta$ -ME
CphBmLC-PCB +DTT	656/702	673	39 s / 7:30 min	max. SAR=0,832 $\rightarrow \epsilon_{656} = 82600$ sehr ähnlich zu CphA
CphBmLC-PCB (Roh)	656/708	675	n.d.	im Rohaufschluß assembliert
CphBmLC-BV -DTT	702/754	726	n.d.	sehr schlechte Photochemie
CphBmLC-BV +DTT	702/754	722	10 min / 288 min	Photochemie ähnlich CphBm-BV +DTT
CphBcy	698/749	720	n.d.	homolog exprimiert in <i>Fremyella diplosiphon</i> SF33
CphBm H267A	!	!	!	keine Photochemie, Anlagerungsprodukt bei 700 nm

**Tabelle 3.8.1** Zusammenfassende Tabelle der spektroskopischen Ergebnisse zu CphBx

$P_r/P_{fr}$ : Peaks des Differenzspektrums,  $\lambda_{isos}$ : isosbestischer Punkt der Photokonversion,  $t_1/t_2$ : Werte des biexponentiellen Fits aus der Assemblierung, n.d.: nicht durchgeführt, ! = nicht determinierbar. Als Photochemie wird hier die  $P_r/P_{fr}$  Photoreversibilität verstanden.

Die chromophorbindende Aminosäure des CphBm ist mit großer Wahrscheinlichkeit das Histidin 267, was durch die Tatsache, daß Imidazol auf die Chromophorbindung von CphB inhibierend wirkt, sowie durch die Mutante H267A belegt wird, bei der ein vollständiger Verlust der Phytochrom-typischen Photochemie zu beobachten war. Ein endgültiger Nachweis für eine kovalente Verknüpfung von PCB oder BV am Histidin 267 mittels eines massenspektrometrisch identifizierten Chromopeptids (analog zu <sup>20</sup>) konnte jedoch weder für CphBm, noch für das homolog exprimierte CphBcy erbracht werden.

Die Rolle des Histidins als an der Chromophorligation beteiligte Aminosäure wird auch durch den Einfluß des Imidazols auf die Assemblierungsgeschwindigkeit von CphBmLC-PCB deutlich. Durch das eingefügte Cystein konnte im CphBmLC die Fähigkeit zur Thioetherverknüpfung mit PCB hergestellt werden, was noch einmal klar belegt, daß das Cystein, wenn vorhanden, die energetisch bevorzugte Chromophorbindestelle in cyanobakteriellen Phytochromen ist.

Zur Frage nach der Kovalenz der beiden Bindungstypen (Cystein-gebunden bzw. Histidin-gebunden) konnte mit Versuchen zur Chromophorkompetition, Zn<sup>2+</sup>-Gelanalysen und Versuchen, ein Chromopeptid aus CphBcy massenspektrometrisch darzustellen, folgendes festgestellt werden: die Chromophor-Protein-Bindung von PCB und CphBmLC kann als kovalent bezeichnet werden, da diese Verknüpfung unter allen in dieser Arbeit angewandten Bedingungen stabil blieb. Die Bindungen von BV und PCB zu CphBm im Umkehrschluß aber als nichtkovalent zu bezeichnen, würde ein unvollständiges Bild zeichnen. So zeigen die Imidazol-Versuche im CphBm, daß es dort ein Gleichgewicht von gebundenem und ungebundenem Chromophor gibt, das abhängig von der Imidazolkonzentration ist. Die Aufreinigung von CphBcy über Ni-NTA (ohne jeglichen Chromophorverlust) sowie die sehr geringe Imidazolkompetierbarkeit des BV-Addukts von CphBm deuten ebenso wie die Zn<sup>2+</sup>-Gele des CphBcy stark auf eine kovalente Bindung hin. Dennoch konnte auch BV aus der Chromophorbindetasche des CphBmLC im Rahmen der Chromophorkompetition von PCB teilweise verdrängt werden, was auch für den Fall von BV ein Gleichgewicht von gebundenem und ungebundenem BV impliziert. Man sollte daher im Fall von CphBm und CphBmLC nicht eine Unterscheidung zwischen kovalent und nichtkovalent treffen, sondern eher eine stabile kovalente Bindung (CphBmLC-PCB) von instabilen kovalenten Bindungen (CphBm-PCB, CphBm-BV und CphBmLC-BV) unterscheiden (dazu auch Diskussion in Kap. 3.2.3). Ein mögliches PCB-Histidinyll-Addukt einer Bromcyanspaltung von Bph1 aus *Deinococcus radiodurans* konnte z.B. massenspektrometrisch nachgewiesen werden <sup>20</sup>.

Eine „echte“ nichtkovalente Wechselwirkung von Chromophor und Protein findet vermutlich in der Mutante H267A statt, die keinerlei Photoreversibilität mehr zeigt, aber dennoch nach der Inkubation mit PCB eine deutliche Zn<sup>2+</sup>-Fluoreszenz aufweist.

Die unterschiedliche Stabilität der Bindungen von BV und PCB an CphBm kann durch die unterschiedliche Architektur der Chromophore erklärt werden (Kap. 3.2.3, Abb. 3.2.3). BV bildet nach der Bindung an den Histidinyrest aufgrund der Einbeziehung von Ring A in das konjugierte  $\pi$ -Elektronensystem eine Enamin-Amidin-Tautomerie aus und ist damit mesomeriestabilisiert, während das PCB an Ring A eine Doppelbindung weniger hat als BV und nicht über eine Mesomerie (oder Protonenverschiebung) stabilisiert werden kann. Bei PCB sind die beiden möglichen Formen durch die andersartige  $\pi$ -Elektronenstruktur in Ring A ohnehin nur über das sehr hydrolyseempfindliche positiv geladene Zwischenprodukt (Abb. 3.6.19) durch Protonierung / Deprotonierung ineinander umwandelbar<sup>188</sup> und dadurch gegenüber nukleophilen Angriffen oder Hydrolyse empfindlicher.

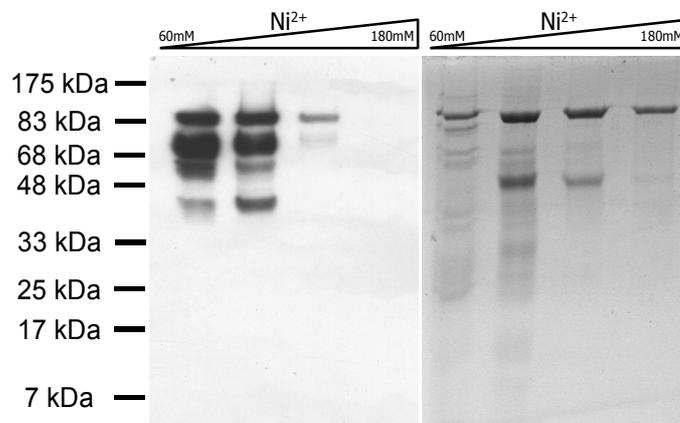
Die Frage, welchen Chromophor CphB *in vivo* hat, konnte durch homologe Expression des Proteins in *Fremyella diplosiphon* beantwortet werden; das *in vivo* exprimierte CphBcy hat nahezu identische Absorptionseigenschaften wie das BV-Addukt des heterolog exprimierten CphBm. Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß Biliverdin den natürlichen Chromophor von CphBcy *in vivo* darstellt. Es bildet damit keine Ausnahme, denn wie Ergebnisse anderer Forschergruppen zeigen, ist Biliverdin auch als Chromophor in Bph1 aus *Deinococcus radiodurans*<sup>49</sup> zu finden, sowie in einem Bacteriophytochrom aus *Agrobacterium tumefaciens* (Tilman Lamparter, pers. Mitteilung), und wahrscheinlich ebenfalls im BrBph1 aus *Bradyrhizobium* ORS278<sup>83</sup>. Dies hier ist jedoch die erste Aufreinigung eines homolog exprimierten Bacteriophytochroms ohne Cysteinbindestelle.

Die Identifikation eines Chromopeptids von CphBcy über LC-MS schlug jedoch fehl. Zwar konnten Chromopeptide über die HPLC nachgewiesen werden, aus den Spektren der MS konnte jedoch kein Peak einer theoretischen Chromopeptid-Masse zugeordnet werden. Stattdessen konnte u.a. das Peptid der unmodifizierten Chromophorbindedomäne, zeitlich korreliert mit Chromopeptid-Signalen der vorgeschalteten HPLC, identifiziert werden, was die Vermutung nahe legt, daß die Chromophor-Peptidbindung unter den gegebenen Bedingungen der MS-MS nicht stabil war.

Die Phosphorylierungsversuche belegen eindeutig, daß es sich bei CphBcy um eine lichtabhängige Histidinkinase handelt, die mit dem Response-Regulator RcpB ein Zweikomponenten-System bildet, das in Dunkelheit und in Weißlicht aktiviert ist und mit langanhaltender Rotbelichtung (partiell) deaktiviert werden kann.

### 3.9 Homologe Expression von CphA

Die Ergebnisse der homologen Expression von CphA (im folgenden CphAcy) führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die verwendeten monoklonalen Anti-CphA Antikörper wurden dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe um Nicole Tandeau de Marsac, Institut Pasteur, Paris bereitgestellt. Die Detektionsgrenze dieser Antikörper wurde mit heterolog exprimiertem, aufgereinigtem CphA ermittelt und lag bei ca. 1 ng Protein (entspricht 0,011 pmol). In Vorversuchen mit Wildtypzellen von *Calothrix* konnte weder in konzentrierten Rohlysaten noch in ankonzentrierten Fraktionen aus Anionenaustausch-Chromatographieläufen eine detektierbare Menge CphAcy gefunden werden. Dies ist weitestgehend konsistent mit Studien des Expressionsniveaus von Cph1 in *Synechocystis* PCC6803<sup>76</sup>. Dort wurde im Wildtyp ebenfalls kein Cph1 detektiert, und das Expressionsniveau des Stamms, der zusätzlich mit einer Cph1-Promotor getriebenen, His(6) getaggten Kopie von Cph1 ausgestattet war, lag bei ca. 23 Molekülen Cph1 pro Zelle und erforderte den Einsatz von deutlich größeren Mengen an Zellmaterial pro Milliliter untersuchter Probe, als hier im Falle von CphAcy eingesetzt wurde.



**Abbildung 3.9.1** CphAcy, verschiedene ankonzentrierte Fraktionen vom Ni-NTA Lauf

**Links:** Westernblot mit monoklonalen Antikörpern. **Rechts:** identische Proben auf Coomassie -Gel. Die mittlere Imidazolkonzentrationen des ersten und letzten Pools sind angegeben.

Eine Ni-NTA Aufreinigung von CphA aus dem Stamm *Calothrix* PCC7601 pPL7b (CphA) ergab eine geringe Menge an Protein der richtigen Molekulargewichtsgröße von ca. 87 kDa (Abb. 3.9.1, rechts). Diese Bande konnte (tryptisch verdaut) über ein MALDI-Experiment nicht als CphA identifiziert werden, desweiteren sieht man in Abb. 3.9.1 eine deutliche Diskrepanz von Coomassie-Gel und Westernblot. Während die 87 kDa Coomassie Bande bei steigender Imidazolkonzentration schließlich als Einzelbande vorliegt, zeigt der Westernblot

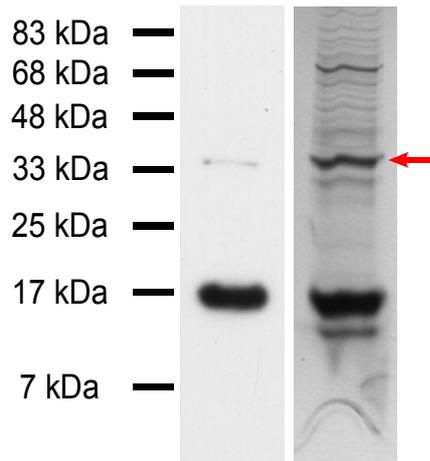
die stärksten Signale in den niedrigeren Imidazolkonzentrationen und zeigt bei der Einzelbande der 180 mM Probe kein Signal. In einem weiteren Versuch hingegen konnte in der *letzten* Fraktion des Ni-NTA Laufs auch ein schwaches Signal mit Anti-His Antikörpern erhalten werden (nicht gezeigt); hier korrelierte das Signal der monoklonalen Antikörper mit den beobachteten Coomassie-Banden. Eine Proteinsequenzierung der 87 kDa Bande blieb ohne auswertbares Ergebnis.

Daher liegt die Vermutung nahe, daß die beobachtete Bande auf dem Coomassie-Gel die Bande des durch die monoklonalen Antikörper nachgewiesenen CphAcy's verdeckt und dadurch auch die Identifizierung mittels MALDI verhindert. Weiterhin wurde in keiner der ankonzentrierten Fraktionen photochemisch aktives Material gefunden, es konnte bei einer Präparation lediglich ein schwaches Spektrum ähnlich der gelben Spezies von CphBcy aufgezeichnet werden (Kap. 3.7.2), was ebenfalls dafür spricht, daß CphAcy nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird. Jedoch reichte die Zellmenge von 10 Litern Kultur für die Aufreinigung offensichtlich nicht aus, um photoaktives CphAcy zu erhalten.

Über die deutlichen Unterschiede im Expressionsniveau von CphBcy und CphAcy (schließlich werden sie vom identischen Promotor getrieben) kann nur gemutmaßt werden. Entweder ist die Proteinstabilität von CphAcy generell deutlich geringer oder sie wird sogar, vergleichbar der lichtabhängigen Proteindegradation von phyA<sup>189</sup> in höheren Pflanzen, aktiv herunterreguliert. Eine derartige lichtabhängige Regulation auf Proteinebene würde CphA ermöglichen, ähnliche Funktionen zu übernehmen wie sein pflanzlicher Konterpart phyA, nämlich primär solche Vorgänge zu regulieren, die beim Übergang von der Dunkelheit zum Licht eine Rolle spielen. Da die P<sub>r</sub>-Form von CphA die physiologisch aktive Form im Sinne von erhöhter Auto- und Transphosphorylierungsaktivität darstellt, ist es ebenfalls denkbar, daß CphA über den Weg der Neusynthese (in die P<sub>r</sub>-Form) oder durch anhaltende Belichtung mit dunkelrotem Licht Prozesse aktiviert, die bei Lichtmangel oder in der Dunkelheit bevorzugt ablaufen. Eine andere, wenn auch sehr unwahrscheinliche Möglichkeit ist, daß sich hier Unterschiede der verwendeten Organismen (*Calothrix* zu *Fremyella diplosiphon*) zeigen.

### 3.10 Homologe Expression von RcpA

RcpA konnte im eigenen Shuttle-Vektor pBQ10 erfolgreich in *Calothrix* zur Expression gebracht werden. Hier gelang der Nachweis mit polyklonalen Hasen-Antikörpern gegen RcpA (Abb. 3.10.1) nach Ni-NTA Aufreinigung aus 2 Liter Kulturvolumen. Wie in der Abbildung zu sehen, kann auch das Dimer von RcpA nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.10.1** RcpAcy aus homologer Expression nach Ni-NTA Aufreinigung.

**Links:** Westernblot mit polyklonalen Anti-RcpA Antikörpern. **Rechts:** Entsprechende Probe auf Coomassie-Gel. **Pfeil:** RcpA Dimer.

Dieses Ergebnis schafft die Grundlage, mit Hilfe polyklonaler Antikörper eine Co-Immuno-präzipitation in *Calothrix* durchzuführen. Für die Planung einer solchen Untersuchung sollte jedoch die geringe Konzentration von Signaltransduktionskomponenten ebenso wie die mögliche Transienz der Protein-Protein Wechselwirkung in Betracht gezogen werden (siehe Vorversuche in Kap. 3.11).

Das entsprechende Experiment, die homologe Expression von RcpB im erfolgreich transformierten Stamm *Calothrix* PCC 7601 pBQ10 konnte aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

### **3.11 Protein-Protein Wechselwirkungsstudien**

*Wo das Behagen aufhört und die Not beginnt, da setzt die Erziehung ein, die das Leben uns geben will. (H. Hesse)*

Um weitere Komponenten der Signaltransduktionskette von CphA und CphB zu identifizieren, wurde versucht, mit den Response-Regulatoren RcpA und RcpB über Protein-Protein Wechselwirkungen den oder die entsprechenden Bindungspartner zu isolieren. Diese Versuche fanden ausschließlich mit heterolog aufgereinigten Response-Regulatoren statt. Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Co-Immunpräzipitation mit RcpA/RcpB (N-terminales FLAG-Epitop und C-terminales FLAG-Epitop. Das FLAG Epitop ist ein Oktapeptid mit der Sequenz DYKDDDDK, für welches es kommerziell erhältliche, hochspezifische monoklonale Antikörper gibt, diese können sowohl an Säulenmaterial gekoppelt als Affinitätssäule verwendet werden, als auch mit Protein A-Sepharose aus Überständen präzipitiert werden.)
- Co-Immunpräzipitation mit RcpA (N-terminales His(6)-tag und C-terminales His(6)-tag)
- Immobilisierung von RcpA und RcpB (und Phospho-RcpA/RcpB) an N-Hydroxysuccinimidyl aktivierte Sepharose, Versuch der Aufreinigung von Signaltransduktionskomponenten aus Rohlysaten.
- Co-Aufreinigung aus Rohlysaten mit zusätzlich zugegebenem RcpA/RcpB über Ni-NTA Aufreinigung.
- Versuch, RcpA bzw. RcpB-spezifische Phosphatase (oder einen Phosphorelay-Partner) über eine Dephosphorylierung der über radioaktives Acetylphosphat P<sup>32</sup>-markierten Response-Regulatoren zu identifizieren.

All diese Versuche blieben ohne positives Ergebnis. Dies liegt sehr wahrscheinlich an zwei Punkten: Zum einen liegen Signaltransduktionskomponenten in der Regel nur in sehr geringer Menge in der Zelle vor, zum anderen kann die Protein-Protein Wechselwirkung während einer Signalübertragung gerade im Fall einer Phosphorylierungskaskade ausgesprochen kurz sein. Co-Aufreinigungen von Signaltransduktionskomponenten stellen in der Literatur auch eher die Ausnahme als die Regel dar und erreichen meist nur Komponenten, die im Komplex mit ihrem Interaktionspartner eine modulierende Wirkung auf diesen ausüben<sup>190</sup>. Die in den Versuchen gewählte Menge an Ausgangsmaterial könnte demnach ebenso für das Scheitern dieses Vorhabens verantwortlich sein, wie der systemische Fehler des Ansatzes, die Response-Regulatoren als „Angelhaken“ zu verwenden. Der Versuch, eine Dephosphorylierung der Response-Regulatoren in fraktionierten Rohlysaten von *Calothrix* nachzuweisen, gelang nur im Fall von RcpA. Dabei fand jedoch kein Phosphotransfer auf einen möglichen Interaktionspartner statt, sondern lediglich eine Dephosphorylierung von RcpA. Das Projekt wurde schließlich auf-

gegeben, da eine Aufreinigung dieser Phosphataseaktivität, der Nachweis ihrer Spezifität und die Identifizierung der verantwortlichen Komponente(n) den noch zur Verfügung stehenden Zeitrahmen gesprengt hätte, zumal für die Identifizierung dieser Komponenten der „klassische“ Weg über Proteinsequenzierung und genomischer PCR mit degenerierten Primern zu gehen gewesen wäre.

Dieses Projekt könnte besser im komplett sequenzierten Organismus *Anabaena* PCC 7120 durchgeführt werden, da hier ebenfalls zu 81% (CphA) bzw. 63% (CphB) sequenzidentische Homologe (nebst ihren kognitiven Response-Regulatoren) zu finden sind<sup>107, 22</sup>. Durch die Verwendung photoaktivierbarer bifunktionaler Crosslinker<sup>191, 192</sup> wäre eventuell eine Co-Aufreinigung von Interaktionspartnern möglich. Die zu erwartenden Mikromengen wären dann theoretisch über Massenspektrometrie identifizierbar.

## 4. Zusammenfassung

*Das Chaos will anerkannt, will gelebt sein, ehe es sich in neue Ordnung bringen läßt. (H. Hesse)*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei cyanobakterielle Phytochrome untersucht, CphA, das eine Chromophorbindestelle analog zum Pflanzenphytochrom aufweist und den Chromophor Phycocyanobilin (PCB) kovalent über einen Thioether an ein Cystein bindet, und CphB, ein typischer Vertreter der noch jungen Klasse der Bacteriophytochrome, dem das chromophorbindende Cystein fehlt. Dieses Protein zeigte in den bisherigen Untersuchungen eine nicht-kovalente Bindung von PCB. In direkter Nachbarschaft des chromophorbindenden Cysteins befindet sich ein in allen Phytochromen konserviertes Histidin, dem eine Beteiligung an der Ausbildung der kovalenten Chromophorbindung zugesprochen wird.

Die Ausbeute an photoaktivem Material konnte im Vergleich zu vorherigen Arbeiten durch Optimierung in beiden Fällen verbessert werden. Für CphB wurden zudem Bedingungen gefunden, die zu einer wesentlich besseren „Konstitution“ dieses Proteins führten und weitergehende Studien mit diesem Protein ermöglichten.

