

**Struktur, Funktion und  
spektroskopische Eigenschaften der flavinbindenden Domänen  
des pflanzlichen Blaulichtrezeptors Phototropin (phot1)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt  
von  
Elke Knieb

Juni 2002

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Diese Dissertation wurde von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt.

München, im Juni 2002

.....

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Wolfhart Rüdiger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Hugo Scheer
Tag der mündlichen Prüfung:	8. November 2002

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Briggs, W. R., Christie, J. M., Knieb, E. und Salomon, M. (1999).  
Phototropin (NPH1), a photoreceptor for phototropism, is a FMN-binding chromoprotein.  
In: *Flavins and Flavoproteins, Proceedings of the thirteenth international symposium*,  
Konstanz, Germany; Gishla, S., Kroneck, P., Macheroux, P. und Sund, H. (eds.), Rudolf  
Weber, Agency for scientific publications, 299-308

Knieb, E., Rüdiger, W. und Salomon, M. (2000).  
Identification of Autophosphorylation Sites of the Blue Light Receptor Phototropin.  
Abstract P04-17. S. 75 und Poster  
Botanikertagung 2000 in Jena (17.–22. September 2000)

Salomon, M., Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U. und Briggs, W.R. (2000).  
Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light  
receptor, phototropin.  
Biochem. 39, 9401-9410

Salomon, M., Eisenreich, W., Dürr, H., Schleicher, E., Knieb, E., Massey, V., Rüdiger, W.,  
Müller, F., Bacher, A. und Richter, G. (2001).  
An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 12357-12361

Für meine Eltern

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>DIE VERSCHIEDENEN PHOTOREZEPTORSYSTEME</b>	<b>2</b>
1.1.1	DAS PHYTOCHROMSYSTEM	2
1.1.2	DIE CRYPTOCHROME	3
1.1.3	ANDERE UV-/BLAULICHT-REZEPTOREN	4
<b>1.2</b>	<b>DER PHOTOTROPISMUS</b>	<b>4</b>
1.2.1	DIE GESCHICHTE DES PHOTOTROPISMUS	5
1.2.1.1	Die Entdeckung und erste Studien	5
1.2.1.2	Dosis-Effekt-Beziehungen und die Frage nach der Anzahl der verantwortlichen Photorezeptoren	6
1.2.1.3	Die Natur des Chromophors	8
1.2.1.4	Die phototropische Wachstumskrümmung – blaulichtinduzierte differentielle Hemmung oder Zunahme des Wachstums ?	10
1.2.2	DIE BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER BLAULICHTVERMITTELTEN PROTEINPHOSPHORYLIERUNG	12
1.2.2.1	Vorkommen und Lokalisierung	13
1.2.2.2	Die Eigenschaften der Phosphorylierungsreaktion und mögliche Gründe für eine Autophosphorylierung	14
1.2.2.3	Die Phosphorylierungsstellen	16
1.2.2.4	Die Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit im Dunkeln	16
1.2.2.5	Erinnerungseffekt	17
1.2.2.6	Die blaulichtvermittelte Mobilitätsreduktion	18
1.2.3	GENETISCHE UND MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DES PHOTOTROPISMUS	18
1.2.3.1	Mutantenstudien	18
1.2.3.2	Korrelation zwischen Mutantenstudien und blaulichtvermittelter Proteinphosphorylierung	19
1.2.3.3	Die Klonierung und Charakterisierung des <i>NPH1</i> -Gens	20
1.2.3.4	Signaltransduktion	21
1.2.4	NOMENKLATUR	22
<b>1.3</b>	<b>AUFGABESTELLUNG DIESER ARBEIT</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>ORGANISMEN</b>	<b>23</b>
2.1.1	PFLANZENMATERIAL	23
2.1.2	BAKTERIENSTÄMME	23
<b>2.2</b>	<b>PLASMIDE, EXPRESSIONSSYSTEM UND OLIGONUKLEOTIDE</b>	<b>24</b>
2.2.1	PLASMIDE UND HETEROLOGES EXPRESSIONSSYSTEM	24
2.2.2	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	24
2.2.2.1	Synthetische Oligonukleotide für Klonierung	24
2.2.2.2	Synthetische Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenese	25
<b>2.3</b>	<b>ANTIKÖRPER, AFFINITÄTSMATRICES UND CHROMOPHORE</b>	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>VERBRAUCHSMATERIAL</b>	<b>27</b>
2.4.1	CHEMIKALIEN	27
2.4.2	REAGENZIEN	28
2.4.3	RADIONUKLEOTIDE	28
2.4.4	ENZYME	28
2.4.4.1	Restriktionsenzyme	28
2.4.4.2	Polymerasen	29
2.4.4.3	RNase	29
2.4.4.4	Endoproteasen	29

## Inhaltsverzeichnis

2.4.4.5	Protease-Inhibitoren .....	29
2.4.4.6	Kinasen .....	29
2.4.4.7	sonstige Enzyme .....	29
2.4.5	GRÖßENSTANDARDS .....	30
2.4.6	GERÄTE UND SONSTIGES VERBRAUCHSMATERIAL.....	32
<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>ANZUCHT DES PFLANZENMATERIALS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>BIOCHEMISCHE ARBEITSMETHODEN.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	HERSTELLUNG VON ROHEXTRAKTEN .....	34
3.2.2	IMMUNOPRÄZIPITATION .....	35
3.2.3	ISOLIERUNG VON ROHMEMBRANEN (MIKROSOMALE MEMBRANEN).....	36
3.2.4	GEWINNUNG VON LÖSLICHEM PHOTOTROPIN DURCH PROTEINABLÖSUNG VON MIKROSOMALEN MEMBRANEN .....	37
3.2.4.1	mit Detergentien .....	37
3.2.4.2	mit hohen Salzkonzentrationen oder chaotropen Reagenzien .....	38
3.2.4.3	mit Detergens und Salzen.....	38
3.2.4.4	mit Salzen und Detergens.....	38
3.2.5	GRÖßENFILTRATION .....	38
3.2.6	PROTEINPHOSPHORYLIERUNG UND $^{32}\text{P}$ -MARKIERUNG .....	39
3.2.6.1	Phosphorylierung von Zellrohextrakten .....	39
3.2.6.2	Phosphorylierung von mikrosomalen Membranen .....	40
3.2.6.3	Phosphorylierung von überexprimierten Proteinen .....	40
3.2.7	GELELEKTROPHORESE .....	40
3.2.7.1	Denaturierende Gelelektrophorese: Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im kontinuierlichen Tris-Glycin- Puffersystem .....	40
3.2.7.2	Dodecylmaltosid-Gelelektrophorese in Anlehnung an BN-PAGE im diskontinuierlichen Puffersystem .....	41
3.2.8	FÄRBE-METHODEN FÜR PROTEINE .....	42
3.2.8.1	Coomassiefärbung.....	42
3.2.8.2	Silberfärbung .....	42
3.2.8.3	Ponceaufärbung .....	42
3.2.9	WESTERNBLOT UND IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS .....	43
3.2.10	AMMONIUMSULFAT-FÄLLUNG .....	43
3.2.11	PROTEINMENGENBESTIMMUNG.....	44
3.2.12	BESTIMMUNG DES PROTEIN-CHROMOPHOR-VERHÄLTNISSSES .....	44
3.2.13	THROMBINVERDAU ZUR Abspaltung des CBP-Fusionsproteins.....	44
3.2.14	GELELUTION .....	45
3.2.15	TRYPSINSPALTUNG .....	45
3.2.16	CYANBROMID-SPALTUNG.....	46
3.2.17	CHROMATOGRAPHIE.....	46
3.2.17.1	Dünnschicht-Elektrophorese .....	46
3.2.17.2	Aufsteigende Dünnschichtchromatographie .....	46
3.2.18	AFFINITÄTSREINIGUNG MIT DEM REAKTIVFARBSTOFF CIBACHCHRON BLAU.....	47
3.2.19	NACHWEIS FÜR N-ACETYLGLUCOSAMINIERUNG .....	48
3.2.20	GLYCOPROTEINNACHWEIS .....	48
3.2.21	MASSENSPEKTROSKOPIE.....	49
<b>3.3</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN.....</b>	<b>49</b>
3.3.1	STANDARDARBEITSTECHNIKEN.....	49
3.3.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	49
3.3.1.2	Transformation in Bakterien .....	50
3.3.1.3	Plasmidpräparation.....	50
3.3.1.3.1	Minipräparation per „Spin Columns“ .....	50

3.3.1.3.2	Standard-Minipräparation.....	51
3.3.1.3.3	Midipräparation.....	51
3.3.1.4	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNS.....	51
3.3.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	52
3.3.1.6	Restriktionsverdau.....	52
3.3.1.7	Elektrophorese.....	53
3.3.2	KLONIERUNG IN <i>E. COLI</i> .....	53
3.3.2.1	PCR zur Amplifikation eines DNS-Fragments.....	53
3.3.2.2	Restriktionsverdau und Vektordephosphorylierung.....	54
3.3.2.3	Ligation.....	54
3.3.2.4	Transformation.....	54
3.3.2.5	Überprüfung der Klonierung.....	55
3.3.2.6	Glycerinkultur.....	55
3.3.3	ZIELGERICHTETE MUTAGENESE.....	55
3.3.3.1	Mutations-PCR.....	55
3.3.3.2	DpnI-Verdau.....	56
3.3.3.3	Transformation.....	56
3.3.3.4	Mutationsüberprüfung.....	57
3.3.3.4.1	mittels Restriktionsverdau.....	57
3.3.3.4.2	biochemische Eigenschaften bei Proteinexpression.....	57
3.3.4	HETEROLOGE EXPRESSION IN <i>E. COLI</i> .....	57
3.3.5	ZELLAUFSCHLUß.....	58
3.3.5.1	Standardmethode.....	58
3.3.5.2	Miniexpressionsanalyse.....	58
3.3.5.3	Löslichkeitsanalyse.....	58
3.3.6	AFFINITÄTSREINIGUNG DER FUSIONSPROTEINE.....	59
3.3.6.1	pMal-Konstrukte.....	59
3.3.6.2	pCal-Konstrukte.....	59

## **4 ERGEBNISSE.....61**

<b>4.1</b>	<b>IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS VON PHOTOTROPIN DURCH KREUZREAKTION MIT ANTI-NPH1.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2</b>	<b>LOKALISATION VON PHOTOTROPIN AUS PFLANZEN UND VERSUCHE ZU SEINER ANREICHERUNG.....</b>	<b>70</b>
4.2.1	GEWEBESPEZIFITÄT UND VERTEILUNG ENTLANG DER KOLEOPTILE.....	70
4.2.2	DIE PHOTOTROPINMENGE IN PFLANZEN IM ETIOLIERTEN UND VORBELICHTETEN ZUSTAND.....	75
4.2.3	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION, DIE DISSOZIATION VON PHOTOTROPIN VON DER PLASMAMEMBRAN IM LICHT UND EVIDENZEN FÜR EINEN HÖHERMOLEKULAREN PHOTOTROPINKOMPLEX IM DUNKELN.....	76
4.2.4	AUFREINIGUNG VON PHOTOTROPIN UNTER DEM ASPEKT EINER ANREICHERUNG.....	82
4.2.4.1	Stabilität von Phototropin.....	82
4.2.4.2	Membranpräparation und Solubilisierung mit Detergentien und/oder Salzen....	86
4.2.4.3	Affinitätsreinigung.....	90
<b>4.3</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER LOV2-CHROMOPHORBINDUNG.....</b>	<b>94</b>
4.3.1	VORARBEITEN.....	94
4.3.2	GENERIERUNG VON LOV2-PUNKTMUTATIONEN.....	103
4.3.2.1	Sequenzanalyse der LOV-Domänen.....	103
4.3.2.2	Die Struktur der LOV-Domänen im Molekülmodell.....	105
4.3.2.3	Zielgerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese in LOV2.....	108
4.3.3	CHARAKTERISIERUNG DER LOV2-PUNKTMUTATIONEN.....	110
4.3.3.1	Biochemische Analyse der CBP-LOV2-Mutanten.....	110
4.3.3.2	Spektrale Charakterisierung.....	112

## Inhaltsverzeichnis

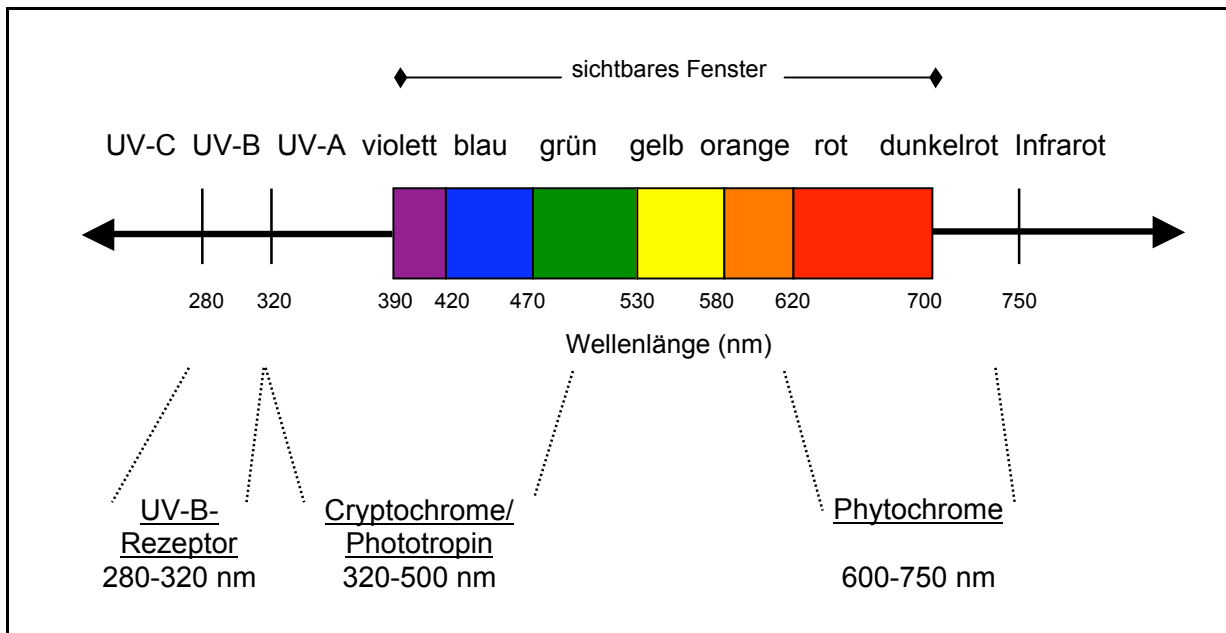
---

4.3.3.3	Simulation der Mutanten im Molekülmodell .....	117
4.3.4	SCHLUßFOLGERUNGEN ZUR CHROMOPHORBINDUNG IN CBP-LOV2 .....	125
<b>4.4</b>	<b>DIE LICHTVERMITTELTE PHOSPHORYLIERUNGSREAKTION UND DIE KARTIERUNG VON PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN .....</b>	<b>126</b>
4.4.1.1	Abhängigkeit von der ATP-Menge .....	126
4.4.1.2	Die Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit im Dunkeln .....	128
4.4.1.2.1	Die Dunkelregeneration .....	128
4.4.1.2.2	Test auf zusätzliche lichtinduzierte posttranslationale Modifikationen bei Phototropin .....	133
4.4.2	LICHTINDUKTION .....	136
4.4.2.1	Lichtmenge .....	136
4.4.2.2	Lichtqualität .....	138
4.4.3	DIE BESTIMMUNG VON PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN IN PHOTOTROPIN .....	145
4.4.3.1	Die Phosphorylierung von heterolog exprimiertem Phototropin .....	145
4.4.3.2	Heterologe Expression und Phosphorylierung von Phototropin subdomänen .....	148
4.4.3.3	Generierung von Phosphorylierungsmutanten .....	153
4.4.3.3.1	In der N-terminalen Domäne .....	154
4.4.3.3.2	In der H1-Region .....	162
4.4.3.4	Die Überprüfung der ermittelten Phosphorylierungsstellen in Haferphototropin .....	167
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>175</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>205</b>



# 1 Einleitung

Umwelteinflüsse prägen Wachstum und Entwicklung von Pflanzen in entscheidender Weise. Eine ausreichende Versorgung mit Wasser, Kohlendioxid, Mineralstoffen und Licht ist ebenso unerlässlich wie z. B. Einflüsse von Temperatur oder Schwerkraft. Der Umweltfaktor Licht nimmt dabei einen sehr hohen Stellenwert ein. Die photoautotrophe Nutzung der Energie des Sonnenlichts in der Photosynthese stellt die Grundlage für das Leben auf der Erde dar. Gerade auch die Lichtwahrnehmung ermöglicht es Pflanzen, nicht zuletzt ihrer Ortsgebundenheit wegen, Informationen über ihre individuelle Umgebung sowie deren Veränderung zu empfangen und unmittelbar darauf zu reagieren. So sind zahlreiche morphologische Prozesse wie beispielsweise Chloroplastenbiogenese, Blühinduktion, Tropismen oder Keimung lichtgesteuert. Damit assoziiert sind lichtinduzierte Änderungen in Genexpression, Proteinaktivität und Zellmetabolismus. Höhere Pflanzen haben dazu eine Reihe von Lichtsensoren entwickelt. Diese sogenannten Photorezeptoren stellen als Chromoproteine Pigment-Protein-Komplexe dar und sind für unterschiedliche Lichtqualitäten sensibel. Bislang werden drei Photorezeptorklassen unterschieden: die rotes und dunkelrotes Licht absorbierende Familie der Phytochrome, die UV-A/Blaulicht-Rezeptoren und die UV-B-Rezeptoren.



**Abbildung 1: Ausschnitt aus dem Spektrum der elektromagnetischen Strahlung (Angaben nach Hesse *et al.*, 1991).** Farblich hervorgehoben ist der für den Menschen sichtbare Spektralbereich, darunter angegeben sind die bislang bekannten Photorezeptoren mit ihren spezifischen Wellenlängenbereichen.

Mit Ausnahme der Phytochrome, die bislang am längsten und intensivsten erforscht wurden, steht die Charakterisierung der übrigen Photorezeptoren noch am Anfang. Aufgrund der

aufwendigen Isolierung und des vielfältigen Zusammenwirkens der individuellen Rezeptoren ist es darüber hinaus nicht ausgeschlossen, daß es noch weitere, bislang unentdeckte Photorezeptorklassen gibt.

## **1.1 Die verschiedenen Photorezeptorsysteme**

### **1.1.1 Das Phytochromsystem**

In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde die Entdeckung des Phytochromsystems über erste Hinweise eingeleitet, daß Rotlicht eine entscheidende Rolle bei der Samenkeimung und Blühinduktion spielt. Phytochrom stellt bis heute das am längsten erforschte und physiologisch am genauesten beschriebene Photorezeptorsystem dar. In allen bislang untersuchten höheren Pflanzen hat man Phytochrome gefunden, ebenso ist es in zahlreichen Farnen, Moosen und Grünalgen nachgewiesen worden (Wada *et al.*, 1997). Diese im roten und dunkelroten Spektralbereich absorbierenden Photorezeptoren sind in eine Vielzahl biologischer Prozesse involviert, wie beispielsweise die Steuerung von Samenkeimung, Blattentwicklung und Blühregulation, aber Phytochrome können auch Gene auf Transkriptionsebene an- und abschalten.

Aufgebaut ist das Phytochrom-Apoprotein aus N-terminaler Chromophordomäne und zwei C-terminalen histidinkinaseähnlichen Domänen (Yeh *et al.*, 1998). Der Chromophor Phytochromobilin, ein offenkettiges Tetrapyrrol, wird autokatalytisch an ein konserviertes Cystein in der Chromophordomäne kovalent gebunden. Funktionell aktiv liegt das Phytochrom als Homodimer vor. Die molekulare Größe der Phytochrommonomere variiert, je nach Ursprungsorganismus, zwischen 120 und 130 kDa. Bislang konnten die Phytochromtypen A bis E identifiziert werden, die teils unabhängig und teils synergistisch arbeiten. Charakteristisch für Phytochrom ist seine Photokonversion (Borthwick *et al.*, 1951; Butler *et al.*, 1959): durch Rotlicht (660 nm) wird die physiologisch aktive P<sub>DR</sub>-Form gebildet, die durch Dunkelrotlicht (730 nm) wieder in die physiologisch inaktive P<sub>R</sub>-Form umgewandelt werden kann. Der Chromophor isomerisiert dabei von der Z- in die E-Form, und umgekehrt (Rüdiger & Thümmler, 1991; Rüdiger *et al.*, 1983; Thümmler *et al.*, 1983). Je nach Lichtverhältnissen liegt somit ein entsprechendes Photogleichgewicht vor. Interessanterweise zeigt die Phytochromfamilie Sensitivität für unterschiedliche Lichtintensitäten und -mengen, die jeweils mit spezifischen Reaktionen beantwortet werden (Björn, 1994). Gegenwärtige Arbeiten haben in erster Linie den Phytochrom-Signaltransduktionsweg zum Gegenstand, wobei u. a. Interaktionen mit heterotrimeren G-Proteinen, zyklischem GMP oder transkriptionellen Regulatoren diskutiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß Phytochrom mit dem phytochrombindenden Protein PKS1 (Fankhauser *et al.*, 1999) oder, in den Zellkern gewandert, mit dem nuklearen Protein PIF3

(Ni *et al.*, 1999) interagiert.

Phytochrom absorbiert auch im ultravioletten/blauen Spektralbereich. Klassische UV-A-/blaulichtvermittelte Reaktionen – beispielsweise die Unterdrückung des Sproßachsenwachstums, die Öffnung des Hypokotylhakens in *Arabidopsis thaliana* oder der Phototropismus – können auch in Einzelfällen unter Beteiligung von Phytochrom stattfinden (Liscum & Hangarter, 1991; Liscum *et al.*, 1992).

### **1.1.2 Die Cryptochrome**

Erst 1993 wurde von Ahmad & Cashmore über die *Arabidopsis-hy4*-Mutante, die in der blaulichtkontrollierten Hemmung des Hypokotyllängenwachstums beeinträchtigt war, der erste UV-A/Blaulicht-Photorezeptor – das Cryptochrom 1 oder CRY1 – identifiziert. Es handelt sich hierbei um ein 75 kDa großes Protein, das starke Sequenzhomologie zu bakteriellen DNS-Photolyasen, besonders an der Chromophorbindestelle, zeigt. Im Gegensatz zu den Photolyasen weist CRY1 eine zusätzliche Extension am C-Terminus auf. CRY1 zeigt jedoch keine meßbare Photolyaseaktivität und bindet, wenn in *E. coli* exprimiert, in einem 1 : 1-Verhältnis das Flavin FAD und das Pterin 5,10-Methenyl-tetrahydrofolat (MTHF) als Chromophore. Dies läßt vermuten, daß CRY1 in Pflanzen zwei Chromophore, analog zu den Photolyasen, bindet, jedoch wurde in früheren Studien Deazaflavin als Chromophor postuliert. Photochemisch bildet CRY1 bei bestimmten Redoxbedingungen ein stabiles FAD-Semichinon-Intermediat, das Grünlicht absorbieren kann und selbst rot erscheint. Somit wird die Beteiligung von Grünlicht im Wirkungsspektrum erklärt. Das *hy4/cry1*-Genprodukt ist außerdem involviert in die Keimblattentwicklung und die Kontrolle der Blaulichtinduktion der Anthocyan synthese durch Transkriptionsregulation der Chalkonsynthase und anderer Flavonoid-Biosynthese-Enzyme. Im Labor von Anthony Cashmore wurde noch ein weiteres Cryptochrom identifiziert (Lin *et al.*, 1996): ursprünglich wurde CRY2 als PHH1 aus *Sinapis alba*, später auch aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (Batschauer, 1993; Hoffmann *et al.*, 1996). CRY2 ist stark homolog zu CRY1: überexprimiert hat es die Chromophore FAD und MTHF gebunden und zeigt ebenso keine Photolyaseaktivität. Hauptsächlich unterscheidet es sich von CRY1 durch eine andere C-terminale Erweiterung. Es ist auch verantwortlich für die blaulichtabhängige Anthocyan synthese und Unterdrückung des Hypokotyllängenwachstums, wird aber durch hohe Blaulichtflußraten stark abgebaut. Das hauptsächlich im Schwachlicht aktive CRY2 ist an der Tageslängenmessung und Blühinduktion in *Arabidopsis* beteiligt und ist zudem in die circadiane Rhythmik involviert.

Cryptochrome wurden nicht nur in Pflanzen, sondern beispielsweise auch bei *Drosophila melanogaster*, Maus oder Mensch gefunden. Für Cryptochrome wird eine redoxgesteuerte Photoreaktion postuliert. In jüngster Zeit wurden Hinweise auf eine Lokalisation von

Cryptochromen im Zellkern gefunden (Cashmore *et al.*, 1999).

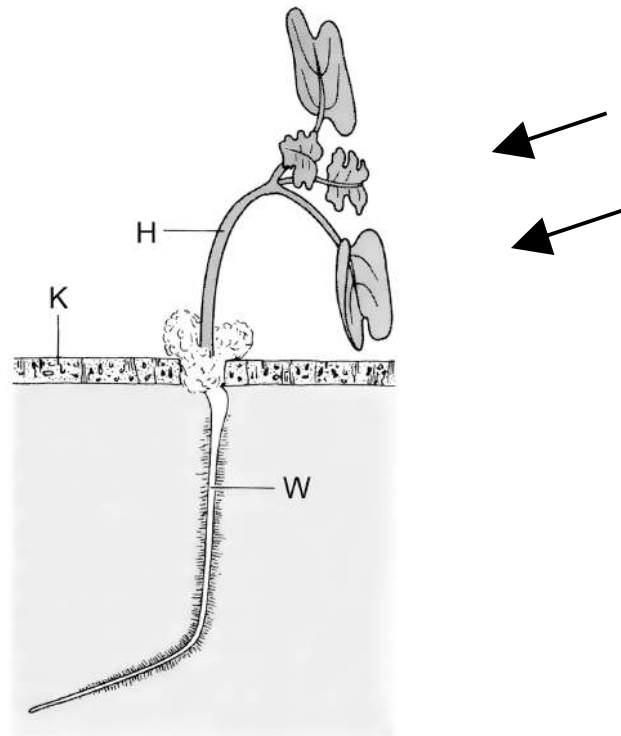
### **1.1.3 Andere UV-/Blaulicht-Rezeptoren**

Die durch Cryptochrom vermittelte Hemmung des Hypokotyllängenwachstums ist nicht die einzige UV-A-/blaulichtregulierte Reaktion. Der Photorezeptor Phototropin ist maßgeblich am UV-A-/blaulichtinduzierten Phototropismus in Pflanzen beteiligt und wird, als Gegenstand dieser Arbeit, in den nachfolgenden Kapiteln erläutert. *Arabidopsis*-Doppelmutanten, die bei Blaubelichtung weder phototropisch noch mit unterdrücktem Hypokotyllängenwachstum reagieren, zeigen normales blaulichtvermitteltes Öffnen der Stomata (Lasceve *et al.*, 1999). Dies ließ auf mindestens einen weiteren Blaulichtrezeptor schließen. Jüngst wurde der Photorezeptor npl für die blaulichtaktivierte Chloroplastenbewegung gefunden (Jarillo *et al.*, 1998; Kagawa *et al.*, 2001). Des Weiteren existieren Hinweise auf einen UV-B-Rezeptor (Teramura, 1996).

## **1.2 Der Phototropismus**

Unter Phototropismus versteht man Wachstumsbewegungen ortsgebundener Pflanzen, die durch einseitigen Lichteinfall verursacht werden. Im Zusammenspiel mit dem Gravitropismus, der den Keimlingen den Weg entgegen bzw. den Wurzeln in Richtung der Schwerkraft weist, und mit der Nutation bei Dikotyledonen, die ungerichtete Orientierungsbewegungen darstellen, ist der Phototropismus als Richtungsgeber bei heranwachsenden Keimlingen entscheidend daran beteiligt, den Pflanzen den schnellsten Weg zur Lichtquelle zu weisen. Somit ist die Richtung des Sproßwachstums bei Keimlingen und jungen, noch nicht verholzten Pflanzen durch Licht beeinflussbar, bei älteren Pflanzen beschränken sich phototropische Bewegungen überwiegend auf die Ausrichtung der Blätter zum Licht (Hangarter, 1997), um letztendlich die optimale Lichtperzeption zur Photosynthese zu ermöglichen.

Phototropismus kann die sogenannte *positiv phototrope* Krümmungsbewegung von Koleoptilenspitzen zur Lichtquelle hin darstellen, aber ebenso ist die *negativ phototrope* Wachstumsreaktion der Wurzeln entgegengesetzt zur Lichtquelle eine phototropische Bewegung. Diaphototropismus (=Transversalphototropismus) tritt auf, wenn sich Blätter senkrecht zur Lichtrichtung einstellen (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: Phototropische Reaktion eines Senfkeimlings (*Sinapis alba*).**

Der Keimling, in einer Korkplatte (K) befestigt, schwimmt auf einer Nährlösung. Das Hypokotyl (H) hat positiv, die Wurzel (W) negativ phototropisch reagiert. Die Blätter haben sich transversalphototropisch eingestellt. Die Pfeile geben die Richtung der Lichtstrahlen an (nach Nultsch, 1996)

Phototropismus wird bei den meisten höheren Pflanzen durch UV-A/Blaulicht induziert, jedoch kann bei manchen Pflanzen auch Grünlicht wirksam werden, beispielsweise bei *Arabidopsis thaliana* und *Lactuca sativa* (Steinitz *et al.*, 1985). Ebenso kann Rotlicht den Phototropismus modulieren oder wirkt selbst phototropisch (Wada & Kadota, 1989; Iino *et al.*, 1984; Parker *et al.*, 1989).

## 1.2.1 Die Geschichte des Phototropismus

### 1.2.1.1 Die Entdeckung und erste Studien

Charles Darwin unternahm 1881 als erster Krümmungsversuche mit Tageslicht an Graskeimlingen (*Phalaris spec.*; Glanzgras), wobei er feststellte, daß die Keimlinge, die in völliger Dunkelheit vertikal wachsen, sich bei einseitiger Belichtung in die Richtung der Lichtquelle krümmen. Ebenso lokalisierte er die höchste phototropische Sensitivität in der Koleoptilenspitze. Kurz darauf machte Julius Sachs den blauen Anteil des elektromagnetischen Lichtspektrums für die phototropische Krümmungsreaktion verantwortlich (Sachs, 1887). Etwa 50 Jahre später wurde von Johnston (1934) bestätigt, daß der rasche Phototropismus bei Haferkoleoptilen eine UV-A-/blaulichtvermittelte Reaktion

ist. Dabei entstanden erste verlässliche Aktions-/Wirkungsspektren, bei denen die Krümmungsreaktion von Haferkoleoptilenspitzen bei unterschiedlichen Anregungswellenlängen gemessen wurde. Ebenfalls in den 30er Jahren fand man erste Hinweise auf das rot-/dunkelrotabsorbierende Phytochromsystem und gelangte damit zu der Erkenntnis, daß in Pflanzen wohl verschiedene Photorezeptorsysteme vorliegen können. Mit der Pigmentanalyse der Haferkoleoptile (Wald & DuBuy, 1936) begann eine jahrzehntelange Kontroverse über die Anzahl und Natur des Chromophors für den Rezeptor des UV-A-/blaulichtabhängigen Phototropismus: in den folgenden Jahrzehnten wurden Pterine, Flavine, Retinal und Carotinoide diskutiert. Doch trotz jüngster Hinweise auf ein Flavin steht die Isolierung des pflanzlichen Phototropinrezeptors und damit des dazugehörigen Flavinchromophors noch aus. Auf der anderen Seite standen ab den späten 50er Jahren Bemühungen, die phototropische Krümmungsreaktion eingehend zu studieren (Briggs, 1960), wobei bis heute unklar ist, wie die unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven (siehe unten) zustande kommen und wieviele Photorezeptoren daran beteiligt sind. Ende der 80er Jahre erst wurde die UV-A-/blaulichtabhängige Phosphorylierung eines 120-kDa-Plasmamembranproteins in Erbse (Gallagher *et al.*, 1988) entdeckt. In den folgenden Jahren wurde dieses Phänomen bei verschiedenen anderen höheren Pflanzen beobachtet und als universell vermutet (Reymond *et al.*, 1992b). Erst weiterführende molekularbiologische und genetische Studien in jüngster Zeit lieferten das Werkzeug, um den Photorezeptor für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus immer genauer charakterisieren zu können.

### 1.2.1.2 Dosis-Effekt-Beziehungen und die Frage nach der Anzahl der verantwortlichen Photorezeptoren

Der blaue und der UV-A-Anteil des Lichtes induzieren phototropische Reaktionen. Studiert wurden diese vor allem an der Krümmungsbewegung von Koleoptilen in Richtung zur Lichtquelle, gelten aber gleichermaßen auch für die Hypokotyle der dikotylen Pflanzen (Short *et al.*, 1992). Bei der Messung der Koleoptilenkrümmungsreaktion bei einer bestimmten Wellenlänge unter steigender Photonendichte (appliziert in kurzen UV-A-/Blaulichtpulsen bis 120 s) der sogenannten Dosis-Wirkungs-Kurve, konnten unterschiedliche Krümmungsmaxima unterschieden werden (MacLeod *et al.*, 1985). Dazu gehören die sogenannte erste und zweite positive Krümmung. Bei Hafer liegt zwischen diesen Reaktionen eine schwächere Krümmungsreaktion, die sogar ins Negative reichen kann und deshalb als erste negative Krümmung bezeichnet wurde. Bei vielen Pflanzen ist diese Reaktion jedoch nicht so stark ausgeprägt oder gar nicht vorhanden, z. B. beim Mais (Iino *et al.*, 1984).

Die erste positive Krümmung ist eine hochgradig sensitive und ausschließliche Krümmung der Koleoptilenspitze, die bereits bei sehr geringem Lichtfluß eintritt. So beginnt sie bei Mais

bei  $0,1 \mu\text{mol m}^{-2}$  und das Maximum liegt bei  $8 \mu\text{mol m}^{-2}$ . Hafer ist sensitiver und zeigt bereits erste positive Krümmung ab  $0,003 \mu\text{mol m}^{-2}$  und weist ein Maximum bei  $0,3 \mu\text{mol m}^{-2}$  auf (Iino, 1988b). Die erste positive Krümmung ist ausschließlich vom Lichtfluß abhängig und unterliegt der Bunsen-Roscoe-Reziprozität. Diese besagt, daß stets gleiche phototropische Effekte durch insgesamt gleichen Lichtfluß erzielt werden. Der Lichtfluß stellt das Produkt aus Belichtungszeit und Lichtflußrate dar, die jedoch individuell variieren können. Nur in der Koleoptilenspitze findet man einen linearen Zusammenhang zwischen eingestrahelter Photonendichte und resultierendem Krümmungswinkel. Die Koleoptilenspitze ist phototropisch am sensitivsten und reagiert am schnellsten und ausgeprägtesten mit Krümmung (Baskin *et al.*, 1985). Franssen *et al.* (1982) zeigten überdies, daß die gesamte Koleoptile, wenn auch weniger stark, auf Blaulicht mit Krümmung reagiert, wenn die Spitze entweder abgedunkelt oder entfernt wurde. Genauer noch wurde von MacLeod *et al.* (1984) demonstriert, daß bei Punktbelichtung unterschiedlicher, scharf umgrenzter Segmente der Koleoptilenbasis nur jeweils in dem belichteten Segment eine Krümmung zu beobachten war. Somit reagiert jede Stelle der Koleoptile unabhängig und kann auf Blaulicht antworten. Die zweite phototropische Krümmung ist eine weniger sensitive, vor allem aber zeitabhängige Reaktion. Sie erstreckt sich von der Koleoptilenspitze bis in die basalen Bereiche (Briggs, 1960). Hier liegt ein linearer Zusammenhang zwischen Belichtungsdauer und resultierendem Krümmungswinkel vor, wobei die Photonendichte nur mehr geringen Einfluß nimmt.

Die unterschiedlichen phototropischen Krümmungen, die in vielen Pflanzen untersucht wurden, können noch nicht zufriedenstellend erklärt werden, wobei verschiedene Hypothesen bezüglich der Anzahl der beteiligten Photorezeptoren aufgestellt wurden: Everett und Thimann (1968) folgerten, da die Wirkungsspektren der ersten und zweiten positiven Krümmung starke Ähnlichkeit aufweisen, daß beide Mechanismen einen ähnlichen, wenn nicht sogar den gleichen Chromophor haben könnten. Wurden *Arabidopsis thaliana*-Keimlinge alle 15 Minuten mit Blaulichtpulsen bestrahlt, erhielt man nur eine einzige, dem Reziprozitätsgesetz gehorchende Krümmungsreaktion. Nach jeder dem Blaulichtpuls folgenden Dunkelinkubation erfolgte bei erneuter Belichtung eine stärkere Krümmungsreaktion als zuvor (Steinitz und Poff, 1986). Dies deutete auf einen einzigen Photorezeptor für beide Krümmungsreaktionen hin, die als kinetische Aspekte interpretiert werden könnten. Iino (1987) postulierte, daß die erste positive Krümmung einen Teil der zweiten positiven Krümmung darstellt und beide dasselbe Photorezeptorsystem teilen. Letztere wird durch die in der Natur vorliegende Dauerbelichtung induziert. Demgegenüber wurde von Iino (1988b) wiederum postuliert, daß man in der Koleoptilenspitze vier verschiedene Krümmungen findet, die von unterschiedlichen Photosystemen vermittelt werden. Zimmermann und Briggs (1963a und b) oder auch Konjevic *et al.* (1989) vermuteten

ebenso mehrere Photorezeptoren.

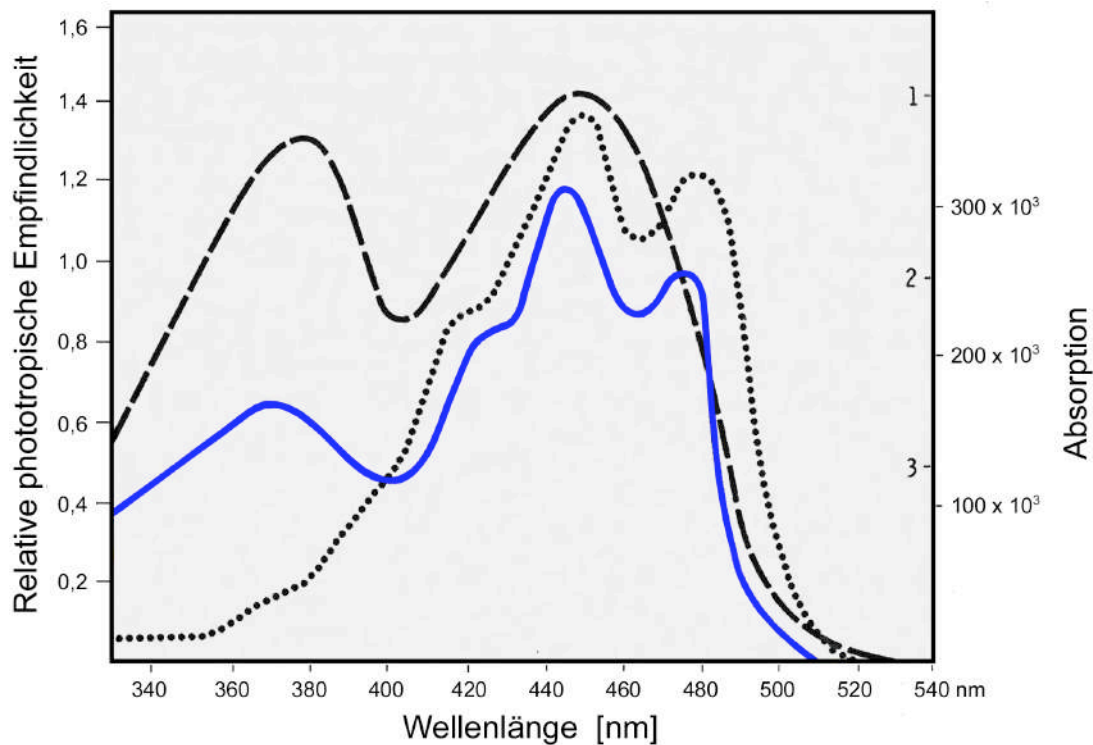
Phototropische Reaktionen werden auch von anderen Photorezeptoren beeinflusst. Rote Lichtanteile wirken über Phytochrom modulierend auf den Phototropismus oder sind selbst phototropisch aktiv, z. B. in niederen Pflanzen (Wada und Kadota, 1989), im Maismesokotyl (Iino *et al.*, 1984) oder bei der Erbse (Parker *et al.*, 1989). Weil Phytochrom zusätzlich auch im blauen und ultravioletten Spektralbereich absorbiert, war es schwierig, viele UV-/blaulichtvermittelte Prozesse isoliert zu studieren. Rotes Licht verändert die Zellwachstumsrate (MacLeod *et al.*, 1986). Bei mit Rotlicht vorbehandelten Pflanzen verschiebt sich die erste positive Krümmung zu höheren Blaulichtphotonendichten und die zweite positive Krümmung wird sensitiver (Chon & Briggs, 1966). Hauptsächlich Phytochrom A verstärkt die erste phototropische Reaktion, wohingegen Phytochrom B die zweite positive Krümmung erhöht. Bei beiden wurden auch Hinweise auf die Beteiligung anderer Phytochrome gefunden (Hangarter, 1997). Eine Rotlicht-Vorbelichtung verkürzt die phototropische Reaktionszeit (Janoudi *et al.*, 1992), wobei eine sofortige, an die Rotlichtbehandlung anschließende Dunkelrotbelichtung die Wirkung aufhebt. Der durch Rotlicht induzierte Phototropismus kann durch anschließende Dunkelrotbelichtung inhibiert werden und weist allgemein eine andere Kinetik auf als der UV-A-/blaulichtvermittelte Phototropismus. Demnach sollten die genannten Reaktionen von Phytochrom und einem Blaulichtrezeptor ausgelöst werden. Bei der Untersuchung der UV-A-/blaulichtinduzierten phototropischen Reaktionen wurde demzufolge mit Rotlicht als Schutzlicht gearbeitet, um phytochrominduzierte Reaktionen in Dunkel- und UV-A-/Blaulichtproben konstant zu halten.

### 1.2.1.3 Die Natur des Chromophors

Trotz der sehr frühen Erkenntnis, daß Blaulicht den Phototropismus hervorruft, konnte die Natur des Chromophors oder der Chromophore des Photorezeptors für den UV-A/blaulichtvermittelten Phototropismus noch nicht offengelegt werden. Bis heute wurde zudem der Photorezeptor aus Pflanzen noch nicht isoliert, womit eine Identifikation des/der Chromophors/-e verknüpft wäre. Als mögliche Chromophore wurden über die letzten 65 Jahre immer wieder Carotinoide vermutet (Wald & DuBuy, 1936; Quinones & Zeiger, 1994; Quinones *et al.*, 1996). In den 40er Jahren wurden außerdem Flavine (Galston, 1949; Galston, 1950) als blaulichtabsorbierende Pigmente gefunden und kontrovers zu den Carotinoiden diskutiert. Jüngere Studien stießen auch auf Pterine (Galland & Senger, 1988) und Retinal (Lorenzi *et al.*, 1994). Am wahrscheinlichsten galten jedoch die Carotinoide und Flavine: beide wurden in höheren Mengen in der Haferkoleoptile nachgewiesen (Wald & DuBuy, 1936; Galston, 1949). Vor allem aber stellte das Aktionsspektrum der ersten positiven phototropischen Krümmung (Shropshire & Withrow, 1958, siehe auch Abbildung 3, blaue Linie) eine Kombination aus den Absorptionsspektren von freiem Flavin (siehe



Abbildung 3, gestrichelte Linie) und Carotinoid (siehe Abbildung 3, punktierte Linie) dar.



**Abbildung 3: Aktionsspektrum der phototropischen Empfindlichkeit der Avena-Koleoptilenspitze (blaue Linie).**

Zum Vergleich sind die Absorptionsspektren des  $\beta$ -Carotins in Hexan (punktierte Linie) und des Riboflavins (gestrichelte Linie, nach Nultsch, 1996) abgebildet.

Im blauen Wellenlängenbereich wies das Aktionsspektrum des Phototropismus die typische Feinstruktur eines Carotinoides mit einem Hauptmaximum bei etwa 450 nm und mit Schultern bei ca. 420 und 480 nm auf. Ebenso konnte darin das breite Flavinmaximum bei etwa 370 nm wiedergefunden werden. 1987 wurde von Baskin und Iino ein Aktionsspektrum für den Phototropismus im Lichtflußbereich der ersten positiven Krümmung ( $5 \mu\text{mol m}^{-2}$ ) und erstmalig im Wellenlängenbereich von 260-530 nm von *Alfalfa* erstellt. Dabei konnte ein zusätzliches ausgeprägtes Maximum bei 280-290 nm gefunden werden, das wiederum auf ein Flavin, das bei diesen Wellenlängen absorbiert, als möglichen Chromophor hindeuten würde. Jedoch wurde aufgrund der bei Wellenlängen unterhalb 300 nm weniger stark ausgeprägten Krümmungsreaktion angenommen, daß entweder inhibitorische Photoreaktionen, ein anderer Photorezeptor oder UV-A/-B-induzierte Schäden zum Tragen kommen und deshalb nach wie vor von einem unabhängigen UV-A/Blaulichtrezeptor gesprochen wird. Von einem durch fernes UV-Licht induzierten Phototropismus in Hafer wurde bereits 1956 von Curry *et al.* berichtet. Ob es sich dabei um denselben Photorezeptor handelte, konnte mit diesen Daten nicht gezeigt werden. Everett & Thimann verglichen 1968 die Aktionsspektren von erster und zweiter positiver phototropischer Krümmung und führten

sie auf den gleichen Photorezeptor zurück. Später wurde die Carotinoidhypothese durch die Entdeckung geschwächt, daß bei der Maismutante *w3*, die unveränderte phototropische Reaktionen zeigte, durch das Fehlen des Enzyms Phytoendesaturase die Carotinoidbiosynthese unterbrochen ist (Palmer *et al.*, 1996). Obwohl durch all diese physiologischen und biochemischen Studien ein Flavin als potentieller Chromophor zu begünstigen wäre, wurde dadurch die Natur des Chromophors noch nicht geklärt.

### 1.2.1.4 Die phototropische Wachstumskrümmung – blaulichtinduzierte differentielle Hemmung (Blaauw) oder Zunahme des Wachstums (Cholodny und Went)

Die phototropische Krümmungsbewegung wird durch differentielles Längenwachstum ermöglicht. Wie jedoch Blaulicht physiologisch wirksam wird und letztendlich eine Wachstumskrümmung daraus resultiert, liegt noch weitgehend im Dunkeln, was auch einige sehr unterschiedliche Hypothesen vermitteln.

Aufgrund der Beobachtung, daß Blaulicht das Zellwachstum bei Pflanzen hemmen kann, bewirkt nach der Theorie von *Blaauw* allein die unterschiedliche Blaulichtintensität und damit verbunden die unterschiedliche Wachstumshemmung bereits die phototropische Krümmung von der belichteten zur unbelichteten Koleoptilenseite: die Zellen auf der belichteten Seite werden in ihrem Wachstum stärker gehemmt als die Zellen zur unbelichteten Koleoptilenseite hin. Rich *et al.* (1985) hingegen fanden, daß das Hypokotylwachstum in Senf maßgeblich von den Phytochromen kontrolliert sein muß, denn bei unter Rotlicht angezogenem Senf wurde keine Wachstumsinhibition durch kontinuierlich bilaterales Blaulicht beobachtet. Andere Studien wiederum berichteten, daß eine Blaubelichtung von allen Seiten das Haferkoleoptilenstreckungswachstum weniger stark hemmt als einseitiges Licht. Wurde eine Koleoptilenseite stärker als die andere belichtet, konnte an der schwächer belichteten Seite keine Wachstumshemmung festgestellt werden (MacLeod *et al.*, 1984 und 1985). Insofern ist die Theorie, daß Blaulicht generell das Wachstum hemmt, nicht haltbar. Möglicherweise wird die phototropische Krümmungsreaktion durch einen Blaulichtgradienten verursacht, wobei auf der stärker belichteten Seite das Wachstum gehemmt wird. Ob aber auf der weniger stark belichteten Seite das Zellwachstum unverändert weiter stattfindet oder sogar gefördert wird, ist noch nicht geklärt. Ein direkter Nachweis der physiologischen Umsetzung eines Lichtgradienten zwischen der stark und der weniger stark belichteten Koleoptilenseite wurde von Salomon *et al.* (1997b) erbracht: zwischen belichteter und unbelichteter Seite der Koleoptile wird analog dem Lichtgradienten im gleichen Maß ein blaulichtinduzierter Phosphorylierungsgradient eines 116-kDa-Haferproteins (siehe 1.2.2) hervorgerufen. Dies könnte einen ersten Schritt in der Signalweiterleitung darstellen.

Veränderungen im Zellturgor konnten bei der Vermittlung der phototropen Wachstumsreaktion ausgeschlossen werden (Rich & Tomos, 1988). Bereits in den 20er

Jahren des letzten Jahrhunderts stellten Cholodny und Went ihre Hypothese zur Entstehung der phototropischen Krümmung auf, nach der unilaterales Blaulicht eine laterale Umverteilung eines Wachstumsregulators induziert und damit das Wachstum auf der belichteten Seite ab- und auf der unbelichteten Seite zunimmt.

In den 30er Jahren wurde mit dem Studium der phototropischen Krümmung (einer punktuell belichteten Koleoptilenspitze, bei der sich die phototropische Krümmung auch auf die unbelichteten basalen Bereiche überträgt) das Phytohormon Auxin entdeckt. Im *Avena*-Koleoptilenkrümmungstest ruft ein einseitiger Auxinüberschuß ein ähnliches Krümmungsverhalten wie bei der phototropischen Krümmung hervor. Bei Auxinen handelt es sich um von der 3-Indolessigsäure abgeleitete Verbindungen, die u. a. für das Zellstreckungswachstum verantwortlich sind. Sie werden im phototropisch sensitivsten Gewebe in der Koleoptilenspitze, dem Meristem, produziert und als Konjugat mit Zuckern oder Aminen an ihren Wirkungsort transportiert. Der Transport kann im Phloem stattfinden, aber auch ein Transport von Zelle zu Zelle ist, im Kambium oder in parenchymatischen Geweben, möglich. Bei den Koleoptilen findet somit nach Jones (1994) eine Umverteilung vom Produktionsort Koleoptilenspitze in die basalen Bereiche statt. Die Auxinwirkung kommt durch Bindung an spezifische Rezeptoren, die damit aktiviert werden, zustande. Auxinbindepoteine finden sich extrazellulär an der Außenseite der Plasmamembran und im endoplasmatischen Retikulum. Daß Auxin im Meristem gebildet wird und zur phototropischen Krümmung nötig ist, demonstrierten Britz & Galston 1983 an Erbse: sie entfernten die apikalen 5 mm des Keimlings und erst nach Auxinzugabe ließ sich eine Krümmungsreaktion herstellen. Die Stärke der phototropischen Reaktion wurde durch die Menge an internem Auxin begrenzt (Baskin *et al.*, 1986). Briggs zeigte 1963 aber auch, daß sich durch Blaulicht die Gesamtmenge an Auxin nicht änderte, womit eine blaulichtinduzierte Auxinsynthese ausgeschlossen werden konnte. Die Cholodny-Went-Hypothese konnte weiterhin an vielen Beispielen belegt werden (Pickard & Thimann, 1964; Iino & Briggs, 1984; Iino, 1991), wobei sogar im Bereich der ersten positiven Krümmung ein lineares Verhältnis von Auxinkonzentration und Wachstumsrate ermittelt wurde (Baskin *et al.*, 1986). Jedoch wurde auch Gegenteiliges gefunden: In *Helianthus annuus* konnte nach unilateraler Blaulichtgabe keine asymmetrische laterale Auxinverteilung festgestellt werden (Feyerabend & Weiler, 1988), dafür wird bei der Sonnenblume eine Beteiligung von Xanthoxin als Wachstumsinhibitor bei der phototropischen Krümmung diskutiert (Franssen, 1980; Feyerabend & Weiler, 1988). Obwohl die Sonnenblume bei den phototropen Reaktionen eine Ausnahmeposition einnimmt (Steyer, 1967), konnte auch bei Rettich (*Raphanus sativus*) bei einseitiger Belichtung auf der belichteten Keimlingsseite eine lichtinduzierte Synthese der Wachstumsinhibitoren Raphanusanin und Raphanusamid festgestellt werden (Noguchi *et al.*, 1986). Daß Auxin selbst nicht die phototrope Reaktion vermittelt, konnten Nick & Schäfer

(1994) bei kortikalen Mikrotubuli zeigen. Ob Auxin beim blaulichtvermittelten Phototropismus überhaupt nur eine verstärkende Rolle spielt oder doch eine wesentlichere Funktion einnimmt, konnte bislang noch nicht geklärt werden.

### **1.2.2 Die biochemische Charakterisierung der blaulichtvermittelten Proteinphosphorylierung**

Gallagher *et al.* publizierten 1988, daß in mikrosomalen Membranen, die aus etiolierten Erbsenkeimlingen präpariert worden waren, hauptsächlich ein 117-kDa-Erbsenprotein *in vitro* in Gegenwart des  $\gamma$ -Phosphates von ATP durch Weiß- bzw. spezifisch Blaulicht (Short & Briggs, 1990) phosphoryliert werden konnte. Diese blaulichtvermittelte Phosphorylierung war am stärksten, wenn etiolierte Pflanzen verwendet wurden. Auch wurde eine Verknüpfung zwischen der Stärke der phototropischen Krümmung und der blaulichtvermittelten Phosphorylierungsstärke des 117-kDa-Proteins beobachtet. Das gleiche Erbsenprotein konnte auch *in vivo* lichtvermittelt phosphoryliert werden: nach Aufnahme von radioaktivem Orthophosphat wurde in etiolierten Keimlingen durch *in vivo* Belichtung eine blaulichtvermittelte Phosphorylierung mit endogen synthetisiertem radioaktivem ATP von gleichem Molekulargewicht nachgewiesen (Gallagher *et al.*, 1988). Der dramatische Rückgang der *in vitro* Phosphorylierbarkeit des blaulichtabhängig phosphorylierbaren Proteins unmittelbar nach *in vivo* Belichtung wurde durch eine Besetzung der Phosphorylierungsstellen *in vivo* mit endogenem ATP erklärt (Short *et al.*, 1992). Daraus konnte die Möglichkeit abgeleitet werden, den *in vivo* Phosphorylierungszustand unter verschiedenen Bedingungen, wie beispielsweise Belichtung mit unterschiedlichen Photonenmengen, indirekt zu bestimmen: durch radioaktive *in vitro* Phosphorylierung mit sättigendem Lichtfluß wurden alle noch nicht *in vivo* phosphorylierten Stellen besetzt, sodaß über die Differenz zwischen der *in vitro* Phosphorylierungsstärke von einer *in vivo* unbelichteten und der belichteten Probe der *in vivo* Phosphorylierungsgrad ermittelt werden konnte (Salomon *et al.*, 1997b). Verglichen mit der *in vivo* Phosphorylierung war der Schwellenwert für die *in vitro* Phosphorylierung zu größeren Photonendichten hin verschoben (Short *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1993a).

Anhand der *in vivo* durchgeführten Dosis-Wirkungs-Kurven im Bereich zwischen 0,2 und 200  $\mu\text{mol m}^{-2}$  Photonen konnte eine Korrelation zur ersten positiven phototropischen Krümmung hergestellt werden. Dies wurde durch die Dosis-Wirkungs-Kurven bezüglich der Phosphorylierungsstärke bestätigt, die ebenfalls der Bunsen-Roscoe-Reziprozität gehorchten und durch die Wiederherstellung der vollständigen Phosphorylierbarkeit des Proteins nach Blaulichtgabe im Vergleich zur erneuten Krümmbarkeit der Koleoptilen (Short & Briggs, 1990; Hager & Brich, 1993; Palmer *et al.*, 1993b) untermauert wurden. Demnach folgen beide Antworten einer Photochemie erster Ordnung.

### 1.2.2.1 Vorkommen und Lokalisierung

Das blaulichtvermittelt phosphorylierbare Protein ist im Pflanzenreich weit verbreitet, denn es konnte in jeder analysierten Pflanze gefunden werden. Bei Monokotyledonen wurden für dieses Protein Molekulargrößen von 110-116 kDa ermittelt, wohingegen bei dikotylen Pflanzen die Tendenz zu höheren Molekulargewichten bis 130 kDa vorhanden ist (Reymond *et al.*, 1992a). Wurden zu Phosphorylierungsstudien Rohextrakte aus Koleoptilengewebe, nach vorheriger Entfernung des Primärblattes, eingesetzt, zeigte sich über 100 kDa keine Phosphorylierung irgendeines anderen Proteins, die möglicherweise die blaulichtvermittelte Phosphorylierung überdecken könnte (Salomon *et al.*, 1997a). Short *et al.* (1992) konnten nach *in vivo* Phosphorylierung, Präparation von Zellrohextrakts und anschließender Ultrazentrifugation eine Anreicherung des lichtabhängig phosphorylierbaren 117-kDa-Proteins in der Membranfraktion finden. In der Fraktion der löslichen Zellbestandteile war dieses Protein nur in minimalen Mengen, bezogen auf die gleiche Gesamtproteinmenge, vorhanden.

Plasmamembranen stellten eine weitere Aufreinigungsstufe dar: von Gallagher *et al.* (1988) wurde erstmals ermittelt, daß bei der Fraktionierung über einen Sucrosegradienten das blaulichtvermittelt phosphorylierbare Protein mit der Plasmamembranfraktion mitgereinigt wurde. Short *et al.* (1993) isolierten alternativ über ein wäßriges Zweiphasensystem Erbsen-Plasmamembranvesikel und lokalisierten darin ebenfalls angereichert das 117-kDa-Protein. Bei letzterer Plasmamembranpräparation lagen die Vesikel nativ orientiert vor und erst durch Solubilisierung mit Triton-X-100 oder CHAPS konnte eine maximale Steigerung der blaulichtvermittelten *in vitro* Phosphorylierung erzielt werden. Dies ließ darauf schließen, daß die Phosphorylierung mit radioaktivem ATP erst nach Aufbrechen der Plasmamembranvesikel möglich war und demzufolge das 117-kDa-Protein an der Plasmamembraninnenseite lokalisiert war. Bestätigt wurde dies durch mehrere Einfrier- und Auftauzyklen der Plasmamembranen: dadurch lagen 50 % nativ orientierte und 50 % invers orientierte Vesikel vor. Hier konnte im detergensfreien Ansatz nach Zugabe von radioaktivem ATP beobachtet werden, daß nur zu 50 % blaulichtvermittelte *in vitro* Phosphorylierung des 117-kDa-Proteins stattfindet. Dies ist auf die Zugänglichkeit des Proteins auf der Außenseite der invers orientierten Plasmamembranvesikel zurückzuführen. (Short *et al.*, 1993). Salomon *et al.* (1996) zeigten, daß sich die Eigenschaften des Proteins mit der Entwicklungsstufe der Keimlinge änderten: während das 110-kDa-Haferprotein nur im anfänglichen Entwicklungsstadium (3 Tage alte Keimlinge) stark an die Membran gebunden ist, schien sich diese Bindung später (5 Tage alte Keimlinge) abzuschwächen. In Mais schien in allen Entwicklungsstufen eine schwächere Membranassoziation vorzuliegen. Nach neueren Daten weist das blaulichtvermittelt phosphorylierbare Protein in seiner Sequenz keinerlei membrangängige Bereiche auf und besitzt die Eigenschaften eines löslichen Proteins, ist

aber dennoch vorwiegend plasmamembranassoziiert (Huala *et al.*, 1997). Die Natur dieser Assoziation muß noch geklärt werden.

Bei Monokotyledonen wurde zunächst das blaulichtabhängig phosphorylierbare Protein im phototropisch sensitivsten Gewebe, der Koleoptilenspitze, indirekt über blaulichtvermittelte radioaktive Phosphorylierung gefunden. Analog zur basipetal abnehmenden phototropischen Sensitivität konnte dieses Protein entlang der Koleoptilen von Hafer und Mais mit von der Spitze zur Basis abnehmender Phosphorylierungsstärke nachgewiesen werden: Palmer *et al.* (1993b) beschrieben mittels einer groben Segmentierung der Maiskoleoptilen die basipetale Abnahme des blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Proteins. Eine sehr exakte Ermittlung der Gewebespezifität der blaulichtvermittelten radioaktiven Phosphorylierung des 110-kDa-Proteins in Hafer wurde von Salomon *et al.* (1997b) mit einer neu etablierten Schnellmethode zur *in vitro* Phosphorylierung durchgeführt. Die Verteilung der Phosphorylierung nahm exponentiell entlang der Koleoptile von der Spitze zur Basis hin ab, wobei 50 % der Phosphorylierung in den apikalen 5 mm der Koleoptile, aber auch noch ca. 5% in der Basis lokalisiert waren. Dies bedeutete – die Phosphorylierungsstärke als Maß für den Proteinnachweis und die Proteinkonzentration vorausgesetzt –, daß das blaulichtabhängig phosphorylierbare Protein zwar in seiner Hauptmenge in der Koleoptilenspitze zu finden ist, aber über die gesamte Koleoptile nachweisbar ist. Dies korrelierte mit frühen Arbeiten von MacLeod (1984), der in der Koleoptilenbasis phototropische Sensitivität nachwies. Für Dikotyledonen liegen keine exakten Daten vor: lediglich Short & Briggs (1990) haben an 7 Tage alten etiolierten Erbsenkeimlingen ermittelt, daß in der apikalen Knospe kein blaulichtabhängig phosphorylierbares Protein bzw. vom oberen Internodium über das Nodium zum unteren Internodium blaulichtabhängig phosphorylierbares Protein in abnehmender Stärke nachweisbar war. Bei Dikotyledonen schien die Phosphorylierbarkeit im oberen Internodium eher gleichmäßig verteilt zu sein (Short *et al.*, 1992). Ein direkter Nachweis des Proteins und eine exakte Quantifizierung, vor allem bei Dikotyledonen, war in diesen Studien noch nicht erfolgt.

### 1.2.2.2 Die Eigenschaften der Phosphorylierungsreaktion und mögliche Gründe für eine Autophosphorylierung

Die Phosphorylierungsreaktion an sich verläuft sehr rasch; Gallagher *et al.* (1988), Palmer *et al.* (1993a) und Hager (1996) berichten von ein bis zwei Minuten. Das pH-Optimum für schnellstmögliche *in vitro* Phosphorylierung liegt bei Hafer bei pH 8,0 (Zacherl, 1997), bei Mais bei pH 7,8 (Hager & Brich, 1993) und bei Erbse bei pH 7,5 (Short *et al.*, 1994). Die zusätzliche Gabe von 5 mM  $Mg^{2+}$  zur Phosphorylierung ist essentiell (Zacherl, 1997), um mit ATP einen Komplex zu bilden. Zweiwertiges Kalzium, das von vielen bekannten Kinasen benötigt wird, ist zur blaulichtabhängigen Phosphorylierung nicht erforderlich (Palmer *et al.*,

1993a, Short *et al.*, 1994). Die blaulichtvermittelte Proteinphosphorylierung konnte mit dem Einsatz von Flavininhibitoren stark herabgesetzt werden (Short *et al.*, 1992; Warpeha *et al.*, 1992). Dies favorisierte wiederum die Flavine als mögliche Chromophore (siehe 1.2.1.3). Ebenso konnte die Phosphorylierungsstärke durch den Einsatz von Reduktionsmitteln gesteigert (Hager *et al.*, 1993) werden. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Thiolreagenzien blockiert (Rüdiger & Briggs, 1995). Je lipophiler die eingesetzten Thiolreagenzien waren, umso effektiver unterdrückten sie die blaulichtvermittelte Phosphorylierung. Dies läßt auf eine hydrophobe Umgebung des lichtperzipierenden Teils des Photorezeptors und die Beteiligung von SH-Gruppen schließen.

Die Vorstellung von der Proteinphosphorylierung durch Blaulicht läßt sich wie folgt beschreiben: Im einfachsten Fall sind neben dem zu phosphorylierenden Substrat auch der gesuchte Photorezeptor und eine Kinase nötig. Daß, wie oben ausgeführt, das Substrat in den phototropisch sensitivsten Geweben am stärksten nachweisbar ist, läßt vermuten, daß auch der Photorezeptor selbst und die dadurch aktivierte Kinase in unmittelbarer Nähe, wenn nicht sogar, aufgrund der schnellen Phosphorylierungsreaktion, in einem gemeinsamen Reaktionskomplex zu finden sein müssen. Für diese Annahme spricht, daß in Erbsenmembranvesikel aus etiolierten Keimlingen, über native Gelelektrophorese aufgetrennt und bei Inkubation dieses Gels in mit radioaktivem ATP versetztem Puffer, ein etwa 335 kDa schwerer Komplex nur durch Blaulichtgabe phosphoryliert werden konnte. Nach einer angeschlossenen zweiten, denaturierenden SDS-PAGE konnte ein radioaktives 117-kDa-Protein nachgewiesen werden, das dem blaulichtabhängig phosphorylierten Protein aus Erbse vom Molekulargewicht entsprach (Warpeha & Briggs, 1993). Somit konnte für diesen 335-kDa-Reaktionskomplex eine Kinaseaktivität gezeigt werden.

Andere Beobachtungen gehen jedoch noch einen Schritt weiter: bei Zugabe von Triton-X-100 zur Phosphorylierungsreaktion wurde eine Steigerung der Phosphorylierung beobachtet (Short *et al.*, 1993). Somit sollte ein postulierter Reaktionskomplex äußerst stabil sein und durch das nichtionische Detergens nicht funktionell beeinträchtigt werden. Die Phosphorylierungsreaktion findet auch bei 0 °C in vollem Maß statt (Hager, 1996), wohingegen bei diesen Bedingungen andere Phosphorylierungen nicht durchführbar waren, da vermutlich die durch die herabgesetzte Temperatur minimierte Anzahl der effizienten Molekülzusammenstöße zwischen Kinase und Substrat nicht ausreichte. Die beiden letzten Beobachtungen würden aber auch auf eine Rezeptorkinase, die sich autophosphoryliert, zutreffen. Für ein Vorhandensein von Kinaseaktivität des blaulichtabhängig phosphorylierbaren Proteins spricht, daß innerhalb dieses Proteins mit einem ATP-Analogen eine ATP-Bindestelle, wie sie jede Kinase besitzt, lokalisiert werden konnte (Palmer *et al.*, 1993a, Short *et al.*, 1993). Ein Reaktionskomplex scheint demnach weniger wahrscheinlich als vielmehr das Modell eines Photorezeptors, in dem Rezeptor, Kinase und Substrat in

einem Protein vereint sind und der möglicherweise autophosphoryliert wird.

Eine Kreuzphosphorylierung, d. h. eine Übertragung der Phosphorylierung von belichteten Plasmamembranen auf unbelichtete Plasmamembranen einer anderen Pflanzenart, wie zunächst von Reymond *et al.* (1992a) publiziert, konnte von Hager (1996) nicht reproduziert werden. Ob nun tatsächlich eine intramolekulare Autophosphorylierung oder sogar eine Phosphorylierung innerhalb eines Photorezeptormultimers vorliegt, bedarf noch genauer Untersuchung.

### 1.2.2.3 Die Phosphorylierungsstellen

Zur Bestimmung der Art der Phosphorylierungsstellen wurden nach Totalproteolyse des phosphorylierten Proteins die Phosphoaminosäuren bestimmt: bei Mais und Erbse wurde hauptsächlich Phosphoserin und in sehr geringem Umfang Phosphothreonin gefunden (Palmer *et al.*, 1993a; Short *et al.*, 1994) Daß nach dem proteolytischen Verdau verschiedene Phosphopeptide gefunden wurden, läßt vermuten, daß die Phosphorylierung an mehreren Stellen (Short *et al.*, 1992 und 1994) stattfindet. Auch wurde von Briggs (1996) eine unterschiedliche Sensitivität einzelner Phosphorylierungsstellen vermutet. Eine genaue Lokalisation und die Bestimmung der Anzahl der Phosphorylierungsstellen war in diesen Arbeiten nicht erfolgt.

### 1.2.2.4 Die Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit im Dunkeln

Adaptionsprozesse spielen bei der Regulation phototroper Reaktionen eine entscheidende Rolle. Nach Induktion der ersten positiven Krümmung kann eine dem Lichtpuls unmittelbar folgende Desensitivierungsphase beobachtet werden. Erst nach einer gewissen Regenerationszeit im Dunkeln kann erneut die gleiche lichtvermittelte Krümmung hervorgerufen werden (Briggs, 1960). Je nach Pflanze kann diese Dunkelregenerationszeit bis zu 30 Minuten dauern. Betrachtet man in den Koleoptilenspitzen bzw. im Hypokotyl über *in vitro* Phosphorylierung die *in vivo* Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit nach einem sättigenden *in vivo* Blaulichtpuls und anschließender *in vivo* Dunkelinkubation, so findet man das System bei Mais nach 30 Minuten (Palmer *et al.*, 1993b), bei Erbse nach 60 Minuten (Short *et al.*, 1992) und bei Hafer sogar erst nach 90 Minuten (Salomon *et al.*, 1997c) regeneriert. Die geringe Dauer für die Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit bei Mais mag zwar zur Wiederherstellung der Krümmbarkeit passen, jedoch sprechen experimentelle Unterschiede bei Mais und Erbse doch eher für eine Korrektur zu höheren Werten: die Bestimmung erfolgte an mikrosomalen Membranen, deren Präparationszeit allein bereits 60 Minuten oder mehr betrug, und es kann währenddessen eine partielle Regeneration des Phosphorylierungssystems und damit verbunden eine Verkürzung der Regenerationszeit nicht ausgeschlossen werden. Demgegenüber wurde bei Hafer mit Rohextrakten, die in 2,5



Minuten hergestellt waren, gearbeitet, und so konnten Präparationseffekte erheblich reduziert werden.

Ganz anders verhält sich die Dunkelregeneration der Phosphorylierbarkeit nach einem sättigenden Blaulichtpuls in der Haferkoleoptilenbasis. Nach etwa 20 Minuten ist die Phosphorylierbarkeit der Dunkelkontrolle erreicht, wohingegen nach etwa 90 Minuten Dunkelregeneration eine 3,5fache Steigerung der Phosphorylierungsstärke im Vergleich zur Dunkelkontrolle ermittelt wurde (Salomon *et al.*, 1997c).

Die Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit *in vitro* wurde von Palmer *et al.* (1993b) postuliert, wobei dafür das Verschwinden der radioaktiven Markierung nach etwa 20 Minuten Dunkelinkubation von dem *in vitro* radioaktiv blaulichtvermitteltem phosphoryliertem 114-kDa-Protein aus Maismembranen, unter Einsatz von Phosphatase- und Proteaseinhibitoren, herangezogen wurde. Andere Studien konnten eine unveränderte Phosphorylierungsstärke des *in vitro* blaulichtvermittelten, unter Ausschluß des Detergens Triton-X-100 phosphorylierten Proteins über 10 Minuten (bei Mais Hager & Brich, 1993) oder 40 Minuten (bei *Arabidopsis* Christie *et al.*, 1998) feststellen, wobei auch kein Phosphatumsatz detektiert werden konnte (Short *et al.*, 1992). Jedoch konnte noch nicht geklärt werden, ob tatsächlich die *in vitro* Wiederherstellbarkeit der Phosphorylierung an Membranen existiert, ob eine Phosphatase überhaupt vorhanden ist oder ob eine Proteindegradation, womöglich versuchsbedingt, vorliegt.

### 1.2.2.5 Erinnerungseffekt

Eine weitere Eigenschaft ist der Erinnerungseffekt des Photosystems. Short *et al.* (1992) zeigten, daß in *in vitro* Versuchen durch Blaulichtgabe der lichtvermittelte aktive Zustand, die sogenannte Phosphorylierungsbereitschaft, über längere Zeit andauern kann: Rohmembranen aus etioliertem Keimlingsmaterial, die frei von endogenem ATP vorliegen, wurden *in vitro* sättigend belichtet, und nach anschließender Dunkelinkubation konnte nach 10 Minuten bei 30 °C bzw. 20 Minuten bei 0 °C bzw. 1 Woche bei –80 °C radioaktiver Einbau festgestellt werden. Genauere Untersuchungen dieses Phänomens ergaben, daß noch nach 70 Minuten durch Zugabe von Triton-X-100 und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP eine erhöhte Phosphorylierung gegenüber der Dunkelkontrolle gemessen werden kann (in Hafer Salomon *et al.*, 1996, und in Mais Hager & Brich, 1993). Überdies kann nach 70 Minuten Dunkelinkubation hierbei durch einen zweiten sättigenden Lichtpuls und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP-Gabe noch 80 % (in Hafer) und 95 % (in Mais) *in vitro* Phosphorylierung im Vergleich zur Positivkontrolle – die *in vitro* Phosphorylierung unmittelbar nach der Blaulichtgabe – gemessen werden. Dieser sogenannte Erinnerungseffekt ist unabhängig von der Phosphorylierungsreaktion und bedeutet, daß der Photorezeptor während der langen Dunkelinkubationsdauer vom physiologisch aktiven Zustand langsam wieder in den Ausgangszustand übergeht und dabei

seine Phosphorylierbarkeit nicht verliert. Studien unter Verwendung von Triton-X-100 bereits bei der Belichtung (Palmer *et al.*, 1993b) implizieren Hinweise auf verstärkte Proteindegradation, da bereits nach 20 Minuten Dunkelinkubation kein meßbarer radioaktiver Einbau bei  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP-Gabe mehr stattfindet. Salomon *et al.* (1996) beschreiben einen negativen Einfluß von Triton-X-100 auf die Phototropinstabilität, der wahrscheinlich so den Phototropinabbau fördert.

#### 1.2.2.6 Die blaulichtvermittelte Mobilitätsreduktion

Erstmalig wurde von Short *et al.* (1993) beobachtet, daß nach Auftrennung von Erbsenmembranproben in SDS-PAGE eine Proteinbande der belichteten und somit phosphorylierten Probe eine deutliche Verschiebung zu höheren Molekülmassen im Vergleich zur Proteinbande der etiolierten Probe aufwies. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen die aus dem SDS-Gel ausgeschnittene 120-kDa-Bande konnte in Westernblotanalyse bestätigt werden, daß, neben einem zweiten, kleineren Protein, spezifisch ein 120-kDa-Protein erkannt wurde, das durch Belichtung in seiner Mobilität reduziert wurde und als weniger scharfe Bande zu erkennen war. Für *in vitro* phosphorylierte Proben konnte dies nicht reproduziert werden. Erweitert wurde diese Beobachtung durch Markierungsversuche mit dem ATP-Analogon FSBA, das kovalent in die Nukleotidbindetasche bindet und so über Anti-FSBA-Antikörper nachgewiesen werden kann. Damit konnte in den Membranen aus den belichteten Keimlingen in Westernblotanalyse das 120-kDa-Protein in Erbse und das 117-kDa-Protein in Mais nachgewiesen und eine verminderte Mobilität festgestellt werden (Short *et al.*, 1993; Palmer *et al.*, 1993b; Liscum & Briggs, 1995). Handelte es sich in beiden Fällen um das gleiche Protein, stellt es Kinase und Substrat in einem dar (siehe 1.2.2.2).

### 1.2.3 Genetische und molekularbiologische Charakterisierung des Phototropismus

#### 1.2.3.1 Mutantenstudien

Ende der 80er Jahre wurden phototrope Mutanten über die mutagene Substanz Ethylmethansulfonat generiert (Khurana & Poff, 1989; Khurana *et al.*, 1989). Als klassisches genetisches Studienobjekt diente *Arabidopsis thaliana*. Ziel der Bemühungen war es, Mutanten zu finden, die ausschließlich veränderten Phototropismus zeigten, keinesfalls jedoch in von anderen Blaulichtrezeptoren vermittelten Reaktionen eingeschränkt waren (siehe 1.1.2 und 1.1.3). Man stieß auf mehrere Mutantenlinien, die sich spezifisch in ihrer phototropischen Reaktion im Vergleich zum Wildtyp unterschieden und offenbar Komponenten des phototropischen Wirkungsmechanismus darstellten. Auch stellte sich heraus, daß bei verändertem Phototropismus der Gravitropismus beeinträchtigt sein kann

(Khurana & Poff, 1989). Von besonderem Interesse war die Mutante *jk224*: sie wies eine Erhöhung des Schwellenwerts für die erste positive Krümmung bei unveränderter zweiter positiver Krümmung auf. Dies wurde zunächst mit Veränderungen in der Photorezeptorkonzentration oder der Photorezeption, z. B. veränderte Chromophorbindung (Khurana & Poff, 1989), begründet. Bei genauerer Analyse wurde das Maximum der ersten positiven Krümmung der *jk224*-Mutante bei dem Lichtfluß der zweiten positiven Krümmung des Wildtyps – bei etwa  $9 \mu\text{mol m}^{-2}$  – lokalisiert. Bei Belichtung mit höheren Intensitäten bildet sich bei der Mutante das Maximum der zweiten positiven Krümmung, das im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist, bereits bei geringerem Lichtfluß aus. Somit ist die Reihenfolge der Maxima bei der *jk224*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp vertauscht (Konjevic *et al.*, 1992). Diese Beobachtungen bekräftigten die Hypothese von zwei Photorezeptoren oder zumindest Chromophoren.

Ein weiterer Meilenstein wurde von Liscum & Briggs (1995) gesetzt, die eine Reihe von phototropischen Nullmutanten beschrieben, die über Neutronenbeschuß erzeugt wurden. Aus der Vielzahl dieser Mutanten konnten insgesamt vier Mutantenlinien mit einem nicht mehr phototropen Hypokotyl ermittelt werden, die auf unterschiedliche Genloci zurückgehen und als *nph1*- bis *nph4*-Mutanten (engl. „*n*on *p*hototropic *h*ypocotyl“) bezeichnet wurden. Nach einer Korrelation der Genloci stellten sich einige der Poff-Mutanten als allelisch zu den *nph*-Mutantenlinien heraus, und im Zuge dessen wurde insbesondere *jk224* in *nph1-2* umbenannt. Zeigten die Poff-Mutanten nur veränderte Krümmungen, so wiesen die Nullmutanten gar keine phototropische, blaulichtvermittelte Krümmung mehr auf. Die unterschiedlichen Eigenschaften sind in der Mutantenherstellung selbst begründet: Khurana & Poff (1989) erzeugten bei *nph1-2* mit Ethylmethansulfonat höchstwahrscheinlich eine Punktmutation, die die Funktion des Rezeptors nur beeinträchtigt aber nicht auslöscht, wohingegen bei den durch Neutronenbeschuß erzeugten *nph1*-Mutanten Strangbrüche und größere Deletionen wahrscheinlich sind (Huala *et al.*, 1997).

### 1.2.3.2 Korrelation zwischen Mutantenstudien und blaulichtvermittelter Proteinphosphorylierung

Ein wesentlicher Schritt in der Identifizierung des Photorezeptors für den blaulichtvermittelten Phototropismus war die Verknüpfung der Ergebnisse der Phosphorylierungsstudien mit denen der Mutantenstudien: Reymond *et al.* (1992b) ermittelten bei *Arabidopsis thaliana nph1-2*-Mutanten, daß die verminderte erste phototropische Krümmung mit der reduzierten Phosphorylierungsstärke des blaulichtvermittelt phosphorylierten 120-kDa-Proteins verknüpft war. Liscum & Briggs (1995) bestätigten mit der phototropen *Arabidopsis* Nullmutante *nph1*, daß weder Blau-, Grün- noch Weißlicht phototropische Krümmungen oder Phosphorylierungen verursachen. Dies stellte einen starken Hinweis dar, daß das

Phosphorylierungsereignis am phototropischen Signaltransduktionsmechanismus beteiligt ist. Vielmehr noch schien es als blaulichtsensitiver und mutmaßlicher Photorezeptor auch am Anfang einer Signaltransduktionskette zu stehen, da die *nph2*- bis *nph4*-Mutanten (Liscum & Briggs, 1995) trotz fehlender phototropischer Krümmung sehr wohl eine blaulichtvermittelte Phosphorylierung des 120-kDa-Proteins aufwiesen und somit die *nph2*- bis *nph4*-Genprodukte andere Komponenten bei der Signalweiterleitung darstellen könnten.

### 1.2.3.3 Die Klonierung und Charakterisierung des *NPH1*-Gens

1997 wurde das *Arabidopsis*-Wildtyp-Gen *NPH1* von Huala *et al.* kloniert und sequenziert. 1998 konnten mit einer *Arabidopsis-NPH1*-Sonde aus einer Hafer- und Mais-cDNS-Bank die *NPH1*-Gene hybridisiert und kloniert werden (Zacherl *et al.*, 1998). Aus Sequenzvergleichen konnten mehrere konservierte Bereiche ermittelt werden: N-terminal wurden zwei Domänen lokalisiert, die starke Homologie untereinander und zu LOV-Domänen zeigten. Letztere findet man vor allem in Sensorproteinen bei Organismen von den Archaea über Eubakterien bis Eukaryonten, die auf Veränderungen in ihrer Umgebung bezüglich Licht, Sauerstoff oder Spannung (LOV als Abkürzung für engl. „Light, oxxygen, voltage“) ihren Redoxstatus ändern können. Einige unter diesen haben als Flavoproteine FAD gebunden, so z. B. das NIF-L-Protein aus *Azotobacter* und das Aerotaxisprotein AER aus *E. coli*. Deshalb wird, da außer den LOV-Domänen sonst keine Homologie mit dem *NPH1*-Genprodukt vorliegt, auch bei *NPH1* die LOV-Domäne als Flavinbindestelle vermutet. LOV-Domänen gehören zur Familie der PAS-Domänen. Das Akronym PAS leitet sich von dem Vorkommen dieser Domäne in den Proteinen PER („period“, das *Drosophila melanogaster*-homologe zu CLOCK), ARNT (das humane Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor nukleäre Translokatorprotein) und SIM („single minded“ aus *Drosophila melanogaster*) ab. Diese wirken als Sensordomänen, oftmals mit einem gebundenen Kofaktor, oder sind bei Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt und in der belebten Natur verbreitet. Der C-terminale Bereich von *NPH1* ist stark homolog zu Serin-/Threoninkinasen. Diese Kinasedomäne enthält die 12 Sequenzmotive einer typischen Proteinkinase und kann damit der PVPK1-Familie der Serin-/Threoninkinasen innerhalb der Proteinkinase C-Gruppe zugeordnet werden (siehe Hanks & Hunter, 1995).

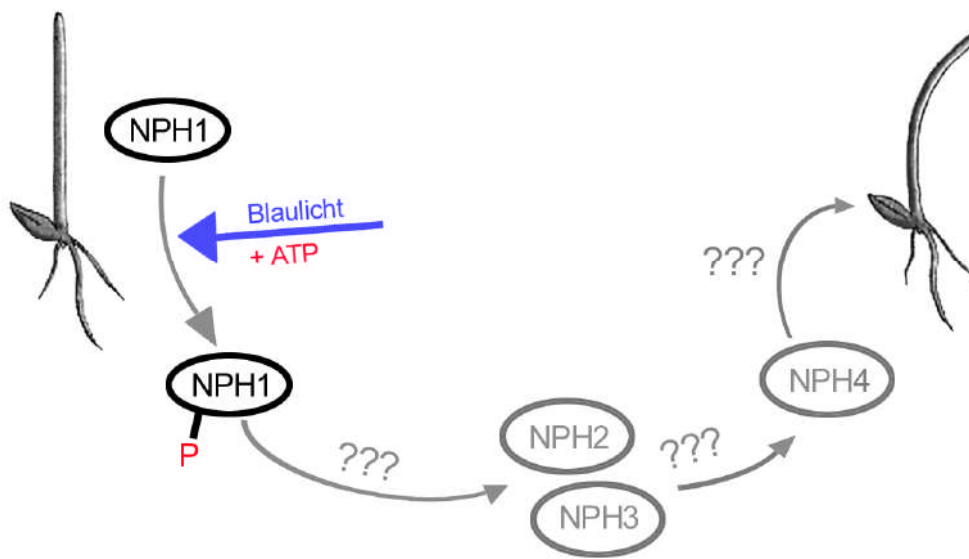
Aus dieser Sequenzanalyse geht hervor, daß das *nph1*-Genprodukt die Voraussetzungen – Kinasedomäne und potentielle Chromophorbindingdomäne/-n – für einen Photorezeptor bietet. Durch die Komplementation der *Arabidopsis-nph1*-Mutante mit der genomischen *NPH1*-Wildtyp-DNS wurde der Nullmutante wieder blaulichtvermittelte Phosphorylierung und vollständig phototrope Reaktion ermöglicht (Huala *et al.*, 1997). Dies alles waren Hinweise, daß es sich bei dem *NPH1*-Genprodukt um den primären Photorezeptor für den blaulichtvermittelten Phototropismus handelte.

#### 1.2.3.4 Signaltransduktion

Die *Arabidopsis*-Mutanten mit veränderter oder fehlender phototropischer Antwort versprachen neue Informationen über Photoperzeption und den Signaltransduktionsmechanismus des blaulichtvermittelten Phototropismus. Da alle *nph*-Nullmutanten unter den bislang untersuchten Bedingungen keine phototropische Aktivität mehr aufweisen, sind offenbar alle durch die Mutation betroffenen Proteine in die Signaltransduktion involviert. Eine Hierarchie der Genloci der einzelnen *nph*-Mutanten konnte erst erkannt werden, als eine Korrelation des blaulichtvermittelten Phototropismus mit einem ebenso blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Protein hergestellt werden konnte (siehe 1.2.3.2): nur die Mutante *nph1* wies unter allen anderen phototropen Nullmutanten keine blaulichtvermittelte Phosphorylierung eines 120-kDa-Proteins mehr auf. Die blaulichtabhängige Phosphorylierung von *nph1* stellt somit ein primäres Ereignis im Phototropismus dar. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem *NPH1*-Genprodukt um den Photorezeptor für den Phototropismus (Huala *et al.*, 1997) und *NPH2*- bis *NPH4*-Genprodukten stellen Komponenten dar, die abwärts (engl. „downstream“) von *nph1* im phototropischen Signaltransduktionsweg agieren (Liscum & Briggs, 1995 und 1996).

Durch den Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven und deren Kinetiken konnte der Phototropismus als eigenständige Reaktion gegenüber dem Gravitropismus (Steyer, 1967; Britz & Galston, 1983), der Hemmung des Hypokotyllängenwachstums durch Blaulicht bei Senf (Rich *et al.*, 1985) und der Circumnutation bei Erbse (Baskin, 1986) abgegrenzt werden. Erstaunlicherweise verursacht eine Entfernung der peripheren Zellschichten des Sproßes den Verlust von gravitropischer (Firn & Digby, 1980) und phototropischer (Feyerabend & Weiler, 1988) Reaktion. Entweder haben beide Reaktionen dort ihren gemeinsamen Wirkungsort oder es gibt in beiden Reaktionen eine gemeinsame Komponente, die dort lokalisiert ist. Die *Arabidopsis-nph4*-Mutante weist weder Phototropismus noch Gravitropismus auf, zeigt aber völlig normale, blaulichtabhängige Phosphorylierung des 120-kDa-Proteins. Die Nullmutanten *nph2* und *nph3* konnten bislang in ihrer Reihenfolge aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit nicht unterschieden werden. Da sie in ihrer gravitropen Antwort keinerlei Einschränkungen zum Wildtyp aufweisen, sind *nph2* und *nph3* als "downstream"-Komponenten zu *nph1* im Signaltransduktionsweg vor *nph4* einzuordnen. Dies ist in Abbildung 4 veranschaulicht.

Die in Studien bis 1997 noch fehlende Erkenntnis, ob die LOV-Domänen im *NPH1*-Genprodukt als Redoxsensor mit Flavinbindestelle fungieren und/oder, in Anlehnung an eine



**Abbildung 4: Möglicher Signaltransduktionsweg für den blaulichtvermittelten Phototropismus am Beispiel der Koleoptilenkrümmung bei Hafer.**

weitere PAS-Domänenfunktion, zur Protein-Protein-Wechselwirkung beitragen, wird einen wichtigen Schritt der Signaltransduktion aufklären.

#### **1.2.4 Nomenklatur**

Während dieser Arbeit wurde von Christie *et al.* (1998) der endgültige Beweis erbracht, daß es sich bei dem *NPH1*-Genprodukt um den Photorezeptor für die blaulichtvermittelte Phosphorylierung handelt. Das von *NPH1* kodierte Protein wurde im Zuge dessen Phototropin genannt. Insbesondere nach jüngster Entdeckung einer phototropinähnlichen Spezies, dem *NPL*-Genprodukt, das später diskutiert wird, war die Einführung einer neuen Nomenklatur unumgänglich (Briggs *et al.*, 2001). So werden nachfolgend alle *nph1*-Homologen als Phototropin bzw. phot1 und alle *np11*-Homologen als phot2 bezeichnet.

#### **1.3 Aufgabestellung dieser Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, über Untersuchungen mit Anti-NPH1, einem polyklonalen Antikörper, der gegen das denaturierte N-terminale Drittel von *Arabidopsis thaliana*-Phototropin generiert worden war, festzustellen, ob es sich bei dem blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Haferprotein um Haferphototropin handelte. Des weiteren galt es Phototropin in Pflanzen in seinen Eigenschaften und seiner Funktionsweise näher zu charakterisieren.

## 2 Material

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 Pflanzenmaterial

Es wurden monokotyle und dikotyle Pflanzen folgender Bezugsquellen untersucht:

##### monokotyle Pflanzen

Hafer: *Avena sativa* (L.) cv. Pirol von Firma Ackermann, Irlbach, Deutschland  
*Avena sativa* (L.) cv. Tomba von Firma Ackermann, Irlbach, Deutschland

Mais: *Zea mays* cv. Diamant, BayWa, Deutschland

##### dikotyle Pflanzen

Senf: *Sinapis alba* (L.), Kiepenkerl Qualitätssaatgut, Firma Obi, Deutschland  
Kresse: *Lepidium sativum* (L.), Bayerische Futtersaatbau, Ismaning, Deutschland  
Soja: *Glycine max* (L.) merr., Hilmar Züchtersaatgut, W. und K. Hild, Marbach, Deutschland  
Tomate: *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Moneymaker, Hilmar Züchtersaatgut, W. und K. Hild, Marbach, Deutschland  
Rauke: *Eruca sativa* (L.), Kiepenkerl Qualitätssaatgut, Firma Obi, Deutschland

#### 2.1.2 Bakterienstämme

Klonierungen und Expressionen erfolgten in den *Escherichia coli*-Stämmen BL21(DE3) (Bestellnummer 200131), BL21(DE3)pLysS (Bestellnummer 200132) und XL1blue (Bestellnummer 200249) der Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande.

##### Genotyp BL21(DE3):

*E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)-gal □(DE3)

##### Genotyp BL21(DE3)pLysS:

*E. coli* B F<sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)-gal □(DE3) [pLysS Cam<sup>r</sup>]

Die Expression der Phototropinkinasedomäne erfolgte auch aus dem Plasmid pMal-KIN im *E. coli*-Stamm XL1blue.

##### Genotyp XL1blue:

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac<sup>q</sup>Z□M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>  
(Quelle Genotypen: Stratagene-Katalog 1999)

## 2.2 Plasmide, Expressionssystem und Oligonukleotide

### 2.2.1 Plasmide und heterologes Expressionssystem

Zur heterologen Expression von Fragmenten des Phototropin-cDNS-Klons As-*PHOT1*-a aus Hafer (Zacherl *et al.*, 1998) wurden diese in die Vektoren pCal-n und pCal-n-EK von Stratagene ligiert. Nach Transformation in die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) oder BL21(DE3)pLysS konnte über eine Ampicillin-Resistenz der Plasmide auf erfolgreiche Transformation selektiert werden. Die exprimierten Proteine weisen N-terminal ein Calmodulin-Bindeprotein (CBP) auf, das eine Affinitätsreinigung über Calmodulinsepharose (pCal-Affinity Protein Expression and Purification System von Stratagene, Bestellnummer 204 302) ermöglicht. Bei dem Konstrukt pMal-Kin (von John Christie zur Verfügung gestellt) handelt sich um die Kinase-Domäne von *Arabidopsis thaliana*-Phototropin, die in den Expressionsvektor pMal (Affinitätsreinigungssystem von New England Biolabs, Schwalbach, Deutschland) kloniert und zur Proteinexpression in den *E. coli*-Stamm XL1blue transformiert worden war. Das überexprimierte Fusionsprotein konnte über eine Amylose-Affinitätsmatrix (Amylose Resin, New England Biolabs, Bestellnummer 800-21S) und Maltose als Elutionsagens gereinigt werden.

### 2.2.2 Synthetische Oligonukleotide

#### 2.2.2.1 Synthetische Oligonukleotide für Klonierung

**Tabelle 1: Übersicht über die zur Klonierung verwendeten synthetischen Oligonukleotide.**

Name	5'→3' Nukleotidsequenz
U-380	CGCCATGGGAAGCTACACATCAATGGCTTCCAAAGGTGCA
U-1129-H1	CGCCATGGACTGAAGGGAACAAGGATACGG
U-1613	CGCCATGGTGGCTACTACTTGAACGTCG
L-1641-H1	CGTGGCAAGCTTCTCAATACGTTCAAGTGTAG
U-1980	CGCCATGGAGAGAGAGGGAGTCATGCTG
L-2062	GGCAAGCTTGTGGTTAGCCACAAATCC
U-2063	CGCCATGGAGGATTTGTGGGCTAACCACTC
U-2133	CGCCATGGCCATCCAAAAAGTTCTTGAGGG
U-2220	CGCCATGGGAAGCGTGCACTTGGTGGAG
L-2220	GGCAAGCTTGCTTCCAGTGTCAACAGATCC
L-3170	GGCAAGCTTGAACATGTCCGGTGTGAGTATC
U-DELNCO1	CTAGACTCCATCGTGGCTACTACAC
L-DELNCO1	GTGTAGTAGCCACGATGGAGTCTAG
U-CBP-N-NCO1	GCTACCATGGATATGAAGCGACG
L-pcal93/121	CTAACAAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGC
U-pcal439/409	CATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAG



### 2.2.2.2 Synthetische Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenese

Soweit möglich wurde durch die gewünschte Mutation zusätzlich eine Schnittstelle mutiert oder neu eingeführt. Dadurch war bereits auf DNS-Ebene der Erfolg der Mutation kontrollierbar (siehe auch 3.3.3.4). Die zur Wildtypsequenz abweichenden Basen in den Mutationsoligonukleotiden sind im folgenden bei den Sinn-Oligonukleotiden gekennzeichnet.

**Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese.**

Name	5'→3' Sequenz	betroffene Schnittstellen
U-NS27 L-NS27	CTGCCGCGGAC <u>GC</u> ACGCGGCTCGCTCGAGGTCTTCAAC GTTGAAGACCTCGAGCGAGCCGCGTGCCTCGCGCGGCAG	mutiert SacII
U-NS30 L-NS30	CTGCCGCGGACTCCCGI <u>GGCG</u> CACTCGAGGTCTTCAAC GTTGAAGACCTCGAGTGCGCCACGGGAGTCGCGCGGCAG	mutiert SacII
U-NS27/30 L-NS27/30	CTGCCGCGGAC <u>GC</u> ACGCGGC <u>GC</u> ACTCGAGGTCTTCAAC GTTGAAGACCTCGAGTGCGCCGCGTGCCTCGCGCGGCAG	mutiert SacII
U-NS37 L-NS37	GAGGTCTTCAACCCCG <u>CT</u> TTCCTCCTCC GGAGGAGGAAGCGGGGTTGAAGACCTC	keine
U-NS101 L-NS101	GTGTCCGCCGATCC <u>GC</u> I <u>GG</u> AGGC GCCTCCAGCGGATCGGGCGGACAC	keine
U-NS104/110 L-NS104/110	GGCGGC <u>GC</u> AGCCCGCAGCG <u>CT</u> TCCGACGACAAG CTTGTCGTGGAAGCGCTGCGGGCTGCGCCGCC	keine
U-NS124 L-NS124	CATCCCCGGGTGC <u>GC</u> I <u>GG</u> AGGACTC GAGCTCCTCAGCGACCCGGGGGATG	keine
U-LOV1-S5 L-LOV1-S5	GACCTTCGTG <u>GC</u> CGGACGCCAGCCGACC GGTCGGCTGGCGTCCGCCACGACGAAGGTC	keine
U-LOV1-S10 L-LOV1-S10	GTGTCCGACGCC <u>CG</u> CCGACCCGGGCACCCAATCATGTAC GTACATGATTGGGTGCCCGGGTCGGGCGGCGTCCGACAC	führt SmaI ein
U-LOV1-S18 L-LOV1-S18	CCAATCATGTACGCC <u>GC</u> CGCCGGCTTCTTCAAC GTTGAAGAAGCCGGCGGCGGCGTACATGATTGG	mutiert HaeII
U-LOV1-S20 L-LOV1-S20	CAATCATGTACGCC <u>GC</u> CGCCGGCTTCTTCAAC GTTGAAGAAGCCGGCGGCGGCGTACATGATTGG	mutiert HaeII
U-LOV1-S29 L-LOV1-S29	CATGACCGGCTACACAG <u>CC</u> AAGGAGGTGTCGG CCGACGACCTCCTTGGCTGTGTAGCCGGTCATG	keine
U-LOV1-S43 L-LOV1-S43	CGTTCCTCCAAGGC <u>GC</u> CCGGCACCCGACCCG CGGGTCGGTCCGGCGCCTTGAGGAAGCG	keine
U-LOV1-S63 L-LOV1-S63	GCAAATGGAGCAA <u>ACT</u> ACTGCGG <u>GC</u> CGTGTCTCTC GAGGACACGCCCGCAGTAGTTTGCTCCATTGTC	mutiert Eco52I
U-LOV1-S104 L-LOV1-S104	GGATGCAAGTGAAGTAG <u>CT</u> AAATACACTGAAGGG CCCTTCAGTGTATTTAGCTACTTCCACTTGATCC	keine
U-LOV1-S63A L-LOV1-S63A	CTAGCAAATGGAGCAA <u>ACT</u> ACTGCGG <u>GC</u> CGTGTCTCTC GGAGGACACGCCCGCAGTAGTTTGCTCCATTGCTAG	mutiert Eco52I
U-LOV1-SH31A L-LOV1-SH31A	GATCAGGCCCGTAGC <u>GC</u> I <u>GT</u> GTCTAAGCTTAG CTAAGCTTAGACACAGCGCTACGGGCCTGATC	führt Eco47III ein
U-H1-S31A L-H1-S31A	GATCAGGCCCGTAGC <u>GC</u> I <u>GT</u> GTCTGAGCTTCTGTTGG CCAACAGAAGCTCAGACACAGCGCTACGGGCCTGATC	führt Eco47III ein
U-H1-S57A L-H1-S57A	GCACCTTTAAAAGAAAT <u>GC</u> GCAGGAATCAGTAGGTGC GCACCTACTGATTCTGCGCATTCTTTAAAGGTGC	führt Nsbl ein

## Material

Name	5'→3' Sequenz	betroffene Schnittstellen
U-H1-S74A L-H1-S74A	CCTGGCAAGAGAAGCGCIGAAAAGTGGATCTCGACG CGTCGAGATCCACTTTCAGCGCTTCTCTTGCCAGG	führt Eco47III ein
U-H1-S82A L-H1-S82A	GGATCTCGACGTAACGCAAATCCGGAGCAAGAACC GGTTCTTGCTCCGGATTTTGC GTTACGTCGAGATCC	führt Kpn2I ein
U-H1-S89A L-H1-S89A	GGAGCAAGAACC GCACTGCAGAAGATCAGC GCTGATCTTCTGCAGTGC GGTTCTTGCTCC	führt ApaLI ein
U-H1-S106A L-H1-S106A	GCAGTAAAAGTAGAAAAGCAGGCCTGTATTCAC GTGAATACAGGCCTGCTTTTCTACTTTTACTGC	führt Eco147I (=StuI) ein
U-LOV2-CA L-LOV2-CA	GGGAAGAAACGCCAGGTTTCTACAAGG CCTTG TAGAAACCTGGCGTTTCTTCCC	mutiert PstI
U-LOV2-CS L-LOV2-CS	GGGAAGAAACTCCAGGTTTCTACAAGG CCTTG TAGAAACCTGGAGTTTCTTCCC	mutiert PstI
U-LOV2-EG L-LOV2-EG	TTCTTGCA GTTACAGGATATAGCCG CGGCTATATCCTGT TAACTGCAAGAA	führt HpaI ein
U-LOV2-FY L-LOV2-FY	CGCGTCCGATAGTTACTTGCAATTGACAG CTGTCAATTGCAAGTAACTATCGGACGCG	mutiert HincII
U-L2-G100A L-L2-G100A	GGGAGATGTCCAATACTTTATTGCGGTTTCAGTTGGATGG CCATCCA ACTGAACCGCAATAAAGTATTGGACATCTCCC	mutiert Scal
U-LOV2-ND L-LOV2-ND	GGGAAGAGATTGCAGGTTTCTACAAGG CCTTG TAGAAACCTGCAATCTCTTCCC	mutiert PstI
U-LOV2-NI L-LOV2-NI	GTTCTGGAICCTCTTTCAC TTGCAGCC GGCTGCAAGT GAAAGAGGATCCAGAAC	führt BamHI ein
U-LOV2-QH L-LOV2-QH	ACTGCAGGTTTCTCCA TGGTCTCG CAGGACCATGGAGAAACCTGCAGT	führt NcoI ein
U-LOV2-RD L-LOV2-RD	GGAAGAAACTGCGACTTTTCTACAAGGT ACCTTG TAGAAAGTCGCAGTTTCTTCC	keine
U-LOV2-SA L-LOV2-SA	ATTATATTCGCGCCCGATAGTTTC GAAACTATCGGCCGCGAATATAAT	führt Eco52I ein
U-LOV2-SF L-LOV2-SF	ATTATATTCGCGTICGATAGTTTCTTG CAAGAACTATCGAACGCGAATATAAT	keine
U-LOV2-SFTY L-LOV2-SFTY	TTCGCGACCGATAGTTACTTGACAG CTGCAAGTAACTATCGGTGCGGAA	führt NruI ein
U-LOV2-YF L-LOV2-YF	CTTGCAATTGACAGAATITAGCCGTGAAG CTTCACGGCTAAATTCTGTCAATTGCAAG	mutiert HincII
U-LOV2-YK L-LOV2-YK	GGAGATGTCCAGAAGTTTATTGGGGTTC GAACCCCAATAA ACTTCTGGACATCTCC	keine
U-LOV2-YM L-LOV2-YM	GGAGATGTCCAGATGTTTATTGGGGTT AACCCCAATAAACATCTGGACATCTCC	keine

### 2.3 Antikörper, Affinitätsmatrices und Chromophore

#### Antikörper und Enzymkonjugate:

Anti-NPH1 ist ein polyklonaler Antikörper, der gegen das denaturierte, heterolog als Maltose-Fusionsprotein exprimierte N-terminale Drittel von Phototropin (PHOT1) – inklusive des N-Terminus und der LOV1-Domäne – aus *Arabidopsis thaliana* in Kaninchen generiert wurde (Christie *et al.*, 1998). Dieser war dankenswerterweise von Winslow Briggs zur Verfügung

gestellt worden. Eingesetzt wurde das ungereinigte Serum.

Alle übrigen Antikörper und die Chromophore wurden bei Sigma, Taufkirchen, Deutschland erworben:

Anti-Phosphoserin (monoklonal)	Bestellnummer P-3430
Anti Rabbit IgG-AP	Bestellnummer A-2556
Anti Mouse IgG-AP	Bestellnummer A-3438
Streptavidin-biotinylated AP complex	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland, Bestellnummer RPN.1052

Affinitätsmatrices:

Lectin-WGA	Weizenkeimagglutinin, digoxigeninmarkiert, Boehringer Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 1284 118
Protein A-Sepharose	Bestellnummer P-3391
Cibachron Blue 3GA-Agarose	Bestellnummer C-1285

Chromophore:

FMN	Bestellnummer F-2253
FAD	Bestellnummer F-6625

## **2.4 Verbrauchsmaterial**

### **2.4.1 Chemikalien**

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma, Taufkirchen, Deutschland in p. a. oder ähnlicher Qualität bezogen. Chemikalien, die in diversen Chargen, Spezifikationen oder Zuständen vertrieben werden, sind der eindeutigen Zuordnung wegen ebenfalls exakt aufgelistet. Wasser wurde in bidestillierter und autoklavierter Qualität (dH<sub>2</sub>O) verwendet.

Albumin	Bovine, Fraction V, Bestellnummer A-9418
AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphat-tetralithiumsalz, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 102 547
ATP	Dinatriumsalz, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 126 888
Brilliant Blau R250	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Bestellnummer 3862.2
Bromcyan	syn. Cyanogenbromid, Merck, Darmstadt, Deutschland, Bestellnummer 8.20193.0050

1-Butanol	z. A. ACS, Merck, Darmstadt, Bestellnummer 1.01990.1000
Dodecylmaltosid	Biomol Feinchemikalien, Hamburg, Deutschland, Bestellnummer 50311
IPTG	peqLab, Erlangen, Deutschland Bestellnummer 37-2020
D-Maltose	research grade, Serva Feinbiochemikalien, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer 28390
Pyridin	z. A. ACS, Merck, Darmstadt, Deutschland, Bestellnummer 1.09728.1000
Serva Blau G	Serva Feinchemica, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer 35050

### **2.4.2 Reagenzien**

dNTP-Mix	Lösung bestehend aus jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP, peqLab, Erlangen, Deutschland, Bestellnummer 20-3011
Rotiphorese Gel 30	30 % (w/v) Acrylamid-/0,8 % (w/v) Methylenbisacrylamid-Lösung in Wasser, Roth, Karlsruhe 3029.1
Magermilchpulver	Firma Glücksklee
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Lab., München, Deutschland, Bestellnummer 500-0006

### **2.4.3 Radionukleotide**

$\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP wurde in folgender Qualität bezogen:

- Redivue Adenosin 5'-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-Triphosphat, Triethylammoniumsalz, spezifische Aktivität 110 TBq/mmol bzw. ~ 3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland, Bestellnummer AA0068
- Redivue Adenosin 5'-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-Triphosphat, Triethylammoniumsalz, spezifische Aktivität >185 TBq/mmol bzw. ~ 5000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland, Bestellnummer AA0018

### **2.4.4 Enzyme**

#### **2.4.4.1 Restriktionsenzyme**

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden in der Regel von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland, bezogen. Ausnahmen stellten folgende Enzyme dar:

DpnI	NEB New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
DpnI	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
BamHI, HincII, NcoI, SacI, SmaI	Stratagene, Heidelberg, Deutschland

#### 2.4.4.2 Polymerasen

<b><i>Pwo</i></b> DNS-Polymerase	PeqLab, Erlangen, Deutschland, Bestellnummer 01-5020
<b><i>Pfu</i></b> DNS Polymerase	Stratagene, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer 600153

#### 2.4.4.3 RNase

RNase A (from bovine pancreas)	Serva, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer 34388
--------------------------------	--------------------------------------------------------

#### 2.4.4.4 Endoproteasen

Trypsin (from bovine pankreas)	Boehringer, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 109 819
Thrombin (from bovine plasma)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland, Bestellnummer T-6634
Endoproteinase Glu-C (V8-Protease)	Boehringer, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 791 156
Endoproteinase Asp-N	Boehringer, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 1 420 488

#### 2.4.4.5 Protease-Inhibitoren

Complete <sup>TM</sup> (protease inhibitor cocktail tablets)	Boehringer, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 1 697 498
-----------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------

#### 2.4.4.6 Kinasen

Proteinkinase A (PKA) (catalytic subunit from bovine heart)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland, Bestellnummer P-2645
----------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------

#### 2.4.4.7 sonstige Enzyme

Alkalische Phosphatase	NEB New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Boehringer, Mannheim, Deutschland, Bestellnummer 713 023

### **2.4.5 Größenstandards**

#### DNS-Standard:

1 kb Leiter (0,05 µg/µl in 1 mM EDTA pH 7,5, 50 % Glycerin und 0,5 % Bromphenolblau), Gibco BRL, Karlsruhe, Deutschland, Bestellnummer 15615-016

#### Proteinstandards:

**SDS-7B** Lyophilisat rekonstituiert in 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 4 M Urea, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,001 % Bromphenolblau, gelieferte Menge und Standardproteine chargenabhängig, Sigma, Unterhaching, Deutschland, Bestellnummer SDS-7B

**SDS-6H** 1 µg/µl in 27,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,0075 % Bromphenolblau, Sigma, Unterhaching, Deutschland, Bestellnummer SDS-6H

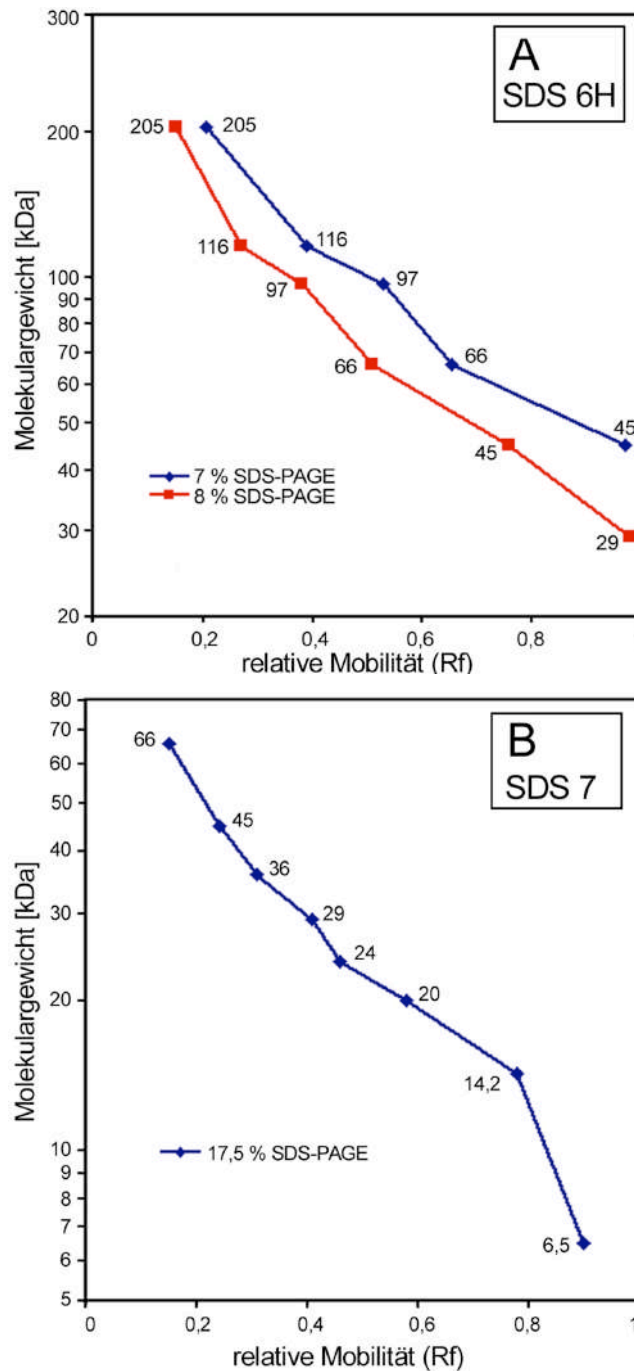
**SDS-7** 1 µg/µl in 27,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,0075 % Bromphenolblau, Sigma, Unterhaching, Deutschland, Bestellnummer SDS-7

**HMW** 1 µg/µl in 0,5 M L-Alminocaprönsäure, 5 % (w/v) Serva Blau G und 10 % (v/v) Glycerin, Pharmacia, Freiburg, Germany, Bestellnummer 17-0445-01

**SDS-17S** 1 µg/µl in 27,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,0075 % Bromphenolblau, Sigma, Unterhaching, Deutschland, Bestellnummer SDS-17S

**Color-Marker Low Range** 3 µg/µl in 62 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 % SDS, 0,01 mM EDTA, 100 mM DTT, 4 M Urea, 0,005 % Bromphenolblau und 30 % Glycerin, Sigma, Unterhaching, Deutschland, Bestellnummer C-3187

**Color-Marker High Range** 3 µg/µl in 62 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 % SDS, 0,01 mM EDTA, 100 mM DTT, 4 M Urea, 0,005 % Bromphenolblau und 30 % Glycerin, Sigma, Unterhaching, Deutschland, Bestellnummer C-3312



**Abbildung 5: Kalibrationskurven der Proteinstandards SDS-6H und SDS7.**

Teil A zeigt die Kalibrationskurve des Proteinstandards SDS-6H in 7 %- (siehe blaue Kurve) und 8 %-Polyacrylamidgelen (siehe rote Kurve), in Teil B ist die Eichkurve von SDS-7 mit dem zusätzlichen Standard Aprotinin (6,5 kDa, aus dem Color-Marker Low Range) in 17,5 % Polyacrylamidgelen angegeben, die zur Molekulargewichtsbestimmung herangezogen wurden.

#### **2.4.6 Geräte und sonstiges Verbrauchsmaterial**

Nitrozellulosemembran:	Protran BA 85, 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland BioTrace™ NT, 0,45 µm, Pall Gelman Laboratory, Dreieich, Deutschland
Belichtungsapparatur:	KL 1500 mit IR-Filter, Schott, Mainz, Deutschland Filterset für KL 1500: UV-A/Blaulicht-Glasfilter mit Transmission von 320 bis 500 nm
Photometer:	Li-189 quantum photometer, Lambda Instruments Corp., Lincoln, USA HP 8451A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett-Packard, USA Hitachi Fluorimeter F-2000, Hitachi, Japan Transputer Integrated Diode Array Spectrophotometer (TIDAS) mit der Software TISPEC, J & M Analytische Meß- und Regeltechnik, Deutschland
radioaktivsensitiver Film:	Hyperfilm MP, Amersham Buchler GmbH, Braunschweig, Deutschland
Phosphoimager: dazu Bildplatte	BAS 1500 Phosphoimager, Fujifilm, Kanagawa, Japan, BAS-MP, Fujifilm, Kanagawa, Japan Auswertungsprogramme BAS-Reader und TINA, raytest, Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland
PCR-Geräte:	bio-med-Thermocycler 60, Bachofer, Reutlingen, Deutschland Tpersonal Kombi, Biometra, Göttingen, Deutschland
kommerzielle Kits:	QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid, Machery-Nagel, Düren, Deutschland Rapid DNA Ligation Kit, Boehringer, Mannheim, Deutschland ECL Glycoprotein Detection System, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland, Bestellnummer RPN 2190
Filter und Konzentratoren:	Ultrafree <sup>®</sup> -MC, 0,22 µm Filter Unit, Millipore Corporation, Bedford, USA Nanosep Centrifugal Concentrators, 10 K, 100 K, 300 K und 0,2 µm, Pall Gelman Laboratory, Dreieich, Deutschland,
Gelelektrophorese:	Elektrophorese-Set Mighty Small II SE 250, Hoefer Scientific Instruments, USA



## Material

---

DC-Elektrophorese:	LKB 2117 Multiphor II Electrophoresis System, LKB Produkter AB, Bromma, Sweden
Vakuumkonzentrator:	Savant SC 110, Bachofer, Reutlingen, Deutschland
DC-Platten:	DC-PF PEI-Zellulose F 20x20 cm, Merck, Darmstadt, Deutschland, Bestellnummer 1.05579.0001 DC-PF Zellulose F 20x20 cm, Merck, Darmstadt, Deutschland, Bestellnummer 1.05565.0001 POLYGRAM <sup>□</sup> CEL 400 UV <sub>254</sub> , Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, Bestellnummer 801 123

### **3 Methoden**

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### **3.1 Anzucht des Pflanzenmaterials**

Zur Gewinnung von etiolierten monokotylen Keimlingen wurden die Samen auf gut durchfeuchtetem Vermiculit (hitzeexpandierter Glimmer) bei 25 °C im feuchten Brutschrank im Dunkeln vier Tage kultiviert. Da etiolierte Dikotyledonenkeimlinge bei oben genannten Bedingungen schneller keimen, war die analoge Keimlingsgröße bereits nach drei bis maximal dreieinhalb Tagen erreicht.

Mais wurde vor der Keimung zur Entfernung der Schutzbeize und zur Quellung zwei Stunden lang in Wasser eingeweicht. Mit dem Keimling nach oben wurden die einzelnen Körner auf feuchtem Filterpapier ausgebreitet und im Dunkeln drei bis fünf Tage bei 25 °C kultiviert. Soja wurde vor der Aussaat zur Entfernung von Pilzsporen fünf Minuten mit Natriumhypochloridlösung (1,2 % Chloranteil) behandelt und bis zur Entfernung des Chlorgeruchs mit Wasser gewaschen.

#### **3.2 Biochemische Arbeitsmethoden**

In der Regel wurden Arbeiten mit UV-A-/blaulichtempfindlichem Material unter Schutzlicht (Rotlicht, Philips TL 40 W/15, Lichtmenge  $1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  bzw. Osram L 58W/25 mit Grünfilter 515-460 nm, Lichtmenge  $< 10 \text{ nmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) durchgeführt. Verwendete Geräte und Lösungen waren vorgekühlt (4 °C bzw. auf Eis).

##### **3.2.1 Herstellung von Rohextrakten**

Rohextrakt wurde bei monokotylen Pflanzen aus Bereichen der Koleoptile und bei Dikotyledonen aus Bereichen des Hypokotyls mit Kinasepuffer (50 mM HEPES-KOH pH 8,0 und 5 mM  $\text{MgSO}_4$ ) bereitet. Das Pflanzenmaterial wurde mit dem Skalpell auf Millimeterpapier geerntet und entweder in flüssigem Stickstoff aufbewahrt oder sofort homogenisiert. Wurde etioliert gewachsenes Keimlingsmaterial sättigend belichtet, erfolgte dies unmittelbar nach der Ernte. Dazu wurden, je nach belichteter Menge, ein bis zwei Minuten  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  appliziert. Das zur Homogenisation nötige Volumen an Kinasepuffer für das jeweilige Pflanzenmaterial ist im folgenden wiedergegeben:

**Tabelle 3: Übersicht über die eingesetzten Kinasepuffervolumina zur Rohextraktbereitung.**

Pflanze	Volumen Kinasepuffer pro mm Pflanzenmaterial
Hafer	4 µl
Mais	10 µl
Senf	3 µl
Kresse	2 µl
Erbse	4,5 µl
Soja	4 µl
Tomate	2 µl
Rauke	2 µl

Anschließend wurden durch Zentrifugation für 20 Sekunden bei 3000 g Zellfragmente entfernt und der klare Rohextrakt sofort weiterverarbeitet. Wurde die Homogenisation in einem Mikrozentrifugengefäß mit einem Mikrohomogenisator durchgeführt und in einer Mikrozentrifuge sedimentiert, konnte Rohextrakt in 2,5 Minuten hergestellt werden (Zacherl, 1997)

Wurden z. B. bei der Dunkelregeneration der Phosphorylierung, Rohextrakte zu definierten Zeiten hergestellt und nicht nativ weiterbehandelt, erfolgte die Homogenisation bereits in 1x SDS-Probenpuffer (52,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,0075 % Bromphenolblau) mit anschließender dreiminütiger Inkubation bei 90 °C.

Bei Stabilitätsstudien von Phototropin wurde Rohextrakt u. a. mit Homogenisationsmedium (25 mM MOPS-NaOH, 250 mM Sucrose, 0,1 mM  $MgCl_2$  und 8 mM Cystein, pH 7,8) bereitet. Dieses Medium konnte mit Boehringer Complete<sup>TM</sup> Proteaseinhibitoren (1 Tablette pro 17,5 ml Homogenisationsmedium unter dem Zusatz von 3 mM  $CaCl_2$  und 0,1 mM  $MgCl_2$ ) angereichert werden.

### **3.2.2 Immunopräzipitation**

Die Proteinprobe – beispielsweise Pflanzenrohextrakt oder mikrosomale Membranen –, die mit dem Antikörper Anti-NPH1 auf Immunopräzipitation untersucht werden sollte, wurde mit 2 % SDS bei 80 °C zwei Minuten denaturiert. Gegebenenfalls entfernte man im Anschluß unlösliches Zellmaterial durch Zentrifugation (4 °C, 13000 g, 2 min). Der klare Überstand wurde mit zehnfachem Volumen Immunopräzipitationspuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA und 1 % (v/v) NP-40, pH 7,5) verdünnt. Daraufhin fügte man Anti-NPH1 in einem Volumen zu, das ein Zehntel des Gesamtvolumens einnahm. Der Gesamtansatz inkubierte rotierend drei Stunden bei Raumtemperatur. Im Anschluß wurde die in Immunopräzipitationspuffer gequollene Protein-A-Sepharose zugesetzt. Dabei wurde ein Volumen gewählt, das ein Siebtel bis ein Achtel des Gesamtvolumens darstellte. Protein A

bindet spezifisch an die Fc-Domäne von IgG-Antikörpern, somit entsteht ein Präzipitat aus Phototropin-Anti-NPH1-Protein-A-Sepharose. Nach 40 Minuten Inkubation rotierend bei Raumtemperatur konnte mittels Zentrifugation (4 °C, 13000 g, 2 min) der Überstand entfernt und das sedimentierte Immunopräzipitat gewaschen werden. Hierzu nahm man das Sediment jeweils in einem Gesamtansatzvolumen Immunopräzipitationspuffer auf, schüttelte eine Minute und entfernte den Überstand durch Zentrifugation (4 °C, 13000 g, 2 min). Nach drei Wiederholungen folgten zwei Waschschriffe mit Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 2 mM EGTA, pH 7,5). Um das immunopräzipitierte Protein zu lösen, wurde das Gesamtpräzipitat in SDS-Probenpuffer (110 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,03 % Bromphenolblau) bei 80 °C drei Minuten erhitzt und der lösliche Überstand auf Phototropin untersucht.

### **3.2.3 Isolierung von Rohmembranen (mikrosomale Membranen)**

Mikrosomale Membranen wurden in unterschiedlichen Maßstäben aus Keimlingsmaterial nach Salomon *et al.* (1996) präpariert. Tabelle 4 gibt eine Übersicht mit den jeweils nötigen Mengenangaben. Bei monokotylen Keimlingen wurden von der Koleoptilenspitze ab jeweils die ersten 10 mm ohne Primärblatt, bei dikotylen Pflanzen nach Entfernung der Primärblätter ab dem Hypokotylhaken 10 mm des Hypokotyls mit dem Skalpell geerntet. Zur Ernte ab 10 g Frischgewicht wurde das Primärblatt bei Hafer nicht mehr entfernt, wobei man die Keimlinge, die durch eine Lochplatte gewachsen waren, mit einer Spachtel abschabte. Bei Dikotyledonen erfolgte die Ernte stets ohne Primärblätter. Bei größeren Mengen wurde das bereits geerntete Frischmaterial portionsweise vorübergehend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Wurde etioliert gewachsenes Keimlingsmaterial sättigend belichtet, erfolgte dies unmittelbar nach der Ernte in maximal 10 g-Portionen. Appliziert wurden dazu zwei bis drei Minuten  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  UV-A-/Blaulicht. Anschließend homogenisierte man die Keimlinge in eiskaltem Homogenisationsmedium (25 mM MOPS-NaOH, 250 mM Sucrose, 0,1 mM  $\text{MgCl}_2$  und 8 mM Cystein, pH 7,8) zu einem breiigen Gemisch. Zur Entfernung von Zellfragmenten konnten größere Mengen zusätzlich durch ein Nylonnetz abgepreßt werden. Vollständig konnten Zellfragmente durch Zentrifugation bei 10000 g, 4 °C und 15 Minuten abgetrennt werden. Vom klaren Zellrohextrakt trennte man mittels Ultrazentrifugation bei 110000 g, 4 °C und 45 Minuten die mikrosomalen Membranen ab, die in eiskaltem Resuspensionsmedium (4 mM  $\text{KNO}_3$ , 250 mM Sucrose und 5 mM K-Phosphatpuffer pH 7,8) aufgenommen wurden. Mit Hilfe eines Homogenisators konnten die Membranen fein verteilt werden. So präparierte mikrosomale Membranen wurden bei  $-80 \text{ °C}$  unter Lichtausschluß gelagert.

Zur Stabilisierung von Phototropin im Rohextrakt konnte das Homogenisationsmedium mit verschiedenen Zusätzen angereichert werden:

- 1,15 mM PMSF
- Boehringer Complete™ Proteaseinhibitoren (1 Tablette pro 17,5 ml Homogenisationsmedium unter dem Zusatz von 3 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>)

**Tabelle 4: Zur Isolierung von mikrosomalen Membranen nötige Volumina an Homogenisationsmedium und Resuspensionsmedium.**

Frischmaterialmenge	Volumen Homogenisationsmedium	Volumen Resuspensionsmedium
100 g monokotyl oder dikotyl	175 ml	8-10 ml
10 g monokotyl oder dikotyl	17,5 ml	500-1000 µl
1 g monokotyl	3 ml	50-100 µl
1,5 g dikotyl	3 ml	50-100 µl
28 x 0-10 mm monokotyl	0,5 ml	30 µl
40 x 0-10 mm dikotyl	0,5 ml	30 µl

### **3.2.4 Gewinnung von löslichem Phototropin durch Proteinablösung von mikrosomalen Membranen**

#### **3.2.4.1 mit Detergentien**

Bei der Membranpräparation (siehe 3.2.3) wurde zum Rohextrakt vor der Ultrazentrifugation Detergens 5-20 Minuten bei Raumtemperatur oder auf Eis zugesetzt. Eingesetzt wurden entweder 3 mM Dodecylmaltosid (cmc 0,18 mM), 20,5 mM Octylglucosid (cmc 14,5 mM) oder 0,05 % (v/v) Brij 58. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an bereits standardisierten Vorschriften (Johansson *et al.*, 1995) oder an der cmc (engl. „critical micelle concentration“ = kritische Micellenbildungskonzentration). Die cmc wird definiert als niedrigste Konzentration, oberhalb der ein Detergens Micellen ausbilden kann oder als höchste Konzentration des Detergensmonomers. Phototropin kann vom jeweiligen Detergens solubilisiert werden, wenn die cmc überschritten wird. Nach der Zentrifugation analysierte man immunologisch mit Anti-NPH1 den löslichen Überstand und die Membranfraktion auf Solubilisierung von Phototropin.

Alternativ wurden frisch präparierte mikrosomale Membranen mit oben angeführten Detergentien unter vorsichtigem Schwenken fünf Minuten bei Raumtemperatur oder auf Eis inkubiert und einem weiteren Ultrazentrifugationsschritt (110000 g, 4 °C und 45 min) unterzogen. Das Sediment wurde mit Resuspensionsmedium resuspendiert. Das Volumen entsprach dem des abgenommenen löslichen Überstandes. Auf Phototropin wurden sowohl Sediment als auch löslicher Überstand untersucht.

### 3.2.4.2 mit hohen Salzkonzentrationen oder chaotropen Reagenzien

Mikrosomale Membranen wurden jeweils versetzt mit:

- 500 mM NaCl
- 0,5–1 M NaBr
- 10–15 mM NaPP
- verschiedenen Mischungen aus 0,5-1 M NaBr und 10-15 mM NaPP

Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert (110000 g, 4 °C und 45 min) und Sediment und Überstand getrennt voneinander untersucht.

### 3.2.4.3 mit Detergens und Salzen

Mikrosomale Membranen wurden bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schwenken fünf Minuten mit 0,05 % (v/v) Brij 58 und anschließend zusätzlich mit 500 mM NaCl, 1 M NaBr oder 15 mM NaPP für weitere 5–30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 110000 g, 4 °C und 45 Minuten enthielt der klare Überstand die von den Membranen abgelösten Proteine. Eine Stabilisierung von Phototropin konnte durch den Zusatz von Boehringer Complete™ Proteaseinhibitoren (1 Tablette pro 17,5 ml Resuspensionsmedium unter dem Zusatz von 3 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>) erreicht werden.

### 3.2.4.4 mit Salzen und Detergens

Frisch präparierte mikrosomale Membranen wurden mit 0,05 % (v/v) Brij 58 und 500 mM NaCl 30 Minuten auf Eis inkubiert und bei 110000 g, 4 °C und 45 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Membranfraktion wurde in Resuspensionsmedium im Volumen des Überstands aufgenommen und mit 3 mM Dodecylmaltosid, 20,5 mM Octylglucosid oder 0,5 % (v/v) Triton-X-100 fünf Minuten auf Eis inkubiert.

Nach anschließender Zentrifugation (110000 g, 4 °C und 45 min) wurden der klare Überstand und die Membranfraktion immunologisch auf Phototropin untersucht.

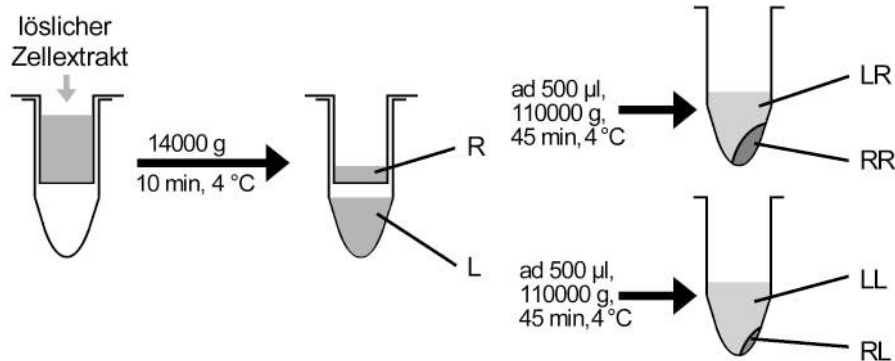
### 3.2.5 Größenfiltration

Um lösliches und membrangebundenes Protein schnell und schonend zu trennen, wurden Nanosep Mikrokonzentratoren mit einer Porengröße von 100 bzw. 300 K eingesetzt.

20 Senfhypokotyle (Segment I bzw. 0–5 mm) wurden mit 300 µl eiskaltem Homogenisationsmedium (25 mM MOPS-NaOH, 250 mM Sucrose, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub> und 8 mM Cystein, pH 7,8) homogenisiert. Feste Zellfragmente wurden durch Zentrifugation für 60 Sekunden bei 14000 g und 4 °C sedimentiert und verworfen. Der klare Überstand wurde mit Homogenisationsmedium auf 500 µl Gesamtvolumen gebracht und in einem Mikrokonzentratoren für 10 Minuten bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Durchlauf und Restvolumen wurden zu einem stöchiometrischen Vergleich mit Homogenisationsmedium

auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und analysiert.

Zur weiteren Analyse konnten optional Durchlauf und Restvolumen jeweils bei 110000 g für 45 Minuten bei 4 °C zentrifugiert werden.



Die Sedimente wurden in 500 µl Homogenisationsmedium resuspendiert und der lösliche Überstand ebenfalls ad 500 µl Gesamtvolumen ergänzt.

### 3.2.6 Proteinphosphorylierung und $^{32}\text{P}$ -Markierung

Aus den Ergebnissen von Zacherl (1997) geht hervor, daß zur optimalen Phosphorylierung von Zellrohextrakten und Rohmembranen folgende Bedingungen empfehlenswert sind:

0,3-0,5 % (w/v) Triton-X-100

pH 8,0, vorzugsweise 50 mM HEPES-KOH gepuffert

5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen-Endkonzentration

1 µM ATP

Wurden höhere ATP-Mengen zur Phosphorylierung eingesetzt, ist dies im Ergebnisteil gesondert angeführt. Die Phosphorylierung von Proteinen konnte je nach Bedarf auch mit radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt werden. Die dazu notwendigen Mengen an  $^{32}\text{P}$ -ATP sind als Mischung mit kaltem ATP oder ddH<sub>2</sub>O (trägerfrei) zuzusetzen. Die Quantifizierung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus erfolgte z. B. nach Gelelektrophorese über eine Auswertung mittels Phosphoimager und der Software BAS-Reader und TINA.

#### 3.2.6.1 Phosphorylierung von Zellrohextrakten

Vom zu untersuchenden Pflanzenmaterial wurde nach 3.2.1 ein Rohextrakt bereitet, der, wie von Zacherl (1997) beschrieben, unverzüglich nach folgendem Ansatz phosphoryliert wurde: in eine durchsichtige Mikrotiterplatte oder ein Mikrozentrifugengefäß mit der UV-A-/Blaulichtquelle darunter wurden 2 µl 2,5–5 % Triton-X-100 (Endkonzentration 0,25-0,5 % (v/v)) vorgelegt und 16 µl Rohextrakt zugefügt. Die ATP-Gabe (2 µl 10 µM ATP bzw. bei radioaktiv markierten Proben 0,5 µl  $^{32}\text{P}$ -ATP vermischt mit 1,5 µl ddH<sub>2</sub>O) erfolgte gleichzeitig mit der UV-A-/Blaulichtgabe (15-30 Sekunden lang sättigende Belichtung mit

einem UV-A-/Blaulichtphotonenfluß von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). Bei Dunkelkontrollen erfolgte die ATP-Gabe ohne Licht. Nach 60 Sekunden stoppte man die Reaktion durch Zugabe von  $7 \mu\text{l}$  4x SDS-Probenpuffer (110 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,03 % Bromphenolblau) und denaturierte drei Minuten bei  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.6.2 Phosphorylierung von mikrosomalen Membranen

Die Membranphosphorylierung erfolgte in Kinasepuffer (50 mM HEPES-KOH und 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 8,0), wobei ein fünffach konzentrierter Puffer eingesetzt wurde. Die mikrosomalen Membranen wurden mit 0,25–0,5 % (v/v) Triton-X-100 gemischt. Die ATP-Gabe (bei nicht radioaktiv markierten Proben mit  $2 \mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  ATP oder  $0,5 \mu\text{l}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  vermischt mit  $1,5 \mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  ATP, wenn im Ergebnisteil nicht anders angegeben) konnte, mußte aber nicht wie bei der Rohextraktphosphorylierung gleichzeitig mit dem sättigenden UV-A-/Blaulichtpuls (15–30 s,  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) gegeben werden, sondern war auch danach möglich. Die Reaktion wurde 60 Sekunden nach der ATP-Gabe mit  $7 \mu\text{l}$  4x SDS-Probenpuffer (110 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,03 % Bromphenolblau) gestoppt und drei Minuten bei  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  gekocht.

### 3.2.6.3 Phosphorylierung von überexprimierten Proteinen

20–30  $\mu\text{g}$  überexprimiertes Fusionsprotein in TCB-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,4) oder  $20 \mu\text{l}$  eines Thrombinverdaus (siehe 3.2.13) wurden in einem Gesamtvolumen von  $40 \mu\text{l}$  mit 40 U PKA (Stocklösung 4 U/ $\mu\text{l}$  in 40 mM DTT), 125  $\mu\text{M}$  ATP und gegebenenfalls  $1 \mu\text{l}$   $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  140 Minuten bei  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  phosphoryliert.

## 3.2.7 Gelelektrophorese

### 3.2.7.1 Denaturierende Gelelektrophorese: Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) im kontinuierlichen Tris-Glycin-Puffersystem

Als Stammlösung für alle SDS-Polyacrylamid-Gele wurde eine 30 % (w/v) Acrylamid-/0,8 % (w/v) Methylenbisacrylamid-Lösung in Wasser verwendet. Trenngele kamen je nach gewünschter Trenngröße mit Polyacrylamid-Anteilen von 7 % bis 17,5 % zum Einsatz. Des weiteren enthielten alle Trenngele 1 % SDS, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % TEMED, 0,083 % (w/v) APS und Harnstoff in verschiedenen Konzentrationen:



**Tabelle 5: Eingesetzte Harnstoffkonzentration in verschiedenen-prozentigen Polyacrylamidgelen für die SDS-PAGE.**

% Polyacrylamid im Trenngel	Harnstoffkonzentration
7	3,3 M
8	3,1 M
10	2,66 M
13	2 M
15	1,6 M
17,5	1 M

Das gegossene Gel überschichtete man mit wassergesättigtem Butanol, um eine gerade Kante zu erhalten und Blasenbildung zu vermeiden. Sammelgele wurden mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 5 % (w/v) in 125 mM Tris-HCl pH 6,8 unter Zusatz von 0,083 % (w/v) APS und 0,1 % TEMED auf das auspolymerisierte Trenngel gegossen. Die Probenaschen entstanden durch Einstecken von Kämmen in die noch nicht polymerisierte Sammelgellösung. Die Proteinproben wurden für die elektrophoretische Auftrennung mit einem Drittel des Probenvolumens mit 4x SDS-Probenpuffer (110 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,03 % Bromphenolblau) denaturiert. Letzteres wurde bei Proteinproben von Pflanzenrohextrakt, Membranen und Bakterienlysat durch dreiminütige Inkubation bei 90 °C verstärkt, wohingegen dieser Schritt für gereinigte Proteine entfiel. Die Elektrophorese erfolgte in einem kontinuierlichen Puffersystem in 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 unter Wasserkühlung bei einer konstanten Spannung von 150 V zu Beginn und maximal 300 V nach Einlaufen der Proben in das Trenngel.

### 3.2.7.2 Dodecylmaltosid-Gelelektrophorese in Anlehnung an BN-PAGE im diskontinuierlichen Puffersystem

Die Dodecylmaltosid-Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an die Blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Schägger & von Jagow (1991) durchgeführt. Die Anfertigung der Polyacrylamidgele erfolgte wie bei der SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1): Es wurden mit einer Mischung von 48 % (w/v) Acrylamid-/1,5 % (w/v) Methylenbisacrylamid-Lösung in Wasser 8 % und 10 % Trenngele sowie 4 % Sammelgele gegossen. Übrige Zusätze waren 0,5 M  $\alpha$ -Aminocapronsäure, 50 mM Bistris, pH 7,0 und des weiteren bei den Trenngelen 25 % (v/v) Glycerin und 2 mM Dodecylmaltosid. APS und TEMED wurden gemäß der Originalvorschrift zugegeben. Die Proteine wurden in Blau-Probenpuffer (0,5 M  $\alpha$ -Aminocapronsäure, 5 % (w/v) Serva Blau G und 10 % (v/v) Glycerin) 5 : 1 bis 10 : 1 solubilisiert. Die Elektrophorese im diskontinuierlichen Puffersystem wurde mit 50 mM Bistris pH 7,0 als Anodenpuffer und zunächst 50 mM Tricin, 15 mM Bistris und 0,02 % (w/v) Serva Blau G, pH 7,0 als Kathodenpuffer A bei 100 V und 4 °C unter Schutzlicht durchgeführt.

Nach dem ersten Drittel der Trennstrecke wurde der Kathodenpuffer A gegen Kathodenpuffer B (50 mM Tricin und 15 mM Bistris, pH 7,0) ausgetauscht, um überschüssigen Farbstoff bei der weiteren Elektrophorese bei 300 V zu entfernen.

### **3.2.8 Färbemethoden für Proteine**

#### **3.2.8.1 Coomassiefärbung**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Gel mittels Brilliant Blau R 250 angefärbt. Die Coomassiefärbung eignete sich für Proteinbanden mit einer Menge von 0,1 bis 10 µg. Dazu inkubierte das PAGE-Gel 10 Minuten unter leichtem Schütteln in der Coomassie-Färbelösung (0,5 % Brilliant Blau R 250 in 40 % (v/v) Ethanol und 7 % (v/v) Eisessig gelöst). Um den blauen Hintergrund zu entfärben, schüttelte man das gefärbte Gel so lange in Entfärberlösung (40 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Eisessig), bis die gefärbten Proteinbanden deutlich zu sehen waren. Anschließend wurde das gefärbte Gel, das aufgrund von Dehydrierung durch den in der Entfärberlösung enthaltenen Alkohol geschrumpft war, in 10 % (v/v) Essigsäurelösung so lange geschwenkt, bis die ursprüngliche Größe wiederhergestellt war. Letzteres bewirkte auch eine völlige Entfärbung des Hintergrundes. Die so behandelten Gele wurden zwischen zwei Cellophanfolien bei 80 °C unter Vakuum auf dem Geltrockner getrocknet.

#### **3.2.8.2 Silberfärbung**

Die Silberfärbung von Proteinen ist zehnfach sensitiver als eine Coomassiefärbung. Sie wurde zur Anfärbung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinproben mit geringer Konzentration eingesetzt. So konnten damit noch Banden mit weniger als 20 ng Protein angefärbt werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im ersten Fixierschritt 70 Minuten in einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Eisessig und 0,05 % (v/v) Formaldehyd geschwenkt. Nach dreimaligem jeweils zwanzigminütigem Waschen in 50 % (v/v) Ethanol wurde eine Oxidation in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung exakt eine Minute lang durchgeführt. Nach dreimaligem jeweils zwanzigsekündigem Schwenken in ddH<sub>2</sub>O inkubierte man das Gel für 20 Minuten in einer Lösung aus 0,2 % (w/v) Silbernitrat und 0,075 % (v/v) Formaldehyd. Um Reste der Silbernitratlösung abzuwaschen, schüttelte man das Gel dreimal 20 Sekunden in ddH<sub>2</sub>O. Die Schwärzung der Banden erfolgte anschließend in Entwicklerlösung (6 % (w/v) Natriumcarbonat, 0,05 % (v/v) Formaldehyd), wobei die Entwicklung durch kurzes Spülen mit ddH<sub>2</sub>O und Stop-Lösung (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Eisessig) beendet wurde.

#### **3.2.8.3 Ponceaufärbung**

Auf Nitrozellulose geblottete Proteine können mit Ponceau-Rot S reversibel gefärbt werden.

Dazu wurde die geblottete Membran eine Minute in der Färbelösung (0,5 % (w/v) Ponceau S und 1 % (v/v) Eisessig) geschwenkt und kurz in ddH<sub>2</sub>O gespült. Um den Farbstoff wieder zu entfernen, schüttelte man die Membran solange in ddH<sub>2</sub>O, bis die Färbung verschwunden war.

### 3.2.9 Westernblot und Immunologischer Nachweis

Mittels Westernblot kann man Proteine immunochemisch mit einem Antikörper nachweisen. Dazu wurden die durch Gelelektrophorese (siehe 3.2.7.1) aufgetrennten Proteinproben in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8,3) bei 160 mA und Wasserkühlung vom Gel auf Nitrozellulose transferiert. Zur Absättigung der Membran wurde 45 Minuten mit Blockpuffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween, pH 7,5 und 5% (w/v) Magermilchpulver bei Anti-NPH1 bzw. 0,5 % (w/v) BSA bei Anti-Phosphoserin) inkubiert und anschließend dreimal je 10 Minuten in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 0,1 % (v/v) Tween, pH 7,5) gewaschen. Die Antikörper wurden verdünnt in TBST-Puffer eingesetzt (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6: Zur Westernblotanalyse verwendete Antikörperverdünnungen.**

Antikörper	Verdünnung in TBST-Puffer	sekundärer Antikörper	Verdünnung in TBST-Puffer
Anti-NPH1	1 : 200	Anti Rabbit IgG-AP	1 : 5000
Anti-Phosphoserin	1 : 300	Anti Mouse IgG-AP	1 : 5000

Die Antikörperdekoration erfolgte über 45 min. Nach dreimaligem jeweils zehn minütigem Waschen in TBST-Puffer wurde ein dem ersten Antikörper entsprechender sekundärer Antikörper 45 Minuten hybridisiert, dessen Art und Verdünnung ebenfalls Tabelle 6 zu entnehmen ist. Dieser sekundäre Antikörper liegt als Konjugat mit alkalischer Phosphatase vor. Diese setzt, nach Entfernung überschüssigen Antikörpers durch dreimal 10 Minuten Waschen in TBST-Puffer, zwei in der Entwicklerlösung (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5 mit dem Zusatz von 0,345 mg/ml NBT und 0,0525 mg/ml  $\beta$ -x-Phosphat) enthaltene Substrate an der Stelle des dekorierten Proteins farbig um. Nach beendeter Farbreaktion wurde überschüssige Entwicklerlösung mit Wasser abgewaschen und die Membran getrocknet.

### 3.2.10 Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Fällung von Proteinen mittels Ammoniumsulfat wird von letzterem eine bei Raumtemperatur gesättigte Lösung eingesetzt. Zur Ermittlung des Volumens an gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung dient folgende Formel:

$$\frac{\text{Volumen der zu fällenden Proteinlösung} \times \% \text{ Ammoniumsulfat}}{100 - \% \text{ Ammoniumsulfat}} = \text{Volumen an zuzugebender gesättigter Ammoniumsulfatlösung}$$

Sollte eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt werden, wurde mit dem niedrigsten Prozentsatz an Ammoniumsulfat begonnen. Bei den anschließenden höherprozentigen Fällungen wurde stets dasselbe Gesamtvolumen beibehalten und bei der jeweils folgenden Prozentzahl das bereits in der Probe enthaltene Ammoniumsulfat als Differenz berücksichtigt.

### **3.2.11 Proteinmengenbestimmung**

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte nach Bradford (1976) unter Verwendung des Biorad Protein Assays, das mit ddH<sub>2</sub>O 10 : 1 verdünnt eingesetzt wurde. Als Eichstandard diente BSA in verschiedenen Konzentrationen.

### **3.2.12 Bestimmung des Protein-Chromophor-Verhältnisses**

Von den nach 3.3.4–3.3.6 aufgereinigten Chromoproteinen wurde zunächst nach 3.2.11 die Proteinkonzentration in [µM] bestimmt. Zur Bestimmung der Chromophormenge wurden 100 µl der selben Proteinprobe mit 20 µl 20 % (w/v) Trichloressigsäure versetzt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und durch 15 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 13000 g der klare Überstand gewonnen. Nach Verdünnung des Überstands ad 500 µl mit ddH<sub>2</sub>O wurde ein Fluoreszenzemissionsspektrum von 400 bis 600 nm bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm aufgenommen und damit im Maximum der Emissionswert festgestellt. Aus einer Eichkurve, die mit kommerziell erhältlichem FMN angelegt wurde, und nach Multiplikation mit dem Faktor 5 (wegen vorangegangener Verdünnung) konnte die Menge an FMN in [µM] in der Probe ermittelt werden. Bei LOV2 betrug das Protein Chromophor-Verhältnis i. d. R. 1 : 1. Bei den verschiedenen LOV2-Mutanten konnte die Menge des Chromophors drastisch verändert sein, so daß z. B. bei der Mutante LOV2-S20F das Verhältnis 1 : 0,015 betrug und somit eine Chromophorreduktion von 98,5 % vorlag.

### **3.2.13 Thrombinverdau zur Abspaltung des CBP-Fusionsproteins**

30 µg heterolog überexprimiertes CBP-Fusionsprotein in TCB-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,4) wurde in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 40 ng Thrombin bei 25 °C für 90-120 Minuten inkubiert.

### **3.2.14 Gelelution**

Nach SDS-PAGE wurde die exakte Lage der zu eluierenden Banden bestimmt. Zum einen konnte dies durch vorgefärbte Markerproteine erfolgen, die mit den Proben der Elektrophorese unterzogen wurden und nach dem Gellauf eine Bestimmung nach dem Molekulargewicht ermöglichten. Zum anderen konnten radioaktiv markierte Proteine mittels Autoradiogramm zugeordnet werden. Dazu wurde unmittelbar nach der Elektrophorese ein Autoradiogramm aufgenommen. Dieses wurde, durch eine Folie getrennt, in Originalgröße unter dem Gel positioniert. So konnten die entsprechenden Banden lokalisiert werden. Die Banden wurden mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und mit Gelelutionspuffer (50 mM HEPES-KOH, 5 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,1 % SDS, pH 8,0, stets frisch angesetzt), der in zwei- bis dreifachem Volumen des Gelstücks zugegeben wurde, fein zerkleinert. Nach zehnmütiger Inkubation bei 80 °C erfolgte eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 13000 g und Raumtemperatur über ein 0,2 µm Nanosep-Mikrokoncentratorsäulchen. Das von Gelfragmenten befreite Eluat enthielt die Hauptmenge des eluierten Proteins. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 13000 g und Raumtemperatur in einem 10-K-Nanosep Konzentrator konnte auf das gewünschte Volumen eingeeengt werden.

Es erwies sich als sinnvoll, die so konzentrierte Proteinelösung vor einer endgültigen Konzentration auf Kleinstvolumina (10 bis 30 µl) mit 1000 µl Gelelutionspuffer zu waschen. Dadurch konnte die unerwünschte Anreicherung von niedermolekularen Begleitsubstanzen vermieden werden.

### **3.2.15 Trypsinspaltung**

Die tryptische Spaltung erfolgte allgemein nach der Richtlinie, daß die Menge des eingesetzten Trypsins mindestens einem Zehntel der zu spaltenden Proteinmenge entsprach. Laut Prof. Lottspeich vom MPI, Martinsried, können Trypsin und das zu spaltende Protein sogar in gleicher Menge eingesetzt werden, um dadurch die Reaktionszeit zu verkürzen. Bei der tryptischen Spaltung vor zweidimensionaler Dünnschichtelektrophorese wurde jedoch auf letzteres verzichtet, um die Zahl von nichtmarkierten tryptischen Peptiden und damit die Probenkonzentration gering zu halten, und dafür eher eine längere Reaktionszeit in Kauf genommen. Eingesetzt wurde eine Stocklösung von 5 µg/µl Trypsin, gelöst in 1 mM HCl. In der Regel wurde das zu spaltende Protein in TCB-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,4) bei 37 °C in Anwesenheit von 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> bis zu 5 Tagen inkubiert. In Ausnahmefällen konnte dazu die Reaktionstemperatur auch bis auf 25 °C reduziert bzw. die Inkubationsdauer verkürzt werden. Abweichende Bedingungen sind im Ergebnisteil gesondert angegeben.

### **3.2.16 Cyanbromid-Spaltung**

Die chemische Spaltung von Proteinen mit Bromcyan erfolgte in Anlehnung an die Methode von Luo *et al.* (1991). Das zu spaltende Protein wurde in 70 % Ameisensäure mit Bromcyan in einer Endkonzentration von 50 mg/ml für zwei Stunden bei Raumtemperatur verdaut. Anschließend wurde die Probe im Vakuumkonzentrator zur Trockene eingeeengt. Um Reste von Ameisensäure zu entfernen, löste man das Proteinsediment in einem Fünftel Verdauvolumen ddH<sub>2</sub>O und engte erneut zur Trockene ein. Dieser Schritt mußte so oft wiederholt werden, bis die Probe einen neutralen pH-Wert aufwies. In der Regel waren dazu drei bis vier Waschschriffe nötig. Um die Probe für weitere Analysen bereitzustellen, wurde das Proteinsediment in 10–30 µl ddH<sub>2</sub>O oder Puffer aufgenommen.

### **3.2.17 Chromatographie**

#### **3.2.17.1 Dünnschicht-Elektrophorese**

Die Dünnschicht-Elektrophorese wurde bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie in der ersten Dimension eingesetzt und erfolgte nach der Methode von Hannig und Pascher (1967). Die Trennung erfolgte auf Zelluloseplatten. Um ausreichende Kühlung zu gewährleisten, wurde ein Kryostat angeschlossen und mit Kühlmittel bei 0 °C betrieben. Es wurden 0,5–1,5 µl Probenvolumen mit möglichst hoher radioaktiver Markierung eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 % Ammoniumcarbonat-Lösung pH 8,9 und 5 mA und 400-500 V. Eine optimale Auftrennung war erfahrungsgemäß nach 150–180 Minuten erreicht. Anschließend wurde die Zelluloseplatte bei 37 °C getrocknet und mittels Phosphoimager ausgewertet.

#### **3.2.17.2 Aufsteigende Dünnschichtchromatographie**

Die aufsteigende Dünnschichtchromatographie wurde bei eindimensionaler Dünnschichtchromatographie oder bei zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie in der zweiten Dimension eingesetzt. Auf die Dünnschichtplatte wurde das aufzutrennende Probenvolumen aufgetragen (möglichst wenig Probenvolumen ggf. mit möglichst hoher radioaktiver Markierung) und vollständig getrocknet. Alternativ wurde eine vollständig getrocknete Dünnschichtplatte mit bereits in erster Dimension elektrophoretisch aufgetrennter Probe verwendet. Die Platte wurde in eine Dünnschichtkammer eingesetzt, die mit etwa 1 cm Laufmittel gefüllt war. Die genauen Zusammensetzungen sind in Tabelle 7 angegeben. Die Seiten der Kammer wurden mit laufmittelgetränkten Filterpapierstreifen ausgekleidet. Die Chromatographie war beendet, wenn die Laufmittelfront den oberen Plattenrand erreicht hatte. Die Platte wurde danach bei 37 °C getrocknet und ausgewertet.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der verschiedenen Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie und Chromatographiedauer.**

DC-Platte	Laufmittel (Angabe in Volumenanteilen)	Dauer der DC
Zellulose	n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H <sub>2</sub> O 37 : 25 : 8 : 30	8-11 Stunden
Kieselgel 60 F	n-Butanol:Eisessig:H <sub>2</sub> O 80 : 20 : 20	ca. 5 Stunden
Zellulose	n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H <sub>2</sub> O 75 : 50 : 15 : 60	ca. 8 Stunden
Kieselgel 60 F, Zellulose	CHCl <sub>3</sub> :Methanol:17 % Ammoniak 40 : 40 : 20	ca. 3 Stunden
Kieselgel 60	n-Butanol:Aceton:Eisessig:5 % Ammoniak:H <sub>2</sub> O 35 : 25 : 15 : 15 : 10	ca. 4 Stunden

### **3.2.18 Affinitätsreinigung mit dem Reaktivfarbstoff Cibachchron Blau**

Die Affinitätsreinigung von Kinasen mit Cibachron Blue 3GA-Agarose nach Baxter *et al.* (1978) wurde in leicht abgeänderter Form gemäß dem Protokoll durchgeführt: die Reinigung erfolgte im sogenannten „batch“-Verfahren, wobei prinzipiell die Affinitätsmatrix mit der ersten Lösung (z. B. Probe-, Wasch- oder Elutionslösung) inkubiert und letztere durch einminütige Zentrifugation bei 4 °C und 13000 g als Überstand wieder gewonnen wurde. Daraufhin folgte die Inkubation der Matrix mit der nächsten Lösung. Die folgenden Schritte wurden entweder im Licht oder im Dunkeln durchgeführt, wobei auf Einzelheiten im Ergebnisteil eingegangen wird.

Die Cibachron Blue 3GA-Agarose wurde zweimal mit jeweils dem zehnfachen Matrixvolumen an Säulenpuffer (50 mM HEPES-KOH, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,0) gewaschen und anschließend mit dem zehnfachen Matrixvolumen an Equilibrierpuffer (50 mM HEPES-KOH, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,0 und pro 25 ml 1 Tablette Complete™) gespült. Die so vorbereitete Matrix versetzte man mit dem zehnfachen Matrixvolumen der aufzureinigenden, in Equilibrierpuffer 1 : 1 bis 10 : 1 verdünnten Proteinlösung und inkubierte 30 Minuten rotierend bei 4 °C. Alternativ konnte die Affinitätsanbindung zusätzlich in Gegenwart von FMN, FAD, 150 mM NaCl, 0,05 % Triton-X-100 oder in Kombination dieser Reagenzien durchgeführt werden.

Anschließend wurde die Matrix fünfmal mit jeweils dem zehnfachen Matrixvolumen an Equilibrierpuffer, Waschpuffer 1 (50 mM HEPES-KOH und 400 mM KCl, pH 8,0) oder Waschpuffer 2 (50 mM HEPES-KOH, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM Mercaptoethanol, pH 9,0) gewaschen. Die Elution der affinitätsgebundenen Proteine erfolgte in 1 ml-Portionen mit Elutionspuffer (50 mM HEPES-KOH, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Mercaptoethanol, 10-100 mM Elutionsagens, pH 8,0 und pro 25 ml Puffer 1 Tablette Complete™). Die Affinitätsmatrix konnte, mit 10 fachem Volumen Regenerationspuffer (50 mM HEPES-KOH, 5 mM Mercaptoethanol und 2 M NaCl, pH 9,0) regeneriert, bei 4 °C in Säulenpuffer equilibriert gelagert werden. Alternativ wurden alle Lösungen statt mit 50 mM HEPES-KOH auch mit 100 mM Tris-HCl gepuffert. Die eluierten Proteinfractionen wurden auf Phototropin untersucht.

### **3.2.19 Nachweis für N-Acetylglucosaminierung**

Der Nachweis von  $\beta$  1-4-N-Acetylglucosaminierung erfolgt nach der Vorschrift zur Anwendung Digoxigenin-markierter Lectine in der Glycokonjugat-Analytik von Boehringer Mannheim. Es wurden die zu untersuchenden Proben mittels SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1) aufgetrennt und nach 3.2.9 geblottet. Die 45 Minuten mit BSA-Blockpuffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween, pH 7,5 und 5 % (w/v) BSA) geblockte Membran inkubierte man nach gründlichem Waschen in TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl und 0,1 % (v/v) Tween, pH 7,5) mit 1 : 100 in TBST-Puffer verdünntem, mit Digoxigenin markiertem Weizenkeimagglutinin für 60 min. Die so behandelte Membran wurde wiederum gründlich in TBST-Puffer gewaschen und 45 Minuten mit einem Anti-Digoxigenin Antikörper (1 : 500 in TBST-Puffer verdünnt) behandelt, welcher als Konjugat mit alkalischer Phosphatase vorliegt (Anti-DIG-AP-Konjugat). Die Entwicklung und Farbreaktion erfolgte analog dem Protokoll zur Antikörperdekoratation unter 3.2.9.

### **3.2.20 Glycoproteinnachweis**

Nach dem Prinzip des DIG Glycan Detection Kit von Boehringer Mannheim können Zuckerreste mit zwei benachbarten Hydroxygruppen nachgewiesen werden.

Nach SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1) wurden die zu analysierenden Proben über Elektrobotten (siehe 3.2.9) auf Nitrozellulose transferiert. Diese Membran wurde in PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) gewaschen und zur Oxidation der Hydroxygruppen von vorhandenen Glycoproteinen im Dunkeln 20 Minuten mit 10 mM Natriummetaperjodat in 100 mM Acetatpuffer pH 5,5 inkubiert. Nach erneutem Waschen in PBS-Puffer wurden Aldehyde mit 0,25  $\mu$ M Biotin-Hydrazid (nach dem ECL Glycoprotein Detection System von Amersham Pharmacia Biotech) in 100 mM Acetatpuffer 60 Minuten markiert. Nach gründlichem Waschen in PBS-Puffer wurde die Membran mit



5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Puffer 45 Minuten geblockt, erneut gewaschen und mit einem Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, das 1 : 2000 mit PBS-Puffer verdünnt eingesetzt wurde, 45 Minuten behandelt. Die Entwicklung und Farbreaktion erfolgte analog dem Protokoll zur Antikörperdekoration unter 3.2.9.

### **3.2.21 Massenspektroskopie**

Proteine wurden durch Massenspektroskopie (Q-TOF ESI-MS-MS, Fa. Micromass, UK) sequenziert und identifiziert. Dazu wurden etwa 1 µg Protein im SDS-Gel aufgetrennt, ausgeschnitten, mit DTT reduziert und mit Iodacetamid/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> alkyliert. Nach einem tryptischen Verdau wurden die Peptide aus dem Gel eluiert und in Ameisensäure ionisiert. Das exakte Protokoll ist bei Dr. Bernd Müller (Fa. Roche, Basel) einzusehen. Über Mascot („peptide mass fingerprint“ unter [http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/search_form_select.html)) wurden anhand von den ermittelten Aminosäuren der fragmentierten Peptide die Proteine identifiziert.

## **3.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

Allen Arbeitsschritten mit Bakterienmaterial lagen die Standardprinzipien für den Umgang mit S1-Organismen nach Sambrook *et al.* (1989) zugrunde. Biologisches S1-Material wurde durch Autoklavieren (2 bar, 25 min, 121 °C) oder durch Behandlung mit 70 % Ethanol inaktiviert.

### **3.3.1 Standardarbeitstechniken**

#### **3.3.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Eine Einzelkolonie des gewünschten Bakterienstamms wurde in 100 ml LB-Medium bei 37 °C mit 200 Upm rotierend bis zu einer OD<sub>580</sub> von 0,5 bebrütet und anschließend 15 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Ernte bei 3500 g und 4 °C für 10 Minuten wurden die Bakterienzellen in 40 ml eiskalter Tfb I-Lösung (30 mM KAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> und 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und je nach Bakterienstamm unterschiedlich lang auf Eis inkubiert:

**Tabelle 8: Dauer der Acetat-/Chloridinkubation der unterschiedlichen E. coli-Stämme zur Präparation kompetenter Zellen.**

E. coli-Stamm	empfohlene Inkubationsdauer
BL21(DE3)pLysS	30–35 min
BL21(DE3)	35–40 min
XL1blue	20–35 min

Die Bakteriensuspension sedimentierte man erneut bei 3500 g und 4 °C für 10 min. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml Tfb II-Lösung (10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Na-MOPS und 15 % (v/v) Glycerin, pH 7,0) aufgenommen und, portioniert in 100 µl Aliquots, bei - 80 °C gelagert.

Um die Kompetenz der so präparierten Zellen zu testen, wurden 1ng, 10 ng und 100 ng pCal-n-Plasmid DNS transformiert (siehe 3.3.1.2), die gewachsenen Kolonien gezählt und jeweils die Kolonienzahl (= cfu bzw. „colony forming units“) für 1 µg Plasmid-DNS berechnet. Für BL21(DE3)pLysS ergab sich in der Regel eine Transformationsrate in der Größenordnung von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> cfu/µg Plasmid-DNS, für BL21(DE3) von 10<sup>5</sup> cfu/µg Plasmid-DNS und für XL1blue von 10<sup>6</sup> cfu/µg Plasmid-DNS.

### 3.3.1.2 Transformation in Bakterien

Zu einem 100 µl Aliquot kompetenter, auf Eis gelagerter Bakterienzellen (siehe 3.3.1.1) wurden maximal 5 µl zu transformierende Plasmid-DNS zupipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 90sekündigen Hitzeschock bei 42 °C kühlte man die Zellen zwei Minuten auf Eis ab, gab 400 µl 37 °C warmes LB-Medium (1 % (w/v) Pepton aus Casein, 1 % (w/v) NaCl und 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, pH 7,5) zu und bebrütete eine Stunde bei 37 °C. In der Regel wurden von dieser Kultur maximal 150 µl auf LB-Amp-Agar (1 % (w/v) Pepton aus Casein, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt und 1,5 % (w/v) Agar-Agar, pH 7,5) ausplattiert. Wollte man die ganze Probe verwenden, sedimentierte man die Bakterienzellen eine Minute bei 11500 g, verwarf 400 µl des klaren Überstands und plattierte die im verbliebenen Überstand resuspendierten Zellen aus. Die LB-Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.3.1.3 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterienzellen wurde je nach Ausbeute und Reinheit der DNS nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt.

#### 3.3.1.3.1 Minipräparation per „Spin Columns“

Diese Methode wurde lediglich zur anschließenden Sequenzierung der Plasmid-DNS

benutzt, da hierbei kleine DNS-Mengen von etwa 20 µg in ausreichender Reinheit gewonnen werden konnten. Die Präparation mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>Plasmid-Kit erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

#### 3.3.1.3.2 Standard-Minipräparation

Diese schnelle Plasmidpräparation ist für eine qualitative Analyse der DNS in den meisten Fällen ausreichend. Dazu wurde eine Einzelkolonie des gewünschten Bakterienklons in 6 ml LB/Amp-Medium bei 37 °C und 200 Upm über Nacht bebrütet. Die Zellen wurden bei 14000 g 3 min sedimentiert und in 100 µl Lösung 1 (25 mM Tris-HCl, 50 mM Glucose und 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend lysierte man die Zellen mit 200 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH und 1 % (w/v) SDS) und inkubierte fünf Minuten bei Raumtemperatur. Zur Ausfällung von genomischer DNS und Makromolekülen (u. a. Zellfragmente, Proteine) wurde mit 150 µl kalter Lösung 3 (3 M Kaliumacetat und 1,8 M Ameisensäure) neutralisiert. Es wurde fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C für fünf Minuten enthielt der klare Überstand die Plasmid-DNS. Das Präzipitat wurde verworfen. Durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 99 % Ethanol wurde die DNS 30 Minuten bei -20 °C gefällt, bei 14000 g und 4 °C für 15 Minuten sedimentiert und mit 500 µl 70 % Ethanol fünf Minuten bei RT entsalzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 g und 4 °C für 15 Minuten wurde der Überstand sorgfältig entfernt und das Plasmid-DNS-Sediment in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgenommen. Je nach Bedarf konnte noch mit 5 µg RNase A (10 mg/ml Stock in 10 mM Tris-HCl und 15 mM NaCl, pH 7,5, gekocht bei 100 °C für 15 min) störende RNS bei 37 °C für 30 Minuten beseitigt werden. War es nötig, Nukleotide und andere niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen, wurde die ethanolische Fällung und Entsalzung wiederholt.

#### 3.3.1.3.3 Midipräparation

Um Plasmid-DNS-Mengen bis zu 100 µg hochrein zu gewinnen, wurde das QIAGEN Plasmid Midi Kit eingesetzt. So präparierte DNS wurde zur Sequenzierung und für die zielgerichtete Mutagenese verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

#### 3.3.1.4 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNS

Die Konzentration in µg/µl von reiner Plasmid-DNS wurde ermittelt, indem die optische Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) von 1 µl der präparierten DNS mit 999 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt in einer Quarzküvette gegen ddH<sub>2</sub>O gemessen wurde und mit dem Umrechnungsfaktor k von 50 (für doppelsträngige DNS) multipliziert wurde. Das Verhältnis  $OD_{260} : OD_{280}$  liegt bei hochreiner DNS zwischen 1,8 und 2,0 (Sambrook *et al.*, 1989).

### 3.3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur hochempfindlichen und für Kontaminationen anfälligen Polymerase-Kettenreaktion (englisch „polymerase chain reaction“ oder PCR) wurden stets autoklavierte Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen (ggf. gestopft) und ddH<sub>2</sub>O eingesetzt und auf Reinheit der Stammlösungen geachtet. In der Regel waren die 50 µl Ansätze wie folgt zusammengesetzt:

100 ng	„template“ (engl. für Matrize)–DNS
1 x	Reaktionspuffer
20 pmol	„upstream Primer“ (engl. für Sinn-Oligonukleotid)
20 pmol	„downstream Primer“ (engl. für Gegensinn-Oligonukleotid)
15 nmol	dNTP-Mix (Konzentration jeweils 10 mM)
2,5 U	<i>pwo</i> -Polymerase

Diese Ansätze wurden in die je nach Thermocycler empfohlenen Reaktionsgefäße zusammenpipettiert. Zur Amplifikation von DNS-Fragmenten im Bereich von 100 bis 1000 bp wurde in der Regel folgendes Standardprogramm durchgeführt:

- Vor Beginn der PCR wurde zum optimalen Aufschmelzen der DNS  
5 min bei 97 °C inkubiert.
- Es folgten 30 Zyklen, bestehend jeweils aus:

DNS-Denaturierung	30 s	97 °C
Primeranlagerung	30 s	60 °C
DNS-Verlängerung	90 s	68 °C
- Am Ende wurde weiter 10 min bei 68 °C inkubiert und  
danach auf 8 °C abgekühlt.

Da jedoch je nach Nukleotidzusammensetzung der „template“-DNS die PCR-Bedingungen dieses Standardprogramms erheblich abweichen können, wird im Ergebnisteil auf abgeänderte Bedingungen gesondert hingewiesen. Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Vorschrift des Herstellers zur Entfernung von nicht eingebauten Oligonukleotiden und dNTP's gereinigt.

### 3.3.1.6 Restriktionsverdau

Zu einem Verdau von DNS wurden bei 20 µl Gesamtvolumen maximal 4 µg DNS, 1–4 U Restriktionsenzym und das nach Vorschrift des Herstellers entsprechende Volumen an Reaktionspuffer eingesetzt. Prinzipiell mußte das Gesamtvolumen das Enzymvolumen mehr als zehnfach übersteigen. Bei 37 °C inkubierte der Ansatz mindestens 2 Stunden. Entstanden Fragmente, die größer als 50 bp waren, konnten durch Elektrophorese in einem

Agarosegel kontrolliert werden. Je nach Bedarf wurde eine Reinigung des DNS-Fragments mit dem QIAquick PCR Purification Kit bzw. dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

### 3.3.1.7 Elektrophorese

DNS kann ihrer Größe nach in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. Je nach Größe der aufzutrennenden DNS wurden Gele mit unterschiedlicher Agarosekonzentration gegossen (siehe Tabelle 9)

**Tabelle 9: Prozentuale Agaroseanteile in DNS-Gelen und daraus resultierende optimale Trennbereiche.**

DNS-Fragmentgröße	% Agarose im Gel
1000-12000 bp	0,8
500-10000 bp	1,0
400-700 bp	1,3
50-600 bp	2

Die entsprechende Menge an Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat und 2 mM EDTA, pH 8) durch Erhitzen gelöst. In die auf etwa 50 °C abgekühlte Lösung wurde zur Anfärbung der DNS 0,01 % (w/v) Ethidiumbromid zugefügt und anschließend wurden je nach Probenmenge Gele gegossen. Die DNS-Proben wurden mit einem Sechstel Volumen Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5, 50 % Glycerin und 0,5 % Bromphenolblau) versetzt, auf der Kathodenseite des Gels geladen und bei 100 V in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetrennten Banden konnten bei UV-Licht (312 nm) betrachtet werden.

### 3.3.2 Klonierung in *E. coli*

Bei der Klonierung wird ein durch PCR generiertes DNS-Fragment über Restriktionsschnittstellen in einen Klonierungsvektor ligiert. Diese Konstrukt kann dann in einen *E. coli*-Stamm transformiert und darin vervielfältigt werden.

#### 3.3.2.1 PCR zur Amplifikation eines DNS-Fragments

Das zu klonierende DNS-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert aus dem cDNS-Klon pBR-As-phot1a (Zacherl *et al.*, 1998) als „template“-DNS. Für das Oligonukleotiddesign dienten die „upstream“- bzw. „downstream“-Sequenzen des zu amplifizierenden DNS-Fragments. Waren in diesen Regionen keine Restriktionsschnittstellen enthalten, die zur Klonierung in die multiple Klonierungsstelle des Vektorplasmids verwendet werden konnten, wurden diese

im Leserahmen mittels 5'-überhängenden Oligonukleotiden über PCR an das zu klonierende DNS-Fragment angehängt. Generell wurden synthetische Oligonukleotide für Standardklonierungen nach folgenden Kriterien konstruiert:

- Die Oligonukleotide sollten eine Basenlänge von 18-35 bp haben.
- Die Schmelztemperatur sollte zwischen 50 und 80 °C liegen.
- Die Oligonukleotide sollten 40 % GC-Mindestgehalt haben.
- Die Oligonukleotide sollten am 3'-Ende mit G oder C enden.

Ein Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide ist unter 2.2.2.1 zu finden, die exakten Klonierungsbedingungen findet man im Ergebnisteil. Die PCR wurde wie unter 3.3.1.5 beschrieben durchgeführt.

### 3.3.2.2 Restriktionsverdau und Vektordephosphorylierung

Mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden im Vektorplasmid und im gereinigten DNS-Fragment ligierbare Enden nach 3.3.1.6 generiert, wobei jeweils im Leserahmen zwischen Vektor und DNS-Fragment zueinander passende Restriktionsenden erzeugt wurden. Das verdaute DNS-Fragment wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Der linearisierte Vektor wurde zur Reinigung nach der Elektrophorese (siehe 3.3.1.7) aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Vorschrift des Herstellers extrahiert.

Um Religation nicht vollständig verdauter Vektorenden zu vermeiden, war es ratsam, die Vektorenden zu dephosphorylieren. Der Reaktionsansatz dazu enthielt 40-50 ng extrahierten Vektor, 20 U Alkalische Phosphatase und 1x Dephosphorylierungspuffer. In der Regel wurde ein Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl gewählt. Bei 37 °C wurde zwei Stunden dephosphoryliert. Zur Entfernung des Enzyms wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Vorschrift des Herstellers gereinigt.

### 3.3.2.3 Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert wurde mit dem Boehringer Mannheim Rapid DNA Ligation Kit nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde der vorangegangenen, beschriebenen Reinigung von Vektor und DNS-Fragment besondere Beachtung geschenkt: die Entfernung des alkoholhaltigen Waschpuffers wurde mindestens zweimal ausgeführt, da die zur Ligation verwendete Ligase empfindlich gegenüber kleinsten Spuren von Alkohol ist.

### 3.3.2.4 Transformation

Vom Ligationsansatz wurde 1 µl wie in 3.3.1.2 beschrieben, in kompetente *E. coli*-Zellen (siehe 3.3.1.1) transformiert.

### 3.3.2.5 Überprüfung der Klonierung

Zur Überprüfung von möglichen positiven Kolonien wurde eine Plasmidminipräparation nach 3.3.1.3.2 angefertigt. Anschließend wurde die präparierte Plasmid-DNS einem Restriktionsverdau (siehe 3.3.1.6) mit den zur Klonierung verwendeten Enzymen unterworfen. Konnten nach Elektrophorese des Verdau (siehe 3.3.1.7) Vektor und Insert detektiert werden, war der Klon als positiv identifiziert.

### 3.3.2.6 Glycerinkultur

Für die dauerhafte Konservierung von Bakterienklonen wurden Glycerin und Bakterienübernachtskultur im Verhältnis 1 : 1 gemischt und bei -80 °C gelagert.

## 3.3.3 Zielgerichtete Mutagenese

Über zielgerichtete *in vitro* Mutagenese (englisch „site-directed mutagenesis“) können in Plasmiden gezielt einzelne Nukleotide ausgetauscht werden. Es wurde dafür nach dem Protokoll des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene gearbeitet. Dabei wird mittels PCR das komplette doppelsträngige Plasmid amplifiziert, wobei über komplementäre Oligonukleotide die Mutation eingeführt wird. Das genickte Plasmid kann ohne vorherige Ligation in *E. coli* transformiert werden. Die Transformationsrate gegenüber vollständig geschlossenen Plasmiden ist jedoch deutlich reduziert.

### 3.3.3.1 Mutations-PCR

Punktmutationen wurden über mutierte Oligonukleotide eingeführt. Dazu wurden komplementäre Oligonukleotide konstruiert, die an der zu mutierenden Stelle statt der parentalen Nukleotidsequenz die neue, veränderte Basenfolge enthielten. Beim Oligonukleotiddesign wurde auf folgende Kriterien besonderer Wert gelegt:

- Beide komplementären Oligonukleotide müssen die angestrebte Mutation enthalten und an der gleichen Stelle im Plasmid anbinden.
- Die Oligonukleotide sollten eine Basenlänge von 25-45 bp haben.
- Die Schmelztemperatur  $T_m$  der Oligonukleotide sollte 78 °C oder mehr betragen. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/N + \% \text{ mismatch}$$

GC = GC-Gehalt des Primers

N = Primerlänge/Basenzahl

mismatch = ausgetauschte Basen

- Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte des Oligonukleotids liegen.
- Durch die eingefügte Mutation sollte nach Möglichkeit eine ursprüngliche

Restriktionsstelle wegfällen oder hinzugefügt werden. Dies kann auch in unmittelbarer Nähe der Mutation stattfinden sofern nicht die ursprüngliche, nicht zu mutierende Nukleotidsequenz betroffen ist.

- Die Oligonukleotide sollten 40 % GC-Mindestgehalt haben.
- Die Oligonukleotide sollten am 3'-Ende mit G oder C enden.

Die PCR wurde durchgeführt wie unter 3.3.1.5 beschrieben. Der Reaktionsansatz enthielt:

50 ng	„template“-DNS
1 x	Reaktionspuffer
20 pmol	„upstream Primer“
20 pmol	„downstream Primer“
30 nmol	dNTP-Mix (Konzentration jeweils 10 mM)
2,5 U	<i>pwo</i> -Polymerase

Hier sei ausdrücklich auf die Kontrollesektivität (engl. „proofreading“-Aktivität) der *pwo*-Polymerase hingewiesen, die für die exakte Amplifikation des kompletten Plasmids nötig ist und nur die über die Oligonukleotide eingeführten Mutationen zuläßt. Die PCR-Bedingungen wurden der Länge des zu amplifizierenden Plasmids angepaßt:

- Vor Beginn der PCR wurde zum optimalen Aufschmelzen der DNS  
5 min bei 97 °C inkubiert.
- Es folgten 20 Zyklen, bestehend jeweils aus:

DNS-Denaturierung	30 s	97 °C
Primeranlagerung	60 s	55 °C
DNS-Verlängerung	2 min/1 kb	68 °C
- Am Ende wurde weiter 10 min bei 68 °C inkubiert und  
danach auf 8 °C abgekühlt.

Je nach GC-Gehalt und/oder spezieller Basenabfolge variieren diese Bedingungen sehr stark und sind für die einzelnen Mutationen dem Ergebnisteil zu entnehmen.

### 3.3.3.2 Dpnl-Verdau

In einen 50 µl-PCR-Ansatz wurden 30 U Dpnl gegeben und bei 37 °C exakt 90 Minuten verdaut. Anschließend reinigte man mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach der Vorschrift des Herstellers.

### 3.3.3.3 Transformation

Die Transformation erfolgte nach 3.3.1.2 in kompetente *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen.



### 3.3.3.4 Mutationsüberprüfung

Eine erfolgreiche Mutation läßt sich letztendlich nur durch Sequenzierung bestätigen. Die Sequenzierung der einzelnen Mutanten erfolgte freundlicherweise in den Arbeitsgruppen von Professor Dittrich und Professor Herrmann. Um vorab bereits die möglich-positiven Mutanten zu selektieren, wurden eine Reihe von Tests durchgeführt, die Hinweise auf eine erfolgreiche Mutation geben konnten.

#### 3.3.3.4.1 mittels Restriktionsverdau

Wenn durch die Mutationsoligonukleotide eine Veränderung bezüglich der Restriktionsstellen eingeführt wurde, konnte zur Überprüfung der Mutation der betroffene DNS-Bereich mit PCR amplifiziert (siehe 3.3.1.5) und anschließend mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (siehe 3.3.1.6) verdaut werden. Der Vergleich mit dem Wildtyp läßt auf eine erfolgreiche Mutation schließen.

#### 3.3.3.4.2 biochemische Eigenschaften bei Proteinexpression

Wurden durch Mutation die biochemischen Eigenschaften des heterolog exprimierten Fusionsproteins verändert, konnte man durch eine Mini-Induktion (siehe 3.3.4) bereits einen ersten Hinweis auf erfolgreiche Mutation erhalten. Dies war in erster Linie bei den chromophorbindenden, heterolog exprimierten LOV-Domänen der Fall, bei denen durch Mutation die Chromophorbindung verändert wurde. Beispielsweise konnten Aussagen hinsichtlich Färbung der sedimentierten Bakterien, Bindung des Fusionsproteins an die Affinitätsmatrix und spektraler Eigenschaften erstellt werden.

### 3.3.4 Heterologe Expression in *E. coli*

Zur Anzucht der die Expressionsplasmide enthaltenden Bakterienstämme wurde entweder eine Einzelkolonie oder 10 µl einer Glycerinkultur in LB-Medium (1 % (w/v) Pepton aus Casein, 1 % (w/v) NaCl und 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, pH 7,5) überführt. Da alle benutzten Expressionsplasmide eine Ampicillinresistenz enthielten, konnte mit 40 mg/l Ampicillin im Medium selektiert werden. Die Ansatzvolumen können nachfolgender Tabelle 10 entnommen werden:

**Tabelle 10: Kulturvolumen für unterschiedlich große Bakterienanzuchten.**

Ansatz	Vorkultur	Hauptkultur
Mini-Induktion	8 ml	–
Mini-Anzucht	8 ml	150 ml
Normal-Anzucht	25 ml	500 ml
Groß-Anzucht	50 ml	1000 ml

Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C rotierend inkubiert. Mit Ausnahme der Mini-Induktion wurde die Vorkultur in das Hauptmedium überführt und bei 37 °C und 200 Upm bebrütet. Bei je nach Bakterienklon unterschiedlicher OD<sub>580</sub> (im Ergebnisteil angegeben) wurde mit 1 mM IPTG induziert und ebenso je nach Klon zwischen 3 1/2 und 5 Stunden bei 30 °C und 200 Upm geschüttelt. Wurden Klone mit LOV-Domänen überexprimiert, fand die Induktion und weitere Anzucht im Dunkeln statt. Bei der Mini-Induktion wurde bereits die Vorkultur mit IPTG induziert und 5 Stunden bei 37 °C rotierend inkubiert.

### **3.3.5 Zellaufschluß**

#### **3.3.5.1 Standardmethode**

Nach Sedimentierung der Bakterienzellen (4 °C, 3000 g und 15 min) erfolgte der Zellaufschluß in Abhängigkeit vom Fusionsprotein. Bei pMal-Konstrukten wurden die Zellen in Maltose-Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA und 0,2 % (v/v) Triton-X-100, pH 8,0) resuspendiert, pCal-Konstrukte hingegen nahm man in CaCl<sub>2</sub>-Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0) inklusive 0,2 % (v/v) Triton-X-100 auf. Die Zellsuspensionen wurden über Nacht bei –20 °C tiefgefroren und am folgenden Tag bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Das klare Lysat wurde durch Zentrifugation bei 4 °C, 35000 g und 45 Minuten von Zellfragmenten befreit.

#### **3.3.5.2 Miniexpressionsanalyse**

Um zu analysieren, ob nach Induktion Protein heterolog überexprimiert wurde, entnahm man vor und nach der Induktion jeweils getrennt 2 ml der Bakteriensuspension und sedimentierte die Zellen (14000 g, 2 min). Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente jeweils mit 500 µl in 1x SDS-Probenpuffer (52,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,0075 % Bromphenolblau) für fünf Minuten bei 90 °C erhitzt. Nach Filtration über ein 0,2 µm Nanosep-Säulchen wurden je 20 µl des löslichen Filtrats einer SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1) unterzogen. In der Spur der induzierten Probe sollte deutlich das überexprimierte Protein, entweder nach Anfärbung (siehe 3.2.8.1) oder Westernblotanalyse (siehe 3.2.9), bei entsprechendem Molekulargewicht zu finden sein.

#### **3.3.5.3 Löslichkeitsanalyse**

In welchem Maße das heterolog exprimierte Protein löslich exprimiert wurde, konnte über eine Löslichkeitsanalyse festgestellt werden. Dazu wurden nach abgeschlossener Induktion 2 bis 4 ml der Bakteriensuspension sedimentiert (4 °C, 14000 g, 2 min) und das Sediment im Anschluß in 500 µl CaCl<sub>2</sub>-Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM

$\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM Imidazol, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0) inklusive 0,2 % (v/v) Triton-X-100 oder Lysepuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA und 0,2 % (v/v) Triton-X-100, pH 8,0) resuspendiert. Durch mehrere Einfrier- und Auftauzyklen wurden die Zellen lysiert. Die lösliche Fraktion wurde abgetrennt (4 °C, 14000 g, 30 min) und mit einem viertel Volumen mit 4x SDS-Probenpuffer (110 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,03 % Bromphenolblau) bei 90° C drei Minuten denaturiert. Das unlösliche Sediment resuspendierte man in 1x SDS-Probenpuffer (52,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 1,25 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,0075 % Bromphenolblau) im Gesamtvolumen der denaturierten löslichen Fraktion und erhitzt man fünf Minuten bei 90 °C. Nach einer Filtration über ein 0,2  $\mu\text{m}$  Nanosep-Säulchen analysierte man zu jeweils gleichen Teilen die so denaturierten Proben der löslichen Fraktion und des Sediments in einer SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1) und anschließender Coomassiefärbung (siehe 3.2.8.1) oder Westernblotanalyse (siehe 3.2.9).

### **3.3.6 Affinitätsreinigung der Fusionsproteine**

Die Affinitätsreinigung erfolgte in Abhängigkeit vom gewählten Fusionsprotein. Die aufgereinigten Proteine wurden entweder direkt im Elutionspuffer weiter untersucht (z. B. spektroskopische Messungen) oder vorher umgepuffert. Letzteres war vor allem für Proteinphosphorylierungen wichtig. Es wurde mit 70 % Ammoniumsulfat gefällt und das Proteinpellet in TCB-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,4) in konzentrierter Form rückgelöst.

#### **3.3.6.1 pMal-Konstrukte**

Um eine Triton-X-100-Konzentration von 0,1 % (v/v) im klaren Lysat zu erhalten, wurde letzteres 1 : 1 mit Maltose-Bindepuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 mM EDTA, pH 8,0) verdünnt. Die Affinitätsbindung erfolgte an eine Amylosesäule. Nach Waschen der Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen an Maltose-Bindepuffer konnte das Fusionsprotein mit Maltose-Elutionspuffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, pH 8,0 und 10 mM Maltose) bereits in den ersten Millilitern in konzentrierter Form eluiert werden.

#### **3.3.6.2 pCal-Konstrukte**

Das Bakterienlysate wurde mit eiskaltem  $\text{CaCl}_2$ -Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 mM Imidazol, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8,0) auf eine Triton-X-100-Konzentration von 0,1 % (v/v) verdünnt. Die Affinitätsreinigung erfolgte über eine Säule mit Calmodulin-Affinitätsmatrix nach dem Protokoll von Stratagene.

Dazu wurde das gekühlte Bakterienlysat über die in  $\text{CaCl}_2$ -Bindepuffer equilibrierte Affinitätsmatrix geführt, wobei das Fusionsprotein an das Säulenmaterial bindet. Nach Waschen mit  $\text{CaCl}_2$ -Bindepuffer mit dreifachem Säulenvolumen wurde das Fusionsprotein mit Hochsalz-Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, und 2 mM EGTA, pH 8,0) von der Säule eluiert.

Das Säulenmaterial wurde mit je dreifachem Säulenvolumen an Regenerationslösung 1 (100 mM  $\text{NaHCO}_3$  und 0,5 M EGTA, pH 8,6), Regenerationslösung 2 (1 M NaCl und 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ), Regenerationslösung 3 (100 mM Kaliumacetat und 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 4,4) und  $\text{CaCl}_2$ -Bindepuffer wieder gebrauchsfertig gemacht.

## **4 Ergebnisse**

Der UV-A-/blaulichtvermittelte Phototropismus war bisher vor allem über Krümmungsstudien und über die UV-A-/blaulichtinduzierte Phosphorylierung eines, je nach Pflanzenart, 110 bis 130 kDa großen Plasmamembranproteins studiert worden. Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde von Huala *et al.* (1997) das *PHOT1*-Gen (ehem. *NPH1*-Gen) aus *Arabidopsis thaliana* kloniert, dessen Genprodukt das UV-A-/blaulichtvermittelt phosphorylierbare 120-kDa-Protein darstellt. Mutantenstudien in *Arabidopsis* (siehe 1.2.3.1 bis 1.2.3.3) gaben bereits Hinweise darauf, daß Phototropin, das *PHOT1*-Genprodukt, ein früher Bestandteil der Signalkette für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus, wenn nicht sogar der mutmaßliche Photorezeptor selbst war.

Gegen das heterolog überexprimierte, denaturierte N-terminale Drittel von *Arabidopsis thaliana*-Phototropin, das die N-terminale und die LOV1-Domäne beinhaltete, wurde im Labor von Winslow Briggs (Carnegie Institution of Washington, Stanford, U.S.A.) der Antikörper Anti-NPH1 generiert (Christie *et al.*, 1998). Es galt zunächst herauszufinden, ob dieser Antikörper auch in einer Kreuzreaktion, d. h. speziesübergreifend, Phototropin aus Hafer (Gruppe der Monokotyledonen, Familie Poaceae oder Süßgräser) erkennt und ob es sich dabei um das Haferprotein handelt, das Zacherl (1997) über die UV-A-/blaulichtabhängige Proteinphosphorylierung in Hafer charakterisiert hatte. Gegebenenfalls konnten diese Ergebnisse auf Proteinebene überprüft und erweitert werden.

Für die Antikörperstudien wurden, neben Mais als weitere monokotyle Pflanze, Vertreter aus der Gruppe der Dikotyledonen, vor allem aus der Familie der Brassicaceae (Kreuzblütler), zu der auch *Arabidopsis thaliana* zählt, hinzugenommen: in der Regel wurde mit Kresse oder Senf gearbeitet, da aufgrund der Keimlingsgröße die Ernte des Versuchsmaterials verhältnismäßig schnell durchzuführen war. Als weitere Dikotyledonen wurden zu einigen Versuchen auch Rauke als weitere Brassicaceae, aus der Familie der Fabaceae (Schmetterlingsblütler) Soja und Erbse und aus der Familie der Solanaceae (Nachtschattengewächse) die Tomate verwendet.

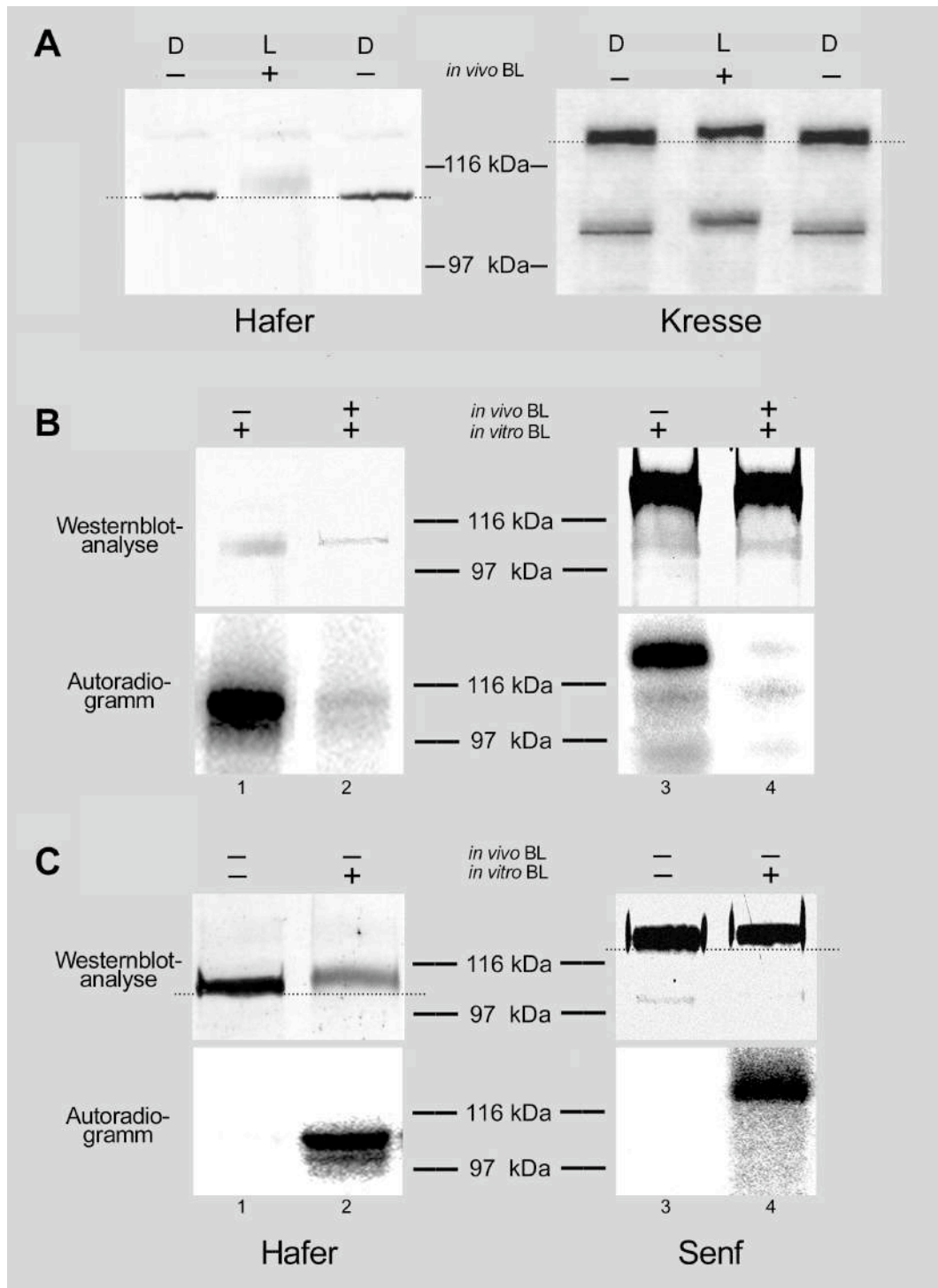
### **4.1 Immunologischer Nachweis von Phototropin durch Kreuzreaktion mit Anti-NPH1**

Zur Charakterisierung der Antikörperspezifität von Anti-NPH1 für Phototropin aus anderen Pflanzen wurde in den zu untersuchenden Pflanzen der phototropisch sensitivste Bereich im Keimling verwendet. Bei Monokotyledonen ist dies die Koleoptilenspitze und bei Dikotyledonen das Hypokotyl unmittelbar nach dem Hypokotylhaken (siehe 1.2.1). Dazu wurden von monokotylen Pflanzen nach vier Tagen die obersten 10 mm der Koleoptile

geerntet. Daß die Koleoptilen in diesem Wachstumsstadium die größte Wachstumsdifferenz zwischen Primärblatt und Koleoptilenspitze aufweisen, erleichterte die Ernte wesentlich, da für sämtliche Versuche mit der Koleoptilenspitze das in der Koleoptile enthaltene Primärblatt unter Schutzlicht entfernt werden mußte (Zacherl, 1997). Bei Dikotyledonen war die entsprechende Keimlingsgröße bereits nach drei bis maximal dreieinhalb Tagen erreicht (siehe 3.1). Für nachfolgende Studien wurden die Hypokotylbereiche von 0-10 mm nach den Hypokotylhaken verwendet.

Zur immunologischen Untersuchung des *in vivo* Zustands von Phototropin wurde von etiolierten Keimlingen, ohne und unmittelbar nach einem sättigenden UV-A-/Blaulichtpuls (60 s,  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), Rohextrakt (siehe 3.2.1) bereitet. Nach der Auftrennung in SDS-PAGE wurde eine Westernblotanalyse (siehe 3.2.9) mit Anti-NPH1 durchgeführt (siehe Abbildung 6A).

In den Rohextrakten aus etiolierten Keimlingen wurde mit Anti-NPH1 in Hafer ein 110 kDa und in Kresse ein 120 kDa großes Protein in ausgeprägter Immunreaktion nachgewiesen, bei dem es sich der Kreuzreaktion nach um Phototropin handeln sollte. Nach sättigender *in vivo* Belichtung mit UV-A-/Blaulicht konnte zwar bei allen untersuchten Pflanzen wiederum eine Anti-NPH1-Kreuzreaktion beobachtet werden. Diese war bei den untersuchten Dikotyledonen (Senf, Kresse, Soja, Rauke, Tomate) unverändert stark, hingegen bei allen untersuchten Monokotyledonen (Hafer, Mais) sehr schwach. Die Stärke der Antikörperreaktion zeigte sich direkt proportional zur Proteinkonzentration: wurde nur die Hälfte der Probenmenge analysiert, konnte eine Antikörperbande mit halber Intensität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Im Falle der *in vivo* belichteten Monokotyledonen konnte in Westernblotanalyse bei halbierter Menge gerade noch eine Antikörperreaktion wahrgenommen werden. Einerseits kann ein lichtinduzierter Abbau von Phototropin ausschließlich bei Monokotyledonen nicht ausgeschlossen werden, andererseits scheint eine allgemein schlechtere Kreuzreaktion von Anti-NPH1, der gegen dikotyles *Arabidopsis thaliana*-Phototropin generiert wurde, mit belichtetem Phototropin aus Monokotyledonen plausibler.



**Abbildung 6: Immunologischer Nachweis von Phototropin in Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 im Vergleich zur radioaktiven Markierung.**

Rohextrakt wurde bei Haferkeimlingen (monokotyl) aus der Koleoptilenspitze (0-10 mm ohne Primärblatt) und bei Dikotyledonenkeimlingen (Kresse oder Senf) aus dem Bereich des Hypokotyls (0-10 mm nach dem Hypokotylhaken) präpariert. Die Auftrennung der fertigen Proben erfolgte in 7% SDS-PAGE-Gelen. **A: Anti-NPH1-Westernblotanalyse von *in vivo* unbelichteten und sättigend belichteten, etiolierten Keimlingen.** Bei Hafer- und Senfrohextrakt von etiolierten Keimlingen (Spur D) wurde mit Anti-NPH1 eine prominente (Phototropin-)Bande bei 110 kDa (Hafer) und 120 kDa (Kresse) dekoriert. Nach sättigender *in vivo* Belichtung (60 Sekunden  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  UV-A-/Blaulicht) konnten bei beiden Banden mit geringerer Mobilität, jedoch bei Hafer zusätzlich mit dramatisch reduzierter Immunreaktion, nachgewiesen werden (Spur L). Bei Kresse wurde wiederum eine zweite, sich analog verhaltende, etwa um 20 kDa leichtere Bande mit Anti-

NPH1 detektiert. **B: Indirekter Nachweis der *in vivo* Phosphorylierung.** Der Phosphorylierungszustand *in vivo* sättigend belichteter oder unbelichteter, etiolierter Keimlinge wurde durch anschließende maximale *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (20 Sekunden  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  UV-A-/Blaulicht) betrachtet. Während im Autoradiogramm sowohl bei Hafer als auch Senf nur bei *in vivo* unbelichteten Pflanzen radioaktiver Einbau verzeichnet wurde (Spuren 1 und 3), konnte bei gleichem Molekulargewicht in Westernblotanalyse bei Hafer wiederum nur schwache, bei Senf hingegen unverändert starke Anti-NPH1-Dekoration gefunden werden. **C: *In vitro* Phosphorylierung von Hafer- und Senfphototropin.** Rohextrakt aus etioliertem Keimlingsmaterial wurde *in vitro* mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP ohne (Spuren 1 und 3) und mit einem sättigendem UV-A-/Blaulichtpuls (20 Sekunden  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) phosphoryliert (Spuren 2 und 4). Nur bei letzteren Spuren konnte im Autoradiogramm ein Einbau radioaktiven Phosphats detektiert werden. In Westernblotanalyse wiesen diese Spuren geringere Mobilität (Spuren 2 und 4) auf, wobei die Anti-NPH1-Erkennung bei Hafer minimal war (Spur 2). Die radioaktive Markierung und die Anti-NPH1-Kreuzreaktion wiesen stets das gleiche Molekulargewicht auf.

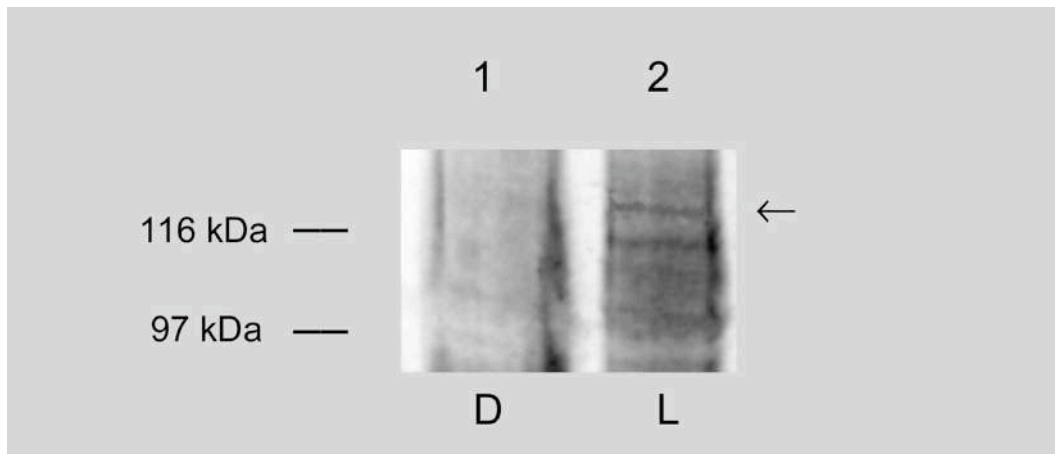
Die in allen Rohextrakten aus *in vivo* belichtetem Keimlingsmaterial mit Anti-NPH1 mehr oder weniger stark nachgewiesene Bande wies eine um etwa 2 kDa geringere Mobilität in der SDS-PAGE auf (siehe Abbildung 6A, Spuren L). Dieser Molekulargewichtsunterschied wurde über die Eichkurve des Proteingrößenstandards SDS-6H (siehe 2.4.5) bei optimierter Trennschärfe in der SDS-PAGE und durch die Verwendung von 7%- statt 8%-Polyacrylamidgelen bestimmt und bestätigt die bereits von Palmer *et al.* (1993) und Short *et al.* (1993b) beobachtete Mobilitätsänderung von Phototropin. Diese wurde allerdings nie bei einem Protein in Silber- oder Coomassiefärbung beobachtet.

Bei allen untersuchten Dikotyledonen wurde ein weiteres Protein in der Größe von etwa 100 kDa lokalisiert, das in gleicher Weise lichtabhängig reagierte. Möglicherweise handelt es sich um eine Abbaubande des 120-kDa-Proteins oder um eine weitere Phototropinspezies.

Wurden mikrosomale Membranen aus dem etiolierten oder etioliert belichteten Keimlingsmaterial präpariert (siehe 3.2.3) und diese anschließend ebenso einer SDS-PAGE und Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 unterzogen (siehe 3.2.9), fanden sich die gleichen Ergebnisse wie im Rohextrakt (Daten nicht gezeigt).

Da Phototropin in belichteten Pflanzen phosphoryliert vorliegt und bei einer Phosphoaminosäureanalyse von *in vitro* phosphoryliertem Phototropin hauptsächlich Phosphoserine nachweisbar waren (Short *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1993a; Short *et al.*, 1994), wurde, um Phototropin mit einem alternativen Antikörper nachzuweisen und so die Molekülgröße der Anti-NPH1-Reaktion zu überprüfen, eine Westernblotanalyse derselben Proben mittels Anti-Phosphoserin durchgeführt (siehe Abbildung 7, gezeigt am Beispiel von Senf).





**Abbildung 7: Nachweis phosphorylierter Proteine in Senfmembranen aus etiolierten und etioliert belichteten Keimlingen durch Westernblotanalyse mit Anti-Phosphoserin.**

Mikrosomale Membranen aus etiolierten (Spur D) und etiolierten, sättigend belichteten (60 Sekunden  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , Spur L) Senfkeimlingen (Material aus dem Hypokotylbereich 0-10 mm nach dem Hypokotylhaken) wurden nach Auftrennung im 7% SDS-PAGE-Gel im Westernblot mit Anti-Phosphoserin behandelt. In Spur L konnte bei 122 kDa eine Bande dekoriert werden (Pfeil), die auf phosphoryliertes Senfphototropin hindeuten könnte. Bei Senfmembranen aus etiolierten Keimlingen (Spur D) war bei 120 kDa, der Molekulargröße von nichtphosphoryliertem Phototropin, keine Phosphoserinbande nachweisbar.

Es wurde in den *in vivo* belichteten Proben, neben starkem Hintergrund, eine Bande an der Stelle beobachtet, an der, unter Berücksichtigung der verminderten Mobilität, phosphoryliertes Phototropin seiner Größe nach zu vermuten war.

Die bislang angewandte Methode zur Bestimmung des Grads an UV-A-/blaulichtvermittelter *in vivo* Phosphorylierung eines Plasmamembranproteins in Pflanzen (Salomon *et al.* 1997b) war als solche indirekt: Ausgehend von der Tatsache, daß bei einer UV-A-/blaulichtvermittelter Phosphorylierung das Zielprotein vor Belichtung *in vivo* unphosphoryliert vorliegt (Short *et al.*, 1992), war bei der darauf folgenden *in vitro* Phosphorylierung von präparierten mikrosomalen Membranen aus etioliertem Keimlingsmaterial mit sättigendem UV-A-/Blaulicht der radioaktive Einbau maximal bzw. 100 % und somit der *in vivo* Phosphorylierungszustand minimal bzw. 0 %. Wurden hingegen etiolierte Keimlinge unmittelbar nach einer sättigenden *in vivo* Belichtung mit  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$  *in vitro* phosphoryliert, konnte im Autoradiogramm kaum noch radioaktiver Einbau festgestellt werden. So waren die Phosphorylierungsstellen in etiolierten Keimlingen durch die sättigende Belichtung *in vivo* mit endogenem ATP maximal bzw. zu 100 % phosphoryliert worden, so daß anschließend *in vitro* keine zusätzliche radioaktive Phosphorylierung mehr möglich war.

Dieser indirekte Nachweis der *in vivo* Phosphorylierung wurde zunächst im Vergleich mit einer Anti-NPH1-Westernblotanalyse betrachtet, um festzustellen, ob es sich bei dem

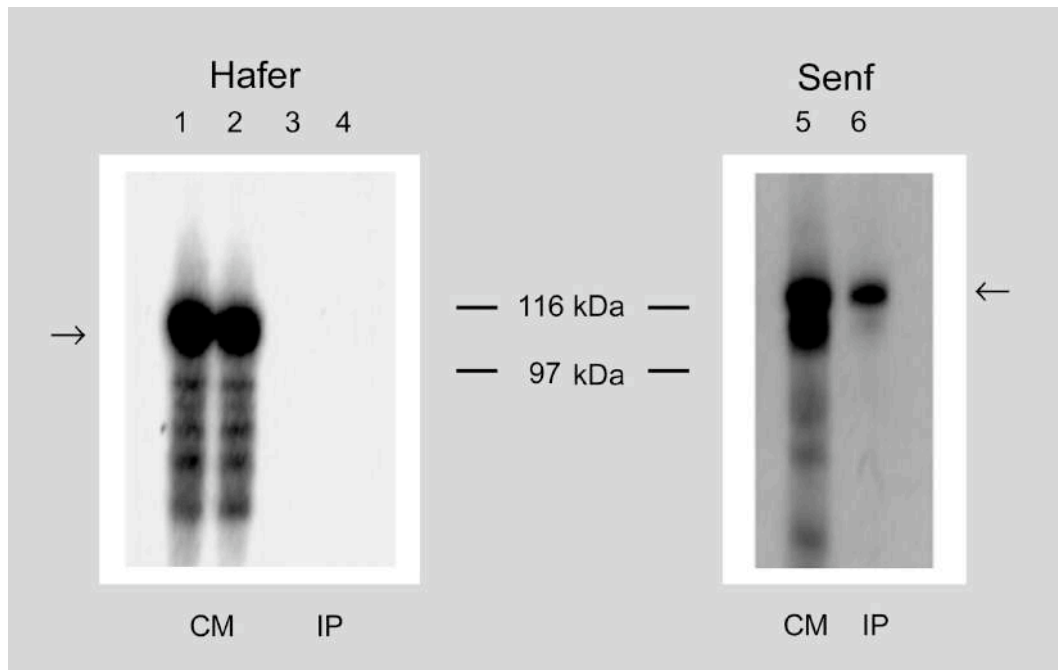
UV-A-/blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Protein um Phototropin handelt: die aus etiolierten Hafer- und Senfkeimlingen, die entweder *in vivo* unbelichtet oder sättigend belichtet (60 s, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  UV-A-/Blaulicht) waren, bereiteten Rohextrakte (siehe 3.2.1) wurden *in vivo* jeweils mit einem sättigenden UV-A-/Blaulichtpuls (20 s, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  UV-A-/Blaulicht) mit  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP (siehe 3.2.6.1) phosphoryliert und in SDS-PAGE aufgetrennt. Das Autoradiogramm wurde einer Westernblotanalyse gegenübergestellt (siehe Abbildung 6B).

Das UV-A-/blaulichtvermittelt *in vivo* bzw. *in vitro* phosphorylierte Protein in beiden Pflanzengruppen, bei denen vergleichbar starker radioaktiver Einbau im Autoradiogramm folglich bei *in vivo* unbelichteten Keimlingen zu finden war, entsprach auch im Anti-NPH1-Westernblot der Reaktion von *in vivo* sättigend belichtetem Rohextrakt: bei Monokotyledonen fand sich eine sehr schwache, bei Dikotyledonen hingegen eine ausgeprägte Kreuzreaktion. Lediglich in der Form der Bande bestanden Unterschiede. Bei Hafer lief die Bande der *in vivo* unbelichteten und anschließend mit sättigendem UV-A-/Blaulichtpuls *in vitro* phosphorylierten Probe (Spur 1) breiter als die der in beiden Fällen sättigend belichteten Probe (Spur 2). Diese Tendenz, die erstmals bei Short *et al.* (1993) bei Dikotyledonen beschrieben wurde, war demnach auch bei Monokotyledonen zu beobachten. Des weiteren konnte die radioaktive Markierung bei exakt gleichem Molekulargewicht wie die Anti-NPH1-Kreuzreaktion lokalisiert werden, was darauf hindeutete, daß es sich bei dem UV-A/blaulichtvermittelt phosphoryliertem Protein tatsächlich um Phototropin handelte. Zum anderen konnten genau diese Banden dem in der SDS-PAGE mobilitätsreduzierten und damit erhöhten Molekulargewicht zugeordnet werden (bei Hafer 112 kDa und bei Senf/Kresse 122 kDa). Dies bestätigte eine Analyse der *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP von etioliertem Hafer und Senf (siehe Abbildung 6C): zwischen der Anti-NPH1-Kreuzreaktion von Dunkelkontrolle (D) und sättigend belichteter Probe (L) bestand ein Mobilitätsunterschied. Die Anti-NPH1-Kreuzreaktion stimmte im Molekulargewicht exakt mit der radioaktiven Markierung im Autoradiogramm überein und der radioaktive Einbau war bei beiden Pflanzengruppen vergleichbar stark (Spuren 2 und 4). Einzig bei Hafer zeigte sich die Anti-NPH1-Erkennung auch in der belichteten Probe unverändert schwach. Somit konnte die Antikörperreaktion der *in vivo* Phosphorylierung von Senf-, vor allem aber auch von Haferphototropin, *in vitro* reproduziert werden.

Aufgrund der vergleichsweise ähnlich starken radioaktiven Markierung schien eine lichtvermittelte Degradation von Phototropin ausschließlich bei Monokotyledonen eher unwahrscheinlich und, wie bereits vermutet, vielmehr eine selektive Antikörpererkennung von nichtphosphoryliertem Phototropin bei Monokotyledonen möglich. Das Verhalten des Antikörpers in den beiden Pflanzengruppen wurde deshalb durch Immunpräzipitation

überprüft.

Dazu wurden Rohmembranen aus etiolierten Hafer- und Senfkeimlingen (siehe 3.2.3) präpariert, mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP *in vitro* phosphoryliert (siehe 3.2.6.2) und nach 3.2.2 immunopräzipitiert.



**Abbildung 8: Immunopräzipitation mit Anti-NPH1 von mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP *in vitro* phosphoryliertem Hafer- und Senfphototropin aus mikrosomalen Membranen im Autoradiogramm.**

Die Spur 5 zeigt, nach SDS-PAGE im 8 %-Gel, das UV-A-/blaulichtvermittelt und radioaktiv *in vitro* phosphorylierte 122-kDa-Senfprotein vor der Immunopräzipitation mit Anti-NPH1, Spur 6 dagegen danach. Es wird deutlich, daß dieses phosphorylierte Protein mit dem gegen die N-terminale Domäne von *Arabidopsis thaliana*-Phototropin generierten Antikörper immunopräzipitierbar war und es sich somit um phosphoryliertes Senfphototropin handelte. Hingegen konnte entsprechendes monokotyles, UV-A-/blaulichtinduziert und radioaktiv phosphoryliertes 112-kDa-Haferprotein (Spuren 1 und 2) nicht mit Anti-NPH1 immunopräzipitiert werden (Spuren 3 und 4).

Die Autoradiogramme in Abbildung 8 zeigen *in vitro* mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP UV-A-/blaulichtabhängig phosphorylierte Hafer- und Senfrohmembranen (Spuren CM), wobei in beiden Fällen erwartungsgemäß jeweils eine stark markierte Hauptbande bei Hafer von 112 kDa und bei Senf von 122 kDa Größe zu sehen war. Nach erfolgter Immunopräzipitation mit Anti-NPH1 (Spur IP) wurde nur noch immunopräzipitiertes 122-kDa-Senfprotein, jedoch kein Haferprotein nachgewiesen. Da Anti-NPH1 gegen den denaturierten N-Terminus und LOV1 von *Arabidopsis thaliana*-Phototropin generiert wurde, erscheint es plausibel, daß starke Kreuzreaktionen mit näher verwandten Spezies, vor allem innerhalb der Gruppe der Dikotyledonen, zu beobachten sind. Die Sequenzhomologien sind bei Phototropin aus verschiedenen Dikotyledonen im N-terminalen Bereich bzw. in LOV1 sehr hoch. Bei

verschiedenen Monokotyledonen sind die Homologien innerhalb von LOV1 auch noch sehr ausgeprägt, jedoch im N-Terminus deutlich geringer. Der N-terminale Bereich bei Monokotyledonen ist allgemein etwa ein Drittel kürzer als bei Dikotyledonen. Phototropin wurde dennoch bei beiden Pflanzengruppen im unphosphorylierten Zustand gleichermaßen stark von Anti-NPH1 erkannt, wohingegen sich durch Phosphorylierung offensichtlich die Phototropintertiärstruktur so weit veränderte, daß bei Monokotyledonen die Erkennung drastisch reduziert wurde.

Bei dem UV-A-/blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Protein handelte es sich somit um Phototropin. Dieses konnte bei Dikotyledonen in Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 sowohl im phosphorylierten als auch im unphosphorylierten Zustand dekoriert werden. Bei Monokotyledonen hingegen wurde lediglich die nichtphosphorylierte Phototropinform in gleicher Weise von Anti-NPH1 erkannt, wohingegen die Erkennung von phosphoryliertem Phototropin eine dramatische Reduktion erfuhr.

Umgekehrt sollte durch die *in vitro* Dephosphorylierung von belichtetem Monokotyledonen-phototropin die Wiederherstellung der vollen Antikörperreaktion gezeigt werden. Dazu kann man versuchen, Phosphatreste chemisch über Laugenbehandlung abzuspalten, da die Phosphatbindung im alkalischen Milieu instabil ist (Manson & Carolan, 1972). Eine weitere Möglichkeit stellt die enzymatische *in vitro* Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase dar. Um Phototropin im Rohextrakt vor Degradation zu schützen, wurden beide Methoden unmittelbar nach dem Transfer von Phototropin auf Nitrozellulose angewandt. Haferrohextrakt aus belichtetem Keimlingsmaterial (siehe 3.2.1) oder mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP *in vitro* phosphorylierter Haferrohextrakt aus etioliertem Keimlingsmaterial (siehe 3.2.6.1) wurde nach elektrophoretischer Auftrennung über SDS-PAGE auf Nitrozellulose geblottet (siehe 3.2.9). Zur Dephosphorylierung inkubierte man den Blot unmittelbar danach eine Stunde in verschiedenen Laugenkonzentrationen (0,1 M KOH, 1 M KOH, 0,1 M NaOH, 1 M NaOH, jeweils bei Raumtemperatur oder 40 °C), anschließend wurde eine Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 (siehe 3.2.9) durchgeführt. Alternativ wurde der Blot während der Westernblotanalyse nach dem Blocken zusätzlich in 1x TBST-Puffer mit 10 bis 25 Einheiten alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) für ein bzw. zwölf Stunden behandelt.

Es konnte aber keine verstärkte Anti-NPH1-Reaktion durch erfolgreich dephosphoryliertes Phototropin detektiert werden. Auch durch die Zugabe von 10 Einheiten alkalischer Phosphatase zu 20 µl präparierten Haferrohmembranen aus belichtetem Keimlingsmaterial konnte nach 10-20 Minuten Inkubation in anschließender SDS-PAGE und Westernblotanalyse keine Antikörperreaktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Mit den gewählten Versuchsansätzen war belichtetes Phototropin wahrscheinlich nicht *in vitro* dephosphorylierbar.

Zum immunologischen Nachweis von Phototropin aus Mono- und Dikotyledonen über Westernblotanalyse in Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 lassen sich insgesamt folgende Aussagen machen: Anti-NPH1 erkennt in Rohextrakten und mikrosomalen Membranen aus etiolierten Keimlingen Phototropin in Kreuzreaktion als prominente Bande. Bei Rohextrakten und mikrosomalen Membranen aus belichteten Keimlingen, wie auch bei *in vitro* phosphoryliertem Phototropin, erkennt Anti-NPH1 Phototropin nur bei Dikotyledonen in gleicher Stärke. In Monokotyledonen wird die belichtete und dadurch phosphorylierte Phototropinform sehr schwach dekoriert. Diese kann auch nicht, trotz mit der von Dikotyledonen vergleichbar starken radioaktiven Markierung im Autoradiogramm, mit Anti-NPH1 immunopräzipitiert werden. Die Molekulargröße von belichtetem Phototropin, nachgewiesen mit Anti-NPH1, stimmt mit dem UV-A-/blaulichtvermittelt phosphoryliertem Protein überein. Weder bei Dikotyledonen noch bei Monokotyledonen wurde jemals in Coomassie- oder Silberfärbung ein Protein gefunden, das UV-A-/blaulichtvermittelt in seiner Mobilität reduziert wird. Diese beschriebene Mobilitätsverschiebung durch Belichtung und folglich Phosphorylierung läßt sich nur *in vivo* durch Belichtung und *in vitro* durch Phosphorylierung über Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 beobachten. Die *in vivo* Phosphorylierung des UV-A-/blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Proteins, indirekt bestimmt wie bei Zacherl (1997), stimmt mit den Reaktionen von Phototropin, das in Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 nachgewiesen wurde, überein.

Die selektive Anti-NPH1-Erkennung von Phototropin aus Monokotyledonen ermöglicht bereits im Westernblot Schlußfolgerungen zur Phosphorylierung im Bereich der Antikörperepitope – dem N-terminalen Bereich und der LOV1-Domäne von Phototropin.

So können Aussagen über den *in vivo* Phosphorylierungszustand der Epitope ohne radioaktive Markierung getroffen werden. Ebenso steht mit der Immunreaktion von Anti-NPH1 in Kreuzreaktion allgemein ein Werkzeug zu Verfügung, mit dem die Reduktion der Mobilität durch Phosphorylierung festgestellt werden kann.

## **4.2 Lokalisation von Phototropin aus Pflanzen und Versuche zu seiner Anreicherung**

Zacherl (1997) hatte die Gewebespezifität der UV-A-/blaulichtvermittelten, radioaktiven Phosphorylierung eines 110-kDa-Proteins aus Hafer ermittelt. Dabei wurde die Annahme zugrundegelegt, daß die Phosphorylierungsstärke das Maß für die Proteinkonzentration darstellt und daß es sich vermutlich bei dem UV-A-/blaulichtvermittelten 110-kDa-Haferprotein um den Rezeptor für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus, das Phototropin, handelt. Diese Korrelation wurde im vorangegangenen Kapitel verdeutlicht. Über die Anti-NPH1-Kreuzreaktion mit Phototropin galt es auf Proteinebene die Gewebespezifität zu ermitteln und mit den Daten von Zacherl zu vergleichen. Überdies sollte mit den gewonnenen Erkenntnissen eine Anreicherung von Phototropin als weiterer Schritt zur eigentlichen Isolierung versucht werden. Phototropin konnte bislang noch nicht aus Pflanzen isoliert werden, wobei erst dieses eine exakte Charakterisierung, beispielsweise die Identifikation des Chromophors, ermöglichen würde.

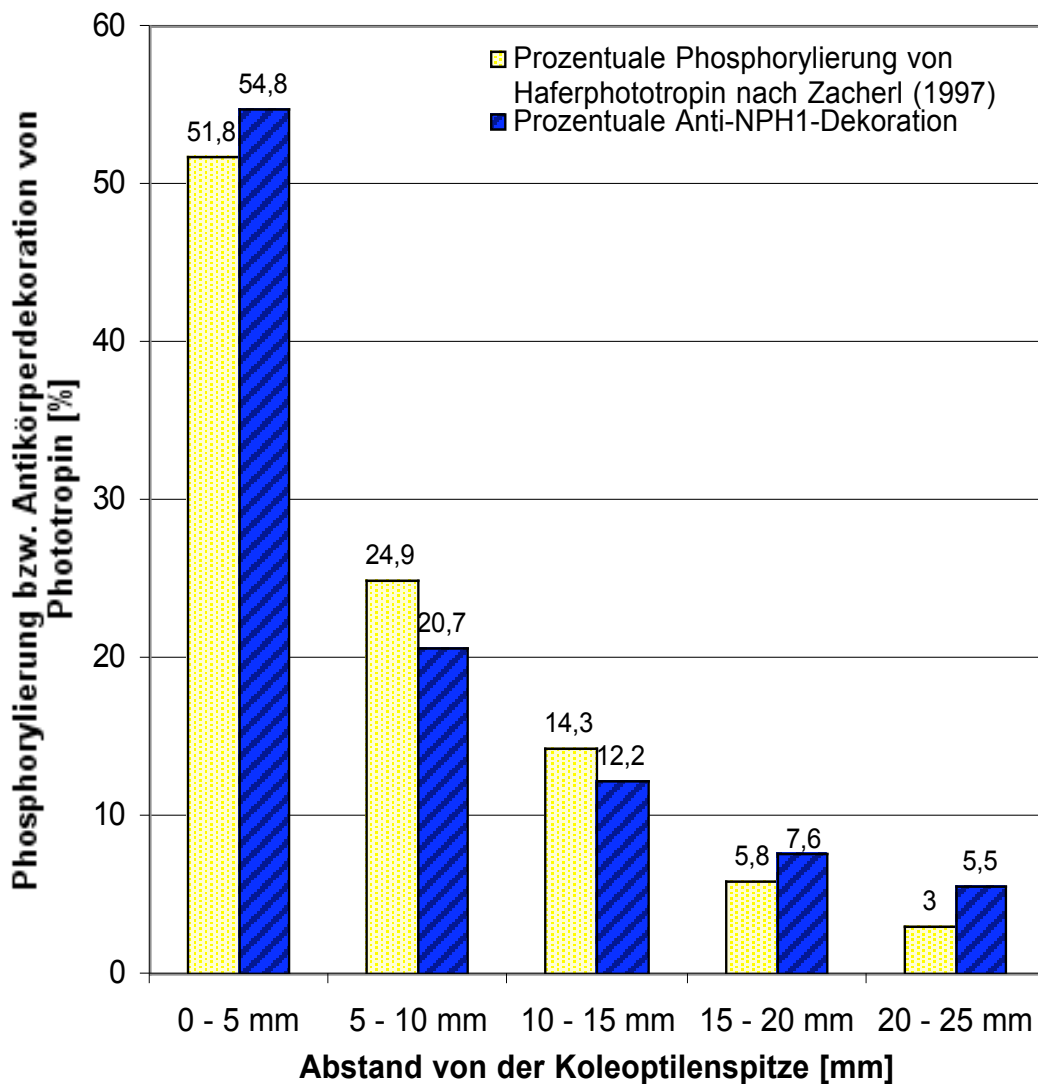
### **4.2.1 Gewebespezifität und Verteilung entlang der Koleoptile**

Aus einer Vielzahl photophysiologicaler Krümmungsstudien der letzten 120 Jahre war bekannt, daß das phototropisch sensitivste Gewebe bei monokotylen Gräsern in der Koleoptilenspitze und bei Dikotyledonen unterhalb des Hypokotylhakens lokalisiert ist (siehe 1.2.1.1 und 1.2.2.1). Salomon *et al.* (1997b) haben die Gewebespezifität der UV-A-/blaulichtabhängigen Phosphorylierung eines 112 kDa-Proteins in 4 Tage altem Hafer über radioaktive *in vitro* Phosphorylierung studiert. Dabei wurde ermittelt, daß die Verteilung exponentiell entlang der Koleoptile von der Spitze zur Basis hin abnahm, wobei 50 % der radioaktiven Phosphorylierung in den apikalen 5 mm der Koleoptile konzentriert waren.

Im folgenden wurde geprüft, ob die Phototropinverteilung entlang der Koleoptile, ermittelt anhand der Stärke der Anti-NPH1-Kreuzreaktion, mit der Phosphorylierungsstärke korreliert und letzere als Maß für die Phototropinkonzentration eingesetzt werden kann.

Da bei Dikotyledonen bislang lediglich an 7 Tage alten Erbsenkeimlingen eine gleichmäßigere Verteilung der UV-A-/blaulichtvermittelten Phosphorylierung im oberen Internodium festgestellt wurde (Short & Briggs, 1990, und Short *et al.*, 1992), wurde bei verschiedenen Dikotyledonen die Verteilung von Phototropin in, im Entwicklungsstadium vergleichbaren, 3 1/2 Tage alten Keimlingen immunologisch ermittelt. Bei Monokotyledonen wurde etioliertes Pflanzenmaterial eingesetzt, da hierbei die Anti-NPH1-Erkennung mit Dikotyledonen vergleichbar war. Die Keimlinge wurden nach 3.1 angezogen und analog zu Zacherl (1997) basipetal in 5 mm-Segmente unterteilt. Geerntet wurden pro Segment jeweils sechs Zylinder ohne Primärblatt, aus denen Rohextrakt bereitet wurde (siehe 3.2.1). Nach

Auftrennung in 8%-Gelen (siehe 3.2.7.1) und Westernblotanalyse mit dem Antikörper Anti-NPH1 (siehe 3.2.9) wurde nach dem graphischen Einlesen des Blots (sog. „Scannen“; 600 dpi Auflösung) anschließend mit der Software TINA die Intensität der Antikörperreaktion pro Segment ermittelt. Die prozentuale Anti-NPH1-Dekoration der einzelnen Segmente im Bezug auf die Gesamtintensität wurde mit der von Zacherl (1997) ermittelten prozentualen Phosphorylierung von Haferphototropin im Verhältnis zur Summe der Phosphorylierungsstärke aller Segmente verglichen (siehe Abbildung 9).



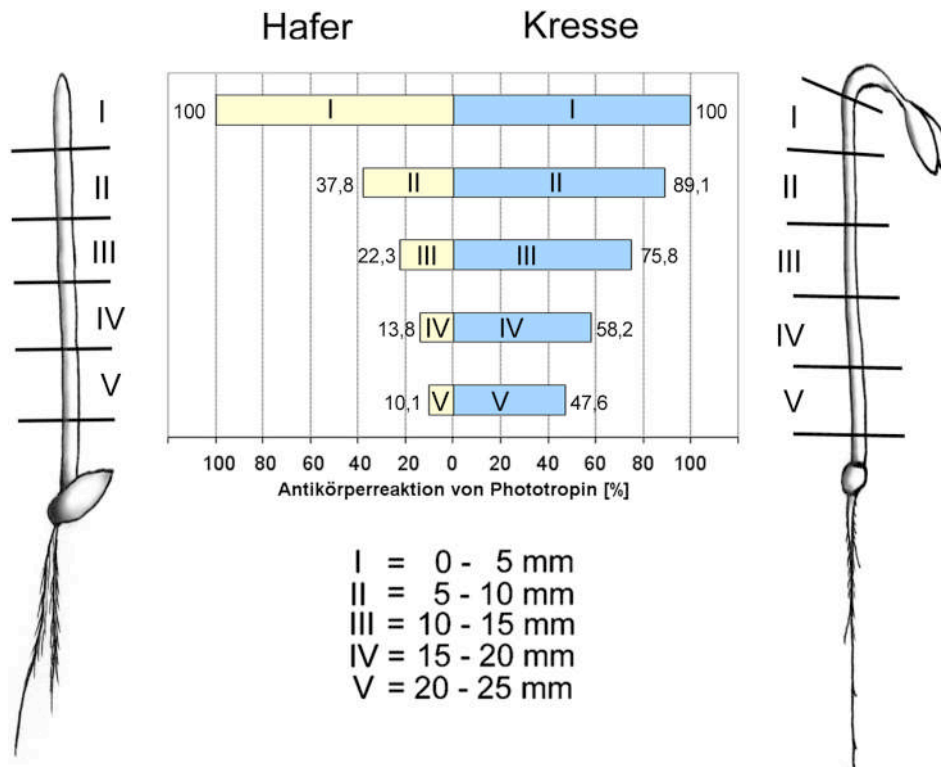
**Abbildung 9: Ermittlung der Haferphototropinverteilung entlang der Koleoptile über radioaktive *in vitro* Phosphorylierung und Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 im Vergleich.**

In gelben Balken dargestellt ist die prozentuale Phosphorylierung von Haferphototropin, die von Zacherl (1997) ermittelt wurde und die auf die Summe der Phosphorylierungsstärke aller Segmente bezogen ist. Ebenso wurde die prozentuale Intensität der Anti-NPH1-Dekoration (blaue Balken) nach Westernblotanalyse über die Auswertung des Scans mit dem Programm TINA bestimmt. Ein Vergleich zeigt, daß über beide Methoden eine basipetale exponentielle Abnahme von Phototropin ermittelt wurde und mehr als 50 % des Phototropins in der Koleoptilenspitze (0-5 mm) lokalisiert sind.

Bei dieser Quantifizierung der Phototropinmenge über die Antikörperreaktion wurde, analog zu Zacherl, mehr als die Hälfte des Phototropins in den ersten 5 mm der Koleoptilenspitze lokalisiert. Basipetal läßt sich eine exponentielle Abnahme feststellen, die konform mit der Abnahme der Phosphorylierungsstärke läuft. Erst in den untersten Segmenten (15-25 mm) machen sich größere Unterschiede bemerkbar, die sich aber, bezogen auf den Maximalwert der Koleoptilenspitze, auf weniger als 5 % belaufen. Dafür verantwortlich könnte eine geringere Sensitivität der Anti-NPH1-Erkennung, verglichen mit der radioaktiven Markierung, bei sehr wenig phosphoryliertem Phototropin sein. Die Gewebespezifität von Phototropin, die von Zacherl über die Stärke der *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP des UV-A-/blaulichtabhängig phosphorylierbaren Proteins ermittelt wurde, entspricht der Intensität der Anti-NPH1 Kreuzreaktion. Die Phosphorylierungsstärke von Phototropin kann hierbei als Maß für die Proteinmenge herangezogen werden.

Erstmals ermittelt wurde die Gewebespezifität im Hypokotyl von Dikotyledonen in einem Entwicklungsstadium, in dem noch keine Internodien ausgebildet waren. Dazu wurden etiolierte und im Licht gewachsene Keimlinge von Erbse, Kresse und Senf untersucht. Die Anzucht des etiolierten Materials erfolgte in 3,5 Tagen nach 3.1, wohingegen im Licht gewachsene Dikotyledonenkeimlinge am Tageslicht bei 25 °C bis zu gleicher Größe angezogen wurden. Das Hypokotyl unterteilte man basipetal in 5 mm-Segmente (siehe Abbildung 10) und aus jeweils sechs gleichen Segmenten wurde Rohextrakt bereitet (siehe 3.2.1). Damit konnte nach Auftrennung in 8%-Gelen, Westernblotanalyse mit Anti-NPH1, „Scannen“ des Blots (600 dpi Auflösung) und Auswertung mit der Software TINA, die Intensität der Antikörperreaktion pro Segment bestimmt werden. Die ermittelte Gewebespezifität stimmte bei den einzelnen Vertretern der untersuchten Dikotyledonen sehr gut überein und wird deshalb in Abbildung 10 nur am Beispiel Kresse präsentiert.





**Abbildung 10: Verteilung von Phototropin entlang des Keimlings in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1.**

Als Beispiel für Monokotyledonen werden Hafer (A) und für Dikotyledonen Kresse (B) gezeigt. Nach SDS-PAGE im 8 % Gel und Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 konnte im Keimlingsrohextrakt aus jeweils unterschiedlichen Segmenten I bis V Phototropin detektiert werden. Nach Einlesen mit einer Auflösung von 600 dpi wurde die Intensität der Anti-NPH1-Dekoration mit der Software TINA ausgewertet: die Spuren mit Rohextrakt aus der Koleoptilenspitze und dem Hypokotyl (I) zeigen die höchste Menge an Phototropin, die basipetal kontinuierlich abnimmt (Spuren II bis V).

Als monokotyles Beispiel wurde Hafer (A) und als dikotyles Beispiel Senf (B) gewählt. Die Einteilung erfolgte ausgehend von der monokotylen Koleoptilenspitze bzw. vom dikotylen Hypokotylhaken basipetal beginnend von I bis V in 5 mm- Segmenten und ist insgesamt auf die Gesamtintensität der Antikörperreaktion bei Hafer bezogen.

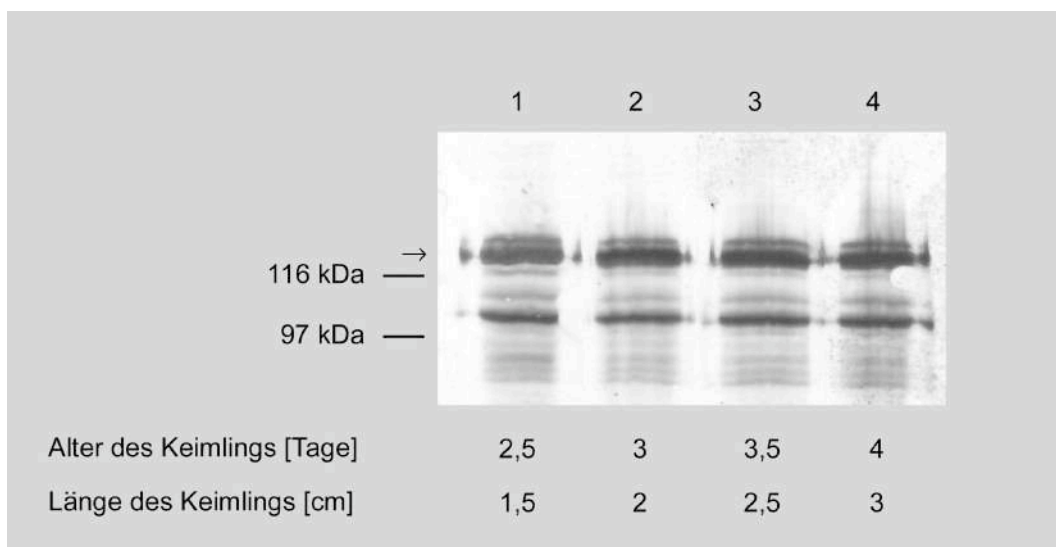
Im Hypokotylhaken selbst und in den Primärblättern von Dikotyledonen war kaum Phototropin zu finden (Daten nicht gezeigt). Zur Wurzel hin wurde über den gesamten Bereich des Keimlings Phototropin detektiert. Die stärkste Antikörperreaktion war in Segment I, unmittelbar nach dem Hypokotylhaken, zu finden. Die Verteilung von Phototropin nahm kontinuierlich basipetal ab. Um den Vergleich zu Monokotyledonen zu ziehen, wurde sowohl bei Hafer als auch bei Kresse die Intensität der Anti-NPH1-Reaktion, die im Segment I maximal war, auf den Bezugswert 100 gesetzt. Davon ausgehend wurden die Werte aller übrigen Segmente prozentual berechnet. Für Hafer ergibt sich, wie auch in Abbildung 9 bereits demonstriert, eine exponentielle Abnahme, wohingegen die basipetale Abnahme von Phototropin in Dikotyledonen linear ist. Offensichtlich ist Phototropin hier gleichmäßiger verteilt, wie es auch bereits für die lichtvermittelte Phosphorylierung im Erbsenepikotyl beschrieben wurde (Short *et al.*, 1992).

Bei Dikotyledonen fällt auf, daß in Westernblotanalyse eine etwa 100 kDa große Bande

ebenfalls von Anti-NPH1 erkannt wird und diese die gleiche Verteilung über den Keimling zeigt wie Phototropin. Diese Bande wurde bereits in Kapitel 4.1 beschrieben (siehe Abbildung 6A).

Da Anti-NPH1 bei Dikotyledonen auch phosphoryliertes Phototropin erkennt, wurden zusätzlich im Licht gewachsene Keimlinge analog untersucht. Es wurde jedoch kein Unterschied in der Verteilung von Phototropin entlang des Keimlings festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Im obersten Hypokotylbereich, in dem mit Anti-NPH1 das meiste Phototropin detektiert wurde, konnte ermittelt werden, wie sich dieser Phototropingehalt im Laufe der Keimlingsentwicklung ausbildete. Hierzu wurden jeweils gleiche Mengen Kressehypokotyl (0-10 mm) von zweieinhalb, drei, dreieinhalb und vier Tage alten Pflanzen auf ihren Phototropingehalt immunologisch mit Anti-NPH1 untersucht (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Kreuzreaktion von Anti-NPH1 mit Rohextrakt aus den ersten Hypokotylsegmenten (Segmente I und II bzw. 0-10 mm) von unterschiedlich alten, etioliert gewachsenen Kressekeimlingen nach SDS-PAGE.**

Von etiolierten Kressekeimlingen unterschiedlichen Wachstumsalters (Spur 1 zweieinhalb Tage alt, Spur 2 drei Tage alt, Spur 3 dreieinhalb Tage alt und Spur 4 vier Tage alt) wurden jeweils die ersten 10 mm Hypokotyl nach dem Hypokotylhaken auf ihren Gehalt an Phototropin mit Anti-NPH1 untersucht. Dazu wurde nach Auftrennung im 8 %-SDS-PAGE-Gel eine Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 durchgeführt. Die Antikörperreaktion war in allen Proben gleich stark (Pfeil), was darauf hinwies, daß der Phototropingehalt gleich war.

Dabei fanden sich erstaunlicherweise bei jeder Probe gleich starke Immunreaktionen von Phototropin, das auf stets gleiche Proteinmengen im obersten Hypokotylbereich schließen ließ. Der ermittelte, basipetal linear abnehmende Verteilungsgradient von Phototropin entlang des Keimlings (s. o.) schien sich während des Streckungswachstums unabhängig vom Phototropingehalt im obersten Hypokotylbereich auszubilden.

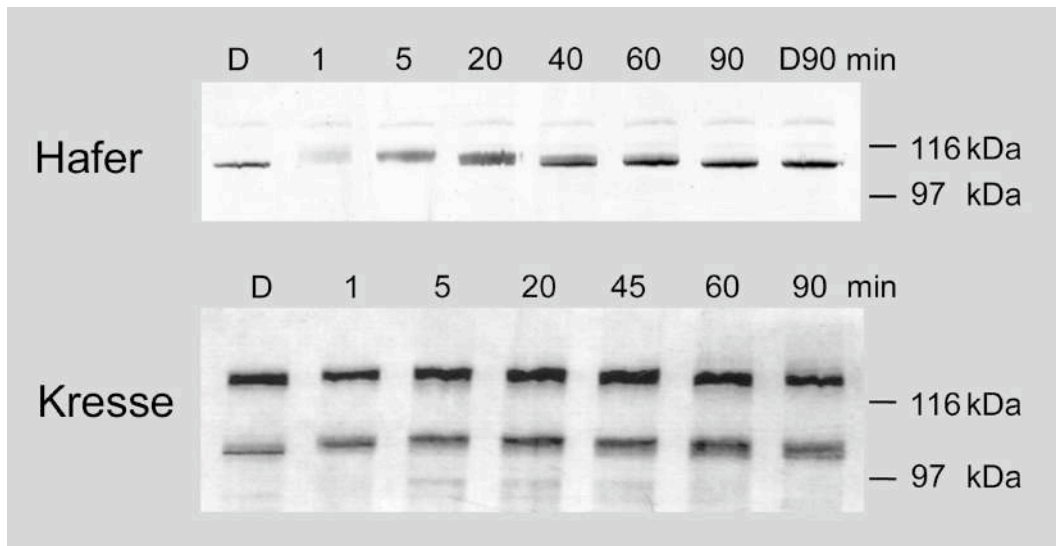
Insgesamt war festzustellen, daß die Gewebespezifität von Phototropin, ermittelt über die Anti-NPH1-Reaktion, mit der von Zacherl bestimmten Verteilung der UV-A-/blau-lichtvermittelten Phosphorylierung von Phototropin entlang der Haferkoleoptile übereinstimmte. Es konnte somit ausschließlich über die Anti-NPH1-Reaktionsstärke die Proteinverteilung bei Dikotyledonen bestimmt werden: sowohl bei Mono- als auch Dikotyledonen ist die größte Menge an Phototropinprotein in der Koleoptilenspitze bzw. unmittelbar nach den Hypokotylhaken lokalisiert, wobei die basipetale Verteilung bei Monokotyledonen exponentiell, bei Dikotyledonen hingegen linear abnimmt.

#### **4.2.2 Die Phototropinmenge in Pflanzen im etiolierten und vorbelichteten Zustand**

Salomon *et al.* (1997c) hatten ermittelt, daß die Phosphorylierungskapazität in der etiolierten Haferkoleoptilenbasis (Segment II oder 5-10 mm, siehe Abbildung 10) nach sättigender Belichtung zunächst auf ein Minimum absinkt, bei anschließender Dunkelinkubation jedoch wieder ansteigt und nach 20 Minuten den Ausgangswert wieder erreicht hat. 90 Minuten nach sättigender Belichtung war eine 3,5-fache Steigerung der Phosphorylierbarkeit zum etiolierten Ausgangswert beobachtet worden. Zacherl (1997) vermutete, daß nach sättigender Vorbelichtung die Phototropinmenge durch Neusynthese zunahm.

Zur Überprüfung wurde bei verschiedenen Pflanzen die Phototropinmenge nach Vorbelichtung und während der Regeneration über die Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 im Westernblot ermittelt. Etiolierte Haferkoleoptilen- bzw. Kressehypokotylsegmente aus dem Bereich II (5-10 mm) wurden sättigend belichtet. Während der anschließenden Dunkelinkubation wurden zu verschiedene Zeitpunkten Proben genommen (siehe 3.2.1). Nach SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1) und Westernblotanalyse (siehe 3.2.9) ergab sich folgendes Bild (siehe Abbildung 12):

Bei Dikotyledonen war stets eine gleich starke Antikörperreaktion und somit die gleiche Phototropinmenge nachweisbar. Im Unterschied zu den Dikotyledonen trat bei Monokotyledonen nach einer Minute Dunkelregeneration eine starke Intensitätsabnahme der Phototropinbande auf. Während fortlaufendener Dunkelinkubation regenerierte die Antikörpererkennung zur ursprünglichen Stärke. Ursache für die unterschiedlich starke Reaktion war hierbei allerdings nicht die Proteinmenge, sondern die selektive Antikörpererkennung der phosphorylierten Phototropinform bei Monokotyledonen (siehe 4.1). In Westernblotanalyse konnte somit zu keinem Zeitpunkt eine stärkere Antikörperreaktion und damit Phototropinmenge als bei dem unbelichteten Phototropin – als Referenzwert – festgestellt werden.



**Abbildung 12: Die Phototropinmenge in Hafer und Kresse vor und nach einem sättigenden UV-A-/ Blaulichtpuls in Westernblotanalyse.**

Etiolierte Haferkoleoptilenbasen und Kressehypokotyle (Segment II bzw. 5–10 mm) wurden sättigend belichtet und anschließend im Dunkeln inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeiten Proben genommen wurden. In Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 wurde die Phototropinmenge immunologisch detektiert. Die lichtabhängig phosphorylierte Phototropinform von Hafer wurde in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad selektiv von Anti-NPH1 erkannt. Eine gleich starke Antikörperreaktion wie in der unbelichteten Probe (Spur D) war ab 20 Minuten Dunkelinkubation wieder erreicht. Bei Kresse wurde zu allen Meßzeiten die gleiche Menge Phototropin detektiert. Diese Abbildung entspricht Abbildung 42, wird hier jedoch ausschließlich unter dem Aspekt der Proteinmenge betrachtet

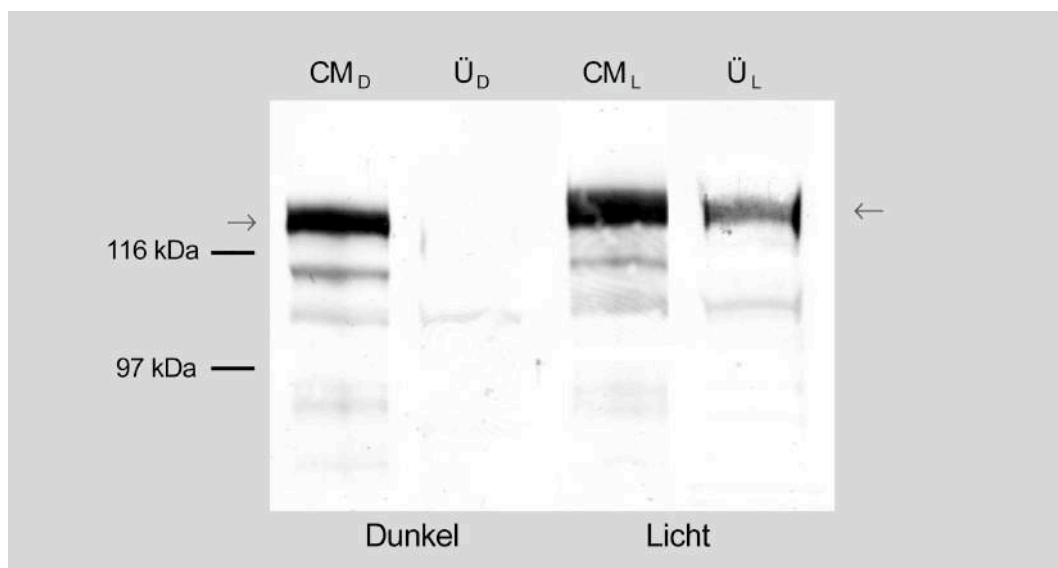
Die Hypothese, daß nach *in vivo* Vorbelichtung die gesteigerte Phosphorylierungsstärke mit einer Erhöhung der Phototropinmenge korreliert, kann über eine Bestimmung der Phototropinmenge mit Anti-NPH1 nicht bestätigt werden. Anders als bei der Ermittlung der Gewebespezifität von Phototropin (siehe 4.2.1) konnte die Phosphorylierungsstärke bei Phototropin aus Pflanzen, die in unterschiedlichen Belichtungsstadien vorlagen, nicht als Maß für die Phototropinmenge herangezogen werden.

#### **4.2.3 Intrazelluläre Lokalisation, die Dissoziation von Phototropin von der Plasmamembran im Licht und Evidenzen für einen höhermolekularen Phototropinkomplex im Dunkeln**

Neben der Ermittlung der Gewebespezifität sollte versucht werden, Phototropin innerhalb der Zelle genauer zu lokalisieren. Bisher war die intrazelluläre Phototropinlokalisierung widersprüchlich: einerseits wurde es experimentell an der Innenseite von Plasmamembranen lokalisiert (Short *et al.*, 1993), andererseits zeigte die Hydrophobizitätsanalyse, daß Phototropin keinerlei membrangängige Bereiche aufweist und der Sequenz nach ein lösliches Protein darstellt (Huala *et al.*, 1997). Salomon *et al.* (1996) konnten bei Plasmamembranvesikeln aus Hafer feststellen, daß Phototropin in frühen Stadien der

Pflanzenentwicklung detergensfrei phosphorylierbar ist, wohingegen mit zunehmendem Alter der Keimlinge und der daraus präparierten Membranen die Phototropinphosphorylierung nur noch in Anwesenheit von nichtionischen Detergentien möglich ist. So wurde Phototropin als – nicht näher spezifiziert – membranassoziiert beschrieben.

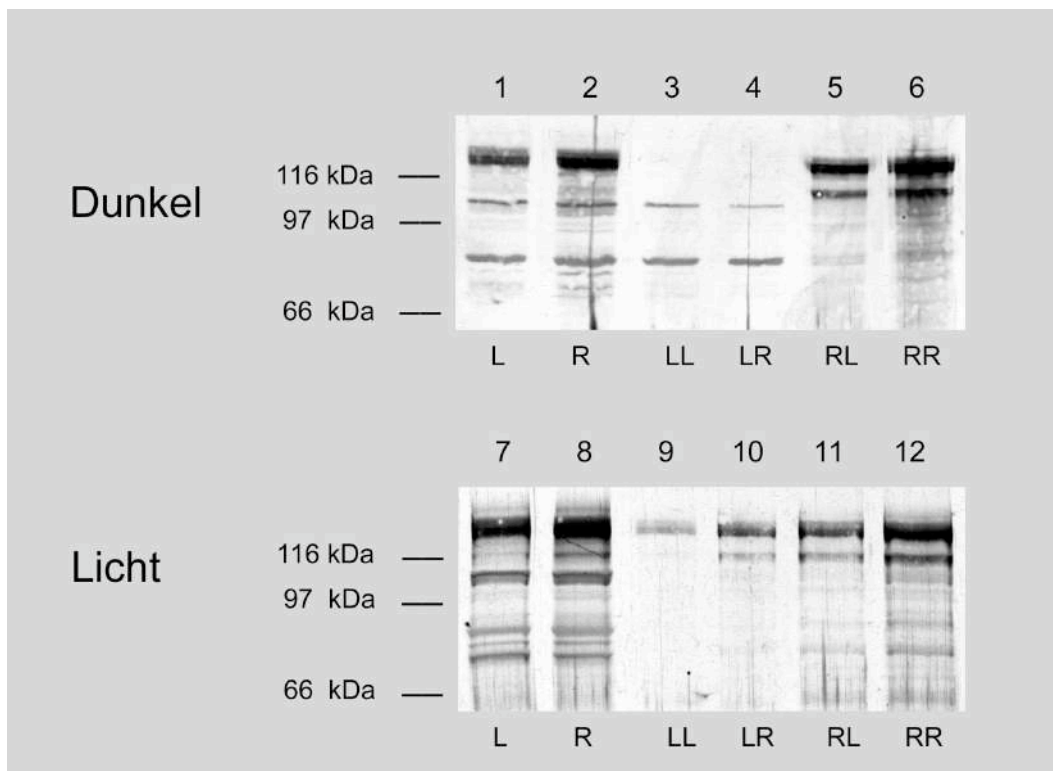
Der erste Ansatzpunkt zu experimentellen Untersuchungen war bei Short *et al.* (1992) zu finden: bei der radioaktiven, lichtvermittelten *in vivo* Phosphorylierung von Erbsenkeimlingen war radioaktiv markiertes Phototropin vor allem in der Membranfraktion, aber auch in geringen Mengen im löslichen Überstand zu finden. Da hierbei keine stöchiometrischen Verhältnisse ermittelt wurden, wurden mikrosomale Membranen aus etiolierten und etioliert belichteten Senfkeimlingen im Mikromaßstab präpariert (siehe 3.2.3). Aufgrund der anfallenden kleinen Volumina konnte die exakte stöchiometrische Verteilung von Phototropin in den einzelnen Fraktionen in Westernblotanalyse ermittelt werden. Die Hauptmenge von Phototropin fand sich bei etiolierten Senfkeimlingen in der Membranfraktion, wohingegen bei belichteten Keimlingen 80 % des Phototropins in der Membranfraktion und 20 % im löslichen Überstand lokalisiert wurden (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 13 : Fraktionen der Membranpräparation aus etiolierten und sättigend belichteten Senfkeimlingen in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1.**

Aus Senfkeimlingen wurde Rohextrakt (siehe 3.2.1) bereitet, aus dem durch Ultrazentrifugation (110000 g, 45 min) mikrosomale Zellmembranen sedimentiert werden konnten (siehe 3.2.3). Die Membranfraktion wurde mit Resuspensionspuffer im gleichen Volumen des gewonnenen löslichen Überstands aufgenommen, um gleiche stöchiometrische Verhältnisse zu gewährleisten. Die Auftrennung der Proben erfolgte im 8%-SDS-PAGE-Gel und nach Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 konnte Phototropin aus etioliertem Senf nahezu quantitativ in der Membranfraktion  $CM_D$  lokalisiert werden. In der dazugehörigen löslichen Fraktion  $Ü_D$  war kein Phototropin nachweisbar. Wurden die Senfkeimlinge unmittelbar vor der Membranpräparation sättigend belichtet (2 min,  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), fanden sich anschließend 80 % des Phototropins in der Membranfraktion (Spur 5) und 20 % in dem dazugehörigen löslichen Überstand (Spur 6).

Da jedoch durch die relativ lange Präparationszeit von mehr als einer Stunde möglicherweise Protein degradierte und so die tatsächlichen Verhältnisse verfälschte, wurde eine schnellere Methode zur Trennung von mikrosomalen Membranen und den löslichen Zellbestandteilen mittels Nanosep Mikrokonzentratoren erprobt (siehe 3.2.5). Bei einer Trennung von Rohextrakt mit diesen 100-K-Konzentratoren zeigte sich, daß aufgrund der zu geringen Porengröße diese verstopften und so keine lösliche Fraktion erhalten werden konnte. Mit 300-K-Konzentratoren wurde in 10 Minuten aus Rohextrakt von sowohl sättigend belichteten als auch etiolierten Senfkeimlingen eine lösliche Fraktion (L) sowie eine Rückstandsfraktion (R), die Zellmembranen enthielt, gewonnen (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14: Größenfiltration von unbelichtetem und sättigend belichtetem Senfrohextrakt mit Nanosep 300-K-Mikrokonzentratoren in Westernblotanalyse.**

Mittels 300-K-Mikrokonzentratoren konnte Senfrohextrakt in „scheinbar zurückgehaltene“ Membranfraktion R und lösliches Eluat L aufgetrennt werden: wurden etiolierte Rohextrakte filtriert, fanden sich in Westernblotanalyse 3/4 des Phototropins in der Rückstandsfraktion (Spur 2) und 1/4 in der löslichen Fraktion (Spur 1). Bei Licht waren mehr als 1/3 des gesamten Phototropins in der löslichen Fraktion (Spur 7) vorhanden. Wurden allerdings beide Fraktionen einer Ultrazentrifugation bei 110000g für 45 min unterzogen, waren in der Rückstandsfraktion als auch im löslichen Eluat Präzipitate vorhanden (Spuren RL und RR). Bei ursprünglich belichtetem Rohextrakt konnte lösliches Phototropin jeweils in den Überständen gefunden werden (Spur 9 bzw. LL als Überstand der löslichen Fraktion und Spur 10 bzw. LR als Überstand der Membranfraktion). Bei Fraktionen aus etioliertem Keimlingen konnte kein lösliches Phototropin mehr dekoriert werden.

Mit Anti-NPH1 wurden die Phototropinverhältnisse ermittelt (siehe Abbildung 14): Bei etioliertem Material fand sich Phototropin zu 3/4 in der Rückstands- und 1/4 in der „löslichen“

Fraktion. Dieses Verhältnis verschiebt sich deutlich bei sättigend belichtetem Material. Hier liegt Phototropin zu mehr als 1/3 in der „löslichen“ Fraktion vor. Die Fraktionen wurden getrennt voneinander einer Ultrazentrifugation (siehe 3.2.5) unterzogen, um festzustellen, ob tatsächlich eine membranfreie, lösliche Fraktion über die Konzentratoren abgetrennt werden konnte. Dies war nicht der Fall, da sich bei allen „löslichen“ Fraktionen nach der Zentrifugation Präzipitate (RL), höchstwahrscheinlich mit Membrananteilen, und damit auch mit membranassoziiertem Phototropin fanden. Diese Methode war folglich zur schnellen Membranpräparation nicht geeignet; bezüglich der Lokalisation von Phototropin konnte aber prinzipiell festgestellt werden, daß in den jeweiligen löslichen Fraktionen nach der Ultrazentrifugation (LL bzw. LR) ausschließlich bei den belichteten Senfproben (LL bzw. LR) intaktes Phototropin detektiert werden konnte.

Auffallend ist auch der Befund, daß bei exakten stöchiometrischen Verhältnissen, d. h. jeweils verhältnismäßig gleiche Anteile von löslichem Überstand und entsprechend resuspendierten Membranfraktionen – die Summe des detektierten Phototropins in der „löslichen“ Lichtprobe (L) nach der Ultrazentrifugation – geringer war als zuvor: so sind die Intensitäten von LL und RL zusammengenommen kleiner als L (siehe Abbildung 14). Hingegen sind die Rückstandsfraktionen RL und RR addiert ähnlich intensiv wie R. Bei den Dunkelproben war dieser Effekt nicht zu beobachten. Die Fraktionen LL und, in geringerem Maße, LR enthielten neben dem Homogenisationsmedium den höchsten Anteil löslicher Zellbestandteile. Möglicherweise wurde dadurch proteolytischer Abbau verursacht. Denkbar wäre auch ein gewisser Schutz vor Degradation durch die Membranassoziation, sei es durch intrinsische Proteininstabilität oder verhinderte Proteasezugänglichkeit.

Phototropin liegt im Dunkeln offensichtlich stark an die Membranen assoziiert vor. Möglicherweise wurde durch Belichtung diese Assoziation geschwächt, so daß Phototropin sich lichtinduziert von der Membran partiell ablösen ließ und so im Cytoplasma löslich nachweisbar war. Auch vorstellbar wäre, daß Phototropin generell zu einem bestimmten Prozentsatz als lösliches Protein vorliegt, welches jedoch, besonders im Falle der unphosphorylierten Form, sehr rasch nach Aufbruch der Zellen abgebaut wird.

Ein weiterer Anhaltspunkt für die intrazelluläre Lokalisation liefert ein von Warpeha & Briggs (1993) bei Erbsenmembranvesikeln beobachteter, 335 kDa schwerer Phototropin-Funktionskomplex mit Kinase- und Substratfunktion im nativen Gelsystem. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht bekannt, daß es sich bei dem Photorezeptor für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus um eine Photorezeptorkinase handelt, bei der in einem Protein Rezeptor, Kinase und Substrat vereint sind (Huala *et al.*, 1997). Es wurde nun auf Westernblotebene mit Anti-NPH1 in Senf überprüft, ob in dem unter nativen Bedingungen beobachteten Komplex, in dem UV-A-/blaulichtvermittelte Phosphorylierung

stattfindet, Phototropin nachgewiesen werden kann. Ebenso galt es herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen diesem Komplex und dem Vorhandensein von löslichem Phototropin bei belichteten Pflanzen besteht.

Als teilnatives Gelsystem wurde die Dodecylmaltosid-Gelelektrophorese in Anlehnung an die blaue Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) von Schägger und von Jagow (1991) verwendet. Die Tatsache, daß der Zusatz von 2 mM Dodecylmaltosid eine gute Auftrennung von Phototropinkomplexen aus Pflanzenrohextrakten und Membranen ermöglichte, bestätigte bereits die membranassoziierte Natur von Phototropin: Dodecylmaltosid als nichtionisches Detergens zerstört weniger Protein-Protein-Wechselwirkung als daß es primär Lipid-Lipid- bzw. Protein-Lipid-Wechselwirkungen aufhebt. Nichtionische Detergentien finden deshalb auch bei der Isolierung von physiologisch aktiven integralen Membranproteinen weitgehend Verwendung.

Die Auftrennung wurde mit Senfproben durchgeführt, um die Unterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Proben bei vollständiger Anti-NPH1-Erkennung aufzuzeigen.

Generell werden bei der BN-PAGE nach Schägger und von Jagow (1991) mittels des anionischen Farbstoffs Coomassie Blau G (= „Serva Blau G“) den aufzutrennenden Proteinen an hydrophobe Bereiche negative Ladungen übertragen. Der Serin-Proteaseinhibitor  $\beta$ -Aminocaprinsäure und zusätzlich Dodecylmaltosid als schwaches nichtionisches Detergens verbessern die Stabilität und Löslichkeit von ggf. aufzutrennenden Membranproteinkomplexen. Nach einem Drittel des Gellaufs wurde der blaue Kathodenpuffer gegen coomassiefreien Kathodenpuffer ausgetauscht. So erhielt man Gele, die nach dem Gellauf weitestgehend entfärbt waren.

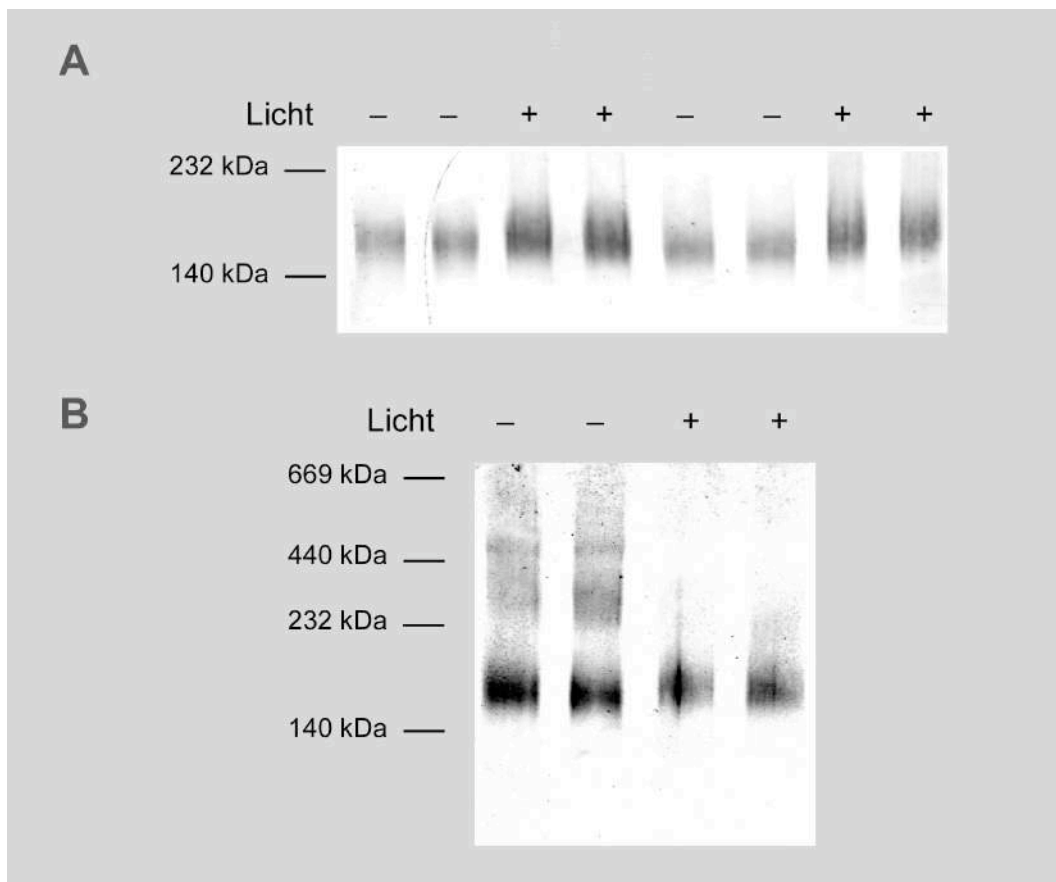
Es wurden alle Arbeitsschritte während der Dodecylmaltosid-PAGE im Dunkeln bzw. unter Schutzlicht ausgeführt, um Lichteffekte während der Gelelektrophorese und damit eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von Senfrohextrakten aus sättigend belichteten und nicht belichteten etiolierten Keimlingen konnte mit Anti-NPH1 in einer Westernblotanalyse (3.2.9) zunächst festgestellt werden, daß die Proben aus belichtetem und somit phosphoryliertem Keimlingsmaterial breiter und mit geringerer Mobilität aufgetrennt wurden (siehe Abbildung 15). Bei näherer Betrachtung waren bei den Dunkelproben höhermolekulare Komplexe zu erkennen, die bei den belichteten Proben gänzlich fehlten.

Dies könnte darauf hindeuten, daß Phototropin tatsächlich, als Polymer oder zusammen mit anderen Proteinen, als höhermolekularer Komplex im Dunkeln vorliegt, der infolge der Belichtung und der damit verbundenen Phosphorylierung zerfällt.

Mit dem HMW Standard von Pharmacia konnten die Molekulargrößen ungefähr abgeschätzt werden: Hauptbanden waren bei der unbelichteten Probe bei etwa 500 kDa, 300 kDa und 170 kDa zu finden. Möglicherweise handelt es sich bei dem niedrigsten nativen



Molekulargewicht um das Monomer. Zur genauen Determination müßte eine zweite denaturierende SDS-PAGE im Anschluß etabliert werden.



**Abbildung 15: Auftrennung von etiolierten und sättigend belichteten Senfrohextrakten über mit Dodecylmaltosid abgewandelte BN-PAGE und anschließender Westernblotanalyse.**

Etiolierte (Spuren gekennzeichnet mit -) und sättigend belichtete Senfrohextrakte (Spuren markiert mit +) wurden nach von Schagger und von Jagow (1991) der BN-PAGE in 8 % Gelen unterzogen und in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 Phototropin dekoriert. Die niedrigstmolekulare Phototropinbande (siehe Abbildung 14A) bei etwa 180 kDa lief im belichteten Zustand mit geringerer Mobilität und weitaus diffuser als die unbelichtete. Abbildung 14B zeigt einen größeren Ausschnitt des Westernblots mit Anti-NPH1: im unbelichteten Zustand waren höhermolekulare Komplexe mit Anti-NPH1 dekorierbar, denen eine ungefähre Molekulargröße von 300 kDa und 500 kDa zuzuordnen war und die bei den belichteten Proben kaum noch nachzuweisen waren.

Um mögliche Signaltransduktionspartner zu lokalisieren, wurden in Dodecylmaltosid-BN-PAGE unbelichtete und sättigend belichtete Senfrohextrakte und -membranen aufgetrennt und geblottet. Die danach geblockte Membran wurde wiederum mit unbelichtetem und alternativ sättigend belichtetem Senfrohextrakt inkubiert. Die Membranen wurden danach gewaschen und mit Anti-NPH1 behandelt (siehe 3.2.9). Hätte Phototropin aus dem Rohextrakt an native Interaktorproteine gebunden, wären zusätzliche Anti-NPH1-Dekorationen zu finden. Dies war aber bei keinem Ansatz der Fall. So spricht wenig für eine Interaktion von Phototropin mit nativen Proteinen bei diesen gewählten Versuchs-

bedingungen. Möglicherweise waren die Bedingungen zu stringent, andernfalls könnten aber auch die aufgetrennten Komplexe mit Phototropin komplett besetzt sein, so daß keine zusätzliche Bindung eines Interaktionspartners möglich wäre oder sie lagen in einer Konformation vor, die die Bindung verhinderte.

#### **4.2.4 Aufreinigung von Phototropin unter dem Aspekt einer Anreicherung**

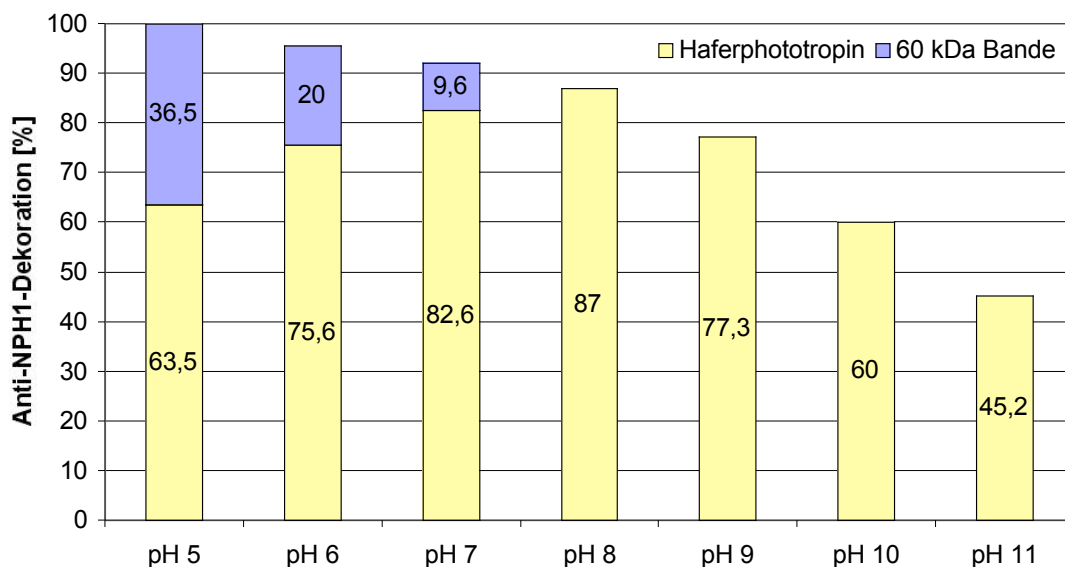
Es ist ein langjähriges Bestreben, Phototropin aus Pflanzen zu isolieren. Dies nicht zuletzt, um direkt die Natur des Chromophors zu identifizieren, ebenso um den Autophosphorylierungsmechanismus zu studieren wie auch den Photorezeptor in seinem Wirkungsgefüge mit möglichen Signalwegen zu beschreiben. Phototropin wurde über seine UV-A-/blaulichtvermittelte Phosphorylierung an der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert. Die bislang erreichte Anreicherung von nativem Phototropin aus dem Ursprungsorganismus stellte die klassische Membranpräparation von mikrosomalen Membranen bzw. Plasmamembranpräparation dar (Gallagher *et al.*, 1989, Short *et al.*, 1992). Lösliches Phototropin, mit dem beispielsweise weiterführende Untersuchungen durchführbar wären, konnte in größeren Mengen hierbei lediglich durch Solubilisierung mit Detergens gewonnen werden. Detergentien stören allerdings bei den meisten funktionellen Studien, da sie das ursprüngliche Gefüge des Proteins oder die Chromophorbindung zerstören. Andere Möglichkeiten zur Gewinnung von löslichem, detergensfreiem Phototropin erbrachten bislang keine tatsächliche Anreicherung (Zacherl, 1997).

##### **4.2.4.1 Stabilität von Phototropin**

Zur Anreicherung von Phototropin ist eine notwendige Voraussetzung, die Stabilitätskriterien zu kennen, um Phototropin weitestgehend vor Abbau oder Inaktivität zu schützen. Das bereits angereicherte Phototropin muß zur Messung von Kinetiken oder zur Durchführung von Phosphorylierungsstudien zumindest während des Versuchszeitraums stabil und funktionsfähig bleiben. Aus diesem Grund wurde bei der Membranpräparation und *in vitro* Phosphorylierung der Einfluß einzelner Parameter auf die Phototropinstabilität untersucht.

Bei einem pH-Wert von 7,5 bis 8 ist der radioaktive Einbau bei *in vitro* Phosphorylierung von Phototropin mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP am höchsten (Hager & Brich, 1993; Short *et al.*, 1994; Zacherl, 1997). Standardmäßig wurden daher Zellrohextrakte bei pH 7,8 bis 8 hergestellt. Um zu ermitteln, ob bei diesen pH-Werten tatsächlich die höchste Menge Phototropin nachweisbar ist, wurden Haferrohextrakte aus etiolierten Keimlingen im pH-Bereich von 5 bis 11 hergestellt (siehe 3.2.1) und bezüglich ihres Phototropingehalts mit Anti-NPH1 in Westernblotanalyse getestet. Da im verwendeten Pflanzenmaterial annähernd immer die gleiche Menge an Gesamtphototropin vorliegt, galt es zunächst herauszufinden, wieviel Phototropin durch die unterschiedlichen pH-Werte in der Rohextraktfraktion, und nicht in den

unlöslichen Zellfragmenten, vorlag. Dabei wurde die höchste Gesamtmenge an Phototropin im Rohextrakt bei einem pH-Wert von 5 festgestellt. Der Anteil von intaktem Phototropin betrug nur 63,5 %. Der fehlende Anteil von 36,5 % fanden sich jedoch in Form einer spezifisch auftretenden 60-kDa-Abbaubande, die vermutlich degradiertes Phototropin darstellte. Mit steigendem pH-Wert des zur Rohextraktbereitung verwendeten Puffers konnte kontinuierlich weniger Gesamtphototropin in der löslichen Fraktion des Rohextrakts detektiert werden, wobei der Anteil des intakten Phototropins allerdings anstieg und, unter kontinuierlicher Abnahme der 60-kDa-Bande, bei pH 8 sein Maximum erreichte. Ab diesem pH-Wert wurde keine 60-kDa-Abbaubande mehr detektiert. Bei weiterer Erhöhung des pH-Werts sank die Menge an intaktem Phototropin, wobei bei pH 11 nur noch etwa halb soviel im Rohextrakt ermittelt wurde als bei pH 8 (siehe Abbildung 16). Saure pH-Werte wirkten sich zusätzlich stark auf die Aktivität aus: so konnten Rohextrakte aus etiolierten Keimlingen, die bei niedrigen pH-Werten präpariert wurden, trotz Antikörperdekoration mit Anti-NPH1 von noch intaktem Phototropin nicht mehr *in vitro* phosphoryliert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Stabilität von Haferphototropin bei unterschiedlichen pH-Werten.**

Aus den ersten 10 mm etiolierter Haferkoleoptilen wurde Rohextrakt mit Homogenisationsmedium mit jeweils unterschiedlichen pH-Werten bereitet. Untersucht wurden pH-Werte von 5 bis 11. Nach SDS-PAGE wurde Phototropin in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 detektiert. Bei pH-Werten niedriger als 8 wurde neben Phototropin von Anti-NPH1 eine etwa 60 kDa große Bande dekoriert, die tendenziell stärker wurde, je weniger Phototropin mit intaktem Molekulargewicht nachweisbar war. Mit der Software TINA wurde die Intensität der Antikörperreaktion ausgewertet, wobei die Phototropinreaktion bei pH 8, da am intensivsten, als 100 %-Wert definiert wurde. Somit konnte verdeutlicht werden, daß mit steigendem pH-Wert des Homogenisationsmediums Phototropin instabiler wurde. Ebenso konnte bei sinkendem pH-Wert weniger Phototropin nachgewiesen werden, wobei Phototropin vermutlich unter Entstehen einer 60-kDa-Bande degradierte.

Wurden mikrosomale Membranen aus Rohextrakten präpariert, die jeweils bei unterschiedlichen pH-Werten von 5–11 gepuffert waren, bestätigten sich die ermittelten Werte: die höchste Anreicherung von Phototropin konnte bei pH 8 erzielt werden. Bei allen anderen pH-Werten wurde in der Westernblotanalyse die detektierbare Menge von intaktem Phototropin geringer.

Im Zellrohextrakt zeigte sich Phototropin bei Raumtemperatur (siehe Abbildung 17, Spalte A) weniger stabil als auf Eis: es konnte in über 2 Stunden auf Eis gelagerten Membranproben nur ein minimaler Phototropinverlust verzeichnet werden. Offensichtlich konnte durch Absenkung der Reaktionstemperatur die Degradation verzögert werden, die vermutlich durch Proteasen im Cytoplasma oder an/in den Membranen verursacht wurde. Auch könnte eine mögliche intrinsische Stabilität von Phototropin auf Eis weniger stark ausgeprägt sein.

Durch Zugabe von bestimmten Proteaseinhibitoren konnte die Lebensdauer von Phototropin im Rohextrakt wesentlich gesteigert werden. Getestet wurden Antipain-dihydrochlorid, Bestatin, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin, Phosphoramidon, Aprotinin, PMSF und Pefablock in unterschiedlichsten Konzentrationen und Kombinationen. Es waren dabei bereits geringfügig stabilisierende Effekte auf Phototropin in jeweils unterschiedlichem Maß zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Eine deutliche Stabilisierung und Erhöhung der Lebensdauer von Phototropin wurde erst mit dem Proteaseinhibitorcocktail Complete™ von Boehringer Mannheim erreicht, dessen Zusammensetzung und damit auch die wirksamen Inhibitoren nicht zu ermitteln waren. Diese Mischung fand standardmäßig Verwendung in sämtlichen Puffern zur Rohextraktbereitung und Membranpräparation.

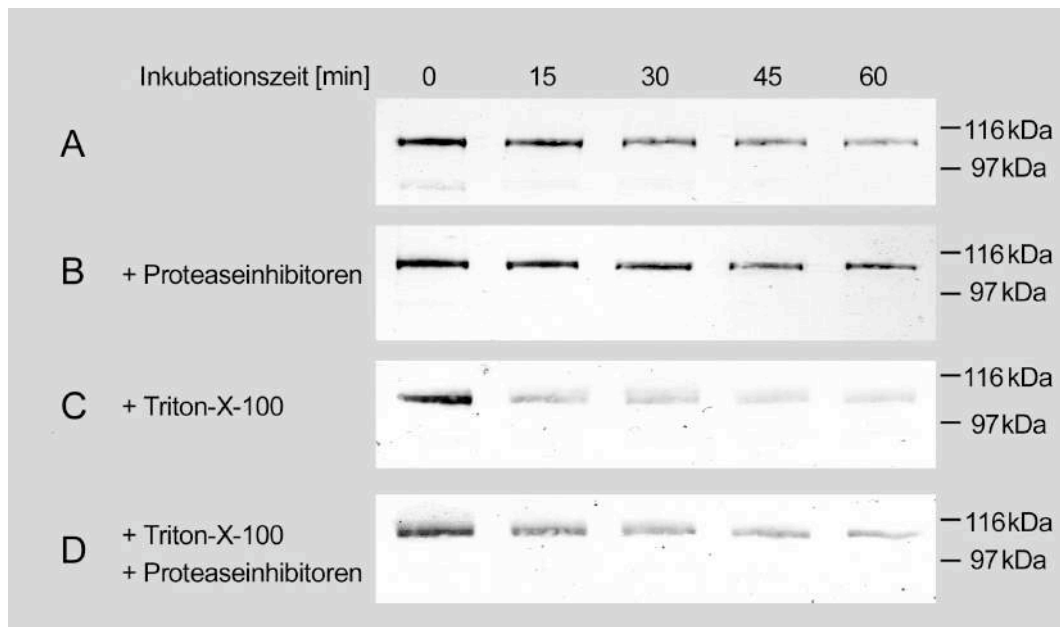
Allgemein zeigte sich Phototropin in resuspendierten mikrosomalen Membranen wesentlich stabiler als im Pflanzenrohextrakt, was durch die Entfernung löslicher Proteasen in der Membranpräparation plausibel erscheint (siehe auch 4.2.3).

Mit dem Einsatz von Reduktionsmitteln, wie z. B. 1-2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2 mM DTT und 2 mM DTE, konnte die Lebensdauer und Aktivität von Phototropin sowohl bei der Präparation von Zellrohextrakt oder Membranen als auch bei funktionellen Studien, wie Phosphorylierung, deutlich erhöht werden.

Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration oder eine Glycerinzugabe in verwendeten Puffern stabilisierte, soweit bei physiologischen Untersuchungen nicht störend, die Phototropinproben deutlich bei der Lagerung und ermöglichte mehrmaliges Einfrieren und Auftauen (Daten nicht gezeigt).

Nach Short *et al.* (1993) war eine Triton-X-100-Zugabe bei Phototropinphosphorylierungen zur Solubilisierung nötig. Beipielsweise konnten Salomon *et al.* (1996) und Zacherl (1997) mit mikrosomalen Membranen von 5 Tage alten etiolierten Keimlingen (im Unterschied zu 3 Tage alten) ohne Triton-X-100 keine *in vitro* Phosphorylierung durchführen. Standardmäßig wurde bei Phosphorylierungen 0,3-0,5 % (w/v) Triton-X-100 verwendet. Dennoch bewirkten

bereits 0,1 % (w/v) Triton-X-100, inkubiert mit frisch vorbereitetem Rohextrakt, einen Abbau von Phototropin um weit mehr als 50 % innerhalb der ersten 15 min. Nach 30 Minuten Inkubation waren höchstens noch 20 % Phototropin immunologisch nachweisbar (siehe Abbildung 17, Spalte C). Der Zusatz von Proteaseinhibitoren konnte den Phototropinabbau zwar etwas verzögern, jedoch nicht verhindern (siehe Abbildung 17, Spalte D).



**Abbildung 17: Stabilität von Phototropin bei Raumtemperatur ohne und mit Zusatz von Proteaseinhibitoren und/oder Triton-X-100 in Westernblotanalyse.**

Aus etiolierten Senfkeimlingen (0-10 mm) wurde Rohextrakt (siehe 3.2.1) bereitet. Dieser wurde ohne (Spalte A) und mit dem Zusatz von 0,1 % (v/v) Triton-X-100 (Spalte C), jeweils mit und ohne Proteaseinhibitoren (Boehringer Complete™, siehe 3.2.1) über 60 Minuten inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 15, 30, 45 und 60 Minuten wurden Proben genommen und auf ihren Phototropingehalt in SDS-PAGE (8%-Gel) und Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 untersucht: deutlich zu sehen ist, daß Phototropin im Rohextrakt nur bedingt stabil ist, denn bereits nach 30 Minuten wurde weniger als die Hälfte an Phototropin dekoriert. Ein vehementer Abbau war durch den Zusatz des zur Phosphorylierung verwendeten Detergens Triton-X-100 erkennbar, wobei bereits nach 15 Minuten nur mehr ein Bruchteil Phototropin nachgewiesen werden konnte. Dieser Abbau konnte durch Proteaseinhibitoren zwar verzögert (Spalten B und D), jedoch nicht verhindert werden.

Auch bei der Denaturierung von Rohextrakt- oder Membranproben mit SDS ist ein hoher Einfluß des Detergens zu beobachten: vom selben Rohextrakt wurden beispielsweise gleiche Aliquots nach 3.2.7.1 mit 1 % (w/v) SDS behandelt, wobei die Proben bei 55 °C oder bei 90 °C unterschiedlich lange erhitzt wurden. Es ließ sich feststellen, daß kurzes Erhitzen bei hohen Temperaturen (ein bis drei Minuten bei 90 °C) Phototropin wesentlich weniger zerstört als längeres Erhitzen bei niedrigerer Temperatur (55 °C). Waren im Nachweis mit Anti-NPH1 (siehe 3.2.9) bei Proben-denaturierung durch einminütiges Erhitzen bei 90 °C noch 100 % Phototropin detektierbar, konnten nach fünf Minuten Kochen bei 90 °C noch 50 % Phototropin und nach einminütigem Erhitzen bei 55 °C nur noch 20 % detektiert

werden – mit abnehmender Tendenz bei fortlaufender Inkubation.

Insgesamt läßt sich festhalten, daß nur bei pH 8 die höchste Menge an intaktem Phototropin isolierbar ist. Eine Absenkung des pH-Werts bewirkt eine kontinuierliche Aktivitätsminderung von Phototropin. Bei Raumtemperatur im Rohextrakt ist Phototropin einem fortschreitendem Abbau unterworfen, der sich durch Temperaturabsenkung, Erhöhung der NaCl-Konzentration, den Zusatz von Complete™ Proteaseinhibitoren, Reduktionsmitteln und/oder Glycerinzugabe mindern läßt, der andererseits jedoch durch Ultrazentrifugation und Detergentien, insbesondere SDS und Triton-X-100 gefördert wird.

#### 4.2.4.2 Membranpräparation und Solubilisierung mit Detergentien und/oder Salzen

Wie bereits unter 4.2.3 dargestellt, findet man bei der Präparation von mikrosomalen Membranen aus belichteten Keimlingen nach der Ultrazentrifugation, im Gegensatz zu den Dunkelextrakten, einen Teil des Phototropins im löslichen Überstand. Dieses lösliche Phototropin zeigte sich nur bedingt stabil. Der Zusatz an Proteaseinhibitoren (Boehringer Complete™) bei allen Schritten der Membranpräparation bewirkte eine höhere Ausbeute an Phototropin sowohl in der Membranfraktion als auch im löslichen Überstand, und in letzterem war Phototropin dadurch über längere Zeit stabil (Daten nicht gezeigt). Für Aktivitäts- und Phosphorylierungsstudien ist diese lösliche Form allerdings ungeeignet, da es durch die der Präparation vorangegangene Belichtung bereits phosphoryliert ist. Im selben löslichen Überstand der Membranpräparation aus etioliertem Keimlingsmaterial war allerdings kein lösliches Phototropin detektierbar. Somit wurde versucht, durch Zusatz milder Detergentien während der Membranpräparation aus etiolierten Hafer- und Senfkeimlingen lösliches unphosphoryliertes Phototropin zu gewinnen.

Zur Phototropinsolubilisierung bei der *in vitro* Phosphorylierung wurde standardmäßig das Detergens Triton-X-100 eingesetzt (Short *et al.*, 1993). Da jedoch die unter 4.2.4.1 durchgeführten Stabilitätsversuche zeigten, daß Phototropin bereits durch 0,1 % Triton einer vermehrten Degradation unterliegt, war es Ziel, besser geeignete Detergentien zu finden.

Zur Membranpräparation wurden neben Proteaseinhibitoren die nichtionischen Detergentien Brij 58, Octylglucosid oder Dodecylmaltosid zugesetzt (siehe 3.2.4.1). Lediglich mit Dodecylmaltosid und Brij 58 konnten geringe Mengen etioliertes Phototropin in die lösliche Fraktion überführt werden. In allen Fällen war, im Vergleich zu detergentfrei präparierten Membranen, nur noch sehr wenig Phototropin an den Membranen immunologisch nachzuweisen. Dies ließ auf eine vermehrte Degradation von solubiliertem Phototropin im Zellextrakt, vermutlich durch darin enthaltene Proteasen, schließen. Wegen des noch zu starken Hintergrunds konnten keine spektroskopischen Messungen durchgeführt werden.