In CphA konnten durch zielgerichtete Punktmutagenese Aminosäuren identifiziert werden, die für die Proteinfaltung und / oder die Bilinlyaseaktivität essentiell sind. Darüberhinaus wurden anhand von Mutanten an Positionen, die aus einem durch Strukturvorhersagen erarbeiteten Modell hervorgingen, drei Aminosäuren identifiziert, die in unmittelbarer Umgebung des Chromophors liegen (N266, Y263, M267). Die Mutante M267R zeigte dabei eine der deutlichsten chromatischen Veränderungen, die für Phytochrome bisher berichtet wurden. Sie zeigt eine nahezu achromatische  $P_{fr}$ -Form, die nicht durch Belichtung wieder in die  $P_r$ -Form überführt werden kann. Die Rückkehr in die  $P_r$ -Form erfolgt innerhalb weniger Minuten durch thermische Relaxation.

Im Falle von CphB wurde die Chromophorbindung genauer untersucht. Die Frage, ob CphB grundsätzlich in der Lage ist, eine Thioetherbindung zu PCB (analog dem pflanzlichen System und CphA) zu knüpfen falls die entsprechende Aminosäure - das Cystein – vorhanden wäre, wurde mit der Mutante CphBmLC, bei der das chromophorbindende Cystein in die Sequenz eingefügt wurde, klar bestätigt. CphBmLC zeigt gegenüber CphB eine 30 nm Blauverschiebung der Absorptionsmaxima, was auf den Verlust einer Doppelbindung des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems von PCB, wie bei einer Thioetherbindung üblich, zurückgeführt werden kann.

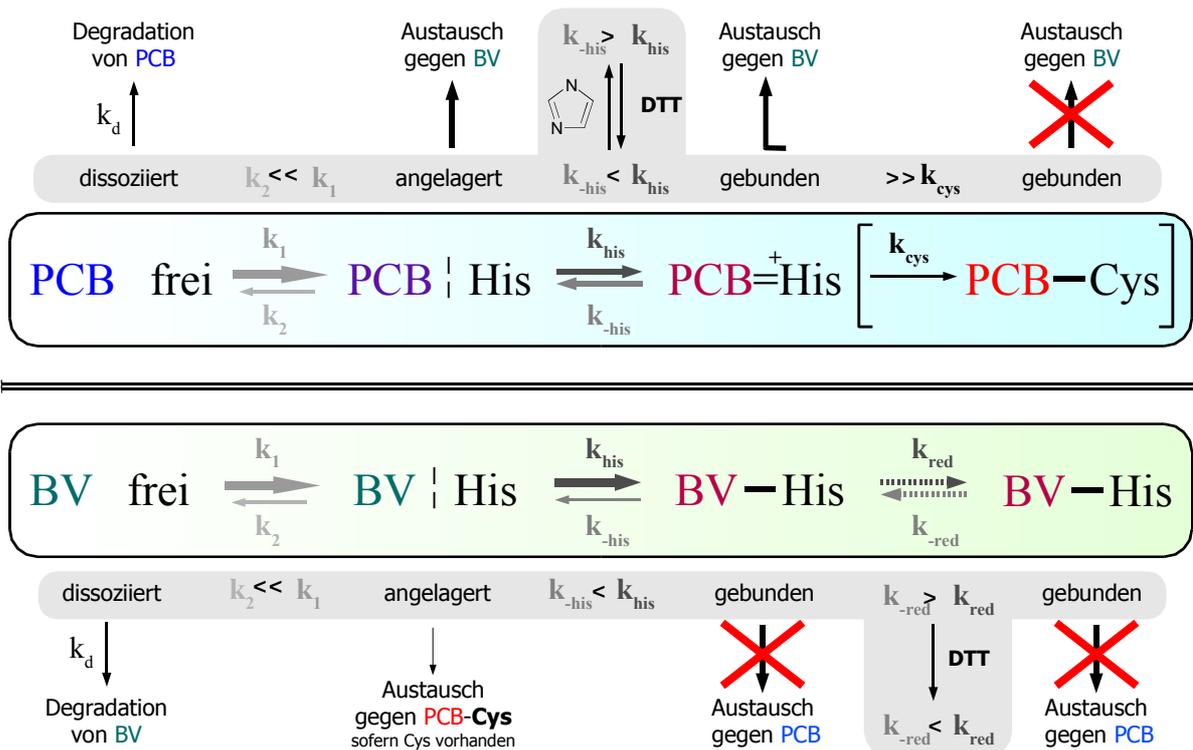
CphB zeigte in früheren Studien einen Verlust des Chromophors während der Aufreinigung. Dieses Phänomen konnte durch gezielte Studien zur Chromophorinkorporation (Assemblierung) überwiegend auf den Einfluß von Imidazol zurückgeführt werden. Dabei wurde eine Gleichgewichtsverschiebung von gebundenem zu ungebundenem Chromophor in

Abhängigkeit von der Imidazolkonzentration beobachtet. Die dazu durchgeführten Untersuchungen mit der Mutante CphBmLC zeigten eine Verlangsamung der Assemblierung mit steigender Imidazolkonzentration, ließen aber erwartungsgemäß die kovalente Natur der Bindung unbeeinflusst. Diese Resultate deuten darauf hin, daß das hochkonservierte Histidin der Phytochrome sowohl an der Katalyse der Thioetherbindung beteiligt ist, als auch als alternative Chromophorbindestelle dient. Bestärkt wird diese Aussage durch die Mutation des Histidins in CphA und CphB. In beiden Fällen findet keinerlei phytochromtypische Photochemie mehr statt, was eindeutig belegt, daß der Chromophor nicht mehr in typischer Weise in das Protein eingebunden wird.

Das Biliverdin (BV)-Addukt von CphBmLC zeigte keine Blauverschiebung gegenüber dem BV-Addukt des CphB, wie es mit den PCB-Addukten dieser Proteine beobachtet wurde (s.o.). Das bedeutet, daß BV nicht über einen Thioether eingebunden wird. Untersuchungen zur Chromophorkompetition in den Phytochromen CphB und CphBmLC mit den Chromophoren PCB und BV ergaben, daß BV in der Lage ist, PCB aus der Bindetasche des CphB zu verdrängen. In der Mutante CphBmLC kann jedoch PCB das BV verdrängen. Das bedeutet zum einen, daß BV fester an CphB bindet als PCB und zum anderen, daß die Bindung dieser Chromophore in CphB *transient* ist und nicht die Stabilität einer Thioetherbindung erreicht. Das mit der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse aufgestellte Modell der Bindung von Biliverdin am Histidin stellt die erste mögliche Enamin-Amidin Tautomerie in der belebten Natur dar.

Während PCB durch Imidazol mit der Zeit vollständig aus CphB verdrängt werden kann, ist dieser Einfluß bei BV stark abgeschwächt. BV scheint somit der bevorzugte Chromophor von CphB zu sein, was zudem durch die homologe Expression dieses Proteins eindeutig gezeigt werden konnte (s.u.).

Die Mutante CphBmLC zeigte eine weitere interessante Eigenschaft: wurde das Apo-Protein (das unassemblierte Protein) unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgereinigt, verhielt sich das PCB-Addukt der Mutante wie der Wildtyp. Addition von reduzierenden Agentien zum Apo-Protein oder zum bereits assemblierten CphBmLC revertierten dieses Verhalten. Das Apo-Protein konnte zwischen beiden möglichen Bindungsarten hin- und hergeschaltet werden. Einmal „korrekt“ (d.h. mit „freigeschaltetem“ Cystein) assembliertes CphBmLC-PCB konnte nicht wieder in den CphB-ähnlichen Zustand überführt werden, die Bindung des Thioethers ist demnach irreversibel, die Bindung am Histidin dagegen transient. Alle diese Informationen sind in Abb. 4.1 zusammengefaßt.



**Abbildung 4.1:** Zusammenfassendes Schema zur Chromophorbinding

**Oben:** Postuliertes Bindungsmodell mit PCB als Chromophor, in eckigen Klammern ist der Fall mit anwesendem Cystein abgebildet. **Unten:** Bindungsmodell mit BV als Chromophor.  $k_x$  = Geschwindigkeitskonstante der Reaktion  $x$ , die Stärke der Pfeile deutet die Höhe der jeweiligen Geschwindigkeitskonstante an.

Desweiteren ist es gelungen, beide Phytochrome (CphA und CphB) sowie einen der beiden Response-Regulatoren (RcpA) homolog zu exprimieren. Im Falle von CphA reichten die gewonnenen Mengen jedoch nicht aus, um eine spektroskopische Charakterisierung durchzuführen. Homolog exprimiertes CphB zeigte sehr ähnliche Spektren wie das BV-Addukts des heterolog exprimierten Proteins. Weiterhin konnte kein Chromophorverlust während der Aufreinigung festgestellt werden. Dies ist die erste gelungene Aufreinigung eines homolog exprimierten Bacteriophytochroms mit alternativer Chromophorbindestelle. Versuche, den Chromophor über eine massenspektrometrische Analyse zu identifizieren, waren bisher nicht erfolgreich.

Die Signaltransduktion des homolog exprimierten CphB ist ein lichtgesteuerter Prozeß. Die Phosphorylierungsversuche belegen eindeutig, daß es sich bei CphB um eine lichtabhängige Histidinkinase handelt. Diese bildet mit dem Response-Regulator RcpB ein Zweikomponenten-System, welches in Dunkelheit und in Weißlicht (d.h. mit der P<sub>r</sub>-Form von CphB) aktiviert wird und nur mit langanhaltender Rotbelichtung (partiell) deaktiviert werden kann.

An dieser Stelle möchte ich auch auf die intermediären Zusammenfassungen zu Teilgebieten dieser Arbeit hinweisen: Kapitel 3.5.8, 3.6.4, 3.6.6, 3.6.7, 3.6.11 und 3.8.

## 5. Anhang

### 5.1 Gensequenzen

#### 5.1.1 Das CphA/RcpA Operon

Die beiden Proteine werden in unterschiedliche Leserahmen einer bicistronischen mRNA translatiert, CphA ist hier in grün, RcpA in blau dargestellt, der Überlappungsbereich auf DNA-Ebene ist doppelt gezeigt und in der RcpA Sequenz grau gekennzeichnet. Start- und Stopcodon sind der jeweiligen Genfarbe angepaßt und im entsprechenden Leserahmen unterstrichen.

181	tgg	tgt	att	gcg	agc	att	cct	tcc	caa	cat	ctg	caa	tta	aat	ttc	225
226	cac	atc	taa	gta	ggg	tgc	aaa	ctt	cag	taa	atg	gtt	aac	att	tat	270
271	tga	tac	tct	gct	ttt	gat	gct	ccg	gta	aaa	tag	agg	aga	atc	tta	315
316	<u>atg</u>	gta	tcc	gaa	ttc	caa	gca	caa	agt	att	aat	gtg	aat	agc	tta	360
1	M	V	S	E	F	Q	A	Q	S	I	N	V	N	S	L	15
361	aaa	gaa	gca	gct	att	cac	gtt	tgt	agt	caa	att	caa	cct	cat	ggt	405
16	K	E	A	A	I	H	V	C	S	Q	I	Q	P	H	G	30
406	gtc	ctc	ttg	gta	ttg	ggg	gaa	cca	gaa	ctg	aac	ata	tta	caa	att	450
31	V	L	L	V	L	G	E	P	E	L	N	I	L	Q	I	45
451	agt	agt	aat	act	tgg	agt	gtt	ttc	ggc	ata	ttg	ccc	gaa	gat	gta	495
46	S	S	N	T	W	S	V	F	G	I	L	P	E	D	V	60
496	ttg	caa	aaa	aaa	ctc	gaa	gat	tta	ctc	gac	ccc	ttc	caa	atc	gaa	540
61	L	Q	K	K	L	E	D	L	L	D	P	F	Q	I	E	75
541	aga	att	aaa	gca	ggc	ata	tta	gaa	ggc	aac	ctg	gat	tat	att	aac	585
76	R	I	K	A	G	I	L	E	G	N	L	D	Y	I	N	90
586	cca	aca	aaa	att	tgg	gtg	aga	aag	aaa	ggc	gat	gaa	tat	gta	gta	630
91	P	T	K	I	W	V	R	K	K	G	D	E	Y	V	V	105
631	ttt	gat	gcg	gta	ttt	cat	cgc	aac	cca	gaa	gga	ttg	ttg	att	tta	675
106	F	D	A	V	F	H	R	N	P	E	G	L	L	I	L	120
676	gaa	tta	gaa	cca	gca	att	tct	caa	gaa	aat	atc	cca	ttt	cta	agc	720
121	E	L	E	P	A	I	S	Q	E	N	I	P	F	L	S	135
721	ttt	tac	cac	cta	gca	aga	gct	tct	att	aat	cag	tta	gaa	aaa	acc	765
136	F	Y	H	L	A	R	A	S	I	N	Q	L	E	K	T	150
766	aca	aac	ctg	cgc	gat	ttc	tgt	caa	att	atc	gtc	caa	gaa	gtc	cgc	810
151	T	N	L	R	D	F	C	Q	I	I	V	Q	E	V	R	165
811	aaa	gtg	act	ggg	ttt	gat	aga	gta	atg	ctc	tat	aaa	ttt	gat	gat	855
166	K	V	T	G	F	D	R	V	M	L	Y	K	F	D	D	180
856	gat	ggg	cat	ggc	tca	gtc	ata	gct	gaa	gaa	aag	cta	gac	agc	atg	900
181	D	G	H	G	S	V	I	A	E	E	K	L	D	S	M	195
901	gaa	cct	tat	tta	ggt	tta	cat	tac	cca	gag	tca	gat	att	cct	aaa	945
196	E	P	Y	L	G	L	H	Y	P	E	S	D	I	P	K	210
946	cca	gca	aga	aag	cta	ttt	gct	tct	aac	ttc	atc	aga	tta	att	ccc	990
211	P	A	R	K	L	F	A	S	N	F	I	R	L	I	P	225
991	gat	gct	cat	gca	gaa	ccc	gta	caa	att	ctg	cca	att	aat	cat	ccg	1035
226	D	A	H	A	E	P	V	Q	I	L	P	I	N	H	P	240
1036	caa	agt	caa	caa	cca	att	gat	tta	act	aac	tca	att	ttg	aga	acc	1080
241	Q	S	Q	Q	P	I	D	L	T	N	S	I	L	R	T	255
1081	gca	gca	aat	tgc	cat	tta	gag	tat	tta	cac	aac	atg	ggt	gta	ggt	1125
256	A	A	N	C	H	L	E	Y	L	H	N	M	G	V	G	270
1126	gct	tct	tta	act	att	tcc	ttg	att	aaa	gat	ggc	aaa	ctt	tgg	gga	1170
271	A	S	L	T	I	S	L	I	K	D	G	K	L	W	G	285
1171	tta	att	gct	tgt	cat	cac	caa	aca	ccg	aaa	tat	gtt	tcc	tat	gaa	1215
286	L	I	A	C	H	H	Q	T	P	K	Y	V	S	Y	E	300

1216	ttc	cgg	aaa	gcc	tgc	GAA	ttc	tta	ggt	aga	gtg	ata	ttt	aca	gaa	1260
301	F	R	K	A	C	E	F	L	G	R	V	I	F	T	E	315
1261	att	tcc	acc	aga	gaa	gaa	aca	gaa	gat	tac	gac	tat	cga	atg	aat	1305
316	I	S	T	R	E	E	T	E	D	Y	D	Y	R	M	N	330
1306	ttg	gca	tat	att	caa	aca	gta	tta	ggt	gaa	tat	atg	tcc	cag	gaa	1350
331	L	A	Y	I	Q	T	V	L	V	E	Y	M	S	Q	E	345
1351	gaa	aac	ttc	att	gat	gga	tta	gta	aaa	cat	cag	ccg	aat	ttg	ctg	1395
346	E	N	F	I	D	G	L	V	K	H	Q	P	N	L	L	360
1396	aat	tta	act	agc	gct	caa	ggt	gCg	gct	ggt	tgt	ttt	ggc	gat	cgc	1440
361	N	L	T	S	A	Q	G	A	A	V	C	F	G	D	R	375
1441	tgt	aca	gtc	att	ggg	caa	act	ccc	aaa	gaa	gaa	gac	ctc	aac	ttt	1485
376	C	T	V	I	G	Q	T	P	K	E	E	D	L	N	F	390
1486	tta	ctg	caa	tgg	ctg	aag	aat	aac	gtc	cgt	gag	gaa	gta	ttc	tac	1530
391	L	L	Q	W	L	K	N	N	V	R	E	E	V	F	Y	405
1531	aca	gat	tcc	cta	ccc	cgg	att	tat	cca	gat	gcc	gaa	aaa	ttt	aaa	1575
406	T	D	S	L	P	R	I	Y	P	D	A	E	K	F	K	420
1576	aac	gtc	gct	agt	ggt	tta	tta	gcg	att	ccc	ata	tct	aag	cgc	aac	1620
421	N	V	A	S	G	L	L	A	I	P	I	S	K	R	N	435
1621	tat	ggt	tta	tgg	ttt	cga	ccg	gaa	gtg	att	caa	aca	gta	aat	tgg	1665
436	Y	V	L	W	F	R	P	E	V	I	Q	T	V	N	W	450
1666	ggt	ggt	aat	ccc	aat	gaa	gcg	ttt	gaa	gtc	agc	caa	aca	gaa	gga	1710
451	G	G	N	P	N	E	A	F	E	V	S	Q	T	E	G	465
1711	aat	ctg	cgc	tta	ggt	ccg	cgt	aaa	tcc	ttt	gaa	ttg	tgg	aaa	gaa	1755
466	N	L	R	L	V	P	R	K	S	F	E	L	W	K	E	480
1756	aat	ggt	cag	tta	aca	tct	tta	cgc	tgg	aaa	gct	ggt	gaa	atc	aaa	1800
481	N	V	Q	L	T	S	L	R	W	K	A	V	E	I	K	495
1801	gct	gca	cta	gaa	tta	cgc	aaa	gcc	att	att	aat	att	gtg	ctg	cgt	1845
496	A	A	L	E	L	R	K	A	I	I	N	I	V	L	R	510
1846	caa	gcc	gat	gaa	cta	gcg	cag	tta	gcg	cac	gac	tta	gaa	cgc	tcg	1890
511	Q	A	D	E	L	A	Q	L	A	H	D	L	E	R	S	525
1891	aat	gcg	gaa	ttg	aaa	aag	ttt	gct	tAt	gtc	gcc	tcc	cat	gat	tta	1935
526	N	A	E	L	K	K	F	A	Y	V	A	S	H	D	L	540
1936	caa	gaa	ccc	tta	aat	caa	gta	gca	aac	tat	gtg	cag	cta	tta	gag	1980
541	Q	E	P	L	N	Q	V	A	N	Y	V	Q	L	L	E	555
1981	atg	cgc	tat	gaa	aac	gaa	ctt	gac	gaa	gac	gcg	aag	gaa	ttt	att	2025
556	M	R	Y	E	N	E	L	D	E	D	A	K	E	F	I	570
2026	aac	ttc	gcc	ggt	gag	gga	gtc	agc	ttg	atg	caa	acc	ctg	att	gat	2070
571	N	F	A	V	E	G	V	S	L	M	Q	T	L	I	D	585
2071	gac	gta	ctt	gca	tat	tcc	aag	gta	gat	atg	caa	gcg	agc	gcc	ttt	2115
586	D	V	L	A	Y	S	K	V	D	M	Q	A	S	A	F	600
2116	caa	cta	act	gag	gta	gaa	acg	ccg	cta	aat	cgc	agc	ctc	agt	aat	2160
601	Q	L	T	E	V	E	T	P	L	N	R	S	L	S	N	615
2161	ttg	cgc	ggg	cgc	att	cat	gaa	act	ggg	gct	atg	att	acc	cat	gac	2205
616	L	R	G	R	I	H	E	T	G	A	M	I	T	H	D	630
2206	ccc	tta	cca	act	gtg	atg	gct	gat	agt	aca	caa	tta	atg	cag	cta	2250
631	P	L	P	T	V	M	A	D	S	T	Q	L	M	Q	L	645
2251	ttt	caa	aat	ctc	atc	gcc	aat	gca	atc	aaa	ttc	cgc	agc	gaa	caa	2295
646	F	Q	N	L	I	A	N	A	I	K	F	R	S	E	Q	660
2296	cca	cca	aaa	att	cac	atc	gga	gcc	gaa	agg	tta	gaa	gat	gag	tgg	2340
661	P	P	K	I	H	I	G	A	E	R	L	E	D	E	W	675
2341	tta	ttc	tcc	gtc	caa	gat	aac	ggt	att	ggc	tta	gaa	cca	aga	ttt	2385
676	L	F	S	V	Q	D	N	G	I	G	L	E	P	R	F	690
2386	agc	gat	cgc	att	ttc	gtc	atc	ttt	cag	cgc	cta	cac	acc	aga	gaa	2430
691	S	D	R	I	F	V	I	F	Q	R	L	H	T	R	E	705
2431	gag	tat	ccc	ggt	aca	ggt	atg	ggt	cta	gcc	atc	tgt	aag	aaa	att	2475
706	E	Y	P	G	T	G	M	G	L	A	I	C	K	K	I	720
2476	att	gaa	tgc	cat	cgg	gga	cga	att	tgg	gta	gag	tca	caa	ctg	ggc	2520
721	I	E	C	H	R	G	R	I	W	V	E	S	Q	L	G	735
2521	gaa	ggt	gct	acc	ttc	tac	ttt	acg	att	cca	gtc	gga	ggc	cgc	gag	2565
736	E	G	A	T	F	Y	F	T	I	P	V	G	G	R	E	750
2566	<u>cgt</u>	<u>gag</u>	<u>cgt</u>	aga	aac	gga	aga	caa	aca	caa	aaa	gat	ctt	ttt	ggt	2610
751	R	E	R	R	N	G	R	Q	T	Q	K	D	L	F	G	765
2567	<u>gtg</u>	agc	gta	gaa	acg	gaa	gac	aaa	cac	aaa	aag	atc	ttt	ttg	gtc	2611

1	V	S	V	E	T	E	D	K	H	K	K	I	F	L	V	15
2611	cga	gga	<u>taa</u>													2655
766	R	G	*													
2612	gag	gat	<u>aac</u>	aaa	gct	gat	atc	cgc	tta	atc	caa	gaa	gca	ctc	aaa	2656
16	E	D	N	K	A	D	I	R	L	I	Q	E	A	L	K	30
2657	aac	agc	acc	gta	cca	cac	gag	gta	gtg	acg	gtc	aga	gat	ggt	atg	2701
31	N	S	T	V	P	H	E	V	V	T	V	R	D	G	M	45
2702	gaa	gca	atg	gct	tat	tta	cgc	caa	gaa	ggt	gaa	tat	gct	aac	gcc	2746
46	E	A	M	A	Y	L	R	Q	E	G	E	Y	A	N	A	60
2747	tca	agt	cct	gac	ctc	atc	ctc	ttg	gat	ttg	aac	ttg	ccc	aaa	aaa	2791
61	S	R	P	D	L	I	L	L	D	L	N	L	P	K	K	75
2792	gat	ggt	cgt	gaa	gtc	ttg	gct	gaa	att	aaa	agc	gac	ccc	aca	ctc	2836
76	D	G	R	E	V	L	A	E	I	K	S	D	P	T	L	90
2837	aag	cgc	att	cct	gta	gtc	gtg	ctc	tcc	acc	tcc	ata	aac	gag	gat	2881
91	K	R	I	P	V	V	V	L	S	T	S	I	N	E	D	105
2882	gat	att	ttt	cat	agc	tac	gac	tta	cac	gtc	aat	tgc	tac	atc	acc	2926
106	D	I	F	H	S	Y	D	L	H	V	N	C	Y	I	T	120
2927	aaa	tct	cgc	aac	ctg	agc	cag	ctg	ttt	caa	atc	gtc	aaa	ggt	att	2971
121	K	S	R	N	L	S	Q	L	F	Q	I	V	K	G	I	135
2972	gag	gaa	ttt	tgg	ctc	tct	acg	gcg	aca	ttg	ccg	tcg	gag	<u>tag</u>	gga	3016
136	E	E	F	W	L	S	T	A	T	L	P	S	E	*		
3017	ttg	gga	atg	ggg	aat	ggg	gaa	tgg	gta	atg	ggt	aac	tcg	ggg	cac	3061
3062	cac	cga	ttg	cag	cgt	gtg	agg	att	tgg	gaa	tgg	gga	ttg	gga	ata	3106
3107	atg	agg	gag	atg	aga	gaa										3124

## 5.1.2 Das CphB/RcpB Operon

Die beiden Proteine werden in unterschiedliche Leserahmen einer bicistronischen mRNA translatiert, CphB ist hier in grün, RcpA in blau dargestellt. Start- und Stopcodon sind der jeweiligen Genfarbe angepaßt und im entsprechenden Leserahmen unterstrichen. Die alternativen Genanfänge von CphB, die in vorigen Arbeiten getestet wurden<sup>144</sup> sind in grau bzw. rot hinterlegt.

47	ggt	ttt	atg	ctc	caa	tat	ttt	cag	aca	aaa	tgt	tat	ttt	aat	gag	91
92	aga	aag	gta	cta	tat	ttt	atg	tct	ttt	ttg	act	tat	taa	ttt	aat	136
137	tta	tat	ctg	aag	gta	gat	gtt	gaa	gag	aaa	ata	aaa	ttt	tta	aaa	181
182	ata	tta	agg	ttt	taa	ttg	<u>ttg</u>	cag	tta	att	tat	aac	aat	ttt	att	226
227	<u>gtg</u>	agc	tta	agt	cct	gaa	aat	tct	cca	gaa	aat	gct	gcg	atc	gca	271
1	V	S	L	S	P	E	N	S	P	E	N	A	A	I	A	15
272	cct	ttt	gag	gtg	gac	<u>ttg</u>	acg	aat	tgc	gat	cgc	gaa	cca	att	cac	316
16	P	F	E	V	D	L	T	N	C	D	R	E	P	I	H	30
317	atc	cct	ggc	tca	att	cag	ccg	cat	ggg	atg	cta	ttg	gcg	ttg	acg	361
31	I	P	G	S	I	Q	P	H	G	M	L	L	A	L	T	45
362	gaa	ccg	gaa	ctc	act	att	gtg	cag	gtg	agc	cga	aat	acc	gat	gaa	406
46	E	P	E	L	T	I	V	Q	V	S	R	N	T	D	E	60
407	ata	tta	ggt	gtt	gct	gcg	act	gag	ttc	atc	aat	caa	ccc	ctc	agc	451
61	I	L	G	V	A	A	T	E	F	I	N	Q	P	L	S	75
452	cgc	ttg	cta	gat	gca	cag	caa	ata	gat	ttt	ttc	cgc	aat	tgt	tta	496
76	R	L	L	D	A	Q	Q	I	D	F	F	R	N	C	L	90
497	gct	caa	gaa	gat	tta	aca	ctc	gtt	aac	ccc	atc	gaa	ctg	aca	att	541
91	A	Q	E	D	L	T	L	V	N	P	I	E	L	T	I	105
542	gct	gtg	ggg	gaa	aat	gcg	cgg	gct	ttt	gat	ggg	att	att	cat	cgc	586
106	A	V	G	E	N	A	R	A	F	D	G	I	I	H	R	120
587	tca	gat	cgt	ctg	ctg	ata	ctg	gaa	tta	gaa	cct	gta	cta	cat	caa	631
121	S	D	R	L	L	I	L	E	L	E	P	V	L	H	Q	135
632	aag	aac	tat	aca	ttc	ttc	aat	ttt	tac	cat	tta	gtg	aaa	gcc	gca	676

136	K	N	Y	T	F	F	N	F	Y	H	L	V	K	A	A	150
677	tta	tct	aaa	gtt	caa	aat	gcc	agt	act	tta	gat	gaa	tta	tgc	cag	721
151	L	S	K	V	Q	N	A	S	T	L	D	E	L	C	Q	165
722	atc	atc	gtc	aaa	cac	gtg	cgc	caa	atg	aac	ggt	ttt	gat	cgc	gtc	766
166	I	I	V	K	H	V	R	Q	M	N	G	F	D	R	V	180
767	atg	atc	tac	cgc	ttt	gat	gaa	aat	tgg	cat	ggt	aca	gtc	att	gcc	811
181	M	I	Y	R	F	D	E	N	W	H	G	T	V	I	A	195
812	gag	gac	aaa	tca	gca	cat	ctt	agc	cct	tac	ctg	agt	ttg	cgc	tat	856
196	E	D	K	S	A	H	L	S	P	Y	L	S	L	R	Y	210
857	ccg	gct	tcc	gac	att	ccc	aaa	caa	gca	aga	caa	ctc	tac	aga	gac	901
211	P	A	S	D	I	P	K	Q	A	R	Q	L	Y	R	D	225
902	aac	tgg	tta	cgg	cta	att	ccg	gat	gtg	gac	tat	caa	cca	gta	gct	946
226	N	W	L	R	L	I	P	D	V	D	Y	Q	P	V	A	240
947	ttg	ctc	ccc	cac	cac	aac	ccc	gta	act	aac	caa	ccc	aca	gat	tta	991
241	L	L	P	H	H	N	P	V	T	N	Q	P	T	D	L	255
992	agt	cac	tcg	gta	ctc	cgc	agc	gtt	tcg	ccg	tta	cac	att	gaa	tat	1036
256	S	H	S	V	L	R	S	V	S	P	L	H	I	E	Y	270
1037	ttg	cac	aat	atg	gga	gtg	aaa	gca	tca	atg	tca	att	tca	ctc	ctc	1081
271	L	H	N	M	G	V	K	A	S	M	S	I	S	L	L	285
1082	aaa	aat	caa	aaa	ctc	tgg	gga	ttg	att	gct	tgt	cac	cac	gaa	tcg	1126
286	K	N	Q	K	L	W	G	L	I	A	C	H	H	E	S	300
1127	ccc	aag	tat	gta	ccc	tat	gaa	atc	cg	agc	gct	tgc	gaa	ttt	ctg	1171
301	P	K	Y	V	P	Y	E	I	R	S	A	C	E	F	L	315
1172	ggg	caa	atg	act	tct	cta	gaa	cta	gcc	gca	aaa	gaa	gac	agc	gag	1216
316	G	Q	M	T	S	L	E	L	A	A	K	E	D	S	E	330
1217	aac	act	gaa	tat	aag	atg	cag	tta	aaa	gct	gta	cag	tcc	aag	cta	1261
331	N	T	E	Y	K	M	Q	L	K	A	V	Q	S	K	L	345
1262	gtg	gaa	tac	atg	gcg	gcg	gcg	aac	aat	ttt	gtt	gac	ggg	ttg	atc	1306
346	V	E	Y	M	A	A	A	N	N	F	V	D	G	L	I	360
1307	ggc	caa	gaa	ccc	aat	tta	cta	gat	tta	gta	aat	gct	aca	ggc	gcg	1351
361	G	Q	E	P	N	L	L	D	L	V	N	A	T	G	A	375
1352	gct	gtt	tgt	att	aac	ggc	gag	tac	caa	acc	ttg	ggg	aga	acg	cca	1396
376	A	V	C	I	N	G	E	Y	Q	T	L	G	R	T	P	390
1397	cag	cat	cga	gaa	att	gag	caa	tta	att	aac	tgg	ctg	agt	cag	cat	1441
391	Q	H	R	E	I	E	Q	L	I	N	W	L	S	Q	H	405
1442	acc	caa	gaa	gag	gtt	ttt	cat	aca	aat	tgc	ctg	tct	gag	ttg	ctg	1486
406	T	Q	E	E	V	F	H	T	N	C	L	S	E	L	L	420
1487	cca	gag	gct	agc	gag	tgg	aaa	gat	gtt	gct	agt	ggg	tta	atg	gcg	1531
421	P	E	A	S	E	W	K	D	V	A	S	G	L	M	A	435
1532	ctg	tca	att	tct	aaa	agc	caa	aaa	agt	tat	tta	ctt	tgg	ttc	cgc	1576
436	L	S	I	S	K	S	Q	K	S	Y	L	L	W	F	R	450
1577	cca	gag	gca	ttg	caa	act	gta	gat	tgg	gca	gga	aat	cct	cat	aag	1621
451	P	E	A	L	Q	T	V	D	W	A	G	N	P	H	K	465
1622	cct	gta	gaa	cta	gca	gat	gat	ggc	agt	tta	cgg	ctg	tca	ccc	cgc	1666
466	P	V	E	L	A	D	D	G	S	L	R	L	S	P	R	480
1667	aaa	tcc	ttt	gat	ttg	tgg	aaa	gaa	ata	gtg	cag	cga	caa	tct	cta	1711
481	K	S	F	D	L	W	K	E	I	V	Q	R	Q	S	L	495
1712	ccc	tgg	gaa	agc	tat	gaa	ata	gaa	gct	gta	tgg	aat	ttt	cg	agt	1756
496	P	W	E	S	Y	E	I	E	A	V	W	N	F	R	S	510
1757	gcg	att	gtg	ggt	gtg	gtg	ttg	cg	aaa	gcc	gat	gaa	ctg	gca	aag	1801
511	A	I	V	G	V	V	L	R	K	A	D	E	L	A	K	525
1802	atg	aat	gta	gaa	ctg	cag	cg	agc	aac	gat	gaa	tta	gat	gcc	ttt	1846
526	M	N	V	E	L	Q	R	S	N	D	E	L	D	A	F	540
1847	gct	tat	att	gcc	tcc	cat	gat	ttg	aag	gaa	cca	ctg	cg	ggt	att	1891
541	A	Y	I	A	S	H	D	L	K	E	P	L	R	G	I	555
1892	cat	cat	tac	tcc	agt	ttt	ctg	atc	gaa	gac	tac	ggc	aat	aga	tta	1936
556	H	H	Y	S	S	F	L	I	E	D	Y	G	N	R	L	570
1937	gat	gac	gaa	ggc	ata	gga	agg	ctg	agg	acg	ctg	att	aga	ctc	aca	1981
571	D	D	E	G	I	G	R	L	R	T	L	I	R	L	T	585
1982	cag	cg	atg	gaa	aat	tta	atc	gat	tcg	ctg	ttg	cac	ttc	tct	cg	2026
586	Q	R	M	E	N	L	I	D	S	L	L	H	F	S	R	600
2027	tta	ggg	cga	gta	gaa	cta	ggt	att	cag	cct	aca	gac	tta	aac	gat	2071
601	L	G	R	V	E	L	G	I	Q	P	T	D	L	N	D	615

2072	tta	gtg	cag	cga	gtt	ata	gat	gtg	ctg	agt	gcc	aga	att	caa	gaa	2116
616	L	V	Q	R	V	I	D	V	L	S	A	R	I	Q	E	630
2117	aca	ggg	gca	aca	att	cgg	att	ccg	cgt	cct	ttg	cca	aca	att	atg	2161
631	T	G	A	T	I	R	I	P	R	P	L	P	T	I	M	645
2162	tgc	gat	cgc	gtc	cag	gtt	agc	gct	atc	ttt	acc	aat	ctc	att	gct	2206
646	C	D	R	V	Q	V	S	A	I	F	T	N	L	I	A	660
2207	aac	ggt	att	aaa	tat	aac	gac	aag	cca	gaa	att	tgg	gta	gaa	atc	2251
661	N	G	I	K	Y	N	D	K	P	E	I	W	V	E	I	675
2252	ggc	tat	cta	gag	cca	att	acc	ctc	tac	gtg	cgc	gac	aac	ggc	att	2296
676	G	Y	L	E	P	I	T	L	Y	V	R	D	N	G	I	690
2297	ggc	att	cgc	gat	cgc	cac	ttt	gaa	tca	att	ttc	cgc	atc	ttt	aaa	2341
691	G	I	R	D	R	H	F	E	S	I	F	R	I	F	K	705
2342	cgg	cta	cat	ggc	cct	acg	caa	tat	ggc	ggt	ggt	acg	ggt	gca	ggg	2386
706	R	L	H	G	P	T	Q	Y	G	G	G	T	G	A	G	720
2387	cta	acc	atc	gcg	aaa	aaa	gtt	gtc	gaa	agg	cat	ggt	ggt	aag	att	2431
721	L	T	I	A	K	K	V	V	E	R	H	G	G	K	I	735
2432	tgg	gtt	gaa	tcc	act	tat	ggg	gaa	gga	agt	acg	ttc	tat	ttc	aca	2476
736	W	V	E	S	T	Y	G	E	G	S	T	F	Y	F	T	750
2477	ttg	cag	gag	gtc	aaa	<u>taa</u>										2521
751	L	Q	E	V	K	*										
2478						<u>taag</u>	caa	<u>atg</u>	gta	gga	aac	gct	act	caa	ccg	2522
1								M	V	G	N	A	T	Q	P	8
2523	ttg	cta	gta	gtt	gaa	gac	agc	gat	gaa	gac	ttt	agc	act	ttt	cag	2567
9	L	L	V	V	E	D	S	D	E	D	F	S	T	F	Q	23
2568	cga	ttg	ttg	cag	cga	gaa	ggt	gta	gtc	aat	ccc	ata	tat	cgc	tgt	2612
24	R	L	L	Q	R	E	G	V	V	N	P	I	Y	R	C	38
2613	atc	acg	ggc	gat	caa	gcc	tta	gat	ttt	ctc	tat	caa	acc	gga	tct	2657
39	I	T	G	D	Q	A	L	D	F	L	Y	Q	T	G	S	53
2658	tat	tgc	aac	ccg	gat	atc	gcc	cct	cgc	cct	gca	gtg	att	ttg	ctg	2702
54	Y	C	N	P	D	I	A	P	R	P	A	V	I	L	L	68
2703	gat	ttg	aat	tta	cca	gga	act	gat	ggg	cgg	gaa	gtc	ttg	caa	gaa	2747
69	D	L	N	L	P	G	T	D	G	R	E	V	L	Q	E	83
2748	att	aaa	cag	gat	gaa	gtg	tta	aag	aaa	att	cct	gtt	gtc	ata	atg	2792
84	I	K	Q	D	E	V	L	K	K	I	P	V	V	I	M	98
2793	aca	acc	tct	tct	aat	cct	aaa	gat	ata	gaa	att	tgt	tac	tct	tac	2837
99	T	T	S	S	N	P	K	D	I	E	I	C	Y	S	Y	113
2838	tct	att	agt	agt	tat	att	gtt	aag	ccc	cta	gag	ata	gat	cgf	ctc	2882
114	S	I	S	S	Y	I	V	K	P	L	E	I	D	R	L	128
2883	acc	gag	acg	gtt	cag	aca	ttc	atc	aaa	tat	tgg	ttg	gat	att	gtt	2927
129	T	E	T	V	Q	T	F	I	K	Y	W	L	D	I	V	143
2928	gta	ctt	cct	gag	atg	ggt	<u>taa</u>	gta	agg	cgf	aac	tat	gct	cca	gca	2972
144	V	L	P	E	M	G	*									149
2973	tac	tgt	ttt	gat	tgt	tga	tga	ctg	ccc	tga	aga	ccg	gga	aat	ata	3017
3018	tcg	tcg	cta	ttt	agc	gag	cga	tcg	cct	aca	cag	cta	tac	cat	cct	3062
3063	aga	aga	aga	gtt	agg	tga	gcc	agc	act	agc	ttt					3095

# 5.2 Alignment

Dies ist das dem Baum in Abb. 3.1.1 zugrundeliegende Alignment.