Die Membranpräparation stellte bislang die effektivste Anreicherung von Phototropin dar. So wurde versucht, Phototropin mit Brij 58, Octylglucosid oder Dodecylmaltosid von frisch

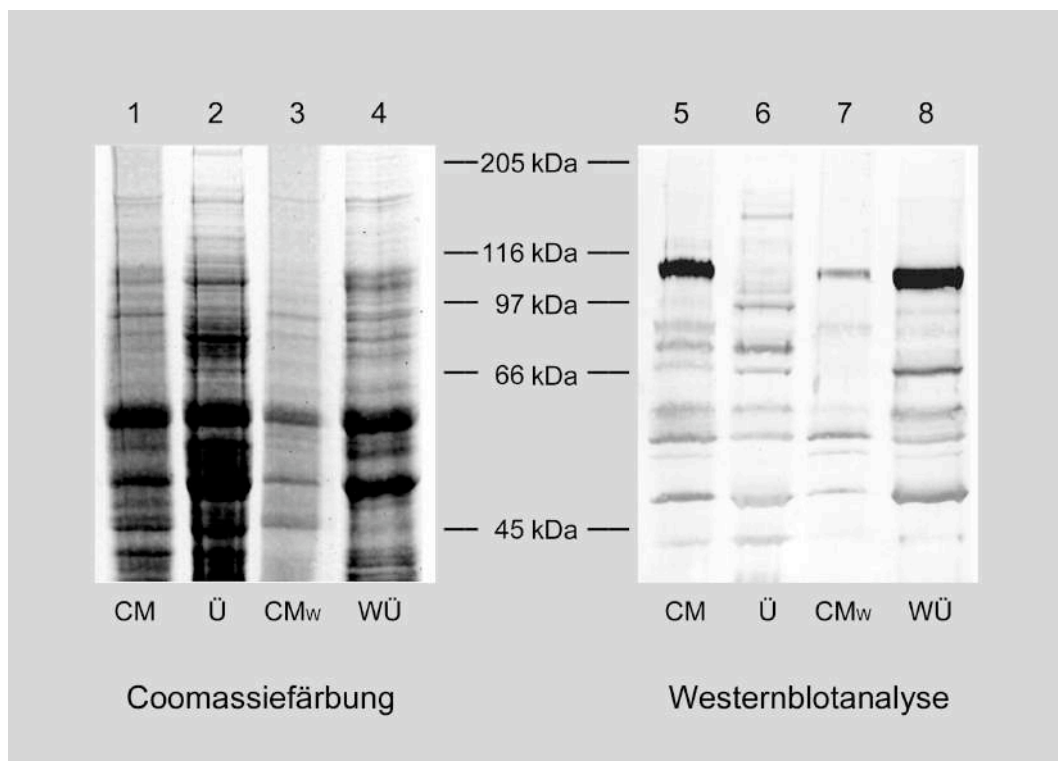
präparierten Membranen aus etioliertem Keimlingsmaterial abzulösen (siehe auch 3.2.4.1). Nach Wiederholung des Ultrazentrifugationsschritts konnte Phototropin nur in geringen Mengen im löslichen Überstand der Behandlung mit dem nichtionischen Detergens Brij 58, einem Polyoxyethylenacyclether, gefunden werden, wobei die dazugehörige Membranfraktion, im Gegensatz zu den Behandlungen mit den übrigen Detergentien, noch ausreichend intaktes Phototropin enthielt, das durch radioaktiven Einbau über *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP gezeigt werden konnte. Am effektivsten konnte Phototropin von mikrosomalen Membranen durch eine Brij 58-Behandlung über fünf Minuten auf Eis und anschließender Ultrazentrifugation abgelöst werden (Daten nicht gezeigt).

Membranvesikel, die nach Präparationen zu 80–90 % nativ orientiert vorliegen, können nach Johansson *et al.* (1995) durch eine Behandlung mit 0,5 % Brij 58 in 100 % invers orientierte Vesikel umgewandelt werden. In Anlehnung an diese Methode wurde die Brij 58-Behandlung mit Hochsalzbedingungen kombiniert (siehe 3.2.4.3). Die zusätzliche Zugabe von 0,5 M NaCl und anschließender 30minütiger Inkubation erzielte in anschließender Anti-NPH1-Westernblotanalyse im Vergleich zur reinen Detergensbehandlung eine Steigerung der Phototropinmenge im löslichen Überstand nach der Zentrifugation. Wurden mikrosomale Membranen aus sättigend belichtetem Keimlingsmaterial präpariert, war die Menge an dem von diesen Membranen mit Brij 58 und 0,5 M NaCl abgelösten Phototropin am höchsten. Im Laufe einer dem sättigenden Lichtpuls folgenden Dunkelinkubation nahmen die Ausbeuten kontinuierlich ab und waren in unbelichteten Pflanzen am geringsten.

Als Variante zur Inkubation mit dem Detergens und Hochsalz diente folgende Überlegung: durch Abtrennung möglichst vieler die Stabilität mindernder Faktoren wurden mikrosomale Membranen zunächst mit Brij 58 und 0,5 M NaCl behandelt, um membranassoziierte Proteasen abzulösen. Nach Ultrazentrifugation wurde dieser erste lösliche Überstand verworfen. In einem zweiten Behandlungsschritt galt es, Phototropin mit einer geringeren Proteaseverunreinigung zu solubilisieren (siehe 3.2.4.4). Wurde zu letzterem Schritt Dodecylmaltosid verwendet, konnte in der Tat eine Phototropinlösung gewonnen werden, in der Phototropin über längere Zeit nicht abgebaut wurde. Jedoch war der tatsächliche Phototropingehalt vergleichsweise gering und die Methode somit vergleichsweise ineffektiv.

Die Behandlung von Thylakoidmembranen mit chaotropen Salzen wird bei Friemann *et al.*, 1992 benutzt, um nichtmembranintegrierte Proteine zu entfernen. Chaotrope Verbindungen, in Wasser gelöst, können intermolekulare Bindungen zwischen Molekülen, z. B. Wasserstoffbrückenbindungen, stören und so auch Proteinkomplexe aufheben. Vielmehr können bei zu hoher Konzentration intramolekulare Bindungen nicht nur geschwächt sondern Proteine dadurch sogar denaturiert werden. Neben verschiedenen Salzen (NaOCl<sub>4</sub>, NaPP, NaF, das Guanidiniumion u.v.m.) zählt auch Harnstoff zu den chaotropen Verbindungen. Die Inkubation von Membranen aus etiolierten Keimlingen mit 1 M NaBr oder

15 mM NaPP und 0,5 % Brij 58 steigerte die Menge an löslichem Phototropin weiter. Hierbei nahm Phototropin in der Membranfraktion in dem Verhältnis ab, wie in der löslichen Fraktion eine Anreicherung an Phototropin verzeichnet werden konnte. Der Zusatz an Proteaseinhibitoren in allen Puffern stabilisierte Phototropin deutlich. Es konnte mittels immunologischer Quantifizierung ein Phototropinverhältnis von 2 : 1 von „noch an Membranen gebundenem Phototropin“ zu „von Membranen abgelöstem Phototropin“ erzielt werden. Dies bedeutete vor allem die Gewinnung von löslichem Phototropin aus etioliertem Pflanzenmaterial in höherer Menge als in der löslichen Fraktion von belichtetem Material nach der Ultrazentrifugation gefunden wurde. Schließlich wurden, unter völligem Verzicht auf Detergentien, frisch präparierte mikrosomale Membranen mit 0,5 M NaCl und/oder mit verschiedenen Mischungen und Anteilen an chaotropen Salzen (0,5–1 M NaBr und/oder 10–15 mM NaPP, siehe 3.2.4.2) versetzt und unterschiedliche Zeiten auf Eis oder bei RT inkubiert. Bei jeder dieser Behandlungen konnte Phototropin von den mikrosomalen Membranen gelöst werden. Mit Abstand am erfolgreichsten zeigte sich eine Mischung aus 0,5 M NaBr und 10 mM NaPP, die den Membranen 30 Minuten auf Eis zugesetzt wurde. Nach einer anschließenden Ultrazentrifugation war lösliches Phototropin zu 95 % in der löslichen Fraktion zu finden (siehe Spur 8 in Abbildung 18). Die Stabilität von löslichem Phototropin wurde durch Zusatz von Proteaseinhibitoren unterstützt.



**Abbildung 18: Gewinnung von löslichem Phototropin von mikrosomalen Membranen aus etiolierten Haferkeimlingen durch Ablösung mit chaotropen Salzen in Westernblotanalyse.**

Nach 3.2.3 präparierte Hafermembranen (= CM; der nach der Ultrazentrifugation



erhaltene lösliche Überstand = Ü) aus etiolierten Haferkeimlingen (Spuren 1 und 5) wurden mit 0,5 M NaBr und 10 mM NaPP 30 Minuten auf Eis inkubiert und einer weiteren Ultrazentrifugation bei 110000 g 45 min unterzogen. Dabei entstanden die Fraktionen des löslichen Waschüberstands (= WÜ) und der gewaschenen Membranen (= CM<sub>W</sub>). Alle Proben wurden in gleichen Anteilen, bezogen auf ihr Gesamtvolumen, in 8%-SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt und in einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 untersucht: die lösliche Fraktion WÜ enthält 95 % des Gesamtphototropins in löslicher Form (Spur 4 und 8), hingegen 5 % des Phototropins verbleiben in der Membranfraktion (Spur 3 und 7, CM<sub>W</sub>).

Mit dieser Methode konnte erstmalig Phototropin mit hoher Effizienz detergensfrei von Membranen aus sättigend belichteten, vor allem aber auch aus etiolierten Keimlingen abgelöst werden. Sogar bei einer derart starken Immunreaktion war in einer Coomassiefärbung keine Proteinbande eindeutig dem Phototropin zuzuordnen. Die Aktivitätsüberprüfung des löslichen Phototropins mittels radioaktiver *in vitro* Auto-phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP zeigte, daß unmittelbar nach der Ultrazentrifugation die Aktivität von Phototropin noch vorhanden war, da radioaktiver Einbau auf Phototropinmolekulargewichtshöhe im Autoradiogramm festgestellt werden konnte. Mit zunehmender Verweildauer von Phototropin in Lösung sank jedoch die Aktivität, so daß nach 30 Minuten Inkubation auf Eis und anschließender *in vitro* Phosphorylierung kaum noch radioaktiver Einbau verzeichnet werden konnte. Hingegen konnte immunologisch eine 60 kDa-Abbaubande dekoriert werden. Eine mögliche Erklärung könnte die partielle Denaturierung von Phototropin durch fortlaufende Inkubation in einer Lösung, die chaotrope Salze enthält, sein. Eine Verdünnung des löslichen Überstands unmittelbar nach der Zentrifugation zur Herabsetzung der Konzentration der chaotropen Salze konnte die Aktivität von Phototropin dauerhaft nicht erhalten. Es wäre auch vorstellbar, daß die Chromophorbindung durch die Salzbehandlung irreversibel geschwächt wird und dadurch der Aktivitätsverlust zustande kam. Des weiteren schien in den abgelösten Fraktionen Proteaseaktivität vorhanden zu sein.

Nichtsdestotrotz konnte Phototropin erstmalig löslich und kurzfristig stabil angereichert werden und möglicherweise für weitere, unmittelbar angeschlossene Aufreinigungen zur Verfügung stehen.

Überdies konnten weitere Aussagen zur membranassoziierten Natur von Phototropin gemacht werden: da durch chaotrope Salze der Hauptteil von Phototropin von den mikrosomalen Membranen abgelöst werden kann, scheint die Membranassoziation über ionische Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrückenbindungen gebildet zu werden. Vorstellbar wäre wiederum ein Komplex, dessen Bestandteil u. a. Phototropin ist. Möglicherweise ist ein an sich lösliches Phototropin über einen derartigen Komplex an die Membran gebunden und durch Licht oder die Behandlung mit chaotropen Salzen aus diesem Komplex freisetzbar.

#### 4.2.4.3 Affinitätsreinigung

Immunoaffinitätschromatographie ist eine der besten Methoden, um Proteine zu isolieren und aufzureinigen. So konnte zunächst der Versuch einer Affinitätsreinigung des Antikörpers Anti-NPH1 mit Protein A unternommen werden. Dabei stellte sich heraus, daß das affinitätsgereinigte Anti-NPH1 weniger aktiv als der ungereinigte Antikörper war. Alternativ wurde nach dem Protokoll von Petrescu *et al.* (1995) ungereinigter Anti-NPH1-Antikörper an pulverisierte Nitrozellulose als Festphase gekoppelt. Das Antigen – Haferphototropin aus Rohextrakt oder Membranen von etiolierten Haferkeimlingen bzw. Senfphototropin aus belichtetem und unbelichtetem Material – wurde mit der präparierten Affinitätsmatrix inkubiert. Die erfolgreiche Immunoaffinitätsbindung von Phototropin konnte durch Kochen einer kleinen Portion Antikörpermatrix mit SDS-Probenpuffer (siehe 3.2.7.1) und anschließendem Nachweis von Phototropin über Westernblotanalyse (siehe 3.2.9) der löslichen Phase nachgewiesen werden. Das Antigen allein konnte jedoch detergentsfrei weder mit sauren oder chaotropen Puffern aus dem Antigen-Antikörper-Komplex eluiert werden. In allen Fällen wurde entweder der Antikörper während der Antigeninkubation mit der Affinitätsmatrix abgelöst, kein Protein oder Phototropin im intakten Antigen-Antikörper-Komplex eluiert. Dies ließ vermuten, daß die Affinität des Antikörpers zur Nitrozellulose geringer war als zum spezifischen Antigen und somit eine Affinitätsreinigung verhinderte.

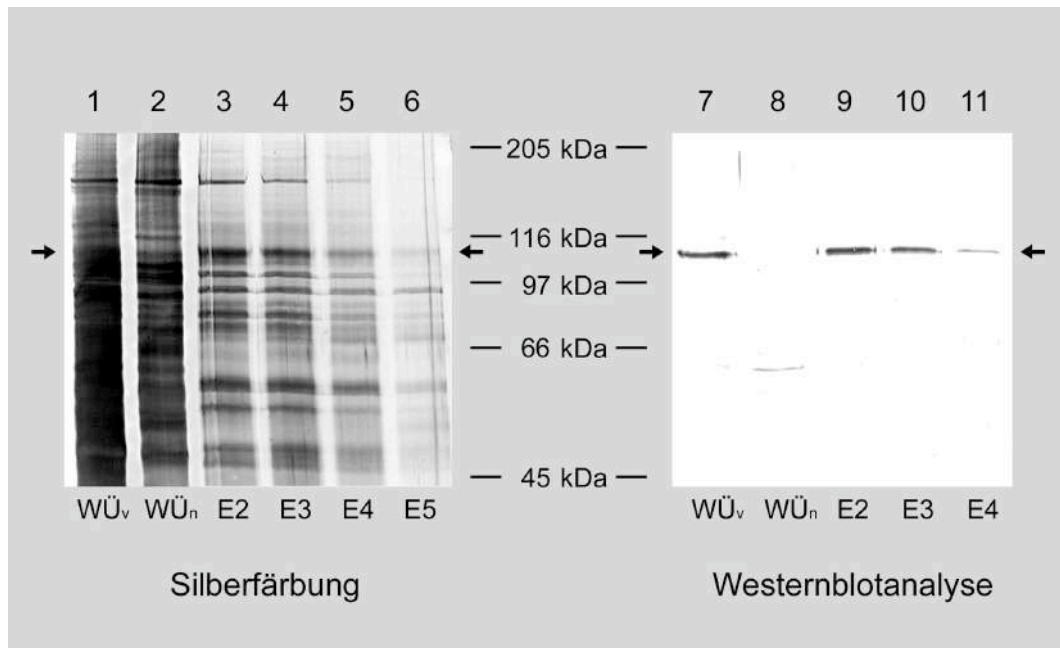
Ein weiterer Ansatz zur Anreicherung von Phototropin mittels Affinitätsreinigung erfolgte über den Reaktivfarbstoff Cibachron Blau 3GA. Dieser zeigt hohe Affinität zur Dinukleotidbindetasche, die alle Kinasen zur ATP-Bindung und Phosphatübertragung besitzen. Wird an diesen Farbstoff, der an eine Matrix wie z. B. Agarose gekoppelt ist, eine Kinase (z. B. die Rezeptorkinase Phototropin) affinitätsgebunden, kann mit ATP als Verdrängungsagens eluiert werden (Baxter *et al.*, 1978). Hafer- oder Senfphototropin wurden dazu in verschiedenen Anreicherungsgraden eingesetzt (siehe 3.2.18): im Rohextrakt nach 3.2.1, an isolierten mikrosomalen Membranen nach 3.2.3 und von letzteren mit chaotropen Salzen solubilisiert nach 3.2.4.2. In jedem Fall war das eingesetzte Phototropin unmittelbar vor der Affinitätsreinigung präpariert worden, denn in Vorversuchen eingesetztes, eingefroren gelagertes Phototropinmaterial zeigte keinerlei Affinität zu Cibachron Blau 3GA (und teilweise auch keine Aktivität mehr, siehe 4.2.4.1). Phototropin zeigte sich während der Anbindungsphase an die Affinitätsmatrix anfällig für Degradation, was vor allem an einer häufig und spezifisch auftretenden, immunologisch mit Anti-NPH1 nachweisbaren 60-kDa-Bande deutlich wurde. Um die Stabilität von Phototropin zu erhöhen und vor Degradation zu schützen, wurde die Proteinlösung bei der Anbindung mit 1 mM FMN, 1 mM FAD, 5–15 mM BSA und/oder Proteaseinhibitoren angereichert. Des Weiteren wurden, um die Stringenz der Anbindebedingungen zu erhöhen, 0,05 % Triton-X-100, 150 mM NaCl oder auch

insbesondere bei Rohextrakt und Membranen 10 % Dodecylmaltosid zugesetzt. Deutlich wurde hier auch, daß ein Optimum für die Affinitätsbindung existiert, denn sowohl bei zu stark verdünnter als auch bei zu stark konzentrierter Proteinlösung findet keine Affinitätsbindung statt (Daten nicht gezeigt).

Die effizienteste Affinitätsbindung und die geringste Phototropindegradation wurde mit einer 1 : 10-Verdünnung von Phototropinprobe (Rohextrakt, mikrosomale Membranen oder NaBr/NaPP-Überstände, s.o.) und Equilibrierpuffer (50 mM HEPES-KOH pH 8,0, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 7 mM MgCl<sub>2</sub> 5 mM Mercaptoethanol und pro 25 ml 1 Tablette Complete™) erreicht. Um Phototropin während der gesamten Reinigung vor Proteaseaktivität zu schützen, wurden sämtliche Reaktionslösungen mit Proteaseinhibitoren angereichert. Bewährt hat sich eine Durchführung bei Raumtemperatur mit eisgekühlten Lösungen. Ebenso wurden zur Elution verschiedene Elutionsmittel und -konzentrationen getestet, wie z. B. ATP in Konzentrationen von 1 bis 50 mM und das ATP-Analogon AMP-PNP. Hierbei zeigte sich eine ATP-Menge von 10 mM am effizientesten. Die stärkste Anbindung erfolgte, wenn Phototropin über mit Dodecylmaltosid versetzten, mikrosomalen Membranen oder mit chaotropen Salzen von mikrosomalen Membranen abgelöst eingesetzt wurde. Dabei war festzustellen, daß phosphoryliertes Senfphototropin, abgelöst von Membranen aus *in vivo* sättigend belichteten Senfkeimlingen, generell eine höhere Affinität zu Cibachron Blue zeigte (Daten nicht gezeigt).

Da bei Haferphototropin nur die unbelichtete Phototropinform immunologisch mit Anti-NPH1 nachgewiesen werden kann (siehe 4.1), konnte kein adäquater Licht-Dunkel-Vergleich ermittelt werden. Jedoch war die unphosphorylierte Form für weiterführende Phosphorylierungsstudien ohnehin interessanter. Prinzipiell konnte Phototropin erstmals in den eluierten Fraktionen als spezifisch angereicherte, distinkte Bande nach SDS-PAGE und Silberfärbung identifiziert werden (siehe Abbildung 19, Pfeil).

Betrachtet man die etiolierten Haferproben in Abbildung 19, schien Phototropin (Spur 7, WÜ<sub>v</sub>) dennoch nahezu vollständig an die Affinitätsmatrix zu binden bzw. nichtgebundenes Phototropin lag degradiert vor: nach Inkubation mit der Matrix war Phototropin in der Proteinlösung lediglich als dünne Abbaubande bei 60 kDa detektierbar (Spur 8, WÜ<sub>n</sub>).



**Abbildung 19: Affinitätsreinigung von Haferphototropin mit Cibachron Blau 3GA-Agarose in Silberfärbung und Anti-NPH1-Westernblotanalyse.**

Von mikrosomalen Membranen aus etiolierten Haferkoleoptilenspitzen (0-10 mm) wurde mit 0,5 M NaBr/10 mM NaPP nach 3.2.4.2 Phototropin löslich gewonnen. Ein Teil dieser phototropinhaltigen Lösung (WÜ) wurde 1 : 10 mit Proteaseinhibitoren angereicherten Equilibrierpuffer verdünnt und mit Cibachron Blau 3GA-Agarose inkubiert (siehe 3.2.18). Anschließend wurde mit 50 mM ATP-haltigem Puffer eluiert. Nach einer Analyse der Proben über Auftrennung im 8% SDS-PAGE-Gel und Westernblot mit Anti-NPH1 wurde deutlich, daß Phototropin, das vor der Anbindung in der Anbindelösung nachgewiesen wurde (Spur WÜ<sub>v</sub>), quantitativ an die Affinitätsmatrix bindet. In der Anbindelösung konnte nach der Inkubation (Spur WÜ<sub>n</sub>) mit Cibachron Blau 3GA-Agarose kein Phototropin bei 110 kDa mehr detektiert werden. Das affinitätsgebundene Phototropin konnte am stärksten in der Elutionsfraktion E2 und mit abnehmender Intensität bis zur Fraktion E5 lokalisiert werden.

Die Hauptmenge an gebundenem Phototropin ließ sich mit 10 mM ATP enthaltendem Elutionspuffer sowohl in der phosphorylierten als auch in der nichtphosphorylierten Form eluieren. Durch verschiedene Zusätze wie beispielsweise BSA oder 50–250 mM NaCl in allen Puffern, aber auch durch eine Variation von pH 6 bis pH 9 konnte der doch recht hohe Hintergrund von unspezifisch mitgereinigtem Protein bei der Elution nicht gemindert und dadurch eine spezifischere Aufreinigung nicht erreicht werden. Es wurde dabei lediglich vermehrte Phototropindegradation beobachtet.

Aufgrund der hohen Gesamtproteinkonzentration in den Phototropinlösungen WÜ<sub>v</sub> und WÜ<sub>n</sub> war eine stöchiometrische Darstellung der Phototropinverhältnisse innerhalb der verschiedenen Proben nur bedingt möglich und deshalb ist folgendes bei der Auswertung zu berücksichtigen: die Spuren WÜ<sub>v</sub> und WÜ<sub>n</sub> stellen jeweils im Verhältnis zu den Spuren E nur 1/10 der Proteinmenge dar. Da jedoch die Stärke der Phototropinbanden aller Elutionsfraktionen in Summe sowohl im Westernblot als auch im Silbergel geringer ist als das Phototropinsignal in WÜ<sub>v</sub>, deutet dies auf Proteindegradation hin, wie auch an der 60-

kDa-Abbaubande im Westernblot in Spur 8 beobachtet werden kann.

Die Aktivität des spezifisch gereinigten etiolierten Phototropins wurde durch radioaktive *in vitro* Phosphorylierung getestet (siehe 3.2.6.1). Dies war nur bei ausschließlich unter Schutzlicht behandeltem Phototropin möglich, um eine unkontrollierte lichtabhängige Phosphorylierung mit dem Elutionsagens ATP zu vermeiden. Hierbei konnte leider keine lichtabhängige Phosphorylierung beobachtet werden.

Alternativ wurde von den Eluaten ein Fluoreszenzspektrum von 350 bis 550 nm bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm bzw. 450 nm gemessen. Das Puffermedium HEPES fluoreszierte jedoch im Meßbereich und dadurch könnten andere Kurven überdeckt werden. Die Puffersubstanz TRIS stört Fluoreszenzmessungen im Wellenlängenbereich von Flavinen nicht. Wurde TRIS statt HEPES in gleicher Konzentration eingesetzt, wurde durch pH-Messungen deutlich, daß mit 10 mM ATP als Elutionsagens bereits die Pufferkapazität von TRIS erschöpft ist. Um ein nahezu identisches Elutionsprofil von Phototropin zu erhalten, sind 50 mM HEPES mit 100 mM TRIS gleichwertig zu ersetzen. In beiden Fällen reichte jedoch die Pufferkapazität nicht aus, um bei der Elution in den ersten Fraktionen den pH-Wert von 8 zu stabilisieren: der pH-Wert sank stets unter 6 ab und stieg wieder mit fortschreitender Elution an. Dies könnte möglicherweise ausreichen, um den Protein-Chromophor-Komplex zu zerstören und die Inaktivität des eluierten Proteins zu erklären. Versuche, die Konzentration von HEPES und TRIS zu erhöhen bzw. im Elutionspuffer den pH-Wert zu erhöhen, um die Pufferwirkung zu unterstützen, führten zur Phototropindegradation (siehe 4.2.4.1).

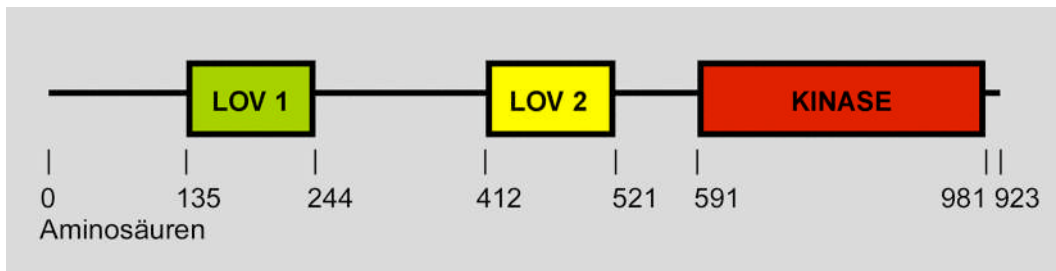
Insgesamt läßt sich festhalten, daß Phototropin durch die Solubilisierung von mikrosomalen Membranen aus etiolierten Keimlingen detergensfrei und löslich mit hoher Effizienz angereichert werden kann und unmittelbar nach der Präparation auch aktiv ist. Ebenso wurde Phototropin über Affinitätschromatografie mit dem Reaktivfarbstoff Cibachron Blue 3GA löslich so weit aufgereinigt, daß erstmalig eine eindeutige Phototropinbande im Silbergel zuzuordnen war.

### **4.3 Charakterisierung der LOV2-Chromophorbindung**

Mit angereichertem Phototropin aus Pflanzen konnten weder aussagekräftige Spektren hinsichtlich der Art des Chromophors gemessen werden, noch waren die Proben für weiterführende Chromophoranalysen ausreichend aufgereinigt. Da Phototropin aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung als löslich gilt (Huala *et al.*, 1997, siehe 4.2.3) und der in Pflanzen vorliegende membranassoziierte Zustand beispielsweise durch Salzbehandlung aufgelöst werden kann (siehe 4.2.4.2), galt es an heterolog überexprimiertem Haferphototropin die Natur der Chromophorbindung zu studieren.

#### **4.3.1 Vorarbeiten**

Zur Expression eines Photorezeptors im heterologen System mußte prinzipiell berücksichtigt werden, daß ein nicht arteigener und erstrebenswert aktiver Photorezeptor auf das Expressionssystem phototoxisch wirken kann und so bei *Escherichia coli*-Zellen eine mögliche Einkapselung des exprimierten Fremdproteins in stoffwechsellinaktive „inclusion bodies“ fördert oder sogar ein Absterben der Zellen verursacht. Die Proteinexpression erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS, da die Transkription der *E. coli* T7 RNS-Polymerase sowie die des Phototropingens, das in den pCal-n-Vektor kloniert wurde und dessen Transkription ebenfalls auf der T7 RNS-Polymerase basiert, im Lac-Operon durch ein IPTG-sensitives Lac-Repressorprotein reprimiert ist. Erst durch IPTG-Zugabe kann individuell die heterologe Expression des Photorezeptors Phototropin initiiert werden. An dieser Stelle setzt sofort das ebenfalls auf der T7 Polymerase basierende Expressionsprodukt des zusätzlichen pLysS-Plasmids an: das Lysozym inaktiviert die T7 Polymerase und dadurch kann eine unkontrollierte Expression von Phototropin maximal unterdrückt werden. Dieser Lysozymeffekt ist nach der Induktion mit IPTG nicht mehr tragend, da die T7 Polymerase in weitaus größerem Maße – und somit auch Phototropin – exprimiert werden. Lysozym selbst bietet außerdem den Vorteil, daß die Bakterienzellen bei der späteren Aufarbeitung leichter lysiert werden können. Als Klonierungs- und Expressionsvektoren dienten die Plasmide pCal-n bzw. pCal-n-EK. Neben dem bereits erwähnten Lac-Operon konnte über eine Ampicillin-Resistenz durch die Plasmide auf erfolgreiche Transformation in die *E. coli*-Zellen selektiert werden, zum anderen wiesen die exprimierten Proteine N-terminal ein Calmodulin-Bindeprotein (CBP) auf, das eine Affinitätsreinigung über Calmodulinsepharose ermöglichte. Die Sequenz von Haferphototropin aus dem cDNS-Klon pBR-As-phot1a mit der Datenbankzugangsnummer AF033096 von Zacherl *et al.* (1998), die der exprimierten Proteinsequenz von NPH1-1 bzw. PHOT1a entspricht (siehe Abbildung 20 und Briggs *et al.*, 2001), war von M. Salomon in den pCal-n-Vektor kloniert worden.



**Abbildung 20: Aufbau von Haferphototropin.**

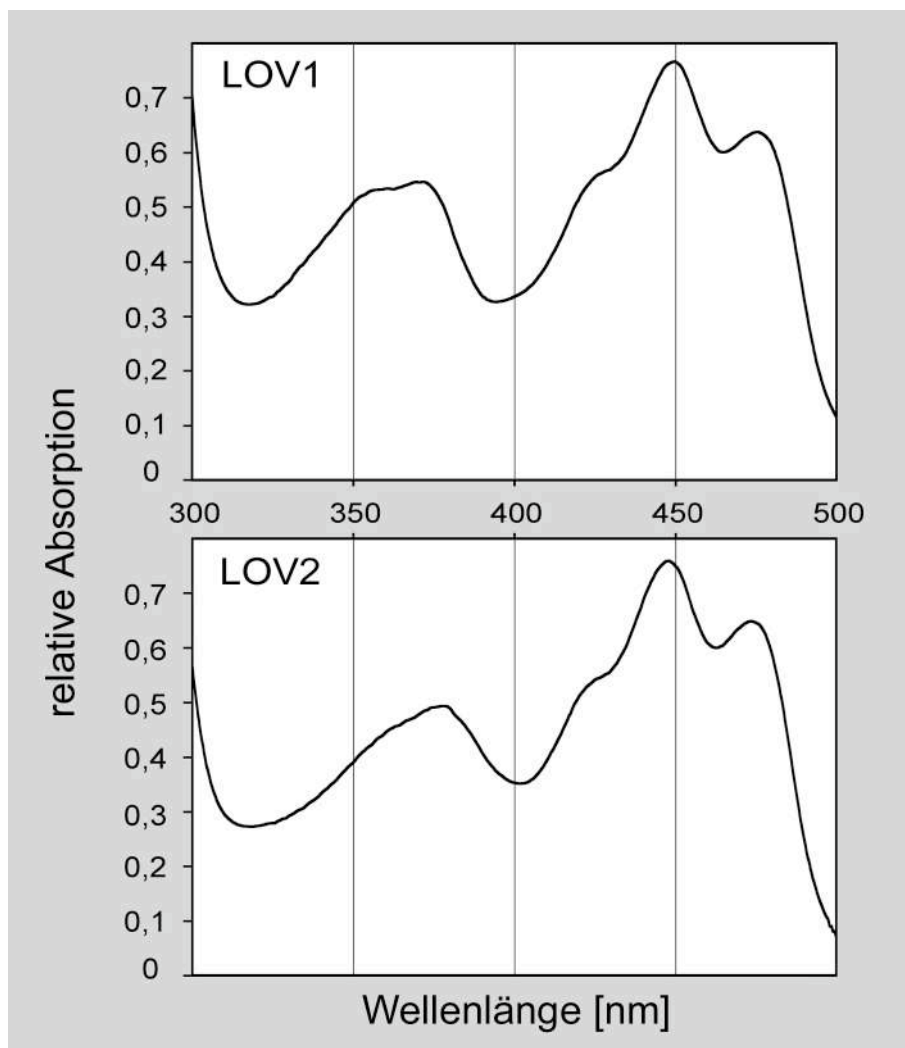
Das aus der Gensequenz des Haferphototropin-cDNS-Klons *As-PHOT1-a* abgeleitete Protein besteht aus 923 Aminosäuren. Es konnten zwei zueinander homologe LOV-Domänen (Aminosäuren 135-243 bzw. 412-520) und eine C-terminale Serin-Threonin-Kinase (Aminosäuren 591-981) identifiziert werden (Zacherl, 1997; Zacherl *et al.*, 1998).

Nach Transformation in den Stamm BL21(DE3)pLysS (siehe 3.3.2.4 und 3.3.2.5) wurde Phototropin heterolog als CBP-Fusionsprotein exprimiert (siehe 3.3.4). Nach Auftrennung der löslichen und unlöslichen Bestandteile des Zellysats (siehe 3.3.5.3) im 8 %-SDS-PAGE-Gel wurde nach einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 deutlich, daß in *E. coli*-Phototropin als CBP-Fusionsprotein zwar heterolog exprimiert wurde, jedoch weitestgehend unlöslich in der Fraktion der Zellfragmente vorlag. Lösliches Phototropin konnte nur in äußerst geringer Menge affinitätsgereinigt werden und zeigte keine meßbare lichtabhängige Autophosphorylierung. Zudem wurde die Identifizierung von Phototropin, trotz Affinitätsreinigung, durch mitgereinigte, über den gesamten aufgetrennten Molekulargewichtsbereich vertretene *E. coli*-Proteine stark erschwert (Daten nicht gezeigt).

Parallel dazu konnte im Labor von Winslow Briggs in Insektenzellen – mit rekombinanten, die *PHOT1*-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* enthaltenden Baculoviren transfiziert – das 120-kDa-phot1-Protein überexprimiert werden (Christie *et al.*, 1998). Obwohl letzteres ebenfalls in seiner Hauptmenge unlöslich war, konnte im Insektenzellrohextrakt eine kleine Menge lösliches phot1-Protein spezifisch mit Anti-NPH1 identifiziert werden, die, wie *in natura* Phototropin, UV-A-/blaulichtabhängige Autophosphorylierung zeigte. Das Fluoreszenzanregungsspektrum dieser löslichen Fraktion entsprach dem Wirkungsspektrum des Phototropismus. Somit war erstmals bewiesen, daß es sich bei dem phot1-Genprodukt um den Photorezeptor für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus handelte. In der gelben Fraktion der unlöslichen Zellfragmente, die zum Großteil aus exprimiertem Phototropin bestand, wurde FMN – Flavinmononukleotid – als Chromophor identifiziert, der nichtkovalent gebunden schien, da dieses als Kofaktor durch Erhitzen oder Säuredenaturierung herausgelöst werden konnte. Phototropin ist somit höchstwahrscheinlich in Pflanzen auch ein Flavoprotein.

Christie *et al.* (1999) klonierten verschiedene Konstrukte, die entweder eine oder beide LOV-Domänen von Phototropin u. a. aus Hafer (siehe Abbildung 20) enthielten. Die LOV-Domänen wurden dabei einzeln heterolog in *E. coli* BL21(DE3) bzw. BL21(DE3)pLysS

ausreichend löslich als CBP-Fusionsprotein mit einer Molekulargröße von 20,8 kDa für CBP-LOV1 und 26,2 kDa für CBP-LOV2 exprimiert (siehe Anhang). Nach der Affinitätsreinigung stimmten bei spektraler Analyse der konzentrierten Proteinlösungen die Absorptionsspektren der gereinigten LOV-Domänen mit dem Wirkungsspektrum des Phototropismus überein (siehe Abbildung 21 und Abbildung 3), so daß vermutlich auch die dreidimensionale Faltung der LOV-Fusionsproteine der des nativen Photorezeptors sehr ähnlich sein muß. Alle zur richtigen, funktionellen Proteinfaltung und folglich korrekter Kofaktorbindung nötigen strukturellen Informationen mußten in der LOV-Proteinsequenz enthalten sein.



**Abbildung 21: Absorptionsspektren der jeweils als CBP-Fusionsproteine heterolog exprimierten LOV-Domänen von Haferphototropin.**

Die Messung erfolgte in Hochsalz-Elutionspuffer (pH 8,0) bei einer LOV1-Menge von 63  $\mu\text{M}$  und einer LOV2-Menge von 55  $\mu\text{M}$  über den Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm.

Christie *et al.* (1999) ermittelten auch, daß der Chromophor FMN in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 jeweils an eine LOV-Domäne gebunden wird, womit bewiesen wurde, daß die LOV-Domänen als FMN-Bindedomänen fungieren. In einer Datenbanksuche wurden zur





\* markierten Aminosäuren sind typisch für PAS-Domänen (Zhulin & Taylor, 1997).

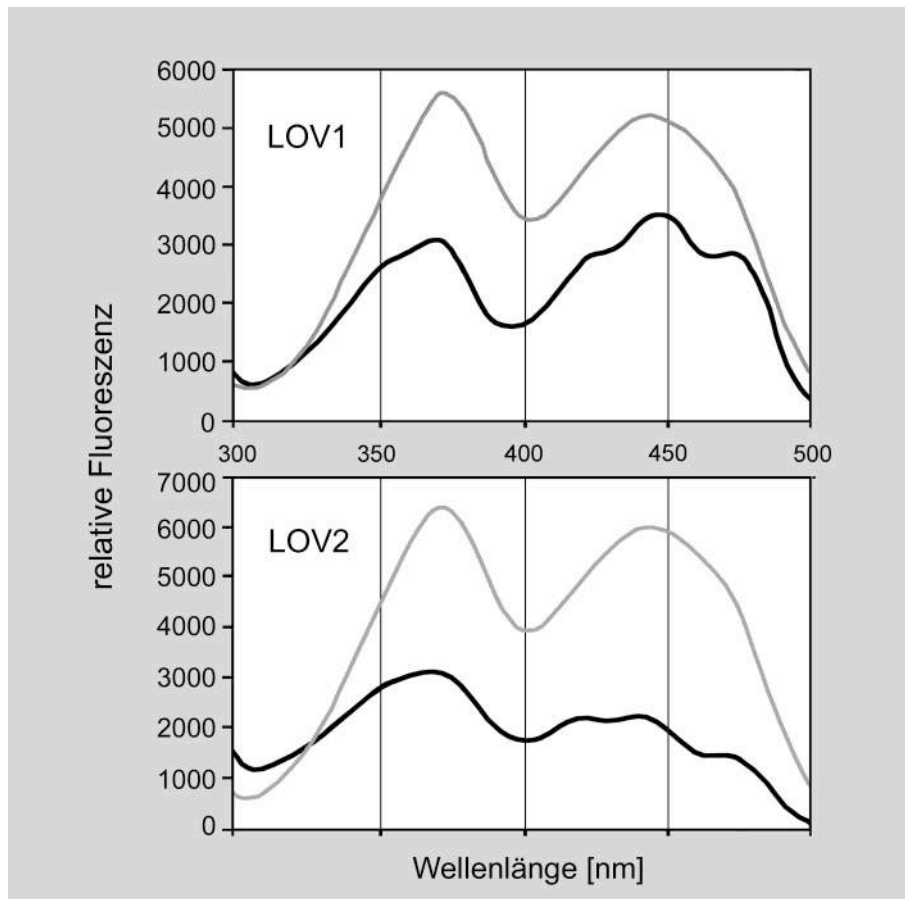
Die stärksten Homologien von Phototropin zeigten sich zu den PAS-Domänen-Proteinen, die durch Änderungen ihres Redoxzustands über Licht, Sauerstoff oder Spannung auf ihre Umgebung reagieren können. Diese Untergruppe in der Superfamilie der PAS-Domänen wird deshalb als LOV (abgeleitet von „Light“, „Oxygen“ und „Voltage“) bezeichnet. Dazu gehören beispielsweise das bakterielle Regulatorprotein NIF-L zur Stickstofffixierung (Hill *et al.*, 1996) oder AER für die Aerotaxis (Bibikov *et al.*, 1997), die Sauerstoffsensoren und Flavoproteine sind. Ebenso weist der potentielle Blaulichtrezeptor WC-1, ein Zinkfingerprotein und Transkriptionsfaktor in *Neurospora crassa*, eine LOV-Domäne auf, die, wenn durch Mutation verändert, zum Verlust der UV-A-/blaulichtabhängigen Regulation führt (Ballario *et al.*, 1996 und 1998). Dies verdeutlicht bereits die Beteiligung der LOV-Domäne bei der Licht- bzw. Signalperzeption und weist auf mögliche Stelle/-n zur Chromophorbindung hin. Die PAS-Domänen von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, vor allem bei Mensch (Cabral *et al.*, 1998), Ratte, Maus und *Drosophila melanogaster*, weisen immer noch bis zu 30 % mit den LOV-Domänen identische Aminosäuren auf. Besonders auffällig waren viele Bereiche mit einem hohen Grad an Homologien, allen voran das Hafer-GRNCRFLQ-Motiv oder das FWNL-Motiv, die in allen Phototropinen, in WC-1 und vielen Kaliumkanalproteinen vorkommen. Da jedoch PAS-Domänen sowohl als Sensordomäne fungieren als auch an der Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligt sein können, ist nicht auszuschließen, daß die beiden LOV-Domänen in Phototropin unterschiedliche Funktionen haben.

Die Absorptionsspektren von LOV1 und LOV2 schienen zunächst ähnlich, bei genauerer Betrachtung fand man jedoch nur bei LOV1 im ultravioletten Wellenlängenbereich zwei Maxima bei 361 und 370 nm, wobei stets das letztere den höheren Wert aufwies. Im Absorptionsspektrum von LOV2 war bei 361 nm eine Schulter nur mehr andeutungsweise zu sehen, wohingegen das Hauptmaximum bei 378 nm lokalisiert werden kann. Die relative Absorption im UV-A-Bereich war bei LOV1 größer als bei LOV2 und auch die Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich war bei beiden LOV-Domänen nicht identisch: die Maxima waren bei LOV2 zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben, so daß beispielsweise das Hauptmaximum bei LOV1 bei 449 nm und bei LOV2 bei 447 nm gefunden werden konnte.

Die Erstellung eines Fluoreszenzanregungsspektrums stellte eine wesentlich empfindlichere Methode dar, um die photochemische Aktivität der LOV-Domänen zu messen. Hierzu konnten im Vergleich zur UV-VIS-Spektroskopie wesentlich geringere Konzentrationen des Chromoproteins eingesetzt werden. Waren Unterschiede zwischen LOV1 und LOV2 im Absorptionsspektrum in erster Linie in der Wellenlänge der Maxima zu finden, konnten im Fluoreszenzanregungsspektrum wesentlich augenscheinlichere Differenzen beobachtet

werden: zunächst wurde im Fluorimeter von beiden Proben im Wellenlängenbereich von 250 bis 600 nm die Emission gemessen und das Emissionsmaximum ermittelt. Dies lag sowohl bei LOV1 als auch bei LOV2 bei 530 nm. Im Anschluß daran wurde von jeder Probe bei konstanter Emission von 530 nm ein Fluoreszenzanregungsspektrum über den Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm gefahren. In der Regel wurde dabei mit maximaler „Scan“-Geschwindigkeit von 1200 nm/min gemessen, so daß jede Messung 10 Sekunden dauerte. Wurde bei geringerer „Scan“-Geschwindigkeit über einen demzufolge längeren Zeitraum gemessen, fielen alle ermittelten Kurven mit geringeren absoluten Werten und vor allem aber flacher aus. Dieser Effekt war bei LOV2 deutlicher ausgeprägt. Das Fluoreszenzanregungsspektrum von LOV1 (siehe Abbildung 23, oben, schwarze Kurve) ähnelt dem Absorptionsspektrum mit einem Doppelmaximum im UV-A und einer Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich. Hierbei wird auch deutlich, daß die Höhe des Maximums im Blauen das des UV-A-Bereichs übersteigt. Hingegen bei LOV2 ist genau diese Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich in allen Fällen schwächer ausgeprägt: alle Maxima dieser Feinstruktur liegen niedriger als bei der LOV1-Feinstruktur und auch vergleichsweise niedriger als im UV-A-Bereich beider LOV-Domänen. Man kann einen regelrechten Abfall der Feinstruktur beobachten.

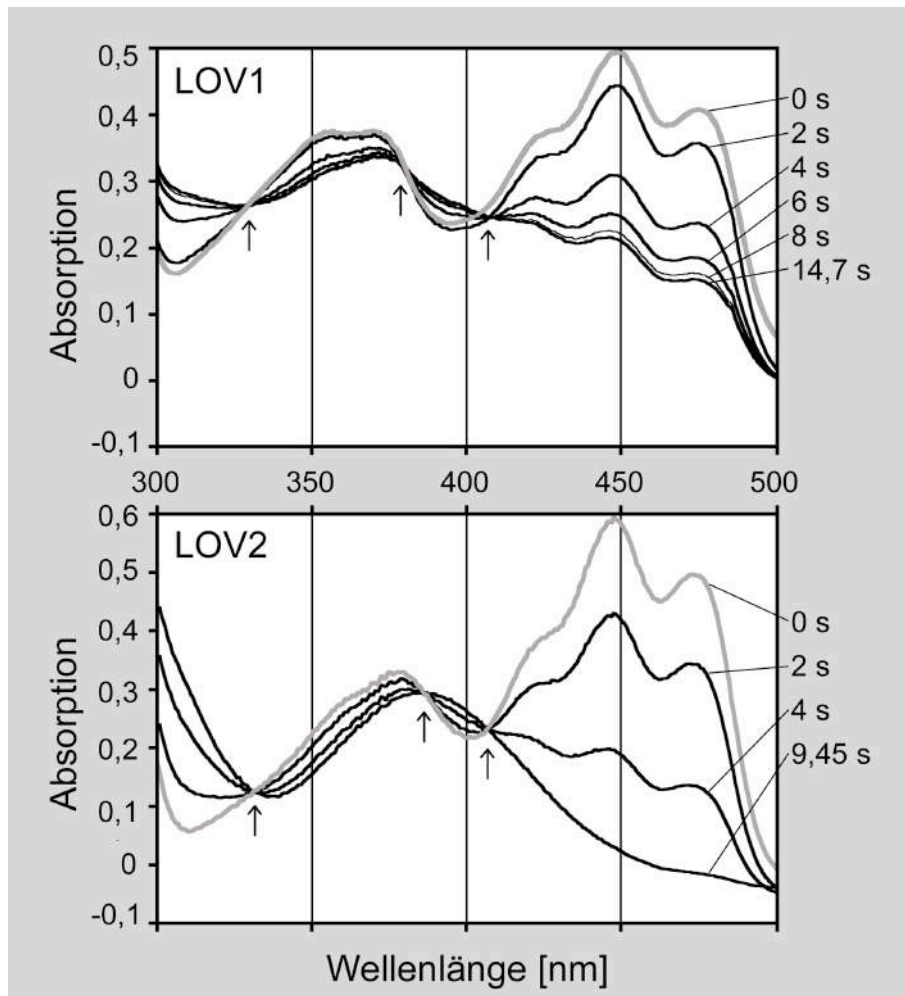
Diese lichtinduzierten Änderungen der Fluoreszenz waren nach etwa fünf Minuten Dunkelinkubation erneut in gleichem Maße lichtinduzierbar. Dieser dunkelregenerierbare Photozyklus ließ sich mehr als 20 mal wiederholen. Löste man den Chromophor FMN durch Denaturierung der gemessenen Probe mit SDS aus dem Proteingefüge, wurde das Fluoreszenzanregungsspektrum des freien Chromophors (Abbildung 23, graue Kurven) gemessen. Durch den Vergleich mit den Fluoreszenzanregungsspektren der nativen Proteine (schwarze Kurven) zeigt sich in letzterem deutlich die Fluoreszenzminderung durch die Proteinumgebung.



**Abbildung 23: Fluoreszenzanregungsspektren der CBP-LOV-Domänen.**

Von den CBP-LOV-Fusionsproteinen (in Hochsalz-Elutionspuffer, pH 8,0) wurde bei einer konstanten Emission von 530 nm über den Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm angeregt und die Fluoreszenz bei einer Spaltbreite von 10 nm und 1200 nm min<sup>-1</sup> gemessen (schwarze Linie). Nach der Messung wurde die Probe jeweils mit 0,1 % (w/v) SDS denaturiert und die Fluoreszenzanregung des freien Chromophors analog ermittelt. Die Menge der gemessenen Proben betrug bei LOV1 1,66 µM und bei LOV2 1,83 µM.

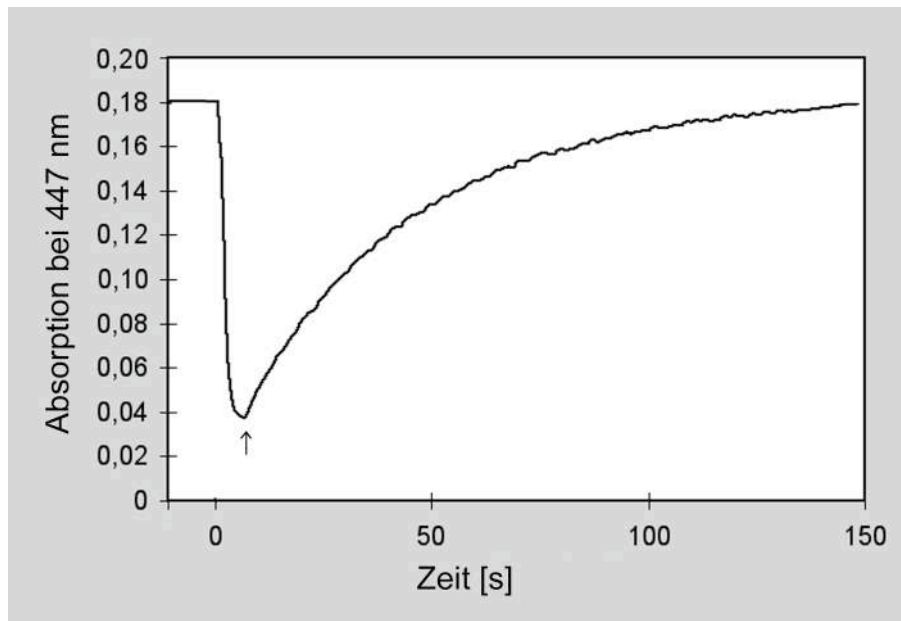
Lichtinduzierte Änderungen waren auch im Absorptionsspektrum in zeitaufgelöster UV-VIS-Spektrometrie zu beobachten. Es wurde einem starken Weißlichtblitz (40000–45000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) folgend, eine Serie von Absorptionsspektren in regelmäßigen Abständen – im Millisekunden- bis Sekundenbereich – aufgenommen. Zunächst war eine Ausbleichreaktion zu erkennen (siehe Abbildung 24), die in Folge durch die Abnahme der dreigipfligen Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich bis zu einem Minimalwert deutlich wurde. Auch im UV-A-Bereich lösten sich die beiden Maxima bei 361 und 371 nm für LOV1 bzw. 378 nm bei LOV2 in ein einziges Hauptmaximum bei 380 bis 385 nm auf. Dieses Photobleichen war bei LOV2 insgesamt stärker ausgeprägt. Besonders auffällig war dabei bei beiden LOV-Domänen die Formation dreier isosbestischer Punkte (Pfeile) bei 331, 380 (LOV1) bzw. 385 (LOV2) und 407 nm.



**Abbildung 24: Absorptionsänderung der heterolog exprimierten CBP-LOV-Domänen aus Haferphototropin während der lichtinduzierten Ausbleichreaktion.**

Von den CBP-LOV-Fusionsproteinen (in Hochsalz-Elutionspuffer, pH 8,0) wurde nach Belichtung (Weißlichtblitz mit  $40000\text{--}45000\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) eine Serie von Absorptionsspektren aufgenommen. Abgebildet ist, ausgehend vom hellgrau markierten Spektrum, die Ausbleichreaktion, die bei LOV1 weniger stark als bei LOV2 ausgeprägt war und vergleichsweise langsamer ablief.

In LOV1 erreichte die Ausbleichreaktion nach 14,7 Sekunden ihr Maximum, hingegen bei LOV2 wurde bereits nach 9,45 Sekunden kein weiteres Photoausbleichen mehr festgestellt. Bei fortlaufender Dunkelinkubation regenerierte das Photosystem wieder zu den spektralen Eigenschaften des Ausgangszustands. Dies veranschaulicht die Trendlinie der Absorption bei 447 nm während der Photoreaktion, die am Beispiel von LOV2 in Abbildung 25 gezeigt ist.



**Abbildung 25: Die Stärke der Absorption bei 447 nm während der LOV2-Photoreaktion.**

Nach einem Weißlichtblitz ( $40000\text{--}45000\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) zum Zeitpunkt 0 Sekunden fällt in einer LOV2-Proteinlösung die Absorption bei 447 nm innerhalb von 9,45 Sekunden auf ein Minimum ab. Daraufhin regeneriert das ausgebleichene Photosystem mit einer Halbwertszeit von 25,5 Sekunden wieder in den Ausgangszustand zurück.

Die Halbwertszeit der Rückreaktion betrug bei LOV1 11,3 Sekunden und bei LOV2 25,5 s. Dies bedeutet, daß LOV2 zwar schneller und stärker ausgebleichen werden konnte als LOV1, jedoch eine weitaus längere Regenerationszeit aufwies. Die Photoreaktion bei beiden Domänen zeigte sich vollständig reversibel und jederzeit erneut auslösbar. Sie konnte auch durch Bestrahlung mit Blau- oder UV-A-Licht hervorgerufen werden, nicht jedoch mit Rotlicht. Da aber die Lichtflußrate der jeweils verwendeten UV-A-/Blau-lichtquellen deutlich geringer war als die des Weißlichtblitzes, war auch die induzierte Ausbleichreaktion weniger drastisch bzw. quantitativ. Auf Eis erfolgte die lichtinduzierte Ausbleichreaktion in ähnlicher Geschwindigkeit, jedoch war die Dunkelregeneration stark verlangsamt (Daten nicht gezeigt).

Die Kinetik der Photoproduktbildung und der Regeneration bei Raumtemperatur wurde über die lichtinduzierte Absorptionsänderung bei 449 nm bei LOV1 und 447 nm bei LOV2, dem jeweiligen Hauptmaximum der dreigipfligen Feinstruktur, bestimmt: Der Logarithmus des Verhältnisses von noch nicht reagiertem Flavoprotein zu gebildetem Photoprodukt bildet in Abhängigkeit von der Zeit eine Gerade. Ebenso erfolgt die Regeneration der ausgebleichenen LOV-Domänen, ausgedrückt über den Logarithmus des Verhältnisses der maximalen Photoproduktmenge zu noch vorhandenem Photoprodukt in Abhängigkeit von der Zeit, linear. Beide Prozesse stellen photochemisch eine Reaktion erster Ordnung dar. Das bedeutet, daß kein zusätzlicher Partner, außer dem LOV-Protein und FMN, am Photozyklus der LOV-Domänen beteiligt ist.

### **4.3.2 Generierung von LOV2-Punktmutationen**

Die isolierten CBP-LOV-Domänen stellen, wie vorangehend demonstriert, ein ideales System dar, um die spektralen und photochemischen Eigenschaften *in vitro* zu untersuchen. Um nun Positionen und Aminosäuren ausfindig zu machen, die zum einen an der Chromophorbindung beteiligt sind, aber zum anderen auch Einfluß auf die Photoaktivität zeigen, wurden CBP-LOV2-Punktmutanten generiert. Um dafür in Frage kommende Aminosäuren vorab zu ermitteln, wurden einerseits die Aminosäuresequenzen der LOV-Domänen untereinander bzw. im Vergleich mit den PAS-Domänen betrachtet, andererseits wurde über Molekülmodelle die Proteinstruktur der LOV-Domänen simuliert. Durch zielgerichtete *in vitro* Mutagenese galt es diese Aminosäuren auszutauschen und damit deren tatsächliche Auswirkungen auf die Eigenschaften der LOV2-Domäne festzustellen.

#### **4.3.2.1 Sequenzanalyse der LOV-Domänen**

Innerhalb der PAS-Domänen zeigen die LOV-Domänen untereinander besonders große Ähnlichkeit. Vergleicht man die Sequenzen der LOV-Domänen von Phototropin aus Hafer, *Arabidopsis thaliana*, Reis, Mais, Erbse und *Adiantum capillus-veneris*, finden sich im hohen Maße konservierte Bereiche, in denen die einzelnen Aminosäuren zueinander homolog oder identisch sind (siehe Abbildung 26). Die Numerierung der Aminosäuren bezieht sich auf die 109 Aminosäuren innerhalb der LOV-Domänen und ist unabhängig von den jeweiligen Positionen im Vollängenprotein (siehe auch Anhang). Besonders auffallend ist das nahezu identische Motiv GRNCRFLQG (Aminosäuren 36- 44), das auch in weiten Bereichen anderer LOV-PAS-Domänen konserviert ist (siehe Abbildung 22). Lediglich das Arginin an Position 37 bildet in PHY3 eine Ausnahme. Interessanterweise findet sich ein Cystein mit Position 39 inmitten dieser Sequenz. Gerade ein Cystein spielt beispielsweise bei der Chromophorbindung in Phytochrom über eine Thioesterbrücke eine zentrale Rolle. Im Gegensatz zur LOV2-Domäne ist ein weiteres Cystein in der LOV1-Domäne an Position 66 konserviert.

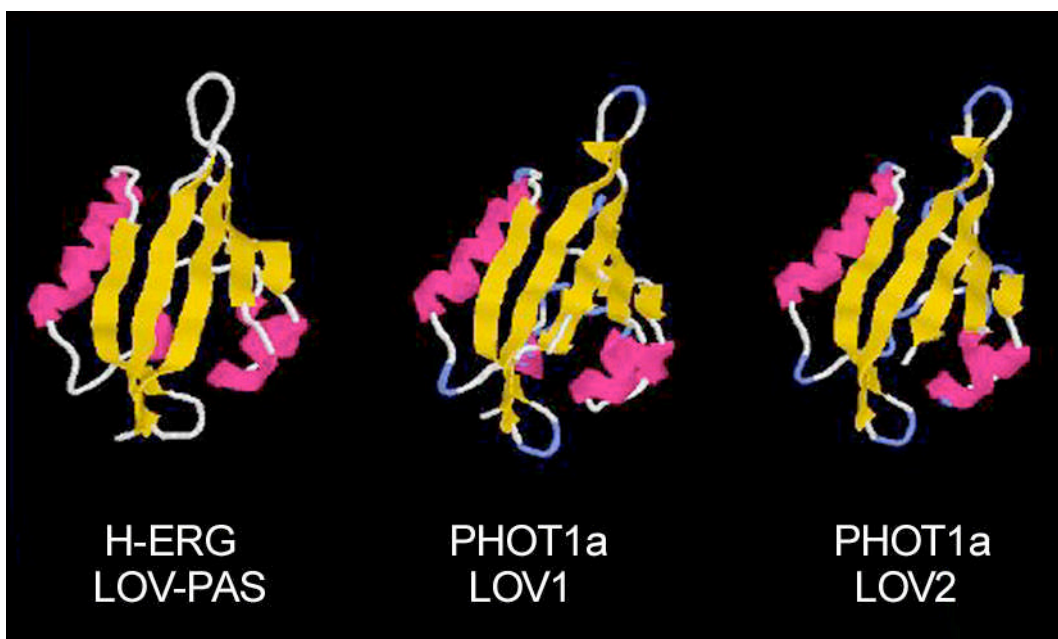




unpolare Glycin, hingegen steht an dieser Stelle in allen LOV2-Domänen die stark polare Aminosäure Glutamat. Gerade diese Stellen sind besonders interessant, um herauszufinden, ob die Unterschiede zwischen LOV1 und LOV2, die sich vor allem in den Fluoreszenzspektren zeigen, auch in unterschiedlicher Chromophorbinding liegen.

#### 4.3.2.2 Die Struktur der LOV-Domänen im Molekülmodell

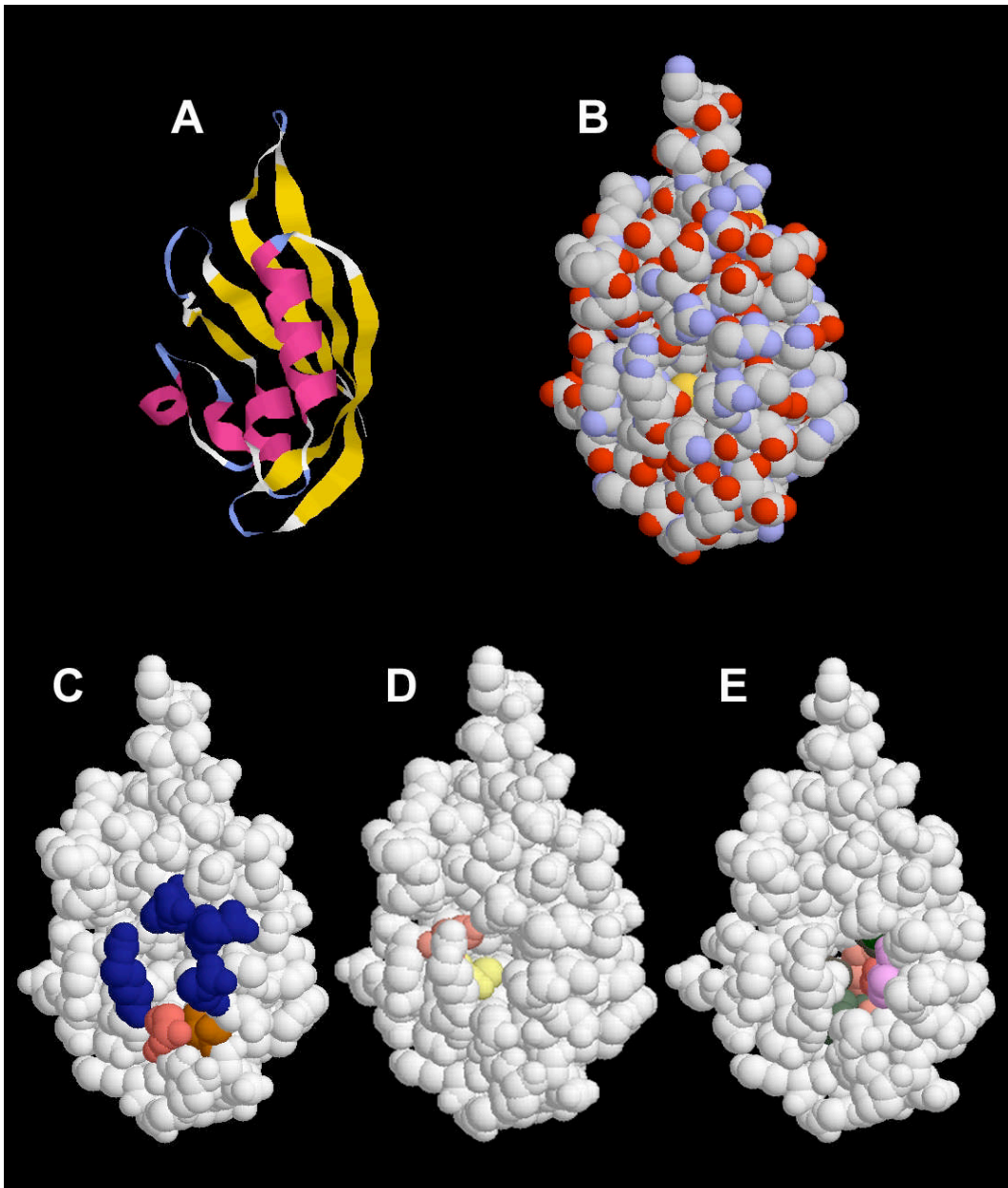
Eine zusätzliche Möglichkeit, Aminosäuren zu ermitteln, die möglicherweise an der Chromophorbinding in den Phototropin-LOV-Domänen beteiligt sind, bietet die Betrachtung der LOV-Domänenstruktur anhand von Molekülmodellen. Zum Zeitpunkt dieser Studien existierte noch keine Kristallstruktur einer Phototropin-LOV-Domäne, jedoch waren von einigen anderen LOV-PAS-Domänen Röntgenkristallstrukturen jüngst veröffentlicht worden. Darunter wurde die, mit etwa 30 % zu LOV1 und LOV2 am höchsten identische LOV-PAS-Domänen aus H-ERG, dem spannungsgesteuerten, menschlichen Kaliumkanalprotein (Cabral *et al.*, 1998; SWISS-PROT-Zugangsnummer 1BYWA), ausgewählt, um als Matrize für die Molekülstruktur der LOV-Domänen aus Hafer zu dienen. Durchgeführt wurden diese Strukturberechnungen auf dem Server SWISS-MODEL 3.5 (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>; Peitsch, 1995 und 1996; Guex & Peitsch, 1997). Die Richtigkeit dieser Berechnungen bestätigte sich im nachhinein an der inzwischen veröffentlichten Röntgenkristallstruktur der rekombinanten LOV2-Domäne von phy3 (Crosson & Moffat, 2001). Die berechneten Daten wurden mit dem Programm Rasmac 2.6 graphisch dargestellt. In Abbildung 27 sind die berechneten dreidimensionalen Modelle für LOV1 und LOV2 neben der Kristallstruktur von H-ERG abgebildet.



**Abbildung 27: Dreidimensionale Molekülmodelle von H-ERG, LOV1 und LOV2.**  
Basierend auf der Kristallstruktur der LOV-PAS-Domäne von H-ERG (links) wurde über

SWISS-MODEL die Molekülstruktur für LOV1 (Mitte) und LOV2 (rechts) aus Haferphototropin berechnet und mit dem Programm Rasmac dargestellt. Charakteristisch bei den untereinander sehr ähnlichen Strukturen sind fünf  $\beta$ -Faltblätter neben zwei  $\alpha$ -Helices.

Die beiden LOV-Domänen weisen sehr große Ähnlichkeit mit H-ERG auf. Allen gemeinsam sind fünf  $\beta$ -Faltblattstrukturen und zwei  $\alpha$ -Helices. In einer raumfüllenden Darstellungsoption, wie in Abbildung 28B am Beispiel der LOV2-Domäne gezeigt wird, fällt eine „Höhle“ oder Proteintasche inmitten des Moleküls auf. Den Höhleneingang stellen stark polare, basische Aminosäuren, vor allem Arginin, dar (siehe Abbildung 28C). In ihren Verlauf ins Molekülinnere knickt die Höhle stark nach links ab. In diesem Linksknick selbst ist ein Cystein herausragend lokalisiert, das links benachbart zu dem polaren, aber neutralen Asparagin steht (siehe Abbildung 28D). Die von der Fläche größere rechte Innenseite (Abbildung 28E) setzt sich ausschließlich aus neutralen Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin, Valin und Phenylalanin zusammen. Im Höhlenende, das nicht mehr sinnvoll abgebildet werden kann, finden sich Asparagine. Koordiniert man diese Höhle mit den hochkonservierten Motiven in den LOV-Domänen, ist festzustellen, daß das GRNCRFLQG- und das KIR-Motiv (siehe 4.3.2.1) maßgeblich an der Proteintaschenbildung beteiligt sind. Hingegen sind die anderen konservierten Motive entweder völlig im Molekül verborgen (FIG) oder an der Oberfläche (FWNL) zu finden.



**Abbildung 28: Die LOV2-Domäne aus Haferphototropin, dargestellt in verschiedenen dreidimensionalen Molekülmodellen.**

Die auf H-ERG basierende Molekülstruktur von *As*-PHOT1a-LOV2 entspricht unter **A** der Abbildung 1 (rechts), wurde aber um 90° um die senkrechte Achse nach links gedreht. Diese Position wird bei Darstellung **B** bis **E** beibehalten. **B** stellt das Kalottenmodell der LOV2-Domäne dar, worin bereits deutlich wird, daß inmitten dieses Moleküls eine „Höhle“ existiert, in deren zentralster Stelle das Cystein (Aminosäure bzw. AS 39) positioniert ist. **C**: Am Eingang dieser, im inneren nach links abknickenden Höhle finden sich vor allem polare Aminosäuren wie Arginine (blau, AS 40, 49, 53 und 56), Glutamin (hellrot, AS 43) und Threonin (braun, AS 47). **D**: Im Linksknick der Höhle ragt ein Cystein (gelb, AS 39) mitten in die Höhle und an dessen Basis findet sich das polare Asparagin (rosa, AS 38). **E**: Auf der großflächigen rechten Innenseite sind ausschließlich neutrale Aminosäuren vertreten: farbig hervorgehoben sind Leucin (AS 26, 42 und 69), Isoleucin (AS 55), Valin (AS 52) sowie Phenylalanin (AS 23 und 83). Im nicht abgebildeten Höhleninneren finden sich drei Asparagine an Position 3, 71 und 81.

Vergleicht man die Struktur der LOV2-Domäne mit LOV1, ist zum einen das Cystein 39 bei LOV1 näher am Höhleneingang positioniert, zum anderen existiert in LOV1 ein weiteres

Cystein (Position 66), das allerdings nicht in der Proteintasche, sondern weitab, frei exponiert an der Moleküloberfläche zu finden ist. Das GRNCRFLQG-Motiv selbst ist jedoch gleichermaßen in beiden LOV-Domänen räumlich im Bereich der Proteinhöhle lokalisiert.

### 4.3.2.3 Zielgerichtete *in vitro* Mutagenese in LOV2

In Kooperation mit dem Labor von Winslow Briggs wurden Mutationen in der LOV1-Domäne von John Christie und die LOV2-Punktmutationen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Aus beiden vorangegangenen Analysen stellten folgende Aminosäuren für einen Austausch via Punktmutation in CBP-LOV2 vielversprechende Ansatzpunkte dar (Numerierung und Lokalisation siehe auch Anhang bzw. Abbildung 28): die hochkonservierten Aminosäuren Arginin (Aminosäure 40) und Glutamin (AS 43), das sich auch an gleicher Position in H-ERG findet, sind im Molekülmodell im Eingangsbereich der Höhle lokalisiert worden. Aus dem Innenbereich der Höhle wurden die ebenso hochkonservierten Aminosäuren Asparagin (AS 38 und 81), Cystein (AS 39) und Phenylalanin (AS 23), sowie von den konservierten Aminosäuren an der Moleküloberfläche Tyrosin (AS 97) und Glycin (AS 100) ausgewählt.

Überdies galt es auch herauszufinden, ob allgemein hochkonservierte (z. B. Serin oder Tyrosin an Position 20 bzw. 29) oder auch nur in einer der LOV-Domänen Aminosäuren konservierte (z.B. Glutamat an Stelle 28), durch Mutation ausgetauscht, einen Einfluß auf die Chromophorbindung haben. Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die Positionen aller durchgeführten Punktmutationen mit den Eigenschaften der betroffenen Aminosäuren.

In der Regel wurden Einzelmutanten generiert. Die einzige Ausnahme bildet die Doppelmutante LOV2-S20T-F23Y, um den Verstärkungseffekt des konservativen Austausches an Position 20 durch eine weitere zusätzliche Veränderung in unmittelbarer Nähe zu untersuchen. Die Punktmutationen wurden nach dem Prinzip der „QuikChange Site-Directed Mutagenesis“ von Stratagene (siehe 3.3.3) zu angegebenen Standardbedingungen durchgeführt. Alle mutierten Plasmide wurden in kompetente *E.coli*-BL21(DE3)pLysS-Zellen transformiert. Die zur Mutations-PCR nötigen synthetischen Oligonukleotide wurden, wie in 3.3.3.1 beschrieben, konstruiert (siehe 2.2.2.2). Um eine erste Kontrollmöglichkeit für eine erfolgreiche Mutagenese zu haben, wurde dabei nach Möglichkeit mit der Änderung der Basenfolge, die zur gewünschten Mutation führt, auch gegebenenfalls vorhandene Restriktionsschnittstellen verändert oder neue geschaffen. Waren diese nach Mutation und Plasmidpräparation potentieller Mutanten bei der Kontrolle über einen Restriktionsverdau im Gegensatz zum Wildtyp verändert, war dies ein zeitsparender Vorabhinweis für eine erfolgreiche Mutation. So überprüft werden konnten die Mutationen LOV2-S20A, -F23Y, -S20T-F23Y, -E28G, -Y29F, -N38D, -C39A, -C39S, -Q43H, -N81I und -G100A. Nichtsdestotrotz wurde bei allen Mutationen eindeutig der Erfolg der Punktmutation nur über die Sequenzierung der Plasmid-DNS im Bereich der LOV2-Sequenz geklärt.

**Tabelle 11: Übersicht über die LOV2-Punktmutationen in Haferphototropin.**

Position innerhalb von LOV2	Aminosäure in der Wildtypsequenz	durch Mutation ausgetauschte Aminosäure	Grund
20	Serin	Alanin	hochkonservierte Position, konservativer Austausch
20	Serin	Phenylalanin	hochkonservierte Position, neutrales Serin wird gegen aromatische Aminosäure ausgetauscht analog zur WC-1 Blindmutante
23	Phenylalanin	Tyrosin	hochkonservierte Position, konservativer Austausch
20 23	Serin Phenylalanin	Threonin Tyrosin	Doppelmutante mit einem konservativen Austausch an Position 20 und einer Änderung von einer weniger zu einer stärker polaren aromatischen Aminosäure an Position 23
28	Glutamat	Glycin	In LOV2 wird das polare Glutamat gegen das in der LOV1-Domäne vorhandene unpolare Glycin ausgetauscht
29	Tyrosin	Phenylalanin	hochkonservierte Position, konservativer Austausch
38	Asparagin	Aspartat	hochkonservierte Höhlenposition, nichtkonservativer Austausch von neutralem Asparagin zu saurem Aspartat
39	Cystein	Alanin	hochkonservierte Höhlenposition, homologer Austausch
39	Cystein	Serin	hochkonservierte Höhlenposition, homologer Austausch
40	Arginin	Aspartat	hochkonservierte Höhlenposition, saures Aspartat ersetzt basisches Arginin
43	Glutamin	Histidin	hochkonservierte Höhlenposition, nichtkonservativer Austausch zu dem in H-ERG vorkommenden Histidin
81	Asparagin	Isoleucin	hochkonservierte Höhlenposition, nichtkonservativer Austausch analog zur WC-1 Blindmutante
97	Tyrosin	Lysin	Position an der Moleküloberfläche, Position der WC-1-Mutante; in LOV2 wird u. a. das aromatische Tyrosin gegen das in der LOV1-Domäne vorhandene polare Lysin ausgetauscht
97	Tyrosin	Methionin	
100	Glycin	Alanin	hochkonservierte Höhlenposition, konservativer Austausch

Insgesamt lag bei allen LOV2-Mutationen unter Einsatz der *pfu*-DNS-Polymerase die Erfolgsquote im ersten Mutationsanlauf unter 10 % (LOV2-S20A). Die noch fehlenden Mutationen (LOV2-S20F, -F23Y, -S20T-F23Y, -E28G, -Y29F, -N38D, -C39A, -C39S, -R40D, -Q43H, -N81I, -Y97K, -Y97M, und -G100A) konnten nach einem Umstieg auf die *pwo*-DNS-Polymerase in einem zweiten Anlauf zu 100 % generiert werden.

Beide DNS-Polymerasen haben Kontrollesektivität während der DNS-Amplifikation. Obwohl

bei allen Mutanten die LOV2-Sequenzen durch Sequenzierung überprüft worden waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, daß im übrigen Bereich des in der Mutations-PCR synthetisierten, restlichen pCal-n-EK-Plasmids mögliche Fehler vorhanden waren. Deshalb wurde über eine Miniinduktion (siehe 3.3.4) und Miniexpressionsanalyse (siehe 3.3.5.2) bei jeder Mutante getestet, ob in Coomassiefärbung alle heterolog exprimierten, mutierten CBP-LOV2-Proteine dieselbe Molekulargröße hatten wie das Wildtyp-CBP-LOV2-Protein. Dies war bei der Mutation LOV2-N81I nicht der Fall. Hier war das überexprimierte Protein etwa 10 kDa größer als erwartet, was möglicherweise an einem defekten Stop-Codon liegen könnte. Diese Mutation wurde neu generiert, und bei erneuter Expression zeigte das CBP-LOV2-Protein die erwartete Molekulargröße.

### **4.3.3 Charakterisierung der LOV2-Punktmutationen**

Um mögliche Auswirkungen durch Punktmutationen auf die Chromophorbinding in CBP-LOV2 zu studieren, wurde einerseits die Chromophorbinding quantifiziert und andererseits die spektralen Eigenschaften der Mutanten ermittelt.

#### **4.3.3.1 Biochemische Analyse der CBP-LOV2-Mutanten**

LOV2 und die LOV2-Mutanten wurden als CBP-Fusionsprotein jeweils in einer Großanzucht exprimiert (siehe 3.3.4). Dabei wurden die *E. coli*-Zellen bei einer  $OD_{580} \leq 0,3$  induziert und nach 4,5 h Wachstum im Dunkeln geerntet. Die danach sedimentierten Bakterienzellen waren bei CBP-LOV2 gelb gefärbt, was auf die FMN-Bindung von CBP-LOV2 zurückgeführt wurde. Bei einigen Mutanten war bereits ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Verhalten zu beobachten. Die Sedimente der LOV2-Mutanten S20F, S20T-F23Y und R40D wiesen bei der Ernte keinerlei Gelbfärbung auf, die Sedimente der Mutanten LOV2-F23Y, -N38D, -Q43H, und -N81I zeigten bereits, im Vergleich zu nichtinduzierten Zellen, eine zarte gelbliche Tönung und kontrastierend dazu war die Farbe der Sedimente der Mutanten LOV2-C39A und -C39S von intensivem Gelbgrün (siehe Tabelle 12). Ob insgesamt unterschiedliche Mengen Fusionsprotein exprimiert wurden, was eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Gelbfärbung darstellen könnte, war nur annähernd zu bestimmen: wie in einer Löslichkeitsanalyse (siehe 3.3.5.3) festgestellt, wurden bei dem Wildtyp CBP-LOV2-Protein heterolog nur 40 % löslich exprimiert. Deshalb konnte die Gesamtmenge lediglich als Coomassiebande im lysierten, ungereinigten Zellrohextrakt im Vergleich zu nichtinduzierten Zellen ermittelt werden (siehe 3.3.5.2). Es zeigte sich, daß die Expression des CBP-LOV2-Proteins beim Wildtyp und den meisten Mutanten in der Regel stark bis sehr stark und lediglich bei den Mutanten CBP-LOV2-E28G, -Y29F und -Y97K eine schwächere Expression zu verzeichnen war. In jedem Fall aber war bei den Mutanten, die bei der Ernte ein blaßgelbes bis ungefärbtes Bakteriensediment aufwiesen, keine geringere CBP-LOV2-

Proteinexpression zu verzeichnen. So schien bei diesen Mutanten weniger Chromophor FMN gebunden zu sein. Zur exakten Ermittlung wurde das Protein-Chromophor-Verhältnis des löslichen CBP-LOV2-Fusionsproteins im Zellysat bei jeder Mutante, nach Affinitätsreinigung über Calmodulin, bestimmt. Von zwei gleichen Proben wurde in der ersten Probe die Proteinkonzentration ermittelt. Die zweite Probe wurde mittels SDS denaturiert und die Menge des dadurch gelösten und nun freien FMN bestimmt (siehe 3.2.12 und Tabelle 12). Für die LOV1- und die LOV2-Domäne war jeweils ein 1 : 1-Verhältnis von Protein und FMN ermittelt worden (Christie *et al.*, 1999). In der Bestimmung des Protein-Chromophor-Verhältnisses zeigte sich nun, daß im Vergleich zum CBP-LOV2-Wildtyp bei den Mutanten CBP-LOV2-S20F, -S20T-F23Y und -R40D mehr als 96 % Reduktion und somit ein nahezu vollständiger Verlust des Chromophors vorlag. Dies entsprach demnach tatsächlich der fehlenden Gelbfärbung des Bakteriensedimentes.

**Tabelle 12: Biochemische Charakterisierung der heterologen Expression von LOV2 und LOV2-Punktmutanten als CBP-Fusionsproteine.**

CBP-Fusionsprotein	Farbe der sedimentierten Zellen	exprimierte Proteinmenge	Fusionsprotein unlöslich:löslich	Reduktion der Flavinbindung [%]
LOV2-Wildtyp	gelb	stark	60 : 40	keine
LOV2-S20A	gelb	stark	70 : 30	11,0
LOV2-S20F	weiß	stark	95 : 5	98,5
LOV2-F23Y	hellgelb	stark	80 : 20	70,0
LOV2-S20T-F23Y	weiß	stark	70 : 30	96,7
LOV2-E28G	gelb	schwach	10 : 90	keine
LOV2-Y29F	gelb	schwach	10 : 90	keine
LOV2-N38D	hellgelb	stark	80 : 20	87,5
LOV2-C39A	intensiv	sehr stark	60 : 40	33,3
LOV2-C39S	grüngelb	stark	80 : 20	55,6
LOV2-R40D	weiß	stark	60 : 40	96,7
LOV2-Q43H	hellgelb	stark	35 : 65	66,6
LOV2-N81I	hellgelb	stark	80 : 20	63,0
LOV2-Y97K	gelb	schwach	80 : 20	keine
LOV2-Y97M	gelb	sehr stark	70 : 30	keine
LOV2-G100A	gelb	stark	60 : 40	2,3

Bei allen drei Mutationen waren hochkonservierte Aminosäure/-n betroffen (siehe 4.3.2.3), die somit alle starken Einfluß auf die Chromophorbindung haben. Weniger starke Reduktion in der Chromophorbindung zeigen die Mutationen, die eine hellgelbe Färbung der Bakterienzellen aufweisen: bei LOV2-F23Y, -N38D, Q43H und -N81I wurde eine Minimierung um 60 bis 90 % festgestellt. Eine geringfügige Chromophorreduktion bis 11 % bei CBP-LOV2-E28G, -Y29F, -Y97K, -Y97M und -G100A läßt auch in der Sedimentfärbung keinen Unterschied zum Wildtyp erkennen. Zum einen konnten hierdurch Aminosäuren bzw. Positionen in LOV2 ermittelt werden, die zu einer reduzierten FMN-Bindung beitragen. Andererseits stellt sich nun die Frage, ob diese Aminosäureaustausche „nur“ eine reduzierte Chromophorbindung verursachen oder auch zusätzlich eine veränderte Photoreaktion zur Folge haben. Von besonderem Interesse sind demnach Mutationen, die kaum Chromophorreduktion, aber eine veränderte Photochemie bewirken. Dies wird im nachfolgenden Kapitel durch spektrale Analyse geklärt werden. Vorab jedoch konnte bereits eine Besonderheit bei den Mutanten CBP-LOV2-C39A und CBP-LOV2-C39S beobachtet werden: obwohl bei diesen Mutationen 33 bis 56 % weniger FMN als im Wildtyp gebunden wurde, zeigte bereits das Bakteriensediment eine außerordentlich starke Gelbfärbung. Auch das gereinigte, lösliche Fusionsprotein leuchtete intensiv gelbgrün bereits bei einer so niedrigen Proteinkonzentration, bei der das gereinigte Wildtyp-LOV2-Protein mit bloßem Auge gerade als hellgelbe Tönung erkennbar war.

Überdies bestanden außerordentliche Unterschiede bei der Löslichkeit der einzelnen Mutanten. Über eine Löslichkeitsanalyse (siehe 3.3.5.3) wurden die jeweiligen Anteile der CBP-LOV2-Proteine im Coomassiegel bestimmt (Tabelle 12).

Generell ist bei vielen Mutanten die Löslichkeit gegenüber dem Wildtyp herabgesetzt, wobei jedoch die Mutante LOV2-S20F herausragend hohe Anteile an unlöslichem exprimiertem Fusionsprotein mit 95 % aufwies, ebenso konnten jedoch auch bei LOV2-E28G und LOV2-Y29F besonders hohe lösliche Anteile (90 %) verzeichnet werden. Dies war von Vorteil, da bei beiden letzteren die Expression vergleichsweise geringer war.

Ob eine schlechtere Löslichkeit und geringere Expressionsraten mit einer möglichen gesteigerten Photoaktivität zusammenhängen, muß über die spektralen Eigenschaften untersucht werden.

### 4.3.3.2 Spektrale Charakterisierung

Durch die spektrale Analyse der Mutanten, die dazu noch ausreichend Chromophor gebunden haben, galt es herauszufinden, welche Aminosäuresubstitutionen in einer veränderten Photoaktivität der LOV2-Domäne resultieren. Nicht analysiert werden konnten die LOV2-Mutanten S20F, S20T-F23Y und R40D, da durch den nahezu vollständigen

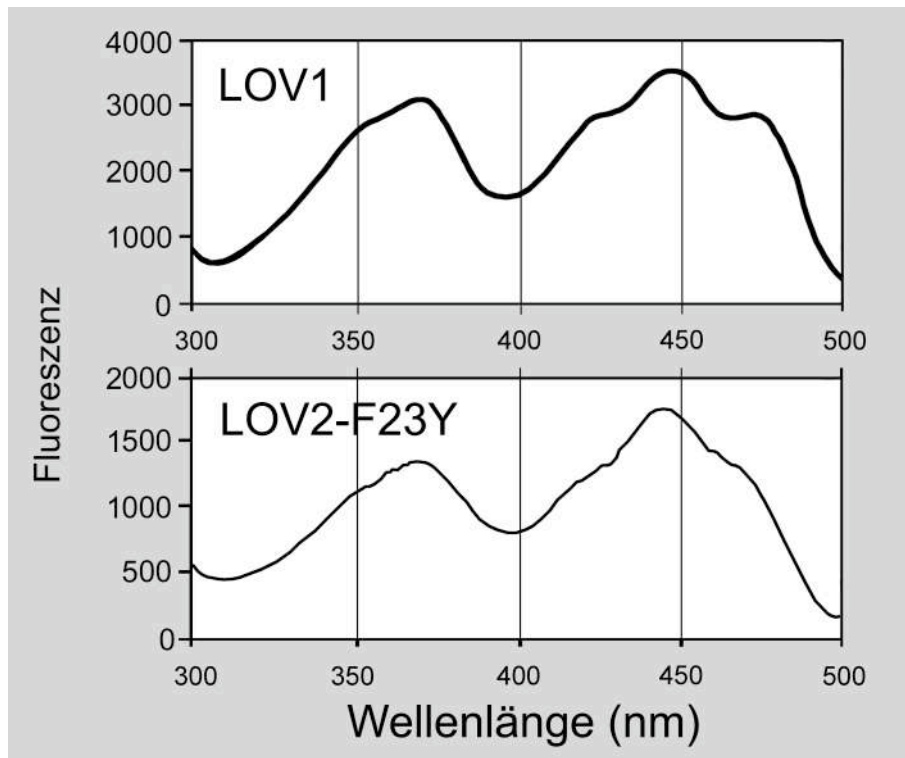


Verlust des Chromophors lediglich die viel stärkeren Proteinsignale meßbar waren.

Wurde zunächst jeweils das Absorptionsspektrum der einzelnen übrigen Mutanten aufgenommen, stimmten diese in der Regel mit dem Absorptionsspektrum des LOV2-Wildtyps (siehe 4.3.1, Abbildung 21) überein: reduziertes Doppelmaximum im UV-A-Bereich und die dreigipflige Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich mit Hauptmaximum bei 446 bis 447 nm (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnten die UV-A-Hauptmaxima bei LOV2-C39A, -C39S und -Q43H tendenziell eher den Maxima von LOV1 anhand ihrer Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen zugeordnet werden. Bezüglich der gleichen Maxima müssen auch LOV2-N38D und -F23Y zwischen die Wildtypspektren von LOV1 und LOV2 eingeordnet werden (Daten nicht gezeigt)

Zur Erstellung eines Fluoreszenzanregungsspektrums wurde üblicherweise im Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm bei einer Spaltbreite von 10 nm mit einer Geschwindigkeit von  $1200 \text{ nm min}^{-1}$  gemessen. Dazu wurden die CBP-LOV2-Fusionsproteine in einer Menge von 1,6 bis 1,9  $\mu\text{M}$  (entsprechen einer Konzentration  $40\text{--}50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) eingesetzt. Bei den Mutanten CBP-LOV2-S20A, -E28G, Y29F, -N81I, Y97K, -Y97M und -G100A konnte keinerlei Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Erstellte man ein Fluoreszenzanregungsspektrum einer Mutante mit stärkerer Chromophorreduktion (siehe 4.3.3.1), verzeichnete man im Vergleich mit dem Wildtyp weitaus geringere Fluoreszenz über das gesamte Spektrum. Darüber hinaus ähnelte die Kurve bei CBP-LOV2-F23Y, -N38D und -Q43H stark der von LOV1, wie repräsentativ am Beispiel CBP-LOV2-F23Y in Abbildung 29 gezeigt wird.

Bei einem Vergleich beider Spektren fiel jedoch auf, daß das Hauptmaximum der dreigipfligen Feinstruktur bei allen Mutanten, im Unterschied zu LOV1, dem LOV2 Maximum entsprach und zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben war. Ebenso waren die Maxima selbst weniger stark ausgeprägt.

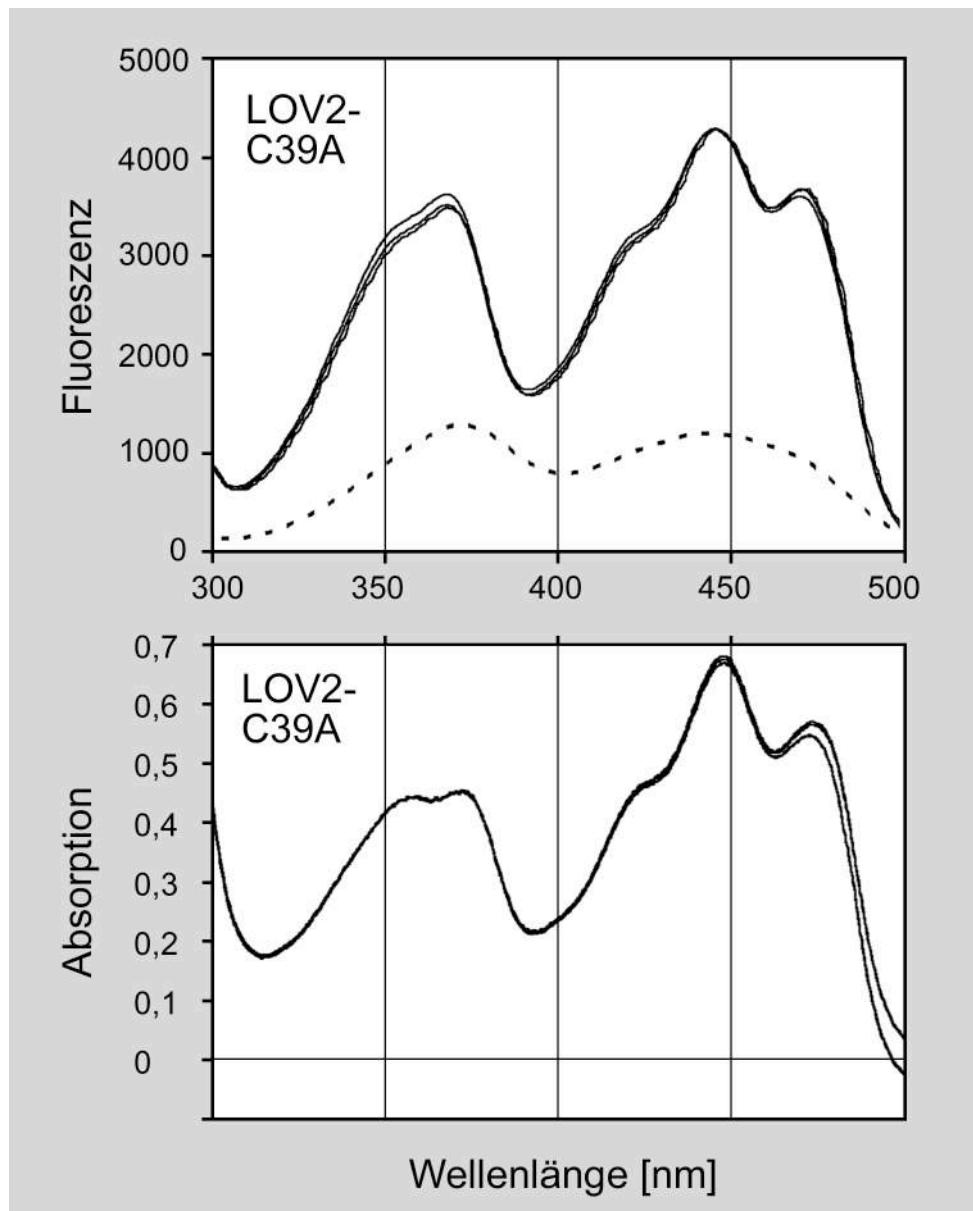


**Abbildung 29: Fluoreszenzanregungsspektren der CBP-Fusionsproteine LOV1 und LOV2-F23Y.**

Gemessen wurden die Fusionsproteine in Hochsalz-Elutionspuffer (pH 8,0) bei einer konstanten Emission von 530 nm über den Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm bei einer Spaltbreite von 10 nm und einer Geschwindigkeit von  $1200 \text{ nm min}^{-1}$ . Die Mutante CBP-LOV2-F23Y ist von der Kurvenform mehr dem Spektrum von LOV1 als dem von LOV2 zuzuordnen. Obwohl die Proteinmenge bei CBP-LOV1 ( $1,66 \mu\text{M}$ ) und CBP-LOV2-F23Y ( $1,71 \mu\text{M}$ ) annähernd gleich war, wies die Mutante 30 % weniger Fluoreszenz auf.

Deutlich abweichende Fluoreszenzintensitäten wiesen die beiden Mutanten CBP-LOV2-C39A und -C39S auf. Wurden diese jeweils in einer Proteinmenge von 1,6 bis  $1,9 \mu\text{M}$  zur Messung eingesetzt, konnten zunächst keine Fluoreszenzanregungsspektren gemessen werden, da im Bereich der LOV2-Maxima sämtliche Meßwerte oberhalb des meßbaren Bereichs lagen. Erst nach vier- bis fünffacher Verdünnung (Endkonzentration  $0,35 \mu\text{M}$ ) der Probe zeigten die Fluoreszenzanregungsspektren ebenfalls den charakteristischen Kurvenverlauf von CBP-LOV1. Bei den langsameren Meßgeschwindigkeiten  $240$  und  $60 \text{ nm min}^{-1}$  wurden nicht niedrigere Fluoreszenzwerte, wie es bei analogen Messungen von CBP-LOV1, CBP-LOV2 und allen anderen, chromophorbindenden Mutanten auftrat, verzeichnet. Vielmehr blieb die lichtinduzierte Fluoreszenz unverändert hoch (siehe Abbildung 30). Wurde der Chromophor durch SDS-Denaturierung aus seiner Proteinumgebung herausgelöst, zeigte sich deutlich, daß im Vergleich zum Wildtyp wesentlich geringere Mengen FMN die Fluoreszenz bewirkten. Somit wurde in diesen Mutanten die Fluoreszenz von gebundenem FMN durch die Proteinumgebung sehr viel schlechter unterdrückt. Folglich wurde der Großteil der im Fluoreszenzanregungsspektrum applizierten Lichtenergie über eine drastisch erhöhte Fluoreszenz wieder abgegeben und

nicht in einer Photoreaktion umgesetzt.