		10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	
phy0_Ceratodon purpureum	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSAPKKTYSSTTSKSK-----HSVRVAQTTADAALVAVY 35
phy1_Physcomitrella patens	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSTPKKTYSTTSKSKA-----HSVRVAQTTADAALQAVF 36
phy1_Selaginella martensii	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSTTKLYTSSGSSAKSK-----HSVRVAQTTADAKLHAVY 35
phy2_Adiantum capillius veneris	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSKMTYSSAAEPRSSSSSVVSGK--HNRRVVAQTTADAKLHAVF 36
phy_Mesotaenium caldariorum	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSTRMSQSSGESTAKTK-----REVRVQAQADAKLNTAF 46
phy_Mougeotia scalaris	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSSKRSQSSGRSSTQTR-----IQNRVTQASADAKLSTAF 36
phy_Picea abies	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSTTRPRAATHSASSGGVSRSSKHS-----ARV-ITQTPVDAKLQAEF 42
phyN_Pinus sylvestris	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----V--SSQVLVDAKLHGNF 1
phyC_Arabidopsis thaliana	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSNTRSRCSTRSRQNSR-----V--SSQVLVDAKLHGNF 33
phyC_Nymphaea alba	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----V--VAQTFMDAQLHAEF 1
phyC_Oryza sativa	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSSRNRRATCSRSSSARSKHSAR-----V--VAQTFMDAQLHAEF 40
phyC_Saururus cernuus	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----V--VAQTFMDAQLHAEF 1
phy3_Avena sativa	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSSRFPASSSS--RNRQSS-----QARVLAQTTDLDAELNAEY 36
phyA_Zea mais	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSSRFPAHSSSSSRTRQSS-----RARILAQTTDLDAELNAEY 38
phyA_Arabidopsis thaliana	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSGRFPQSSSGSRSSKHS-----ARIQAQTTVDAKLHADP 36
phyA_Solanum tuberosum	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSSRPQSSTTSRSKHS-----ARIIAQTTSDAKLHADP 36
phyA_Petroselinum crispum	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MSSSRFPANSSNPGRANQN-----ARVLLT-LDAKIHADF 35
phyA_Hernandia lychnifera	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----TESMSKAQQYTVDAKLVAVF 71
phyB_Arabidopsis thaliana	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MVSGVGGSGGGRGGGEEPESSSHTFNRRRGGEQASGKTKSLRPRN-----TESMSKAQQYTVDAKLVAVF 71
phyD_Arabidopsis thaliana	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MVS-----GGSKTSGGEAASSGHRSSRHTSAAEQASANKALRSQKQPNHGHTSTNKAQQYTVDAKLVAVF 73
phyB_Ammophila arenaria	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----MENVGKAVTSSSATSNLN-----TGKAIAQYNADAKLMAEF 37
phyE_Ipomoea nil	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MESQSSNRRGGRTSLNQKQNNKNSGLNTSSAANMKNN-----ASKAIAQYNADAKLMAEF 32
phyE_Lycopersicon esculentum	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MGFESSSSAASNKPKQ-----PQKSNIAQYSDAALFADF 35
phyE_Arabidopsis thaliana	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 35
Cpha_PCC7601	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Cpha_Anabaena_PCC7120	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Cphl_Synechocystis_PCC6803	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
CphB_PCC7601	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
CphB_Anabaena_PCC7120	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Bph1_Agrobacterium tumefaciens	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Bph1_Pseudomonas putida	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
BphP_Deinococcus radiodurans	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Bph_Pseudomonas fluorescens	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Bph_Pseudomonas syringae	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Fpr_Rhodospirillum centenum	121	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												MPDRITDDFPFTEQIRGTIDGMGTAEFDALVGAIQVDGSGVHYRNYRTESSRLSGRIPEVIGRNFTEVAPCTNIPAFSGRPMQVTSGLTDAQDFVDFQMAPVRVQIRMQNAGVP 120
Bph2_Agrobacterium tumefaciens	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Bph2_Pseudomonas putida	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Rhizobium leguminosarum	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
BrBph_Bradyrhizobium sp.	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Bphy_Pseudomonas aeruginosa	1	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
Clustal Consensus		..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....												-----PQKSNIAQYSDAALFADF 1
		130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	
phy0_Ceratodon purpureum	36	EMSGDSGDS---FDYSKSVGQS---AESVPAGA-VTAYLQRMQRGGLIQTFGCMVAEEPNFCVIAYSENASEFFDLMPQAVPSMG-----EMDVLGIGDITRLTFLPSSG 134												
phy1_Physcomitrella patens	37	EKSGDSGDS---FDYSKSVKST---AESLPSGA-VTAYLQRMQRGGLIQTFGCMVAEEGNFCVIAYSENAEFLDLMPQAVPSMG-----EMDVLGIGDITRLTFLPSSG 136												
phy1_Selaginella martensii	36	EEGSGSGDS---FDYSKSNATK---STGETIPAQA-VTAYLQRMQRGGLVQPPGCMVAEEGFRVIAFSNAGEMLDLMQVSPVSLGS-----GQDVLITGTDARTLFT-AAA 138												
phy2_Adiantum capillius veneris	47	EQAQSEGDGTGGSSFDYMRSIDEDAGSVLSEKVPQA-VTAYLQRMQRGGLIQTFGCMVAEEGFRVIAFSNAGEMLDLMQVSPVSG-----VQVVLGIGDITRLTFLPSSG 155												
phy_Mesotaenium caldariorum	37	EASAAVGG---SFDYTKSVGASLNAG-SEALPSSA-VTAYLQRMQRGGLIQTFGCMVAEEGFRVIAFSNAGEMLDLMQVSPVSG-----QQSLIAGVDITRLTFLTASV 139												
phy_Mougeotia scalaris	37	EVSSSSGGD---SFDYTKSVTASLNP---TEPLAAS-VTAYLQRMQRGGLIQTFGCMVAEEGFRVIAFSNAGEMLDLMQVSPVSG-----HQNALGIGDITRLTFLPSSV 139												
phy_Picea abies	43	EGSVHS---FDYTKSIDISGD---SSVPSSET-VKAYLQRLQKMLIQPFPGCLVAEEGSCAVVGYSENAPEMLTVMSHAVPSVSG-----BHPVLGIGDITRLTFLPSSG 151												
phyN_Pinus sylvestris	1	-----FDYTKSIDISGD---SSVPSSET-VKAYLQRLQKMLIQPFPGCLVAEEGSCAVVGYSENAPEMLTVMSHAVPSVSG-----BHPVLGIGDITRLTFLPSSG 151												
phyC_Arabidopsis thaliana	34	EESERL---FDYASINLAM-PSSSCEIPSSA-VSTYLQRIQRGMLIQPFPGCLVAEEGSKLVIAFSENTQEMGLIHPHTVPSME-----QREALTIGDITRDLKSLSPGC 133												
phyC_Nymphaea alba	1	-----FDYASINLAM-PSSSCEIPSSA-VSTYLQRIQRGMLIQPFPGCLVAEEGSKLVIAFSENTQEMGLIHPHTVPSME-----QREALTIGDITRDLKSLSPGC 133												
phyC_Oryza sativa	41	EGSQRH---FDYSSVVG---AANRSGATTSN-VSAYLQRMQRGFVQPFPGCLLVAHPETFALLAYSENAEMLDLPVAVPTID-----QREALVAGDITRDLKSLSPGC 137												
phyC_Saururus cernuus	1	-----FDYSSVVG---AANRSGATTSN-VSAYLQRMQRGFVQPFPGCLLVAHPETFALLAYSENAEMLDLPVAVPTID-----QREALVAGDITRDLKSLSPGC 137												
phy3_Avena sativa	37	EEGSDS---FDYSKLVAEQRDGPVQGRSEK-VIAYLQHIQKGLIQTGFCLLALDEKSFNVIASFENAPEMLTVMSHAVPSVD-----DPPRLGIGDITRDLKSLSPGQA 137												
phyA_Zea mais	39	EEGSDS---FDYSKLVAEQRSTFPQGRSGK-VIAYLQHIQKGLIQTGFCLLALDEKSFNVIASFENAPEMLTVMSHAVPSVD-----DPPRLGIGDITRDLKSLPDTGPA 139												
phyA_Arabidopsis thaliana	37	EEGSSS---FDYSTSVRVTGFPVENQPRSDKVTITLHIIQKGLIQTGFCLLALDEKFKVIAFSNASELLTMAHSHAVPSVSG-----BHPVLGIGDITRDLKSLPDTGPA 138												
phyA_Solanum tuberosum	37	EEGSDS---FDYSSSVRVTNVAEGEQPKSPKDTTAYLQHIQKGFQIQTGFCLLALDEKFKVIAFSNAPEMLTVMSHAVPSVSG-----BHPVLGIGDITRDLKSLPDTGPA 138												
phyA_Petroselinum crispum	36	EEGNS---FDYSSSVRVTSAVGENSSIQNKLTAYLHIIQKGLIQTGFCLLALDEKSKVIMAYSENAPEMLTVMSHAVPSVSG-----BHPVLGIGDITRDLKSLPDTGPA 137												
phyA_Hernandia lychnifera	1	-----FDYSSSVRVTSAVGENSSIQNKLTAYLHIIQKGLIQTGFCLLALDEKSKVIMAYSENAPEMLTVMSHAVPSVSG-----BHPVLGIGDITRDLKSLPDTGPA 137												
phyB_Arabidopsis thaliana	72	EQSGESGKS---FDYSQSLKTTTYG---SSVPEQITAYLSRIQRGGYIQTGFCMLVADESSFRIGYSENAREMLGIMQVSPVTTLE-----KPEITLGMTDTRDLKSLPSSS 172												
phyD_Arabidopsis thaliana	74	EQSGESGKS---FDYSQSLKTPYD---SSVPEQITAYLSRIQRGGYIQTGFCMLVADESSFTIIGYSENAREMLGIMQVSPVSIED-----KSEVLTIGDITRDLKSLPSSSY 175												
phyB_Ammophila arenaria	1	-----FDYSQSLKTTTYG---SSVPEQITAYLSRIQRGGYIQTGFCMLVADESSFRIGYSENAREMLGIMQVSPVTTLE-----KPEITLGMTDTRDLKSLPSSS 172												
phyE_Ipomoea nil	38	EQSRESGKS---FDYSRSVTHAQ---NVTEEMTAYLSRIQRGGYIQTGFCMLVAEEPSFKIVGSENCFDILLGLKSGVPEPPER-----MSLIGDITRDLKSLPSSS 133												
phyE_Lycopersicon esculentum	63	EQSSVSGKS---FDYSKSVLFPFH---EANEKEITSYLSRIQRGGYIQTGFCMLVAEEPTFKIIGYSENCFDMLGFKP---TKMK-----LGLIGDARNLFTPSSG 155												
phyE_Arabidopsis thaliana	36	AQSYITGKS---FNYKSVISPPN---HVPDEHITAYLSRIQRGGYIQTGFCMLVAEEPSFRILGLSDNSSFDFGLLSPSTSHSGE-----FKVKVGLIGDITRDLKSLPSSG 137												
Cpha_PCC7601	1	-----MVEFEQAQSNVNSLKEAIAHVCSSQIQPHGVLVLEPELNLQISSNTWSVFGILPEVDLQ-K-----KLEDLDPFQI 74												
Cpha_Anabaena_PCC7120	1	-----MRIDVESQINVTSLKEAIAHLSVCSQIQPHGVLVLEPELNLQISSNTWSVFGILPEVDLQ-K-----KLEDLDPFQI 74												
Cphl_Synechocystis_PCC6803	1	-----MATTVQLSDQLSRLQETLAITHLHIIQPHGLVVLQEPDLTISQISANCTGILGRSPEDLIG-R-----TLGEVDFSPQI 74												
CphB_PCC7601	1	-----VLSLSPNSFENAIAPFEVDLNCNDREP IHIIPGSIQPHGMLLALTEPELTIQVSRNTDIELGVAATEFLN-Q-----PLSLDLAQI 83												
CphB_Anabaena_PCC7120	1	-----MNINDITPPQVLDNSCSKEP IHIIPGSIQPHGMVLLVQEPDLTILQVSNNTFNILGRHPEQLLN-Q-----HLSCLLEAEQL 76												
Bph1_Agrobacterium tumefaciens	1	-----MSSHTPLKDSGCAEP IHIIPGAIQPHGALLVLSAREFVSVQASDNLANYG------VDLPFGAVAT 60												
Bph1_Pseudomonas putida	1	-----MTADNSLADAMERCAQEP IQVPGSIQPHGVLVLDATDLRVLQASENVEHMLGLPARELIGCH-----FADLVHEGFDL 74												
BphP_Deinococcus radiodurans	1	-----MSRDLPLFPFVYLGQPEITTECNEREP IHIIPGSIQPHGALLVLDGHSSEVLSQSLNAATFLGQEPVLRG-----QTIALALP 79												
Bph_Pseudomonas fluorescens	1	-----MNPQKDEAPELLANCADEP IFRPFGAIQPHGLLLTSEPDLSITIQISANVETLLARPAQELIG-Q-----PLQSLIGDAHA 75												
Bph_Pseudomonas syringae	1	-----MFRALARSRGTMASQLDKDAFEVLLANCADEP IQFPGAIQPHGLLLTSEPELTIQVSNVQSVLGVDPDQAG-Q-----TLDCVLGAGWA 88												
Fpr_Rhodospirillum centenum	121	DRYWFVVKLEDLRPPGPAEAPAHTASVTEGVDFVDFSCQEDIRRVGAIQPHGVALVLDPRDVTWCAASDNQAQLDLCARPLG-R-----PLGEVLDAGPL 218												
Bph2_Agrobacterium tumefaciens	1	-----MASTDYHVDLNCNDREP IHIIPGSIQPHGCLLACDNAMRMLRHSNCEGELLGLEG-DLNG-R-----KAEVLDGKLV 70												
Bph2_Pseudomonas putida	1	-----MTYNQVNLNCNDREP IQIPGSIQPHGCLLACDASATVLRHSVNAQMLGVAN-DING-Q-----TLHVLGDEVT 70												
Rhizobium leguminosarum	1	-----MSGTHEPVDLNCNDREP IHIIPGSIQPHGVLVLAAS-SDNVIRASANLAEFLGTEANALG-R-----PVRSLISPEAL 71												
BrBph_Bradyrhizobium sp.	1	-----MPVLETTAPFAGHTLANCEREGIHLASGIQPHGILLAVKEPDMNVVQASINAAEFLNIN--SVVG-R-----PLRDLGDLAL 75												
Bphy_Pseudomonas aeruginosa	1	-----MTSITPVTLANCEDEP IHPVGAIQPHGALVTLR-ADGMVLAASENIQALLGFVAP--SSVVG-R-----GSYLTQEQV 64												
Clustal Consensus		-----MTSITPVTLANCEDEP IHPVGAIQPHGALVTLR-ADGMVLAASENIQALLGFVAP--SSVVG-R-----GSYLTQEQV 64												

Abbildung 5.2.1: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil

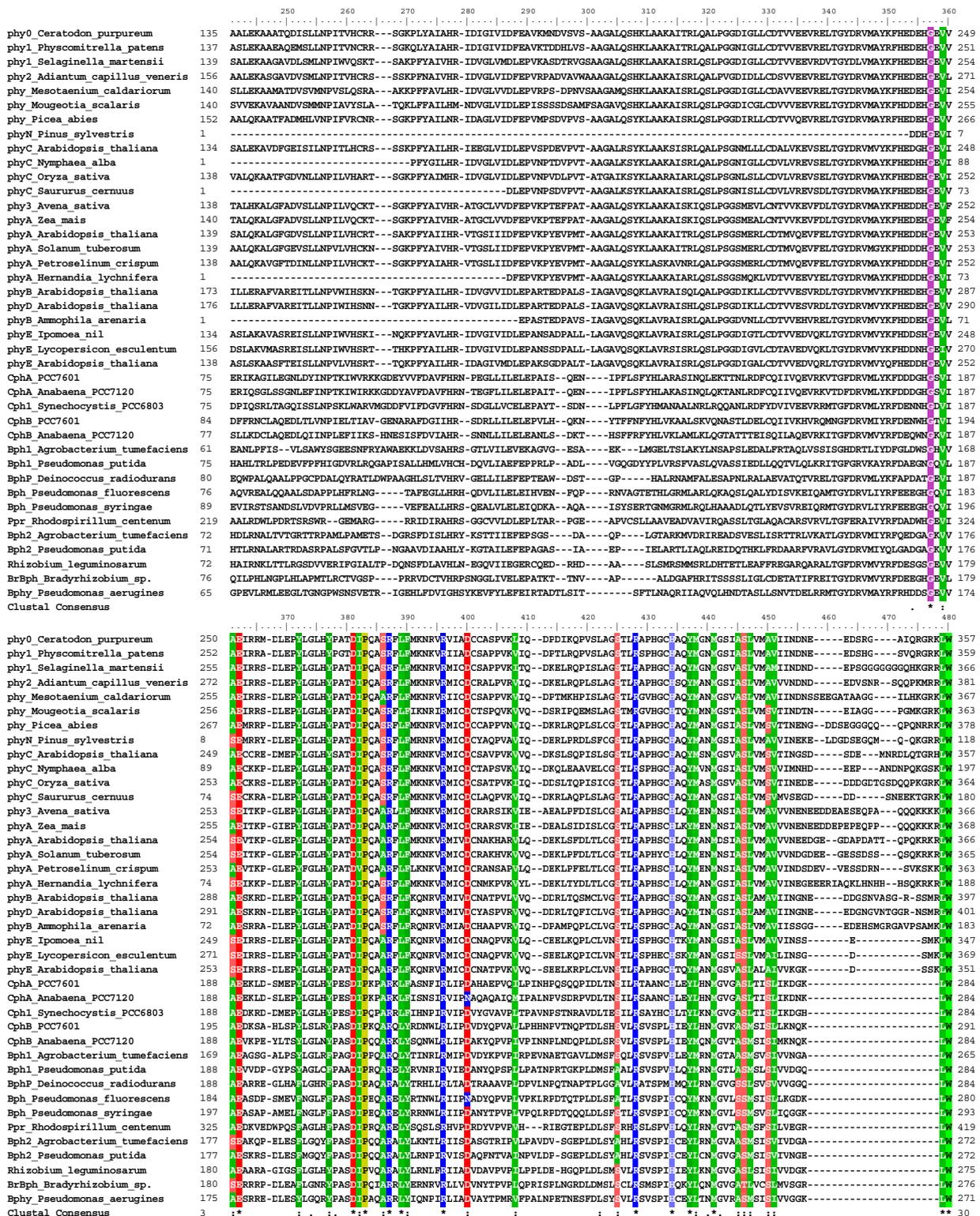


Abbildung 5.2.2: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 2 (Chromophorbindestelle)

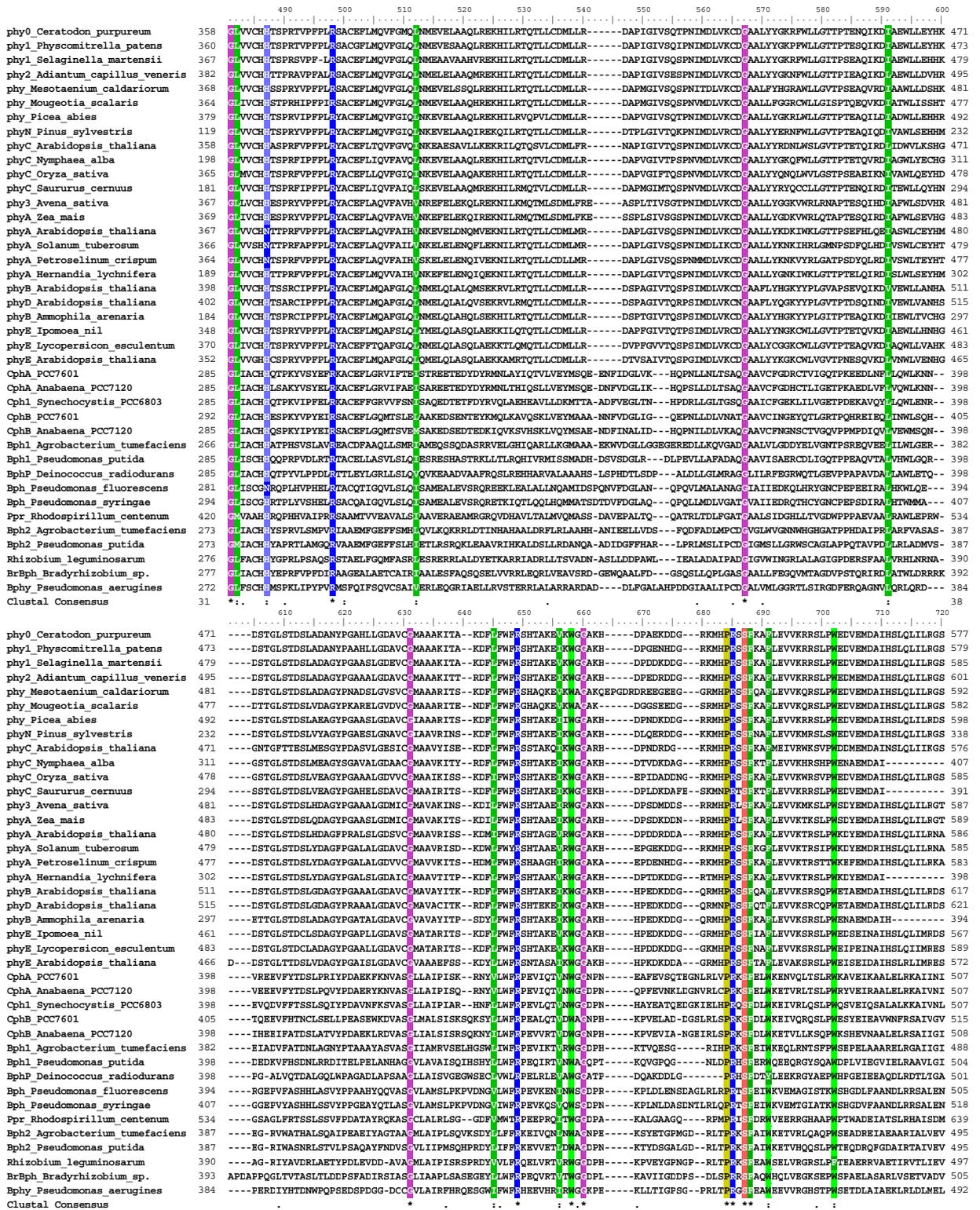


Abbildung 5.2.3: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 3



	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
phy0 Ceratodon purpureum	803	LKSGD	SMTKFMI	LNAMDMGT	-NTDKF	SPFCN	REKGV	VEALL	STNKR	NTADG	VITGV	FCFLQ
phy1 Physcomitrella patens	805	MKSQD	AMTKFMI	LNAMDMGT	-STDKF	SPFCN	REKGV	VEALL	STNKR	NTADG	VITGV	FCFLQ
phy1 Selaginella martensii	811	LKQD	AVTKFMI	LNAMDMGT	-DTEK	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD	B
phy2 Adiantum capillus veneris	827	LRQD	SMTKFMI	LNAMDMGT	-DSDR	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD	B
phy Mesotaenium caldariorum	823	LRGSD	GLTKFMI	LNAMDMGT	-DTEK	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD	B
phy Mougeotia scalaris	805	LKNV	GLTKFMI	LNAMDMGT	-DTEK	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD	B
phy Picea abies	823	LKGQ	GLTKFMI	LNAMDMGT	-DTEK	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD	B
phyN Pinus sylvestris	562	LKGN	ALTKFMI	LNAMDMGT	-ETEK	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD	B
phyC Arabidopsis thaliana	798	LKD	HDTLTKL	RIGNAVIS	GGKNI	KEKLL	GFYH	RGDF	IEALL	SANK	RTD	IE
phyC Nymphaea alba	407	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phyC Oryza sativa	814	VKD	HGTLLTKL	SILMNTVIS	GGQ	-DPEK	ILFG	FNTD	GKYES	LMTAT	KRTD	AB
phyC Saururus cernuus	391	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phy3 Avena sativa	812	LKN	DAFVSL	CVLINS	ALAGE	-ETEK	APFG	DFDR	SGKY	IECLLS	ANR	NE
phyA Zea mais	814	LKS	DAFVSL	CVLINS	ALAGE	-EAK	ASFG	DFDR	SGKY	IECLLS	ANR	NE
phyD Arabidopsis thaliana	812	LKN	QEA	FVNL	GIVL	NAVIS	GGQ	-DPEK	ILFG	FNTD	GKYES	LMT
phyA Solanum tuberosum	811	LKN	QEA	FVNL	GIVL	NAVIS	GGQ	-DPEK	ILFG	FNTD	GKYES	LMT
phyA Petroselinum crispum	816	LKS	QEA	FVNL	GIVL	NAVIS	GGQ	-DPEK	ILFG	FNTD	GKYES	LMT
phyA Hernandia lychnifera	398	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phyD Arabidopsis thaliana	844	LKG	PDALTKFMI	VHNAIGG	QDT	-DKFP	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD
phyD Arabidopsis thaliana	848	LKG	PDALTKFMI	VHNAIGG	QDT	-DKFP	FPF	DFDR	RGKY	VEALL	TATK	RAD
phyB Ammophila arenaria	394	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phyE Ipomoea nil	790	LKG	QDALTKFMI	LQYIS	GHDT	-EKL	SFG	DFDR	SGKY	IECLLS	ANR	NE
phyE Lycopersicon esculentum	812	LTG	QDALTKFMI	LQYIS	GHDT	-KFL	FPF	DFDR	SGKY	IECLLS	ANR	NE
phyE Arabidopsis thaliana	790	VKQ	QD	SLTK	IFLS	LYQ	IG	AD	NP	VE	SS	LV
Cpha PC7601	558	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cpha Anabaena PC7120	558	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cph1 Synechocystis_PCC6803	558	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CphB PC7601	566	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CphB Anabaena PC7120	559	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph1 Agrobacterium tumefaciens	538	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph1 Pseudomonas putida	555	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BphP Deinococcus radiodurans	554	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph Pseudomonas fluorescens	552	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph Pseudomonas syringae	565	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Fpr Rhodospirillum centenum	692	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph2 Agrobacterium tumefaciens	577	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph2 Pseudomonas putida	577	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Rhizobium leguminosarum	580	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BrBph Bradyrhizobium sp.	558	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BphY Pseudomonas aeruginosa	532	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clustal Consensus		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1200
phy0 Ceratodon purpureum	921	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phy1 Physcomitrella patens	923	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phy1 Selaginella martensii	929	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phy2 Adiantum capillus veneris	945	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phy Mesotaenium caldariorum	941	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phy Mougeotia scalaris	923	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phy Picea abies	941	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyN Pinus sylvestris	681	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyC Arabidopsis thaliana	917	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyC Nymphaea alba	407	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phyC Oryza sativa	932	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyC Saururus cernuus	391	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phy3 Avena sativa	930	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyA Zea mais	932	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyA Arabidopsis thaliana	920	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyA Solanum tuberosum	924	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyA Petroselinum crispum	929	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyA Hernandia lychnifera	398	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phyB Arabidopsis thaliana	962	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyD Arabidopsis thaliana	966	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyB Ammophila arenaria	394	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
phyE Ipomoea nil	908	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyE Lycopersicon esculentum	928	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
phyE Arabidopsis thaliana	905	QKQ	F	L	T	S	A	V	C	E	Q	L
Cpha PC7601	601	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cpha Anabaena PC7120	601	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cph1 Synechocystis_PCC6803	601	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CphB PC7601	609	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CphB Anabaena PC7120	602	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph1 Agrobacterium tumefaciens	581	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph1 Pseudomonas putida	598	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BphP Deinococcus radiodurans	600	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph Pseudomonas fluorescens	597	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph Pseudomonas syringae	609	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Fpr Rhodospirillum centenum	735	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph2 Agrobacterium tumefaciens	633	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Bph2 Pseudomonas putida	638	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Rhizobium leguminosarum	633	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BrBph Bradyrhizobium sp.	600	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BphY Pseudomonas aeruginosa	572	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Clustal Consensus		---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Abbildung 5.2.5: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 5

	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
phy0_Ceratodon_purpureum	1037	GGNVHVMHLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-MTQE	-----	GLGLNMCCKLVLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1121
phy1_Physcomitrella_patens	1039	GGVHVMHLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-MTQE	-----	GLGLNMCCKLVLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1132
phy1_Selaginella_martensii	1045	GGVHVMHLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-MTQE	-----	GLGLNMCCKLVLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1134
phy2_Adiantum_capillus_veneris	1061	KDGLHIVHFEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-ITQE	-----	GMGLSVSRKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1140
phy_Mesotaenium_caldariorum	1056	PGGITMAHMEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-SQE	-----	GLGLNMCCKLVLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1142
phy_Mougeotia_scalaris	1038	PGGVSANVDFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-SQE	-----	GLGLSICRKLVLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1124
phy_Picea_abies	1056	GGGVNVMHMEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-MFQE	-----	GLGLYMCQQLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1136
phyN_Pinus_sylvestris	796	GGGVYVIGIEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-MSQE	-----	GFGLLICRKLVLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	876
phyC_Arabidopsis_thaliana	1034	KMKRMVLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-TSRE	-----	GLGLHITQKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1111
phyC_Nymphaea_alba	407	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	407
phyC_Oryza_sativa	1048	GSGMQIAHLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-HSPG-ASRE	-----	GLGLYSQKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1137
phyC_Saururus_cernuus	391	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	391
phy3_Avena_sativa	1047	GENLHLIDLRIKHQGLVPAELMAQMFEDNK	-EQSEE	-----	GLSLVSRNLLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1129
phyA_Zea_mais	1049	GENLHLIDLRIKHQGLVPAELMAQMFEDNK	-EQSEE	-----	GLSLVSRNLLRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1131
phyA_Arabidopsis_thaliana	1045	GRSVHLANLEIRLTHGAGIPFLLSQMFGTBE	-DVSEE	-----	GLGLSVSRKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1122
phyA_Solanum_tuberosum	1044	GESVQLALLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-DASEE	-----	GISLLVSRKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1123
phyA_Petroselinum_crispum	1049	GGVSQLVHLEFRVSHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-ETSEE	-----	GISLLVSRKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1129
phyA_Hernandia_lychnifera	398	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	398
phyB_Arabidopsis_thaliana	1077	ADGFAAIRTEFRMACPGEGLPEELVLEMYDRAGK	-SR-WTSPE	-----	GLGLSVCRKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1172
phyD_Arabidopsis_thaliana	1081	ADGFSAVRLEFRMACPGEGLPEELVLEMYDRAGK	-SR-WTSPE	-----	GLGLSVCRKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1164
phyB_Ammophila_arenaria	394	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	394
phyE_Ipomoea_nil	1025	QDGNVYIHLQFRMTHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-WTQE	-----	GVVHLISQKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1115
phyE_Lycopersicon_esculentum	1044	QDGNVYIHLQFRMTHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-WTQE	-----	GIALNVAQKLVRLMN	-GDVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1137
phyE_Arabidopsis_thaliana	1021	RDNRYIHLQFRMTHPGGLPEELVLEMYDRAGK	-WVTPD	-----	GLGLKLSRKLVLRLMN	-GRVYVRENAQCYPVVVVELPMAQRDDAASQ	-----	-----	-----	-----	-----	1112
CphA_PCC7601	673	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	767
CphA_Anabaena_PCC7120	673	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	765
Cph1_Synechocystis_PCC6803	673	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	748
CphB_PCC7601	679	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	755
CphB_Anabaena_PCC7120	676	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	751
Bph1_Agrobacterium_tumefaciens	654	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	736
Bph1_Pseudomonas_putida	671	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	748
BphP_Deinococcus_radiodurans	673	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	755
Bph_Pseudomonas_fluorescens	672	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	745
Bph_Pseudomonas_syringae	684	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	757
Ppr_Rhodospirillum_centenum	811	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	844
Bph2_Agrobacterium_tumefaciens	731	PLKVLVDEQMLIAMVDENLEDNGIKAIETATSSAMAEK	-LKTYPDVAALDINLSDTSIPVARELHRRGIPFLFATGYADGSMVDFGAVFVIRKPYDEDALMAGIGVLVGTEN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	849
Bph2_Pseudomonas_putida	731	GLCVLLELDQVIAVGLQILNDAQIKDVTATSSAQAMQL	-LGSHPKDAALDINLSDTSIPVARELHRRGIPFLFATGYADGSMVDFGAVFVIRKPYDEDALMAGIGVLVGTEN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	847
Rhizobium_leguminosarum	738	GLMNLVVENNIIAMDGEDILR-RLGADVATAPSVTEAMEI	-LAQSFDDLALLDINLSDTSIPVARELHRRGIPFLFATGYADGSMVDFGAVFVIRKPYDEDALMAGIGVLVGTEN	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	855
BrBph_Bradyrhizobium_sp.	677	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	724
Bphy_Pseudomonas_aeruginosa	646	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	728

Abbildung 5.2.6: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 6

Es wurde ClustalX Programmversion 1.8 in den Standardeinstellungen für das Alignment verwendet (Ref. <sup>137</sup>, <sup>193</sup>, <sup>194</sup>). Der Schattierungswert dieses Alignments wurde auf 100% gesetzt, d.h. es sind nur diejenigen Aminosäuren farbig hinterlegt, die in allen Sequenzen homolog bzw. identisch sind. Ähnliche Aminosäuren sind mit einem Punkt, stärker konservierte mit einem Doppelpunkt und identische mit einem Sternchen in der Clustal Konsensus Sequenz markiert.

## 5.2.1 Accession Nummern der verwendeten Proteinsequenzen

<i>Proteinsequenz</i>	<i>Swissprot Accession</i>	<i>Proteinsequenz</i>	<i>Swissprot Accession</i>
<i>Ceratodon purpureum</i> phy0	AAB67863	<i>Physcomitrella patens</i> phy1	P36505
<i>Selaginella martensii</i> phy1	Q01549	<i>Adiantum capillus veneris</i> phy2	BAA33775
<i>Mesotaenium caldariorum</i> phy1b	U31284	<i>Mougeotia scalaris</i> phy	P33529
<i>Picea abies</i> phy	Q40762	<i>Pinus sylvestris</i> phyN	CAC11136
<i>Arabidopsis thaliana</i> phyC	P14714	<i>Nymphaea alba</i> phyC	AAF26345
<i>Oryza sativa</i> phyC	AAF66603	<i>Saurus cernuus</i> phyC	AAF26353
<i>Avena sativa</i> phyA (3)	P06593	<i>Zea mais</i> phyA	P19862
<i>Arabidopsis thaliana</i> phyA	P14712	<i>Solanum tuberosum</i> phyA	P30733
<i>Petroselinum crispum</i> phyA	P55141	<i>Hernandia lychnifera</i> phyA	AAF26332
<i>Arabidopsis thaliana</i> phyB	P14713	<i>Arabidopsis thaliana</i> phyD	P42497
<i>Ammophila arenaria</i> phyB	AAD41277	<i>Ipomoea nil</i> phyE	P55004
<i>Lycopersicon esculentum</i> phyE	AAF25812	<i>Arabidopsis thaliana</i> phyE	P42498
<i>Calothrix PCC7601</i> CphA	AAL76159	<i>Anabaena PCC7120</i> CphA	Q9LCC2
<i>Synechocystis PCC6803</i> Cph1	Q55168	<i>Calothrix PCC7601</i> CphB	AAL76161
<i>Anabaena PCC7120</i> CphA	Q9R6X3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Bph1	AAL42985
<i>Pseudomonas putida</i> Bph1	AAL50632	<i>Deinococcus radiodurans</i> Bph1	Q9RZA4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Bph	AAL50631	<i>Pseudomonas syringae</i> Bph	AAL50634
<i>Rhodospirillum centenum</i> Pph	AF064527	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Bph2	NP_355125
<i>Pseudomonas putida</i> Bph2	AAL50633	<i>Rhizobium leguminosarum</i> Bph	CAC95194
<i>Bradyrhizobium ORS278</i> BrbphP	AAL68700	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bphy	Q9HWR3

**Tabelle 5.2.1A** Swissprot Accession # der verwendeten Proteinsequenzen in der Reihenfolge des Alignments (von links nach rechts, zeilenweise zu lesen).

## 5.3 Primersequenzen

### 5.3.1 Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz 5' -> 3'	#mer	oBQ#
<b>Sequenzierungen von CphA</b>			
phyC seq 1	ggt aga gtg ata ttt aca g	19	oBQ15
phyC seq 2	ggt gtt tgg tga tga caa gc	20	oBQ20
phyC seq 3	ggt ggt aat ccc aat gaa gcg	21	oBQ23
phyC seq 4	gcg ctt aga tat ggg aat cg	20	oBQ18
phyC seq 5	ccc atg acc cct tac caa c	19	oBQ16
phyC seq 6	cat caa tca ggg ttt gca tc	20	oBQ21
phyC seq 7	gca ttt tcg tca tct ttc ag	20	oBQ19
phyC seq 8	gct aga ccc ata cct gta cc	20	oBQ22
<b>Sequenzierungen von RcpA</b>			
rcp1 seq 1	agg tca gga cgt gag gcg	18	oBQ14
rcp1 seq 2	agt cgt gct ctc cac ctc c	19	oBQ17
<b>Sequenzierungen von CphB(m)</b>			
phyL seq 1	atc gtc tgc tga tac tgg	18	oBQ37
phyL seq 2	tag ata atg cgg ctt tca c	19	oBQ38
phyL seq 3	tcc ccc acc aca acc	15	oBQ39
phyL seq 4	taa cgg cga aac gct gc	17	oBQ40
phyL seq 5	tgg atc ggc caa gaa gg	17	oBQ41
phyL seq 6	aag gtt tgg tac tcg ccg	18	oBQ42
phyL seq 7	agt tta cgg ctg tca ccc	18	oBQ43
phyL seq 8	ggt aga gat tgt cgc tgc	18	oBQ44
phyL seq 9	ctg tgg cac tcc tct cgc	18	oBQ45
phyL seq 10	aac tcg ctg cac taa atc g	19	oBQ46
phyL seq 11	cta cat ggc cct acg c	16	oBQ47
<b>Sequenzierungen von RcpB</b>			
lrcp seq 1	atc gct gta tca cgg gc	17	oBQ50
lrcp seq 2	ttt ctt gca aga ctt ccc	18	oBQ51

*Tabelle 5.3.1A Zur Sequenzierung verwendete Primer.*

## 5.3.2 Mutationsprimer

oBQ #	Mutation	Sequenz 5' ->3'	fett = Punktmutation	bp
100	F178A	GAT AGA GTA ATG CTC TAT AAA	<b>GCT</b> GAT GAT GAT GGG CAT GGC TC	44
101	F178A	GAG CCA TGC CCA TCA TCA TCA	<b>GCT</b> TTA TAG AGC ATT ACT CTA TC	44
102	D179A	GAG TAA TGC TCT ATA AAT TTG	<b>CTG</b> ATG ATG GGC ATG GCT CAG TC	44
103	D179A	GAC TGA GCC ATG CCC ATC ATC	AGC AAA TTT ATA GAG CAT TAC TC	44
104	D180A	GCT CTA TAA ATT TGA TGC TGA	TGG GCA TGG CTC AGT C	37
105	D180A	GAC TGA GCC ATG CCC ATC	<b>AGC</b> ATC AAA TTT ATA GAG C	37
106	E189Q	CAT GGC TCA GTC ATA GCT	<b>CAA</b> GAA AAG CTA GAC AGC ATG	39
107	E189Q	CAT GCT GTC TAG CTT TTC	<b>TTG</b> AGC TAT GAC TGA GCC ATG	39
108	D207N	GTT TAC ATT ACC CAG AGT	<b>CAA</b> ATA TTC CTA AAC CAG CAA GAA AG	44
109	D207N	CTT TCT TGC TGG TTT AGG AAT	<b>ATT</b> TGA CTC TGG GTA ATG TAA AC	44
110	P209A	CAT TAC CCA GAG TCA AAT ATT	<b>GCT</b> AAA CCA GCA AGA AAG C	40
111	P209A	GCT TTC TTG CTG GTT TAG	<b>CAA</b> TAT TTG ACT CTG GGT AAT G	40
112	R213I	GAT ATT CCT AAA CCA GCA	<b>ATC</b> AAG CTA TTT GCT TCT AAC TTC	42
113	R213I	GAA GTT AGA AGC AAA TAG CTT	<b>GAT</b> TGC TGG TTT AGG AAT ATC	42
114	L248PQR	GCA AAG TCA ACA ACC AAT TGA	<b>TCV</b> ACT AAC TCA ATT TTG AGA ACC	45
115	L248PQR	GGT TCT CAA AAT TGA GTT AGT	<b>BGA</b> TCA ATT GGT TGT TGA CTT TGC	45
116	S251PA	CAA CCA ATT GAT TTA ACT AAC	<b>SCA</b> ATT TTG AGA ACC GCA GCA	42
117	S251PA	TGC TGC GGT TCT CAA AAT TGS	GTT AGT TAA ATC AAT TGG TTG	42
118	L253PQR	CAA TTG ATT TAA CTA ACT CAA	<b>TTC</b> <b>VGA</b> GAA CCG CAG CAA ATT GC	44
119	L253PQR	GCA ATT TGC TGC GGT TCT	<b>CBG</b> AAT TGA GTT AGT TAA ATC AAT TG	44
120	R254TI	GAT TTA ACT AAC TCA ATT TTG	<b>AYA</b> ACC GCA GCA AAT TGC C	40
121	R254TI	GGC AAT TTG CTG CGG TTR	TCA AAA TTG AGT TAG TTA AAT C	40
122	Y263HQD	CAG CAA ATT GCC ATT TAG AGV	ATT TAC ACA ACA TGG GTA G	40
123	Y263HQD	CTA CCC ATG TTG TGT AAA	<b>TBC</b> TCT AAA TGG CAA TTT GCT G	40
124	N266VADG	CCA TTT AGA GTA TTT ACA	<b>CGN</b> CAT GGG TGT AGG TGC TTC	39
125	N266VADG	GAA GCA CCT ACA CCC ATG	<b>NCG</b> TGT AAA TAC TCT AAA TGG	39
126	M267LR	CAT TTA GAG TAT TTA CAC AAC	<b>CKG</b> GGT GTA GGT GCT TCT	39
127	M267LR	AGA AGC ACC TAC ACC	<b>CMG</b> GTT GTG TAA ATA CTC TAA ATG	39
128	S272PA	CAA CAT GGG TGT AGG TGC	<b>TSC</b> TTT AAC TAT TTC CTT G	37
129	S272PA	CAA GGA AAT AGT TAA AGS	AGC ACC TAC ACC CAT GTT G	37
130	W284RG	CTT GAT TAA AGA TGG CAA ACT	<b>TSG</b> GGG ATT AAT TGC TTG TC	41
131	W284RG	GAC AAG CAA TTA ATC CCC	<b>SAA</b> GTT TGC CAT CTT TAA TCA AG	41
132	G285VE	GAT TAA AGA TGG CAA ACT TTG	<b>GGW</b> ATT AAT TGC TTG TCA TCA C	43
133	G285VE	GTG ATG ACA AGC AAT TAA	<b>TWC</b> CCA AAG TTT GCC ATC TTT AAT C	43
134	C289SA	CTT TGG GGA TTA ATT GCT	<b>KCT</b> CAT CAC CAA ACA CCG	36
135	C289SA	CGG TGT TTG GTG ATG	<b>AGM</b> AGC AAT TAA TCC CCA AAG	36
136	H290RL	GGG GAT TAA TTG CTT GTC	<b>KTC</b> ACC AAA CAC CGA AAT ATG	39
137	H290RL	CAT ATT TCG GTG TTT GGT	<b>GAM</b> GAC AAG CAA TTA ATC CCC	39
142	H260LPR	GAG AAC CGC AGC AAA TTG	<b>CCB</b> TTT AGA GTA TTT ACA CAA CAT G	43
143	H260LPR	CAT GTT GTG TAA ATA CTC	TAA <b>AVG</b> GCA ATT TGC TGC GGT TCT C	43
<b>CphB(m)</b>				
138	L->C	GTA CTC CGC AGC GTT TCG CCG	<b>TGT</b> CAC ATT GAA TAT TTG CAC	42
139	L->C	GTG CAA ATA TTC AAT GTG	<b>ACA</b> CGG CGA AAC GCT GCG GAG TAC	42
140	SPL -> ANC	CAC TCG GTA CTC CGC AGC GTT	<b>GCG AAC TGT</b> CAC ATT GAA TAT TTG CAC AAT ATG G	55
141	SPL -> ANC	CCA TAT TGT GCA AAT ATT CAA	TGT <b>GAC AGT TCG</b> CAA CGC TGC GGA GTA CCG AGT G	55
144	H->L,P,R	GGT ACT CCG CAG CGT TTC	GCC GTT <b>ACB</b> CAT TGA ATA TTT GCA CAA TAT GG	50
145	H->L,P,R	CCA TAT TGT GCA AAT ATT CAA	<b>TGV</b> GTA ACG GCG AAA CGC TGC GGA GTA CC	50
144-2	H->T, A	CAC TCG GTA CTC CGC AGC GTT	TCG CCG TTA <b>RCC</b> ATT GAA TAT TTG CAC AAT ATG G	55
145-2	H->T, A	CCA TAT TGT GCA AAT ATT CAA	<b>TGG YTA</b> ACG GCG AAA CGC TGC GGA GTA CCG AGT G	55
<b>CphA wdh</b>				
114-2	L248PQR	GCA AAG TCA ACA ACC AAT TGA	<b>TCV</b> AAC TAA CTC AAT TTT GAG AAC C	46
115-2	L248PQR	GGT TCT CAA AAT TGA GTT AGT	<b>TBG</b> ATC AAT TGG TTG TTG ACT TTG C	46
122-2	Y263HQD	CGC AGC AAA TTG CCA TTT AGA	<b>GVA</b> TTT ACA CAA CAT GGG TGT AG	44
123-2	Y263HQD	CTA CAC CCA TGT TGT GTA AAT	<b>BCT</b> CTA AAT GGC AAT TTG CTG CG	44
<b>CphBm wdh</b>				
138-2	L->C	CAC CTG GTA CTC CGC AGC GTT	TCG CCG <b>TGT</b> CAC ATT GAA TAT TTG CAC AAT ATG G	55

**Tabelle 5.3.2A** Zur SDM eingesetzte Primer. Die Abweichung von der Wildtypsequenz ist in **fett** angegeben. Zur erfolgreichen Mutation wurden, wenn vorhanden, die Primer aus den Serien Wdh gewählt. Wobble-Basen nach IUPAC.