**Abbildung 30: Spektrale Analyse der Mutante CBP-LOV2-C39A**

Im **Fluoreszenzspektrum** (oben) sind die einzelnen Anregungsspektren, gemessen bei einer Emission von 530 nm, einer Spaltbreite von 10 nm, aber jeweils unterschiedlichen „Scan“-Geschwindigkeiten von 1200, 240 und 60 nm min<sup>-1</sup>, die auf die Photoproduktbildung jedoch keinen Einfluß zeigen, angegeben. Die eingesetzte Proteinmenge (in Hochsalz-Elutionspuffer, pH 8,0) betrug 0,35 µM. Nach der Messung wurde die Probe mit 0,1 % (w/v) SDS denaturiert. Die gemessene Fluoreszenzanregung des freien Chromophors lag deutlich unter der Anregungskurve des Pigment-Protein-Komplexes. Zur Ermittlung der lichtvermittelten **Absorptionsänderung** (unten) wurde von 49,3 µM Protein nach Belichtung (Weißlichtblitz mit 40000–45000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) im Abstand von 0,5 Sekunden jeweils ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Dabei waren keine Unterschiede festzustellen.

Analog zum Wildtyp (siehe 4.3.1) durchgeführte zeitaufgelöste Messungen der Absorptionsspektren ließen keine Änderung nach einem applizierten Lichtblitz erkennen

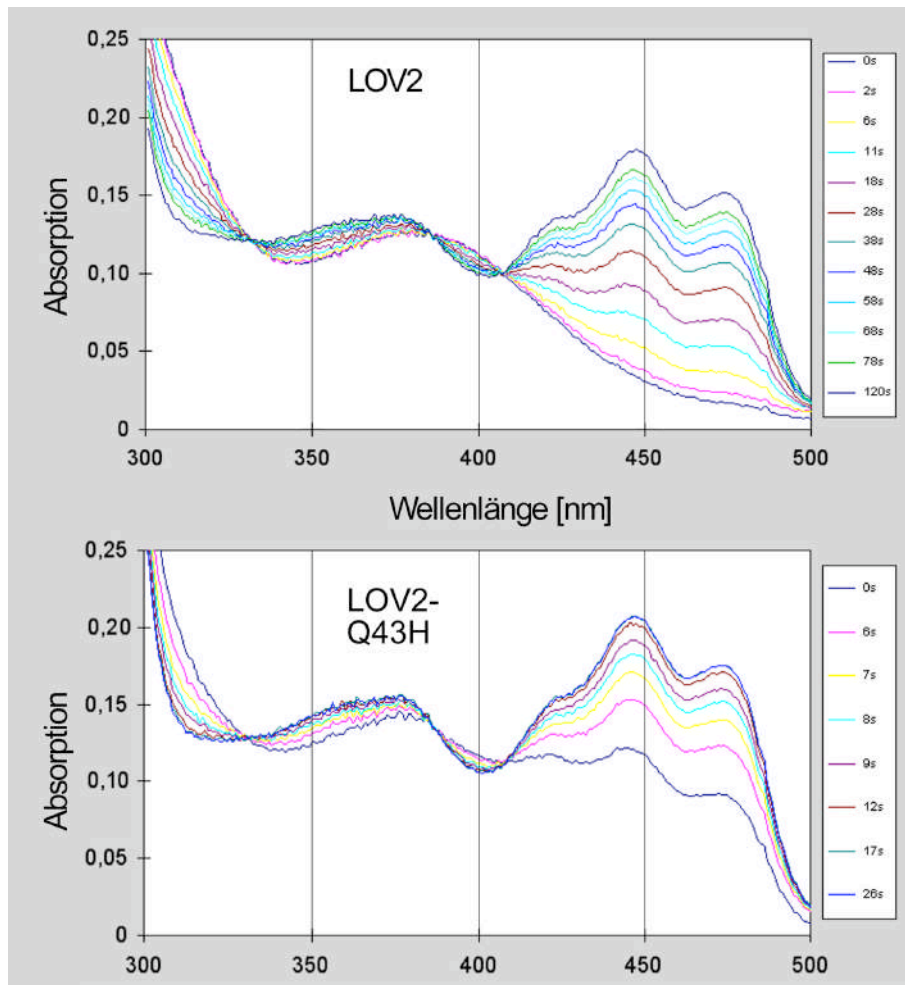
(siehe Abbildung 30). Weder CBP-LOV2-C39A noch -C39S durchliefen einen Photozyklus, der, wie bei Wildtyp-LOV1 und –LOV2, aus einer lichtinduzierten Bleichreaktion und anschließenden Dunkelregeneration in den Ausgangszustand anhand von Änderungen in den zugehörigen Absorptionsspektren zu verfolgen war. Das Cystein an Position 39 spielt demnach eine zentrale Rolle bei der Photoproduktbildung und nach Austausch gegen Serin oder Alanin kann kein Photoprodukt mehr gebildet werden.

Der Hauptteil der übrigen chromophorbindingen LOV2-Mutanten zeigte in zeitaufgelöster Absorptionsmessung meist große Ähnlichkeit mit dem entsprechenden Wildtyp (siehe Abbildung 24), jedoch waren auch wenige interessante Mischformen zu beobachten (siehe Tabelle 13:

**Tabelle 13: Überblick über die zeitlichen Veränderungen bei der Photoreaktion durch einige Mutationen.**

	Ausbleichreaktion maximal nach	Halbwertszeit der Regeneration	Form des Spektrums
LOV1	14,7 s	11,3 s	LOV1
LOV2	9,45 s	25,5 s	LOV2
LOV2-N81I	7,60 s	10,4 s	LOV2
LOV2-Q43H	9,45 s	4,8 s	LOV1

Eine Sonderstellung nahm die Mutante LOV2-N81I ein, bei der die lichtinduzierte Ausbleichreaktion mit 7,6 Sekunden schneller als im LOV2-Wildtyp erfolgte, das Absorptionsspektrum aber dennoch bei maximal gebildetem Photoprodukt dem LOV2-Wildtyp glich. Die Halbwertszeit der Regeneration von 10,4 Sekunden war hingegen mehr als die Hälfte niedriger als im Wildtyp und sogar noch niedriger als bei LOV1. Tendenziell stellt dieser Photozyklus eine Mischform zwischen LOV1 und LOV2 dar. Ein außergewöhnliches Verhalten wies auch die Mutante LOV2-Q43H auf (siehe Abbildung 31). Die Form des Absorptionsspektrums konnte anhand der Verschiebung der Maxima zu kürzeren Wellenlängen LOV1 zugeordnet werden, die maximale lichtinduzierte Ausbleichreaktion, die nach der Intensität von LOV1 erfolgte, fand jedoch in derselben Zeit wie bei dem LOV2-Wildtyp statt und das Photoprodukt zeigte mit einer Halbwertszeit von 4,8 Sekunden die schnellste Regeneration insgesamt – fünffach schneller als der LOV2-Wildtyp und zweifach schneller als LOV1.



**Abbildung 31: Regeneration des Photoprodukts von LOV2 und LOV2-Q43H.**

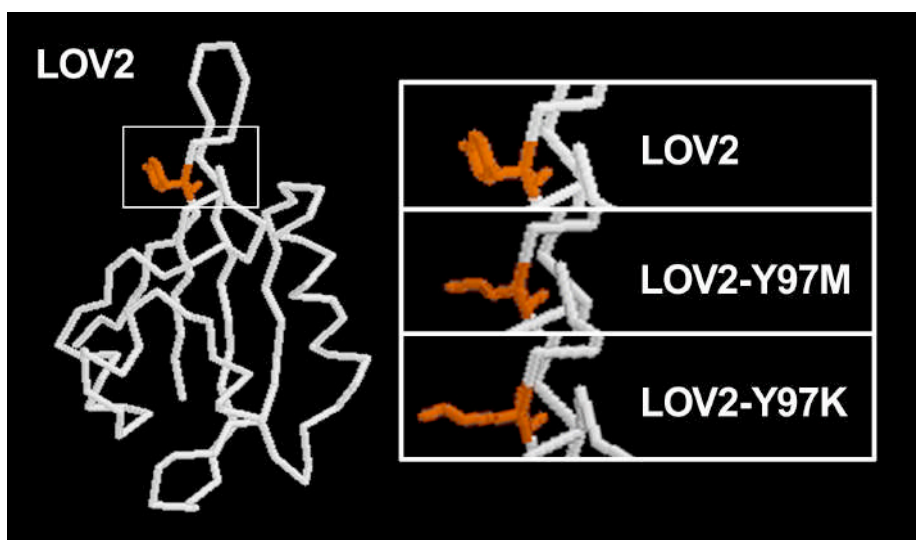
Die CBP-Fusionsproteine (in Hochsalz-Elutionspuffer, pH 8,0) wurden jeweils durch einen Weißlichtblitz mit  $40000\text{--}45000\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  maximal ausgeblencht. Von diesem Absorptionsspektrum ausgehend (Zeitpunkt null Sekunden) regenerierte das Photoprodukt kontinuierlich. Dabei wurden Absorptionsspektren in Serie aufgenommen, bis der Ausgangszustand wieder erreicht war.

#### 4.3.3.3 Simulation der Mutanten im Molekülmodell

Mögliche Effekte der Mutationen auf die Molekülstruktur wurden anhand von Molekülmodellen simuliert. Daß diese berechneten Modelle korrekt waren, zeigt die jüngst veröffentlichte Röntgenkristallstruktur der rekombinanten LOV2-Domäne aus phy3 (Crosson & Moffat, 2001), zum Zeitpunkt der Simulation jedoch wurde die PAS-Domäne H-ERG als Matrize verwendet, um weitere Erklärungsmöglichkeiten zur Lage und Bindung des Chromophors sowie zur Photoreaktion selbst zu liefern.

Zunächst wurden die Mutationen betrachtet, die sich biochemisch und photochemisch wie der LOV2-Wildtyp verhielten. Dies traf auf die Mutanten CBP-LOV2-Y97K, -Y97M und -G100A zu. Dabei zeigte die Natur des durch die Mutation neu eingeführten Rests keinen Einfluß auf die spektralen Eigenschaften: wenn auch bei LOV2-G100A der

Aminosäureaustausch strikt konservativ war, wurde doch das aromatische Tyrosin 97 einmal gegen das polare Lysin, anderenfalls gegen das neutrale Methionin ersetzt. Alle betroffenen Aminosäuren konnten im dreidimensionalen Modell der Moleküloberfläche lokalisiert werden, wobei die Reste jeweils vom Molekül weg gerichtet sind und offenbar in keiner Weise mit dem Chromophor wechselwirken. Dies ist in Abbildung 32 repräsentativ am Beispiel des Tyrosins 97 gezeigt.



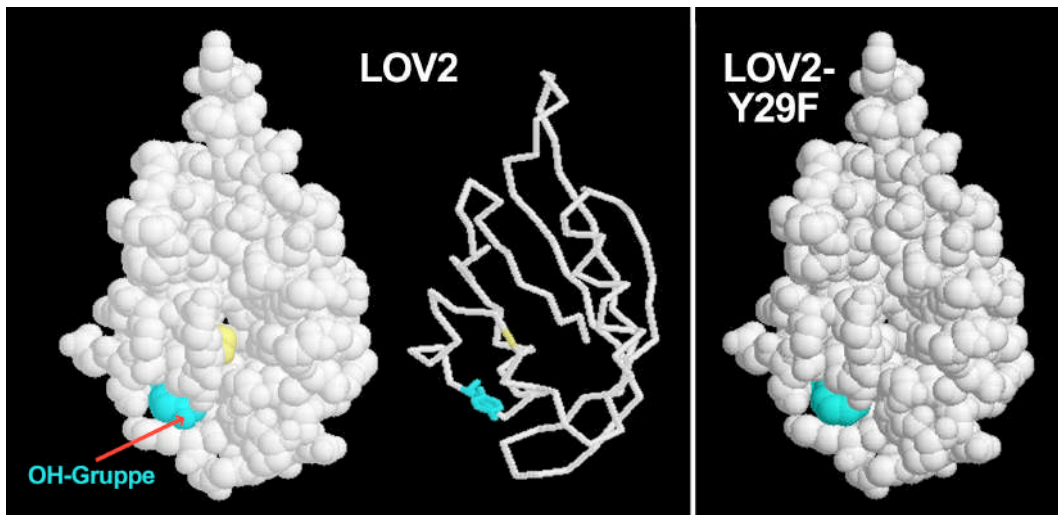
**Abbildung 32: Die Betrachtung der LOV2-Y97M und -Y97K-Mutation im dreidimensionalen Molekülmodell.**

Der jeweils unterschiedliche Rest der Aminosäure 97 (rot) reicht sowohl beim Wildtyp als auch bei allen Mutanten aus der Molekülebene hinaus, wie in Vergrößerung der SWISS-MODEL-Vorhersage dargestellt wird.

Bei der Mutante LOV2-E28G wurde das saure, polare und an der Oberfläche lokalisierte Glutamat 28 gegen ein neutrales Glycin ersetzt. Einzig die Löslichkeit des Fusionsproteins bei der Mutation LOV2-E28G ist, abweichend zum Wildtyp, erhöht und durch die Minderung der Polarität dieser an der Oberfläche lokalisierten Position 28 nicht sinnvoll erklärbar.

Auch die Mutation LOV2-S20A entspricht spektral dem LOV2-Wildtyp. Die Mutationsposition befindet sich im dreidimensionalen Modell ebenfalls an der Moleküloberfläche. Biochemisch kann hierbei jedoch eine geringe Chromophorreduktion verzeichnet werden (siehe 4.3.3.1).

Erste Hinweise auf spektrale Änderungen zum Wildtyp fanden sich bei der zeitaufgelösten UV-VIS-Spektroskopie der Mutante LOV2-Y29F, die durch einen Polaritätsverlust vergleichsweise schneller ausgebleicht werden konnte (siehe 4.3.3.2). Im Modell konnte der konservative Aminosäureaustausch an der Moleküloberfläche lokalisiert und in der Mutante als Verlust einer OH-Gruppe, die von der Moleküloberfläche weg reicht, verdeutlicht werden (siehe Abbildung 33).



**Abbildung 33: Darstellung von LOV2 und der LOV2-Y29F-Mutation im dreidimensionalen Molekülmodell.**

Das Gerüstmodell von LOV2 zeigt eine Lokalisation der Aminosäure 29 an der Moleküloberfläche. Auch im raumfüllenden Modell ist der aromatische Rest des Tyrosins (blau) deutlich mit der hervorstehenden OH-Gruppe, die in der Mutation Y29F fehlt, an der Oberfläche zu sehen. Die Proteinkinasetasche, gut zu erkennen am zentralen Cystein (gelb), liegt in relativer Nähe.

Die Mutation LOV2-N81I nimmt unter den Mutationen, bei denen keine spektrale Änderung zum Wildtyp gezeigt werden konnte, eine Sonderstellung ein, denn hierbei ist eine Aminosäureposition betroffen, die nicht an der Oberfläche sondern tief in und am Ende der Proteintasche im Modell lokalisiert werden konnte (siehe Abbildung 34). Der zur Höhle gerichtete Aminosäurerest ist in der Mutante wesentlich unpolarer.



**Abbildung 34: Vergleich der räumlichen Veränderung von LOV2 und der LOV2-N81I-Mutation in Molekülmodell.**

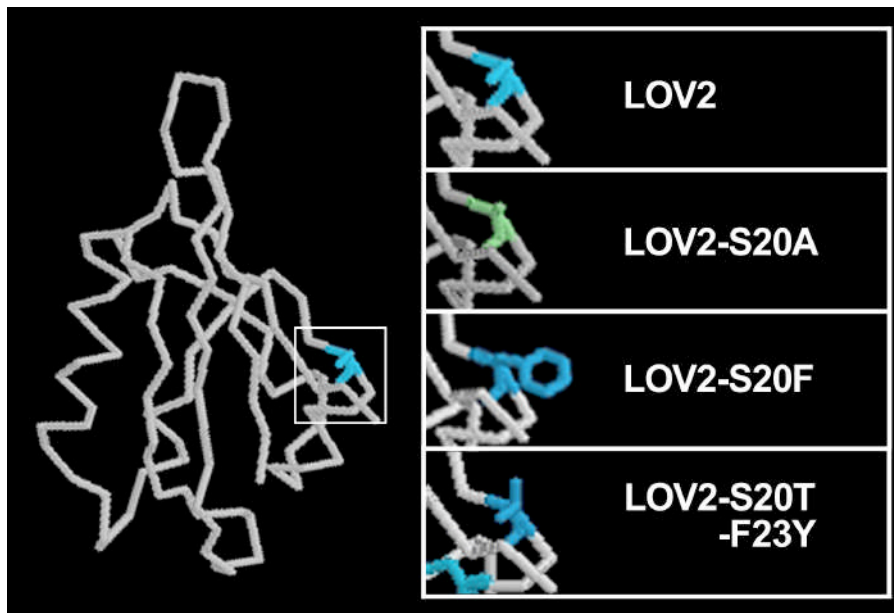
Verdeutlicht wird an dieser SWISS-MODEL-Gerüststruktur, daß die unterschiedlichen Reste der Aminosäure 81 (gelb) jeweils in das Molekül hineinreichen, jedoch bei der Mutation N81I der Isoleucinrest sich weniger weit ausdehnt.

Die Mutante zeigt jedoch eine Reduktion der Chromophorbindung von 63 %. Dies legte die



Vermutung nahe, daß eher die Proteintasche in die Chromophorbinding und die Moleküloberfläche in spektrale Eigenschaften involviert sind.

Diese Hypothese kann vordergründig zunächst in Frage gestellt werden, wenn man im Molekülmodell die Positionen der substituierten Aminosäuren in den Mutanten, bei denen nahezu kein Chromophor mehr gebunden wird, betrachtet. Im Modell der oben bereits erwähnten Mutation LOV2-S20A (siehe Abbildung 35), bei der keinerlei spektrale Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden konnten, findet man den substituiert eingeführten Methylrest analog zum Hydroxymethylrest des Wildtyps dicht am Molekülgitter lokalisiert. Biochemisch war bei dieser Mutante eine Chromophorreduktion von 11 % festzustellen, die durch die fehlende polare Hydroxylgruppe zum Molekülinneren hin erklärbar sein könnte. Wird diese Aminosäureposition 20 durch ein Phenylalanin ersetzt, klappt im Modell der neu eingeführte aromatische und unpolare Rest, vermutlich aus sterischen Gründen, vollständig aus der Molekülebene heraus. Dies führt offensichtlich, wie biochemisch analysiert, zu einem nahezu vollständigen Verlust der Chromophorbinding. Der Einfluß eines Austauschs mit Threonin, das zu dem ursprünglichen Serin deutlich homologer ist, sollte demnach weniger stark sein, da der zwar raumfüllendere Threoninrest im Modell weniger weit aus dem Molekül herausreicht und eine zusätzliche Methylgruppe einführt, jedoch die ursprüngliche Polarität in Richtung Molekülmitte weitestgehend erhält.

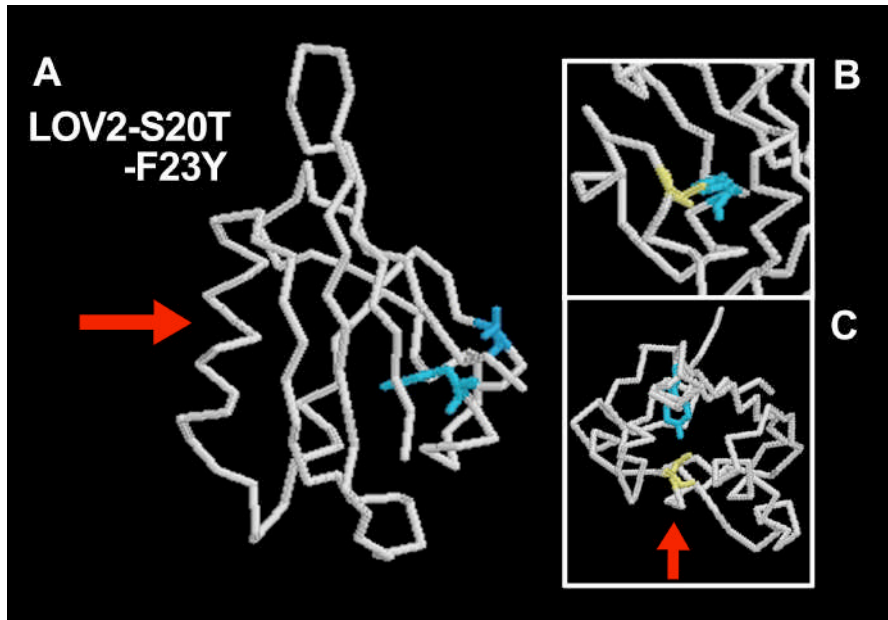


**Abbildung 35: Vorhergesagte Auswirkungen der Mutationen S20A, S20F und S20T-F23Y auf die räumliche Molekülstruktur von LOV2.**

Die über SWISS-MODEL simulierten zweidimensionalen Molekülmodelle zeigen, daß der Hydroxymethylrest (hellblau) des Serins an Position 20 im Wildtyp wie auch der Methylrest (grün) in der LOV2-S20A-Mutante nicht aus der Ebene des Moleküls heraustreten. Ist jedoch an Aminosäureposition 20 ein Phenylalanin vorhanden, kippt der aromatische Rest aus der Molekülebene heraus (blau). Auch ist diese auswärts gerichtete Orientierung bei Threonin in der Mutante S20T-F23Y (blauer Rest) in Ansätzen zu finden.



Daß aber gerade die Doppelmutante LOV2-S20T-F23Y ebenfalls eine fast gleich starke Chromophorreduktion wie die LOV2-S20F-Mutanten aufweist, ist wohl eher durch den verstärkenden Effekt der zweiten mutierten Position 23 zu erklären (siehe Abbildung 36A).



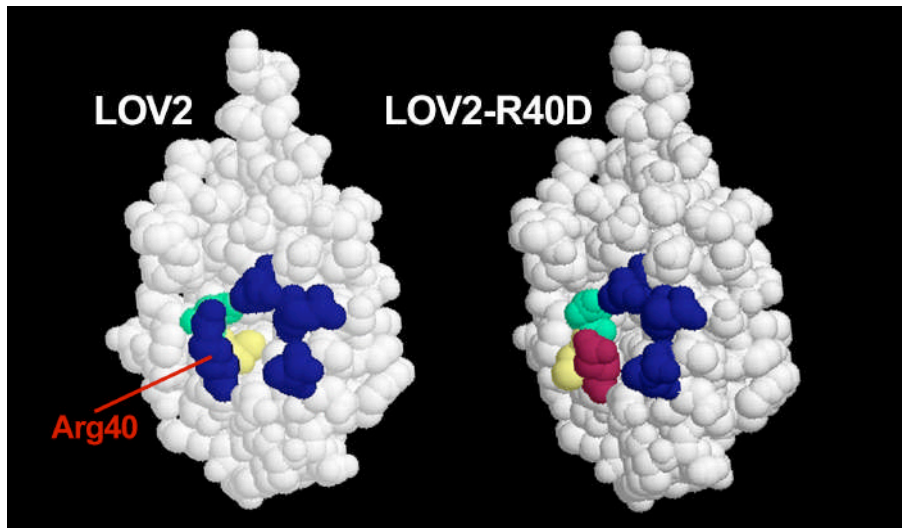
**Abbildung 36: Die LOV2-S20T-F23Y-Doppelmutante in dreidimensionaler Gerüstansicht.**

Zur besseren räumlichen Vorstellung der Lage der mutierten Aminosäuren zueinander wird unter **A** die gleiche Ansicht wie LOV2 in Abbildung 37 gewählt. Auch hier wird nochmal der nach außen gerichtete Seitenrest des Threonins 20 (blau) deutlich. Weiter zum Höhleninneren gerichtet ist die Aminosäure 23 Phenylalanin (hellblau), deren Lage sich durch Austausch mit einem Tyrosin nicht ändert, jedoch reicht die neu hinzugekommene OH-Gruppe in der Mutation wesentlich weiter in die Proteinbindetasche hinein. Dies ist an der Lage zu Cystein 39 (gelb), das exponiert in der Proteintasche sitzt, in 90 ° Linksdrehung (**B**) und in Aufsicht (**C**) verdeutlicht. Der rote Pfeil gibt jeweils die Richtung in die Proteintasche an.

Dieses Phenylalanin 23 ist im Wildtyp tief in der Proteinbindetasche zu finden. Nicht in unmittelbarer, aber relativer Nähe dazu findet sich das Cystein 39, bei dessen Mutation dramatische spektrale Änderungen stattfinden (siehe Abbildung 36B und C). Wird das Phenylalanin durch das stärker polare Tyrosin, das eine zusätzliche OH-Gruppe trägt, ersetzt, ist in der übrigen neutralen Höhle (siehe 4.3.1) ein negativer Einfluß auf die Chromophorbindung zu erwarten. Tatsächlich findet man in der Einzelmutation LOV2-F23Y 70 % Chromophorreduktion. Der Einfluß der Veränderung an Position 23 auf die Chromophorbindung ist offensichtlich.

Im Molekülmodell von LOV2 bilden vier Arginine, die in Abbildung 37 dunkelblau gefärbt sind, den Beginn der Proteintasche, sozusagen den Höhleneingang. Direkt hinter Arginin 40 ist das Cystein 39 (gelb in Abbildung 37) positioniert, das photochemisch höchst wirksam ist (siehe 4.3.3.2, Abbildung 30) und in die Proteintaschenmitte ragt. Wird das basische Arginin 40 durch ein saures Aspartat (rot in Abbildung 37) ersetzt, wird die Chromophorbindung

nahezu vollständig verhindert. Im dreidimensionalen Modell klappt auch das Cystein 39 aus der Höhle heraus an die Moleküloberfläche und das neutrale, grün gekennzeichnete Asparagin 38 drängt marginal in diese entstandene Lücke, so daß sich auch der Höhleneingang verkleinert, aber letztendlich im Milieu wesentlich geändert hat.

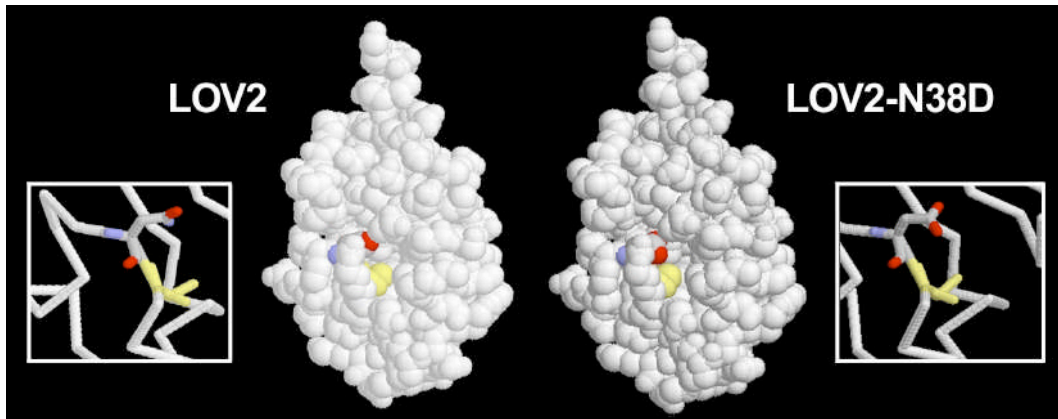


**Abbildung 37: Vorhergesagte strukturelle Auswirkungen der LOV2-R40D-Mutation im dreidimensionalen Molekülmodell.**

In LOV2 bilden nach der über SWISS-MODEL berechneten Proteinstruktur die Aminosäuren Arginin 40, 49, 53 und 56 (dunkelblau), unterstützt von Asparagin 38 (grün), den Eingang zur Proteinbindetasche, in der das Cystein 39 (gelb) eine prominente Position einnimmt. Durch Austausch des Arginin 40 durch ein Aspartat (rot) wird in der Mutante LOV2-R40D der Eingang förmlich zugeschnürt. Unterstützt wird dies durch ein vorhergesagtes Umklappen des Cystein 39 von innen an die Oberfläche.

Somit betreffen alle Positionen, die mit der Proteinbindetasche in Verbindung gebracht werden können, auch die Chromophorbindung.

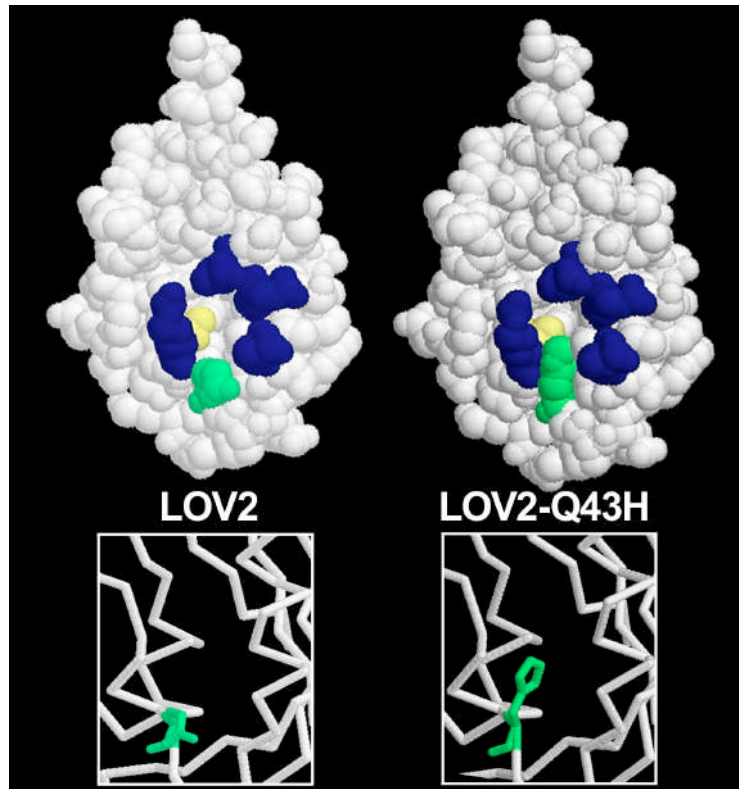
Spektrale Änderungen treten neben mäßig bis starker Chromophorreduktion vor allem bei den Mutationen LOV2-F23Y und im GRNCRFLQG-Motiv (Asn38, Cys38 und Gln43) auf. Alle Positionen wiederum sind im Proteinmodell in die Formation der Höhle involviert. Die Mutanten weisen alle spektrale Eigenschaften auf, die eher dem LOV1-Wildtyp entsprechen (siehe 4.3.3.2). Die neu substituierten Aminosäuren in den Mutanten weisen als Gemeinsamkeit die Veränderung des ehemals neutralen unpolaren Milieus der Höhle auf. Ob das Milieu nun acider (LOV2-N38D, Abbildung 38), basischer (LOV2-Q43H, Abbildung 39) oder nur polarer (LOV2-F23Y, Abbildung 36B und C) wird, spielt offenbar keine Rolle.



**Abbildung 38: Dreidimensionale Betrachtung des LOV2-Proteins und der Mutation N38D.**

Nur geringfügige Änderungen entstehen durch die Mutation an Position 38 von Asparagin zu Aspartat in der über SWISS-MODEL ermittelten Proteinstruktur. Lediglich die gegen die Aminogruppe ausgetauschte Hydroxygruppe bewirkt eine räumliche Drehung des Rests und somit eine geringfügige Annäherung an das Cystein 39 (gelb).

Somit scheinen die spektralen Eigenschaften von LOV1 in der Stärke der Wechselwirkungen zwischen FMN und Proteintasche und damit in der Stärke der Chromophorbindung begründet zu sein. Da die betroffenen Aminosäuren jedoch hochkonserviert in beiden LOV-Domänen sind, bestimmen die spektralen LOV1-Eigenschaften vermutlich eher nichtkonservierte Aminosäuren, die für die Größe und das Milieu der LOV1-Höhle verantwortlich sind. Ob das allerdings an berechneten Modellen dargestellt werden kann, ist ungewiß und kann vermutlich erst durch die Röntgenstrukturanalyse geklärt werden. Daß aber im Modell die Größe und Zugänglichkeit der Proteintasche einen Einfluß auf LOV1- bzw. LOV2-Eigenschaften hat, sieht man bei LOV2-N38D, wobei sich in der Mutation der Aspartatrest durch ionische Wechselwirkungen wesentlich stärker in die Höhle ausdehnt als der neutrale Rest des Asparagins (siehe Abbildung 38). Finden sich bei der Mutation LOV2-Q43H (Abbildung 39) spektrale LOV1-Eigenschaften bei nur mäßig starker Chromophorreduktion, zeigt sich im Proteinmodell, daß durch den Ersatz des neutralen Glutamins am Eingang der Proteintasche durch ein Histidin im Modell der Zugang basischer und sterisch wesentlich enger wird.



**Abbildung 39: Mögliche räumliche Strukturänderung in LOV2 durch die Mutation Q43H.**

Über SWISS-MODEL wurde für die LOV2-Mutation Q43H ein sterisches Umklappen des substituierten Aminosäurerests an Position 43 berechnet (grüne Kennzeichnung). Dadurch wird der Höhleneingang verengt.

Eine herausragende spektrale Veränderung fand sich bei dem Austausch des Cysteins 39. Die Absorptions- und Fluoreszenzspektren, die in stark verdünnter Lösung gemessen wurden, konnten LOV1 zugeordnet werden. Dies ist bei LOV2-C39S und -C39A durch eine negativere Polarisierung, bezogen auf den  $pK_a$ -Wert der  $-SH$ -Gruppe im Cystein, erklärbar. Sterisch sind im Modell keine weitläufigen Änderungen zu erkennen (siehe Abbildung 40). Biochemisch war bei beiden Mutanten geringere Chromophorreduktion ermittelt worden.



**Abbildung 40: Veränderungen innerhalb der Proteinbindetasche durch Austausch des Cystein 39 durch Serin oder Alanin.**

Geringe räumliche Änderungen bewirken die Substitution von Cystein 39 (gelb) durch die Aminosäuren Serin (rot) oder Alanin (grün) in den Mutanten LOV2-C39S und LOV2-C39A: die etwas geringere räumliche Ausdehnung kommt durch den kürzeren Hydroxymethyl- bzw. Methylrest zustande.

Die dramatisch veränderte Photochemie bei den LOV2-Cystein 39-Mutanten scheint demnach nicht in der Molekül- oder Höhlengestalt oder im inneren Milieu zu liegen, sondern muß in der Substitution des Cysteins selbst begründet liegen.

### **4.3.4 Schlußfolgerungen zur Chromophorbindung in CBP-LOV2**

Mutationen, die mittels dreidimensionaler Proteinmodelle an der Proteinoberfläche lokalisiert wurden, zeigen in der Regel keine Beteiligung an der Chromophorbindung. Einzig die an der Oberfläche befindliche, mit ihrer Seitenkette jedoch ins Molekülinnere gerichtete Position 20 (ein Serin im LOV2-Wildtyp) hat, wenn durch Mutation der Einfluß der Seitenkette wegfällt, überaus starken Einfluß auf die Chromophorbindung. Einen ebenso starken Einfluß zeigen Aminosäuren, die an der Formierung einer Proteintasche im LOV2-Molekül beteiligt sind. Dabei scheint es entscheidend, daß am Eingang zu dieser Tasche basisch polare Aminosäuren (Arginine 40, 49, 53 und 56) postiert sind, wohingegen das Innere der Tasche weitestgehend aus neutralen hydrophoben Aminosäuren bestehen muß (z. B. Asparagin 38 oder 81 umgeben von aliphatischen Aminosäuren, siehe auch 4.3.1). An zentraler Position 39 befindet sich inmitten dieser Höhle ein Cystein, bei dessen Substitution zwar immer noch Chromophor gebunden wird, das Chromoprotein jedoch photochemisch inaktiv ist. Somit ist diese herausragende Stelle weniger für die Chromophorbindung als vielmehr für die Bildung eines Photoprodukts verantwortlich.

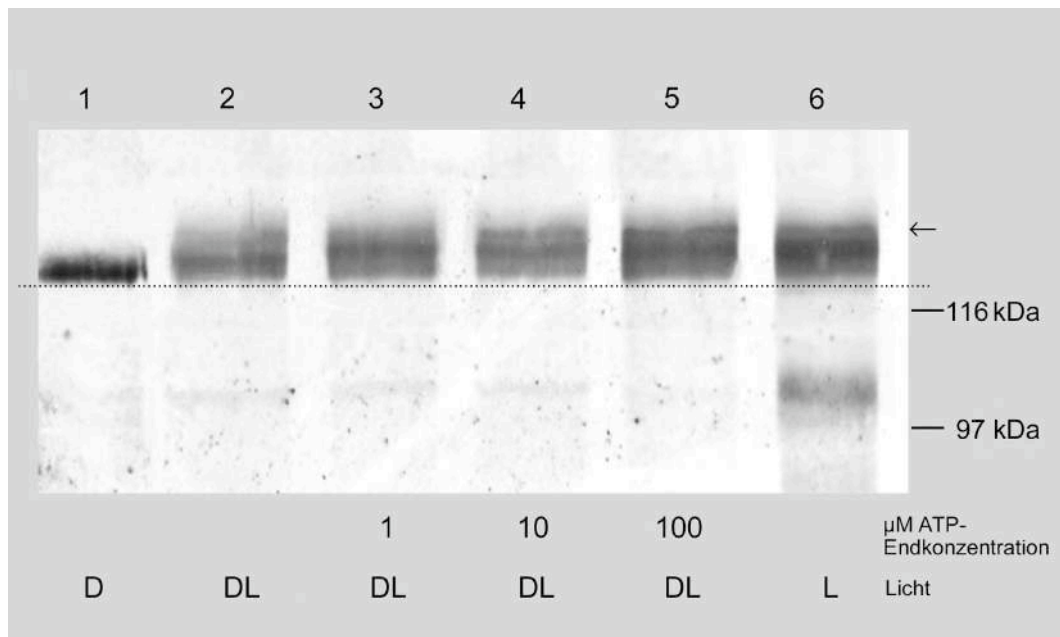
## **4.4 Die lichtvermittelte Phosphorylierungsreaktion und die Kartierung von Phosphorylierungsstellen**

In Kapitel 4.1 wurde die Antikörpercharakterisierung der UV-A-/blaulichtvermittelten Phosphorylierungsreaktion von Phototropin in monokotylen und dikotylen Pflanzen im etiolierten Zustand und unter sättigenden UV-A-/Blaulichtbedingungen mit Anti-NPH1 untersucht, wobei die Selektivität des Anti-Phototropin-Antikörpers für den Phosphorylierungszustand bei Monokotyledonen deutlich wurde. Die Stärke der Anti-NPH1-Erkennung, wie bei der Ermittlung der Gewebespezifität von Phototropin in unbelichteten und belichteten Pflanzen getrennt gezeigt wurde, gibt das Maß der Phosphorylierung wieder (siehe 4.2.1). Dies bestätigt einerseits diese Hypothese von Zacherl (1997), andererseits gilt dies nur für jeweils gleiche Belichtungsverhältnisse, wie durch die Untersuchung der Proteinmenge während verschiedener Belichtungs- und damit Phosphorylierungsstadien verdeutlicht werden konnte (siehe 4.2.2). Denn Zacherl (1997) hatte überdies gefunden, daß nach vorhergehender UV-A-/Blaulichtbelichtung die *in vivo* Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit im Dunkeln von Spitze und Basis der Haferkoleoptile nach 90 Minuten ihr Maximum erreichte. Insbesondere war in der Koleoptilenbasis diese maximale Phosphorylierungsstärke nach Vorbelichtung und 90 Minuten Dunkelregeneration gegenüber einer nicht vorbelichteten Pflanze um das 3,5 fache erhöht. Da aber keine von Zacherl postulierte *de novo* Synthese von Phototropin und folglich erhöhte Rezeptorkonzentration vorliegt, galt es, die Phosphorylierungsreaktion, die Regeneration der Phosphorylierung und die Steigerung der Phosphorylierungskapazität nach Vorbelichtung über die selektive Anti-NPH1-Reaktion genauer zu betrachten.

### **4.4.1.1 Abhängigkeit von der ATP-Menge**

Bei der UV-A-/blaulichtvermittelten Phosphorylierung von Phototropin aus Pflanzen wurde zunächst die dazu eingesetzte ATP-Menge untersucht. Von Zacherl (1997) wurde zur optimalen Phosphorylierung von Rohextrakten, Rohmembranen und Plasmamembranen eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  ATP im Phosphorylierungsansatz ermittelt und konstant verwendet. Um zu überprüfen, ob nicht zuletzt auch die Mobilitätsreduktion mit unterschiedlichen Mengen an ATP bei der *in vitro* Phosphorylierung beeinflusst werden konnte, wurden Senfrohextrakte verwendet, da in Westernblotanalyse die nichtphosphorylierte und die phosphorylierte Form von Anti-NPH1 gleichermaßen erkannt wurde (siehe Abbildung 6) und die Mobilitätsunterschiede gut sichtbar waren. Es wurden Senfrohextrakte von etiolierten Keimlingen mit verschiedenen Endkonzentrationen von ATP phosphoryliert (ohne externes bzw. zusätzlich mit 1–100  $\mu\text{M}$  zugesetztem ATP) und mit einer Probe Senfrohextrakt aus belichteten Keimlingen im Westernblot mit Anti-NPH1 verglichen

(siehe Abbildung 41).



**Abbildung 41: *In vitro* Phosphorylierung von Senfrohextrakten in Abhängigkeit von der dazu eingesetzten ATP-Menge in Westernblotanalyse.**

Wurden etiolierte Senfrohextrakte (Spur 1) mit steigender ATP-Konzentration phosphoryliert (Spur 2 mit endogenem ATP, Spur 3 mit 1  $\mu\text{M}$  ATP, Spur 4 mit 10  $\mu\text{M}$  ATP und Spur 5 mit 100  $\mu\text{M}$  ATP Endkonzentration), war im Vergleich zur etiolierten Form, die Ausbildung von Phototropinbanden mit geringerer Mobilität zu beobachten. Dabei betrug die größte Molekulargewichtserhöhung etwa 2 kDa. Die Phototropinbande mit der daraus resultierenden, maximal verminderten Mobilität (Pfeil) war bereits bei der *in vitro* Phosphorylierung ohne externe ATP-Zugabe schwach zu beobachten (Spur 2, Pfeil) und nahm mit steigender Zugabe von ATP in ihrer Intensität zu. Bei ATP-Endkonzentrationen zwischen 10–100  $\mu\text{mol}$  glich sich diese Intensität der *in vivo* phosphorylierten Phototropinbande (Spur 6) an, so daß bereits ein Optimum für die *in vitro* Phosphorylierung bei 10  $\mu\text{mol}$  ATP liegt. Zwischen maximalem (122 kDa) und minimalem (120 kDa) Molekulargewicht von Phototropin bildeten sich Intermediate aus, die sich mit steigender ATP-Konzentration größtenteils der 122-kDa-Bande annäherten. Schwankungen in der Stärke der Gesamtreaktion lagen hier im Beispiel in Schwankungen der Gesamtproteinkonzentration begründet.

Im Vergleich zur Phototropinbande aus etioliertem Senfrohextrakt (Spur 1) waren nach *in vitro* Phosphorylierung bereits ohne zugesetzte ATP (Spur 2) höhermolekulare Phototropinbanden zu beobachten. Dies war vermutlich durch im Zellrohextrakt vorhandenes, endogenes ATP möglich. Gab man zum Phosphorylierungsansatz zusätzlich steigende Mengen ATP (1  $\mu\text{M}$  ATP bis 100  $\mu\text{M}$  ATP-Endkonzentration), war eine stufenweise Verschiebung der Phototropinbande zu höheren Molekulargewichten über Intermediate zu beobachten. Zwischen einer ATP-Endkonzentration von 10 und 100  $\mu\text{mol}$  konnten kaum mehr Unterschiede in der Intensität der Intermediatbanden zueinander festgestellt werden, so daß ein Optimum bei 10  $\mu\text{mol}$  ATP-Endkonzentration anzusiedeln ist. Die maximale Molekulargewichtserhöhung betrug etwa 2 kDa. Bei den beobachteten Intermediaten handelte es sich offenbar um partiell phosphoryliertes Phototropin. Die



stufenweise Molekulargewichtszunahme wurde demnach durch die noch nicht vollständige Bindung von Phosphat verursacht. Folglich steht bis zum Sättigungswert die Mobilitätsreduktion von Phototropin direkt in Zusammenhang mit der ATP-Konzentration: je mehr ATP zur Phosphorylierung eingesetzt wurde, um so stärker waren die Mobilitätsreduktion und Molekulargewichtserhöhung von Phototropin.

Ähnliches war auch bei Rohmembranen zu finden: die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht, die durch Zugabe an steigenden ATP-Endkonzentrationen während der *in vitro* Phosphorylierung von Rohmembranen aus etiolierten Senfkeimlingen lokalisiert wurde, lag auf gleicher Höhe wie Phototropin aus Rohmembranen von belichteten Senfkeimlingen. Im Unterschied zu Rohextrakten war jedoch bei der *in vitro* Phosphorylierung ohne Zugabe von ATP noch keine Bande mit verminderter Mobilität zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies ist wahrscheinlich auf die Entfernung von endogenem ATP während der Membranpräparation zurückzuführen

Diese Ergebnisse der Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 zeigen, daß die *in vitro* Phosphorylierung mit höheren ATP-Endkonzentrationen als von Zacherl (1997) vorgeschlagen, zu einer quantitativeren Verschiebung der Phototropinbande, ausgehend von der Position des etiolierten Zustandes, über Intermediate zum Molekulargewicht des belichteten Zustands beitrug.

#### 4.4.1.2 Die Wiederherstellung der Phosphorylierbarkeit im Dunkeln

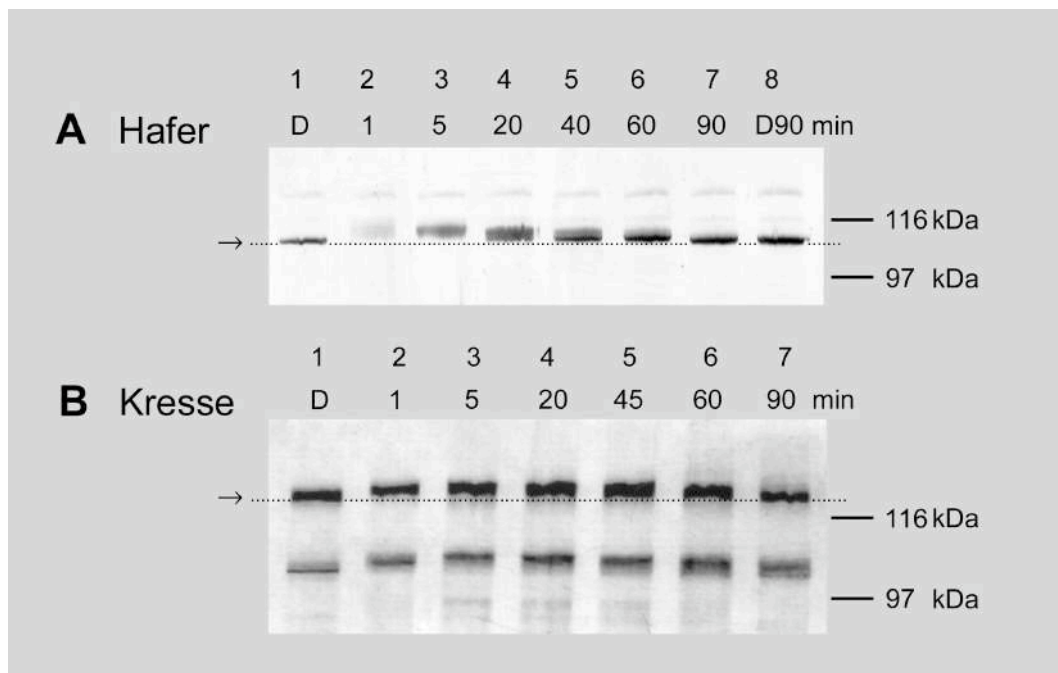
##### 4.4.1.2.1 Die Dunkelregeneration

Aus vorangegangenen Studien war bekannt, daß Phototropin in Maisrohmembranen (Palmer *et al.*, 1993b) und Erbsenrohmembranen (Short & Briggs, 1990) aus unmittelbar vor der Präparation *in vivo* sättigend belichteten Keimlingen *in vitro* nicht mehr phosphoryliert werden konnte. Wurden allerdings die sättigend belichteten Keimlinge im Dunkeln bzw. unter UV-A-/Blaulichtausschluß gehalten, konnten die daraus präparierten Membranen mit steigender Dunkelinkubation wieder phosphoryliert werden. Salomon *et al.* (1997c) haben für Haferkoleoptilen durch die indirekte Bestimmung des Grads an *in vivo* Phosphorylierung ermittelt, daß nach maximaler *in vivo* Phosphorylierung durch sättigende Belichtung in der Haferkoleoptilenbasis (Segment II oder 5–10 mm, siehe Abbildung 10) bereits nach fünf Minuten Dunkelinkubation 25 % der Photorezeptorkinase wieder regeneriert waren. Nach 20 Minuten Dunkelinkubation war die Phosphorylierungskapazität des etiolierten Ausgangszustands wieder erreicht. In der Haferkoleoptilenbasis wurde sogar 90 Minuten nach sättigender Belichtung eine 3,5fache Steigerung der Phosphorylierbarkeit zum etiolierten Ausgangswert beobachtet. Entsprechende eigene Versuche mit dikotylen etiolierten Bereichen aus der Hypokotylbasis zeigten, daß bei etiolierten Kressekeimlingen



die Phosphorylierungskapazität nach einem sättigenden UV-A-/Blaulichtpuls *in vivo* nach 40–50 Minuten Dunkelregeneration wieder erreicht war. Nach 90 Minuten wurde eine etwa zweifache Steigerung der Phosphorylierungskapazität ermittelt (Daten nicht gezeigt). Über die selektive Anti-NPH1-Erkennung bei Monokotyledonen und die Stärke der Mobilitätsreduktion der phosphorylierten Bande (siehe 4.1 und 4.4.1.1) wurden aus der Gruppe der Monokotyledonen Hafer und Mais sowie aus der Gruppe der Dikotyledonen Kresse, Senf, Soja, Tomate und Rauke nach Vorbelichtung und während der Regeneration hinsichtlich des Phosphorylierungsgrads betrachtet.

Zunächst belichtete man etiolierte Koleoptilen- bzw. Hypokotylsegmente aus dem Bereich II (5–10 mm) sättigend. Während der anschließenden Dunkelinkubation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen (siehe 3.2.1) und über SDS-PAGE (siehe 3.2.7.1) und Westernblotanalyse (siehe 3.2.9) analysiert (siehe Abbildung 42):



**Abbildung 42: *In vivo* Dunkelregeneration von Hafer- und Kressephototropin nach einem sättigenden UV-A-/Blaulichtpuls in Westernblotanalyse.**

Etiolierte Haferkoleoptilenbasen und Kressehypokotyle (Segment II bzw. 5–10 mm, Spur 1) wurden sättigend belichtet (30 Sekunden  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) und anschließend im Dunkeln inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen. In Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 wurde Phototropin immunologisch detektiert. Die Autophosphorylierung von Phototropin erfolgte innerhalb von Sekunden und erreichte ihr Maximum bei Hafer zwischen 1–4 Minuten (Teil A, Spuren 2 und 3). Die phosphorylierte und dadurch mobilitätsreduzierte Phototropinform von Hafer wurde nur noch äußerst schwach von Anti-NPH1 erkannt (Teil A, Spur 2). Bereits nach fünf Minuten war trotz unverändert reduzierter Mobilität die Antikörpererkennung, verglichen mit Spur 2, wieder deutlicher. Die gleiche Antikörperreaktion wie die unbelichtete Probe (Spur 1) war nach 20 Minuten (Spur 4) und die Ausgangsmobilität der etiolierten Probe war nach 60–70 Minuten (Spuren 6 und 7) wieder erreicht. Bei Kresse wurde zu allen Meßzeiten die gleiche Menge Phototropin detektiert. Die maximale Mobilitätsregeneration nach Belichtung war bei Kresse nach fünf Minuten (Teil B, Spur 3) erreicht, die vollständige Regeneration hingegen erst nach 90 Minuten (Teil B, Spur 7).

Verglichen mit der Dunkelkontrolle konnte bereits eine Minute nach sättigender Belichtung bei Hafer- und Kressephototropin ein Mobilitätsverlust – vermittelt durch die sättigende UV-A-/blaulichtinduzierte Phosphorylierung – detektiert werden. Das erhöhte Molekulargewicht erreichte bei Hafer zwischen ein und fünf Minuten sein Maximum (Abbildung 42 Teil A, Spuren 2 und 3), bei Kresse hingegen konnte etwa fünf Minuten nach Belichtung die geringste Mobilität beobachtet werden (Abbildung 42 Teil B, Spur 3). Während der fortlaufenden Dunkelinkubation regenerierte der Mobilitätsverlust kontinuierlich, so daß bei Hafer (monokotyl) nach 60–70 Minuten und bei Kresse (dikotyl) nach 90 Minuten das Molekulargewicht von etioliertem Phototropin wieder erreicht war.

Nach 20 Minuten Dunkelregeneration war bei Monokotyledonen die Phosphorylierung wie auch der Verlust der Antikörpererkennung, nicht aber der Mobilitätsverlust, vollständig regeneriert. Zum einen konnten mittels der selektiven Antikörpererkennung von Anti-NPH1 bei Monokotyledonen lediglich Aussagen über die Phototropinphosphorylierung an Phosphorylierungsstellen innerhalb der Antikörperepitope getätigt werden; folglich schienen diese nach 20 Minuten wieder dephosphoryliert zu sein. Zum anderen wurde aus der Westernblotanalyse ersichtlich, daß die Mobilitätsreduktion von Phototropin nach 20 Minuten noch nicht wieder auf das Niveau der Dunkelkontrolle regeneriert war. Erst nach 60–70 Minuten war die UV-A-/blaulichtvermittelte Mobilitätsreduktion bei Hafer vollständig aufgehoben. Da nach Palmer *et al.* (1993b), Short *et al.* (1993), Liscum & Briggs (1995) wie auch unter 4.4.1.1 gezeigt, die Phosphorylierung am Mobilitätsverlust ursächlich beteiligt ist, sollten außerhalb des Antikörperepitops weitere Phosphorylierungsstellen betroffen oder zusätzliche UV-A-/blaulichtvermittelte Sekundärmodifikationen involviert sein.

In Kresse als dikotyle Pflanze fanden viele Reaktionen verzögert statt: neben der Phosphorylierungsregeneration, die im Vergleich zu 20 Minuten bei Hafer, 40–50 Minuten (s. o.) dauerte, verlief auch die Wiederherstellung der Ausgangsmobilität innerhalb von 90 Minuten im Dunkeln bei Kresse insgesamt langsamer. Des Weiteren war in Kresse das gleiche Regenerationsverhalten wie bei Phototropin auch an einer etwa 20 kDa kleineren Bande zu sehen, das bereits unter 4.1 beobachtet worden war.

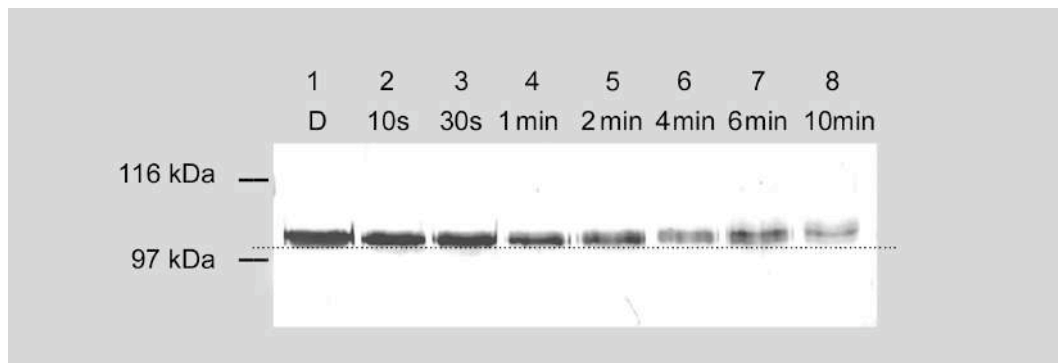
Die von Zacherl (1997) postulierte Neusynthese von Phototropin nach sättigender Vorbelichtung wird neben einer stets nachweisbaren konstanten Proteinmenge (siehe 4.2.2) auch dadurch unwahrscheinlich, daß aufgrund des Mobilitätsverlusts neu synthetisiertes Phototropin phosphoryliert vorliegen müßte bzw. zwei Spezies – phosphoryliertes „altes“ und unphosphoryliertes neusynthetisiertes Phototropin – parallel nachweisbar sein müßten. Letzteres ist nicht der Fall.

Eine wahrscheinlichere Erklärung könnte eine gesteigerte Kinaseaktivität von Phototropin nach sättigender Vorbelichtung und Dunkelregeneration sein. Denkbar wäre auch, daß der etiolierte und der vorbelichtete Zustand maximaler Phosphorylierbarkeit eine

unterschiedliche Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen bieten.

Obwohl die höchste Steigerung der Phosphorylierungskapazität in der Koleoptilenbasis auftritt, in der noch dazu exponentiell weniger Phototropin lokalisiert wurde, ist es dennoch erstaunlich, daß in der Koleoptilenspitze, in der überproportional mehr Phototropin nachgewiesen wurde, kaum eine Erhöhung der Phosphorylierungskapazität zu verzeichnen ist. Möglicherweise spielen dabei zusätzlich altersabhängige Sekundärmodifikationen an Phototropin eine Rolle.

Der UV-A-/blaulichtvermittelte Phosphorylierungsschritt an sich verlief sehr schnell: unmittelbar nach sättigender Belichtung war innerhalb der ersten Minuten die Mobilität der Phototropinbande reduziert und bei Hafer zusätzlich die Anti-NPH1-Erkennung minimiert. Um die Phosphorylierung genauer zu betrachten, wurde zur Verlangsamung der Haferdunkelregeneration die Reaktionstemperatur abgesenkt: bei  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  fand gar keine Reaktion statt, hingegen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (auf Eis) konnte der Schritt der Phototropinautophosphorylierung 10–20fach verlangsamt beobachtet werden (siehe Abbildung 43):



**Abbildung 43: *In vivo* Phosphorylierung von Haferphototropin nach einem sättigenden UV-A-/ Blaulichtpuls in Westernblotanalyse auf Eis.**

Etiolierte Haferkoleoptilen (Segment II bzw. 5–10 mm, Spur 1) wurden auf Eis sättigend belichtet und anschließend im Dunkeln inkubiert. Zu den in Abbildung 43 angegebenen Zeiten wurde Rohextrakt bereitet und in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 auf Phototropin untersucht. Mit steigender Dunkelinkubation auf Eis begann zwischen 30 Sekunden und 1 min (Spuren 3 und 4) die Antikörpererkennung schwächer zu werden, was ein erster Hinweis auf Phosphorylierung war. Während zwischen 2 und 4 min (Spuren 5 und 6) bereits die Antikörpererkennung drastisch reduziert war, konnte in diesem Zeitraum erstmals eine Mobilitätsreduktion beobachtet werden, die mit weiterer Dunkelinkubation anstieg. Trotz verminderter Antikörpererkennung waren zwischen nichtreduzierter und in der Mobilität reduzierter Phototropinbande deutliche Intermediatbanden erkennbar, was auf stufenweise Phosphorylierung hindeutete.

Nach sättigender Belichtung und Inkubation auf Eis wurde im Vergleich zur unbelichteten Dunkelkontrolle in Westernblotanalyse kontinuierlich eine Molekulargewichtszunahme beobachtet. Dies erfolgte, beginnend zwischen 30 und 60 Sekunden schrittweise in deutlich

erkennbaren Stufen, die an die Bildung von Intermediaten bei der *in vitro* Phosphorylierung mit steigenden ATP-Mengen erinnern (siehe 4.4.1.1). Eine Abnahme der Antikörperreaktion war ebenfalls erstmals nach 30–60 Sekunden zu beobachten und die maximale Abnahme war nach etwa 10 Minuten erreicht (siehe Spur 8 in Abbildung 43). Während der weiteren Dunkelinkubation (bis 120 min) auf Eis konnte Phototropin wieder mit dem Antikörper dekoriert werden, aber selbst nach zwei Stunden Dunkelinkubation auf Eis hatte das Phototropin die ursprüngliche Mobilität und vollständige Antikörpererkennung noch nicht wiedererlangt (Daten nicht gezeigt). Daß die Phosphorylierungsreaktion auf Eis zwar verlangsamt, aber dennoch innerhalb von 30 Sekunden anläuft, bedeutet, daß die Reaktionspartner aufgrund der bei etwa 4 °C stark herabgesetzten Braunschen Molekularbewegung in unmittelbarer Nähe sein müssen. Hiermit wird die Hypothese bekräftigt, daß sich Phototropin als Rezeptorkinase autophosphoryliert und intermolekulare Reaktionen weniger wahrscheinlich sind. Innerhalb dieser 30 Sekunden muß die Lichtperzeption als Initiationsereignis stattfinden und dieses Signal muß weitergeleitet werden, um vermutlich über Kinaseaktivierung den Phosphorylierungsvorgang in Gang zu bringen.

Daß die Lichtperzeption, Kinaseaktivierung und Phosphorylierung – *in vivo* bei RT innerhalb weniger Sekunden und auf Eis noch innerhalb von 30 Sekunden – ein sehr schnelles Ereignis im Vergleich zur Regeneration durch Dephosphorylierung darstellen, läßt vermuten, daß nach der schnellen Autophosphorylierung der Photorezeptorkinase die Dephosphorylierung durch ein zweites Protein stattfindet. Eine Phosphatase wurde bereits von Palmer *et al.* (1993b) postuliert. Um diese Dephosphorylierungsaktivität näher zu charakterisieren, wurde die *in vitro* Dunkelregeneration untersucht.

Eine *in vitro* Dunkelregeneration ist mit Phototropin sowohl im Hafer- und Senfrohextrakt als auch an mikrosomalen Membranen versucht worden. Durch einen sättigenden UV-A-/Blaulichtpuls (2 min, 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) konnte Phototropin mit zugesetztem  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  phosphoryliert (siehe 3.2.6.1 bzw. 3.2.6.2) werden. Nach etwa zwei Minuten erhielt man den maximalen radioaktiven Einbau. Während der folgenden Dunkelinkubation nahm die radioaktive Markierung rasch und kontinuierlich ab. Nach 15 Minuten war kein radioaktiver Einbau im Bereich der Molekulargröße von Phototropin mehr feststellbar, was zunächst auf eine Dunkelregeneration schließen ließe.

Über die Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 wurde bei Hafer eine ebenso rasche Abnahme bis zu völligem Verlust der Antikörpererkennung festgestellt, die zunächst als Reduktion der Antikörperreaktion durch Phototropinphosphorylierung gedeutet wurde (siehe 4.1). Die korrelierende Abnahme des radioaktiven Einbaus in die Phototropinbande könnte auch tatsächlich auf eine Abspaltung des Phosphates durch Phosphatase hindeuten. Jedoch

wurde weder nach 15 noch nach 30 Minuten eine Wiedererkennung der Phototropinbande im Westernblot beobachtet, wie das bei der *in vivo* Dunkelregeneration bei Haferkoleoptilen bereits nach 5 Minuten der Fall war (s. o.).

Bei analoger *in vitro* Dunkelregeneration an Senf zeigten Antikörperstudien mit Anti-NPH1, daß in Extrakten eine ebenso rasche Abnahme der Proteinmenge zu beobachten war. Diese Abnahme konnte mit der Abnahme der radioaktiven Markierung der *in vitro* phosphorylierten Senfphototropinbande im Autoradiogramm in Zusammenhang gebracht werden. Die Intensität der Anti-NPH1-Erkennung war bei phosphoryliertem und nichtphosphoryliertem Senfphototropin gleich und eine Abnahme der Antikörperreaktion schien auf eine Abnahme der Proteinmenge und nicht der Phosphorylierung zurückzuführen. Folglich liegt sowohl bei Hafer als auch bei Senf nicht eine Dunkelregeneration vor, sondern proteolytischer Abbau. Da bereits von der proteolysefördernden Wirkung des verwendeten Detergens Triton-X-100 berichtet wurde (Salomon *et al.*, 1996), ist dies höchstwahrscheinlich ausschlaggebend.

In mikrosomalen Membranen sind offenbar deutlich weniger aktive Proteasen vorhanden, denn Hager & Brich 1993 konnten eine nahezu konstante radioaktive Phosphorylierung über 10 Minuten in Triton-X-100-freien belichteten Maismembranen bzw. jüngst auch Christie *et al.* (1998) über etwa 40 Minuten in *Arabidopsis*-Membranen beobachten. Demnach scheinen die für die Phototropindegradation verantwortlichen Phosphatasen löslich im Cytoplasma vorzuliegen.

Ob möglicherweise im Rohextrakt eine Phosphatase nach der Belichtung aktiv ist, konnte über die *in vitro* Dunkelregeneration nach Standardbedingungen nicht geklärt werden.

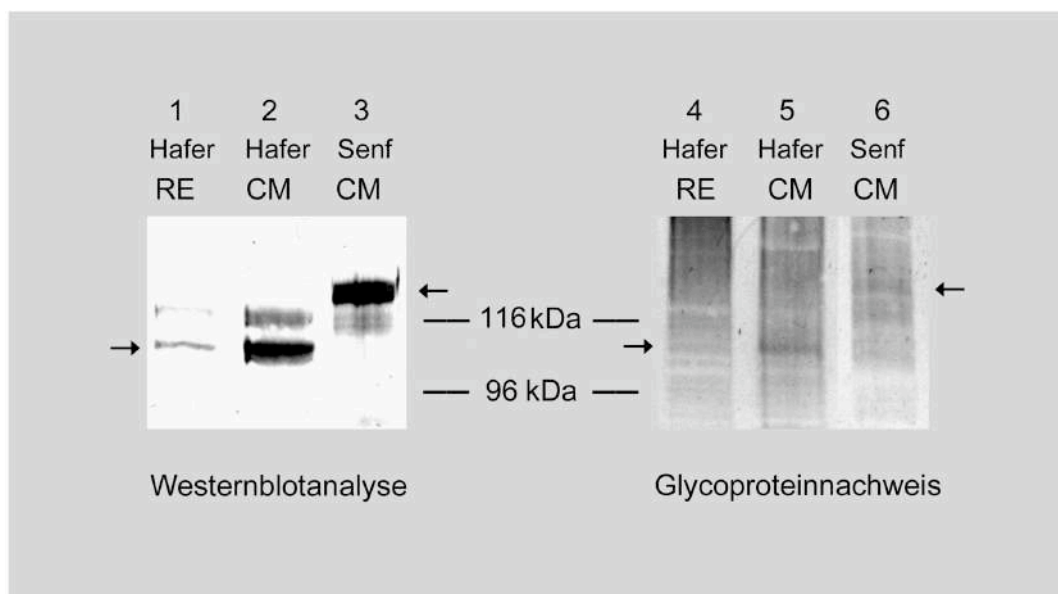
#### 4.4.1.2.2 Test auf zusätzliche lichtinduzierte posttranslationale Modifikationen bei Phototropin

Die Dunkelregeneration der Phosphorylierung erfolgt schneller als die Wiederherstellung der ursprünglichen elektrophoretischen Laufeigenschaften von Phototropin: so trat nach Vorbelichtung bei der Haferkoleoptilenbasis (5–10 mm) bereits nach 20 Minuten die ursprüngliche Phosphorylierungskapazität wieder ein (Salomon *et al.*, 1997c). Dabei war jedoch die durch UV-A-/Blaulichtgabe verminderte Mobilität der Phototropinbande in Westernblotanalyse erst nach 60 bis 70 Minuten wieder hergestellt. Ähnlich verhielt es sich bei Senf (siehe 4.4.1.2.1). Möglicherweise erfolgen neben der durch UV-A-/blaulicht-induzierten Autophosphorylierung weitere lichtabhängige posttranslationale Modifikationen, die zur verringerten elektrophoretischen Mobilität des Proteins beitragen könnten.

Zahlreiche Proteine, die an der intrazellulären Signalkette beteiligt sind, sind über einen Palmitylrest sekundär modifiziert. Dies stellt eine dynamische Regulationseinheit solcher Proteine dar. Eine Palmitylierung wird beispielsweise als Membrananker für lösliche Proteine diskutiert (Milligan *et al.*, 1995). Durch Behandlung mit Hydroxylamin kann der Palmitylrest *in*

*in vitro* abgespalten werden. Dazu wurden Rohmembranen und Zellrohextrakte aus etiolierten und belichteten Senfkeimlingen mit 0,1 M Hydroxylamin versetzt, auf Eis bzw. bei Raumtemperatur zwischen einer und zwanzig Minuten inkubiert und anschließend in einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 analysiert. Es konnte, verglichen mit der jeweiligen Kontrollbande eines hydroxylaminfreien Ansatzes, zu keinem Zeitpunkt eine Phototropinbande mit geringerer Mobilität detektiert werden. Offensichtlich lag keine Palmytylierung vor. Allgemein konnte aber ein verstärkter Abbau von Phototropin bei Inkubation mit Hydroxylamin anhand verstärkt auftretender Banden geringeren Molekulargewichts festgestellt werden.

Die Glycosylierung von Proteinen des Cytoplasmas und Zellkerns war sehr lange umstritten und lediglich an Proteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparats nachgewiesen worden. Durch neuere Untersuchungen konnte posttranslationale Proteinglycosylierung im Cytosol und Kern gezeigt werden (Torres & Hart, 1984; Hart, 1997). Ein allgemeiner Nachweis von Glycoproteinen beruht auf der Oxidation von zwei benachbarten Hydroxygruppen im Zuckerrest mit Natriummetaperiodat zu zwei Carbonylgruppen (Aldehyde). Mit Biotin-Hydrazid kann ein Aldehyd markiert werden. Das Biotin wird mit einem Konjugat aus Streptavidin und Alkalischer Phosphatase dekoriert. Somit wird die Umsetzung eines Farbreagens ermöglicht.



**Abbildung 44: Glycoproteinnachweis und Anti-NPH1-Westernblotanalyse von unbelichteten mikrosomalen Hafer- und Senfmembranen und von Haferrohextrakt.**

Gleiche Membran- bzw. Rohextraktproben wurden geteilt und in 8%-SDS-Gelen aufgetrennt, einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 und einem Glycoproteinnachweis unterzogen. In Hafermembranen konnte bei gleicher Molekulargröße von Phototropin (Spur 2, linker Pfeil) eine deutliche Glycosylierungsreaktion gefunden werden (Spur 5, linker Pfeil), die auch bei geringer konzentriertem Phototropin im Haferrohextrakt (Spur 1, Pfeil) deutlich schwächer ausfällt (Spur 4). Ebenso ist bei Senfmembranen die im Westernblot dekorierbare Menge Phototropin (Spur 3) auch beim Glycosylierungsnachweis zu finden (Spur 6).

Mit dieser Methode konnte jeweils ein Glycoprotein in unbelichtetem Rohextrakt und mikrosomalen Membranen detektiert werden, das die gleiche Molekulargröße im SDS-Gel aufwies wie durch Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 detektiertes Phototropin in Haferrohextrakt, Haferrohmembranen und Senfrohmembranen aus etiolierten Keimlingen (siehe Abbildung 44, Pfeile). Auch ist das Mengenverhältnis von der deutlich schwächer vertretenen Phototropinbande im Haferrohextrakt (Spur 1) zu den Haferrohmembranen (Spur 2) bei den im Glycoproteinnachweis analog detektierten Banden (Spuren 4 und 5) wiederzufinden: die starke Dekoration der Phototropinbande aus Haferrohmembranen in Spur 2 korreliert mit der prominenten, gleich großen Bande in Spur 5 des Glycoproteinnachweises. Der starken Phototropindekoration mit Anti-NPH1 in Senfmembranen entspricht jedoch keine so ausgeprägte Glycosylierungsreaktion (Spur 6). Bei Rohextrakten und Rohmembranen von belichteten Keimlingen wurde keine analoge Glycosylierung nachgewiesen (Daten deshalb nicht gezeigt).

Als Spezifikation wurde daraufhin auf N-Acetylglucosaminierung getestet. Serin- und Threoninreste, insbesondere in Phosphoproteinen, können alternierend zur Phosphorylierung über eine Sauerstoff- oder Stickstoffbrücke mit N-Acetylglucosamin verändert sein. Diese spezifische Modifikation ist hochdynamisch und kann in der Signaltransduktion eine Umkehrfunktion zur Phosphorylierung darstellen (Hart, 1997; Schmitz & Griffith, 1998). Wurde die Aminosäuresequenz von *As-PHOT1a* auf mögliche N-Acetylglucosaminierungsstellen über eine Sauerstoffbrücke mit dem Programm YinOYang 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk>) analysiert, könnten Threonin 137 zu 64 % und die Serine 38, 97 und 846 mit  $\geq 60$  % Wahrscheinlichkeit derart modifiziert vorliegen. Der spezifische Nachweis einer N-Acetylglucosaminierung über eine Sauerstoffbrücke wurde über Lectine nach der Vorschrift „Anwendung Digoxigenin-markierter Lectine in der Glykokonjugat-Analytik“ von Boehringer-Mannheim versucht: Senfimmunopräzipitate (siehe 3.2.2) – zum einen aus etiolierten Keimlingen, zum anderen aus sättigend belichteten Keimlingen nach einer Minute und 30 Minuten Dunkelinkubation – wurden mit Digoxigenin markiertem Weizenkeimagglutinin analysiert. Analog wurden Senf- und Haferrohmembranen und –rohextrakte aus etiolierten und aus sättigend belichteten Keimlingen nach verschiedenen Zeiten Dunkelinkubation untersucht. Es konnte jedoch in keinem Fall eine N-Acetylglucosaminierung über eine Sauerstoffbrücke nachgewiesen werden.

Somit fanden sich insgesamt Hinweise, daß insbesondere Haferphototropin glycosyliert vorliegt, da jedoch bei diesem positiven Glycosolierungsnachweis anhand zweier benachbarter Hydroxylgruppen keine Aussage über die exakte Natur der Glycosylierung möglich war, wären zahlreiche weiterführende Untersuchungen nötig gewesen, um speziellere Hinweise zur Art der Glycosylierung zu erhalten. So konnte in ersten Studien eine

N-Acetylglucosaminierung über eine Sauerstoffbrücke durch DIG-markierte Lectine bei Phototropin ausgeschlossen werden. Weiterführende Experimente (N-Acetylglucosaminierung über eine Stickstoffbrücke, Gehalt an Sialinsäure der Glykokonjugate) wurden nicht mehr durchgeführt, da eine Glycosylierung nur bei Proben aus etiolierem Keimlingsmaterial, d. h. am nichtphosphorylierten Phototropin, gefunden wurde. Da Phototropin nach Belichtung auch im Cytoplasma lokalisierbar ist (siehe 4.2.3), scheint eine Glycosylierung als Membrananker von Phototropin im unbelichteten Zustand sogar plausibel. Es handelt sich aber um eine UV-A-/blaulichtinduzierte Deglycosylierung, alternierend zur Phosphorylierung. Dies dürfte, wenn Phosphorylierung und Glycosylierung als Sekundärmodifikationen den gleichen Einfluß auf das Laufverhalten von Phototropin hätten, keine Änderung in der Mobilität von Phototropin zwischen etiolierten und etioliert belichteten Proben zur Folge haben. Möglicherweise wird nach lichtvermittelter Deglycosylierung während der Dunkelregeneration die Glycosylierung in einem Reaktionskomplex wiederhergestellt, wodurch die verzögerte Molekulargewichtsregeneration von Phototropin vermutet werden kann.

Daß die Mobilität von Phototropin bei der Dunkelregeneration trotz bereits regenerierter Phosphorylierbarkeit (siehe 4.4.1.2.1) und Anti-NPH1-Erkennung noch nicht wiederhergestellt war, hat vermutlich andere UV-A-/blaulichtinduzierte Ursachen. Vorstellbar wäre eine Modifikation durch Fettsäuren, beispielsweise eine Myristilierung, wie sie bei anderen membranassoziierten Kinasen, z. B. der Src-Kinase (Tatosyan & Mizenina, 2000), N-terminal vorkommt. Höchstwahrscheinlich ist auch außerhalb des Antikörperepitops danach zu suchen, weil bereits die Phosphorylierung im Epitop und die damit verbundenen Strukturänderungen die Antikörpererkennung unmittelbar nach Belichtung stark minimieren, aber auch sehr schnell wieder regenerieren.

### **4.4.2 Lichtinduktion**

Über die selektive Antikörpererkennung von Anti-NPH1 konnte bei Monokotyledonen hinsichtlich der Phosphorylierung von Phototropin in den Antikörperepitopen unterschieden werden (siehe 4.1). Damit wurde der Einfluß der Lichtmenge und -qualität bei der Phototropinphosphorylierung in Pflanzen näher betrachtet.

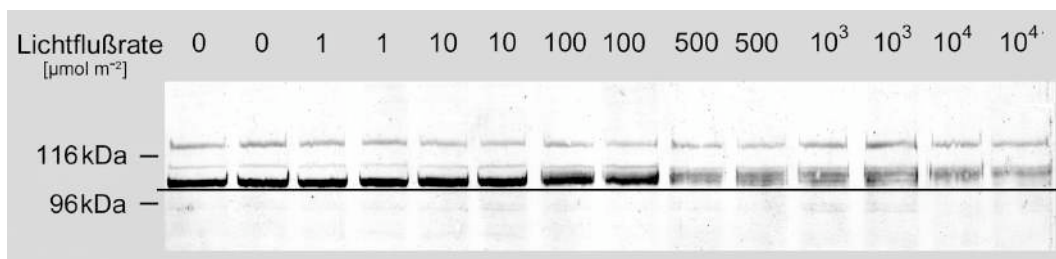
#### **4.4.2.1 Lichtmenge**

Der Schwellenwert für die Autophosphorylierung von Haferphototropin, durch radioaktive *in vitro* Phosphorylierung ermittelt, liegt *in vivo* und *in vitro* zwischen einem UV-A-/Blaulichtfluß von 1 und 10  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Die maximale Phosphorylierung von Phototropin wird bei einem Lichtfluß von 1000–3000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  erreicht (Salomon *et al.*, 1997c; Zacherl, 1997). Durch selektive Kreuzreaktion von Anti-NPH1 mit Haferphototropin konnten über die *in vivo*



Phototropinphosphorylierung in den Epitopen des Antikörpers Anti-NPH1 bereits Aussagen gemacht werden (siehe 4.1 und 4.4.1.2.1). Es galt nun die Sensitivität der Anti-NPH1-Reaktion zu ermitteln. Hiermit war die Frage verbunden, ob der Schwellenwert für die *in vivo* Phototropinphosphorylierung, der bislang nur über *in vivo* Markierung oder indirekt bestimmt worden war (Salomon *et al.*, 1997b), bereits direkt im Rohextrakt über den immunologischen Phototropin mit Anti-NPH1 festgestellt werden kann.

Zur Betrachtung der *in vivo* Phototropinautophosphorylierung in Abhängigkeit vom Lichtfluß wurden etiolierte Keimlinge von Hafer bei einer Belichtungszeit von jeweils 10 Sekunden und jeweils steigendem Lichtfluß schrittweise von 0 bis maximal 10000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  UV-A-/Blaulicht belichtet und nach SDS-PAGE in einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 (siehe 3.2.7.1 und 3.2.9) auf Phosphorylierung im Epitop untersucht. Als Anzeichen für *in vivo* Phototropinphosphorylierung wurde die Ausbildung einer Phototropinbande mit verminderter Mobilität sowie auch die Abnahme der Anti-NPH1-Erkennung herangezogen (siehe Abbildung 45).



**Abbildung 45: Dosis-Effekt-Studie zur Autophosphorylierung von Haferphototropin in Abhängigkeit vom Lichtfluß in Westernblotanalyse.**

Etiolierte Haferkoleoptilenspitzen (0–5) wurden für 10 Sekunden mit jeweils steigendem Lichtfluß (1–10000  $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) belichtet und der daraus präparierte Rohextrakt einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 unterzogen. Die Ausbildung einer Phototropinbande mit verminderter Mobilität und geringerer Antikörperdekoration ist bei einem Lichtfluß zwischen 10 und 100  $\mu\text{mol m}^{-2}$  zu finden. Eine vollständige Reduktion der Phototropinbande zu verminderter Mobilität und Antikörperdekoration läßt sich bei einem Lichtfluß zwischen 1000 und 10000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  nachweisen.

Ab einem Lichtfluß von 100  $\mu\text{mol m}^{-2}$  konnte die deutliche Ausbildung einer Haferphototropinbande mit verminderter Mobilität und reduzierter Antikörperdekoration festgestellt werden. Der Schwellenwert zur Detektion einer Phosphorylierung im Bereich der Antikörperepitope lag bei einem Lichtfluß zwischen 10  $\mu\text{mol m}^{-2}$  und 100  $\mu\text{mol m}^{-2}$ . Eine maximale Reduktion der Antikörperdekoration und vor allem – epitopunabhängig – der Mobilität war erstmals bei einem Lichtfluß von 10000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  zu beobachten. Die Lichtmenge zur maximalen Autophosphorylierung ist demnach *in vivo* im Lichtflußbereich zwischen 1000–10000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  anzusiedeln.

Verglichen mit den von Salomon *et al.* (1997c) ermittelten Werten ist im Schwellenbereich

die Sensitivität zur Erkennung bereits geringer Proteinphosphorylierung mit dem Antikörper Anti-NPH1 um eine Zehnerpotenz weniger sensitiv als bei der radioaktiven Phosphorylierung.

Obwohl bereits bei geringerem Lichtfluß in deren Studien Autophosphorylierung stattfindet, ist es fraglich, ob die geringe Menge der phosphorylierten Bande zum einen schon geringere Mobilität im Westernblot mit Anti-NPH1 aufweist oder noch in der starken Bande des nichtphosphorylierten Phototropins überdeckt wird. Zum anderen kann nicht geklärt werden, ob diese mögliche Mobilitätsreduktion überhaupt eine, mit hinzukommender reduzierter Antikörpererkennung, erkennbare Bande im Westernblot darstellt. Zudem kann mit Anti-NPH1 nur die Phosphorylierung im den Epitopen des Antikörpers betrachtet werden. Es ist vorstellbar, daß der von Salomon *et al.* (1997c) ermittelte Schwellenwert für Phosphorylierungsstellen außerhalb der Epitope gilt und über die durchgeführte Westernblotanalyse nicht erfaßt werden kann.

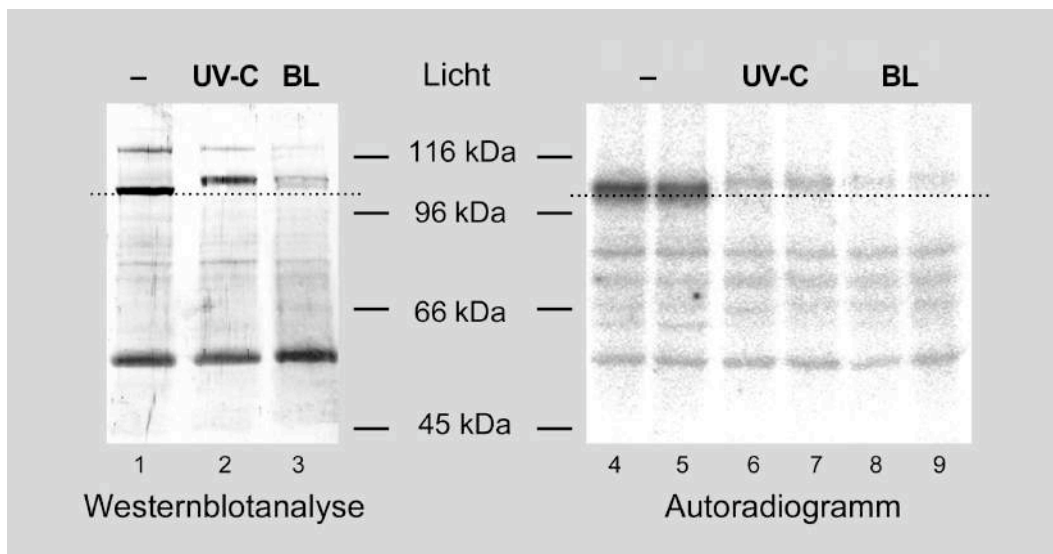
Im Bereich der maximalen Phosphorylierung kann der Bereich des Schwellenwerts grob über die verminderte Anti-NPH1-Erkennung und die Intermediate bei der Mobilitätsreduktion bestimmt werden. Exakte Angaben über Schwellenwert und Sättigung lassen sich aber, vor allem bei niedrigem Lichtfluß, nur über die nach wie vor sensitivere und sehr aufwendige radioaktive Markierung – direkt über *in vivo* Phosphorylierung mit radioaktiven Orthophosphat oder indirekt über radioaktive *in vitro* Phosphorylierung – ermitteln.

Insgesamt dient die Ermittlung des Grads der *in vivo* Phosphorylierung über den immunologischen Phototropinnachweis mit dem Antikörper Anti-NPH1 einen direkten, schnellen und einfachen Überblick.

#### 4.4.2.2 Lichtqualität

Im Aktionsspektrum der phototropischen Krümmung der Haferkoleoptile (siehe Abbildung 3) zeigen sich Wellenlängen im UV-A-/Blaulichtbereich höchst wirksam. In der Literatur wird Phototropin gemeinhin als UV-A/Blaulichtrezeptor beschrieben. Einzig Baskin & Iino (1987) haben bislang den Versuch unternommen, das Aktionsspektrum für den Phototropismus bei Alfalfa im niederen UV-Bereich zu erweitern und sind dabei auf ein weiteres scharf ausgeprägtes Maximum bei 280–290 nm gestoßen. Dosis-Wirkungs-Kurven bei definierter Wellenlänge im Bereich der ersten positiven Krümmung belegen eindeutig die wohlbekannte Glockenform bereits ab 260 nm bis 500 nm Wellenlänge. Im Hinblick auf die Charakterisierung des Photorezeptors für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus wurde ermittelt, wie stark Phototropin von den unterschiedlichen Wellenlängen phosphoryliert wird und welche Wellenlängen die effektivste Phosphorylierung bewirken. Dies erfolgte an etiolierten Haferkoleoptilenspitzen (0–5 mm). Als Lichtquellen wurden die Standardbelichtungslampe KL 1500 mit UV-A/Blaulichtglasfilter mit einer Transmission von

320 bis 500 nm (UV-A/BL) und eine UV-C-Handlampe unbekannter Bauart mit einer nicht näher definierten Transmission von 254 nm eingesetzt. Nach *in vivo* Belichtung in unterschiedlicher Lichtqualität wurde mit dem anschließend präparierten Rohextrakt eine Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 und eine radioaktive *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP durchgeführt (siehe Abbildung 46). Da die Lichtflußrate der UV-Lampe mit  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  verhältnismäßig gering war, wurden die Koleoptilen damit 330 Sekunden belichtet, währenddessen mit UV-A-/Blaulicht 15 Sekunden bei einer Lichtflußrate von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet wurde, um bei beiden Belichtungen die gleiche Photonenmenge zu applizieren.



**Abbildung 46: Autophosphorylierung in etiolierten Haferkoleoptilenspitzen durch UV- und Blaulicht in Westernblotanalyse und Autoradiogramm.**

Etiolierte Haferkoleoptilenspitzen (0–5 mm) wurden mit UV-A-/Blaulicht 15 Sekunden bei einer Lichtflußrate von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet bzw. mit UV-C 254 nm 330 Sekunden bei einer Lichtflußrate von  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  belichtet. Der jeweils daraus präparierte Rohextrakt wurde einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 unterzogen. Im Vergleich zum etiolierten Phototropin (Spur 1) ist bei Blaubelichtung (Spur 3) die Ausbildung einer Phototropinbande mit verminderter Mobilität und geringerer Antikörperdekoration zu finden. Bei UV-C-Belichtung ist lediglich eine Phototropinbande mit verminderter Mobilität zu beobachten ist (Spur 2). Im Autoradiogramm konnte nach radioaktiver *in vitro* Phosphorylierung bei etioliertem Phototropin (Spur 4) maximaler Einbau gemessen werden. Bei vorangegangener Blaubelichtung der Koleoptilen ist minimalster radioaktiver Einbau zu finden (Spur 9), bei vorangegangener UV-C-Belichtung detektiert man hingegen schwachen Einbau, der 12 % des radioaktiven Einbaus in etioliertes Phototropin (Spur 4) zeigt.

Im Rohextrakt aus unbelichteten Keimlingen war bei Phototropin sowohl im Westernblot starke Antikörpererkennung als auch im Autoradiogramm maximaler radioaktiver Einbau erwartungsgemäß zu beobachten. Durch die UV-A/Blaubelichtung *in vivo* wurde Phototropin phosphoryliert, das im SDS-Gel durch eine Mobilitätsreduktion deutlich wurde. Im Autoradiogramm konnte das *in vivo* bereits lichtvermittelt phosphorylierte Phototropin kaum noch weiter radioaktiv *in vitro* phosphoryliert werden. Wurde jedoch *in vivo* mit 254

nm belichtet, war auf Westernblotebene geringere Mobilität bei voller Antikörperdekoration zu finden, wohingegen der Mobilitätsverlust auch deutlich im Autoradiogramm bei geringer radioaktiver *in vitro* Phosphorylierung zu beobachten war.

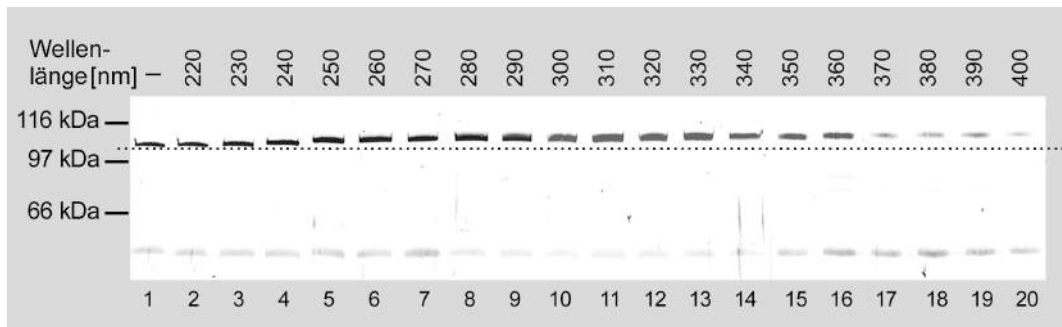
Zum einen sprechen der deutlich zu beobachtende Mobilitätsverlust, der sowohl im Westernblot als auch im Autoradiogramm zu erkennen ist, sowie die geringe *in vitro* Phosphorylierungskapazität für *in vivo* Phosphorylierung; zum anderen scheint jedoch die unverändert starke Antikörperdekoration eine Phosphorylierung im Epitop des Antikörpers auszuschließen. Durch beide Lichtqualitäten – UV-C und UV-A/Blauvlicht – wird eine *in vivo* Phosphorylierung von Phototropin erreicht, wobei die *in vivo* Phosphorylierung durch UV-C-Licht aufgrund vergleichsweise stärkerer radioaktiver *in vitro* Nachphosphorylierung etwas schwächer zu sein scheint als die UV-A-/blauvlichtvermittelte *in vivo* Phosphorylierung. Aus dem bisherigen Rahmen fällt die anhaltende Anti-NPH1 Erkennung von UV-C-vermittelt phosphoryliertem Phototropin der Monokotyledonen.

Ein vorstellbarer Grund für die unvollständige Phosphorylierung durch UV-C-Licht ist nicht die Lichtqualität, sondern die Lichtflußrate, bei der die Photonenmenge appliziert wurde. Denkbar wären Phosphorylierungsstellen, die erst ab einer bestimmten Lichtflußraten phosphoryliert werden können. So könnte wegen der niedrigen Lichtflußrate der UV-C-Lampe mit  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  der Schwellenwert immer noch nicht erreicht gewesen sein. Bei einer nachfolgenden *in vitro* Phosphorylierung mit UV-A/Blauvlicht bei einer 20fachen Lichtflußrate wurden möglicherweise allen freien Phosphorylierungsstellen besetzt.

Vermutlich spielt auch die Applikationszeit eine Rolle, die aufgrund der schwachen Lichtflußrate der UV-C-Lampe 20fach erhöht werden mußte.

Aus diesen Gründen mußten die effektiven UV-Wellenlängen bestimmt und deren Lichtfluß als Produkt der Lichtflußrate und der Applikationszeit näher betrachtet werden.

Aufgrund fehlender Filterangaben zur UV-C-Lampe konnte prinzipiell die Durchlässigkeit für Licht längerer Wellenlängen nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Um exakte UV-Effekte zu ermitteln, wurde zur alternativen Belichtung der etiolierten Koleoptilen der monochromatische Lichtstrahl des Hitachi Fluorimeters F-2000 benutzt. Es wurden etiolierte Haferkoleoptilen *in vivo* jeweils 420 Sekunden lang mit UV-Licht belichtet, Rohextrakt bereitet und die Anti-NPH1-Dekoration in Westernblotanalyse betrachtet (siehe Abbildung 47). Eingesetzt wurden in jeweils 10 nm Abständen alle Wellenlängen von 220 bis 400 nm.

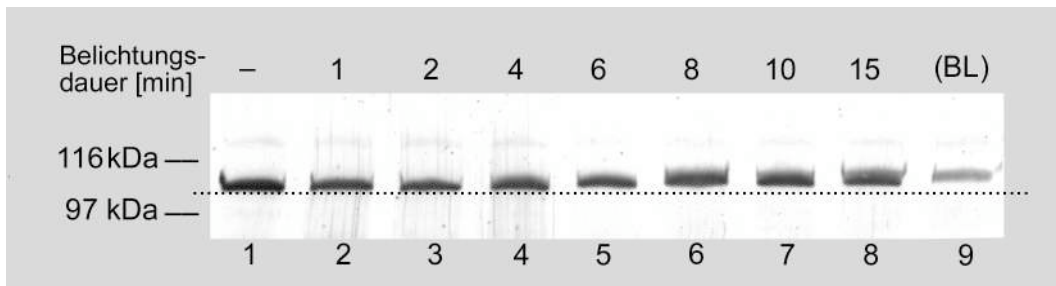


**Abbildung 47: Dosis-Effekt-Studie zur Autophosphorylierung von Haferphototropin in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei konstanter Belichtungszeit in Westernblotanalyse.**

Etiolierte Haferkoleoptilenspitzen (0–5 mm) wurden 420 Sekunden mit monochromatischem Licht jeweils unterschiedlicher Wellenlänge im Hitachi-Fluorimeter belichtet: es wurde bei einer Wellenlänge von 220 nm begonnen und in 10 nm-Schritten bis 400 nm (Spuren 2 bis 20) bestrahlt. Die SDS-PAGE und Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 zeigen, daß Haferphototropin über den Wellenlängenverlauf von 220 bis 400 nm kontinuierlich von einer stark mit dem Antikörper dekorierbaren Bande in eine Bande übergeht, die vom Antikörper nur mehr schwach erkannt wird und geringere Mobilität aufweist als die unbelichtete Phototropin (Spur 1). Zuerst tritt dabei die verminderte Mobilität auf.