## 5.4 Peakliste des Proteinverdaus von CphB(cy)

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
MGSSHHHHHHH SSSLVPRGRSH MVSEFQAQSI NVNSLKEAAI HVCSQIQPHG VLLVLGEPPEL NILQISSNTW SVFGILPEDV LQKKLEDLLD PFQIERIKAG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
ILEGNLDYIN PTKIWRKKG DEYVVFDAVF HRNPEGLLIL ELEPAISQEN IPPLSFYHLA RASINQLEKT TNLDRFCQII VQEVKVTGF DRVMLYKFFD

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
DGHGSVIAEE KLDSEMEPYLG LHYPESDIPK PARKLFASNF IRLIPDAHAE PVQILPINHP QSQQPIDLTN SILRTAANCH LEYLHNMVG V ASLTISLIKD

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
GKLWGLIACH HQTPKYVSYE FRKACEPLGR VIFTEISTRE ETEDYDYRMN LAYIQTVLVE YMSQEEFNID GLVKHQPNLL NLTSQAQAAV CFGDRCTVIG

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
QTPKEEDLNF LLQWLKNNVR EEVFTYDLSL RIYPDAEKFK NVASGLLAIP ISKRNYVLWF RPEVIQTVNW GGNPNEAFEV SQTEGNLRLV PRKSFELWKE

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
NVQLTSLRWK AVEIKAAL EL RKAINIVL R QADELAQLAH DLERSNAELK KFAYVASHDL QEPLNQVANY VQLEMMRYEN ELDEDAKEFI NFAVEGVSLM

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
QTLIDDLVLA SKVDMQASAF QLTEVETPLN RLSLNLGRRI HETGAMITHD PLPTVMADST QLMQLFNLI ANAIKFRSEQ PPKIHIGAER LEDEWLFSVQ