Obwohl mit steigender Wellenlänge die Mobilität von Phototropin ab 240 nm geringer wurde und ebenso die Antikörpererkennung ab 300 nm abnahm (Verlauf Spuren 1 bis 20 in Abbildung 47) konnte deutlich beobachtet werden, daß bereits vor der Abnahme der Antikörpererkennung die Mobilitätsreduktion ausgeprägt war. Insofern wurde auch mit monochromatischem Licht bestätigt, daß eine Sensitivität von Phototropin, nachgewiesen in Kreuzreaktion mit Anti-NPH1, für niedrigere Wellenlängen als UV-A/Blauviolet vorliegt.

Inwieweit die Belichtungszeit und damit die Photonendichte Einfluß auf die Mobilitätsreduktion und den Verlust der Antikörpererkennung nahmen, wurde an verschiedenen Wellenlängen in ähnlicher Weise ermittelt und wird in Abbildung 48 am Beispiel 270 nm gezeigt:



**Abbildung 48: Autophosphorylierung von Haferphototropin bei 270 nm in Abhängigkeit von der Belichtungszeit in Westernblotanalyse.**

Etiolierte Haferkoleoptilenspitzen (0– 5 mm) wurden bei 270 nm Wellenlänge bei einem Lichtfluß von  $2,44 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Hitachi-Fluorimeter jeweils unterschiedlich lange belichtet: Phototropin zeigt in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 mit steigender Belichtungszeit die Ausbildung einer Phototropinbande mit geringerer Mobilität, beginnend bei Belichtung zwischen 2 und 4 min. Neben der Dunkelkontrolle ohne Belichtung (Spur 1) ist Phototropin nach sättigender Belichtung mit UV-A-/Blaulicht (Spur 9) gezeigt.

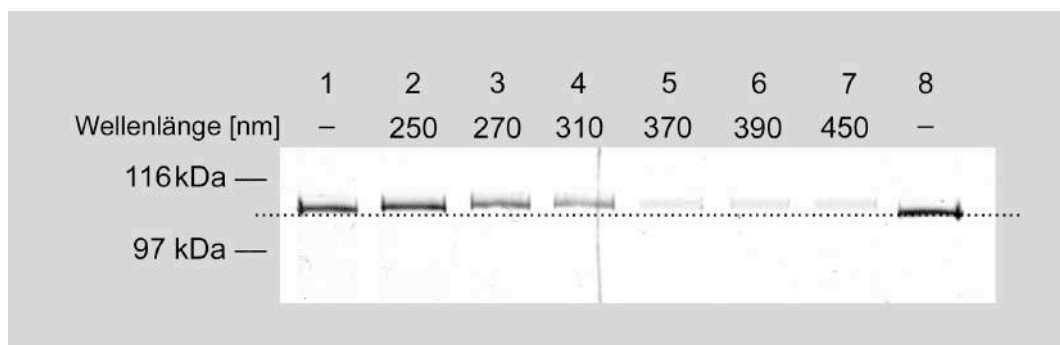
Spuren 1 bis 8 in Abbildung 48 zeigen den Verlauf bei jeweils höherer Belichtungsdauer, selbstverständlich stets oberhalb des Schwellenwerts (siehe 4.4.2.1), und Spur 9 stellt den Kontrollwert bei sättigender UV-A-/Blaulichtbelichtung dar. Die Entwicklung zur Ausbildung einer Phototropinform mit geringerer Mobilität war ausgeprägt zu beobachten. Eine stärkere Mobilitätsreduktion, auch bei längerer Belichtung (bis 30 min) konnte nicht beobachtet werden und ist deshalb nicht abgebildet. Ebenfalls konnte lediglich ein geringer Verlust der Antikörperreaktion ab acht Minuten Belichtung festgestellt werden, der vielmehr einer breiter werdenden Phototropinbande ähnelt und auch nach längerer Belichtung nicht stärker wurde. Bei den nicht abgebildeten Versuchsreihen war festzustellen, daß bei niedrigeren Wellenlängen keine Reduktion der Antikörperreaktion stattfand, und mit abnehmender Wellenlänge auch die Ausbildung der Mobilitätsreduktion geringer wurde. Hingegen bei steigenden Wellenlängen wurde mit steigender *in vivo* Belichtungszeit die Ausbildung der Phototropinbande mit verminderter Mobilität, gefolgt von der Reduktion der Anti-NPH1-Erkennung, beobachtet. Beide Phänomene ließen sich bei Wellenlängen ab 370 nm kaum noch zeitlich trennen (Daten nicht gezeigt).

Um exakt gleiche Photonenmengen jeweils unterschiedlicher Wellenlängen auf die etiolierten Keimlinge zu applizieren, wurde mit einem semiportablen Spannungsgerät der Arbeitsgruppe Uhl (mit freundlicher Unterstützung von Sebastian Munk) die Lichtflußrate der Xe-Lampe des Fluorimeters bestimmt und daraus, unter Berücksichtigung der Meßdiodenintensität, die Belichtungszeit berechnet, die nötig ist, um bei jeder Wellenlänge eine Photonenzahl von  $1000 \mu\text{mol m}^{-2}$  zu gewährleisten (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: Benötigte Belichtungszeiten zur sättigenden Belichtung von Phototropin im Hitachi-Fluorimeter bei Wellenlängen von 220–450 nm.**

Wellenlänge [nm]	Lichtflußrate [ $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ]	benötigte Belichtungszeit für 1000 $\mu\text{mol m}^{-2}$
220	0,0553	301 min 23 s
230	0,151	110 min 23 s
240	0,489	34 min 5 s
250	1,05	15 min 52 s
260	1,71	9 min 45 s
270	2,44	6 min 50 s
280	3,62	4 min 36 s
290	5,21	3 min 12 s
300	7,02	2 min 22 s
310	8,44	1 min 58 s
320	9,28	1 min 48 s
330	10,40	1 min 36 s
340	11,80	1 min 25 s
350	12,1	1 min 23 s
360	11,9	1 min 24 s
370	12,4	1 min 21 s
380	13,6	1 min 14 s
390	14,9	1 min 7 s
400	15,6	1 min 4 s
450	17,7	56 s

Mit dieser so ermittelten, für jede Wellenlänge spezifischen Belichtungszeit wurden jeweils etiierte Haferkeimlinge *in vivo* belichtet, Rohextrakt bereitet und Phototropin im Westernblot dekoriert (siehe Abbildung 49).

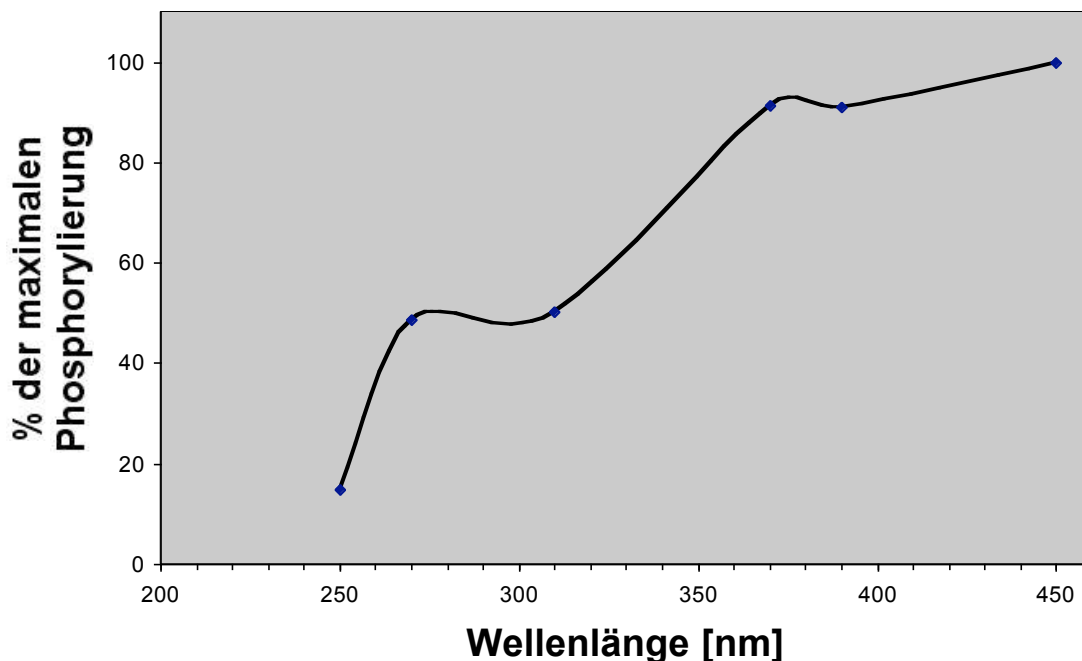


**Abbildung 49: Autophosphorylierung von Haferphototropin in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei gleichem Lichtfluß bzw. gleicher Photonenmenge in Westernblotanalyse.**

Etiolierte Haferkeimkeimspitzen (0–5 mm) wurden im Hitachi-Fluorimeter jeweils mit den Wellenlängen der Absorptionsmaxima und -minima von Phototropin bei gleichem Lichtfluß belichtet: im Vergleich zur Dunkelkontrolle in Spur 1 und 8 ist in Westernblotanalyse von 250 nm bis 450 nm eine Phototropinbande zu sehen, die kontinuierlich von einer stark mit dem Antikörper dekoriierbaren Bande in eine Bande mit geringerer Mobilität übergeht, die vom Antikörper nur noch schwach erkannt wird.

Bei allen abgebildeten Wellenlängen konnte eine Veränderung relativ zum unbelichteten

Wert ermittelt werden. Geringere Mobilität war bei allen belichteten Proben zu finden. Das Nachlassen der Anti-NPH1-Erkennung konnte deutlich ab 270 nm beobachtet werden. Tendenziell war festzustellen, daß trotz korrigierter Photonenapplikation nach wie vor bei den niedrigeren Wellenlängen geringere Effekte in der reduzierten Antikörpererkennung zu sehen waren (siehe Abbildung 49). Es konnte mit monochromatischem Licht definierter Wellenlängen und jeweils gleichem appliziertem Lichtfluß das erste Ergebnis (siehe Abbildung 46) bestätigt werden. Mit den zur Verfügung stehenden Mitteln konnten mögliche Änderungen bei gleicher Lichtflußrate nicht untersucht werden. Ob somit bei UV-C-Wellenlängen unter 270 nm mit vergleichbarem Lichtfluß eine reduzierte Anti-NPH1 Erkennung möglich sein kann, ist noch offen. Einerseits könnte die Wellenlänge selbst oder aber eine Regeneration bzw. Dephosphorylierungsreaktion aufgrund der vergleichsweise langen Belichtungszeiten – teilweise 50 bis 100fach – eine Rolle spielen. Spuren 1 und 8 in Abbildung 49 stellen die Anti-NPH1-Reaktion mit dem unbelichteten Phototropin dar. Abgebildet sind die Proben, die mit den Wellenlängen der Maxima und Minima im Absorptionsspektrum von Phototropin korrelieren. Abbildung 50 stellt die erreichbare maximale Phosphorylierung durch unterschiedliche Wellenlängen bei sättigender Belichtung dar. Der *in vivo* Phosphorylierungszustand wurde indirekt bestimmt, indem die bei unterschiedlichen Wellenlängen mit korrigierten Belichtungszeiten *in vivo* belichteten Proben *in vitro* radioaktiv phosphoryliert wurden.



**Abbildung 50: Aktionsspektrum der *in vivo* Autophosphorylierung von Haferphototropin.**

Etiolierte Haferkoleoptilenspitzen (0–5 mm) wurden im Hitachi-Fluorimeter jeweils mit den Wellenlängen der Absorptionsmaxima und -minima von Phototropin bei gleichem



Lichtfluß belichtet. Durch *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP wurde indirekt die prozentuale *in vivo* Phosphorylierung bei den jeweiligen Wellenlängen bestimmt. 0 % der maximalen Phosphorylierung stellt die Dunkelkontrolle dar und als 100 % wurde die Phosphorylierung bei 450 nm Blaulicht definiert.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve ähnelt dem zu erwartenden Aktionsspektrum des Phototropismus, nur wurde hier der Effekt Phosphorylierungsstärke und nicht, wie in Abbildung 3, die phototropische Krümmung betrachtet. Die einzig in der Literatur beschriebene Wellenlängen-Phosphorylierungskurve von Palmer *et al.* (1993a) wurde mit Mais ermittelt und stimmt ebenfalls mit der hier für Hafer ermittelten Kurve sehr gut überein.

### **4.4.3 Die Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in Phototropin**

Bereits in Kapitel 4.2.4 wurde dargelegt, daß bei Phototropin die Fähigkeit zur Autophosphorylierung in der bisherigen maximalen Aufreinigungsstufe aus Pflanzen – abgelöst von Membranen und affinitätsgereinigt über Cibachron Blau 3GA – kaum mehr vorhanden war. Als problematisch erwies sich dabei der sehr eng definierte Toleranzbereich der Phototropinstabilität: der Photorezeptor zeigte sich inaktiv bei pH-Werten höher oder niedriger als pH 8 oder äußerst instabil gegenüber Proteasen oder Detergentien (siehe 4.2.4.1).

Im Zuge der Charakterisierung der Chromophorbindung wurde Phototropin aus Hafer als Vollängenprotein bzw. dessen Subdomänen löslich als CBP-Fusionsproteine heterolog in *Escherichia coli*- BL21(DE3)pLysS-Zellen exprimiert (siehe 4.3.1). Neben der Untersuchung zur Bindung des Chromophors wurden mit dem heterolog exprimierten Haferphototropin Phosphorylierungsstudien durchgeführt. Die diversen Konstrukte im Anschluß entstanden, wenn nicht selbst kloniert, während einer Zusammenarbeit mit dem Labor von Winslow Briggs.

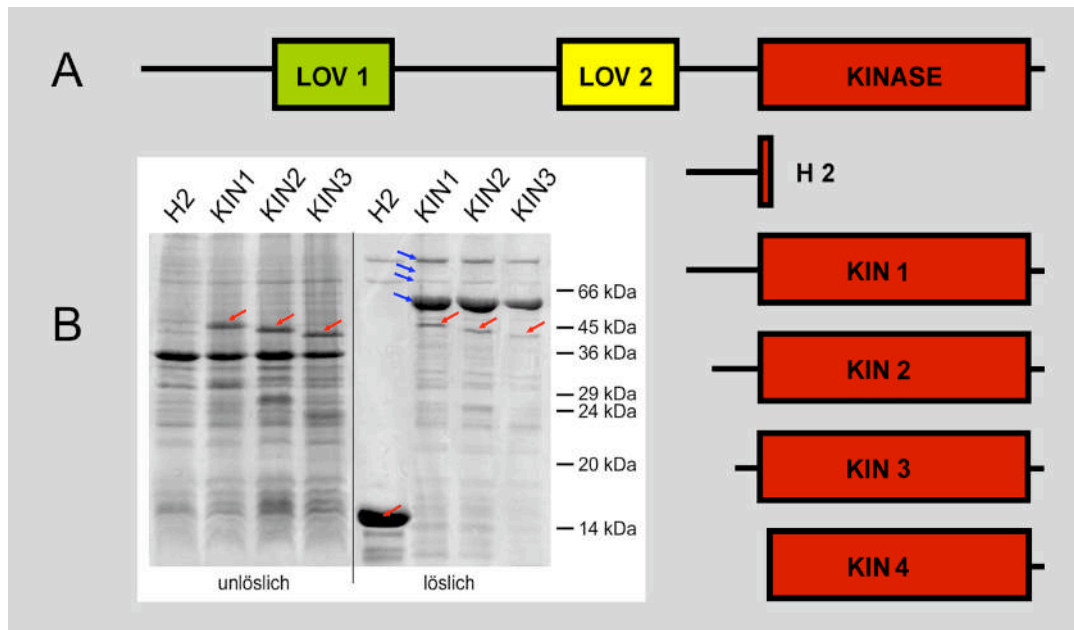
#### **4.4.3.1 Die Phosphorylierung von heterolog exprimiertem Phototropin**

Wurde Phototropin in seiner gesamten Länge heterolog als CBP-Fusionsprotein in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS exprimiert (Aminosäure 1–923; 108,15 kDa), lag es größtenteils unlöslich, vermutlich in „inclusion bodies“ eingekapselt, vor. Im Zellysat war zu wenig lösliches Phototropinprotein vorhanden, um durch eine Affinitätsreinigung eine Anreicherung zu erzielen. Wurden das lösliche, ungereinigte Zellysat *in vitro* mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP lichtabhängig versetzt, konnte keine meßbare Phototropinautophosphorylierung verzeichnet werden (Daten nicht gezeigt).

Da Phototropin in Pflanzen UV-A-/blaulichtabhängig phosphoryliert wird, muß eine Regulation der Phototropinkinase vorliegen, die die Aktivität der Kinase im Dunkeln unterdrückt und durch Licht freigibt. Klassische Kinasen bestehen in der Regel aus mehreren Untereinheiten, die entweder die Aktivität kontrollieren (die sogenannte regulatorische

Untereinheit) oder die Kinaseaktivität innehaben (die sog. katalytische Untereinheit). Bei einer Photorezeptorkinase, für die Autophosphorylierung postuliert wurde, sollten in ein und demselben Molekül regulatorische und katalytische Bereiche vereint sein und die Kinaseaktivierung durch das Rezeptormolekül selbst gesteuert werden. Da bislang über die Lichtregulation der Phototropinkinase keine näheren Daten existieren, ist es durchaus möglich, daß sich die Phototropinkinase entweder mit regulatorischen Elementen in ihrer Domäne selbst oder aus dem übrigen C-terminalen Bereich des Proteins steuert. Die Initiation zur Freisetzung der Kinaseaktivität durch Licht kann nur über ein intaktes Photosystem erfolgen. Da das Sediment des unlöslichen Zellysats die Hauptmenge des exprimierten CBP-Fusionsproteins enthielt und hellgelb gefärbt war, konnte vermutet werden, daß, ähnlich wie bei den heterolog exprimierten, FMN-bindenden LOV-Domänen auch das in vergleichsweise geringen Mengen vorhandene lösliche Vollängenprotein theoretisch in der Lage sein sollte, Chromophor zu binden.

Um nun nähere Hinweise zur Phototropinkinaseaktivität zu erhalten, wurden verschieden lange Fragmente des C-Terminus, der homolog zu Serin-/Threoninkinasen ist, kloniert und in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS exprimiert: in der Aminosäuresequenz von Haferphototropin AS-PHOT1 und allen bisher bekannten Phototropinen findet sich C-terminal zur LOV2-Domäne zunächst ein weniger stark konservierter Übergangsbereich, die sogenannte H2-Domäne (von Übergangsdomäne, engl. „hinge“). Mit den Oligonukleotiden U-1980/L-2220 wurde dieses Fragment aus dem cDNS-Klon amplifiziert und über die Schnittstellen NcoI/HindIII in pCal-n ligiert (siehe Anhang). Das rekombinante CBP-Fusionsprotein ist 14,3 kDa groß. C-terminal zur H2-Region folgt die stark konservierte eigentliche Kinasedomäne. Analog kloniert wurden Kinasekonstrukte mit unterschiedlichen Anteilen der H2-Übergangsdomäne: pCal-n-KIN1 (Oligonukleotide U-1980/L-3170, rekombinantes 50,3-kDa-CBP-Fusionsprotein), pCal-n-KIN2 (U-2063/L-3170, 47,1 kDa), pCal-n-KIN3 (U-2133/L-3170, 44 kDa) und pCal-n-KIN4 (U-2220/L-3170, 41,3 kDa). Das Vollängenprotein und die exprimierten Kinasebereiche sind dem Anhang und Abbildung 51A zu entnehmen.



**Abbildung 51: Heterologe Expression unterschiedlicher Fragmente der Phototropinkinasedomäne.**

Verschiedene Bereiche der Phototropinkinasedomäne wurden jeweils in den pCal-n-Vektor kloniert, als CBP-Fusionsproteine in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS exprimiert und affinitätsgereinigt. Die Lage der Kinasebereiche innerhalb des Phototropin-vollängenproteins sind unter **A** angegeben. In der Coomassiefärbung (**B**) eines 12 % SDS-Gels mit den unlöslichen Bestandteilen einer Expressionsanalyse (siehe 3.3.5.2) und der löslichen, affinitätsgereinigten Fusionsproteine geben die roten Pfeile jeweils die exprimierten Fusionsproteine an, während die blauen Pfeile mitgereinigte *E. coli*-Proteine markieren.

Bei der Expressionsanalyse fielen bezüglich der Menge überrepräsentierte, mitgereinigte Proteine auf (siehe Abbildung 51B, gekennzeichnet mit blauem Pfeil). Mit den deutlich schwächer exprimierten CBP-Kinaseproteinen und dem rekombinant sehr schwach exprimierten Phototropinvollängenprotein bzw. dem in größeren Mengen exprimierbaren, um die Kinase verkürzten Teil von Phototropin (das sog. NL12 siehe Anhang) wurde eine radioaktive *in vitro* Phosphorylierung versucht (siehe 3.2.6.3). Dazu wurde von der jeweiligen Kinase 1/20 bis 1/10 der Menge des zu phosphorylierenden Proteins eingesetzt. Außerdem wurden in gleicher Menge wie die CBP-Kinase alternativ zu jedem Reaktionsansatz CBP-H2 beigefügt, um mögliche regulatorische Elemente in dieser Domäne für die Kinaseaktivität zu testen. Es konnte insgesamt jedoch in keinem einzigen Fall *in vitro* Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, daß die Kinaseaktivität durch das CBP-Fusionsprotein beeinträchtigt wurde, sollte dies durch Thrombin abgespalten werden. Dieser Thrombinverdau, unter unterschiedlichsten Bedingungen, war nicht zu bewerkstelligen, so daß zur Kontrolle die Kinase 3 als MPB-Fusionsprotein (pMal-Konstrukt aus dem Labor von Winslow Briggs) herangezogen wurde. Auch hier glückten analoge Phosphorylierungsversuche mit dem Fusionsprotein (siehe 3.3.6.1) bzw. die Fusionsproteinabspaltung mit Faktor X nicht (Daten

nicht gezeigt).

Würden Proteinsequenzen außerhalb der H2- und Kinasedomäne die Kinaseaktivität blockieren, könnte dies im Vollängenfusionsprotein von Phototropin eine Einschränkung der Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen bedeuten, sollte aber im CBP-NL12-Fusionsprotein, dem die Kinasedomäne fehlt, nicht der Fall sein. Darüber hinaus rechtfertigte im Rückblick die Verwendung von CBP-NL12 alternativ zum Vollängenprotein bei der Betrachtung der Phosphorylierungsorte ein bei beiden phosphorylierten Proteinen identisches Phosphopeptidmuster (siehe Abbildung 52), das auf gleiche Phosphorylierungsdomänen schließen ließ.

Zunächst wurde die Phosphorylierung des CBP-Vollängenproteins und CBP-NL12 mit kommerziell erhältlichen katalytischen Untereinheiten verschiedenster Kinasen, z. B. der Proteinkinase A oder C, versucht. Beide Proteine konnten mit der cAMP-abhängigen Proteinkinase oder Proteinkinase A (= PKA) aus dem Rinderherzen) erfolgreich (siehe 3.2.6.3), wenn auch das CBP-Vollängenprotein aufgrund der äußerst geringen Menge nur schwach, phosphoryliert werden.

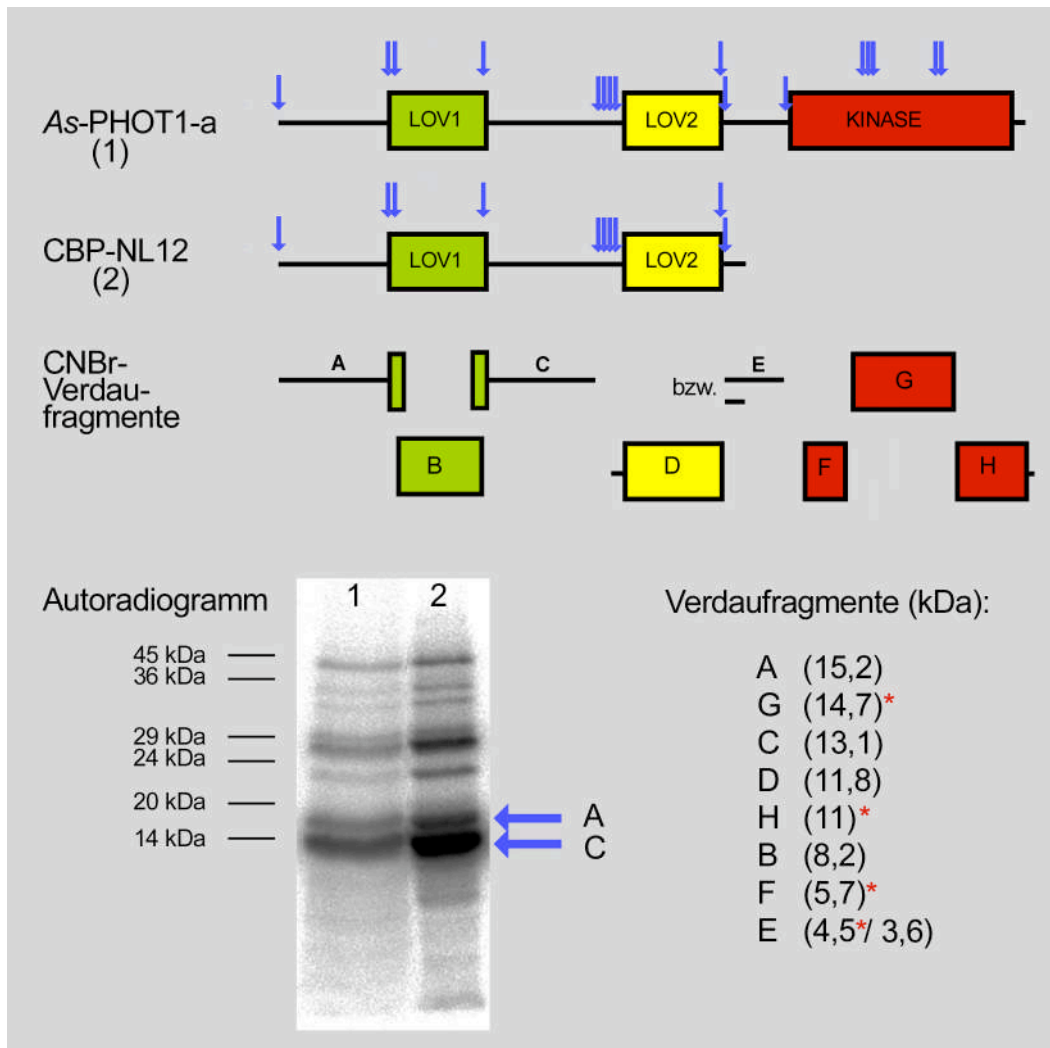
Somit war eine prinzipielle Phosphorylierung von heterolog exprimiertem Phototropin *in vitro* möglich und damit die Zugänglichkeit von Phosphorylierungsstellen gezeigt. Da aber keine Phosphorylierung mit der Phototropinkinase gelang, läßt sich schließen, daß auch noch die kürzeste CBP-Phototropinkinase blockiert bzw. inaktiv sein mußte. Vorstellbar wäre dies bereits durch eine falsche Proteinfaltung, aber auch andere Interaktoren könnten dabei eine Rolle spielen. Daß eine Autophosphorylierung von heterolog exprimiertem Phototropin möglich ist, bewiesen Christie *et al.* (1998) im Insektenzellsystem. Demnach schien die Hemmung der exprimierten Phototropinkinase am Expressionssystem *Escherichia coli* selbst zu liegen. Wurden die dabei stets mitgereinigten Proteine aus dem SDS-Gel eluiert und über Massenspektroskopie (ESI-MS-MS, siehe 3.2.21) sequenziert, konnten SecA (102 kDa), ein mögliches Fe-S-Protein (80 kDa), Hsp70 (69,1 kDa) und GroEL (60 kDa) aus *E. coli* identifiziert werden. Da viele dieser Proteine als „chaperone“ wirken und bei dieser Aufgabe als Faltungshilfe Strukturen annehmen, die sich um das zu faltende und hier artfremde Kinasefusionsprotein legen und es regelrecht einkapseln, erscheint es plausibel, daß gerade diese Proteine mit Affinitätsreinigung werden. Nach einem Vergleich der löslichen und unlöslichen Anteile könnte auch die geringe lösliche Menge der jeweiligen Kinaseproteine auf eine vermutlich aktive Fremdkinase in *E. coli* hindeuten, deren Hauptteil physiologisch durch Bildung von unlöslichen „inclusion bodies“ inaktiviert werden könnte.

#### 4.4.3.2 Heterologe Expression und Phosphorylierung von Phototropin-Subdomänen

Mit der PKA war es nun erstmalig möglich, heterolog exprimiertes Phototropinprotein *in vitro* zu phosphorylieren. Da zwischen der PKA und der Phototropinkinasedomäne hohe

Sequenzähnlichkeit bestand (> 40 % Identität), liegt eine ähnliche Spezifität nahe. Ob allerdings die PKA auch die selben Phosphorylierungsmotive bzw. Phosphorylierungsstellen wie die Phototropinkinase als Substrat erkennt und damit als *in vitro* Kinaseersatz dienen kann, mußte im Vorfeld geklärt werden.

Bei der Sequenzanalyse von Haferphototropin war aufgefallen, daß vorwiegend am Anfang bzw. am Ende der Proteinsubdomänen Methionine vorhanden waren (siehe Abbildung 52). Dies wurde ausgenutzt, um Phototropin durch Cyanbromid (syn. Bromcyan oder CNBr) chemisch zu spalten, wodurch aus dem Methionin, über die Homoserin-Lacton-Bildung und unter Spaltung der C-terminalen Peptidbindung, ein Homoserin entsteht. Die theoretisch ermittelten CNBr-Spaltfragmente (ermittelt über das Programm PeptideMass unter <http://us.expasy.org/tools/peptide-mass.html>) von Phototropin aus Hafer wurden mit den Fragmenten von CBP-NL12, das in deutlich höheren Mengen exprimiert werden konnte als das CBP-Vollängenprotein, verglichen. Abgesehen von der bei CBP-NL12 fehlenden Kinasedomäne war lediglich das Fragment der H2-Subdomäne verkürzt (siehe Abbildung 52). Die übrigen Phototropinfragmente stimmten überein. Aus diesem Grund wurde statt des rekombinanten, nur in geringen Mengen exprimierbaren CBP-Vollängenproteins das CBP-NL12 verwendet. Verglichen wurden radioaktiv <sup>32</sup>P-markiertes Haferphototropin – im Rohextrakt aus 3,5 bis 4 Tage alten, etiolierten Haferkeimlingen (siehe 3.2.6.1) *in vitro* mit <sup>32</sup>P-ATP phosphoryliert – und rekombinantes CBP-NL12, das mit der PKA und <sup>32</sup>P-ATP *in vitro* phosphoryliert (siehe 3.2.6.3) wurde. Beide Proteine wurden nach SDS-PAGE aus dem 8%- (Haferphototropin) bzw. 12 %-Gel (CBP-NL12) ausgeschnitten (siehe 3.2.7.1 und 3.2.16). Gleiche Mengen von Haferphototropin und CBP-NL12 mußten individuell ermittelt werden: der Haferrohextrakt wurde aus 20 Haferkoleoptilenspitzen (0–5 mm) mit 800 µl Puffer bereitet, die Phototropinbanden aller daraus aufgetrennten Spuren wurden ausgeschnitten, vereinigt, eluiert, konzentriert und mit CNBr gespalten. Dieser Ansatz wurde vollständig im 17,5 %-Gel aufgetrennt. Vergleichsweise wurden 1 µg CBP-NL12 *in vitro* phosphoryliert, aufgetrennt, eluiert und mit CNBr verdaut. Von diesem Verdauansatz wurden jedoch verschiedene Volumina in SDS-PAGE, zusammen mit der gespaltenen Haferphototropinprobe aufgetrennt. Anhand der Konzentrationsreihe wurde eine CBP-NL12-Menge von 50 ng als Vergleich in Abbildung 52 gewählt.



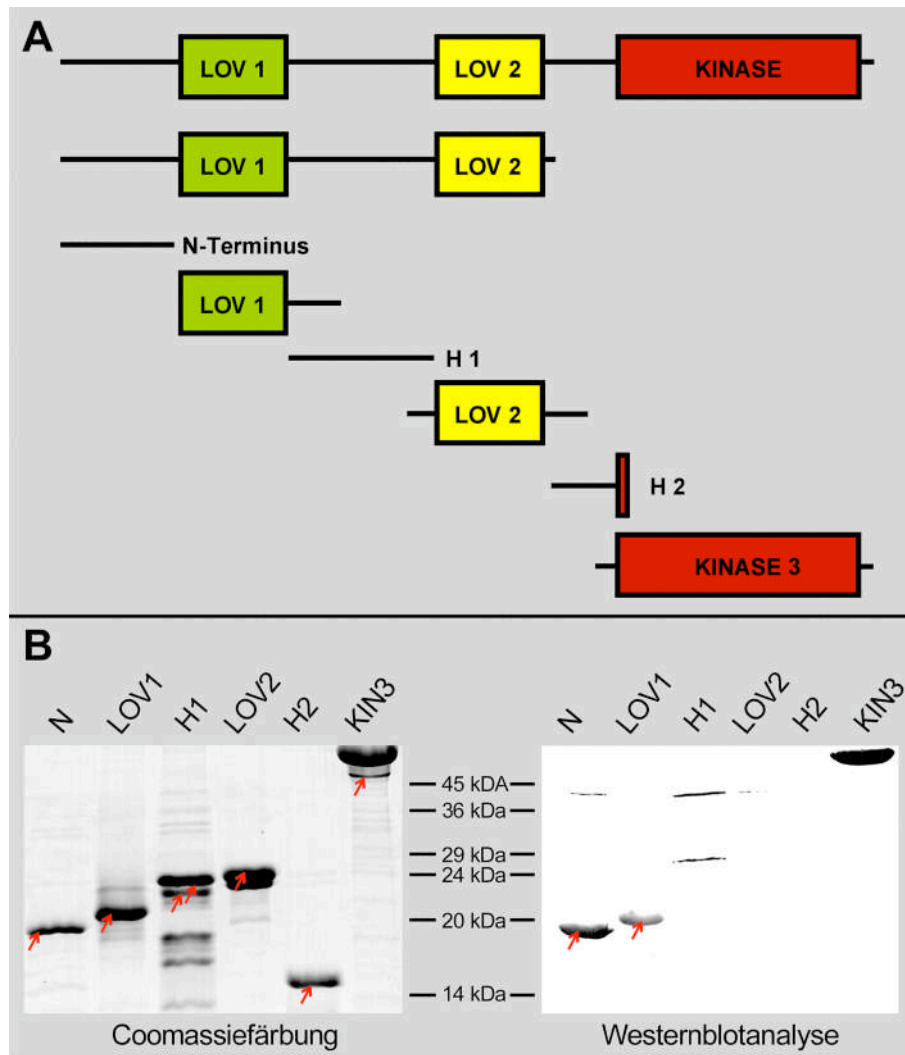
**Abbildung 52: Cyanbromidspaltung von Phototropin aus Hafer (Spur 1) und CBP-NL12 (Spur 2).**

Mit blauen Pfeilen im oberen Teil sind die in der Sequenz vorhandenen Methionine, an denen die CNBr-Spaltung stattfindet, angegeben, gefolgt von den entstehenden Fragmenten bei vollständiger Spaltung. Über die berechnete Größe dieser Fragmente konnten im Autoradiogramm, nach Auftrennung im 17,5 % SDS-Gel, die Fragmente A und C als Phosphorylierungsdomänen ermittelt werden, wobei die gekennzeichneten Fragmente (\*) bei CBP-NL12 nicht vorhanden sind.

Bei beiden mit CNBr gespaltenen Proben ließ sich ein nahezu identisches Muster im Autoradiogramm feststellen. Dies rechtfertigte die Verwendung des in ausreichenden Mengen exprimierbaren CBP-NL12 und die Phosphorylierung mit der PKA für die weitere Untersuchung der Phosphorylierungsstellen von Haferphototropin und schloß prinzipiell bereits die in CBP-NL12 fehlenden Phototropinbereiche – in Abbildung 52 mit \* markiert – als Phosphorylierungsort aus. Die Fragmente im niedrigeren Molekulargewichtsbereich sind eindeutig zuzuordnen: Fragment A als Hauptbereich des N-Terminus vor LOV1 mit 15,2 kDa folgt bei 13,1 kDa das Fragment C, das der H1-Region bis Aminosäure 112 (siehe Anhang) entspricht. Die Signale im Autoradiogramm, die größer als die theoretisch errechneten Spaltragmente sind, lassen auf einen unvollständigen Verdau schließen und sind unter

dieser Prämisse auch zuzuordnen. Die PKA wie auch die Phototropinkinase haben demzufolge dieselben Domänen als Substrat. Die *in vitro* Phosphorylierung findet bei Haferphototropin mit der phototropineigenen Kinase wie auch bei CBP-NL12 mit der PKA ausschließlich in den mit CNBr gespaltenen Fragmenten der N-terminalen Domäne vor LOV1 und der Domäne zwischen den beiden LOV-Domänen statt.

Um die Domänen exakt einzugrenzen, in denen potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden waren, wurden die einzelnen Phototropinsubdomänen (siehe Abbildung 53A) getrennt voneinander jeweils als CBP-Proteine heterolog in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS exprimiert, affinitätsgereinigt und als PKA-Substrat überprüft. Im Zuge der Zusammenarbeit mit dem Labor von Winslow Briggs waren folgende Konstrukte bereits kloniert worden: die beiden LOV-Domänen als Konstrukte pCal-n-LOV1 (CBP-Fusionsprotein beinhaltet Aminosäure 134–256) und pCal-n-EK-LOV2 (Aminosäuren 409–559) (siehe 4.3.1 und Christie *et al.*, 1999) sowie der N-Terminus vor Beginn der LOV1-Domäne als pCal-n-N (Aminosäure 1–127). Ergänzt wurde dies mit der fehlenden H1-Domäne zwischen den LOV-Domänen (Aminosäure 243–413) über das Konstrukt pCal-n-H1 (amplifiziert aus dem cDNS-Klon von *As-PHOT1-a* über die Oligonukleotide U-1129H1/L-1641H1, in pCal-n kloniert über die Schnittstellen NcoI/HindIII). Die bereits unter 4.4.3.1 beschriebenen Konstrukte pCal-n-H2 (Aminosäure 525–607) und pCal-n-KIN2 (Aminosäure 554–923) vervollständigten die Serie der Subdomänen. Die Expression aller Konstrukte als CBP-Fusionsproteine erfolgte in BL21(DE3)pLysS. Die anschließend über Calmodulin affinitätsgereinigten Fusionsproteine sind nach Auftrennung in SDS-PAGE in einer Coomassiefärbung in Abbildung 53B zu sehen. In einer zusätzlichen Westernblotanalyse konnte auch die Anti-NPH1-Spezifität überprüft werden: der Antikörper war gegen den N-terminalen Bereich einschließlich Anteilen von LOV1 mit heterolog exprimiertem, denaturiertem *At-PHOT1* generiert worden und exakt diese Epitope werden auch als CBP-Einzeldomänen erkannt. Offenbar schienen auch die Epitope hauptsächlich in CBP-N zu liegen, da bei CBP-LOV1 die Anti-NPH1-Erkennung im Verhältnis zur Proteinmenge deutlich reduziert ist.



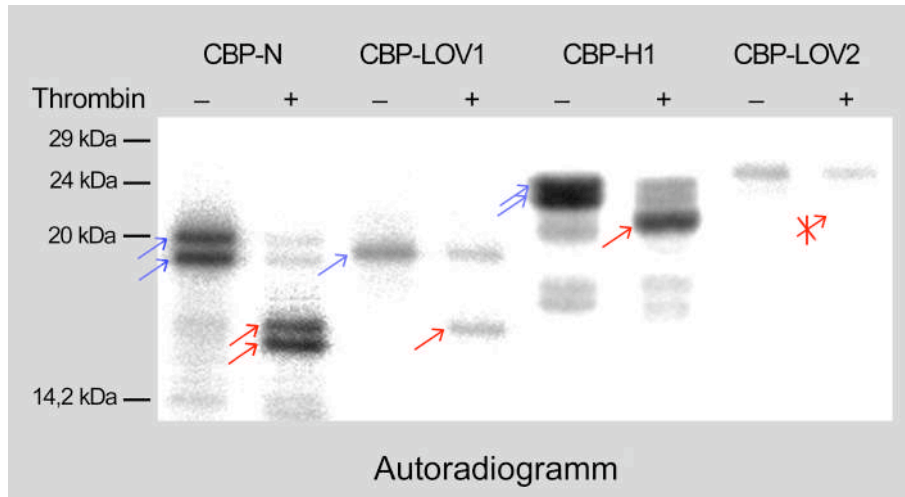
**Abbildung 53: Heterologe Expression verschiedener Subdomänen von Haferphototropin und deren Erkennung durch Anti-NPH1.**

Um das Epitop des Antikörpers Anti-NPH1 zu bestimmen, wurden die Bereiche der einzelnen Phototropindomänen (A) in pCal-Vektoren kloniert, in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS heterolog exprimiert und über das CBP affinitätsgereinigt (B). Diese Fusionsproteine sind, in einem 17,5 % SDS-Gel aufgetrennt, in der Coomassiefärbung mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Wurden die gleichen Proben einer Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 unterzogen, wurden vom Antikörper nur der N-Terminus (N) und, schwächer die LOV1-Domäne erkannt (rote Pfeile im Westernblot). Des Weiteren wurden wenige mitgereinigte *E. coli*-Proteine erkannt.

Alle Fusionsproteine wurden mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und der PKA *in vitro* phosphoryliert (siehe 3.2.6.3) und im Autoradiogramm nach SDS-PAGE ausgewertet (siehe Abbildung 54). Hierbei war bei CBP-N und CBP-H1 ein sehr starker und bei CBP-LOV1 ein schwacher Einbau von radioaktivem Phosphat zu verzeichnen. Eine äußerst geringe Phosphorylierung konnte allerdings bei jedem Konstrukt festgestellt werden. Bei näherer Betrachtung des Calmodulinbindeproteins stellte sich heraus, daß dieses Phosphorylierungsstellen für die PKA beinhaltet. Aus diesem Grund wurde erneut eine radioaktive *in vitro* Phosphorylierung durchgeführt, jedoch zuvor mit Thrombin das CBP abgespalten (siehe 3.2.13). Erneut



zeigten die N-terminale und die H1-Domäne sehr starken radioaktiven Einbau, hingegen die LOV1-Domäne vergleichsweise schwachen. Die nicht abgebildeten Subdomänen H2 und die verschiedenen Kinasen zeigten gleich wie LOV2 nach Thrombinspaltung keinen Einbau.



**Abbildung 54:** *In vitro* Phosphorylierung von rekombinanten Subdomänen mit der PKA und  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP.

Der N-Terminus, LOV1, H1 und LOV2 als CBP-Fusionsproteine wurden nach radioaktiver *in vitro* Phosphorylierung direkt (blauer Pfeil) oder nach Abspaltung des Bindeproteins durch Thrombin im Autoradiogramm betrachtet (roter Pfeil). Deutlich wird der starke radioaktive Phosphateinbau beim N-Terminus und H1 im Gegensatz zum schwachen Einbau bei LOV1 bzw. dem fehlenden Einbau bei LOV2 nach dem Thrombinverdau.

Da bei der Cyanbromid-Spaltung von phosphoryliertem Phototropinprotein ebenfalls der N-Terminus und die H1-Domäne übereinstimmend als Phosphorylierungsdomänen lokalisiert wurden, fällt bei einem Vergleich der Subdomänenfusionsproteine auf, daß CBP-LOV1 nicht nur die LOV1-Domäne beinhaltet, sondern auch den Beginn der H1-Region umfaßt. Möglicherweise sind in diesen 32 Aminosäuren potentielle Phosphorylierungsstellen lokalisiert.

Eine weitere Übereinstimmung bei der *in vitro* Phosphorylierung mit der PKA und der Phototropinkinase ist das Auftreten einer Mobilitätsreduktion durch die Phosphorylierung. In erster Linie konnte bei der phosphorylierten Form des CBP-N ein Molekulargewichtsanstieg um 2 kDa im 17,5 % SDS-Gel beobachtet werden, der unter 4.4.3.3.1 ausführlich dargelegt wird.

#### 4.4.3.3 Generierung von Phosphorylierungsmutanten

In der Literatur wurde bezüglich Phosphorylierungsstellen bislang lediglich die Phosphoaminosäureanalyse nach Totalproteolyse von phosphoryliertem Mais- und Erbsenphototropin beschrieben (Palmer *et al.*, 1993a; Short *et al.*, 1994), wobei hauptsächlich Phosphoserin und in sehr geringem Umfang Phosphothreonin gefunden worden war. Zur Ermittlung der genauen Phosphorylierungsstellen galt es, in den

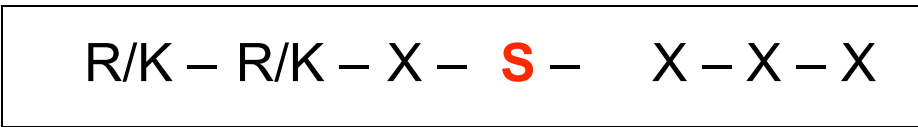
Phosphorylierungsdomänen, dem N-Terminus und H1, zunächst mögliche Phosphorylierungsmotive der PKA, die analog zur Phototropinkinase die gleichen Phototropindomänen als Substrat zeigt, zu finden. Durch zielgerichtete Mutagenese sollten potentielle Phosphorylierungsstellen verändert werden, um im Vergleich zum Wildtyp im positiven Falle Unterschiede festzustellen und daraus auf Substrataktivität schließen zu können.

Resümiert man das Phosphorylierungsmotiv der PKA verschiedener Quellen (unter [www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/kinase\\_dir/PKA.html](http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/kinase_dir/PKA.html); Stryer, L., 1996; Pearson & Kemp, 1991), phosphoryliert die PKA Serinreste mit einer Häufigkeit von 92 %, hingegen Threoninreste nur mit 8%. In Tabelle 15 sind die am häufigsten gefundenen Aminosäuren an den Positionen -3 bis +3 angegeben, bezogen auf die Phosphorylierungsstelle mit der Position 0.

**Tabelle 15: Häufigste Aminosäuren im Phosphorylierungsmotiv der PKA**

-3	-2	-1	0	1	2	3
67,7 % R	56,4 % R	10,3 % L	92,1 % S	17,0 L	15,2 %S	12,7 %S
8,5 % K	17,6 % K	9,7 % A	7,9 % T		12,7 %A	10,3 % A
		9,7 % G				
		9,7 % R				
		9,7 % S				
		9,1 % P				
		5,5 % K				

Aus diesen vorangegangenen Werten wurde als häufigstes Phosphorylierungsmotiv der PKA folgendes Ergebnis abgeleitet, wobei X für variable Aminosäuren steht und S das phosphorylierte Serin darstellt:



Mit Hilfe dieses Motivs und durch Sequenzvergleiche mit anderen Phototropinen galt es nun die Phosphorylierungsdomänen auf mögliche Phosphorylierungsstellen zu untersuchen und Punktmutationen zu generieren.

#### 4.4.3.3.1 In der N-terminalen Domäne

Wurden die Aminosäuren im N-Terminus vor der LOV1-Domäne der bislang vollständig sequenzierten Phototropine aus verschiedenen Pflanzen miteinander verglichen (siehe Abbildung 55), schienen als mögliches Substrat ein oder mehrere Serine wesentlich



**Tabelle 16: Theoretische Vorhersage von Phosphorylierungsstellen im N-Terminus von Haferphototropin (As PHOT1a)**

Position des Serins innerhalb des N-Terminus von As PHOT1a	Kontext		Summe aller Häufigkeiten nach 4.4.3.3		wahrscheinliche Phosphorylierung nach NetPhos 2.0
27	PRD <b>S</b> RGS		182,4		98,4
30	SRG <b>S</b> LEV	□	191,0	□	99,0
37	FNP <b>S</b> SSS		141,2		35,7
57	RSAP <b>S</b> PFI		184,0		96,6
101	ARS <b>S</b> GGG		178,9	□	99,0
106	GGG <b>S</b> ARS		125,9		66,8
109	SAR <b>S</b> SSD		135,2	□	99,6
110	ARS <b>S</b> SDD		178,2	□	99,7
111	RSS <b>S</b> DDK	□	191,4		98,0
124	PRV <b>S</b> EEL		172,7		97,3

(Die Pfeile geben die höchsten ermittelten Werte an)

Welche Phosphorylierungsstellen nun von der PKA als Substrat erkannt werden, galt es indirekt zu ermitteln: Über zielgerichtete Mutagenese wurde das Serin in einer Punktmutation gegen Alanin ausgetauscht. Handelte es sich bei dem ausgetauschten Serin um ein PKA-Substrat, sollte die Mutante geringere radioaktive Phosphorylierung zeigen als analog phosphorylierter Wildtyp.

Unter allen konservierten Serinen in Haferphototropin (As PHOT1a) wurden somit sieben Serine für Punktmutationen ausgewählt: fünf Serine (Position 27, 30, 101, 110, 124, siehe Anhang) kommen in klassischen Phosphorylierungsmotiven vor und für zwei andere Serine (Position 37 und 106) wurden sehr geringe Wahrscheinlichkeiten vorhergesagt. Die Punktmutationen wurden jeweils im Konstrukt pCal-n-N zunächst als Einzelmutationen durchgeführt (siehe 3.3.3). Als äußerst problematisch erwies sich hierbei die PCR: der hohe GC-Gehalt der DNS-Sequenz des N-Terminus in Hafer erforderte es, abweichend von den Standardbedingungen, die optimalen PCR-Bedingungen für jede einzelne Mutation individuell zu ermitteln. Aus diesem Grunde sind diese nachfolgend angegeben (siehe Tabelle 17). Alle übrigen Schritte der Mutagenese wurden zu Standardbedingungen (siehe 3.3.3.1) durchgeführt.

**Tabelle 17: PCR-Bedingungen für die zielgerichtete Mutagenese von pCal-n-N<sup>\*)</sup>**

Mutation	DNS-Denaturierung	Primeranlagerung	DNS-Verlängerung
S27A S30A	98 °C 30 s	56 °C 60 s	70 °C 13 min
S37A	96 °C 30 s	60 °C 60 s	68 °C 13 min
S101A	96 °C 30 s	65 °C 60 s	68 °C 13 min
S104-110A S124A	98 °C 30 s		68 °C 14 min
S27-30A	98 °C 30 s		73 °C 14 min

<sup>\*)</sup> aufgrund des stark reduzierten Phosphateinbaus bei der *in vitro* Phosphorylierung von den Mutanten N-S27A und N-S30A wurde auf die Mutation weiterer Motive (siehe Tabelle 16) verzichtet

Die erfolgreich mutierten N-terminalen Domänen wurden als CBP-Fusionsproteine in einer Großanzucht (Induktion bei OD<sub>580nm</sub> 0,4 und 4 h Wachstum nach Induktion) exprimiert und von jeder Mutante konnten, ähnlich dem Wildtyp, durchschnittlich 500–550 µg lösliches Protein aufgereinigt werden.

Anschließend setzte man vom Wildtyp CBP-N und den einzelnen Mutanten dazu jeweils gleiche Proteinmengen (25 µg) zu einer *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und der PKA (siehe 3.2.6.3) ein, trennte die Proben in einem 17,5 %SDS-Gel auf und analysierte die Proben im Autoradiogramm (siehe Tabelle 18).

**Tabelle 18: Einbauraten<sup>\*)</sup> von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P in den N-Terminus bei der *in vitro* Phosphorylierung mit der PKA von 25 µg rekombinantem Protein.**

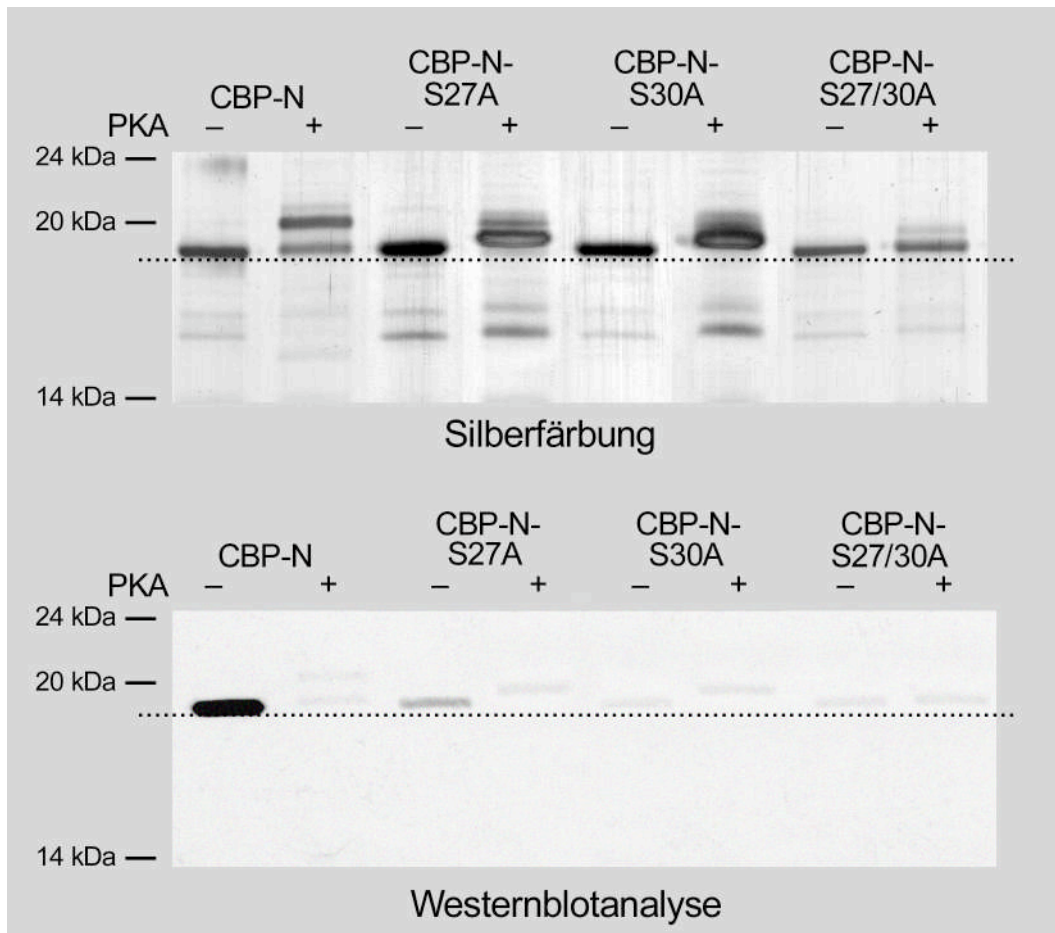
N-Terminus	N-S27A	N-S30A	N-S37A	N-S101A	N-S106/110A	N-S124A
100 %	66 %	51 %	102 %	97 %	96 %	89 %

<sup>\*)</sup> ausgewertet wurden 2 parallele Phosphorylierungsreihen

Hierbei konnte mit 66 % bzw. 51 % (bezogen auf 100 % Einbau beim Wildtyp) bei den Mutanten CBP-N-S27A und CBP-N-S30A deutlich geringerer radioaktiver Gesamteinbau verzeichnet werden, womit die Serine 27 und 30 offensichtlich Phosphorylierungsstellen im N-Terminus darstellen. Beide Serine sind im Kontext X-R-X-S-X-X-X zu finden, das bislang als gemeinsames Phosphorylierungsmotiv abgeleitet werden kann. Bei allen übrigen Mutanten wurde ein radioaktiver Gesamteinbau von 89–102 %, bezogen auf den N-Terminus-Wildtyp, festgestellt. Aufgrund des dramatisch erniedrigten Einbaus bei N-S27A und N-S30A wurde von einer Mutation der weniger dem gemeinsamen Phosphorylierungsmotiv entsprechenden potentiellen Phosphorylierungsstellen abgesehen.

Anhand einer Proteinfärbung war bereits unter 4.4.3.2 bei der Charakterisierung der Phosphorylierung der CBP-N-Subdomäne ein Mobilitätsverlust der phosphorylierten Form um etwa 2 kDa beobachtet worden. Bei genauerer Betrachtung fielen hierbei zwei Banden auf, wovon die obere Bande einen Mobilitätsverlust dieser Größenordnung repräsentierte. Jedoch findet sich auch eine zweite Bande mit einem sehr geringen, aber deutlich erkennbaren Mobilitätsverlust. Bei radioaktiver Phosphorylierung weisen beide eine annähernd gleich starke Phosphorylierung auf. Offensichtlich entstehen bei der Phosphorylierung zwei unterschiedliche Proteinspezies. Bei beiden Mutanten findet man jeweils einen im Vergleich zum Wildtyp halb so großen, nur etwa 1 kDa umfassenden Mobilitätsverlust der phosphorylierten Bande, der deutlich zwischen den beiden Wildtypspezies liegt (siehe Abbildung 56 Silberfärbung). Wurde zusätzlich das CBP durch einen vorgeschalteten Thrombinverdau (siehe 3.2.13) abgespalten, konnte die Phosphorylierungsstärke der Mutanten mit etwa der Hälfte der Phosphorylierungsstärke der beiden Banden des Wildtyps quantifiziert werden (siehe Abbildung 57). Auch konnte stets eine geringfügig stärkere radioaktive Markierung bei N-S27A im Vergleich zu N-S30A reproduziert werden. Wurde jedoch postuliert, daß alle Phosphorylierungsstellen in gleichem Maße phosphoryliert werden, handelt es sich offenbar im N-Terminus um zwei Phosphorylierungsstellen.

Um letzteres und die Effekte eines gleichzeitigen Austausches beider Serine gegen Alanine zu analysieren, wurde die Doppelmutante CBP-N-S27/30A generiert. Die PCR-Bedingungen dazu (siehe 3.3.3.1) sind in Tabelle 17 angegeben. Wurde das gereinigte Fusionsprotein in einer *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP eingesetzt, konnte nur mehr eine äußerst geringe Mobilitätsreduktion beobachtet werden, die maximal auf wenige hundert Dalton geschätzt werden konnte (siehe Abbildung 56 Silberfärbung) und dem Mobilitätsverlust der kleineren phosphorylierten Wildtypbande (unter CBP-N) entsprach.

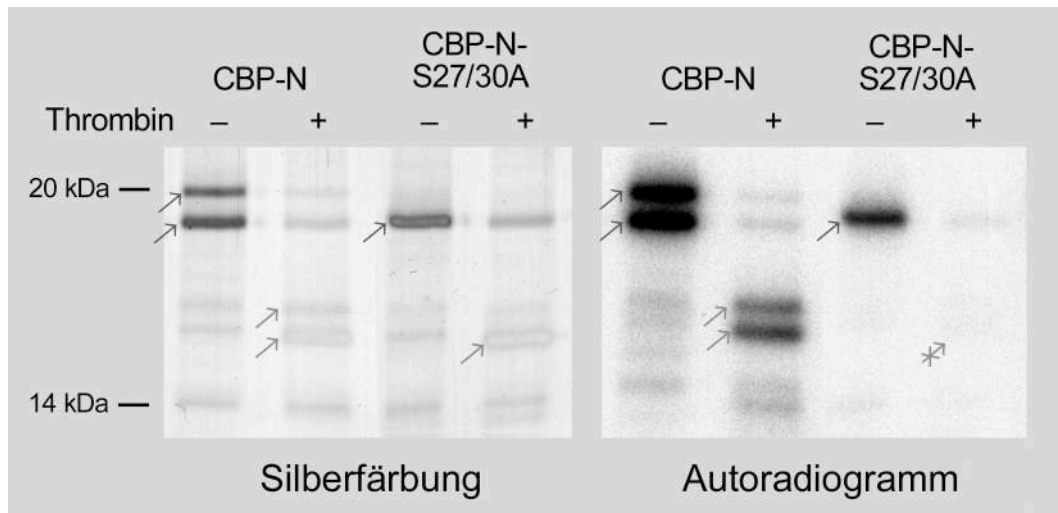


**Abbildung 56 *In vitro* Phosphorylierung von heterolog exprimiertem CBP-N und verschiedenen Mutanten.**

Die als CBP-Fusionsprotein exprimierte N-terminale Domäne von Haferphototropin (CBP-N) konnte mit der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert werden. Dieses phosphorylierte Protein tritt in zwei verschieden stark mobilitätsreduzierten Spezies auf (Silberfärbung). In Anti-NPH1-Westernblotanalyse wird das nichtphosphorylierte Protein gut erkannt, hingegen nach Phosphorylierung ist die Erkennung dramatisch reduziert. Beide Einzelmutanten CBP-N-S27A und -S30A weisen phosphoryliert nur mehr eine halb so ausgeprägte Mobilitätsreaktion als der Wildtyp in einer einzigen Bande auf, wohingegen alle Proteinbanden von Anti-NPH1 ebenso kaum noch erkannt werden. Noch am besten, im Vergleich zum Wildtyp CBP-N aber dennoch verhältnismäßig schwach, wurde das unphosphorylierte CBP-N-S27A erkannt. Die Mobilität der Doppelmutante CBP-N-S27/30A war nach Phosphorylierung minimal und sowohl die unphosphorylierte als auch die phosphorylierte Proteinform war in ihrer immunologischen Reaktion stark reduziert.

Zum anderen konnte nach Abspaltung des CBP durch Thrombin eine schwache radioaktive Markierung gemessen werden, deren Stärke im Vergleich weniger als 1 % des analog behandelten Wildtyps bei gleichen Phosphorylierungsbedingungen betrug (siehe Abbildung 57).





**Abbildung 57: *In vitro* Phosphorylierung von CBP-N und CBP-N-S27/30A nach vorgeschalteten Thrombinverdau.**

Nach der Abspaltung des CBP von CBP-N und CBP-N-S27/30A und anschließender *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und der PKA wurden in Silberfärbung die Subdomänen nicht mehr schwarz sondern gelb angefärbt. Diese Proteine sind hier im Silbergel mit roten Pfeilen markiert. Während man beim Wildtyp vor und nach dem Thrombinverdau (Pfeile) noch sehr starken radioaktiven Phosphateinbau im Autoradiogramm beobachten konnte, war bei der thrombinverdauten Mutante N-S27/30S trotz deutlicher und mit dem Wildtyp in der Stärke vergleichbarer Proteinbande keine Phosphorylierung mehr meßbar.

Sollten tatsächlich bei der *in vitro* Phosphorylierung alle Phosphorylierungsstellen gleichwertig phosphoryliert werden, müßte es sich bei der Doppelmutante CBP-N-S27/30A um die Phosphorylierungsnullmutante handeln. Dies wird zum einen gerade dadurch in Frage gestellt, daß bei phosphoryliertem N-S27/30A die gemessene radioaktive Markierung weniger als 1 % des Wildtyps – und somit nicht Null – beträgt und zudem eine sehr geringe Mobilitätsreduktion festzustellen ist. Dies könnte ein Hinweis auf weitere zusätzliche Phosphorylierungsstellen sein. Bei den Einzelmутanten weist N-S27A stets eine etwas stärkere Phosphorylierung als N-S30A auf. Demnach ist die Phosphorylierbarkeit der einzelnen Stellen unterschiedlich. Vorstellbar wäre dies beispielsweise über individuelle Zugänglichkeit innerhalb des Proteins oder eine Hemmung durch Konformationsänderung. Serin 30 stellt offenbar eine zugänglichere Phosphorylierungsstelle als Serin 27 dar. Insgesamt ist es nicht auszuschließen, daß weitere Phosphorylierungsstellen mit geringer Phosphataffinität in den Epitopen von Anti-NPH1 oder außerhalb vorhanden sein könnten.

Oder aber handelt es sich bei der geringen radioaktiven Markierung von phosphoryliertem N-S27/30A um unspezifische Hintergrundphosphorylierung. Diese kann auftreten, wenn das eigentliche, spezifische Phosphorylierungsmotiv fehlt und ATP im Überschuß – hier vier ATP-Moleküle pro Substratmolekül – vorhanden ist.

So wie die Mobilitätsreduktion verhielt sich auch die Antikörpererkennung beim rekombinanten N-Terminus wie Phototropin aus Hafer: das unphosphorylierte CBP-N-Protein wurde in Westernblotanalyse ausgesprochen gut von Anti-NPH1 – ein polyklonaler

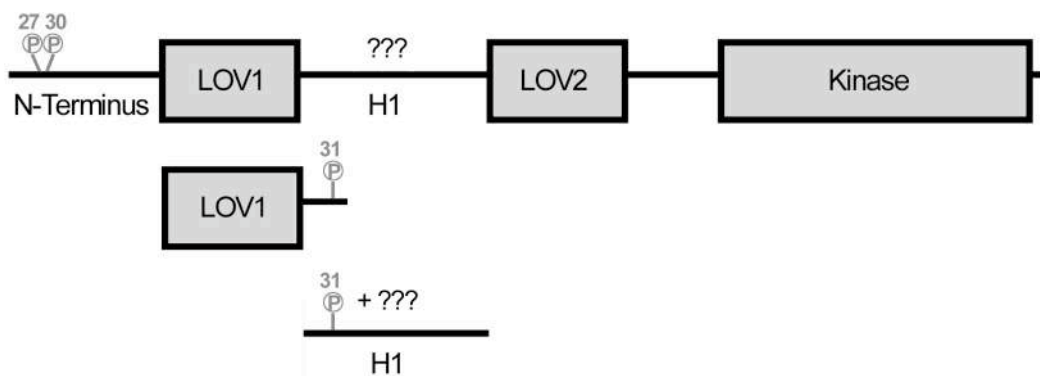


Antikörper gegen verschiedene Epitope innerhalb des N-Terminus und LOV1 von Phototropin – erkannt, hingegen die phosphorylierte Form nicht mehr (siehe Abbildung 56). Mutanten der Positionen 27 und 30 zeigten ebenso nach durchgeführter Phosphorylierungsreaktion keine Antikörpererkennung mehr. Daß dies auch bei der Doppelmutante CBR-N-S27/30A der Fall war, läßt aber nicht zwangsläufig auf Phosphorylierung über die selektive Antikörpererkennung schließen: da offensichtlich im nichtphosphorylierten Zustand bereits bei CBP-N-S27A die Antikörpererkennung nachließ und bei CBP-N-S30A völlig reduziert war, bedeutet dies vielmehr, daß viele Epitope des Antikörpers – bereits durch die Substitution von Serin gegen Alanin – nicht mehr erkannt wurden. Dieser Effekt war bei Serin 30 deutlich stärker ausgeprägt als bei dem Austausch des Serins 27 gegen Alanin. Der Phosphorylierungszustand läßt sich vor allem bei der Mutation an Position 30 nicht über die Antikörpererkennung sondern eher über die Mobilitätsänderung, in jedem Fall aber über die radioaktive Phosphorylierung charakterisieren.

Werden diese Ergebnisse auf Phototropin in monokotylen Pflanzen projiziert, scheinen die beiden Serine 27 und 30 im Kontext Phosphorylierungssubstrate darzustellen, wobei letzteres verstärkt für den Verlust der Antikörperreaktion verantwortlich zu sein scheint, da es in mehreren Epitopen von Anti-NPH1 liegen muß. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß es weitere Phosphorylierungsstellen außerhalb dieser Epitope gibt, die jedoch schwächer phosphoryliert werden.

#### 4.4.3.3.2 In der H1-Region

Durch Phosphorylierung mit der PKA wurde neben dem N-Terminus auch in der rekombinanten LOV1-Protein – nach Phosphorylierung und Abspaltung des CBP durch Thrombin – Phosphorylierung nachgewiesen (siehe Abbildung 54 und 4.4.3.2). Der allgemein recht schwache radioaktive Einbau hielt nach Austausch aller Serine innerhalb der LOV-Domäne (Einzelmutationen Serin 7, 10, 20, 31, 45, 63, 106 und 140 gegen Alanin; Nummerierung siehe Anhang) analog zum Wildtyp an. In CBP-LOV1 ist bei genauerer Betrachtung ein kurzer Teil der Aminosäuresequenz der in Phototropin nachfolgenden H1-Region enthalten (siehe Abbildung 58).



**Abbildung 58: Übersicht über den Aufbau von Haferphototropin und der beiden rekombinanten LOV1 und H1-Proteine.**

Nach Austausch des Serins an Position 31 der H1-Region, das gerade noch im rekombinanten LOV1-Protein enthalten ist, konnte im *in vitro* Phosphorylierungsversuch kein Phosphat mehr in dieses rekombinante LOV1 eingebaut werden.

Nach Mutation des Serins mit Position 31 der H1-Region zu Alanin war keine Phosphorylierung mehr meßbar (Daten nicht gezeigt). Somit war die LOV1-Domäne selbst eindeutig kein Substrat für die PKA, was auch die Cyanbromidspaltung von Haferphototropin manifestierte. Ebenso wiesen alle Serine in LOV1 nicht das im N-Terminus ermittelte Phosphorylierungsmotiv auf. Im Gegensatz zum N-Terminus war die H1-Region als Übergangsdomäne zwischen den beiden chromophorbindernden LOV-Domänen nicht mehr Bestandteil des rekombinanten Phototropinfragmentes, gegen das der Antikörper Anti-NPH1 generiert worden war. Demzufolge standen bei geplanten H1-Mutationen über eine Westernblotanalyse keine zusätzlichen Informationen zur Verfügung.

Betrachtete man zunächst die ermittelten Phosphorylierungsmotive im N-Terminus und ergänzte das vorab ermittelte neue Phosphorylierungsmotiv von Serin 31 in H1, bestätigte sich das Motiv X-R-X-S-X-X-X. Die H1-Region aus Phototropinen verschiedener Pflanzen (siehe Abbildung 59) wurde auf weitere mögliche Phosphorylierungsmotive hin analysiert.



**Tabelle 19: Theoretische Vorhersage von Phosphorylierungsstellen in der H1-Domäne von Haferphototropin (As PHOT1a)**

Position des Serins innerhalb der H1-Domäne von As PHOT1a	Kontext	Summe aller Häufigkeiten nach 4.4.3.3	wahrscheinliche Phosphorylierung nach NetPhos 2.0
31	ARSSVSE	192,2	99,7
57	KRKSEQES	185,5	99,7
74	KRSSESG	193,4	99,6
82	RRNSKSG	□ 248,3	□ 99,8
89	ARTSLQK	176,9	68,6
106	SRKSGLY	170,4	99,1

(Die Pfeile geben die höchsten ermittelten Werte an)

Im H1-Fragment, das in der CNBr-Spaltung von phosphoryliertem CBP-NL12 oder Haferphototropin entstand und das neben dem N-Terminusfragment Phosphorylierung aufwies, sind alle diese hier nun in Betracht gezogenen potentiellen Motive enthalten.

Übereinstimmend waren in der H1-Region für das Motiv um Serin 82 die theoretischen Voraussagen am höchsten. Aber auch für das bereits anhand von CBP-LOV1 ermittelte Serin 31 wurde die gleiche hohe Wahrscheinlichkeit als Phosphorylierungsstelle prognostiziert wie für Serin 57. Diese Voraussagen galt es nun über Einzelmutationen in CBP-H1 zu überprüfen. Alle sechs Serine wurde jeweils gegen Alanin über zielgerichtete *in vitro* Mutagenese (siehe 3.3.3) ausgetauscht, wobei die PCR-Bedingungen bis auf eine DNS-Denaturierungszeit von 40 Sekunden bei 97 °C den Standardbedingungen (siehe 3.3.3.1) entsprachen.

Die Expression von CBP-H1 und der Mutanten stellte sich als relativ schwierig heraus, da das Fusionsprotein zwar größtenteils löslich exprimiert wurde, allerdings das Protein selbst die Neigung zur Degradation zeigte. In einer Großanzucht (Induktion bei OD<sub>580nm</sub> 0,5 und anschließend 5 h Wachstum) waren maximal 60 µg lösliches CBP-H1 affinitätsgereinigt worden. In den meisten Fällen wurde CBP-H1 nicht als eine konkrete Bande von 24 kDa, sondern als Doppelbande von 24 kDa und 20 kDa gefunden werden (siehe Abbildung 53). Mit zunehmendem Alter der Proteinprobe nahm auch die Intensität der kleineren Bande zu. Nur in wenigen Fällen jedoch konnte CBP-H1 hauptsächlich als 24-kDa-Protein gereinigt werden. Da beide H1-Proteine bei einer Expressionsanalyse (nach 3.3.5.2) bereits im ungereinigten Zellysat lokalisierbar waren, scheint wohl eine Instabilität im C-terminalen Ende des Proteins für das Vorhandensein zweierlei Spezies verantwortlich zu sein. Wurde CBP-H1 radioaktiv *in vitro* phosphoryliert (siehe 3.2.6.3), wurde stets bei beiden Banden

Phosphorylierung gemessen. Demnach wurden zur Ermittlung der H1-Phosphorylierung beide Banden zusammen ausgewertet. Verglichen mit der Phosphorylierung des N-Terminus betrug die Phosphorylierungsstärke, stets mit ATP-Überschuß, bei CBP-H1 zwischen 70–75 %. Der Mobilitätsunterschied zwischen phosphorylierter und nichtphosphorylierter Form war sehr gering und konnte nicht als Phosphorylierungskriterium herangezogen werden. Überdies konnte auch die Koaffinitätsreinigung vor allem eines 90-kDa-Proteins beobachtet werden, das allerdings in weitaus geringeren Mengen auftrat als bei der Expression der Kinasedomänen (siehe 4.4.3.1) und interessanterweise verstärkt auftrat, wenn kaum CBP-H1 exprimiert war und umgekehrt. Das Auftreten von zusätzlichen Banden erschwerte die Konzentrationsbestimmung von CBP-H1, da standardmäßig bei nichtchromophortragenden Proteinen lediglich die Gesamtproteinkonzentration ermittelt werden konnte. Aus diesem Grund wurde zusätzlich die Konzentration der CBP-H1-Banden anhand von einer Konzentrationsreihe mit BSA im gefärbten Gel bestimmt und mit dem Gesamtprotein abgeglichen.

Wurden 25 µg des CBP-H1-Wildtyp und der Einzelmutanten bei annähernd gleicher Proteinkonzentration *in vitro* mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP und der PKA phosphoryliert (siehe 3.2.6.3), wurden erwartungsgemäß bei der Mutante CBP-H1-S31A, aber auch bei Serin 57, 74, 82 und 106 niedrigere Einbauraten als beim Wildtyp gemessen, wobei allerdings keine Stufen in der Abnahme zu erkennen waren (siehe Tabelle 20).

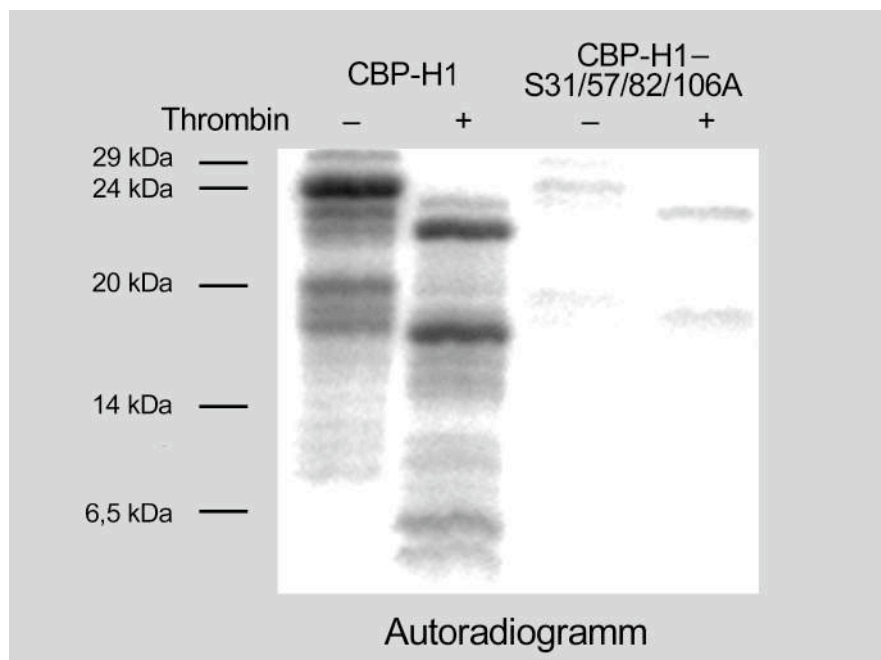
**Tabelle 20: Einbauraten<sup>\*)</sup> von  $\gamma$ -<sup>32</sup>P in die H1-Region bei der *in vitro* Phosphorylierung mit der PKA von 25 µg rekombinantem Protein.**

H1-Wildtyp	H1-S31A	H1-S57A	H1-S74A	H1-S82A	H1-S89A	H1-S106A
100 %	55 %	73 %	73 %	50 %	94 %	60 %

<sup>\*)</sup> ausgewertet wurden 6 parallele Phosphorylierungsreihen

Die größte Abnahme von 50% wurde bei CBP-H1-S82A verzeichnet, gefolgt von CBP-H1-S31A mit 55 %, CBP-H1-S106A mit 60 % und CBP-H1-S57A bzw. CBP-H1-S74A mit 73 %. Lediglich bei CBP-S89A wurde geringfügig weniger radioaktiver Einbau durch Phosphorylierung gemessen. Dadurch wurde deutlich, daß zum einen die ATP-Menge, die weniger als 4 Moleküle ATP pro Substrat betrug, keinesfalls ausreichte, um quantitativ zu phosphorylieren, und daß zum anderen die einzelnen Phosphorylierungsstellen unterschiedlich stark phosphoryliert werden. Aus diesem Grunde wurden für weitere Phosphorylierungen die ATP-Menge erhöht und Mehrfachmutanten generiert, um die Effekte der einzelnen Mutationen zu verstärken. Ausgangsbasis dafür war das Konstrukt pCal-n-H1-S31A. Bereits bei einer radioaktiven Phosphorylierung der Zweifachmutanten waren

zwischen CBP-S31A und der Mutante CBP-H1-S31/74A kaum Unterschiede im radioaktiven Einbau feststellbar, wohingegen alle übrigen Serin 31-Zweifachmutanten (CBP-H1-S31/57A, CBP-H1-S31/82A und CBP-H1-S31/106A) bei gleichen Bedingungen geringer markiert wurden. Serin 74 schien demnach doch kein Substrat der PKA zu sein. Nach der Generierung und Prüfung über *in vitro* Phosphorylierung von Dreifach- und Vierfachmutanten zeichnete sich folgendes Ergebnis ab: im Vergleich zum Wildtyp CBP-H1 und allen übrigen Mutanten konnte bei der Vierfachmutante CBP-H1-S31/57/82/106A nach *in vitro* Phosphorylierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (ATP-Menge insgesamt etwa 200  $\mu$ M bei 25  $\mu$ g H1-Protein) und der PKA, wie auch nach einem vorgeschalteten Thrombinverdau (siehe 3.2.13) zur Abspaltung des CBP, das auch mit der PKA schwach phosphorylierbar ist, nur mehr sehr geringe Phosphorylierung von 1,74 %, bezogen auf den Wildtyp, gemessen werden (siehe Abbildung 60).



**Abbildung 60: *In vitro* Phosphorylierung des thrombingespaltene CBP-H1 und CBP-H1-S31/57/82/106A.**

Bei dem Wildtypprotein CBP-H1 ist vor dem Thrombinverdau bei 24 kDa eine sehr starke radioaktive Markierung im Autoradiogramm zu finden. Nach der Thrombinspaltung finden sich zwei kleinere Hauptbanden, die dadurch zustandekommen, daß Thrombinspaltstellen nicht nur zwischen H1 und CBP liegen. Bei der Vierfachmutante findet sich nach dem Thrombinverdau in beiden verdauten Banden nur mehr eine sehr geringe radioaktive Markierung.

In diesem Autoradiogramm war auch die oben beschriebene Instabilität des CBP-H1 deutlich zu erkennen, da die hier entstandene Degradationsbande bei 20 kDa sich bei der Thrombinspaltung genauso wie das intakte CBP-Fusionsprotein verhielt. Die analog phosphorylierte Vierfachmutante, die statt dem Serin 82 das Serin 74 enthielt, zeigte noch 12,5 % Phosphorylierung.

Ein generelles Problem bei der *in vitro* Phosphorylierung von CBP-H1 an sich stellte die ATPase-Aktivität des mitgereinigten Proteins bei 90 kDa dar. Dies konnte durch Inkubation von CBP-H1 aus verschiedenen heterologen Expressionen, mit unterschiedlich starkem Gehalt an mitgereinigtem Protein, mit radioaktivem ATP ermittelt werden: nach Auftrennung des Reaktionsgemisches konnte in aufsteigender Dünnschichtchromatographie (siehe 3.2.17.2, mit Kieselgel-60-Platten, Laufmittel Butanol Aceton:Eisessig:5 % Ammoniak:H<sub>2</sub>O mit 35 : 25 : 15 : 15 : 10) um so mehr gebildetes radioaktives Phosphat und weniger radioaktives ATP lokalisiert werden, je höher der Anteil des 90-kDa-Fragments im Reaktionsgemisch war. Da bei den verschiedenen Fusionsproteinen, die eingesetzt wurden, wurde zwar darauf geachtet, daß bei gleichem Fusionsproteingehalt die Menge an 90-kDa-Protein möglichst gering blieb. Dennoch variierte die Proteinmenge des 90-kDa-Protein und so waren Schwankungen in der Phosphorylierungsstärke aufgrund unterschiedlicher zur Verfügung stehender ATP-Mengen unvermeidbar.

Über die angewandte Methode konnten die Serine 31, 57, 82 und 106 als Phosphorylierungsstellen in der H1-Domäne bestimmt werden. Das gemeinsame Phosphorylierungsmotiv X-R-X-S-X-X-X bestätigt werden. Einzig erweitert wurde dies durch die reproduzierbar polare Eigenschaft der Aminosäure zwischen dem konservierten Arginin und Serin.

Ob es sich bei der äußerst niedrigen Hintergrundaktivität bei thrombinbehandeltem und radioaktiv phosphoryliertem H1-S31/57/82/106A nun um unspezifische Hintergrundaktivität oder um weitere Phosphorylierungsstellen handelte, die entweder unzureichend phosphoryliert oder bislang nicht berücksichtigt wurden, konnte über diesen Ansatz nicht geklärt werden.

#### 4.4.3.4 Die Überprüfung der ermittelten Phosphorylierungsstellen in Haferphototropin

Bisher waren alle potentiellen Phosphorylierungsstellen in den heterolog exprimierten Subdomänen des N-Terminus und der H1-Region von Haferphototropinprotein über Phosphorylierung mit der PKA ermittelt worden. Ein übereinstimmendes Phosphorylierungsschema für diese Domänen mit der Phosphorylierung von Haferphototropin mit dessen eigener Kinase demonstrierten unter 4.4.3.2 die gleichen CNBr-Spaltungsfragmente. Dies bedeutete jedoch nicht zwangsläufig, daß auch in diesen beiden Domänen die gleichen Serine phosphoryliert bzw. von der Phototropinkinase auch exakt die gleichen Phosphorylierungsmotive erkannt werden. Das Verhältnis der Phosphorylierungsstärke der beiden einzigen radioaktiv markierten Spaltfragmente im angeführten Cyanbromidverdau, die den N-Terminus und die H1-Region bis Aminosäure 112 enthielten (siehe Anhang), betrug bei CBP-NL12 1 : 6 und bei Haferphototropin 1 : 3.

Phototropin scheint demzufolge in Hafer innerhalb der Domänen in einem anderen Verhältnis phosphoryliert als rekombinantes Protein, phosphoryliert mit der PKA.

Zur Lokalisation einzelner Phosphorylierungsstellen wurde eine Auftrennung von radioaktiv markierten Phosphopeptiden über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (2D-DC) entwickelt. Nach der *in vitro* Phosphorylierung – zum einen von rekombinanten Phototropinfusionsproteinen mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und der PKA, zum anderen von Haferphototropin im Rohextrakt aus etiolierten Keimlingen mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP – und entsprechender Reinigung (siehe 3.2.14) wurden durch Trypsinspaltung (siehe 3.2.15) Phosphopeptide generiert; die Aminosäuresequenzen von letzteren aus den Bereichen der jeweiligen Phototropindomänen stimmten überein.

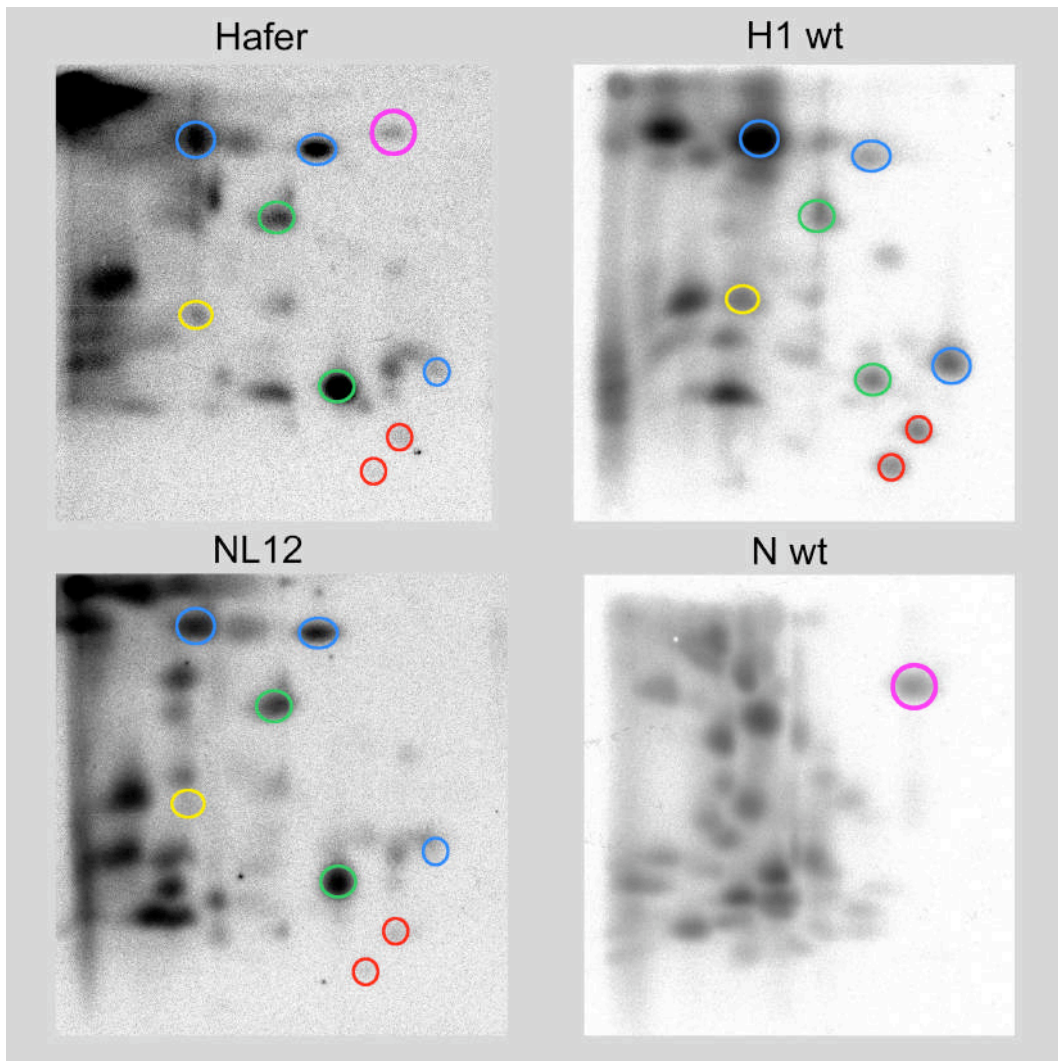
Die erste Dimension stellte eine Dünnschichtelektrophorese (siehe 3.2.17.1) dar, bei der die Phosphopeptide in einem basischen Laufmittel neben ihrem Molekulargewicht in erster Linie nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt wurden. Hierzu wurden verschiedene Matrices als stationäre Phase erprobt. Kieselgelplatten, einfache Zelluloseplatten sowie PEI-Zelluloseplatten eigneten sich aufgrund einer sehr schlechten Auftrennung des Phosphopeptidgemisches nicht. Einzig auf Platten, die mit mikrokristallinen Zellulosefasern (Avicel<sup>®</sup>-Zellulose; POLYGRAM<sup>®</sup>CEL 400-Platten) beschichtet waren, wurde das Probengemisch zufriedenstellend aufgetrennt.

In der zweiten Dimension trennte man die Proben auf diesen Platten anschließend in aufsteigender Dünnschichtchromatographie nach ihrer Größe und Ladung. Nach der Erprobung diverser Laufmittel (siehe 3.2.17.2) erwies sich ein Laufmittel aus n-Butanol : Pyridin : Eisessig : H<sub>2</sub>O in einem Verhältnis von 37 : 25 : 8 : 30 als am geeignetsten.

So galt es zunächst, die Phosphopeptidmuster von phosphoryliertem CBP-N und CBP-N mit jeweils allen Phosphorylierungsmutanten einzeln zu analysieren, um im Phosphopeptidmuster die Orte der Phosphopeptide der einzelnen Phosphorylierungsstellen der PKA zu kartieren und schließlich mit analog analysiertem, phosphoryliertem Haferphototropin Übereinstimmungen oder Unterschiede festzustellen.

Eine Analyse vorab zeigte den Vergleich der Phosphopeptidmuster von mit der PKA phosphoryliertem CBP-NL12 – ein Phototropin-CBP-Fusionsprotein, dem die Kinasedomäne und Teile von H2 fehlen (siehe Anhang) – und autophosphoryliertem Haferphototropin nach 2D-DC (siehe Abbildung 61, linke Hälfte).





**Abbildung 61: Phosphopeptidanalyse von phosphoryliertem Haferphototropin, CBP-NL12, CBP-N und CBP-H1 über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie.**

Die mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP *in vitro* phosphorylierten Phototropinproben (Haferphototropin lichtabhängig durch Autophosphorylierung, hingegen die Fusionsproteine mit der PKA) wurden nach SDS-PAGE und Gelellution tryptisch gespalten und in erster Dimension elektrophoretisch bei pH 8,9 in Laufrichtung zur Anode (Auftragspunkt links oben, Trennung von links nach rechts) auf Zelluloseplatten aufgetrennt. Die zweite aufsteigende Dünnschichtchromatographie erfolgte in n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H<sub>2</sub>O im Verhältnis 37 : 25 : 8 : 30 (siehe 3.2.17.2). Im Wildtyp konnten anhand der Markierungen der Subdomänen Phosphorylierungsstellen aus dem N-Terminus (pink) und der H1-Region (übrige Farben) zugeordnet werden.

Eine große Schwierigkeit stellte bei phosphoryliertem Phototropin aus Hafer die Proteinmenge dar, die im Verhältnis zu heterolog exprimiertem Protein weitaus geringer war. Deshalb mußte wesentlich mehr Material eingesetzt werden als bei spezifisch gereinigten, phosphorylierten Fusionsproteinen. Folge dabei war jedoch auch ein deutlich höherer Gehalt an unspezifischem Hintergrund bei Haferphototropin. Verwendet wurde deshalb neben dem jeweiligen gereinigten CBP-Fusionsprotein ein Haferhextrakt, der konzentrierter als üblich (siehe 3.2.1) aus 40 Haferkoleoptilenspitzen (0–10 mm) von 3,5 bis 4 Tage alten, etiolierten

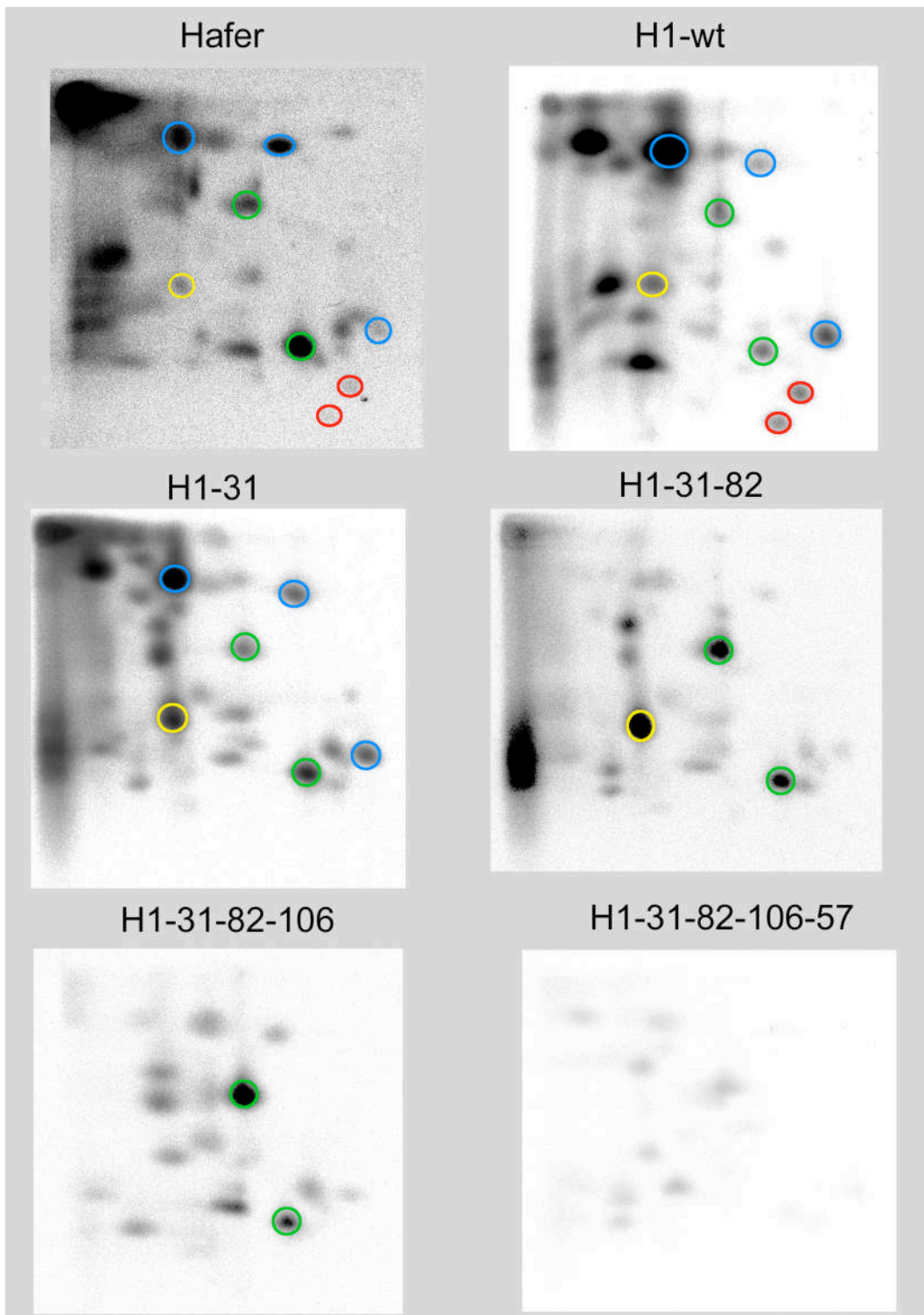
Haferkeimlingen mit insgesamt 720 µl Puffer in vier Portionen hergestellt wurde. Nach *in vitro* Phosphorylierung mit  $^{32}\text{P}$ -ATP (siehe 3.2.6.1 bzw. 3.2.6.3) wurden alle daraus jeweils in SDS-PAGE aufgetrennten Phototropinbanden separat ausgeschnitten, vereinigt, eluiert, konzentriert und tryptisch gespalten (siehe 3.2.15). Anschließend wurde versucht, möglichst ähnlich stark radioaktiv markierte Proben über 2D-DC aufzutrennen (siehe 3.2.16). Große Schwierigkeiten traten beim Trypsinverdau auf, bei dem es galt, das richtige Mengenverhältnis von phosphoryliertem und eluiertem Protein, dessen Menge gering und dessen Konzentration deshalb unzureichend bestimmbar war, und Trypsin zu finden. Die Verdauzeit pro Probe war sehr individuell und in der Regel erst anhand der fertig durchgeführten 2D-DC als zu kurz oder ideal einzustufen.