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
710     720     730     740     750     760     770     780
DNGIGLEPRF SDRIFVIFQR LHTR EEPYPT GMGLAICKKI IECHRGR I W ESQLGEGATF YFTIPVGGRE RERRNGRQTQ KDLFGRG

```

**Text 1A CphAcy:** Diese Sequenz wurde für den theoretischen Trypsinverdau (siehe Tabelle unten) herangezogen.

Masse	Position	#MC	Peptidsequenz	ID
5444.889	27-76	1	EPIHIPGSIQPHGMLLALTE PELTIVQVSRNTDEILGVAA TEFINQPLSR	-
5390.811	230-277	1	LIPVDVYQPVALPHHPVT NQPTDLSHSVLRSVSPHLIE YLHNMGVK	-
5353.639	394-440	1	EIEQLINWLSQHTQEEVFHT NCLSELLPEASEWKDVASGL MALSISK	-
5256.620	345-393	1	LVEYMAAANNFVDGLIGQEP NLLDLVNATGAAVCINGEYQ TLGRTPQHR	-
5150.592	340-388	1	AVQSKLVEYMAAANNFVDGL IGQEPNLLDLVNATGAAVCI NGEYQTLGR	-
4700.284	389-427	1	TPQHREIEQLINWLSQHTQE EVFHTNCLSELLPEASEWK	-
4637.301	345-388	0	LVEYMAAANNFVDGLIGQEP NLLDLVNATGAAVCINGEYQ TLGR	-
4379.369	649-686	1	VQVSAIFTNLIANGIKYNDK PEIWEIGYLEPITLYVR	-
4277.163	18-56	1	GSHMTNCDREPIHIPGSIQP HGMLLALTEPELTIVQVSR	-
4270.216	225-261	1	DNWLR LIPVDVYQPVALPH HNPVTNQPTDLSHSVLR	-

Masse	Position	#MC	Peptidsequenz	ID
4234.183	444-480	1	SYLLWFRPEALQTVDWAGNP HKPVVELADDGSLRLSPR	-
4124.099	441-476	1	SQKSYLLWFRPEALQTVDWA GNPVKPVVELADDGSLR	-
4080.965	394-427	0	EIEQLINWLSQHTQEEVFHT NCLSELLPEASEWK	-
4043.091	77-112	1	LLDAQQIDFFRNCLAQEDLT LVNPIELTIAVGENAR	-
3780913	444-476	0	SYLLWFRPEALQTVDWAGNP HKPVVELADDGSLR	-
3605.874	88-120	1	NCLAQEDLTLVNPIELTIAV GENARAFDGI IHR	-
3585.881	230-261	0	LIPVDVYQPVALLPVPHNPVT NQPTDLSSHSLR	-
3534.823	57-87	1	NTDEILGVAATEFINQPLSR LLDAQQIDFFR	-
3435.795	665-693	1	YNDKPEIWVEIGYLEPITLY VRDNGIGIR	-
3275.782	27-56	0	EPIHIPGSIQPHGMLLALTE PELTIVQVSR	j
3118.713	124-148	1	LLILELEPVLHQKNYTFNF YHLVK	-
3080.711	637-664	1	IPRPLPTIMCDRVQVSAIFT NLIANGIK	-
3048594	493-518	1	QSLPWESYEIEAVWNFRSAI VGVVLR	-
2901.270	1-26	1	MGSSHHHHHSSGLVPRGSH MTNCDR	-
2894307	310-335	1	SACEFLGQMTSLELAAKEDS ENTEYK	-
2885.422	185-209	1	FDENWHGTVIAEDKSAHLSP YLSLR	-
2863.394	731-755	1	HGGKIWVESTYEGSTFYFT LQEVK	-
2779.384	488-509	1	EIVQRQSLPWESYEIEAVWN FR	-
2779.336	526-549	1	MNVELQRSNDELDAFAYIAS HDLK	-
2763.312	554-577	1	GIHHYSSFLIEDYGNRLDDE GIGR	-
2754.468	262-286	1	SVSPLHIEYLHNMGVKASMS ISLLK	-
2719.347	303-326	1	YVPYEIRSACEFLGQMTSLE LAAK	-
2710.413	665-686	0	YNDKPEIWVEIGYLEPITLY VR	j
2696.392	88-112	0	NCLAQEDLTLVNPIELTIAV GENAR	j
2663.473	604-627	1	VELGIQPTDLNDLVQRVIDV LSAR	-
2484.197	735-755	0	IWVESTYEGSTFYFTLQEV K	j
2411.233	290-309	1	LWGLIACHHESPKYVPYEIR	-
2404.178	533-553	1	SNDELDAFAYIASHDLKEPL R	-
2403.184	550-569	1	EPLRGIHHYSSFLIEDYGNR	-
2381.279	628-648	1	IQETGATIRIPRPLPTIMCD R	-
2323.118	180-198	1	VMIYRFDENWHGTVIAEDK	-
2244.227	149-169	1	AALSKVQNASTLDELQIIV K	-
2188.124	57-76	0	NTDEILGVAATEFINQPLSR	j
2166.170	154-172	1	VQNASTLDELQIIVKHVR	-
2154.029	493-509	0	QSLPWESYEIEAVWNFR	j
2136.177	601-619	1	LGRVELGIQPTDLNDLVQR	-
2115.123	199-217	1	SAHLSPYLSLRYPASDIPK	-
2073.091	584-600	1	LTQRMENLIDSLHFSR	-
2063.075	137-153	1	NYTFFNFYHLVKAALSK	-
1955.046	706-725	1	RLHGPTQYGGGTGAGLTI AK	-
1927.040	707-726	1	LHGPTQYGGGTGAGLTI AKK	-
1908.897	533-549	0	SNDELDAFAYIASHDLK	j
1907.903	554-569	0	GIHHYSSFLIEDYGNR	j
1903.101	121-136	1	SDRLLILELEPVLHQK	-

Masse	Position	#MC	Peptidsequenz	ID
1901.006	588-603	1	MENLIDSLHFSRLGR	-
1899.889	1-17	0	MGSSHHHHHHSSGLVPR	-
1860.954	287-302	1	NQKLWGLIACHHESPK	-
1842.044	620-636	1	VIDVLSARIQETGATIR	-
1823.947	262-277	0	SVSPLHIEYLHNMGVK (Chromopeptid ohne Chromophor)	j
1809.970	604-619	0	VELGIQPTDLNDLVQR	j
1798.945	707-725	0	LHGPTQYGGGTGAGLTIK	j
1798.871	310-326	0	SACEFLGQMTSLELAAK	j
1773.941	154-169	0	VQNASTLDELQCIIVK	j
1687.974	649-664	0	VQVSAIFTNLIANGIK	j
1660.760	185-198	0	FDENWHGTVIAEDK	j
1634.878	428-443	1	DVASGLMALSISKSQK	-
1614.732	327-339	1	EDSENTEYKMLK	-
1592.790	137-148	0	NYTFFNFYHLVK	-
1574.800	588-600	0	MENLIDSLHFSR	j
1544.941	124-136	0	LLILELEPVLHQQ	j
1529.735	173-184	1	QMNGFDRVMIYR	-
1516.779	520-532	1	ADELAKMVELQR	-
1490.757	290-302	0	LWGLIACHHESPK	-
1420.758	482-492	1	SFDLWKEIVQR	-
1411.755	637-648	0	IPRPLPTIMCDR	-
1365.716	77-87	0	LLDAQQIDFFR	j
1323.721	696-705	1	HFESIFRIK	-
1319.735	278-289	1	ASMSISLLKNQK	-
1291.693	428-440	0	DVASGLMALSISK	j
1286.660	113-123	1	AFDGI IHRSDR	-
1263.659	221-229	1	QLYRDNWLR	-
1259.606	170-179	1	HVRQMNGFDR	-
1245.659	210-220	1	YPASDIPKQAR	-
1243.679	199-209	0	SAHLSPYLSLR	j
1206.601	694-702	1	DRHFESIFR	-
1143.612	570-579	1	LDDEGIGRLR	j
1114.453	327-335	0	EDSENTEYK	-
1041.678	510-519	1	SAIVGVVLRK	-
1032.587	336-344	1	MQLKAVQSK	-
1020.399	18-26	0	GSHMTNCDR	-
1015.528	687-695	1	DNGIGIRDR	-
1000.626	580-587	1	TLIRLTQR	-
988.542	628-636	0	IQETGATIR	j
949.539	278-286	0	ASMSISLLK	j
939.493	303-309	0	YVPYEIR	j
935.473	696-702	0	HFESIFR	j
934.522	218-224	1	QARQLYR	-
928.500	113-120	0	AFDGI IHR	j

Masse	Position	#MC	Peptidsequenz	ID
923.498	481-487	1	KSFDLWK	j
913.583	510-518	0	SAIVGVVLR	j
890.462	210-217	0	YPASDIPK	j
889.456	526-532	0	MNVELQR	j
881.495	727-734	1	VVERHGGK	-
874.426	570-577	0	LDDEGIGR	j
872.520	620-627	0	VIDVLSAR	j
867.378	173-179	0	QMNGFDR	j
795.404	482-487	0	SFDLWK	j
774.436	519-525	1	KADELAK	j
771.520	578-583	1	LRTLIR	-
744.400	687-693	0	DNGIGIR	j
703.352	225-229	0	DNWLR	j
681.375	180-184	0	VMIYR	j
646.341	520-525	0	ADELAK	-
644.373	488-492	0	EIVQR	-
638.337	389-393	0	TPQHR	-
630.393	726-730	1	KVVER	-
600.383	477-481	1	LSPRK	-
579.325	221-224	0	QLYR	-
563.366	703-706	1	IFKR	-
532.309	340-344	0	AVQSK	-
519.296	336-339	0	MQLK	j
517.309	584-587	0	LTQR	-
514.298	550-553	0	EPLR	-
502.335	580-583	0	TLIR	j
502.298	727-730	0	VVER	-

**Tabelle 5.4.1A** Theoretischer Trypsinverdaus.

**Masse:** Monoisotopische Masse des Peptids. **Position:** Aminosäure-Position in der Sequenz von CphAcy (im Textkasten oben). **#MC:** Anzahl der „missed cleavage sites“ Peptide mit einer MC sind blau gekennzeichnet. **ID:** j = in der Massenspektrometrie eindeutig zugeordnete Peptide.

**5.5 Abkürzungsverzeichnis**

Abb	Abbildung
Abs	Absorption
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bphy	Bacteriophytochrom
BSA	bovine serum albumin
BV	Biliverdin IX alpha
CCA	complementary chromatic adaptation
DHBV	Dihydrobiliverdin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat (Mix)
DTT	Dithiothreitol
$\Delta$ Abs	Differenzabsorption
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung (kontextsensitiv)
h	Stunde(n)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazino]-ethansulfonsäure
His(6)-tag	sechs Histidin Peptid Markierung
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid
Kap	Kapitel
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LADS	lifetime associated difference absorption spectroscopy
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{\max}$	Absorptionsmaximum
M	molar (mol/l)
MeCN	Acetonitril
MW	Molekulargewicht
min	Minute(n)
ms	Millisekunde(n)
$\mu$ s	Mikrosekunde(n)
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde(n)
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
P <sub>r</sub>	rotlichtabsorbierende Form von Phytochrom
P <sub>fr</sub>	dunkelrotlichtabsorbierende Form von Phytochrom
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
PCC	Pasteur Culture Collection
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEG	Polyethylenglycol

---

Phy	Phytochrom
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PΦB	Phytochromobilin
Ref	Referenz
RT	Raumtemperatur
rpm	Rotationen pro Minute
s	Sekunde(n)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SAR	specific absorption ratio
SDM	zielgerichtete Punktmutagenese
SDS	Natriumdodecylsulphat
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X100	t-Oktylphenoxy-Polyethoxy-Ethanol
UV	Ultraviolettes Licht
üN	über Nacht
Vol	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-3-Chlor-3-Inoyl-β-D-galactopyranosid

## 5.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Verbreitung verschiedener Photorezeptorsysteme in der belebten Natur.....	2
Abbildung 1.1.1 Pflanzliches Phytochrom A und das Tageslichtspektrum.....	3
Abbildung 1.1.2 Signaltransduktion pflanzlicher Phytochrome (aus 36, modifiziert).....	4
Abbildung 1.2.1 Phylogentischer Stammbaum der Bacteriophytochrome.....	6
Abbildung 1.3.1 Domänenstruktur von Phytochromen aus höheren Pflanzen und Bakterien.....	8
Abbildung 1.3.2 Domänenstruktur der bisher bekannten Phytochrome.....	9
Abbildung 1.3.3 Chromophorbiosynthese, Überblick.....	10
Abbildung 1.3.4 Chromophore und Bindungstypen.....	11
Abbildung 1.3.5 Alignment ausgewählter Pflanzen- und Bacteriophytochrome.....	12
Abbildung 3.1.1 Phylogenetischer Baum.....	57
Abbildung 3.1.2 Alignment verschiedener Bacteriophytochrome (Chromophorbinderegion).....	58
Abbildung 3.2.1 Sekundärstrukturvorhersage der Chromophorbindedomäne von CphA.....	59
Abbildung 3.2.2 3D-Modell der CphA Chromophorbindedomäne.....	60
Abbildung 3.2.3 Mögliche Histidin-Addukte von BV und PCB.....	62
Abbildung 3.3.1 Vektoren zur heterologen Expression (mit N-terminalem His(6)-tag).....	64
Abbildung 3.3.2: Genanfang von CphB auf genomischer Ebene.....	65
Abbildung 3.3.3 Alignment der N-terminalen Sequenzen verschiedener Bacteriophytochrome.....	66
Abbildung 3.3.4 Vektorkarten zur heterologen Expression von CphBm und RepB.....	67
Abbildung 3.3.5 Vektor pPL2.7.....	68
Abbildung 3.3.6 Klonierungsstrategie der pBQ-Konstrukte.....	71
Abbildung 3.4.1 Chromophorbindestellen von CphA und CphB .....	73
Abbildung 3.5.1 CphA nach Ni-NTA Aufreinigung und Umpuffern.....	75
Abbildung 3.5.2 Assemblierungskinetik von CphA mit PCB.....	77
Abbildung 3.5.3 Spektren verschiedener CphA Mutanten, Anmerkungen siehe Text.....	79
Abbildung 3.5.4 Die Mutante M267L. Assemblierungskinetik und biexponentieller Fit.....	80
Abbildung 3.5.5 Die Mutante M267R.....	81
Abbildung 3.5.6 LADS von CphAwt, N266A und N266D.....	83
Abbildung 3.6.1 Spektrale Eigenschaften von CphBm, CphBmLC und CphBm SPL→ANC.....	88
Abbildung 3.6.2 Gelfiltrationslauf von CphBmLC.....	90
Abbildung 3.6.3 CphBm-PCB unter nichtreduzierenden Bedingungen.....	92
Abbildung 3.6.4 CphBm-PCB mit 1mM DTT.....	93
Abbildung 3.6.5 CphBm-BV unter nichtreduzierenden Bedingungen.....	94
Abbildung 3.6.6 Effekt von DTT auf die spektralen Eigenschaften von CphBm-BV.....	96
Abbildung 3.6.7 Zeitlicher Verlauf der Absorption bei $\lambda_{max}$ der Pr-Formen von CphBm-PCB und CphBm-BV.....	97
Abbildung 3.6.8 Apo-CphBmLC, vor und nach Ni-NTA Aufreinigung assembliert.....	100
Abbildung 3.6.9 Einfluß von DTT auf CphBmLC-PCB.....	102
Abbildung 3.6.10 Blockierung von "freigeschaltetem" Apo-CphBmLC durch Gelfiltration.....	104
Abbildung 3.6.11 Einfluß von Reduktionsmitteln auf blockiertes CphBmLC-PCB.....	105
Abbildung 3.6.12 Konversionskinetik CphBmLC.....	105
Abbildung 3.6.13 Konversionsverlauf nach Inkubation über Nacht.....	107
Abbildung 3.6.14 CphBmLC-BV.....	109
Abbildung 3.6.15 "Konversionskinetik" von CphBmLC-BV durch DTT-Zugabe.....	110

Abbildung 3.6.16 Assemblierungskinetik von CphBmLC unter reduzierenden Bedingungen.....	111
Abbildung 3.6.17 Spektren aus den Assemblierungen von CphBmLC und CphA.....	114
Abbildung 3.6.18 Assemblierungsdifferenzspektren von CphA, CphBm und CphBmLC.....	116
Abbildung 3.6.19 Assemblierung von CphBm unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen.....	119
Abbildung 3.6.20 Assemblierung von CphBmLC mit PCB unter verschiedenen Imidazolkonzentrationen.....	120
Abbildung 3.6.21 Zeitlicher Verlauf des Chromophorverlusts aus CphBm und CphBmLC bei verschiedenen Imidazolkonzentrationen.....	123
Abbildung 3.6.22 Effekt von Imidazol auf CphBm-PCB und CphBm-BV.....	124
Abbildung 3.6.23 Effekt von NaCl auf die CphBm-PCB Assemblierungskinetik.....	126
Abbildung 3.6.24 Konversion der CphBm-PCB Pr-Form zur CphBm-BV Pr-Form.....	128
Abbildung 3.6.25 CphBm-PCB vor und nach BV Zugabe.....	129
Abbildung 3.6.26 CphBmLC-BV vor und nach PCB Zugabe.....	131
Abbildung 3.6.27 Spektrale Eigenschaften von CphBm H267A.....	134
Abbildung 3.6.28 Zn <sup>2+</sup> -Gel Analyse.....	136
Abbildung 3.6.29 HPLC-Lauf von CphBm und CphBmLC .....	137
Abbildung 3.7.1 Wachstumskurve von <i>Fremyella diplosiphon</i> pPL9b im 12 Liter Fermenter.....	139
Abbildung 3.7.2 Aufgereinigtes CphBcy.....	140
Abbildung 3.7.3 CphBcy nach Ni-NTA Aufreinigung, Thrombinverdau und Gelfiltration.....	142
Abbildung 3.7.4 Pfr-Stabilität von CphBcy bei 15°C.....	144
Abbildung 3.7.5 Kinetik und Lichtabhängigkeit der Auto- und Transphosphorylierung von CphBcy.....	146
Abbildung 3.7.6 Kinetik der RcpB-Phosphorylierung unter verschiedenen Lichtbedingungen.....	148
Abbildung 3.7.7 Ausschnitt eines MALDI-TOF Spektrums von CphBcy.....	150
Abbildung 3.7.8 LC-Lauf von CphBcy.....	152
Abbildung 3.9.1 CphAcy, verschiedene ankonzentrierte Fraktionen vom Ni-NTA Lauf.....	156
Abbildung 3.10.1 RcpAcy aus homologer Expression nach Ni-NTA Aufreinigung.....	158
Abbildung 4.1: Zusammenfassendes Schema zur Chromophorbindung.....	163
Abbildung 5.2.1: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil1.....	169
Abbildung 5.2.2: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 2 (Chromophorbindestelle).....	170
Abbildung 5.2.3: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 3 .....	171
Abbildung 5.2.4: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 4.....	172
Abbildung 5.2.5: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 5.....	173
Abbildung 5.2.6: Alignment zu Abb. 3.1.1 Teil 6.....	174

## 6. Literaturverzeichnis

- [<sup>1</sup>]Ebrey, T. and Koutalos, Y. (2001) Vertebrate photoreceptors. *Progress in Retinal & Eye Research*, **20**, 49-94.
- [<sup>2</sup>]Kaupp, U.B. and Koch, K.W. (1986) Mechanism of photoreception in vertebrate vision. *TIBS*, **11**, 43-47.
- [<sup>3</sup>]Barinaga, M. (2002) Circadian clock. How the brain's clock gets daily enlightenment. *Science*, **295**, 955-957.
- [<sup>4</sup>]Berson, D.M., Dunn, F.A. and Takao, M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, **295**, 1070-1073.
- [<sup>5</sup>]Hattar, S., Liao, H.W., Takao, M., Berson, D.M. and Yau, K.W. (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, **295**, 1065-1070.
- [<sup>6</sup>]Cashmore, A.R., Jarillo, J.A., Wu, Y.J. and Liu, D.M. (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science*, **284**, 760-765.
- [<sup>7</sup>]Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J. and Dunlap, J.C. (2002) White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science*, **297**, 815-819.
- [<sup>8</sup>]He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H. and Liu, Y. (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science*, **297**, 840-843.
- [<sup>9</sup>]Bieszke, J.A., Spudich, E.N., Scott, K.L., Borkovich, K.A. and Spudich, J.L. (1999) A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry*, **38**, 14138-14145.
- [<sup>10</sup>]Christie, J.M. and Briggs, W.R. (2001) Blue light sensing in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11457-11460.
- [<sup>11</sup>]Briggs, W.R. and Christie, J.M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends. Plant Sci.*, **7**, 204-210.
- [<sup>12</sup>]Lin, C. (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*, **14**, S207-S225.
- [<sup>13</sup>]Sineshchekov, O.A., Jung, K.H. and Spudich, J.L. (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS*, **99**, 8689-8694.
- [<sup>14</sup>]Oesterhelt, D. (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr. Op. Struct. Biol.*, **8**, 489-500.
- [<sup>15</sup>]Hoff, W.D., Jung, K.H. and Spudich, J.L. (1997) Molecular mechanism of photosignaling by archaeal sensory rhodopsins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 223-258.

- [16] Meyer, T.E., Fitch, J.C., Bartsch, R.G., Tollin, G. and Cusanovich, M.A. (1990) Soluble cytochromes and a photoactive yellow protein isolated from the moderately halophilic purple phototrophic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1016**, 364-370.
- [17] Hoff, W.D., Dux, P., Hard, K., Devreese, B., Nugterenroodzant, I.M., Crielaard, W., Boelens, R., Kaptein, R., Vanbeeumen, J. and Hellingwerf, K.J. (1994) Thiol ester-linked p-coumaric acid as a new photoactive prosthetic group in a protein with rhodopsin-like photochemistry. *Biochemistry*, **33**, 13959-13962.
- [18] Hellingwerf, K.J., Hoff, W.D. and Crielaard, W. (1996) Photobiology of microorganisms - how photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol. Microbiol.*, **21**, 683-693.
- [19] Losi, A., Polverini, E., Quest, B. and Gärtner, W. (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys. J.*, **82**, 2627-2634.
- [20] Davis, S.J., Vener, A.V. and Vierstra, R.D. (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science*, **286**, 2517-2520.
- [21] Vierstra, R.D. and Davis, S.J. (2000) Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Sem. Cell. Devel. Biol.*, **11**, 511-521.
- [22] Herdman, M., Coursin, T., Rippka, R., Houmard, J. and Tandeau de Marsac, N. (2000) A new appraisal of the prokaryotic origin of eukaryotic phytochromes. *J. Mol. Evol.*, **51**, 205-213.
- [23] Kehoe, D.M. and Grossman, A.R. (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science*, **273**, 1409-1412.
- [24] Kehoe, D.M. and Grossman, A.R. (1997) New classes of mutants in complementary chromatic adaptation provide evidence for a novel four-step phosphorelay system. *J. Bact.*, **179**, 3914-3921.
- [25] Schmitz, O., Katayama, M., Williams, S.B., Kondo, T. and Golden, S.S. (2000) CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science*, **289**, 765-768.
- [26] Wilde, A., Churin, Y., Schubert, H. and Boerner, T. (1997) Disruption of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 gene with partial similarity to phytochrome genes alters growth under changing light qualities. *FEBS Letters*, **406**, 89-92.
- [27] Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. and Todo, T. (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2353-2362.
- [28] Matthijs, H.C.P., Geerdink, J.H., Balke, H., Haker, A., Schubert, H., Mur, L.R. and Hellingwerf, K.J. (1998) Sensing of green light in complementary chromatic adaptation of the cyanobacterium *Calothrix* sp.: involvement of a rhodopsin? In Peschek, G.A., Löffelhardt, W. and Schmetterer, G. (eds.), *Phototrophic Microorganisms*. Plenum Press, New York.
- [29] Beja, O., Spudich, E.N., Spudich, J.L., Leclerc, M. and DeLong, E.F. (2001) Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, **411**, 786-789.
- [30] Borthwick, H.A., Hendricks, S.B., Parker, M.W., Toole, E.H. and Toole, V.K. (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *PNAS*, **38**, 662-666.

- [<sup>31</sup>]Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W. and Hendricks, S.B. (1959) Detection, assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *PNAS*, **45**, 1703-1708.
- [<sup>32</sup>]Vierstra, R.D. and Quail, P.H. (1982) Native phytochrome: inhibition of proteolysis yields a homogeneous monomer of 124 kilodaltons from *Avena*. *PNAS*, **79**, 5272-5276.
- [<sup>33</sup>]Clack, T., Mathews, S. and Sharrock, R.A. (1994) 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.
- [<sup>34</sup>]Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y. and Wagner, D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science*, **268**, 675-680.
- [<sup>35</sup>]Smith, H. (1995) Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**, 289-315.
- [<sup>36</sup>]Quail, P.H. (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 180-188.
- [<sup>37</sup>]Casal, J.J. (2000) Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants. *Photochem. Photobiol.*, **71**, 1-11.
- [<sup>38</sup>]Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants--an emerging synthesis. *Nature*, **407**, 585-591.
- [<sup>39</sup>]Quail, P.H. (2000) Phytochrome-interacting factors. *Sem. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 457-466.
- [<sup>40</sup>]Moller, S.G., Ingles, P.J. and Whitelam, G.C. (2002) The cell biology of phytochrome signalling. *New Phytol.*, **154**, 553-590.
- [<sup>41</sup>]Kircher, S., Gil, P., Kozma-Bognar, L., Fejes, E., Speth, V., Husselstein-Müller, T., Bauer, D., Adam, E., Schäfer, E. and Nagy, F. (2002) 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**, 1541-1555.
- [<sup>42</sup>]Nagy, F. and Schäfer, E. (2000) Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *EMBO J.*, **19**, 157-163.
- [<sup>43</sup>]Nagy, F. and Schäfer, E. (2000) Control of nuclear import and phytochromes. *Curr. Op. Plant Biol.*, **3**, 450-454.
- [<sup>44</sup>]Gärtner, W. (1997) Das pflanzliche Photorezeptorsystem Phytochrom. *Biologie in unserer Zeit*, **27**, 235-244.
- [<sup>45</sup>]Quail, P.H. (1994) Phytochrome genes and their expression. In Kendrick, R.E. and Kronenberg, G.H.M. (eds.), *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer Academic, Dodrecht, pp. 71-104.

- [46] Kaneko, T. and Tabata, S. (1997) Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1171-1176.
- [47] Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.*, **3**, 109-36.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res.*, **3**, 185-209.
- [48] Lagarias, J.C. and Rapoport, H. (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the PR form of the phytochrome chromophore. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4821-4828.
- [49] Bhoo, S.H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B. and Vierstra, R.D. (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature*, **414**, 776-779.
- [50] Quail, P.H. (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell Environ.*, **20**, 657-665.
- [51] Schneider-Poetsch, H.A., Braun, B., Marx, S. and Schaumburg, A. (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. Hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction. *FEBS Lett.*, **281**, 245-249.
- [52] Fankhauser, C., Yeh, K.C., Lagarias, J.C., Zhang, H., Elich, T.D. and Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science*, **284**, 1539-1541.
- [53] Yeh, K.C. and Lagarias, J.C. (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *PNAS*, **95**, 13976-13981.
- [54] Cashmore, A.R. (1998) Higher-plant phytochrome: "I used to date histidine, but now I prefer serine". *PNAS*, **95**, 13358-13360.
- [55] Jones, A.M. and Quail, P.H. (1986) Quaternary structure of 124-kilodalton phytochrome from *Avena sativa* L. *Biochemistry*, **25**, 2987-2995.
- [56] Lamparter, T., Esteban, B. and Hughes, J. (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4720-4730.

- [57] Park, C.M., Shim, J.Y., Yang, S.S., Kang, J.G., Kim, J.I., Luka, Z. and Song, P.S. (2000) Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry*, **39**, 6349-6356.
- [58] Gärtner, W., Hill, C., Worm, K., Braslavsky, S.E. and Schaffner, K. (1996) Influence of expression system on chromophore binding and preservation of spectral properties in recombinant phytochrome A. *Eur. J. Biochem.*, **236**, 978-983.
- [59] Hoch, J.A. and Silhavy, T.J. (eds.) (1995) *Two Component Signal Transduction*. Am. Soc. Microbiol. Press, Washington.
- [60] Taylor, B.L. and Zhulin, I.B. (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiol. Mol. Biol. R.* , **63**, 479-506.
- [61] Fry, R.C., Habashi, J., Okamoto, H. and Deng, X.W. (2002) Characterization of a strong dominant phytochrome A mutation unique to phytochrome A signal propagation. *Plant Physiol.*, **130**, 457-465.
- [62] Lapko, V.N., Jiang, X.Y., Smith, D.L. and Song, P.S. (1997) Posttranslational modification of oat phytochrome A: phosphorylation of a specific serine in a multiple serine cluster. *Biochemistry*, **36**, 10595-10599.
- [63] Park, C.M., Shim, J.I., Yang, S.S., Kang, J.G., Kang, J.H., Shim, J.Y., Chung, Y.H., Park, Y.M. and Song, P.S. (2000) A second photochromic bacteriophytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803: spectral analysis and down-regulation by light. *Biochemistry*, **39**, 10840-10847.
- [64] Wu, S.H. and Lagarias, J.C. (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry*, **39**, 13487-13495.
- [65] Davis, S.J., Kurepa, J. and Vierstra, R.D. (1999) The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *PNAS*, **96**, 6541-6654.
- [66] Davis, S.J., Bhoo, S.H., Durski, A.M., Walker, J.M. and Vierstra, R.D. (2001) The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants. *Plant Physiol.*, **126**, 656-669.
- [67] Kohchi, T., Mukougawa, K., Frankenberg, N., Masuda, M., Yokota, A. and Lagarias, J.C. (2001) The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell*, **13**, 425-436.
- [68] McDowell, M.T. and Lagarias, J.C. (2001) Purification and biochemical properties of phytochromobilin synthase from etiolated oat seedlings. *Plant Physiol.*, **126**, 1546-1554.
- [69] Terry, M.J., McDowell, M.T. and Lagarias, J.C. (1995) (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *J. Biol. Chem.*, **270**, 11111-11118.

- [70]Cornejo, J., Willows, R.D. and Beale, S.I. (1998) Phytobilin biosynthesis - cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.*, **15**, 99-107.
- [71]Cornejo, J. and Beale, S.I. (1997) Phycobilin biosynthetic reactions in extracts of cyanobacteria. *Photosynth. Res.*, **51**, 223-230.
- [72]Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T. and Lagarias, J.C. (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell.*, **13**, 965-978.
- [73]Gambetta, G.A. and Lagarias, J.C. (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *PNAS*, **98**, 10566-71.
- [74]Landgraf, F.T., Forreiter, C., Hurtado Pico, A., Lamparter, T. and Hughes, J. (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **508**, 459-462.
- [75]Schluchter, W.M. and Glazer, A.N. (1999) Biosynthesis of Phycobiliproteins in Cyanobacteria. In Peschek, G.A., Löffelhardt, W. and Schmetterer, G. (eds.), *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York.
- [76]Hübschmann, T., Börner, T., Hartmann, E. and Lamparter, T. (2001) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 2055-2063.
- [77]Rüdiger, W. and Correl, D.L. (1969) Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Protein Bindung. *Liebigs Ann. Chem.*, **723**, 208-212.
- [78]Wu, S.-H., McDowell, M.T. and Lagarias, J.C. (1997) Phycocyanobilin is the natural chromophore precursor of phytochrome from the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Physiol.*, **114**, 154.
- [79]Jorissen, H.J.M.M., Braslavsky, S.E., Wagner, G. and Gärtner, W. (2002) Heterologous expression and characterization of recombinant phytochrome from *Mougeotia scalaris*. *Photochem. Photobiol.*, **in press**.
- [80]Elich, T.D. and Lagarias, J.C. (1989) Formation of a photoreversible phycocyanobilin-apophytochrome adduct in vitro. *J. Biol. Chem.*, **264**, 12902-12908.