Die resultierenden Phosphopeptidmuster von phosphoryliertem Haferphototropin und CBP-NL12 wiesen einen hohen Grad an Übereinstimmung auf. Dies war insbesondere in Bereichen, in denen vollständig verdaute Fragmente zu erwarten sind, im rechten Teil jeder 2D-DC der Fall. Ausgehend vom Auftragspunkt des Peptidgemisches im linken oberen Eck wurde zunächst horizontal von links nach rechts in der ersten Dimension aufgetrennt. Hierbei war zwar primär der pI-Wert maßgeblich, jedoch blieben bei unvollständigem Trypsinverdau der Proben eine Vielzahl unterschiedlicher Peptide zurück, die eine scharfe Auftrennung verhinderten und infolge ihrer Größe eine Anhäufung der Peptide am oder in der Nähe des Auftragspunkts bewirkten. Ebenso wurden in der zweiten Dimension die unvollständig verdauten Fragmente vor allem wegen ihrem hohen Molekulargewicht nicht so weit aufgetrennt. Je schlechter die tryptische Spaltung funktionierte, desto mehr unterschiedliche Markierungen fanden sich im linken Bereich, die möglicherweise dort aufgrund ihres pI-Werts und/oder ihrer Hydrophobizität lokalisierte Phosphopeptide überdeckten. auch Zusätzliche Markierungen stammten bei CBP-Fusionsproteinen von den Phosphorylierungsstellen im CBP selbst. Wurde jedoch in erster Linie der linke und untere Bereich analysiert, fanden sich sehr viele deckungsgleiche Markierungen, so daß dies zumindest auf ein Vorhandensein vieler identischer Phosphorylierungsstellen hindeutete.

Wurden analog zu CBP-NL12 auch CBP-N und CBP-H1 einer 2D-DC unterzogen, fanden sich, neben unzureichend tryptisch gespaltenen Peptidmarkierungen, viele Markierungen von CBP-H1 in der 2D-DC von CBP-NL12 und auch von Haferphototropin wieder (siehe Abbildung 61 rechts). Bei dem N-Terminus konnte lediglich eine Markierung übereinstimmend zugeordnet werden.

Unter Optimierung der Trypsinverdaubedingungen hinsichtlich verlängerter Verdauzeit wurden von der H1-Region die verschiedenen Mutanten in 2D-DC getestet. So war in Reihenfolge der Mutationen an Serin 31, 82, 106 und 57 eine kontinuierliche Abnahme bestimmter Markierungen festzustellen, die darüber folglich auch den einzelnen Phosphorylierungsstellen zuzuordnen waren. In Abbildung 62 sind diese einzelnen

zugeordneten Markierungen farblich gekennzeichnet.



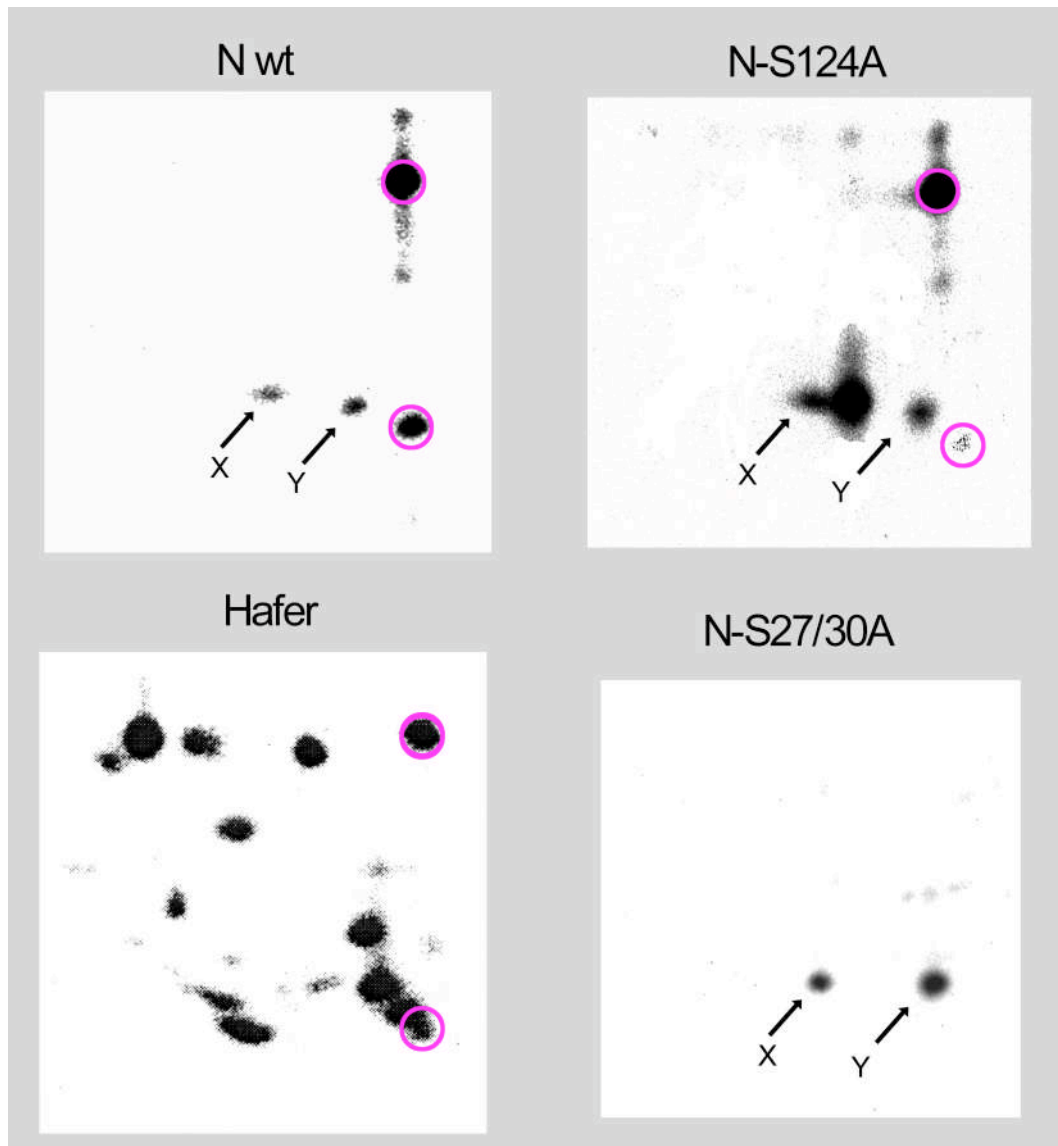
**Abbildung 62: Phosphopeptidanalyse von phosphoryliertem CBP-H1 und verschiedenen Serinmutanten über zweidimensionale Dünnschichtchromatographie.**

Die Markierungen der in 2D-DC aufgetrennten radioaktiven Phosphopeptide (auf Zellulose, erste Dimension elektrophoretisch bei pH 8,9, Auftragspunkt und Kathode links oben, zweite Dimension aufsteigend in n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H<sub>2</sub>O im Verhältnis 37 : 25 : 8 : 30) von *in vivo* lichtabhängig phosphoryliertem Haferphototropin wurden anhand von mit der PKA und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP phosphoryliertem und in 2D-DC aufgetrennten

CBP-H1 und der Ein- bis Vierfachmutanten zugeordnet: Phosphorylierungsstelle S31 ist rot, S82 blau, S106 gelb und S57 grün gekennzeichnet. Die Reihenfolge der Serine in den Mutanten gibt lediglich die Reihenfolge der einzelnen Mutationen während der *in vitro* Mutagenese wieder.

Da bei der Vierfachmutante CBP-H1-S31/82/106/57A bzw. CBP-H1-S31/57/82/106A in der 2D-DC trotz sehr geringer radioaktiver Gesamtmarkierung dennoch Markierungen übrig bleiben, kann es sich dabei um die Markierungen des CBP handeln oder um einen Hinweis auf weitere, mit geringerer Sensitivität phosphorylierbare Phosphorylierungsstellen.

Wurde die Phosphorylierung über 2D-DC in CBP-N und dessen Mutanten untersucht, mußten die Verdaubedingungen zunächst weiter optimiert werden. Da beim Trypsinverdau des CBP-N im stärksten Maße unzureichend gespaltene, höhermolekulare Fragmente zu finden waren (siehe Abbildung 61), wurde, um die Zugänglichkeit dieses Proteins zu erhöhen, vor dem tryptischen Verdau eine Cyanbromidspaltung (siehe 3.2.16) durchgeführt, um das Protein vorzufragmentieren. Dies bewirkte bei nachfolgender Trypsinbehandlung eine nahezu vollständige Spaltung. Wurden so generierte Phosphopeptide des CBP-N Wildtyps mit solchen der CBP-N-S27/30A-Mutante, die bei radioaktiver Phosphorylierung mit der PKA und nach Abspaltung des Fusionsproteins im Autoradiogramm kaum noch eine Markierung aufwies (siehe 4.4.3.3.1, Abbildung 57), in 2D-DC verglichen, konnten bei der Mutante der Verlust zweier Phosphorpeptidmarkierungen beobachtet werden (siehe Abbildung 63). Diese Markierungen sind bei analog gespaltenem und in 2D-DC aufgetrenntem phosphoryliertem Haferphototropin nachweisbar.



**Abbildung 63: 2D-DC von Haferphototropin und der heterolog exprimierten N-terminalen Subdomäne (als Wildtyp und Serinmutanten).**

Nach lichtabhängiger *in vitro* Phosphorylierung von Haferphototropin mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP bzw. Phosphorylierung mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP und der PKA von CBP-Fusionsproteinen wurden nach SDS-PAGE und Gelelution tryptische Phosphopeptide generiert und diese über 2D-DC (auf Zellulose, erste Dimension elektrophoretisch bei pH 8,9, Auftragspunkt und Kathode links oben, zweite Dimension aufsteigend in n-Butanol:Pyridin:Eisessig:H<sub>2</sub>O im Verhältnis 37 : 25 : 8 : 30) aufgetrennt. Im Vergleich konnten die eingekreisten Markierungen den Phosphorylierungsstellen S27 und S30 zugeordnet werden. Die Markierungen X und Y stellen hingegen entweder Phosphorylierungsstellen noch unbekannter Position oder des CBP dar.

Demnach werden auch in Hafer von der Phototropinkinase die Stellen 27 und 30 phosphoryliert. Aus einem Vergleich mit den Einzelmutanten CBP-S27A und CBP-S30A konnte die Markierung rechts oben dem Serin 27 und rechts unten dem Serin 30 zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt). Es fielen jedoch auch zwei zusätzlich verhältnismäßig starke Markierungen auf, die bei allen bisherig generierten CBP-N-Mutanten (beispielsweise CBP-N-S124A; siehe 4.4.3.3.1) und dem Wildtyp vorhanden waren und mit X und Y bezeichnet wurden. Entweder handelt es sich um die Phosphorylierung des CBP-Proteins, die in der

2D-DC von Hafer fehlen sollten, oder es sind im N-Terminus noch weitere Phosphorylierungsstellen vorhanden. Zur Auswertung aller Markierungen in der 2D-DC von Hafer müssten alle H1-Mutanten mit einem zusätzlichen CNBr-Verdau analog quantitativ aufgetrennt und zugeordnet werden. Im Falle noch nicht zuzuordnender Banden müssten weitere Mutanten über *in vitro* Mutagenese generiert und in 2D-DC analysiert werden.

Alles in allem läßt sich mit den bisherigen Ergebnisse der 2D-DC aussagen, daß alle über die *in vitro* Mutagenese ermittelten Phosphorylierungsstellen, die durch die PKA in heterolog exprimierten Subdomänen von Haferphototropin phosphoryliert werden, in autophosphoryliertem Haferphototropin nachweisbar sind und es nicht auszuschließen ist, daß noch weitere Phosphorylierungsstellen vorhanden sind.

## 5 Diskussion

Der UV-A-/blaulichtvermittelte Phototropismus war bislang in erster Linie über Krümmungsstudien sowie über die UV-A-/blaulichtvermittelte Phosphorylierung an Keimlingen von Wildtyppflanzen und *Arabidopsis*-Phototropismusmutanten studiert worden. Erst durch die Entdeckung und Klonierung der *NPH*-Gene (Huala *et al.*, 1997) aus *Arabidopsis thaliana* lagen Hinweise vor, daß das *PHOT1*-Genprodukt den mutmaßlichen Photorezeptor Phototropin für den UV-A-/blaulichtvermittelten Phototropismus verkörperte. In Hafer konnte Zacherl (1997) noch nicht eindeutig belegen, daß das Genprodukt des isolierten Hafer-*PHOT1*-Gens (Zacherl *et al.*, 1998) und das UV-A-/blaulichtvermittelt phosphorylierbare 110-kDa-Haferprotein identisch waren. So wurde zu Beginn dieser Arbeit diese Korrelation in Hafer mittels eines Antikörpers gegen *Arabidopsis*-PHOT1 hergestellt.

### ***Die Anti-NPH1-Kreuzreaktion mit dem blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Haferprotein sowie der immunologische Nachweis von Phototropin aus anderen Pflanzen***

Der polyklonale Antikörper Anti-NPH1 war gegen das denaturierte, heterolog als maltosebindendes Fusionsprotein exprimierte N-terminale Drittel von PHOT1 aus *Arabidopsis thaliana*, das die Aminosäuresequenz des sogenannten N-Terminus und der LOV1-Domäne beinhaltete, in Kaninchen generiert worden (Christie *et al.*, 1998). Die hohe Spezifität des Antikörpers demonstrierte Christie durch das Ausbleiben der Immunreaktion bei mikrosomalen Membranfraktionen der phototropen Nullmutante *nph1-5* (Huala *et al.*, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels der Kreuzreaktion von Anti-NPH1 mit Rohextrakten oder mikrosomalen Membranen aus anderen etiolierten Dikotyledonenkeimlingen (Senf, Kresse, Tomate, Rauke und Soja) in Westernblotanalyse je nach Pflanzenart eine starke Bande zwischen 120 und 130 kDa lokalisiert werden. Ebenso verhielt es sich bei Rohextrakten oder mikrosomalen Membranen aus *in vivo* sättigend belichteten Dikotyledonenkeimlingen. Die Immunreaktion war hierbei jedoch bei einem nach SDS-PAGE um etwa 2 kDa höheren Molekulargewicht zu beobachten. Letzteres fand sich auch bei UV-A/blaulichtvermittelt *in vivo* phosphoryliertem Phototropin im Autoradiogramm (Zacherl, 1997) und diese Mobilitätsreduktion war somit primär auf die Phototropinphosphorylierung zurückzuführen: *in vitro* Phosphorylierungen von Rohextrakten oder mikrosomalen Membranen und analoger Westernblotanalyse sowie die Immunopräzipitation zeigten dies.

Bei Monokotyledonen wie Hafer und Mais war im Rohextrakt oder in mikrosomalen Membranen aus etiolierten Keimlingen analog zu den Dikotyledonen mit Anti-NPH1 eine starke Phototropinbande bei 110 bzw. 114 kDa detektierbar. Hingegen zeigte sich bei *in vivo*



sättigend belichteten Keimlingen nur mehr eine sehr schwache Reaktion mit dem Antikörper im Immunoassay, auch mit ebenfalls reduzierter Mobilität nach SDS-PAGE. Bezüglich des Molekulargewichts stimmten die Banden jedoch mit den *in vitro* UV-A/blaulichtvermittelt phosphorylierten Proteinen, die Zacherl (1997) beschrieben hatte, überein. Die Immunpräzipitation von Anti-NPH1 mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP *in vitro* UV-A/blaulichtvermittelt phosphorylierten Proteinen aus Hafer- bzw. Kressemembranen demonstrierte, daß phosphoryliertes Phototropin aus Dikotyledonen immunopräzipitiert, hingegen Phototropin aus Monokotyledonen analog nicht immunopräzipitiert werden konnte.

Die Ursache dafür muß folglich in der Unterschiedlichkeit der Epitope liegen: der Sequenzbereich aus *Arabidopsis*-Phototropin, gegen den Anti-NPH1 generiert wurde, umfaßt neben der LOV1-Domäne, die bei Mono- und Dikotyledonen sehr stark konserviert ist, auch den N-Terminus. Bisher wiesen alle bisher bekannten dikotylen Phototropinsequenzen einen deutlich längeren N-Terminus auf als in Monokotyledonen. Vermutlich betreffen die Epitope von Anti-NPH1 bei Mono- und Dikotyledonen zwar weitestgehend die homologen Bereichen des N-Terminus, so daß im unphosphorylierten Zustand Phototropin aus beiden Pflanzengruppen noch vergleichbar stark immunologisch detektiert werden kann. Nach der Phototropinphosphorylierung werden die N-terminalen Epitope offensichtlich in Monokotyledonen so stark modifiziert, daß die Antikörpererkennung drastisch sinkt. Belegt werden konnte dies durch die heterologe Expression der Subdomänen von Haferphototropin: im unphosphorylierten Zustand wurde der N-Terminus sehr stark und LOV1 etwas schwächer erkannt, hingegen zeigte phosphorylierter N-Terminus kaum noch Antikörperdekoratation.

Somit konnte über die Anti-NPH1-Immunisierung demonstriert werden, daß es sich bei dem von Zacherl (1997) charakterisierten UV-A/blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Haferprotein um Phototropin handelte. Erstmals gelang es, auch das Phototropinprotein aus Pflanzen im etiolierten Zustand bzw. Phototropin in seinen verschiedenen Phosphorylierungszuständen in Kreuzreaktion nachzuweisen.

#### **Die Gewebespezifität von Phototropin in Mono- und Dikotyledonen**

Die Menge von Phototropin wurde im Rohextrakt aus verschiedenen Segmenten entlang der etiolierten, 4 Tage alten Haferkoleoptile über die Anti-NPH1-Antikörperreaktion untersucht. Es zeigte sich, daß die Intensität der Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 exponentiell basipetal abnahm. Über 50 % der Gesamtintensität der Antikörperdekoratation war in den apikalen 5 mm der Koleoptile konzentriert, hingegen waren in den basipetal anschließenden 5 mm bereits 21 % und im am weitesten von der Spitze entfernten, untersuchten Segment (20–25 mm bzw. Segment V, siehe Abbildung 10) nur mehr 5,5 % Anti-NPH1-Dekorationsmeßbar. Diese Daten stimmten ausgezeichnet mit der von Zacherl (1997) und Salomon *et al.*



(1997b) ermittelten Gewebespezifität der Stärke der UV-A-/blaulichtabhängigen *in vitro* Phosphorylierung in der Haferkoleoptile überein. Somit schien es legitim, bei den vorhandenen Proteinmengen die Phosphorylierungsstärke von Phototropin aus etiolierten Pflanzen als Maß der Proteinkonzentration einzusetzen.

Erstmalig wurde analog die Verteilung von Phototropin in 3 1/2 Tage alten, etiolierten bzw. sättigend belichteten Dikotyledonenkeimlingen (Erbse, Kresse und Senf) immunologisch ermittelt. Der Bau der Dikotyledonen legte zudem die Untersuchung der Primärblätter und des Hypokotylhakens neben dem eigentlichen Hypokotyl nahe, wobei in beiden ersteren nur sehr geringe Mengen Phototropin nachweisbar waren. Die stärkste Anti-NPH1-Reaktion konnte unmittelbar nach dem Hypokotylhaken festgestellt werden. Weiter basipetal nahm die Intensität der Reaktion kontinuierlich, im Gegensatz zu Monokotyledonen jedoch linear ab. Phototropin kommt demzufolge, bei annähernd gleich anfärbbarer Gesamtproteinmenge in allen untersuchten Keimlingssegmenten, am stärksten in den phototropisch sensitivsten Bereichen vor (in der Koleoptilenspitze bzw. unterhalb des Hypokotylhakens, siehe 1.2.1.1 und 1.2.2.1), ist aber bei Dikotyledonen gleichmäßiger verteilt, wie es auch bereits für das Epikotyl bzw. im oberen Internodium von 7 Tage alten Erbsenkeimlingen bisher beschrieben wurde (Short & Briggs, 1990 und Short *et al.*, 1992).

Darüber hinaus konnte in zweieinhalb, drei, dreieinhalb und vier Tage alten Kressekeimlingen im Hypokotyl (0–10 mm) immunologisch stets der gleiche Phototropingehalt nachgewiesen werden. Der ermittelte lineare, basipetale Verteilungsgradient schien sich offensichtlich entlang des Keimlings, mit fixem Phototropingehalt im apikalen Hypokotyl, während des Streckungswachstums des Keimlings und somit im Laufe der Keimlingsentwicklung auszubilden.

### **Die Membranassoziation von Phototropin**

Phototropin war innerhalb der Mesophyllzelle als membranassoziiert beschrieben worden, da es bei der Präparation von mikrosomalen Membranen angereichert werden konnte. Bei einer weiteren Untersuchung war zudem eine spezifische Zuordnung an der Innenseite der Plasmamembran möglich (siehe Short *et al.*, 1993). Die Natur dieser Membranassoziation war noch unklar, vor allem durch den Befund, daß Phototropin aufgrund seiner Sequenz die Eigenschaften eines löslichen Proteins aufwies (Huala *et al.*, 1997) und Salomon *et al.* (1996) zeigen konnten, daß sich die Membranassoziation mit der Entwicklungsstufe der Keimlinge änderte: nur im anfänglichen Entwicklungsstadium (3 Tage alte Keimlinge) schien Haferphototropin stark an die Membran gebunden zu sein, hingegen im weiteren Entwicklungsverlauf (5 Tage alte Keimlinge) wurde diese Bindung schwächer.

Nach einer Dodecylmaltosid-BN-PAGE von Rohextrakten aus etiolierten Senfkeimlingen konnten spezifisch über eine Anti-NPH1-Westernblotanalyse höhermolekulare Phototropin-

komplexe von etwa 500 kDa, 300 kDa und 170 kDa beobachtet werden. Analog untersuchte Rohextrakte aus belichteten Senfkeimlingen wiesen jedoch nur eine Immunreaktion bei 170 kDa auf. Höhermolekulare Phototropinkomplexe waren im belichteten Zustand nicht mehr lokalisierbar. Auch Warpeha & Briggs (1993) hatten bereits in Erbsenmembranvesikel aus etiolierten Keimlingen, über native Gelelektrophorese aufgetrennt, einen blaulichtabhängig phosphorylierbaren, 335 kDa schweren Komplex gefunden, bei dessen Auftrennung in SDS-PAGE ein 117-kDa-Protein, aller Wahrscheinlichkeit nach Erbsenphototropin, lokalisiert werden konnte. Ein in Erbse postuliertes Homodimer konnte in Senf nicht eindeutig bestätigt werden, da aufgrund der Auftrennung in der Dodecylmaltosid-BN-PAGE, die nicht in erster Linie exakt nach dem Molekulargewicht, sondern in höherem Maße nach der Oberflächenladung der Proteine und der Affinität zur Ladungshilfe Coomassie Blau G stattfindet, die Zuordnung mit Hilfe des Proteingrößenmarkers lediglich als grobe Abschätzung dienen konnte. Für ein Phototropindimer bei Senf wird ein Molekulargewicht von 240 kDa berechnet, ein Trimer entsprechend 360 kDa. Da aber im Gegensatz zu Warpeha & Briggs (1993) Dodecylmaltosid eingesetzt wurde und somit die Systeme nicht direkt zu vergleichen sind, könnte die in Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 nachgewiesene Phototropinbande bei 170 kDa möglicherweise das Monomer und die Bande bei 300 kDa ein Dimer darstellen. Andererseits kann Phototropin mit anderen, noch unbekannt Proteinen in einem Komplex vorliegen. Denkbar wäre z. B. ein Signaltransduktionskomplex, der im unbelichteten Zustand die Bindung an die Membran ermöglicht und durch Belichtung und folglich Phototropinphosphorylierung eine Umorganisation zur Signalweiterleitung, möglicherweise unter Freisetzung von Phototropin, erfährt. Zur exakten Molekulargewichtsbestimmung müßte mit der in Dodecylmaltosid-BN-PAGE aufgetrennten Probe zweidimensional im Anschluß eine denaturierende SDS-PAGE etabliert werden.

Bei der Präparation von mikrosomalen Membranen aus belichteten Senfkeimlingen lag Phototropin nach der Ultrazentrifugation zwar zu 80 % in der Membranfraktion, jedoch auch zu 20 % im löslichen Überstand vor. Bei etiolierten Rohextrakten konnte keinerlei lösliches Phototropin nachgewiesen werden. Bereits Short *et al.* (1992) waren, ohne eine exakte stöchiometrische Verteilung zu bestimmen, bereits bei der Membranpräparation nach radioaktiver, lichtvermittelter *in vivo* Phosphorylierung von Erbsenkeimlingen auf geringe Phosphorylierung in der Höhe des Molekulargewichts von Phototropin im löslichen Überstand gestoßen. Vorstellbar wäre einerseits, daß Phototropin im etiolierten Zustand sehr stark an die Membranen assoziiert vorliegt und durch lichtvermittelte Phosphorylierung diese Assoziation geschwächt wird, so daß sich Phototropin von der Membran partiell ablösen und im Cytoplasma löslich nachgewiesen werden kann. Andererseits könnte Phototropin generell zu einem bestimmten Prozentsatz als lösliches Protein vorliegen, dieses jedoch besonders

im Falle der unphosphorylierten Form sehr rasch nach Aufbruch der Zellen abgebaut werden.

Weitere Hinweise zur Art der Membranassoziation lieferte die Behandlung von frisch präparierten mikrosomalen Membranen mit Salzen. Abgeleitet von einer erfolgreichen Solubilisierung von Phototropin mit 500 mM NaCl in Kombination mit dem nichtionischen Detergens Brij 58 konnte eine Steigerung der löslichen Phototropinmenge detergensenfrei durch eine Kombination von 500 mM NaCl mit verschiedenen Mischungen der chaotropen Salze NaBr und/oder NaPP erreicht werden. Schließlich wurde erstmalig gezeigt, daß detergensenfrei mit einer Mischung aus 0,5 M NaBr und 10 mM NaPP, die den Membranen aus etiolierten Keimlingen 30 Minuten auf Eis zugesetzt wurde, nach einer anschließenden Ultrazentrifugation lösliches, unphosphoryliertes und aktives, d. h. lichtvermittelt autophosphorylierbares Phototropin zu 95 % in der löslichen Fraktion zu finden war.

Die Bindung von Phototropin an die Membranen scheint eher über ionische Wechselwirkungen und/oder Wasserstoffbrückenbindungen zu erfolgen, da durch die chaotropen Salze der Hauptteil von Phototropin von den mikrosomalen Membranen abgelöst werden konnte. Die Daten sprechen gegen eine Membrangängigkeit oder kovalente Bindung an die Membran. Denkbar wäre nach wie vor auch ein membrangebundener Funktionskomplex mit Phototropin als Bestandteil, der sich durch Licht modifizierte und dabei Phototropin aus seinem Verbund entließe. Ein weiterer Hinweis für die an sich lösliche Natur von Phototropin war auch die Tatsache, daß Phototropin, heterolog überexprimiert im völlig „artfremden“ *E. coli*-System, z. T. löslich war oder, wie von Christie *et al.* (1998) gezeigt, in Insektenzellen löslich exprimiert, auch seine volle Funktion zur Autophosphorylierung besaß.

### **Aufreinigung**

Die Studien zur Membranassoziation ermöglichten die Gewinnung von löslichem Phototropin durch Ablösung mit chaotropen Salzen. Über die Affinität des Reaktivfarbstoffs Cibachron Blau zur Dinukleotidbindetasche von Kinasen wurde Phototropin über seine Kinaseeigenschaft zwar weiter spezifisch gereinigt und angereichert, büßte dabei jedoch leider einen Großteil seiner Aktivität ein und zeigte sich nur mehr in sehr geringem Ausmaß autophosphorylierbar.

Short *et al.* (1993) berichteten von einer coomassiefärbbaren 120-kDa-Erbseproteinbande in mikrosomalen und Plasmamembranen, die angeblich mit bloßem Auge sichtbar, in Proben aus belichtetem Pflanzenmaterial einen Mobilitätsverlust im Vergleich zu unbelichteten Pflanzen aufwies. Bei allen in dieser Arbeit diesbezüglich untersuchten Pflanzen (Mais, Hafer, Senf, Kresse) war dies in dieser Anreicherungsstufe nicht reproduzierbar. Da im Molekulargewichtsbereich von 110 bis 130 kDa verhältnismäßig viele Proteine auch noch in präparierten Membranen vorhanden waren, war eine eindeutige Zuordnung von Phototropin

bislang nicht möglich. Selbst nach der Solubilisierung von Phototropin von mikrosomalen Membranen konnte diesem keine eindeutige coomassiefärbbare Proteinbande zugeordnet werden. Erst nach der Affinitätsreinigung dieses löslichen Phototropins mit Cibachron Blau 3GA und dem damit verbundenen Wegfall ähnlich großer Proteine war erstmals spezifisch gereinigtes Phototropin in der Eluatfraktion eindeutig als prominente silbergefärbte Proteinbande im SDS-PAGE-Gel zu sehen. Offensichtlich schienen in Erbse an Membranen weniger Proteine ähnlichen Molekulargewichts zu existieren, wenn es sich bei der von Short *et al.* (1993) zugeordneten Bande tatsächlich um Phototropin handelte.

Anhand der eindeutigen Lokalisation von affinitätsgereinigtem Haferphototropin im Silbergel ist überdies die von Zacherl (1997, Abbildung 26) vorgenommene Zuordnung unwahrscheinlich, da die dort abgebildete silbergefärbte Proteinbande kleiner als Phototropin ist.

### ***Die Charakterisierung der Chromophorbindung in der LOV2-Domäne und der Photozyklus der LOV-Domänen***

Phototropin aus Pflanzen in dem Grade aufzureinigen, um damit spektroskopische Untersuchungen zur Chromophorbindung und -identifizierung zu machen, ist bislang nicht gelungen. In *E. coli*-BL21(DE3)pLysS konnten nur Fragmente von Haferphototropin, die die Kinasedomäne nicht enthielten, löslich in größeren Mengen als CBP-Fusionsprotein exprimiert werden. So war es aber möglich, die LOV-Domänen als Orte der Chromophorbindung zu bestätigen, wobei der Chromophor FMN in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 gefunden wurde. Die jeweiligen Absorptionsspektren gaben das Wirkungsspektrum des Phototropismus wieder (Christie *et al.*, 1999). Alle Informationen zur korrekten Faltung der Domänen und zur Chromophorbindung müssen somit in der Proteinstruktur selbst verankert sein. Die LOV-Domänen stellen demzufolge ein ausgezeichnetes System zur Untersuchung der Chromophorbindung und damit verbunden der Lichtperzeption des UV-A/Blaulichtrezeptors Phototropin dar.

Die LOV-Domänen selbst bilden eine Untergruppe der großen Familie des PAS-Domänen, die z. B. in vielen Sensorproteinen, die beispielsweise auf äußere Einflüsse über die Änderung ihres Redoxzustands reagieren können, vorkommen oder an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind (Pellequer, *et al.*, 1998; Zhulin & Taylor, 1997; Taylor & Zhulin, 1999). Da von den LOV-Domänen zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch keine Kristallstrukturen existierten, wurde die Molekülstruktur der LOV-Domänen aus Hafer über SWISS-MODEL 3.5 (Peitsch, 1995 und 1996; Guex & Peitsch, 1997) berechnet, wobei als Matrize die Röntgenkristallstruktur der PAS-Domäne aus H-ERG, dem spannungsgesteuerten, menschlichen Kaliumkanalprotein (Cabral *et al.*, 1998), diente. Die

inzwischen veröffentlichte Röntgenkristallstruktur der LOV2-Domäne von *phy3 aus Adiantum capillus-veneris* (Crosson & Moffat, 2001) belegt im Rückblick die Richtigkeit dieser Berechnungen. H-ERG wies etwa 30 % zu LOV1 und LOV2 identische Aminosäuren auf. Wie auch in der Röntgenkristallstruktur der weniger stark homologen PAS-Domänen FIX-L und PYP, die *in vivo* beide höchstwahrscheinlich Kofaktoren binden (Miyatake *et al.*, 2000; Genick *et al.*, 1997), fiel in H-ERG eine zentrale Proteintasche auf. Diese Höhle fand sich auch in der berechneten Molekülstruktur – bildlich umgesetzt mit dem Programm Rasmac 2.6 – von LOV1 und LOV2 (siehe Abbildung 27) wieder. Jedoch erschien diese Höhle im Modell bei LOV1 räumlich enger angelegt zu sein. Über *in vitro* Mutagenese wurden Punktmutationen an CBP-LOV2 durchgeführt, vergleichende Mutationen an LOV1 unternahm John Christie im Labor von Winslow Briggs. Eine zentrale Bedeutung der Proteintasche der LOV/PAS-Struktur wurde bereits indirekt ersichtlich, als alle Mutationen, die Aminosäuren im Molekülmodell an der Oberfläche betrafen und deren Reste von der Molekülebene weggerichtet waren (LOV2-E28G, -Y29F, -Y97K, -Y97M und -G100A), dasselbe Protein-Chromophor-Verhältnis wie der LOV2-Wildtyp aufwiesen und damit keinerlei Unterschiede bei der Chromophorbindung zeigten. Differenzen zum LOV2-Wildtyp ließen sich einzig im Gesamtanteil des löslichen Proteins erkennen: der Austausch des polaren Glutamats an Position 28 gegen Glycin bewirkte eine Steigerung der löslichen Proteinmenge um mehr als 200 %. Wurde jedoch das ebenfalls an der Proteinoberfläche lokalisierte Serin 20 gegen Alanin ausgetauscht, war eine Chromophorreduktion von 11 % zu verzeichnen. Der betroffene Aminosäurerest wies im Molekülmodell direkt auf das Ende der Proteintasche. Ein paralleler Austausch des polaren Serins gegen das aromatische Phenylalanin hatte einen fast vollständigen Verlust der Chromophorbindung zur Folge. Ebenso verhielt es sich bei dem Austausch des stark polaren Asparagin 81 gegen ein Isoleucin. Essentiell wichtig schien zur Chromophorbindung somit ein polares Ende der Proteintasche. Diese LOV2-S20F-Mutation findet sich auch in der WC-1-Mutante von *Neurospora crassa* und ist möglicherweise für die fehlende Lichtsensitivität des mutmaßlichen Blaulichtrezeptors durch ebenfalls drastisch reduzierte Chromophorbindung verantwortlich (Ballario *et al.*, 1998).

Im Höhleninneren bewirkte die Erhöhung der Polarität jedoch eine stark reduzierte Chromophorbindung, wie bei dem Austausch des aromatischen Phenylalanins gegen Tyrosin (LOV2-F23Y) oder des neutralen Asparagin 38 gegen ein saures Aspartat im Computermodell zu beobachten war. Das im Wildtyp unpolare Höhleninnere umgab im Strukturmodell ein in diese Höhle ragendes, exponiertes Cystein 39, bei dessen Austausch gegen Alanin etwa 30 % oder gegen Serin etwa 50 % weniger Chromophor gebunden wurden. Der Eingangsbereich der Proteintasche schien stark polar sowie basisch und wurde hauptsächlich von vier Argininen gebildet. Der Austausch des Arginin 40 gegen das saure

Glutamat bewirkte im berechneten Molekülmodell einen sterischen Umbau des Eingangs, wobei in Folge das Cystein 39 aus der Höhle heraus an die Oberfläche klappte. Die ermittelte Chromophorbindung war drastisch zum Wildtyp reduziert. Weniger dramatische Effekte im Modell zeigte der Austausch des Glutamin an Position 43, das zur Formierung des Höhleneingangs beiträgt, gegen ein Histidin. Hierbei wird durch die weitere basische Aminosäure sterisch der Eingang verengt, das Milieu blieb jedoch erhalten und es war eine 60 %ige Chromophorreduktion meßbar.

Zusammengefaßt schien die Chromophorbindung in LOV2 Aminosäuren zu betreffen, die mit der Bildung der Proteintasche in Verbindung gebracht werden konnten. Entscheidend war bei dieser Höhle ein basischer, polarer, nicht zu enger Eingang sowie ein hydrophobes Höhleninneres mit dem zentral positionierten Cystein und einem polaren Höhlenabschluß.

Wesentlich daran beteiligte Aminosäuren fanden sich vor allem in dem hochkonservierten GRNCRFLQ-Motiv wieder, das in allen LOV-Domänen und in vielen PAS-Domänen, die, wie die ERG-Proteine, WC-1, FIX-L oder NIF-L, Sensorproteine darstellen, zu finden ist. Wurden analoge Positionen in LOV1 mutiert (J. Christie), entsprachen die Ergebnisse weitestgehend denen von LOV2. In LOV1 fand sich an Position 66 ein zweites Cystein, das im Modell an der Proteinoberfläche lokalisiert wurde und nach Austausch gegen Alanin geringe Chromophorreduktion aufwies. Studien mit NPM demonstrierten allerdings keinerlei Beteiligung von diesem Cystein 66 an der Chromophorbindung (Salomon *et al.*, 2000).

Die Bindung von FMN an sich in den einzeln exprimierten LOV-Domänen zeigte sich allgemein stabil und konnte erst durch Denaturierung mit Detergentien oder TCA aufgehoben werden, so daß eine kovalente Bindung eher unwahrscheinlich schien. Bei nachfolgender spektraler Analyse unterschied sich das Absorptionsspektrum des freien Chromophors im polaren Lösungsmittel deutlich vom Absorptionsspektrum des gebundenen FMN. Letzteres war typisch für Flavine in unpolarem Medium (Schmidt, 1980) und ließ auf eine eher hydrophobe Proteinumgebung schließen. Dies lief konform mit den vorangegangenen Schlüssen aus den Mutantenstudien in dreidimensionaler Strukturberechnung: die Proteinhöhle mit ihrem hydrophoben Milieu schien geradezu prädestiniert als potentielle Chromophorbindetasche zu sein.

Obwohl die Absorptionsspektren von LOV1 und LOV2 an sich sehr ähnlich waren, unterschieden sie sich in der exakten Lage und Stärke der Maxima: LOV1 wies bei der breiten Absorption im UV-Bereich bei 361 nm eine ausgeprägtere Schulter und ein Maximum bei 370 nm auf, während letzteres bei LOV2 bei 378 nm zu finden war. Das Hauptmaximum der Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich konnte, neben zwei Schultern bei 430 bzw. 470 nm, bei LOV1 bei 449 nm lokalisiert werden, hingegen wies LOV2 eine hypsochrome Verschiebung um 2 nm auf (siehe Abbildung 21). Aufgrund der starken Chromophor-

reduktion bei LOV2-S20F, -S20F-F23Y und -R40D konnte keine spektrale Auswertung erfolgen. Bei dem Großteil der übrigen Mutationen entsprach das ermittelte Absorptionsspektrum dem LOV2-Wildtyp. Die Mutanten LOV2-F23Y, -N38D, Q43H und beide Cystein 39-Mutanten ähnelten jedoch eher dem LOV1-Wildtyp. Von den gleichen Mutanten erstellte Fluoreszenzanregungsspektren zeigten ebenfalls große Ähnlichkeit zum LOV1-Wildtypspektrum. Letzteres unterschied sich vom LOV2-Fluoreszenzanregungsspektrum durch eine wesentlich ausgeprägtere Absorption der Feinstruktur im blauen Wellenlängenbereich – mit drei scharfen Maxima – wohingegen bei LOV2 diese Feinstruktur deutlich niedriger war und kontinuierlich abfiel (siehe Abbildung 23). Eine Besonderheit stellten die beiden Cysteinmutanten dar, die in Lösung bereits eine vergleichsweise auffallend intensive gelbgrüne Farbe zeigten: ein Fluoreszenzspektrum konnte aufgrund ebenso außergewöhnlich starker Fluoreszenz nur nach starker Verdünnung im Normalbereich gemessen werden. Allgemein wurde bei LOV1 und LOV2 höhere Fluoreszenz ermittelt, je schneller die Meßgeschwindigkeit und damit je kürzer die Meßzeit (10, 50, 200 s) war, d. h. bei längeren Meßzeiten war ein weniger stark ausgeprägtes Spektrum zu sehen. Nach einer Dunkelregeneration von etwa zwei bis vier Minuten konnte die Fluoreszenz in der ursprünglichen Stärke verzeichnet werden. Folglich schien durch die Lichthanregung innerhalb von Sekunden eine Photoreaktion – meßbar als Ausbleichen – stattzufinden, die schneller als die beiden langsameren Messungen war und die vor der erneuten Lichthanregung einer Regeneration im Dunkeln bedarf. Bei den Cysteinmutanten waren beide Effekte nicht nachweisbar.

Über zeitaufgelöste UV-/VIS-Spektroskopie, bei der im Sekundenbereich Serien von Absorptionsspektren gemessen wurden, konnte bei rekombinantem CBP-LOV1 und -LOV2 ein Photozyklus beobachtet werden, der aus einer lichtinduzierten Ausbleichreaktion jeweils unterschiedlicher Intensität mit nachfolgender Dunkelregeneration bestand (siehe Abbildung 21 und Abbildung 31). Dieser Zyklus konnte daraufhin durch Licht erneut ausgelöst werden. Als Reaktion erster Ordnung findet diese bei beiden Domänen allein zwischen dem Chromophor und der LOV-Domäne ohne die Beteiligung weiterer Reaktionspartner statt. Bei herabgesetzter Reaktionstemperatur (4 °C) verzögerte sich lediglich die Dunkelregeneration, nicht aber die Reaktionszeit der Ausbleichreaktion, was bedeutete, daß die Photoreaktion in unmittelbarer Nähe erfolgte. LOV2-Mutanten, bei denen sich im Vergleich zum Wildtyp das innere Milieu der Proteinhöhle änderte – beispielsweise weniger hydrophobe Eigenschaften in der Höhle (LOV2-F23Y, LOV2-N38D) bzw. mehr am Höhlenende (LOV2-N81I) – oder der Höhleneingang (LOV2-Q43H) verengt wurde, nahmen Mischformen zwischen dem LOV1- und LOV2-Photozyklus ein (siehe Tabelle 13). Unterschiede zwischen der LOV1- und LOV2-Photoreaktion schienen daher wohl in der von der Proteinstruktur vermittelten Umgebung zu

liegen.

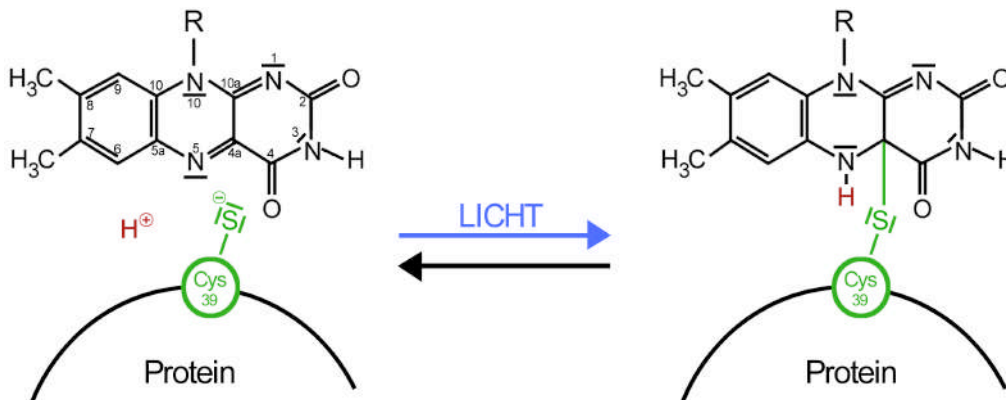
Keinerlei Ausbleichreaktion durch Licht zeigten beide LOV2-Cysteinmutanten (LOV2-C39A bzw.-C39S). Die Fähigkeit zur lichtinduzierten Bleichreaktion ist offensichtlich essentiell an das Cystein geknüpft und bei Ersatz der Thiolgruppe durch eine Hydroxyl- oder Methylgruppe kann keine Photoreaktion stattfinden. Umgekehrt spricht dies für eine lichtinduzierte Bindung zwischen dem Chromophor und dem in unmittelbarer Nähe vorhandenen Cystein während der Ausbleichreaktion und Auflösung dieses Photoprodukts während der Dunkelregeneration. Ohne Lichtinduktion konnte der Chromophor durch Detergens oder TCA freigesetzt werden, was auf eine nichtkovalente Bindung im nicht angeregten Zustand hinweist. Daß keine weiteren Reaktionspartner während des Photozyklus vorkommen, zeigte auch bereits die Kinetik erster Ordnung bei der Photoproduktbildung und -regeneration. Ein weiteres Indiz war auch die starke Fluoreszenz der Cysteinmutanten: hier wurde offensichtlich der Hauptteil der eingestrahlten Lichtenergie nicht in die Bildung eines Photoprodukts eingebracht, sondern in Fluoreszenz umgesetzt.

Allgemein zeigen Flavine und bisher bekannte Flavoproteine in Anwesenheit von Elektronendonatoren und unter anaeroben Bedingungen eine klassische lichtinduzierte Ausbleichreaktion. Dabei geht das oxidierte Flavin durch die Aufnahme eines Elektrons in die halbreduzierte Form des Semichinons über. Nach weiterer Aufnahme eines Elektrons entsteht die vollreduzierte Hydrochinonform. Die Reduktion bewirkt den Verlust der Absorption sowohl im blauen als auch im UV-Wellenlängenbereich und zeigt klassischerweise nur einen isosbestischen Punkt zwischen 330 und 350 nm (Massey et al., 1978).

Die lichtinduzierten Veränderungen im Absorptionsspektrum der LOV-Domänen entsprechen nicht dieser gewöhnlichen Art der Flavinphotoreduktion. Die sogar unter aeroben Bedingungen ablaufende, lichtvermittelte Ausbleichreaktion der beiden LOV-Domänen wies jeweils drei isosbestische Punkte bei 331, 380 bzw. 385 und 408 nm auf, wobei die Absorption im UV-A-Bereich erhalten blieb. Zusätzliche reduzierende Agentien als Elektronendonatoren waren zur Photoreduktion nicht nötig. Spektrale Parallelen sind vielmehr zu einem Flavin-(C4a)-Thiol-Addukt erkennen, das zum einen Miller *et al.* (1990) bei der Quecksilber<sup>2+</sup>-Reduktase und zum anderen Thorpe *et al.* (1981) bei der Lipoamid-Dehydrogenase beobachtet haben. Diese bislang bekannten Addukte stellten stets kurzlebige Übergangsstufen bei der Reduktion von Flavoproteinen innerhalb der Gruppe der Disulfid-Reduktasen dar. Bei der Quecksilber<sup>2+</sup>-Reduktase, die vier Cysteine im aktiven Zentrum aufweist, stabilisierten Miller *et al.* (1990) diese während der Reduktion schnelllebige Zwischenstufe längerfristig durch den Austausch dreier Cysteine gegen Alanin und konnte diese somit spektroskopisch analysieren. Interessanterweise fanden sich bei der Bildung dieses Flavin-Cysteinyl-Addukts drei isosbestische Punkte bei 331, 380 bzw. 385 und



407 nm. Bemerkenswert war auch der Erhalt der UV-A-Absorption, analog zu den LOV-Domänen von Phototropin. Bei der Bildung eines Flavin-Cysteinyl-Addukts wird ein Protein über das Schwefelatom des Cysteins kovalent an ein C-Atom des Flavins gebunden. Daß der Austausch des Cysteins 39 in den LOV-Domänen die Photoproduktbildung verhinderte, die Chromophorbindung allerdings an sich weniger stark beeinträchtigte, verdeutlichte die zentrale Rolle des Cysteins bei der Photoreduktion des beteiligten Flavinchromophors. Somit liegt es nahe, daß die Ausbleichreaktion der LOV-Domänen eine Photoreduktion zu einem nichtfluoreszierenden Flavin-(C4a)-Thiol-Addukt darstellen könnte, wobei diese halbreduzierte Form deutlich länger stabil scheint als ein reines Flavinsemichinon. Während der Dunkelregeneration oxidiert dieses Photoprodukt wieder unter Aufhebung der Thiobrücke (siehe Abbildung 64).



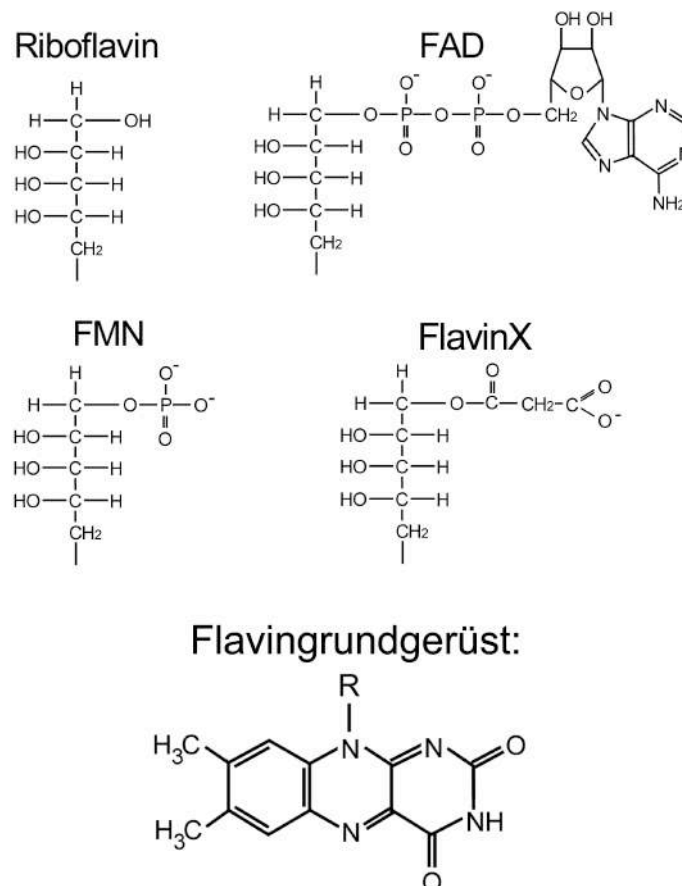
**Abbildung 64: Postulierter Reaktionsmechanismus für die lichtvermittelte Photoproduktbildung der LOV-Domänen aus Haferphototropin.**

Durch Licht wird die kovalente Bindung zwischen der C4a-Position des Flavin-Isoalloxazinrings und dem SH-Rest des Cystein 39 der LOV-Domänen induziert, wobei der Flavinchromophor reduziert wird. R steht für den unterschiedlichen Rest der verschiedenen Flavine (siehe Abbildung 65).

Eine Bestätigung für diesen postulierten Reaktionsmechanismus fand sich auch über NMR-Messungen von rekonstituierten LOV2-Domänen mit verschiedenen markierten Flavinen (Dürr, 2001; Salomon *et al.*, 2001): ein mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem FMN rekonstituiertes CBP-LOV2 zeigte, im Vergleich zum unbelichteten Zustand, durch Belichtung eine chemische Verschiebung des C4a-Signales, die auf einen Übergang von einer  $\text{sp}^2$ - zu einer  $\text{sp}^3$ -Hybridisierung hindeutete. Ebenso bekräftigte die dramatische Aufwärtsverschiebung des N5-NMR-Signals bei belichtetem CBP-LOV2, rekonstituiert mit universell  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -markiertem FMN, zusätzlich ein Flavin-C(4a)-Thioladdukt.

Daß die Photoreduktion auf Eis in ähnlicher Geschwindigkeit wie bei Raumtemperatur abläuft, spricht für unmittelbare Nähe des Chromophors zum Protein bzw. Reaktion an Ort und Stelle. Die exponierte Lage des Cystein 39 im berechneten LOV-Proteinmodell, die

zentrale Bedeutung des Cystein 39 bei der Photoproduktbildung sowie die spektralen Hinweise auf ein Flavin-(C4a)-Cysteinyladdukt lassen vermuten, daß das Schwefelatom des Cysteins und die C(4a)-Position des Isoalloxazinrings des Flavins räumlich in unmittelbarer Nähe gelegen sein müssen. Die hydrophobe Proteinhöhle der LOV-Domäne stellt eine geradezu ideale Umgebung für den aromatischen Isoalloxazinring dar, wobei die polarere Seite des Rings mit den beiden Ketogruppen tiefer in der Proteintasche, und damit näher an das im Strukturmodell polarere Ende, hineinragen könnte. Der Eingang der Höhle zeigte im Modell polare Eigenschaften, die gut mit Wechselwirkungen zum Ribitylrest des Flavins zu vereinbaren wären. Insbesondere wären Korrelationen zwischen der eher basischen Eigenschaft der dort lokalisierten Aminosäuren und dem sauren Phosphatrest des in den heterolog exprimierten LOV-Domänen gefundenen FMNs denkbar. Exakte Affinitätsverhältnisse werden erst durch eine Kristallstruktur klärbar sein. Ob FMN auch in Pflanzen als Chromophor vorhanden ist, kann daraus nicht abgeleitet werden, denn Rekonstitutionsversuche mit der heterolog exprimierten LOV2-Domäne ergaben, daß auch die Flavine FAD, FlavinX und Riboflavin (siehe Abbildung 65) eine spezifische Bindung eingehen (Dürr, 2001).



**Abbildung 65: Die Strukturformeln verschiedener bekannter Flavine.**

Die vier verschiedenen Reste der Flavine Riboflavin, FAD, FMN und FlavinX stehen jeweils für R im Grundgerüst.

Daß die Schlußfolgerungen zur Lage des Chromophors korrekt waren, bestätigt die jüngst veröffentlichte Röntgenkristallstruktur der LOV2-Domäne von phy3 aus *Adiantum capillus-veneris* (Crosson & Moffat, 2001). Phy3 bzw. Superchrom ist ein Hybridphotorezeptor, der von Nozue *et al.* (1998) in dem Farn *Adiantum capillus-veneris* identifiziert wurde. Die N-terminalen 566 Aminosäuren zeigen starke Homologie zu Phytochrom, während der C-Terminus zwei LOV-Domänen und eine Serin/Threonin-Kinase, wie auch Phototropin, aufweist (siehe Abbildung 67). In *E. coli* überexprimiert bindet Superchrom FMN an den LOV-Domänen. Mit Phycocyanobilin rekonstituiert, zeigt es die Rot/Dunkelrot-Photokonversion von Phytochrom wie auch offensichtlich aktive Eigenschaften von Phototropin. Die LOV2-Domänen von Haferphototropin und phy3 sind in ihren Aminosäuren zu 70 % identisch. Sehr ähnlich sind auch die Kristallstrukturen von phy3 und H-ERG, die zur Berechnung der Hafer-LOV-Strukturmodelle diente (s. o.). In der phy3-LOV2-Struktur liegt das Cystein 966, das in Hafer-LOV2 dem Cystein 39 entspricht, zentral in der Proteintasche und ist 4,2 Å vom C4a des FMN-Chromophors entfernt. Durch eine Konformationsänderung im Isoalloxazinring, vermittelt über Rotation um die C<sub>α</sub>(4a)-C<sub>β</sub>(4)-Bindung, kann jedoch das Schwefelatom auf 2,6 Å an die C4a-Position angenähert werden, um die postulierte lichtvermittelte Formation des kovalenten FMN-Cysteinylladdukts zu bilden.

Dies läßt vermuten, daß insgesamt die Phototropinaktivierung über die Photoaktivierung der C4a-Position im gebundenen Flavin initiiert wird, und konnte über NMR-Studien jüngst bestätigt werden (Dürr, 2000; Salomon *et al.*, 2001). Des weiteren bekräftigt die PHY3-LOV2-Kristallstruktur das berechnete Hafer-LOV2-Strukturmodell, da Aminosäuren, die in Hafer-LOV2 zu den typischen Eigenschaften der Höhle beitragen, auch in der PHY3-LOV2-Kristallstruktur Wasserstoffbrückenbindungen oder Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Chromophor ausbilden: Asparagin 1008 (entspricht Asparagin 81 in Hafer-LOV2) als polares Ende der Höhle wechselwirkt mit einer Ketogruppe des Isoalloxazinringes, Glutamin 970 und Asparagin 965 (entsprechen Glutamin 43 und Asparagin 38 in Hafer-LOV2) assoziieren mit dem Ribitylrest und Arginin 967 und 983 (entsprechen Arginin 40 und 56 in Hafer-LOV2) formen den basischen Höhleneingang und binden den Phosphatrest (Crosson & Moffat, 2001). Interessanterweise wurden in dieser Höhle auch noch zwei weitere Wassermoleküle gefunden, die mit Asparagin 965 bzw. 38 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden.

Im Molekülmodell unterschied sich LOV2 von LOV1 durch ein zentraler positioniertes Cystein 39, das bei LOV1 näher am Höhleneingang lokalisiert war. Dies bestätigten NPM-Bindungsstudien an rekombinanten Hafer-LOV1 und -LOV2 (Salomon *et al.*, 2000) mit der besseren Zugänglichkeit des Cystein 39 bei LOV1. Vorstellbar wäre eine ungestörtere und demzufolge intensivere Photoreduktion bei LOV2 durch einen isolierteren Reaktionsraum ohne den Einfluß von äußeren Komponenten. Als nächstmöglicher Protonendonator könnte

in LOV2 das 3,6 Å entfernte Glutamin 100 fungieren. Exakte Affinitäten können jedoch erst durch eine vergleichende Untersuchung der LOV-Kristallstrukturen geklärt werden. Daß LOV1 allerdings strukturell anders gebaut sein muß, lassen auch die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten der beiden LOV-Domänen vermuten (Salomon *et al.*, 2000). Die starke Homologie der LOV-Domänen in Phototropin bedeutet zwar eine ähnliche Primärstruktur, gilt allerdings nicht zwangsläufig auch für die Sekundär- und Tertiärstruktur. So ist es längerfristig unumgänglich, eine geeignete Methode zur Aufreinigung von intaktem Phototropin aus Pflanzen zu finden, um nicht nur die Proteinbindungstasche mit den tatsächlichen Bindungsverhältnissen exakt zu bestimmen, sondern auch das in Pflanzen als Chromophor vorkommende Flavin zu identifizieren.

### ***Die Auswirkung der Photoproduktbildung auf die Proteinkonformation der LOV2-Domäne***

Die LOV-Domänen durchliefen über die lichtinduzierte Photoproduktbildung und anschließende Dunkelreversion einen vollkommen eigenständigen Photozyklus, wie er auch bei dem bakteriellen Photorezeptor PYP (Genick *et al.*, 1997) zu finden ist. Das Ergebnis der lichtvermittelten Photoreduktion des Flavinchromophors der LOV2-Domäne stellt höchstwahrscheinlich als photochemische Primärreaktion ein Flavin-C(4a)-Thioladdukt dar. Messungen des Circular dichroismus jeweils bei beiden Hafer-LOV-Domänen (Salomon *et al.*, 2000) zeigten lichtinduzierte Konformationsänderungen des Chromophors, die bei den Cysteinmutanten fehlten. Über NMR-Messungen waren nicht nur drastische Verschiebungen an den Positionen C4a und N5 des Flavins festzustellen, sondern auch Verschiebungen in geringem Maße an vielen weiteren Positionen im Protein (Salomon *et al.*, 2001). Dies deutete nicht nur auf eine lichtinduzierte Konformationsänderung des Chromophors hin, sondern auch dadurch sekundär auf eine Änderung der Proteinkonformation. Offensichtlich trägt diese Konformationsänderungskaskade als photochemische Sekundärreaktion zur Aktivierung des Photorezeptors entscheidend bei.

### ***Die Charakterisierung der Phototropinphosphorylierung durch radioaktive Markierung und über die Kreuzreaktion mit Anti-NPH1***

Die Intensität der Kreuzreaktion von Phototropin mit Anti-NPH1 gab bei Dikotyledonen und, im Falle von unphosphoryliertem Phototropin, auch bei Monokotyledonen – Anti-NPH1 erkennt die phosphorylierte Phototropinform bei Monokotyledonen kaum – unter den verwendeten Bedingungen die Phototropinkonzentration wieder. Zur Analyse der Phototropinphosphorylierung stand neben der radioaktiven Markierung mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP mit der selektiven Anti-NPH1-Erkennung bei Monokotyledonen im Bereich der Epitope ein zweites Werkzeug zur Verfügung.

Weiterhin unterschied sich die unbelichtete Phototropinform aller untersuchten Pflanzen in ihrer Kreuzreaktion deutlich von der *in vivo* belichteten und damit phosphorylierten Form durch eine Mobilitätsreduktion um etwa 2 kDa, wobei dies bei Hafer und Senf erstmalig beobachtet werden konnte. Auch durch *in vitro* Phosphorylierung konnte eine Erhöhung des Molekulargewichts sowie die Reduktion der Kreuzreaktion reproduziert werden. Wurde mehr ATP als von Zacherl (1997) mit 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration vorgeschlagen, zur *in vitro* Phosphorylierung eingesetzt, konnte eine stärkere Mobilitätsreduktion erreicht werden. Deutlich zu erkennen waren dabei im Westernblot auch Intermediatbanden zwischen dem Molekulargewicht des unphosphorylierten und phosphorylierten Phototropins, die bei steigender ATP-Menge ein jeweils höheres Molekulargewicht aufwiesen. Bei stets sättigender Belichtung schienen die zur vollständigen *in vitro* Phosphorylierung nötigen ATP-Mengen wesentlich höher zu liegen als bisher angenommen. Selbst durch eine physiologisch hohe, *in vivo* unwahrscheinliche ATP-Endkonzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  konnten bei der *in vitro* Phosphorylierung von Rohextrakten oder mikrosomalen Membranen noch Intermediate mit geringerer Molekülmasse gefunden werden, die, im Vergleich zu *in vivo* sättigend belichtetem Phototropin, möglicherweise immer noch nur partiell phosphoryliertes Phototropin darstellen könnten. Daß die Phosphorylierung an mehreren Stellen stattfindet, hatten Short *et al.* (1992 und 1994) nach einem proteolytischen Phototropinverdau und Lokalisierung verschiedener Phosphopeptide beschrieben. Denkbar wäre weiterhin, daß bei der *in vitro* Phosphorylierung eine zur vollständigen Mobilitätsreduktion nötige Komponente fehlt oder die *in vitro* Phosphorylierungsbedingungen noch nicht optimal an die *in vivo* Situation im intakten Zellkompartiment angepaßt sind. Darüber hinaus muß auch nicht jede phosphorylierte Stelle in Phototropin eine Änderung der Mobilität zur Folge haben und demzufolge muß Phototropin nicht zwangsläufig bei maximaler Mobilitätsreduktion quantitativ phosphoryliert vorliegen.

Überdies scheint es nach wie vor erstaunlich, daß durch die Phosphorylierung allein ein Molekulargewichtsunterschied von etwa 2 kDa zustande kommt. Dies sollte bedeuten, daß bei einer Molekulargewichtserhöhung von 79 Da pro Phosphatgruppe rein stöchiometrisch gesehen etwa 25 Serin- und ggf. auch Threoninreste phosphoryliert werden. Obwohl die UV-A-/blaulichtvermittelte Phototropinphosphorylierung sich bereits im massiven radioaktiven Einbau eines nicht im Silbergel erkennbaren Proteins ausdrückt, sind 25 Phosphorylierungsstellen in der Literatur noch nie beschrieben worden. Andernfalls könnte die Gewichtszunahme durch ein verändertes Laufverhalten im SDS-Gel zustande kommen, da die Bindung von Phosphat, auch bereits in geringerem Ausmaß, zusätzlich negative Ladung wie auch mögliche Konformationsänderungen dem aufzutrennenden Protein vermittelt. Eine Reduktion der Proteinmobilität nach Phosphorylierung wurde auch bei anderen Phosphoproteinen bereits beobachtet und diskutiert (Diskussionsforen unter

<http://pkr.sdsc.edu/html/index.shtml> oder [www.nih.gov/mirror/Kinases](http://www.nih.gov/mirror/Kinases), insbesondere Beitrag [www.nih.gov/mirror/Kinases/pkr/pk\\_majordomo/msg00047.html](http://www.nih.gov/mirror/Kinases/pkr/pk_majordomo/msg00047.html) oder [www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pk\\_majordomo/msg00516.html](http://www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pk_majordomo/msg00516.html)).

Ein weiterer Hinweis zur Mobilitätsreduktion durch Phosphorylierung konnte durch *in vitro* Phosphorylierung der heterolog als CBP-Fusionsproteine in *E. coli* exprimierten Phototropinsubdomänen erhalten werden: wurde lediglich das N-terminale Fragment vor den chromophorbindenden LOV-Domänen aus Haferphototropin mit der Proteinkinase A (PKA), die starke Homologien zur Phototropinkinase zeigte, phosphoryliert, konnte, analog zu phosphoryliertem Haferphototropin, eine Mobilitätsreduktion von etwa 2 kDa sowie eine reduzierte Anti-NPH1-Erkennung im Westernblot im Vergleich zur unphosphorylierten Form beobachtet werden. Dies wies darauf hin, daß die Phosphorylierung in diesem Phototropinbereich die Reduktion der Mobilität wie auch der Antikörpererkennung verursachte.

Bei der Ermittlung des Schwellenwerts zur lichtvermittelten *in vivo* bzw. *in vitro* Phosphorylierung in den Antikörperepitopen von Phototropin aus Pflanzen mit Anti-NPH1 zeigte sich, daß bei 10  $\mu\text{mol m}^{-2}$  UV-A/Blaulicht, das Salomon *et al.* (1997c) und Zacherl (1997) indirekt als Schwellenwert für die *in vivo* Phosphorylierung gemessen haben, noch keine Mobilitätsreduktion oder eine verminderte Kreuzreaktion sichtbar war. Zum einen ist es bei Dikotyledonen möglich, daß diese geringe Menge an phosphoryliertem Phototropin noch keine erkennbare Mobilitätsreduktion zeigt, zum anderen könnte eine evtl. vorhandene geringe Mobilitätsreduktion von der starken Bande des nichtphosphorylierten Phototropins überdeckt werden. Auch konnte bei analoger *in vitro* Phosphorylierung von Rohextrakt aus Monokotyledonen noch keine Intensitätsabnahme der Antikörperreaktion detektiert werden, da möglicherweise zudem eine Phosphorylierung außerhalb der Epitope bei diesem Lichtfluß stattfindet.

Bei der Untersuchung der effektiven Lichtqualitäten konnte Phosphorylierung von Phototropin durch UV-A/Blaulicht als auch durch Wellenlängen im ferneren UV-Bereich gezeigt werden. Mit den zur Verfügung stehenden Lichtquellen wurde monochromatisches Licht definierter Wellenlängen von 220 nm bis 450 nm erzeugt, jedoch war eine deutliche Varianz in der jeweiligen Lichtflußrate vorhanden. Um diese Vorgabe zu kompensieren, wurde unter der Annahme, daß Bunsen-Roscoe-Reziprozität – stets gleiche phototropische Effekte werden durch insgesamt gleichen Lichtfluß erzielt – gültig ist, der Effekt untersucht, in welcher Weise Phototropin auf insgesamt gleichen Lichtfluß unterschiedlicher Wellenlängen, bei entsprechend unterschiedlich langer Belichtungszeit, *in vivo* reagiert. Über die Kreuzreaktion mit Anti-NPH1 war eine Mobilitätsreduktion bereits ab 240 nm deutlich zu

sehen. Das Nachlassen der Anti-NPH1-Erkennung war deutlich ab 270 nm zu beobachten. Wurde die *in vivo* Phosphorylierung indirekt über radioaktive *in vitro* Phosphorylierung betrachtet, zeigte die *in vivo* Phosphorylierungsstärke generell im fernerem UV-Bereich niedrigere Raten, in Abhängigkeit von der Wellenlänge jedoch einen Kurvenverlauf, der dem Wirkungsspektrum des Phototropismus ähnelte. Hier mag die Wellenlänge selbst oder aber eine Regeneration bzw. Dephosphorylierungsreaktion aufgrund der vergleichsweise langen Belichtungszeiten eine Rolle spielen. In Anbetracht der Tatsache, daß zur sättigenden Belichtung bei 250 nm Wellenlänge die Belichtungsdauer noch 17mal länger ist als bei 450 nm, kann das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Phototropin zu Lasten der Phosphorylierung verschoben sein und aus diesem Grund niedrige Phosphorylierungswerte aufweisen. Möglicherweise hatte die UV-C-Lichtflußrate nicht ausgereicht, um alle Phosphorylierungsstellen, die gleichwertig UV-C-/UV-A und blaulichtsensibel sind, zu phosphorylieren.

Die Belichtung mit einer UV-C Lampe mit stärkerer Lichtflußrate bei 254 nm rief eine geringfügig niedrigere *in vivo* Phosphorylierung hervor als eine UV-A/Blaubelichtung mit analogem Lichtfluß. Jedoch nur bei letzterer war die Antikörperreaktion reduziert. Neben der Möglichkeit, daß diese 254 nm UV-C-Lampe Streulichthintergrund aufweisen könnte, wäre es auch denkbar, daß die Phosphorylierungsstellen, die zum Mobilitätsverlust größtenteils beitragen, durch UV-C bis UV-B und Blaulicht phosphoryliert werden können. Jedoch die Phosphorylierungsstellen, die in den Epitopen des Antikörpers liegen und für den Erkennungsverlust nach Phosphorylierung verantwortlich sind, sind unter Umständen UV-A-/blaulichtsensibel. Umgekehrt kann man auch folgern, daß noch nicht alle Phosphorylierungsstellen im *in vivo* UV-C belichteten Phototropin besetzt sind und deshalb die Antikörpererkennung noch vorhanden ist. Ein weiterer Hinweis auf die unterschiedliche Lichtsensibilität der Phosphorylierungsstellen zeigte die radioaktive *in vitro* Nachphosphorylierung selbst: Durch *in vivo* UV-C-Belichtung wurden möglicherweise UV-A/blaulichtsensitive Phosphorylierungsstellen ausgespart und erst bei der *in vitro* Nachphosphorylierung durch UV-A/Blaulicht phosphoryliert, was den etwas erhöhten radioaktiven Einbau erklärte. Eine analoge UV-C-Belichtung bei der Nachphosphorylierung mit gleichem Lichtfluß wäre nur mit stärkeren UV-Lampen durchführbar und konnte so nicht verglichen werden.

Ob der Effekt, daß eine oder mehrere Phosphorylierungsstellen in den Epitopen des Antikörpers spezifisch durch UV-A/Blaulicht phosphoryliert werden, ob bei UV-B- und UV-C-Belichtung die Lichtflußrate zu gering zur vollständigen Phosphorylierung ist oder ob nun bei UV-C-Wellenlängen unter 270 nm eine reduzierte Anti-NPH1 Erkennung prinzipiell nicht möglich ist, konnte über Dosis-Effekt-Studien nicht eindeutig geklärt werden. Andererseits könnten Mutantenstudien, durch die zunächst die Phosphorylierungsstellen bestimmt und

anschließend selektiv mit verschiedenen Lichtqualitäten phosphoryliert würden, darüber Aufschluß geben.

Nicht zuletzt weisen diese Ergebnisse, in Einklang mit Baskin & Iino (1987), die das Aktionsspektrum für den Phototropismus bei Alfalfa im niederen UV-Bereich mit einem Maximum bei 280–290 nm erweitert haben, jedoch darauf hin, daß Phototropin durchaus auch als UV-B- und UV-C-Rezeptor agieren könnte, da durch diese Wellenlängen phototrope Krümmung induziert wird.

Darüber hinaus wäre es interessant, die Eindeutigkeit dieses Effekts durch die Autophosphorylierung von Phototropin bei verschiedenen Lichtqualitäten ohne Wechselwirkungen mit einem anderen Molekül oder Rezeptor, beispielsweise exprimiert im Insektenzellsystem, zu betrachten.

### **Die Ermittlung von Phosphorylierungsstellen in Haferphototropin**

Die selektive Anti-NPH1-Erkennung bei Monokotyledonen stellte bereits einen Hinweis auf das Vorhandensein von Phosphorylierungsstellen in den Epitopen des Antikörpers dar. Zwar wurde dieser Antikörper gegen das denaturierte, heterolog exprimierte N-terminale Drittel von Phototropin aus *Arabidopsis thaliana*, das die Aminosäuresequenz des N-Terminus und der LOV1-Domäne beinhaltete, erzeugt. Dies bedeutete aber nicht zwangsläufig, daß der polyklonale Antikörper exakt und gleichwertig den gesamten Antigenbereich erkannte. Somit werden vermutlich einzelne Bereiche innerhalb des N-Terminus und/oder LOV1 unterschiedlich stark als Epitope erkannt. Für eine genauere Spezifikation der autophosphorylierten Bereiche schien es demnach sinnvoller, bereits denaturiertes und in SDS-PAGE aufgetrenntes Phototropin aus *in vitro* radioaktiv phosphoryliertem Rohextrakt aus etiolierten Haferkeimlingen zu eluieren, als die bislang spezifische Aufreinigungsstufe von Haferphototropin zu verwenden, die aufgrund ihrer nur schwachen Autophosphorylierbarkeit für weiterführende Untersuchungen weniger geeignet war. Da im umliegenden Molekulargewichtsbereich von Haferphototropin keine weiteren Proteine lichtvermittelt phosphoryliert wurden, konnte die Phototropinbande eindeutig ausgeschnitten, aus dem Gel eluiert und chemisch mit Cyanbromid gespalten werden. Über die elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennten Spaltfragmente, die idealerweise hauptsächlich die Einzeldomänen von Haferphototropin wiedergaben, konnte Phosphorylierung im N-Terminus und in der Region zwischen den chromophorbindingen Domänen festgestellt werden. Rekombinantes Phototropin als CBP-Fusionsprotein konnte in *E. coli* nur in äußerst geringen Mengen exprimiert werden. Dies zeigte keinerlei Autophosphorylierungsaktivität. In deutlich größerem Reinheitsgrad und in wesentlich höheren Mengen konnte in *E. coli* analog der Teil von Haferphototropin, dem die Kinasedomäne fehlte, überexprimiert werden. Dieses sogenannte CBP-NL12 (siehe Anhang)

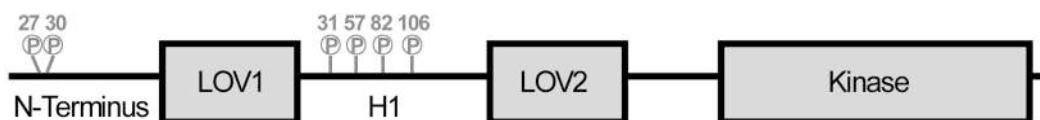


wies nach *in vitro* Phosphorylierung mit der Proteinkinase A (PKA), die starke Sequenzhomologien zur Phototropinkinase aufwies und deshalb ähnliche Spezifität vermuten ließ, und nachfolgender Cyanbromidspaltung die gleichen Phosphorylierungsbereiche wie im autophosphorylierten Haferphototropin auf.

Parallel zeigten von allen einzeln heterolog exprimierten Phototropinsubdomänen nach *in vitro* Phosphorylierung mit der PKA wiederum nur der N-Terminus und die H1-Region zwischen den LOV-Domänen radioaktive Markierung. Die Immunreaktion des heterolog exprimierten N-Terminus entsprach der des Phototropins in Hafer: die unphosphorylierte Form wurde erkannt, hingegen wies die mit der PKA phosphorylierte Form eine stark reduzierte Antikörpererkennung neben einer Mobilitätsreduktion um etwa 2 kDa auf. Dies deutete auf ein sehr ähnliches Phosphorylierungsmuster von PKA und der Phototropinkinase hin. Aus einem Sequenzvergleich der N-Terminalen Regionen vor der LOV1-Domäne aller bisher bekannten Phototropine wurden homologe Serine ermittelt, da bei Phosphopeptidanalysen von phosphoryliertem Phototropin hauptsächlich Phosphoserin und nur in sehr geringem Umfang Phosphothreonin gefunden worden waren (Palmer *et al.*, 1993a; Short *et al.*, 1994). Diese wurden mit dem klassischen Phosphorylierungsmuster der PKA verglichen. Nach zielgerichteter Mutagenese dieser Serine zu Alanin und anschließender Überprüfung über radioaktive *in vitro* Phosphorylierung parallel zur immunologischen Betrachtung konnten zwei Serine (Aminosäureposition 27 und 30) ermittelt werden, bei deren Substitution deutlich geringere Phosphorylierungsraten neben einer Mobilitätsreduktion der SDS-PAGE-Bande um etwa 1 kDa zu verzeichnen war. Die Doppelmutante dieser beiden Serine wies eine zum autophosphorylierten Haferphototropin analoge Mobilitätsreduktion von etwa 2 kDa auf, zeigte auch nach Abspaltung des CBP nach radioaktiver *in vitro* Phosphorylierung Einbauraten von weniger als 1 % der Wildtypmarkierung und keine Antikörperreaktion mehr. Vielmehr konnte über die Antikörperreaktion am heterolog exprimierten N-Terminus gezeigt werden, daß bereits durch die Mutation an Position 27 im unphosphorylierten Zustand die Antikörperreaktion etwas und an Position 30 sehr stark reduziert war und somit Serin 30 ein sensitiveres Epitop für den Antikörper darstellte. Es handelt sich somit sehr wahrscheinlich bei Phototropin um dieselben Serine als Phosphorylierungsstellen.

Die H1-Regionen verschiedener Phototropine wurden auf das resultierende Phosphorylierungsmotiv des N-Terminus untersucht. Die dabei ermittelten sechs homologen Serine wurden in der rekombinanten H1-Subdomäne aus Haferphototropin jeweils als Einzelmutationen gegen Alanin ausgetauscht. Aufgrund der hohen Instabilität des H1-Proteins, der ATPaseaktivität der hierbei mitgereinigten *E. coli*-Faltungshilfen und mehrerer vorhandener Phosphorylierungsstellen konnte bei den Einzelmutanten nur eine wahrscheinliche Phosphorylierungsreduktion gefunden werden. Nach der Generation von

Zwei- bis Vierfachmutanten unterschiedlicher Kombinationen und Abspaltung des CBP konnte nach radioaktiver *in vitro* Phosphorylierung bei der Mutante, die statt der Serine 31, 57, 82 und 106 jeweils Alanine enthielt, kaum noch radioaktiver Einbau verzeichnet werden. Um die Phosphorylierungsstellen der Phototropinkinase und der PKA miteinander zu vergleichen, wurde eine Phosphopeptidanalyse mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie der tryptischen Phosphopeptide von *in vitro* autophosphoryliertem Haferphototropin und mit der PKA phosphoryliertem NL12-CBP-Fusionsprotein durchgeführt und dabei ein hoher Grad an Übereinstimmung in den scharf aufgetrennten Bereichen festgestellt. Das so erzeugte Markierungsmuster von CBP-H1 war größtenteils im Muster des Haferphototropins und des CBP-NL12 wiederzufinden. Um weiter die einzelnen Phosphorylierungsstellen des Haferphototropins nach Autophosphorylierung mit den über Mutagenese ermittelten zu vergleichen, wurde zunächst das Phosphopeptidmuster von CBP-H1 anhand der Phosphopeptidmuster der ermittelten Ein- bis Vierfachmutanten geeicht. Die Phosphorylierungsstellen S-31, S-57, S-82 und S-106 der H1-Region konnten dann auch in Hafer gefunden werden. Analoge Phosphopeptidmuster beim überexprimierten und phosphorylierten N-Terminus erzeugten erst nach zusätzlicher Cyanbromidspaltung und optimiertem Trypsinverdau in Hafer zuzuordnende Phosphopeptidmarkierungen. Es konnten die Positionen 27 und 30, kartiert über die jeweiligen Einzelmutanten, in Hafer bestätigt werden.



**Abbildung 66: Die in Haferphototropin kartierten Phosphorylierungsstellen.**

Darüber hinaus waren sowohl beim N-Terminus als auch bei der H1-Vierfachmutante aber noch weitere, nichtzuzuordnende Peptidmarkierungen vorhanden. Es könnte sich um unvollständig gespaltene, größere Phosphopeptide oder aber um Markierungen des CBP handeln, das auch ein Phosphorylungsmotiv besitzt. Bei der Thrombinspaltung von phosphorylierten Mutanten wies das CBP jedoch nur sehr geringen radioaktiven Einbau auf, so daß die nicht zuzuordnenden Markierungen in der 2D-DC, die verhältnismäßig stark waren, wahrscheinlich nicht auf das CBP zurückzuführen sind, sondern auf weitere, noch unbekannte Phosphorylierungsstellen, möglicherweise sogar Phosphothreonine (Palmer *et al.*, 1993a; Short *et al.*, 1994). Aus Zeitmangel konnten diese Studien, wie z. B. erneute Mutagenesestudien, nicht mehr weitergeführt werden. Nach neuesten Ergebnissen schienen sich die beiden H1 Positionen S-74 und S-89, bereits in dieser Arbeit als Einzelmutanten in H1 generiert, doch auch als weitere Phosphorylierungsstellen zu bestätigen (M. Salomon,

persönliche Mitteilung).

Wurden gleiche Proteinmengen der H1-Region und des N-Terminus mit ATP im Überschuß *in vitro* radioaktiv phosphoryliert, war ein Verhältnis der Phosphorylierungsstärke der H1-Region zum N-Terminus von 1 : 0,7–0,75 zu verzeichnen. Dies entsprach nicht der Anzahl der bislang ermittelten Phosphorylierungsstellen, sondern wies möglicherweise auf weitere N-terminale Phosphorylierungsstellen hin. Zudem wiesen während der Phosphopeptidanalyse der H1-Region die Positionen 57 und 82 im Verhältnis zu den Markierungen anderer Phosphorylierungsstellen eine erhöhte radioaktive Markierung auf. Eine unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Phosphorylierungsstellen hatte bereits Briggs (1996) vermutet. Vorstellbar wäre eine unterschiedliche Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen für die Kinase durch die Proteinfaltung selbst. Daß zwischen autophosphoryliertem Phototropin aus Pflanzen und rekombinantem Haferphototropin, dem die Kinasedomäne fehlte und das stattdessen von der PKA lichtunabhängig phosphoryliert wurde, möglicherweise auch in der Sensitivität der Phosphorylierungsstellen Unterschiede bestehen, wurde beim Cyanbromidverdau deutlich: bei Phototropin aus Pflanzen betrug das Verhältnis der Phosphorylierungsstärke von N-Terminus zur H1-Region 1 : 3, hingegen bei CBP-NL12 1 : 6. Auch denkbare unterschiedliche Lichtschwellenwerte der einzelnen bislang ermittelten Phosphorylierungsstellen bei der *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierung von Phototropin aus Hafer könnten durch die etablierte Phosphopeptidanalyse analysiert werden. Im N-Terminus wurden als Phosphorylierungsstellen die Serine 27 und 30 bestätigt, die der Westernblotanalyse nach für die Mobilitätsreduktion verantwortlich scheinen. Somit bewirkt diese enge Nachbarschaft der beiden Phosphorylierungsstellen, die in der gesamten Phototropinsequenz einzigartig ist, bei Phosphorylierung zwar eine dicht nebeneinander lokalisierte negative Ladung durch die Phosphatreste. Jedoch müßten diese aufgrund des ungeraden Abstands von Position 27 und 30 in verschiedene Richtungen des Raums orientiert sein, so daß in der SDS-PAGE möglicherweise das Detergens bei der Denaturierung und damit Einbringung negativer Ladung über den gesamten Bereich um Position 27 und 30 gestört ist. Die SDS-Anionen binden sich üblicherweise an die Hauptketten (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren), so daß ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht (Stryer, 1996). Anderenfalls wären, wie oben bereits erwähnt, rein rechnerisch für die beobachtete Mobilitätsreduktion durch zur Masse zu addierende Phosphatreste die Phosphorylierung an mindestens 25 Stellen erforderlich, was beim N-Terminus unmöglich ist.

### **Die Dunkelregeneration zur Wiederherstellung der Phosphorylierungsaktivität**

Durch sättigende *in vivo* Belichtung von etiolierten Keimlingen wurde Phototropin phosphoryliert. Die anschließende langsame Dephosphorylierung im Dunkeln (bzw. unter

rotem Schutzlicht) war bereits von Short & Briggs (1990) und Hager & Brich (1993) mit der Wiederherstellung der phototropischen Sensitivität korreliert worden. Die *in vitro* Phosphorylierungskapazität in etiolierten Haferkoleoptilenspitzen war nach sättigender *in vivo* Belichtung und einer anschließenden Dunkelregeneration von 90 Minuten wieder erreicht (Short & Briggs, 1990; Palmer *et al.*, 1993a). Eine deutlich schnellere Kinetik der Regeneration der Phosphorylierungskapazität in der Haferkoleoptilenbasis haben Zacherl (1997) bzw. Salomon *et al.* (1997c) gezeigt, wobei Phototropin nach 5 Minuten Dunkelinkubation bereits 25 % und nach 20 Minuten 100 % der Phosphorylierungskapazität der unbelichteten Haferkoleoptilenbasis zurückerlangt hatte. In der Koleoptilenbasis stieg die Phosphorylierungskapazität innerhalb von 90 Minuten Dunkelinkubation nach dem sättigenden Lichtpuls sogar auf den dreieinhalbfachen Wert der unbelichteten Basis an. Zacherl diskutierte als wahrscheinlichste Ursache dafür eine Steigerung der Phototropinmenge – unter der Annahme, daß die Phosphorylierungsstärke das Maß der Phototropinkonzentration ausdrückt. Dies würde somit einen UV-A/blaulichtinduzierten Proteinabbau mit sofortiger UV-A/blaulichtinduzierter Genexpression und Neusynthese bedeuten.

Über die Kreuzreaktion des Antikörpers Anti-NPH1 mit Phototropin aus Monokotyledonen (Hafer und Mais) und Dikotyledonen (Kresse, Senf, Soja, Tomate und Rauke) wurde die Proteinmenge während der Dunkelregeneration betrachtet. Zwischen den phototropisch sensitivsten Bereichen (die Koleoptilenspitze bzw. direkt unter dem Hypokotylhaken) und den basaleren Bereichen (der Koleoptilenbasis bzw. im entsprechenden Abschnitt des Hypokotyls) im Keimling bestand im Verlauf der Dunkelregeneration kein Unterschied: nach 90 Minuten Dunkelregeneration konnte demnach in allen Fällen die gleiche Menge Phototropin wie vor der Belichtung anhand einer gleichstarken Kreuzreaktion festgestellt werden. Die gesteigerte Phosphorylierungskapazität in der Koleoptilenbasis beruhte somit nicht auf einer gesteigerten Phototropinkonzentration. Des weiteren spricht auch der Erinnerungseffekt von Phototropin (Salomon *et al.*, 1996; Hager *et al.*, 1993), bei dem sättigend belichtetes Haferphototropin an mikrosomalen Membranen auch noch durch eine erstmalige ATP Gabe nach 70 Minuten Dunkelinkubation phosphoryliert werden konnte, gegen einen Phototropinabbau und anschließende Neusynthese, da dieses neue Phototropin etioliert und nicht aktiviert vorläge.

Für die starke Zunahme der Phosphorylierungskapazität nach der Dunkelregeneration wäre eine veränderte Konformation von Phototropin im Vergleich zum etiolierten Zustand denkbar, so daß vorbelichtetes Phototropin verstärkt zugängliche Phosphorylierungsstellen offeriert, wie Zacherl (1997) bereits vermutet hat. Auch ist eine gesteigerte Phototropinkinaseaktivität nach Vorbelichtung vorstellbar. Des weiteren ist nicht eindeutig auszuschließen, daß Phototropin im etiolierten Zustand bereits partiell phosphoryliert vorliegt und erst nach der

lichtabhängigen Phosphorylierung dephosphoryliert wird. Möglicherweise liegen auch zell- oder altersabhängige Unterschiede zwischen Phototropin aus der Koleoptilenspitze bzw. aus den basaleren Zellen vor, wie Salomon *et al.* (1996) bereits für die *in vitro* Phosphorylierung unterschiedlich alter Keimlinge ermittelt haben. Eventuell agiert auch eine phototropinunabhängige Komponente, die mit dem Entwicklungsgrad der Zelle in Verbindung gebracht werden kann, wie z. B. zusätzliche Kinaseaktivität oder unterschiedliche Zellokalisation von Phototropin in Abhängigkeit von der Entwicklungsstufe. Erstaunlicherweise tritt der Effekt der gesteigerten Phosphorylierbarkeit nach Vorbelichtung weniger stark bei Dikotyledonen auf, bei denen die Phototropinverteilung entlang des Hypokotyls nicht exponentiell wie bei Monokotyledonen, sondern linear ist. Die genauere Untersuchung dieses Phänomens stellt künftig eine Herausforderung dar.

Während der gesamten Dunkelregeneration blieb die Stärke der Kreuzreaktion von Anti-NPH1 und Phototropin bei allen untersuchten Dikotyledonen stets konstant, was auch gegen einen UV-A/blaulichtinduzierten Proteinabbau spricht. Bei Monokotyledonen war unmittelbar nach der sättigenden UV-A/Blaubelichtung aufgrund der reduzierten Antikörpererkennung der phosphorylierten Phototropinform eine dramatisch reduzierte Kreuzreaktion in der Westernblotanalyse zu sehen, die aber bereits nach 5 Minuten Dunkelinkubation wieder deutlich an Intensität zunahm. Nach 20 Minuten Dunkelinkubation unterschied sich die Intensität von allen folgenden Regenerationszeitpunkten und von der etiolierten Probe nicht mehr. Da Anti-NPH1 nur gegen ein rekombinantes *Arabidopsis thaliana*-Phototropinfragment, das den N-Terminus und LOV1 enthielt, erzeugt worden war, lieferte die selektive Antikörpererkennung bei Monokotyledonen zur *in vivo* Dephosphorylierung weitere Informationen: die ermittelten Phosphorylierungsstellen im N-Terminus, also Serin 27 und 30 (siehe 4.4.3), die in den Epitopen von Anti-NPH1 liegen und deren Phosphorylierung für den Verlust der Antikörpererkennung maßgeblich verantwortlich waren, waren somit nach 20 Minuten wieder dephosphoryliert.

Bei allen analysierten Dunkelregenerationen konnte eine Minute nach Belichtung ein Mobilitätsverlust der phosphorylierten Phototropinbande im SDS-PAGE-Gel bestimmt werden, der nach ein bis fünf Minuten sein Maximum von etwa 2 kDa erreichte. Im weiteren Verlauf der Dunkelinkubation nahm die Phototropinbande kontinuierlich ihr ursprüngliches Molekulargewicht wieder ein, das vollständig bei Hafer nach 60–70 Minuten und bei Kresse nach 90 Minuten erreicht war. Da aber nach 20 Minuten in der Koleoptilenbasis bereits wieder die ursprüngliche Phosphorylierungskapazität vorhanden war, jedoch noch keine vollständige Regeneration zum ursprünglichen Laufverhalten wiederhergestellt war, ist eine zusätzliche lichtvermittelte sekundäre Modifikation denkbar.

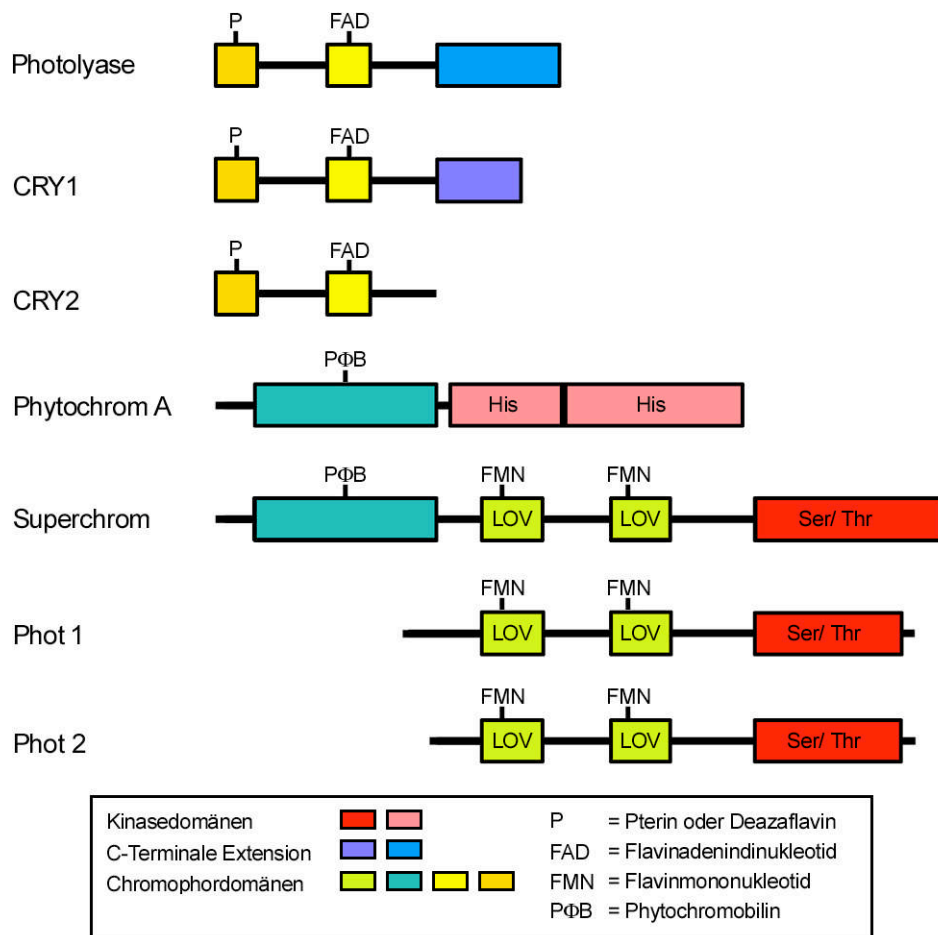
Die lichtvermittelte Phosphorylierungsreaktion, die *in vivo* sehr schnell ablaufen muß, da

bereits nach einer Minute bei Hafer eine starke Mobilitätsreduktion und geringe Anti-NPH1-Erkennung vorhanden ist, kann auf Eis zwar insgesamt verlangsamt werden, jedoch läuft auch innerhalb von 30 Sekunden die Mobilitätsreduktion und die Reduktion der Anti-NPH1-Erkennung an. Die Regeneration dauerte hingegen unverhältnismäßig länger: allein die Antikörpererkennung war auch nach 2 h noch nicht wiedererlangt. Die Autophosphorylierung von Phototropin auf Eis kann, da Substrat und Kinase in einem Molekül liegen, trotz erniedrigter Molekularbewegung schneller ablaufen als die Regeneration, zu der offensichtlich ein zweites Molekül, eine Phosphatase, wie bereits von Palmer *et al.* (1993b) postuliert, nötig ist. Auch scheint die Lichtrezeption und damit die Lichtaktivierung der Kinase nur wenig durch die Temperaturabsenkung betroffen zu sein.

Bei der Untersuchung der *in vitro* Dunkelregeneration war von Palmer *et al.* (1993b) 20 Minuten nach der radioaktiven *in vitro* Phosphorylierung von Maismembranen keine Radioaktivität mehr gemessen worden, obwohl Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt worden waren. Nach der *in vitro* Phosphorylierung von Rohextrakten wurde ebenfalls eine sehr rasche Abnahme innerhalb von 15 Minuten der radioaktiven Markierung detektiert. Dies schien zunächst auf eine *in vitro* Dunkelregeneration hinzudeuten. Widersprüchlich war jedoch die Tatsache, daß radioaktiv phosphorylierte Membranen keinen Phosphatumsatz bei Zugabe von kaltem ATP zeigten (Hager & Brich, 1993; Short *et al.*, 1992) oder bei Inkubation nach der radioaktiven *in vitro* Phosphorylierung über 10 Minuten in Mais (Hager & Brich, 1993) bzw. 40 Minuten in Arabidopsis (Christie *et al.*, 1998) nahezu keine Abnahme zeigten. Eine mögliche Erklärung wäre das Fehlen der postulierten Phosphatase an Membranen bei letzteren Versuchen. Viel wahrscheinlicher ist aber primär der Einfluß des Detergens Triton-X-100, das standardmäßig sowohl bei Membranen als auch bei Rohextrakten nach Short *et al.* (1993) zur *in vitro* Phosphorylierung zugesetzt wurde, nicht aber bei den Versuchen von Hager & Brich (1993), Short *et al.* (1992) und Christie *et al.* (1998). Nach Salomon *et al.* (1996) weist Triton-X-100 einen negativen Einfluß auf die Phototropinstabilität auf. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur *in vitro* Dunkelregeneration mit Rohextrakten und mikrosomalen Membranen konnte in Westernblotanalyse mit Anti-NPH1 eine rasche, irreversible Abnahme der Phototropinkonzentration, analog zum Verschwinden der radioaktiven Markierung im Autoradiogramm, bei Dikotyledonen und bei Monokotyledonen festgestellt werden. Offensichtlich wurde der proteolytische Abbau von Phototropin durch Triton-X-100 gefördert. Darüber hinaus wäre auch eine zusätzliche intrinsische Instabilität von Phototropin im *in vitro* System denkbar. Bislang gibt es keine direkten experimentellen Hinweise dafür, daß *in vitro* eine Phosphatase zumindest im Rohextrakt aktiv ist.

**Ausblick zur Funktionsweise von Phototropin**

Der prinzipielle Aufbau aller bisher bekannten Photorezeptorenfamilien ist ähnlich, obwohl sie nicht miteinander verwandt sind: die Signalperzeption erfolgt über eine lichtabsorbierende, N-terminale Chromophordomäne, an die sich eine signaltransduzierende Domäne anschließt. Auch Phototropin ist nach diesem grundlegenden Prinzip aufgebaut (siehe Abbildung 67).



**Abbildung 67: Proteinstrukturen von Photorezeptoren.**

Dargestellt sind von oben nach unten *Escherichia coli* Typ I-Photolyase, *Arabidopsis thaliana* cry1, *Arabidopsis thaliana* cry2, *Avena sativa* phyA, *Adiantum capillus-veneris* phy3 (Superchrom), *Arabidopsis thaliana* phot1 und *Arabidopsis thaliana* phot2. Zusätzlich zur Legende sind ausgewiesen die LOV-Domänen und der Typus der Kinasedomäne: Serin/Threonin-Kinase (Ser/Thr) oder Histidinkinase (His).

Viele Photorezeptoren zeigen nicht nur einen ähnlichen Bauplan, sondern weisen auch Übereinstimmungen bei der Aktivierung auf. Während es sich bei der photochemischen Primärreaktion z. B. bei Phytochrom, Rhodopsin oder auch PYP (engl. „photoactive yellow protein“) um eine cis-Trans-Isomerisierung handelt, findet im Falle von Phototropin die Bildung eines Cysteinylladdukts statt. Bei allen resultiert daraus aber stets eine Konformationsänderung des Chromophors. Durch Lichtenergie wird somit ein ein

photochemischer Mechanismus initiiert, der die spezifische signalweiterleitende Reaktion des jeweiligen Rezeptors vermittelt. Diese besteht bei Rezeptorkinasen wie Phototropin oder auch Phytochrom in der Aktivierung der Kinasedomäne, wohingegen bei anderen Photorezeptoren zur Signaltransduktion bisher kaum Daten vorliegen.

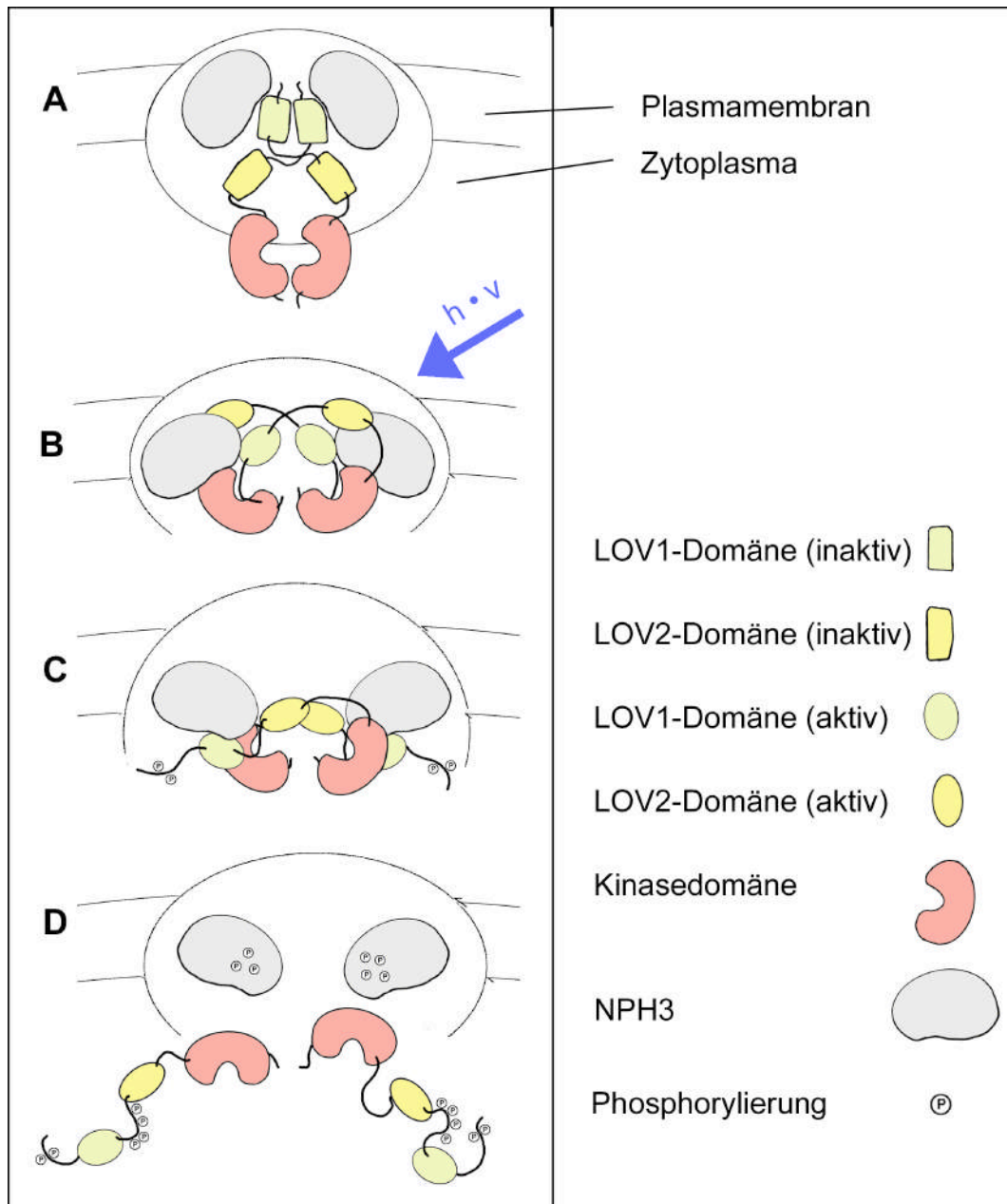
Proteinphosphorylierung und -dephosphorylierung sind ein häufiger regulatorischer Mechanismus in der Signaltransduktion bei Prokaryonten, Pflanzen und Tieren. Proteinphosphorylierung kann die Proteinstabilität, Enzymaktivität, Transkriptionsrate oder die Funktion von transmembranen Ionenkanälen beeinflussen (Krebs, 1985). Mit den Daten der vorliegenden Arbeit und bisherigen Veröffentlichungen ist für Phototropin aus Hafer folgendes Funktionsmodell konstruierbar (siehe Abbildung 68):

Im Dunkeln bzw. etiolierten Zustand ist Phototropin plasmamembranassoziiert. Diese Assoziation wird über ionische oder elektrostatische Wechselwirkungen nichtkovalenter Natur bestimmt, da Phototropin mit chaotropen Salzen von Membranen abgelöst werden kann. Auch konnte Phototropin im Dunkeln in einem höhermolekularen Komplex lokalisiert werden, der stöchiometrisch nicht einem Phototropinmultimer entsprach und somit Hinweise auf die Beteiligung anderer Proteine an diesem Komplex gab. Des weiteren war im Dunkeln keine *in vitro* Kinaseaktivität von Phototropin zur Autophosphorylierung nachweisbar.

Die Aktivierung der Phototropinkinase erfolgt durch Licht. Der Bereich der effektiven Lichtintensitäten ist relativ breit. Bereits geringe Lichtmengen zwischen 1 und 10  $\mu\text{mol m}^{-2}$  bewirken eine partielle Phototropinphosphorylierung und ein Maximum ist bei einem Lichtfluß von 1000–3000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  erreicht (siehe Abbildung 45 bzw. Salomon et al, 1997c; Zacherl, 1997). Phototropin zeigt einen breiten Wirkungsbereich: bislang als UVA-/Blaulichtrezeptor deklariert, phosphorylierte Phototropin bereits ab 250 nm mit Optima bei den im Wirkungsspektrum des Phototropismus effektivsten Wellenlängen.

Die Lichtabsorption erfolgt in den signalperzipierenden Chromophordomänen über ein nichtkovalent gebundenes Flavin (Christie *et al.*, 1999), das bei rekombinantem Phototropin FMN ist. Die Natur des Flavins macht eine Lichtabsorption im effektiven Wellenlängenbereich von 250 bis 450 nm grundsätzlich möglich. Jedoch ändern sich die Absorptionsmaxima charakteristisch, wenn das Flavin der hydrophoben Proteinumgebung an die LOV-Domäne gebunden ist. Wie in berechneten Computermodellen für die LOV-Domänen vorhergesagt und über zielgerichtete *in vitro* Mutagenese bestätigt, spielt eine Proteintasche in beiden LOV-Domänen bei der Chromophorbindung die zentrale Rolle. Diese Höhle bietet eine hydrophobe Aminosäureumgebung, in die der Isoalloxazinring des Flavins eingebettet ist, sowie ein polares Höhlenende und einen basischen Eingang zur richtigen Orientierung des Chromophors, so daß die Lage des Flavins eng definiert ist. Die Röntgenkristallstruktur der LOV2-Domäne von *Adiantum capillus-veneris*-phy3 bestätigte dies.





**Abbildung 68: Funktionsmodell zur Photoaktivierung von Phototropin in Pflanzen.**

Durch Lichtanregung formiert sich eine kovalente Bindung zwischen der C4a-Position des Isoalloxazinrings des Flavins und dem Cystein 39 der LOV-Domäne, das zentral in der hydrophoben Proteintasche exponiert ist. Dieses Cysteinyladdukt als Photoprodukt der Photoreduktion wurde spektroskopisch oder auch über NMR-Messungen nachgewiesen (Salomon *et al.*, 2001): Ebenso fand keine Photoreduktion bei Austausch des Cysteins gegen Alanin bzw. Serin über *in vitro* Mutagenese statt.

Diese photochemische Primärreaktion der Cysteinyladduktbildung, vermittelt durch die lichtinduzierte Konformationsänderung des Chromophors, bewirkt sekundär auch die Änderung der Proteinkonformation (Salomon *et al.*, 2001), die letztendlich in der Aktivierung der Kinasedomäne resultiert. Dieser Zustand ist *in vitro* auch über längere Zeit in

Abwesenheit von ATP beständig, was sich im sogenannten Erinnerungseffekt (Salomon *et al.*, 1996) ausdrückt. Die exakte Inhibition der Phototropinkinase im inaktiven Zustand im Dunkeln und die daran beteiligten Bereiche von Phototropin können erst durch die Röntgenstrukturanalyse der Phototropinkinase geklärt werden. Die aktive Kinasedomäne vermittelt die Phosphorylierung von Serinresten im N-Terminus und in der Region zwischen den beiden chromophorbindenden LOV-Domänen (H1). Über zielgerichtete *in vitro* Mutagenese wurden in den rekombinanten Domänen zwei Phosphorylierungsstellen im N-Terminus und vier Phosphorylierungsstellen in H1 nachgewiesen. Diese konnten in Phototropin aus Hafer bestätigt werden, und es existieren Hinweise für weitere Phosphorylierungsstellen. Darüber hinaus scheinen diese Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Lichtqualitäten sensibel zu sein. Möglicherweise ist auch die Spezifität für UV-Wellenlängen größer als für blaue, was auch das entwicklungsgeschichtlich hohe Alter dieser Photorezeptorklasse widerspiegelt. Neuesten Studien zufolge wurde bei Haferphototropin eine unterschiedliche Sensitivität einzelner Phosphorylierungsstellen bezüglich des Lichtflusses gefunden (von Zeppelin und Salomon, persönliche Mitteilung). Daß hierfür die Zugänglichkeit der Phosphorylierungsstellen durch unterschiedliche lichtvermittelte Konformationsänderungen variiert, erscheint plausibel. Physiologisch könnte Phototropin damit auf unterschiedliche Lichtverhältnisse reagieren. Die lichtinduzierte Auto-phosphorylierung von Phototropin kann intramolekular stattfinden, wahrscheinlicher scheint jedoch eine wechselseitige, intermolekulare Phototropinphosphorylierung, da rekombinantes LOV1-Holoprotein als Homodimer vorliegt (Salomon und Richter, unveröffentlichte Ergebnisse). Obwohl beide LOV-Domänen signalperzipierend fungieren, können sie als PAS-Domäne auch an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein. Es scheint unwahrscheinlich, daß beide LOV-Domänen exakt die gleiche Aufgabe haben, da sie sich in wenigen, aber wesentlichen Punkten unterscheiden: neben einem unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten und ähnlichen, aber nicht gleichen spektralen Eigenschaften zeigen sie andere Quantenausbeuten bei der Photoreduktion (Salomon *et al.*, 2000) und divergierende Größen der Proteintasche im Modell. In teilnativer Elektrophorese fand sich von belichtetem Phototropin hauptsächlich die monomere Form; höhermolekulare Komplexe, wie im Dunkeln beobachtet, waren drastisch reduziert. Folglich könnte Phototropin im unbelichteten Zustand auch als Homodimer vorliegen und die Konformationsänderung bewirkt, entweder durch Licht bedingt am Chromophor oder resultierend daraus durch Phosphorylierung des Proteins, die Monomerisierung. Auch Warpeha & Briggs (1993) postulierten bereits ein Phototropinhomodimer in Erbse. Phototropin wurde nach Belichtung löslich im Cytoplasma nachgewiesen, was dafür spricht, daß es aus dem postulierten Reaktionskomplex, der so auch die Membranassoziation ermöglichen könnte, entlassen werden kann.

Viele Rezeptorkinasen liegen in der inaktiven Form entspannt vor, wobei die Untereinheiten nicht in unmittelbarer Nähe zueinander stehen. Erst durch Aktivierung, wie beispielsweise bei der Src-Kinasefamilie, werden durch phosphorylierungsinduzierte Konformationsänderungen die einzelnen Untereinheiten in unmittelbare Nähe des aktiven Zentrums der Kinasedomäne gebracht und phosphoryliert (Tatosyan & Mizenina, 2000; Sicheri *et al.*, 1997). Ein ähnlicher Mechanismus schiene auch bei der Funktion von Phototropin plausibel und kann gut, wie im Modell gezeigt (siehe Abbildung 68), mit intermolekularer Autophosphorylierung des Phototropinhomodimers korreliert werden.

Interessanterweise wurde auch eine blaulichtabhängige Phosphorylierung des 745 Aminosäuren umfassenden *nph3* durch Phototropin beschrieben (Motchoulski & Liscum, 1999), und somit ist Phototropin nicht einziges Substrat. *Nph3* weist eine blaulichtinduziert höhere Mobilität bei der Elektrophorese auf. Vorstellbar ist, daß *nph3*, das wie Phototropin löslich und dennoch plasmamembranassoziiert ist, auch in dem beobachteten Komplex auftritt. Dies wird ebenso von Motchoulski & Liscum (1999) anhand einer möglichen Freisetzung von Phototropin aus einem gemeinsamen Komplex und folglich einer Freigabe bzw. Exposition von Phosphorylierungsstellen an *nph3* diskutiert.

Nach neusten Erkenntnissen zeigen Phototropismusnullmutanten wie *nph1-2* aus *Arabidopsis thaliana* (Khurana & Poff, 1989; Reymond *et al.*, 1992b; Liscum & Briggs, 1995) nach wie vor unter Lichtverhältnissen bis 3000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  keinerlei phototrope Aktivität, jedoch sehr wohl unter Starklichtverhältnissen (Sakai *et al.*, 2001). Dies deutete auf das Vorhandensein eines weiteren Rezeptors für den blaulichtvermittelten Phototropismus hin, der in *Arabidopsis thaliana* als *npl1* bzw. *phot2* (Jarillo *et al.*, 1998; Kagawa *et al.*, 2001) mit einer Größe von etwa 105 kDa identifiziert wurde (siehe Abbildung 67). *Phot2* vermittelt darüber hinaus die Chloroplastenumverteilung innerhalb der Mesophyllzellen, die durch unterschiedliche Lichtintensitäten bedingt wird (Kagawa *et al.*, 2001; Jarillo *et al.*, 1998). Eventuell ist das ebenfalls membranassoziierte *phot2* bei Dikotyledonen in dem vermuteten Reaktionskomplex lokalisiert. Interessanterweise fiel oftmals ein etwa 100 bis 105 kDa großes Protein bei Anti-NPH1-Westernblotanalysen von Rohextrakten und Membranfraktionen von Dikotyledonen auf (z. B. in Abbildung 6 und Abbildung 42), bei dem es sich durchaus um *phot2* handeln könnte, da *phot1* und *phot2* hohe Sequenzhomologien aufweisen (Kagawa *et al.*, 2001) und deshalb Epitope für den Antikörper in *phot2* vorhanden sein könnten. Nie jedoch wurde eine analoge Reaktion bei Monokotyledonen beobachtet, das durch eine bislang ausstehende Identifizierung eines analogen *phot2* in Monokotyledonen bestätigt wird.

Phototropin regeneriert im Dunkeln innerhalb von 60 bis 90 Minuten, je nach Pflanzenart, zum einen mittels Dephosphorylierung durch eine postulierte lösliche Phosphatase, die

höchstwahrscheinlich im N-Terminus am Serin Position 30 beginnt. Andererseits erfolgt die Spaltung des UV-A/blaulichtvermittelten Flavin-Cysteinylladduktes. Bei den einzeln exprimierten, rekombinanten LOV-Domänen erfolgt dies *in vitro* in wenigen Minuten. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß die vollständige Spaltung dieses Addukts in rekombinantem NL12 (siehe Anhang), das beide LOV-Domänen enthält, verzögert stattfindet (Salomon, persönliche Mitteilung). Möglicherweise erstreckt sich bei Phototropin in Pflanzen die Regeneration des Flavin-Cysteinyll-Addukts über einen längeren Zeitraum und stellt damit ein zusätzliches, regulatorisches Element bei der Lichtperzeption dar. Nach der Formation und Regeneration in den Ausgangszustand – durch Dephosphorylierung und Spaltung des Flavin-Cysteinyll-Addukts – ist die lichtvermittelte Reaktion erneut auslösbar.

Die phototropische Reaktion wird von den zwei Phototropinen phot1 und phot2 ergänzend lichtabhängig induziert, ist aber deutlich von weiteren blaulichtvermittelten Reaktionen und ihren Rezeptoren abzugrenzen: neben den beiden Cryptochromen cry1 und cry2 kann mittlerweile für die Regulation der Stomataöffnung in *Arabidopsis* der Blaulichtrezeptor npq1 klassifiziert werden (Frechilla *et al.*, 1999). Bei letzterem, der noch 1994 als möglicher Rezeptor für den Phototropismus diskutiert (Quinones & Zeiger, 1994) wurde, ist Zeaxanthin an der Lichtabsorption beteiligt.

Mögliche frühe signalweiterleitende Komponenten beim Phototropismus stellen die Genprodukte von *NPH2*, *RPT2* und *NPH3* (Liscum & Briggs, 1996; Motchoulski & Liscum, 1999) dar. Nph3, das als phot1-interagierendes Protein von Phototropin phosphoryliert wird, weist zwei mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen auf, wovon eine *in vitro* mit einem die LOV-Domänen enthaltendem Phototropinfragment FMN-abhängig interagiert (Motchoulski & Liscum, 1999). Wie Phototropin liegt auch nph3 plasmalemmaassoziiert vor, so daß es in einem übergeordneten Reaktionskomplex als „Scaffold“-Protein, die bekanntlich viele Interaktionsdomänen für nichtverwandte Proteine beinhalten (Pawson & Scott, 1997; Schlessinger, 2000), eine Adapterfunktion übernehmen könnte und so einerseits gezielt mit der LOV1-Domäne von Phototropin, aber auch mit anderen, noch unbekannt Proteinen in der Signalkette wechselwirken könnte. Weiter abwärts in der Signaltransduktionskette steht der auxinabhängige Transkriptionsregulator ARF7 (Harper *et al.*, 2000), das Genprodukt des NPH4-Lokus (Liscum & Briggs, 1995 und 1996), dessen Aktivierung nach wie vor im Dunkeln liegt. Auxinabhängiges differentielles Wachstum beim Phototropismus und Gravitropismus, wie beispielsweise die Entwicklung des apikalen Hypokotylhakens oder die Blattstellung (Stowe-Evans *et al.*, 1998) werden durch ARF7 reguliert. NPH4/ARF7 stellt somit eine zentrale Schaltstelle mehrerer auxinbeteiligter Signalwege dar.

## 6 Zusammenfassung

Phototropin (phot1) ist ein UV-/Blaulichtrezeptor, der maßgeblich die phototrope Reaktion in Pflanzen als Reaktion auf unilaterales Licht vermittelt. Phot1 stellt, je nach Pflanzenart, ein 110–130 kDa großes, plasmamembranassoziiertes Chromoprotein dar, das zwei chromophortragende, zueinander stark homologe LOV-Domänen sowie eine C-terminale Serin/Threoninkinase aufweist. Durch Lichtaktivierung findet eine Phototropinauto-phosphorylierung statt.

In dieser Arbeit wurde zunächst mit dem Phototropinantikörper Anti-NPH1 nachgewiesen, daß es sich bei dem von Zacherl (1997) untersuchten, blaulichtvermittelt phosphorylierbaren Haferprotein um Phototropin handelte. Durch zusätzliche Charakterisierung von Phototropin in weiteren Pflanzen konnte über die Ermittlung der Stärke der Antikörperreaktion die höchste Menge Phototropin in den phototropisch sensitivsten Geweben – bei Monokotyledonen in der Koleoptilenspitze und bei Dikotyledonen im Hypokotyl unmittelbar unterhalb des Hypokotylhakens – lokalisiert werden. Basipetal nahm die Phototropinmenge exponential bzw. linear ab.

Untersuchungen zur Phototropinauto-phosphorylierung über die Immunreaktion belegten, daß die erhöhte Phosphorylierungsrate von belichtetem und anschließend dunkelregeneriertem Phototropin nicht auf erhöhte Phototropinmengen nach der Dunkelregeneration, wie von Zacherl (1997) postuliert, zurückzuführen sind. Über die selektive Erkennung des Phototropinantikörpers von nichtphosphoryliertem Phototropin aus Monokotyledonen ließ sich die Mobilitätsreduktion von etiolierem Phototropin nach *in vivo* Belichtung auf Phosphorylierung im N-Terminus zurückführen. Darüber hinaus fanden sich Hinweise auf eine Phosphorylierung von Phototropin durch fernes UV-Licht sowie eine Selektivität der Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Lichtqualitäten. Durch die *in vitro* Phosphorylierung von heterolog in *E. coli* überexprimierten Subdomänen von Haferphototropin mit der Proteinkinase A wurden der N-Terminus und die H1-Region zwischen den beiden LOV-Domänen als Orte der Phosphorylierung lokalisiert. Dies bestätigten Cyanbromidspaltfragmente des autophosphorylierten Haferphototropins. In den rekombinanten Domänen ermöglichte der Austausch von Serinen durch *in vitro* Mutagenese die Kartierung von sechs potentiellen Phosphorylierungsstellen. Diese waren auch in autophosphoryliertem Haferphototropin betroffen, wie in zweidimensionaler Phosphopeptid-analyse demonstriert wurde.

Weiterhin wurde Phototropin aus Pflanzen durch die Solubilisierung von mikrosomalen Membranen aus etiolierten Keimlingen detergensfrei und löslich mit hoher Effizienz angereichert und zeigte sich unmittelbar nach der Präparation aktiv. Ebenso konnte

Phototropin über Affinitätschromatografie mit dem Reaktivfarbstoff Cibachron Blue 3GA löslich so weit aufgereinigt werden, daß dem Phototropinprotein erstmalig eine eindeutige Bande im Silbergel zuzuordnen war.

Die LOV-Domänen von Haferphototropin konnten in *E. coli* löslich exprimiert werden, wobei das Flavin FMN in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 gebunden wurde (Christie *et al.*, 1999). Folglich schienen alle Informationen zur korrekten Faltung in der Proteinsequenz selbst verankert zu sein, und die rekombinanten LOV-Domänen stellten ein ideales System zur Charakterisierung der Chromophorbindung dar. Durch Sequenzanalyse von LOV-Domänen aus verschiedenen Pflanzen und Computermolekülmodellen wurde durch zielgerichtete *in vitro* Mutagenese eine Flavinbindungstasche spezifiziert, deren hydrophobes Inneres vermutlich mit dem Isoalloxazinring des Flavins wechselwirkt. Eine temporäre kovalente Bindung – ein sogenanntes Flavin-C4a-Cysteinyll-Addukt – wird lichtinduziert zwischen dem in dieser Tasche zentral exponierten Cystein der LOV-Domäne und dem C4a des Isoalloxazinrings geknüpft, die im Dunkeln wieder gelöst wird. Diese Art der damit verbundenen Photoreduktion stellt einen neuartigen Mechanismus dar, der die LOV-Domänen als internen Redoxsensor am Signaltransduktionsweg entscheidend partizipieren läßt. Die Signalweiterleitung, die in der Aktivierung der Phototropinkinase resultiert, erfolgt über Konformationsänderungen sowohl am Flavin als auch am Protein.

## Anhang

### DNS- und Proteinsequenzen

Zur Klonierung von Phototropinfragmenten wurde der Phototropin-cDNS-Klon As-*PHOT1-a* aus Hafer (Zacherl, 1997; Zacherl *et al.*, 1998) verwendet. Die Aminosäurenumerierung der rekombinanten Expressionsprodukte in dieser Arbeit bezieht sich jedoch jeweils auf die funktionellen Subdomänen (siehe Abbildung 20). Deshalb sind nachfolgend von den klonierten Einzelkonstrukten Ausschnitte aus der DNS-Sequenz mit daraus resultierenden Aminosäuren und die entsprechende Numerierung angegeben. Die Aminosäuren der einzelnen Domänen sind unterstrichen, wobei zur Mutation ausgewählte Aminosäuren farbig hervorgehoben sind. Dunkelgrau markiert ist das CBP, hellgrau unterlegt ist die Thrombinspaltsequenz. Die individuellen Parameter der rekombinanten Proteine wurden mit dem Programm ProtParam ([www.expasy.ch/cgi-bin/protparam](http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam)) erstellt.

#### N-Terminus

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein enthält Aminosäure 1 bis einschließlich 127 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 174 Aminosäuren bzw. 17,95 kDa)

```

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC
                M K R R W K K N F I A V S A A N R
TTTAAGAAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGCATGGGA
F K K I S S S G A L L V P R G S P A M G
AGCTTCACATCAATGGCTTCCAAAGGTGCAGGAGGCGGCGGGCCATGAGGAGCCT
(1) S F T S M A S K G A G G G G G H E E P 16
CAGCGGCCGAAGCAGCAGCTGCCGCGGACTCCCGCGGCTCGCTCGAGGTCTTCAACCCC
17 Q R P K Q Q L P R D S R G S L E V F N P 36
TCTTCTCCTCCGCGCGCTCGAGCCCCCTCCGCGTTCGCCCCGCGCCAGGTCCGCGC
37 S S S S A A V E P P S A F R P A A R S A 56
TCCCCGTTTCATCGAGGAAGCAACGGGCGGCATCGAGGATGTCGGCAAGGCCACGCAGCGG
57 S P F I E E A T G G I E D V G K A T Q R 76
GCGGCGGAGTGGGGCCTCGTGTCTCCAGACCAACGAGCAGACGGGCGCGCCAGGGCGTG
77 A A E W G L V L Q T N E Q T G R P Q G V 96
TCCGCCCCGATCCTCCGGAGGCGGGCTCCGCCCCGACGAGCTCCGACGACAAGGCCGTC
97 S A R S S G G G G S A R S S S D D K A V 116
GCCGGCGCCATCCCCGGGTCTCGGAGGAGCTCAAGCTTAGATCCGGCTGCTAAcaaacg
117 A G A I P R V S E E L K L R S A C Stop (127)

```

#### LOV1

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 135 bis einschließlich 256 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 189 Aminosäuren bzw. 20,83 kDa)

```

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC
                M K R R W K K N F I A V S A A N R
TTTAAGAAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGGAATTTCTA
F K K I S S S G A L L V P R G S P A M G
GACTCCATGGTCCAGCAGACCTTCGTGTGTGCGGACGCCAGCCGACCCGGCCACCCAATC
(1) D S M V Q Q T F V V S D A S R P G H P I 16
ATGTACGCCAGCGCCGGCTTCTTCAACATGACCGGCTACACATCCAAGGAGGTTCGTCGGA
17 M Y A S A G F F N M T G Y T S K E V V G 36
AGGAACTGCCGCTTCCCTCCAAGGCTCCGGCACCCGCGGAGATTGCCAAGATCAGG
37 R N C R F L Q G S G T D P A E I A K I R 56
CAGGCTCTAGCAAATGGATCAAACACTACGCGCGGTGTCTCAACTACAAGAAGGACGGC
57 Q A L A N G S N Y C G R V L N Y K K D I L 76
ACCGCATTTCTGGAACCTCTTGACCATTGCCCAATCAAGGATGAAGAAGGCAGGGTCTCTC
77 T A F W N L L T I A P I K D E E G R V L 96
AAGTTCATAGGATGCAAGTGAAGTAAATACACTGAAGGGAACAAGGATACGGTT
97 K F I G M Q V E V S K Y T E G N K D T V (109)
GTTCTGTCCAAATGGCCTGCCAGAGTCACTCATCAAATATGATGCCAGGCAAAAGGATCAG

```

## Anhang

V R P N G L P E S L I K Y D A R Q K D Q  
GCCCGTAGCTCAGTGTCTAAGCTTAGATCCGGCTGCTAAcaaaagcccg  
A R S S V S K L R S A C Stop

### H1-Region

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 243 bis einschließlich 413 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 217 Aminosäuren bzw. 24,10 kDa)

```
gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC
      M K R R W K K N F I A V S A A N R
TTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGGAATTCTA
F K K I S S S G A L L V P R G S P G I L
(1) GACTCCATGGACACTGAAGGGAACAAGGATACGGTTGTTTCGTCCAAATGGCCTGCCAGAG 15
      D S M D T E G N K D T V V R P N G L P E
16 TCACTCATCAAAATATGATGCCAGGCAAAAGGATCAGGCCCGTAGCTCAGTGTCTGAGCTT 35
      S L I K Y D A R Q K D Q A R S S V S E L
36 CTGTTGGCTATCAAGAATCCACGATCATTGTTCAGAATCAACTAATAGCACCTTTAAAAGA 55
      L L C A I K N P R S L S E S T N S T F K R
56 AAATCAGAGGAATCAGTAGGTCATTGACGGGTGATCGTCCCTGGCAAGAGAGGCTCAGAA 75
      K S Q E S V G A L T G D R P G K R S S E
76 AGTGGATCTCGACGTAACCTCAAAATCTGGAGCAAGAACCTCACTGCAAAAGATCAGCGAA 95
      S G S R R N S K S G A R T S L Q K I S E
96 GTACCTGAAAGAGGCAGTAAAAGTAGAAAATCTGGTCTGTATTCACTTATGAGTTTACTT 115
      V P E R G S K S R K S G L Y S L M S L L
116 GGTATGGGCCCTGGAAATATAGAAAAGGACATGCTGAAACCAAGAGATGAAGACCCGCTA 135
      G M G P G N I E K D M L K P R D E D P L
136 CTTGACAGTGATGATGAAAGACCTGAGAGTTTTGATGATGAGCTAAGGCGGAAAGAAATG 155
      L D S D D E R P E S F D D E L R R K E M
156 AGAAGGGGTATAGACTTGGCTACTACACTTGAACGTATTGAGAAGCTTAGATCCGGCTGC 168)
      R R G I D L A T T L E R I E K L R S A C
TAAcaaaagcccg
Stop
```

### LOV2-Domäne

(Expressionsvektor pCal-n-EK; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 409 bis einschließlich 559 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 233 Aminosäuren bzw. 26,18 kDa)

```
gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC
      M K R R W K K N F I A V S A A N R
TTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCTGGTTCCTGGTGAT
F K K I S S S G A L L V P R G S G S G D
(1) GACGACGACAAGGGAAGAGGATCCGAATCTTGGCTACTACACTTGAACGTATTGAGAAG 2
      D D D K G R G S E F L A T T L E R I E K
3 AACTTTGTCATTACTGACCCAAGGTTGCCAGATAATCCCATTATATTCGCGTCCGATAGT 22
      N F V I T D P R L P D N P I I F A S D S
23 TTCTTGCACTTGACAGAATATAGCCGTGAAGAAATTTTGGGAAGAAAAGTGCAGGTTTCTA 42
      F L Q L T E Y S R E E I L G R N C R F L
43 CAAGGTCCTGAAACTGATCGCGGACAGTGAGAAAAATTAGAGATGCCATAGATAACCAA 62
      Q G P E T D R A T V R K I R D A I D N Q
63 ACAGAGGTCACTGTTTCAGCTGATTAATTATACAAAGAGTGGTAAAAAGTTCTGGAACCTC 82
      T E V T V Q L I N Y T K S G K K F W N L
83 TTTCACTTGCAGCCTATGCGAGATCAGAAGGGAGATGTCCAGTACTTTTATTGGGGTTTCAG 102
      F H L Q P M R D Q K G D V Q Y F I G V Q
103 TTGGATGGAAGTGAAGCATGTCCGAGATGCTGCCGAGAGAGGGAGTCAATGCTGATTAAG 109)
      L D G T E H V R D A A E R E G V M L I K
AAAAGTGCAGAAAATATTGATGAGGCGGCAAAAGAAGTCCAGATGCTAATTTGAGACCA
K T A E N I D E A A K E L P D A N L R P
GAGGATTTGTGGGCTAACGTTCCATGGGTCGACTCGAGCTCAAGCTTAGATCCGGCTGCT
E D L W A N V P W V D S S S S L D P A A
AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAActagca
N K A R K E A E L A A A T A E Q Stop
```



**H2-Region**

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 525 bis einschließlich 607 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 129 Aminosäuren bzw. 14,27 kDa)

```

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC
          M K R R W K K N F I A V S A A N R
TTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGGAATCTA
F K K I S S S G A L L V P R G S P G I L
(5) GACTCCATGGAGAGAGAGGGAGTCATGCTGATTAAGAAAACGCAGAAAATATTGATGAG
D S M E R E G V M L I K K T A E N I D E 21
GCGGCAAAAGAACTTCCAGATGCTAATTTGAGACCAGAGGATTTGTGGGCTAACCACTCA
22 A A K E L P D A N L R P E D L W A N H S 41
AAAGTAGTTTTGCCAAAGCCACATATGAAGGATTTCTGCATCATGGAGAGCCATCCAAAAA
42 K V V L P K P H M K D S A S W R A I Q K 61
GTTCTTGAGGGTGGAGAAAACATTGATTTGAAGCATTTTCAGGCCGTAAAGCCTTTGGGA
62 V L E G G E N I D L K H F R P V K P L G (73)
TCTGGTGACACTGGAAGCAAGCTTAGATCCGGCTGCTAAcaaaagcccg
S G D T G S K L R S A C Stop
    
```

**KIN 1**

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 525 bis einschließlich 923 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 445 Aminosäuren bzw. 50,33 kDa)

```

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC
          M K R R W K K N F I A V S A A N R
TTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCGCGTGGATCCCCGGGAATCTA
F K K I S S S G A L L V P R G S P G I L
GACTCCATGGAGAGAGAGGGAGTCATGCTGATTAAGAAAACGCAGAAAATATTGATGAG
D S M E R E G V M L I K K T A E N I D E
GCGGCAAAAGAACTTCCAGATGCTAATTTGAGACCAGAGGATTTGTGGGCTAACCACTCA
A A K E L P D A N L R P E D L W A N H S
AAAGTAGTTTTGCCAAAGCCACATATGAAGGATTTCTGCATCATGGAGAGCCATCCAAAAA
K V V L P K P H M K D S A S W R A I Q K
GTTCTTGAGGGTGGAGAAAACATTGATTTGAAGCATTTTCAGGCCGTAAAGCCTTTGGGA
V L E G G E N I D L K H F R P V K P L G 8
TCTGGTGACACTGGAAGCGTGCACCTGGTGGAGTTATTAACACAGGTGAATACTTTGCC
S G D T G S V H L V E L L N T G E Y F A 28
ATGAAAGCTATGGATAAAAACGTCATGCTTAACCGCAATAAGGTTTCATAGAGCTAACGCT
M K A M D K N V M L N R N K V H R A N A 48
GAACGAGAAATCCTTGATATGTTGGATCACCCATTCCTTCCGACATTATATGCGTCATTT
E R E A E I L D M L D H P F L P T L Y A S F 68
CAGCAAAAGACACATATATGCTCTCATTACAGACTACTACCCTGGCGGGGAGCTCTTTCTG
Q T K T H I C L I T D Y Y P G G E L F L 88
CTCCTAGATAGACAACCTCTAAAGGTTCTGCGGGAAGATGCCGTCAGGTTCTATGCTGCT
L A L D R Q P L K V L R E D A V R F Y A A 108
GAAGTTGTCATTGCACCTGAATCCTTGCCAAAGGAATAATCTACCGAGACTTGAAG
E V V I A L E Y L H C Q G I I Y R D L K 128
CCAGAGAATATCTTACTTCACAGGGACGGGCACATCTCCTTGACAGACTTTGATTTGTCT
P E N I L L H R D G H I S L T D F D L S 148
TGTCTGACATCTTGCAGACCAGGTCCTTTCTTCCAGAAGAAGCTAATAAGAAAAGTAGG
C L T S C R P Q V F L P E E A N K K S R 168
AGGAAAAGCAGGAGTTCACCCATATTTTTTGCTGAACCTATGCGAGCATCCAATTCATTT
R K S R S S P I F F A E P M R A S N S F 188
GTTGGTACAGAGGAGTACATTGCACCTGAGATCATTACTGGAGCTGGCCATACAAAGTCT
V G T E E Y I A P E I I T G A G H T S A 208
GTTGATTGGTGGGCGCTAGGGATCCTCCTGTATGAAATGTTGTATGGTTACACACCCCTTC
V D W W A L G I L L Y E M L Y G Y T P F 228
AGAGGTAAAACCAGGCAGAGGACATTCGCAACATCCTACACAAGGACATCAGATTTCC
R G K T R Q R T F A N I L H K D I R F P 248
GCGAGTATATCGGTGAGCCTCCAGCAAGGCAGCTGATATATAGGCTGTACACAGGGAT
A S I S V S L P A R Q L I Y R L L H R D 268
CCTTCCGAATAGGCTGGGATCGTACGAGGGATCAAACGAGATAAAAAGAACACCCCTTTCTTC
269 P S N R L G S Y E G S N E I K E H P F F 288
CGCGGCATCAACTGGGCTCTCGTGGCTGGCACGGCTCCTCCAAGCTGGACGCTCCACTG
R G I N W A L V R G T A P P K L D A P L
TTCCCGGATGACACGGACAAGGAATGGGCGATGCTGCTGCTGATACTCACACCGAC
F P D D T D K G M G D A A A A D T H T D
    
```

## Anhang

ATGTTCAAGCTTAGATCCGGCTGCTAAcaagcccg  
M F K L R S A C Stop

### KIN 2

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 554 bis einschließlich 923 von As *PHOT1*-a; Proteingröße 416 Aminosäuren bzw. 47,1 kDa)

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGCTCAGCAGCCAACCGC  
M K R R W K K N F I A V S A A N R  
TTTAAGAAAATCTCATCTCCGGGGCATTCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGGAATCTA  
F K K I S S S G A L L V P R G S P G I L  
GACTCCATG GAGGATTTGTGGGCTAACCCTCAAAAAGTAGTTTTGCCAAAAGCCACATATG  
D S M E D L W A N H S K V V L P K P H M  
AAGGATTCGCATCATGGAGACCATCCAAAAGTTCTTGAGGGTGGAGAAAACATGAT  
K D S A S W R A I Q K V L E G G E N I D  
TTGAAGCATTTCAGGCCGTAAAGCCTTTGGGATCTGGTGACACTGGAAGCGTGCACCTG  
L K H F R P V K P L L G S G D T G S V H L 17  
GTGGAGTTTAAACACAGGTGAATACTTTGCCATGAAAGCTATGGATAAAAAACGTCATG  
18 V E L L N T G E Y F A M K A M D K N V M 37  
CTTAACCGCAATAAGGTTTCATAGAGCTAACGCTGAACGAGAAAATCCTTGATATGTTGGAT  
38 L N R N K V H R A N A E R E I L D M L D 57  
CACCATTCCTCCGACATTATATGCGTCATTTTCAGACAAAAGACACATATATGTCATG  
58 H P F L P T L Y A S F Q T K T H I C L I 77  
ACAGACTACTACCTGGCGGGGAGCTCTTTCTGCCTCCTAGATAGACAACCTCTAAAGGTT  
78 T D Y Y P G G E L F L L D R Q P L K V 97  
CTGCGGGAAGATGCGCTCAGGTTCTATGCTGCTGAAAGTTGTCATGCACTTGAATACTTG  
98 L R E D A V R F Y A A E V V I A L E Y L 117  
CATTGCCAAGGAATAATCTACCGAGACTTGAAGCCAGAGAATATCTTACTTCACAGGGAC  
118 H C Q G I I Y R D L K P E N I L L H R D 137  
GGGCACATCTCCTTGACAGACTTTGATTTGTCTTGTCTGACATCTTGCAGACCCGAGGTC  
128 G H I S L T D F D L S C L T S C R P Q V 157  
TTTCTTCCAGAAGAAGCTAATAAGAAAAGTAGGAGGAAAAGCAGGAGTTCCACCCATATTT  
158 F L P E E A N K K S R R K S R S S P I F 177  
TTTGCTGAACCTATGCGAGCATCCAATTCATTTGTTGGTACAGAGGAGTACATTCACACT  
178 F A E P M R A S N S F V G T E E Y I A P 197  
GAGATCATTACTGGAGCTGGCCATACAAGTGCCTGTTGATTTGGTGGGCGCTAGGGATCCTC  
198 E I I T G A G H T S A V D W W A L G I L 217  
CTGTATGAAATGTTGTATGGTTACACACCCCTTCAGAGGTAAAACCAGGCAGAGGACATTC  
218 L Y E M L Y G Y T P F R G K T R O R T F 237  
GCCAACATCCTACACAAGGACATCAGATTTCCCGCGAGTATATCGGTGAGCCTCCCGCA  
238 A N I L H K D I R F P A S I S V S L P A 257  
AGGCAGCTGATATATAGGCTGCTACACAGGGATCCTTCGAATAGGCTGGGATCGTACGAG  
258 R Q L I Y R L L H R D D P S N R L G G S Y E 277  
GGATCAAACGAGATAAAAGAACCCCTTTCTCCCGCGCATCAACTGGGCTCTCGTCCGT  
278 G S N E I K E H P F F R G I N W A L V R  
GGCAGGCTCCTCAAAGCTGGACGCTCCACTGTTCCCGGATGACACGGACAAGGGAATG  
G G T A P P K L D A P L F P D D T D K G T M  
GGCATGCTGC\*TGATAC\*TCACACCGACATGTTCAAGCTTAGATCCGGCTGCTAA  
G D A A A A D T H T D M F K L R S A C Stop  
caagcccg

### KIN 3

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 578 bis einschließlich 923 von As *PHOT1*-a; Proteingröße 392 Aminosäuren bzw. 44,28 kDa)

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGCTCAGCAGCCAACCGC  
M K R R W K K N F I A V S A A N R  
TTTAAGAAAATCTCATCTCCGGGGCATTCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGGGAATCTA  
F K K I S S S G A L L V P R G S P G I L  
GACTCCATGICCATCCAAAAGTTCTTGAGGGTGGAGAAAACATGATTTGAAGCATTTTC  
D S M A I Q K V L E G G E N I D L K H F 1  
AGGCCGTAAAGCCTTTGGGATCTGGTGACACTGGAAGCGTGCACCTGGTGGAGTTATTA  
2 R P V K P L G S G D T G S V H L V E L L 21  
AACACAGGTGAATACTTTGCCATGAAAGCTATGGATAAAAAACGTCATGCTTAACCGCAAT  
22 N T G E Y F A M K A M D K N V M L N R N 41  
AAGGTTTCATAGAGCTAACGCTGAACGAGAAAATCCTTGATATGTTGGATCACCCATCTCTT  
42 K V H R A N A E R E I L D M L D H P F L 61  
CCGACATTATATGCGTCATTTTCAGACAAAAGACACATATATGTCCTCATTTACAGACTACTAC  
62 P T L Y A S F Q T K T H I C L I T D Y Y 81  
CCTGGCGGGGAGCTCTTTCTGCCTCCTAGATAGACAACCTCTAAAGGTTCTGCGGGAAGAT  
82 P G G E L F L L D R Q P L K V L R E L D 101  
GCCGTCAGGTTCTATGCTGCTGAAAGTTGTCATTTGCACTTGAATACTTGCATTTGCCAAGGA  
102 A V R F Y A A E V V I A L E Y L H C Q G 121  
ATAATCTACCGAGACTTGAAGCCAGAGAATATCTTACTTCACAGGGACGGGCACATCTCC  
122 I I Y R D L K P E N I L L H R D G H I S 141

## Anhang

TTGACAGACTTTGATTTGTCTTGTCTGACATCTTGCAGACCGCAGGTCTTCTTCCAGAA  
142 L T D F D L S C L T S C R P Q V F L P E 161  
GAAGCTAATAAGAAAAGTAGGAGGAAAAGCAGGAGTTCACCCATATTTTTTGTCTGAACT  
162 E A N K K S R R K S R S S P I F F A E P 181  
ATGCGAGCATCCAATTCATTTGTTGGTACAGAGGAGTACATTCACCTGAGATCATTACT  
182 M R A S N S F V G T E E Y I A P E I I T 201  
GGAGCTGGCCATACAAGTGTCTGTTGATTGGTGGGCGCTAGGGATCCTCCTGTATGAAATG  
202 G A G H T S A V D W W A L G I L L Y E M 221  
TTGTATGGTTACACACCCTTCAGAGGTAAAACCAGGCAGAGGACATTCGCCAACATCCTA  
222 L Y G Y T P F R G K T R Q R T F A N I L 241  
CACAAGGACATCAGATTTCCCGCGAGTATATCGGTGAGCCTCCCAGCAAGGCAGCTGATA  
242 H K D I R F P A S I S V S L P A R Q L I 261  
TATAGGCTGTACACAGGGATCCTTCGAATAGGCTGGGATCGTACGAGGGATCAAACGAG  
262 Y R L L H R D P S N R L G S Y E G S N E 281  
ATAAAGAACACCCCTTCTTCCCGCGCATCAACTGGGCTCTCGTGCCTGGCACGGCTCCT  
282 I K E H P F F R G I N W A L V R G T A P  
CCAAAGCTGGACGCTCCACTGTTCCCGGATGACACGGACAAGGGAATGGGCGATGCTGCT  
P K L D A P L F P D D T D K G M G D A A  
GCTGCTGATACTCACACCGACATGTTCAAGCTTAGATCCGGCTGCTAAcaaaagcccg  
A A D T H T D M F K L R S A C Stop

### KIN 4

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 606 bis einschließlich 923 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 364 Aminosäuren bzw. 41,30 kDa)

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCTCAGCAGCCAACCGC  
M K R R W K K N F I A V S A A N R  
TTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCACTTCTGGTTCCCGGTGGATCCCCGGGAATTTCTA  
F K K I S S S G A L L V P R G S P G I L  
13 GACTCCATGGGAAGCGTGCACCTTGGTGGAGTTATTAACACAGGTGAATACTTTGCCATG 29  
D S M G S V H L V E L L N T G E Y F A M  
30 AAAGCTATGGATAAAAACGTATGCTTAACCGCAATAAGGTTTCATAGAGCTAACGCTGAA 49  
K A M D K N V M L N R N K V H R A N A E  
CGAGAAATCCTTGATATGTTGGATCACCCATTCCTTCCGACATTTATATGCGTCATTTTCAG  
50 R E I L D M L D H P F L P T L Y A S F Q 69  
ACAAAGACACATATATGCTCTATTACAGACTACCTCCCTGGCGGGGAGCTCTTCTGCTC  
70 T K T H I C L I T D Y Y P G G E L F L 89  
CTAGATAGACAACCTCTAAAGGTTCTGCGGGAAGATGCCGTCAGGTTCTATGCTGCTGAA  
90 L D R O P L K V L R E D A V R F Y A A E 109  
GTTGTCTATGCACTTGAATACTTGCATTGGCCAAAGAAATATCTACCGAGACTTGAAGCCA  
110 V V I A L E Y L H C O G I I Y R D L K P 129  
GAGAATATCTTACTTCACAGGGACGGGCACATCTCCTTGACAGACTTTGATTTGTCTTGT  
130 E N I L L H R D G H I S L T D F D L S C 149  
CTGACATCTTGCAGACCGCAGGTCTTCTTCCAGAAGAAGCTAATAAGAAAAGTAGGAGG  
150 L T S C R P Q V F L P E E A N K K S R R 169  
AAAAGCAGGAGTTCACCCATATTTTTTGTCTGAACTTATGCGAGCATCCAATTCATTTGTT  
170 K T A R S S S P I F F A E P M R A S N S F V 189  
GGTACAGAGGAGTACATTGCACCTTACATTACCTGGAGCTGGCCATACAAGTGTCTGTT  
190 G T E E Y I A P E I I T G A G H T S A V 209  
GATTGGTGGGCGCTAGGGATCCTCCTGTATGAAATGTTGTATGGTTACACACCCTTCAGA  
210 D W W A L G G I L L Y E M L Y G Y T P F R 229  
GGTAAAACAGGCAGAGGACATTCGCCAACATTCCTACACAAGGACATCAGATTTCCCGCG  
230 G K T R Q R T F A N I L H K D I R F P A 249  
AGTATATCGGTGAGCCTCCCAGCAAGGCAGCTGATATATAGGCTGCTACACAGGGATCCT  
250 S I S V S L P A R Q L I Y R L L H R D P 269  
270 TCGAATAGGCTGGGATCGTACGAGGGATCAAACGAGATAAAAAGAACACCCCTTCTTCCGC 288  
S N R L G S Y E G S N E I K E H P F F R  
GGCATCAACTGGGCTCTCGTGCCTGGCACGGCTCCTCCAAAGCTGGACGCTCCACTGTTCT  
G I N W A L V R G T A P P K L D A P L F  
CCGGATGACACGGACAAGGGAATGGGCGATGCTGCTGCTGATACTCACACCGACATG  
P D D T D K G M G D A A A A D T H T D M  
TTCAAGCTTAGATCCGGCTGCTAAcaaaagcccg  
F K L R S A C Stop

### NL12

(Expressionsvektor pCal-n; CBP-Fusionsprotein umfaßt Aminosäure 1 bis einschließlich 525 von As *PHOT1-a*; Proteingröße 525 Aminosäuren bzw. 62,6 kDa)

Das in diesen Vektor inserierte Fragment codiert Haferphototropin ohne die Kinasedomäne bzw. enthält es die vollständigen Sequenzen von N-Terminus, LOV1, H1, LOV2 und Anteile von H2. Da eine exakte Nummerierung der einzelnen Aminosäuren für diese Arbeit nicht nötig war, wird auch hier darauf verzichtet. Lediglich die inserierte Phototropinsequenz ist

unterstrichen.

gatatacatATGAAGCGACGATGGAAAAAGAATTCATAGCCGCTCAGCAGCCAACCGC  
 M K R R W K K N F I A V S A A N R  
 TTTAAGAAAATCTCATCCTCCGGGGCATTCTGGTTCCGCGTGGATCCCCGCCATGGGA  
F K K I S S S G A L L V P R G S P A M G  
 AGCTTACATCAATGGCTTCCAAAGGTGCAGGAGGCGGGCGGGCCATGAGGAGCCT  
S F T S M A S K G A G G G G G G H E E P  
 CAGCGGCCGAAGCAGCAGCTGCCGCGGACTCCCAGGCTCGCTCGAGGCTTCAACCCC  
Q R P K Q Q L P R D S R G S L E V F N P  
 TCTTCCTCCTCCGCGCGTTCGAGCCCCCTCCGCGTTCCGCCCCGCCAGGTCCGCG  
S S S S A A V E P P S A F R P A A R S A  
 TCCCCGTTTCATCGAGGAAGCAACGGGCGGCATCGAGGATGTCGGCAAGGCCACGCAGCGG  
S P F I E E A T G G I E D V G K A T Q R  
 GCGGCGGAGTGGGGCCTCGTGTCCAGACCAACGAGCAGACGGGCCGCGCAGGGCGTG  
A A E W G L V L Q T N E Q T G R P Q G V  
 TCCGCCCCGATCCTCCGAGGCGGGCGGTCCGCCCCGAGCAGCTCCGACGACAAGGCCGT  
S A R S S G G G G S A R S S S D D K A V  
 GCCGGCGCCATCCCCCGGGTCTCGGAGGAGCTCCGGGCCGCGCTCTCCGCGTTCCAGCAG  
A G A I P R V S E E L R A A L S A F Q Q  
 ACCTTCGTGTCGCGACGCCAGCCGACCCGGCCACCCAATCATGTACGCCAGCGCCGGC  
T F V V S D A S R P G H P I M Y A S A G  
 TTCTTCAACATGACCGGCTACACATCCAAGGAGGTCGTCGGAAGGAACTGCCGCTTCCCT  
F F N M T G Y T S K E V V G R N C R F L  
 CAAGGCTCCGGCACCGACCCGGCGGAGATTGCCAAGATCAGGCAGGCTCTAGCAAATGGA  
Q G S G T D P A E I A K I R Q A L A N G  
 TCAAATACTGCGGCCGTGCTCAACTACAAGAAGGACGGCACCGCATCTGGAACCTC  
S N Y C G R V L N Y K K D G T A F W N L  
 TTGACCATTGCCCAATCAAGGATGAAGAAGGCAGGGTCTCAAGTTCATAGGGATGCAA  
L T I A P I K D E E G R V L K F I G M Q  
 GTGGAAGTAAGTAAATACACTGAAGGGAACAAGGATACGGTTGTTCGTCCAAATGGCCTG  
V E V S K Y T E G N K D T V V R P N G L  
 CCAGAGTCACTCATCAAATATGATGCCAGGCAAAAGGATCAGGCCCGTAGCTCAGTGTCT  
P E S L I K Y D A R Q K D Q A R S V S  
 GAGCTTCTGTTGGCTATCAAGAATCCACGATCATTTGTCAGAATCAACTAATAGCACCTTT  
E L L L A I K N P R S L S E S T N S T F  
 AAAAGAAAATCACAGGAATCAGTAGGTGCATTGACGGGTGATCGTCTGGCAAGAGAAAGC  
K R K S Q E S V G A L T G D R P G K R S  
 TCAGAAAGTGGATCTCGACGTAACCTCAAATCTGGAGCAAGAACCTCACTGCAAAAAGATC  
S E S G S R R N S K S G A R T S L Q K I  
 AGCGAAGTACCTGAAAGAGGCAGTAAAAGTAGAAAATCTGGTCTGTATTCACTTATGAGT  
S E V P E R G S K S R K S G L Y S L M S  
 TTACTTGGTATGGGCCCTGGAAATATAGAAAAGGACATGCTGAAACCAAGAGATGAAGAC  
L L G M G P G N I E K D M L K P R D E D  
 CCGTACTTGCAGTGATGATGAAAGACCTGAGAGTTTTGATGATGAGCTAAGGCGGAAA  
P L L D S D D E R P E S F D D E L R R K  
 GAAATGAGAAGGGGTATAGACTTGGCTACTACACTTGAACGTATTGAGAAGAAGCTTTGTC  
E M R R G I D L A T T L E R I E K N F V  
 ATTACTGACCCAAGGTTGCCAGATAATCCCATTTATATTCGCGTCCGATAGTTTCTTGCAG  
I T D P R L P D N P I I F A S D S F L Q  
 TTGACAGAATATAGCCGTGAAGAAATTTTGGGAAGAACTGCAGGTTTCTACAA GTCCCT  
L T E Y S R E E I L G R N C R F L Q G P  
 GAAACTGATCGCGGACAGTGAGAAAAATTAGAGATGCCATAGATAACCAAACAGAGGTC  
E T D R A T V R K I R D A I D N Q T E V  
 ACTGTTTTCAGCTGATTAATTATACAAAGAGTGGTAAAAAGTTCTGGAACCTCTTTCACTTG  
T V Q L I N Y T K S G K K F W N L F H L  
 CAGCCTATGCGAGATCAGAAGGGAGATGTCCAGTACTTTTATTGGGGTTCAGTTGGATGGA  
Q P M R D Q K G D V Q Y F I G V Q L D G  
 ACTGAGCATGTCCGAGATGCTGCCGAGAAGCTTAGATCCGGCTGCTAACaaagc  
T E H V R D A A E K L R S A C Stop

## Abkürzungen

□	Wellenlänge (nm)
acc.	Zugangsnummer (accession number)
Amp	Ampicillin
AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphat-tetralithiumsalz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
□-ATP	[□- <sup>32</sup> P]ATP, <sup>32</sup> P-Markierung am □-Phosphatrest des ATP's
Bis-Tris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BL	UV-A-/Blaulicht
BSA	Rinderserumalbumin (bovine albumin)
CBP	Calmodulin-Bindeprotein
CM	mikrosomale Zellmembranen
CM <sub>w</sub>	gewaschene mikrosomale Zellmembranen
cmc	kritische Micellenkonzentration
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
cv.	cultivatum, gezüchtet
D	Dunkel bzw. etioliert
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DL	Dunkelinkubation bzw. etioliert mit anschließender sättigender Belichtung
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate
DTT	1,4-Dithio-DL-threit(ol), Cleland's Reagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid, Riboflavin-5'-adenosindiphosphat
FMN	Flavinmononukleotid, Riboflavin-5'-phosphat
g	Erdbeschleunigung (9,81 ms <sup>-2</sup> )
GC-Gehalt	Gehalt einer DNS-/RNS-Sequenz an Guanin und Cytosin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IP	Immunopräzipitat
IPTG	Isopropyl-β-D--thiogalactopyranosid
k	Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNS von 50
L	Licht bzw. sättigend belichtet
L.	von Linné
LB	Luria-Bertani-Medium
Mill.	Miller
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NaPP	Natriumpyrophosphat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid (C <sub>40</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>10</sub> O <sub>6</sub> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
β-x-Phosphat	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat-p-tuloidin-di Natriumsalz
PKA	Proteinkinase A bzw. katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus dem Rinderherz
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Primer	Oligonucleotid, das zur Gegenstrangsynthese von DNS eingesetzt wird
RNS/RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (22 °C)
SDS	Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SOB	Standard-Medium mit Mg <sup>2+</sup>
T	Thymidin
TCB	Trombin-Verdauungspuffer

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit = Einheit
Ü	Überstand
Upm.	Umdrehungen pro Minute
UV-A	Ultraviolettes Licht von 320–400 nm
UV-B	Ultraviolettes Licht von 280–320 nm
UV-C	Ultraviolettes Licht kleiner 280 nm
UZ	Ultrazentrifuge
WÜ	lösliche Fraktion nach Membranwaschung und anschließender Ultrazentrifugation
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Übrige Abkürzungen für physikalische Einheiten und deren Vorzeichen entsprechen dem internationalen Einheitssystem und sind nicht gesondert aufgeführt.

## Literaturverzeichnis

- Ahmad, M.** und Cashmore, A. R. (1993)  
HY4 gene of *Arabidopsis thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor.  
Nature **366**, 162–166
- Ausubel, F. M.**, Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, I. A., Struhl, K. (eds.) (1988)  
Current Protocols in Molecular Biology.  
John Wiley and Sons Inc., Media, Pennsylvania
- Avery, G. S.**, Piper, M. und Smith, P. (1945)  
Cell number in successive segments of *Avena* coleoptiles of different ages: Material for the biochemist.  
Am. J. Bot. **32**, 575–579
- Ballario, P.**, Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. und Macino, G. (1996)  
White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein.  
EMBO. **15**, 1650–1657
- Ballario, P.**, Talora, C., Galli, D., Linden, H. und Macino, G. (1998)  
Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins.  
Mol. Microbiol. **29**, 719–729
- Baskin, T. I.**, Iino, M., Green, P. B. und Briggs, W. R. (1985)  
High-resolution measurement of growth during first positive phototropism in maize.  
Plant Cell Env. **8**, 595–603
- Baskin, T. I.** (1986)  
Redistribution of growth during phototropism and nutation in the pea epicotyl.  
Planta **169**, 406–414
- Baskin, T. I.**, Briggs, W. R. und Iino, M. (1986)  
Can lateral redistribution of auxin account for phototropism of maize coleoptiles?  
Plant Physiol. **81**, 306–309
- Baskin, T. I.** und Iino, M. (1987)  
An action spectrum in the blue and ultraviolet for phototropism in alfalfa.  
Photochem. Photobiol. **46**, 127–136
- Batschauer, A.** (1993)  
A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage.  
Plant J. **4**, 705–709
- Baxter, A.**, Currie, L. M. und Durham, J. (1978)  
A general method for purification of deoxycytidine kinase.  
Biochem. J. **173**, 1005–1008
- Bibikov, S. I.**, Biran, R., Rudd, K. E. und Parkinson, J. S. (1997)  
A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli*.  
J. Bacteriol. **179**, 4075–4079

- Björn, L. O.** (1994)  
in: Photomorphogenesis in Plants.  
Kendrick, R. E., Kronenberg, G. H. M. (Kluwer Academic Publishers, Netherlands)
- Blom, N.**, Gammeltoft, S., und Brunak, S. (1999)  
Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites.  
J. Mol. Biol. **294**, 1351-1362
- Borthwick, H. A.**, Hendricks, S. B., Toole, V. K. und Toole, E. H. (1951).  
A reversible photoreaction controlling seed germination.  
Proc. Natl. Acad. Sci., **38**, 662-666.
- Boyd, L.** und Avery, G. S. Jr. (1936)  
Grass seedling anatomy: the first internode of *Avena* and *Triticum*.  
Bot. Gaz. **97**, 765-779.
- Bradford, M.** (1976)  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.  
Anal. Biochem., **72**, 248–254
- Briggs, W. R.** (1960)  
Light dosage and phototropic responses of corn and oat coleoptiles.  
Plant Physiol. **35**, 951–962
- Briggs, W. R.** (1963a)  
Mediation of phototropic responses of corn coleoptiles by lateral transport of auxin.  
Plant Physiol. **38**, 237–247
- Briggs, W. R.** (1996)  
Signal transduction in phototropism. In: International meeting on UV/blue light: Perception and responses in plants and microorganisms. Book of abstracts. University of Marburg, Germany, S. 49
- Briggs, W. R.**, Beck, C. F., Cashmore, A. R., Christie, J. M., Hughes, J., Jarillo, J. A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rüdiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., und Watson, J. C. (2001)  
The phototropin family of photoreceptors.  
Plant Cell **13**, 993-997.
- Britz, S. J.** und Galston, A. W. (1983)  
Physiology of movements in the stems of seedling *Pisum sativum* L. cv. Alaska.  
Plant Physiol. **71**, 313–318
- Butler, W. L.**, Norris, K. H., Siegelman H. A. und Hendricks, S. B. (1959)  
Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **45**, 1703–1708
- Cabral, J. H.**, Lee, A., Cohen, S. L., Chait, B. T., Li, M. und Mackinnon, R. (1998)  
Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain.  
Cell **95**, 649–655
- Cashmore, A. R.**, Jarillo, J.A., Wu, Y.-J. und Liu, D. (1999)  
Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals.



Science **284**, 760–765

**Chon, H. P.** und Briggs, W. R. (1999)

Effect of red light on the phototropic sensitivity of corn coleoptiles.

Plant Physiol. **41**, 1715–1724

**Christie, J. M.**, Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A., Liscum, E. und Briggs, W. R. (1998)

*Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism.

Science **282**, 1698–1701

**Christie, J. M.**, Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. und Briggs, W. R. (1999)

LOV domains of the blue light photoreceptor phototropin (NPH1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 8779–8783

**Curry, G. M.**, Thimann, K. V. und Ray, P. M. (1956)

The base curvature response of *Avena* seedlings to the UV.

Plant Physiol. **9**, 429–440

**Crosson, S.** und Moffat, K. (2001)

Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction.

Proc. Natl. Acad. Sci. **98**, 2995–3000

**Darwin, C.** (1881)

The power of movement in plants.

Appleton D. and company, N. Y., Da Capo Press Reprint Ed., 1966. New York

**Dürr, H.** (2000)

Photochemie und Chromophorbinding der LOV-Domänen des Phototropins von *Avena sativa*.

Diplomarbeit am Lehrstuhl von Prof. Dr. Dr. Rüdiger im Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Everett, M.** und Thimann, K. V. (1968)

Second positive phototropism in the *Avena* coleoptile.

Plant Physiol. **43**, 1786–1792

**Fankhauser, C.**, Yeh, K. C., Lagarias, J. C., Zhang, H., Elich, T. D. und Chory, J. (1999)

PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*.

Science **284**, 1539–1541

**Feyerabend, M.** und Weiler, E. W. (1988)

Immunological estimation of growth regulator distribution in phototropically reacting sunflower seedlings.

Physiologica Plantarum **74**, 185–193

**Firn, R. D.** und Digby, J. (1980)

The establishment of tropic curvatures in plants.

Ann. Rev. Plant Physiol. **31**, 131–148

**Franssen, J. M.** (1980)

Phototropism in seedlings of sunflower *Helianthus annuus*.

Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen **80**, 1–83

- Franssen, J. M.**, Firn, R. D. und Digby, J. (1982)  
The role of the apex in the phototropic curvature of *Avena* coleoptiles: positive curvature under conditions of continuous illumination.  
*Planta* **155**, 281–286
- Frechilla, S.**, Zhu, J., Talbott, L. D. und Zeiger, E. (1999)  
Stomata from *npq1*, a Zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light.  
*Plant Cell Physiol.* **40**, 949–954
- Friemann, A.**, Schwarz, H. J. & Hachtel, W. (1992)  
*In vitro* synthesis and membrane integration of the chloroplast encoded D-2 protein of photosystem II.  
Regulation of chloroplast Biogenesis. Edited by J. H. Argyroudi-Akoyunoglou, Plenum Press, New York
- Gallagher, S.**, Short, T. S., Ray, P. M., Pratt, L. H. und Briggs, W. R. (1988)  
Light-mediated changes in two proteins found associated with plasma membrane fractions from pea stem sections.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 8003–8007
- Galland, P.** und Senger, H. (1988)  
The role of pterins in the photoreception and metabolism of plants.  
*Photochem. Photobiol.* **48**, 811–820
- Galston, A. W.** (1949)  
Riboflavin-sensitized photo-oxidation of indoleacetic acid and related compounds.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **35**, 10–17
- Galston, A. W.** (1950)  
Riboflavin, light, and the growth of plants.  
*Science* **111**, 619–624
- Genick, U. K.**, Borgstahl, G. E., Ng, K., Ren, Z., Pradervand, C., Burke, P. M., Srajer, V., Teng, T. Y., Schildkamp, W., McRee, D. E., Moffat, K. und Getzoff, E. D. (1997)  
Structure of protein photocycle intermediate by millisecond time-resolved crystallography.  
*Science* **275**, 1471–1475
- Guex, N.** und Peitsch, M. C. (1997)  
SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling.  
*Electrophoresis* **18**, 2714–2723.
- Hager, A. und Brich M.** (1993)  
Blue light-induced phosphorylation of a plasma membrane protein from phototropically sensitive tips of maize coleoptiles.  
*Planta* **189**, 567–576
- Hager, A., Brich M. und Bazlen, I.** (1993)  
Redox dependence of the blue light-induced phosphorylation of a 100 kDa Protein on isolated plasma membranes from tips of coleoptiles.  
*Planta* **190**, 120–126

- Hager, A.** (1996)  
Properties of a blue-light-absorbing photoreceptor kinase localized in the plasma-membrane of the coleoptile tip region.  
*Planta* **198**, 294–299
- Hanks, S. K.** und Hunter, T. (1995)  
The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification.  
*FASEB J.* **9**, 576–596
- Hannig, K.** und Pascher, G. (1967)  
Dünnschicht-Elektrophorese. In: *Dünnschichtchromatographie – Ein Laboratoriumshandbuch*, herausgegeben von Stahl, E., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 110–114
- Hangarter, R. P.** (1997)  
Gravity, light and plant form.  
*Plant Cell Env.* **20**, 769–800
- Harper, R. M.**, Stowe-Evans, E. L., Luesse, D. R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M. K., Yamamoto, K. und Liscum, E. (2000)  
The *NPH4* locus encodes the auxin response factor ARF7.  
*Plant Cell* **12**, 757–770
- Hart, G. W.** (1997)  
Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins.  
*Annu. Rev. Biochem.* **66**, 315–336
- Hesse, M.**, Meier, H. und Zeeh, B. (1991)  
Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie.  
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 4., überarb. Auflage
- Hill, S.**, Austin, S., Eydmann, T., Jones, T. und Dixon, R. (1996)  
Acetobacter vinelandii NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2143–2148
- Hoffman, P. D.**, Batschauer, A. und Hays, J. B. (1996)  
PHH1, a novel gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein similar to plant blue-light photoreceptors and microbial photolyases.  
*Mol. Gen. Genet.* **253**, 259–265
- Huala, E.**, Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I.-S., Larsen, E. und Briggs, W. R. (1997)  
*Arabidopsis* NPH1: A Protein Kinase with a putative Redox-Sensing Domain.  
*Science* **278**, 2120–2123
- Iino, M.** und Briggs, W. R. (1984)  
Growth distribution during first positive phototropic curvature of maize coleoptiles.  
*Plant Cell Env.* **7**, 97–104
- Iino, M.**, Briggs, W. R. und Schäfer, E. (1984)  
Phytochrome-mediated phototropism in maize seedling shoots.  
*Planta* **160**, 41–51
- Iino, M.** (1987)  
Kinetic modelling of phototropism in maize coleoptiles.

Planta **171**, 110–126

**Iino, M.** (1988b)

Pulse-induced phototropisms in oat and maize coleoptiles.

Plant Physiol. **88**, 823–828

**Iino, M.** (1991)

Mediation of tropisms by lateral translocation of endogenous indole-3-acetic acid in maize coleoptiles.

Plant Cell Env. **14**, 279–286

**Janoudi, A. K.**, Konjevic, R., Apel, P. und Poff, K. L. (1992)

Time threshold for second positive phototropism is decreased by a preirradiation with red light.

Plant Physiol. **99**, 1422–1425

**Jarillo, J. A.**, Ahmad, M. und Cashmore, A. R. (1998)

NPL1 (acc. No. AF053941): A second member of the NPH serine/threonine kinase family of *Arabidopsis*.

Plant Physiol. **117**, 719

**Johansson, F.**, Olbe, M., Sommarin, M. und Larsson, Chr. (1995)

Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles.

The Plant Journal **7**, 165–173

**Johnston, E. S.** (1934)

Phototropic sensitivity in relation to wavelength.

Smithsonian Inst. Publs. Misc. Collects. **92**, 1–17

**Jones, A. M.** (1994)

Auxin-binding proteins.

Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **45**, 393–420

**Kagawa, T.**, Sakai, T., Suetsugu, N., Oikawa, K., Ishiguro, S., Kato, T., Tabata, S., Okada, K. und Wada, M. (2001)

*Arabidopsis* NPL1: A phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response.

Science **291**, 2138–2141

**Khurana, J. P.**, Ren, Z., Steinitz, B., Parks, B., Best, T.R. und Poff, K. L. (1989)

Mutants of *Arabidopsis thaliana* with decreased amplitude in their phototropic response.

Plant Physiol. **91**, 685–689

**Khurana, J. P.** und Poff, K. L. (1989)

Mutants of *Arabidopsis thaliana* altered phototropism.

Planta **178**, 400–406

**Konjevic, R.**, Steinitz, B. und Poff, K. L. (1989)

Dependence of the phototropic response of *Arabidopsis thaliana* on fluence rate and wavelength.

Proc. Natl. Acad. Sci. **86**, 9876–9880

**Konjevic, R.**, Khurana, J. P. und Poff, K. L. (1992)

Analysis of multiple photoreceptor pigments for phototropism in a mutant of

*Arabidopsis thaliana*.

Photochem. Photobiol. **55**, 789–792

**Krebs, E. G.** (1985)

The phosphorylation of proteins: A major mechanism for biological regulation.  
Biochem. Soc. Trans. **13**, 813–820

**Lin, C.**, Ahmad, M., Chan, J und Cashmore, A. R. (1996)

CRY2: A second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family (Acc. No. U43397) (PGR 96-001).  
Plant Physiol. **110**, 1047

**Liscum, E.** und Hangarter, R. P. (1991)

*Arabidopsis* mutants lacking blue light-dependent inhibition of hypocotyl elongation.  
Plant Cell **3**, 685–694

**Liscum, E.**, Young, J. C., Poff, K. L. und Hangarter, R. P. (1992)

Genetic separation of phototropism and blue light inhibition of stem elongation.  
Plant Physiol. **100**, 267–271

**Liscum, E.** und Briggs, W. R. (1995)

Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis thaliana* disrupt the perception of phototropic stimuli.  
Plant Cell **7**, 473–485

**Liscum, E.** und Briggs, W. R. (1996)

Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signalling pathway.  
Plant Physiol. **112**, 291–296

**Luo, R.**, Hurley, T. R. und Sefton, B. M. (1991)

Cyanogen bromide cleavage and proteolytic mapping of proteins immobilized to membranes.  
Methods in Enzymology **201**, 149–150

**Lorenzi, K.**, Cerccarelli, N., Lercari, B. und Gaultieri, P. (1994)

Identification of retinol in higher plants: is a rhodopsin-like protein the blue light receptor?  
Phytochemistry **36**, 599–601

**MacLeod, K.**, Firn, R. D. und Digby, J. (1984)

The phototropic responses of *Avena* coleoptiles following localized continuous unilateral illumination.  
J. Exp. Botany **35**, 1380–1389

**MacLeod, K.**, Digby, J. und Firn, R. D. (1985)

Evidence inconsistent with the Blaauw model of phototropism.  
J. Exp. Botany **36**, 312–319

**MacLeod, K.**, Firn, R. D. und Digby, J. (1986)

The phototropic responses of *Avena* coleoptiles.  
J. Exp. Botany **37**, 542–548

**Manson, W.** und Carolan, T. (1972)

Alkali-induced elimination of phosphate from  $\beta$ -casein.  
J. Dairy Res. **39**, 189–194

- Massey, V.**, Stankovich, M. und Hemmerich, P. (1978)  
Light-mediated reduction of flavoproteins with flavin as catalysts.  
*Biochemistry* **17**, 1–8
- Miller, S. M.**, Massey, V., Ballou, D., Williams, C. H., Distefano, M. D., Moore, M. und Walsh, T. (1990)  
Use of site-directed triple mutant to trap intermediates: demonstration that the flavin C(4a)-thiol adduct and reduced flavin are kinetically competent intermediates in mercuric ion reductase.  
*Biochemistry* **29**, 2831–2841
- Milligan, G.**, Parenti, M. und Magee, A. I. (1995)  
The dynamic role of palmitoylation in signal transduction.  
*TIBS* **20**, 181–186
- Miyatake, H.**, Mukai, M., Park, S.-Y., Adachi, S.-L., Tamura, K., Nakamura, K., Tsuchiya, T., Iizuka, T. und Shiro, Y. (2000)  
Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium melioli*: Crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies.  
*J. Mol. Biol.* **301**, 415–431
- Motchoulski, A.** und Liscum, E. (1999)  
*Arabidopsis* NPH3: A NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism.  
*Science* **286**, 961–964
- Ni, M.**, Tepperman, J. M. und Quail, P. H. (1999)  
Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light.  
*Nature* **400**, 781–784
- Nick, P.** und Schäfer, E. (1994)  
Polarity induction versus phototropism in maize: Auxin cannot replace blue light.  
*Planta* **195**, 63–69
- Noguchi, H.**, Nishitani, K., Bruinsma, J. und Hasegawa, K. (1986)  
Phototropism in hypocotyls of radish *Raphanus sativus* var. *Hortensis* f. *gigantissimus*. Role of cis and trans raphanusanins and raphanusamide in phototropism of radish hypocotyls.  
*Plant Physiol.* **81**, 980–983
- Nozue, K.**, Kanagae, T., Imaizumi, T., Fukuda, S., Okamoto, H., Yeh, K.-C., Lagarias, J. C. und Wada, M. (1998)  
A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 15826–15830
- Nultsch, W.** (1996)  
Allgemeine Botanik.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 10. Auflage
- Palmer, J. M.**, Short, T. W. und Briggs, W.R. (1993a)  
Correlation of blue light-induced phosphorylation to phototropism in *Zea mays* L..  
*Plant Physiol.* **102**, 1219–1225

- Palmer, J. M.**, Short, T. W., Gallagher, S. und Briggs, W.R. (1993b)  
Blue light-induced phosphorylation of a plasma membrane-associated protein in *Zea mays* L..  
Plant Physiol. **102**, 1211–1218
- Palmer, J. M.**, Warpeha, K. M. F. und Briggs, W.R. (1996)  
Evidence that zeaxanthin is not the photoreceptor for phototropism in maize coleoptiles.  
Plant Physiol. **110**, 1323–1328
- Parker, K.**, Baskin, T.I. und Briggs, W.R. (1989)  
Evidence for a phytochrome-mediated phototropism in etiolated pea seedlings.  
Plant Physiol. **89**, 493–497
- Pawson, T** und Scott, J. D. (1997)  
Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins.  
Science **278**, 2075–2080
- Pearson, R . B.** und Kemp, B. E. (1991)  
Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations.  
Methods in Enzymology **200**, 62–81
- Peitsch, M. C.** (1995)  
Protein modelling by E-Mail.  
Bio/Technology **13**, 658-660.
- Peitsch, M. C.** (1996)  
ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling.  
Biochem. Soc. Trans. **24**, 274-279.
- Pellequer, J. L.**, Wagner-Smith, K. A., Kay, S. A. und Getzoff, E. D. (1998)  
Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional folding of the PAS domain superfamily.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 5884–5890
- Petrescu, S.**, Branza-Nichita, N., Nita-Lazar, M., Petrescu, A.-J., Motas, C. (1995)  
Immunoaffinity chromatography on antibodies immobilized on nitrocellulose powder.  
Anal. Biochem. **229**, 299-302
- Pickard, B. G** und Thimann, K. V. (1964)  
Transport and distribution of auxin during tropistic response  
II. The lateral migration of auxin in phototropism of coleoptiles.  
Plant Physiol. **39**, 341–350
- Quail, P. H.**, Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. und Wagner, D. (1995)  
Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction.  
Science **268**, 675–680
- Quinones, M. A.**, Lu, Z. & Zeiger E. (1996)  
Close correspondence between the action spectra for the blue light responses of the guard cell and coleoptile chloroplasts, and the spectra for blue light-dependent stomatal opening and coleoptile phototropism.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, 2224–2228

- Quinones, M. A.** & Zeiger E. (1994)  
A putative role of the xanthophyll, zeaxanthin, in the blue light photoperception of corn coleoptiles.  
*Science* **264**, 558–561
- Reymond, P.**, Short, T. W. und Briggs, W. R. (1992a)  
Blue light activates a specific protein kinase in higher plants.  
*Plant Physiol.* **100**, 655–661
- Reymond, P.**, Short, T. W., Briggs, W. R. und Poff, K. L. (1992b)  
Light-induced phosphorylation of a membrane protein plays an early role in signal transduction for phototropism in *Arabidopsis thaliana*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 4718–4721
- Rich, T. C. G.**, Whitelam, G. C. und Smith, H. (1985)  
Phototropism and axis extension in light-grown mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings.  
*Photchem. Photobiol.* **42**, 789–792
- Rich, T. C. G.** und Tomos, A.D. (1988)  
Turgor pressure und phototropism in *Sinapis alba* L. seedlings.  
*Jour. Of Exp. Bot.* **39**, 291–300
- Rüdiger, W.**, Thümmler, F., Cmiel, E. und Schneider, S. (1983)  
Chromophore structure of the physiologically active form (Pfr) of phytochrome.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 6244-6248
- Rüdiger, W.** und Thümmler, F. (1991)  
Phytochrom, das Sehpigment der Pflanzen.  
*Angew. Chemie* **103**, 1242–1254
- Rüdiger, W.** und Briggs, W. R. (1995)  
Involvement of thiol groups in blue-light-induced phosphorylation of a plasma membrane associated protein from cleoptile tips of *Zea mays* L..  
*Z. Naturforsch.* **50c**, 231–234
- Sachs, J. von** (1887)  
In lectures on the physiology of plants. (Eng. ED. H. M. Ward translator)  
Oxford: Clarendon, p. 696
- Sakai, T.**, Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M. und Okada, K. (2001)  
*Arabidopsis* *nph1* and *npl1*: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 6969-6974
- Salomon, M.**, Zacherl, M. und Rüdiger, W. (1996)  
Changes in blue-light dependent protein phosphorylation during the early development of etiolated oat seedlings.  
*Planta* **199**, 336-342
- Salomon, M.**, Zacherl, M. und Rüdiger, W. (1997a)  
Phototropism and protein phosphorylation in higher plants: Unilateral blue light irradiation generates a directional gradient of protein phosphorylation across the oat coleoptile.  
*Bot. Acta.* **110**, 214-216



- Salomon, M.**, Zacherl, M. und Rüdiger, W. (1997b)  
Asymmetric, blue light-dependent phosphorylation of a 116 kDa plasma-membrane protein can be correlated with the first- and second positive phototropic curvature of oat (*Avena sativa* L.) coleoptiles.  
Plant Physiol. **115**, 485-491
- Salomon, M.**, Zacherl, M., Luff, L. und Rüdiger, W. (1997c)  
Exposure of oat seedlings to blue light results in amplified phosphorylation of the putative photoreceptor for phototropism and in higher sensitivity of the plants to phototropic stimulation.  
Plant Physiol. **115**, 493-500
- Salomon, M.**, Christie, J.M., Knieb, E., Lempert, U. und Briggs, W.R. (2000)  
Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin.  
Biochem. **39**, 9401-9410
- Salomon, M.**, Eisenreich, W., Dürr, H., Schleicher, E., Knieb, E., Massey, V., Rüdiger, W., Müller, F., Bacher, A. und Richter, G. (2001)  
An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. **98**, 12357-12361
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)  
Molecular Cloning.  
Cold Spring Harbor Press
- Schägger, H.** und 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
- Schägger, H.** und von Jagow, G. (1991)  
Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.  
Anal. Biochem. **199**, 223-231
- Schlessinger, J.** (2000)  
Cell signalling by tyrosine kinases.  
Cell **103**, 211-225
- Schmidt** (1980)  
The blue light syndrome.  
herausgegeben von Senger, H.,  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 212-220
- Schmitz, B.** und Griffith, L. S. (1998)  
N-Acetylglucosaminierung: die Alternative zur Ser/Thr-Phosphorylierung.  
Biospektrum **6**, 25-28
- Short, T. W.** und Briggs, W. R. (1990)  
Characterization of a rapid, blue light-mediated change in detectable phosphorylation of a plasma membrane protein from etiolated pea (*Pisum sativum* L.) seedlings.  
Plant Physiol. **92**, 179-185
- Short, T. W.**, Porst, M. und Briggs, W. R. (1992)  
A photoreceptor system regulating *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of a pea plasma

- membrane protein.  
Photochem. Photobiol. **55**, 773–781
- Short, T. W.**, Reymond, P. und Briggs, W. R. (1993)  
A pea plasma membrane protein exhibiting blue light-induced phosphorylation retains photosensitivity following Triton solubilization.  
Plant Physiol. **101**, 647–655
- Short, T. W.**, Porst, M., Palmer, J., Fernbach, E. und Briggs, W. R. (1994)  
Blue light induces phosphorylation at seridyl residues on a pea (*Pisum sativum* L.) plasma membrane protein.  
Plant Physiol. **104**, 1317–1324
- Shropshire, W.** und Withrow, R. B. (1958)  
Action spectrum of phototropic tip-curvature of *Avena*.  
Plant Physiol. **33**, 360–365
- Sicheri, F.**, Moarefi, I. und Kuriyan, J. (1997)  
Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck.  
Nature **385**, 602–609
- Steinitz, B.**, Ren, Z. und Poff, K.L. (1985)  
Blue and green light-induced phototropism in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa* L. seedlings.  
Plant Physiol. **77**, 248–251
- Steinitz, B.** und Poff, K.L. (1986)  
A single positive phototropic response induced with pulsed light in hypocotyls of *Arabidopsis thaliana* seedlings.  
Planta **168**, 305–315
- Steyer, B.** (1967)  
Die Dosis-Wirkungsrelationen bei geotroper und phototroper Reizung: Vergleich von Mono- mit Dikotyledonen.  
Planta **77**, 277–286
- Stowe-Evans, E. L.**, Harper, R. M., Motchoulski, A. V. und Liscum, E. (1998)  
NPH4, a conditional modulator of auxin-dependant differential growth responses in *Arabidopsis*.  
Plant Physiol. **118**, 1265–1275
- Strasburger, E.** (1991)  
Lehrbuch der Botanik.  
Neubearbeitet von Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A.  
Stuttgart, Jena, New York, 33. Auflage
- Stryer, L.** (1996)  
Biochemie.  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 4. Auflage
- Tatosyan, A. G.** und Mizenina, O. A. (2000)  
Kinases of the Src-family: Structure and functions.  
Biochemistry (Moscow) **65**, 6549–6558
- Taylor, B. L.** und Zhulin, I. B. (1999)  
PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light.

Microbiol. Mol. Biol. Rev. **22**, 479–506

**Teramura, A. H.** (1996).

How plants respond to a changing UV-B radiation environment.

In W. Briggs, E. Tobin, and R.L. Heath (ed). How plants use the light environment to regulate growth and development.

American Society for Plant Physiologist, pp 164–170

**Thorpe, C.** und Williams, C. H. Jr. (1981)

Lipoamide dehydrogenase from pig heart. Pyridine nucleotide induced changes in monoalkylated two electron reduced enzyme.

Biochemistry **20**, 1507–1513

**Thümmler, F.**, Rüdiger, W., Cmiel, E. und 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

**Torres, C.-R.** und Hart, G. W. (1984)

Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc.

J. Biol. Chem. **259**, 3308–3317

**Wada, M.** und Kadota, A. (1989)

Photomorphogenesis in lower green plants.

Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mo. Biol. **40**, 169–191

**Wada, M.**, Kanegae, T., Nozue, K. und Fukuda, S. (1997)

Cryptogam Phytochromes.

Plant Cell Env. **20**, 685–690

**Wald, G.** und DuBuy, H. G. (1936)

Pigments of the oat coleoptile.

Science **84**, 237

**Warpeha, K. M. F.**, Kaufman, L. S. und Briggs, W. R. (1992)

A flavoprotein may mediate the blue light-activated binding of Guanosine-5'-triphosphate to isolated plasma membranes of *Pisum sativum* L..

Photochem. Photobiol. **55**, 595–603

**Warpeha, K. M. F.** und Briggs, W. R. (1993)

Blue light-induced phosphorylation of a plasma membrane protein in pea: a step in the signal transduction chain for phototropism.

Aust. J. Plant Physiol. **20**, 393–403

**Yeh, K.-C.** und Lagarias, J. C. (1998)

Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry.

Proc. Natl. Acad. Sci. **95**, 13976–13981

**Zacherl, M.**, Huala, E., Rüdiger, W., Briggs, W. R. und Salomon, M. (1998)

Isolation and characterization of cDNAs from oat encoding a serine/threonine kinase: An early component in signal transduction for phototropism.

Plant Physiol. **116**, 869

**Zacherl, M.** (1997)

Zum Phototropismus bei Hafer (*Avena sativa*) und Mais (*Zea mays*): Charakterisierung der Blaulichtabhängigen Protein-Phosphorylierung und Isolierung der *nph1* Gene. Dissertation an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

**Zhulin, I. B.** und Taylor, B. L. (1997)

PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox. TIBS **22**, 331–333

**Zimmermann, B. K.** und Briggs, W. R. (1963a)

Phototropic dosage-response curves for oat coleoptiles. Plant Physiol. **38**, 248–253

**Zimmermann, B. K.** und Briggs, W. R. (1963b)

A kinetic model for phototropic responses of oat coleoptiles. Plant Physiol. **38**, 253–261

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Wolfhart Rüdiger erstellt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Wolfhart Rüdiger danke ich ganz herzlich für Sein großes Interesse an der wissenschaftlichen Fragestellung dieser Arbeit als auch für Seine außerordentlich kompetente fachliche Unterstützung, die vielen hilfreichen Ratschläge und Diskussionen sowie der Bereitstellung der finanziellen Mittel und nicht zuletzt für die Möglichkeit, diese Arbeit an Seinem Lehrstuhl anzufertigen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn PD Dr. habil. Michael Salomon für die vielen konstruktiven Anregungen, praktischen Hilfestellungen (insbesondere die selbstgebauten), die zahlreichen Gespräche, die er mit hoher fachlicher Kompetenz geführt hat, und das angenehme Laborklima.

Ich danke des weiterem dem Herrn, dem Espresso und folgenden Personen:

- Ohne die freundliche Unterstützung von Dr. Winslow Briggs und Dr. John Christie aus Stanford wäre allein des Antikörpers wegen ein Großteil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.
- Ulrike Oster und Bernd Müller für die zur Verfügung gestellten Bakterienstämme, die oft fehlenden Chemikalien und vor allem die vielen nützlichen Tips.
- Unser Diplomand Harald Dürr hat nicht nur spektral vieles ausgebaut, mit seiner steten guten Laune machte die Arbeit viel Spaß. Eva Bartl ist es zu verdanken, daß mir in der letzten heißen Phase genug aufgereinigtes Protein zur Verfügung stand.
- Vielen Dank an die Arbeitsgruppen dieses Lehrstuhls, allen voran Andrea, Claudia und Heidi, die stets mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie unsere Sekretärin Theresa.
- Ben und Sebastian, Euer Computerwissen und Eure Espressomaschine waren so oft die Rettung – und Apple sind einfach wirklich die besseren Computer!
- Liebe Ursu, lieber Norbert und Pit, ohne Euch hätte ich wohl nie meine Doktorarbeit begonnen und ich bewundere, Ursu und Norbert, Euer stetes Interessen an diesem „hochwissenschaftlichen Kram“. Pit, danke, daß Du mir, neben meinen Aktivitäten am heimischen Herd, im Haushalt und beim Kindhüten immer mehr als genug Zeit zum Austoben im Labor gelassen hast.
- Bärbel und Ian, Ihr habt mir stets zur richtigen Zeit eine ordentliche Portion Menschenverstand verpaßt, um alles objektiver zu sehen. Ich habe unsere ausführlichen Gespräche über die UV-A/blaulichtvermittelte Autophosphorylierung sehr genossen, liebe Mela – Danke an Benjamin Jordan Howes, daß er später kam.
- Meiner Familie – nicht zu vergessen meine liebe Omama – für den Rückhalt und die finanzielle wie auch menschliche Unterstützung.
- Zum Gewinn der letzten Jahre zähle ich, daß mir mein lieber Mitstreiter Harald ein sehr wichtiger Freund geworden ist.

## Lebenslauf

Name: Elke Knieb  
Geburtsdatum: 23. April 1971  
Geburtsort: Mühldorf am Inn  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

1977–1981 Grundschole Mühldorf am Inn  
1981–1990 Ruperti-Gymnasium Mühldorf am Inn  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

1990–1997 Studium der Biologie und Chemie für das Lehramt an Gymnasien an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach: physiologische Botanik  
Abschluß: Staatsexamen

1995–1996 Zulassungsarbeit am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts an der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Fritz Thümmeler mit dem Thema: „Versuche zur Bildung von photoreversiblen Addukten aus Phycocyanobilin und Hafer- oder Ceratodon-Phytochrom-Apoproteinen.“

Januar 1998 Beginn der Promotion unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Wolfhart Rüdiger am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität in München mit dem Thema: „Struktur, Funktion und spektroskopische Eigenschaften der flavinbindenden Domänen des pflanzlichen Blaulichtrezeptors Phototropin (PHOT1)“

seit Februar 2002 angestellt bei der SiREEN AG in Martinsried