- [81]Tümmler, F., Rüdiger, W., Cmiel, E. and Schneider, S. (1983) Chromopeptides from phytochrome and phycocyanin. NMR studies of the Pfr and Pr chromophore of phytochrome and E,Z isomeric chromophores of phycocyanin. *Z. Naturforsch.*, **38c**, 359-368.
- [82]Fodor, S.P., Lagarias, J.C. and Mathies, R.A. (1990) Resonance Raman analysis of the Pr and Pfr forms of phytochrome. *Biochemistry*, **29**, 11141-11146.
- [83]Giraud, E., Fardoux, L., Fourier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B. and Vermeglio, A. (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature*, **417**, 202-205.

- [84] Remberg, A., Schmidt, P., Braslavsky, S.E., Gärtner, W. and Schaffner, K. (1999) Differential effects of mutations in the chromophore pocket of recombinant phytochrome on chromoprotein assembly and Pr-to-Pfr photoconversion. *Eur. J. Biochem.*, **266**, 201-208.
- [85] Braslavsky, S.E., Gaertner, W. and Schaffner, K. (1997) Phytochrome photoconversion. *Plant, Cell Environ.*, **20**, 700-706.
- [86] Schmidt, P., Gensch, T., Remberg, A., Gärtner, W., Braslavsky, S.E. and Schaffner, K. (1998) The complexity of the Pr to Pfr phototransformation kinetics is an intrinsic property of native phytochrome. *Photochem. Photobiol.*, **68**, 754-761.
- [87] Eichenberg, K., Bäurle, I., Paulo, N., Sharrock, R.A., Rudiger, W. and Schäfer, E. (2000) Arabidopsis phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B. *FEBS Lett.*, **470**, 107-112.
- [88] Ruddat, A., Schmidt, P., Gatz, C., Braslavsky, S.E., Gärtner, W. and Schaffner, K. (1997) Recombinant type A and B phytochromes from potato. Transient absorption spectroscopy. *Biochemistry*, **36**, 103-111.
- [89] Remberg, A., Ruddat, A., Braslavsky, S.E., Gärtner, W. and Schaffner, K. (1998) Chromophore incorporation, Pr to Pfr kinetics, and Pfr thermal reversion of recombinant N-terminal fragments of phytochrome A and B chromoproteins. *Biochemistry*, **37**, 9983-9990.
- [90] Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Bäurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E. and Harter, K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. *Science*, **294**, 1108-1111.
- [91] Eichenberg, K., Hennig, L., Martin, A. and Schaefer, E. (2000) Variation in dynamics of phytochrome A in Arabidopsis ecotypes and mutants. *Plant Cell Environ.*, **23**, 311-319.
- [92] Lagarias, J.C. and Lagarias, D.M. (1989) Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein in vitro. *PNAS*, **86**, 5778-5780.
- [93] Li, L. and Lagarias, J.C. (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J. Biol. Chem.*, **267**, 19204-10.
- [94] Li, L., Murphy, J.T. and Lagarias, J.C. (1995) Continuous fluorescence assay of phytochrome assembly in vitro. *Biochemistry*, **34**, 7923-7930.
- [95] Deforce, L., Tomizawa, K., Ito, N., Farrens, D., Song, P.S. and Furuya, M. (1991) In vitro assembly of apophytochrome and apophytochrome deletion mutants expressed in yeast with phycocyanobilin. *PNAS*, **88**, 10392-6.
- [96] Lindner, I., Knipp, B., Braslavsky, S.E., Gaertner, W. and Schaffner, K. (1998) A novel chromophore selectively modifies the spectral properties of one of the two stable states of the plant photoreceptor phytochrome. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 1843-1846.
- [97] Hanzawa, H., Inomata, K., Kinoshita, H., Kakiuchi, T., Jayasundera, K.P., Sawamoto, D., Ohta, A., Uchida, K., Wada, K. and Furuya, M. (2001) In vitro assembly of phytochrome B apoprotein with synthetic analogs of the phytochrome chromophore. *PNAS*, **98**, 3612-3617.

- [<sup>98</sup>]Robben, U., Lindner, I., Gärtner, W. and Schaffner, K. (2001) Analysis of the topology of the chromophore binding pocket of phytochromes by variation of the chromophore substitution pattern. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1048-1050.
- [<sup>99</sup>]Lindner, I., Braslavsky, S.E., Schaffner, K. and Gärtner, W. (2000) Model studies of phytochrome photochromism: Protein-mediated photoisomerization of a linear tetrapyrrole in the absence of covalent bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3269-3271
- [<sup>100</sup>]Stock, A.M., Robinson, V.L. and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 183-215.
- [<sup>101</sup>]Parkinson, J.S. and Kofoid, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **26**, 71-112.
- [<sup>102</sup>]Chang, C. and Meyerowitz, E.M. (1994) Eukaryotes have "two-component" signal transducers. *Res. Microbiol.*, **145**, 481-486.
- [<sup>103</sup>]Yeh, K.C., Wu, S.H., Murphy, J.T. and Lagarias, J.C. (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*, **277**, 1505-1508.
- [<sup>104</sup>]Hübschmann, T., Jorissen, H.J.M.M., Börner, T., Gärtner, W. and Tandeau de Marsac, N. (2001) Phosphorylation of proteins in the light-dependent signalling pathway of a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3383-3389.
- [<sup>105</sup>]Garcia-Dominguez, M., Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C. and Florencio, F.J. (2000) Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J. Bacteriol.*, **182**, 38-44.
- [<sup>106</sup>]Wilde, A., Fiedler, B. and Börner, T. (2002) The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol. Microbiol.*, **44**, 981-988.
- [<sup>107</sup>]Jorissen, J.M.M.H., Quest, B., Remberg, A., Coursin, T., Braslavsky, S.E., Schaffner, K., Tandeau de Marsac, N. and Gärtner, W. (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2662-2671.
- [<sup>108</sup>]van Thor, J.J., Borucki, B., Crielaard, W., Otto, H., Lamparter, T., Hughes, J., Hellingwerf, K.J. and Heyn, M.P. (2001) Light-induced proton release and proton uptake reactions in the cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry*, **40**, 11460-11471.
- [<sup>109</sup>]Remberg, A., Lindner, I., Lamparter, T., Hughes, J., Kneip, C., Hildebrandt, P., Braslavsky, S.E., Gärtner, W. and Schaffner, K. (1997) Raman spectroscopic and light-induced kinetic characterization of a recombinant phytochrome of the cyanobacterium *Synechocystis*. *Biochemistry*, **36**, 13389-13395.
- [<sup>110</sup>]Bennett, A. and Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.*, **58**, 419-35.
- [<sup>111</sup>]Tandeau de Marsac, N. (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bact.*, **130**, 82-91.
- [<sup>112</sup>]Kehoe, D.M. and Grossman, A.R. (1994) Complementary chromatic adaptation: photoperception to gene regulation. *Semin. Cell Biol.*, **5**, 303-313.

- [113]Matthijs, H.C.P., Geerdink, J.H., Balke, H., Haker, A., Schubert, H., Mur, L.R. and Hellingwerf, K.J. (1999) Sensing of green light in complementary chromatic adaptation of the cyanobacterium *Calothrix* sp. In Peschek, G.A., Löffelhardt, W. and Schmetterer, G. (eds.), *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic, New York, pp. 187-194.
- [114]Kehoe, D.M. and Grossman, A.R. (1999) The molecular mechanisms controlling complementary chromatic adaptation. In Peschek, G.A., Löffelhardt, W. and Schmetterer, G. (eds.), *The Phototrophic Prokaryotes*. Kluwer Academic, New York, pp. 61-69.
- [115]Seib, L.O. and Kehoe, D.M. (2002) A turquoise mutant genetically separates expression of genes encoding phycoerythrin and its associated linker peptides. *J. Bacteriol.*, **184**, 962-970.
- [116]Zhulin, I.B., Taylor, B.L. and Dixon, R. (1997) PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox. *TIBS*, **22**, 331-333.
- [117]Jiang, Z.Y., Swem, L.R., Rushing, B.G., Devanathan, S., Tollin, G. and Bauer, C.E. (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*, **285**, 406-409.
- [118]Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979) Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 1-62.
- [119]Damerval, T., Guglielmi, G., Houmard, J. and Tandeau de Marsac, N. (1991) Hormogonium differentiation in the cyanobacterium *Calothrix* a photoregulated developmental process. *Plant Cell*, **3**, 191-202.
- [120]Sidler, W.A. (1994) Phycobilisome and phycobiliprotein structure. In Bryant, D.A. (ed.) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 139-216.
- [121]Tandeau de Marsac, N., Mazel, D., Damerval, T., Guglielmi, G., Capuano, V. and Houmard, J. (1988) Photoregulation of gene expression in the filamentous cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601: light harvesting complexes and cell differentiation. *Photosynth. Res.*, **18**, 99-132.
- [122]Mazel, D. and Marliere, P. (1989) Adaptive eradication of methionine and cysteine from cyanobacterial light-harvesting proteins. *Nature*, **341**, 245-248.
- [123]Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- [124]Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **41**, 459-472.
- [125]Hedges, R.W. and Jacob, A.E. (1974) Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. *Mol. Gen. Genet.*, **132**, 31-40.
- [126]Elhai, J. and Wolk, C.P. (1988) Conjugal Transfer of DNA to Cyanobacteria. In: Packer, L. and Glazer, A.N. (eds.), *Meth. Enzymol.*, Vol. 167, pp. 747-754.

- [127] Thomas, C.M. and Smith, C.A. (1987) Incompatibility Group P Plasmids: Genetics, Evolution, And Use In Genetic Manipulation. *Annu. Rev. Microbiol.*, **41**, 77-101.
- [128] Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1988) Complementary chromatic adaptation: Physiological conditions and action spectra. In Packer, L. and Glazer, A.N. (eds.), *Meth. Enzymol.* Academic Press, Inc., Vol. **167**, pp. 318-328.
- [129] Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-379.
- [130] Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685.
- [131] Zhang, C.F., Farrens, D., Björling, S.C., Song, P.-S. and Kligler, D.S. (1992) Time-resolved absorption studies of native etiolated oat phytochrome. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4569-4580.
- [132] Scurlock, R.D., Evans, C.H., Braslavsky, S.E. and Schaffner, K. (1993) A phytochrome phototransformation study using two-laser/two-color flash photolysis: Analysis of the decay mechanism of I-700. *Photochem. Photobiol.*, **58**, 106-115.
- [133] Staden, R. (1996) The Staden Sequence Analysis Package. *Mol. Biotechnol.*, **5**, 233-241.
- [134] Perriere, G. and Gouy, M. (1996) WWW-query: an on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie*, **78**, 364-369.
- [135] Rost, B. and Sander, C. (1994) Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins*, **19**, 55-72.
- [136] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- [137] Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- [138] Hanelt, S., Braun, B., Marx, S. and Schneider-Poetsch, H.A. (1992) Phytochrome evolution: a phylogenetic tree with the first complete sequence of phytochrome from a cryptogamic plant (*Selaginella martensii* spring). *Photochem. & Photobiol.*, **56**, 751-758
- [139] Wu, S.H. and Lagarias, J.C. (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry*, **39**, 13487-13495.
- [140] Rost, B. and Sander, C. (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.*, **232**, 584-599.
- [141] Przybylski, D. and Rost, B. (2002) Alignments grow, secondary structure prediction improves. *Proteins*, **46**, 197-205.
- [142] Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, **292**, 195-202.

- [143]McGuffin, L.J., Bryson, K. and Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, **16**, 404-405.
- [144]Jorissen, H.J.M.M. (2001) Spectroscopic and functional characterization of recombinant phytochromes from the lower plants *Anemia phyllitidis* and *Mougeotia scalaris* and the cyanobacterium *Calothrix* PCC7601. Ph. D. thesis MPI für Strahlenchemie, Mülheim (Ruhr). Gerhard-Mercator-Universität Gesamthochschule Duisburg, p. 166.
- [145]Houmard, J. (1994) Gene transcription in filamentous cyanobacteria. *Microbiology*, **140**, 433-441.
- [146]Schyns, G., Jia, L., Coursin, T., Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1998) Promotor recognition by a cyanobacterial RNA polymerase: in vitro studies with the *Calothrix* sp. PCC 7601 transcriptional factors RcaA and RcaD. *Plant Mol. Biol.*, **36**, 649-659.
- [147]Jacques, N. and Dreyfus, M. (1990) Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions. *Mol. Microbiol.*, **4**, 1063-1067.
- [148]Shine, J. and Dalgarno, L. (1975) Terminal-sequence analysis of bacterial ribosomal RNA. Correlation between the 3'-terminal-polypyrimidine sequence of 16-S RNA and translational specificity of the ribosome. *Eur. J. Biochem.*, **57**, 221-230.
- [149]Reaston, J., Duyvesteyn, G.C. and de Waard, A. (1982) *Nostoc* PCC7524, a cyanobacterium which contains five sequence-specific deoxyribonucleases. *Gene*, **20**, 103-110.
- [150]Duyvesteyn, M.G.C., Korsuize, J., De, W.A., Wolk, C.P. and Vonshak, A. (1983) Sequence specific endonucleases in strains of *Anabaena* and *Nostoc*. *Arch. Microbiol.*, **134**, 276-281.
- [151]Elhai, J., Vepritskiy, A., Muropastor, A.M., Flores, E. and Wolk, C.P. (1997) Reduction of conjugal transfer efficiency by three restriction activities of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bact.*, **179**, 1998-2005.
- [152]Schäfer, M.R., Chiang, G.G., Cobley, J.G. and Grossman, A.R. (1993) Plasmids from two morphologically distinct cyanobacterial strains share a novel replication origin. *J. Bact.*, **175**, 5701-5705.
- [153]Cobley, J.G., Zerweck, E., Reyes, R., Mody, A., Seludo-Unson, J.R., Jäger, H., Weerasuriya, S. and Navankasattusas, S. (1993) Construction of shuttle plasmids which can be efficiently mobilized from *Escherichia coli* into the chromatically adapting cyanobacterium, *Fremyella diplosiphon*. *Plasmid*, **30**, 90-105.
- [154]Kehoe, D.M. and Grossman, A.R. (1998) Use of molecular genetics to investigate complementary chromatic adaptation: Advances in transformation and complementation. *Meth. Enzymol.*, **297**, 279-290.
- [155]Schyns, G., Sobczyk, A., Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1994) Specific initiation of transcription at a cyanobacterial promotor with RNA polymerase purified from *Calothrix* sp. PCC 7601. *Mol. Microbiol.*, **13**, 887-896.

- [156]Chiang, G.G., Schäfer, M.R. and Grossman, A.R. (1992) Transformation of the filamentous cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* by conjugation or electroporation. *Plant Physio. Bioch.*, **30**, 315-325.
- [157]Cobley, J.G., Zerweck, E., Reyes, R., Mody, A., Seludo-Unson, J.R., Jaeger, H., Weerasuriya, S. and Navankasattusas, S. (1993) Construction of shuttle plasmids which can be efficiently mobilized from *Escherichia coli* into the chromatically adapting cyanobacterium, *Fremyella diplosiphon*. *Plasmid*, **30**, 90-105.
- [158]Lapko, V.N. and Song, P.S. (1995) A simple and improved method of isolation and purification for native oat phytochrome. *Photochem. Photobiol.*, **62**, 194-198.
- [159]Mozley, D., Remberg, A. and Gärtner, W. (1997) Large-scale generation of affinity-purified recombinant phytochrome chromopeptide. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 710-715.
- [160]Xu, Y., Parks, B.M., Short, T.W. and Quail, P.H. (1995) Missense mutations define a restricted segment in the C-terminal domain of phytochrome A critical to its regulatory activity. *Plant Cell*, **7**, 1433-1443.
- [161]Lamparter, T., Mittmann, F., Gärtner, W., Boerner, T., Hartmann, E. and Hughes, J. (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *PNAS*, **94**, 11792-11797.
- [162]Gill, S.C. and von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- [163]Shinomura, T., Uchida, K. and Furuya, M. (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **122**, 147-56.
- [164]Rothwarf, D.M. and Scheraga, H.A. (1993) Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A. 3. Dependence on the nature of the redox reagent. *Biochemistry*, **32**, 2690-2697.
- [165]Wynn, R., Cocco, M.J. and Richards, F.M. (1995) Mixed disulfide intermediates during the reduction of disulfides by *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, **34**, 11807-11813.
- [166]Li, Y.J., Rothwarf, D.M. and Scheraga, H.A. (1998) An unusual adduct of dithiothreitol with a pair of cysteine residues of a protein as a stable folding intermediate. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2668-2669.
- [167]Rothwarf, D.M., Li, Y.J. and Scheraga, H.A. (1998) Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease a - detailed kinetic analysis of two independent folding pathways. *Biochemistry*, **37**, 3767-3776.
- [168]Miyada, D.S., Dinovo, E.C. and Nakamura, R.M. (1975) Creatine kinase reactivation by thiol compounds. *Clin. Chim. Acta*, **58**, 97-99.
- [169]Rothwarf, D.M. and Scheraga, H.A. (1992) Equilibrium and kinetic constants for the thiol-disulfide interchange reaction between glutathione and dithiothreitol. *PNAS*, **89**, 7944-7948.

- [170]Creighton, T.E. (1984) Disulfide bond formation in proteins. In Wold, F. and Moldave, K. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 107, pp. 305-329.
- [171]Getz, E.B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. and Selvin, P.R. (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal. Biochem.*, **273**, 73-80.
- [172]Jocelyn, P.C. (1987) Chemical reduction of disulfides. In Jakoby, W.B. and Griffith, O. (eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, Vol. 143, pp. 246-256.
- [173]Kneip, C., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S.E., Mark, F. and Schaffner, K. (1999) Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the Pr --> Pfr phototransformation of phytochrome: a resonance Raman spectroscopic study. *Biochemistry*, **38**, 15185-15192.
- [174]Förstendorf, H., Lamparter, T., Hughes, J., Gärtner, W. and Siebert, F. (2000) The photoreactions of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*: A low-temperature UV-Vis and FT-IR spectroscopic study. *Photochem. Photobiol.*, **71**, 655-661.
- [175]Bhoo, S.H., Hirano, T., Jeong, H.Y., Lee, J.G., Furuya, M. and Song, P.S. (1997) Phytochrome photochromism probed by site-directed mutations and chromophore esterification. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11717-11718.
- [176]Deforce, L., Furuya, M. and Song, P.S. (1993) Mutational analysis of the pea phytochrome A chromophore pocket: chromophore assembly with apophytochrome A and photoreversibility. *Biochemistry*, **32**, 14165-14172.
- [177]Li, L., Murphy, J.T. and Lagarias, J.C. (1995) Continuous fluorescence assay of phytochrome assembly in vitro. *Biochemistry.*, **34**, 7923-7930.
- [178]Berkelman, T.R. and Lagarias, J.C. (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **156**, 194-201.
- [179]Wahleithner, J.A., Li, L.M. and Lagarias, J.C. (1991) Expression and assembly of spectrally active recombinant holophytochrome. *PNAS.*, **88**, 10387-10391.
- [180]Landgraf, F.T., Forreiter, C., Hurtado Pico, A., Lamparter, T. and Hughes, J. (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **508**, 459-462.
- [181]Chun, L., Kawakami, A. and Christopher, D.A. (2001) Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant Physiol.*, **125**, 1957-1966.
- [182]Garcia-Dominguez, M., Muro-Pastor, M.I., Reyes, J.C. and Florencio, F.J. (2000) Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J. Bact.*, **182**, 38-44.
- [183]Tandeau de Marsac, N. and Houmard, J. (1998) Acclimation of the filamentous cyanobacteria *Calothrix* spp. to the environment: Physiological and molecular studies. In Subramanian, G., Kaushik, B.D. and Venkataraman, G.S. (eds.), *Cyanobacterial Biotechnology*. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, India, pp. 315-324.

- [184]Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N. and Simon, M.I. (1988) Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell*, **53**, 79-87.
- [185]Jin, S.G., Prusti, R.K., Roitsch, T., Ankenbauer, R.G. and Nester, E.W. (1990) Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J. Bact.*, **172**, 4945-4950.
- [186]Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Heidelberg, Berlin.
- [187]Ferrell, J.E., Jr. (1996) Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends. Biochem. Sci.*, **21**, 460-466.
- [188]Rappoport, Z. (1994) *The Chemistry of Enamines*. Wiley, Chichester.
- [189]Clough, R.C., Jordan-Beebe, E.T., Lohman, K.N., Marita, J.M., Walker, J.M., Gatz, C. and Vierstra, R.D. (1999) Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for P<sub>fr</sub> ubiquitination and degradation. *Plant J.*, **17**, 155-167.
- [190]Kranz, J.E., Satterberg, B. and Elion, E.A. (1994) The MAP kinase Fus3 associates with and phosphorylates the upstream signaling component Ste5. *Gene. Dev.*, **8**, 313-327.
- [191]Fancy, D.A. and Kodadek, T. (1999) Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: Rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *PNAS*, **96**, 6020-6024.
- [192]Bren, A. and Eisenbach, M. (1998) The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J. Mol.Biol.*, **278**, 507-514.
- [193]Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4876-4882.
- [194]Higgins, D.G., Thompson, J.D. and Gibson, T.J. (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Meth. Enzymol.*, **266**, 383-402.

## Danksagung

Danken will ich kreuz und quer so vielen Menschen, daß ich nicht gezwungen sein will, der Dankesflut eine höhere oder irgendeine Ordnung zu geben. Da ich aber irgendwie die Dankesliste anfangen muß, danke ich den Blumen, daß sie so schön wachsen und den Bäumen und den anderen Pflanzen (insbesondere dem Kakao und dem Zuckerrohr), den Mikroorganismen und den Tieren, auf daß sie ein so vorzügliches Ökosystem ausgebildet haben, das wir noch nicht ganz verstanden haben und es aber dennoch schützen und bewahren sollten, weil es folgenden Menschen, die maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben, Nahrungsgrundlage, Heimat und Obhut ist. Was wäre die Welt ohne Steffi; sie wäre beklagenswert leise und enthielte wahrscheinlich viel mehr Äpfel, Kürbisse, Hühner, Auberginen, Avocados (vielleicht aber auch weniger Avocados?) und ganz sicher mehr frustrierte Benjamins. Mit Dank seien überschüttet alle meine Freunde, die mir immer vor Augen geführt haben, daß der Mensch an sich nicht schlecht sein kann, wenn eine Teilmenge der Menschheit Henrik, Sabine, Basti *et al.*, Alex, Stephan, Thorsten, Maik, Jindrich, Simone, Boris, Irene, Tanja, Peter, Christian K., Martina, Rainer, Astrid, Markus, Bianca, Derk, Steffi oder Christoph O. heißt. Der Familie, die die Grundlage geschaffen hat, aus einem schreienden Wutbündel einen (studierten) kognitiv denkenden und, wie ich hoffe, humorvollen Menschen zu machen: Frauke, Kolja, Lotte, Wiebke, Otto. Wie arm wäre die Welt ohne so gute Menschen wie Ursel, Wolfgang, Rita, Eva, Eva, Kiki, Marlis, Uta, Tanja B., Helene, Leja, Thomas, Nicole, Oe, Eleonore, Jörg, Katrin, Brigitte, Silvia, Jens, Francesco, Miriam, Frank, Bea, Martin, Anna, Carolina, Guido, Mat(t)(h)ias, Mat(t)hias, Wilfried, Florian, Maya, Wofgang B., Christina oder Douglas.

Den Menschen, die an all den Programmen werkeln, die ich für die Erstellung dieser Arbeit benutzt habe, und die ihre Arbeit freigiebig verschenken, gebührt mein Dank und meine Anerkennung.

Ich möchte mich auch bei allen schlechten Vorbildern bedanken ohne deren Gegenpol die Welt vielleicht angenehmer, aber auch langweiliger wäre, und ohne die kein Streben zum anderen Gegenpol stattfinden kann. Ich möchte sie nicht namentlich nennen, denn vielleicht (und hoffentlich) tue ich ihnen ja mittlerweile schon Unrecht.

Nach all diesem persönlichen und von Herzen kommenden Dank möchte ich weiterhin offiziell Danksagen und Anerkennen. Nicht daß dieser Dank ein besserer oder schlechterer wäre, als der oben geäußerte, der Unterschied besteht einzig im jeweiligen Grund, der, genau genommen, genauso wenig selbstverständlich ist, wie das Dasein selbst.

Prof. Dr. Wolfgang Gärtner möchte ich nicht nur für das Thema, sondern auch für die aufopferungsvolle Art und Weise danken, mit der er dieses Thema betreut hat M->MH->M, MH->M->MH.

Prof. Dr. D. Oesterhelt möchte ich für die beinahe endlose Geduld danken, mit der ich seine Fördermittel verforschen durfte, ohne daß ich sein eigenes „wissenschaftliches Konto“ auch nur um einen halben Cent bereichert habe.

Den Collaborateuren Dr. Nicole Tandeau de Marsac, Dr. Thomas Hübschmann und (jetzt) Dr. Leja Jorissen danke ich für ihren wissenschaftlichen Beitrag, nützliche Diskussionen und die angenehme, unkomplizierte Zusammenarbeit.

Rita Wiemeyer, die keine molekularbiologische Klippe (und auch keine anderen) gescheut hat und viele der DNA-Spoiler dieses teils wirren Kampfs aus Konstrukten mit Fassung und Humor fachgerecht werkstückte.

Den PraktikantInnen Juliane Müller (!), Tim Conze (naja), Robert Gauss (!), Petra Neff, Thomas Grosskopff (nomen est omen in allen Belangen), Anette Kunz und Thomas Hannich.

Walter Erhard und Hans Schiefele für die Cyanobenchen (u.a.), der grüne Kollege hat's genossen.

Rainer Koenig und Heiko Schmidt für die freundliche Hilfestellung bei der Erstellung phylogenetischer Bäume.

Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die unkomplizierte, zweijährige finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

# BENJAMIN QUEST

---

Preßburgerstraße 27 ➤ 81377 München

Tel.: ++49-89-71998432 ➤ E-Mail: Benjamin\_Quest@gmx.de

## LEBENS LAUF

### ANGABEN ZUR PERSON

---

Geburtsdatum und -ort 7. Mai 1972, Berlin-Dahlem  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit Deutsch

### AUSBILDUNG

---

1978 -1982 Besuch der Grundschule Osningschule in Bielefeld  
1982 – 1991 Besuch des Helmholtz-Gymnasiums in Bielefeld  
1991 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)  
1991 - 1992 Zivildienst beim Deutschen Paritätischen Wohlfahrtsverband als „individueller Schwerstbehindertenbetreuer“ (ISB)  
1993 - 1998 Studium der Biologie an der Universität Kassel  
1998 Durchführung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) in der Abteilung Membranbiochemie.  
Thema: „UNTERSUCHUNGEN ZUR IDENTIFIZIERUNG VON KOMPONENTEN DER ÜBERTRAGUNG VON GLYCOSYL-PHOSPHATIDYL-INOSITOL-ANKERN AUF PROTEINE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*“. Abschluß als Dipl. Biol.  
1999 - 2002 Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) in der Abteilung Membranbiochemie unter der Betreuung von Prof. Dr. W. Gärtner.  
Thema: „BIOCHEMISCHE UND SPEKTROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG ZWEIER CYANOBAKTERIELLER PHYTOCHROME AUS *CALOTHRIX* PCC 7601“. 2/2003 (voraussichtlich) Abschluß als Dr. rer. nat.

---

München, 28. November 2002