

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Bilinchromophore

Die Phytochrom-Apoproteine wurden mit verschiedenen Bilinchromophoren assembliert. Dabei handelt es sich um die Tetrapyrrole Biliverdin (BV), 18,18`dihydrobiliverdin (18EtBV), 15Z-*anti*-18EtBV (15Za), 15Z-*syn*-18EtBV (15Zs), 15E-*anti*-18EtBV (15Ea), 15E-*syn*-18EtBV (15Es), 5Z-*syn*-18EtBV (5Zs) und 5Z-*anti*-18EtBV (5Za). Biliverdin wurde bei Porphyrin Products (Logan, UT, USA) gekauft. Die synthetischen Bilinchromophore 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es, 5Za und 5Zs wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Katsuhiko Inomata (Kanazawa Universität, Japan) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die pulverförmig vorliegenden Chromophore wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -80 °C aufbewahrt. Mit Hilfe des Molekulargewichts konnte berechnet werden, welche Menge des jeweiligen Chromophors und welches Volumen an Lösungsmittel gemischt werden müssen, um eine 1 mM bis 2 mM Chromophor Stammlösung zu erhalten. Die genaue Konzentration der gelösten Chromophore wurde anschließend spektral bestimmt.

2.1.1. Bestimmung der Chromophorkonzentration durch spektrale Messungen

Die Bestimmung der Chromophorkonzentration erfolgte nach Li et al., 1995. Alle spektralen Messungen der Chromophore wurden mit einem Uvikon 941 oder einem Uvikon 931 Spektrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) bei 18 °C durchgeführt. Es wurden 10 µl BV, 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es, 5Za oder 5Zs mit 990 µl Methanol/HCl(5%) gemischt. Die Mischung Methanol/HCL(5%) wurde frisch und kurz vor Verwendung angesetzt. Von 350 bis 900 nm wurde ein Spektrum aufgenommen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach dem Lambert Beer'schen-Gesetz: $E = \epsilon \times c \times d$. Dabei ist E der Absorptionsbetrag für das Absorptionsmaximum im roten Wellenlängenbereich, ϵ der entsprechende Extinktionskoeffizient und d die Schichtdicke der Küvette, (hier 1 cm). Der Extinktionskoeffizient für Biliverdin ist in McDonagh, 1979 veröffentlicht und die Werte für 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es, 5Za und 5Zs wurden von Katsuhiko Inomata (Kanazawa Universität, Japan) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten für die verschiedenen Chromophore und die dazugehörigen Wellenlängen sind in Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1: Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Biline BV und 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es, 5Za und 5Zs. Der Wert für BV stammt aus der Arbeit von McDonagh, 1979. Die Werte für 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es, 5Za und 5Zs wurden von Katsuhiko Inomata (Kanazawa Universität in Japan) berechnet. Dazu wurde eine bestimmte Menge an Chromophor eingewogen und in HCL-(5%)Methanol, im Fall von 15Es in nichtsaurem Methanol, gelöst und von 200 bis 800 nm ein Spektrum gemessen.

	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	OD (nm)
BV	30,8	696
18EtBV	30,5	689
15Za	40,3	678
15Zs	49,2	691
15Ea	51,3	663
*15Es	13,6	648
5Za	33,9	681
5Zs	26,5	695

* spektrale Messung erfolgte in nichtsaurem Methanol

2.1.2. Test der Protein-Chromophor-Wechselwirkung

Diese Methode ermöglichte die Untersuchung der Wechselwirkung des Protein-Chromophor-Komplexes im nativen und SDS-denaturierten Zustand. Für die Tests wurden NAP-5 Entsalzungssäulen (Amersham Pharmacia) verwendet. Diese Säulen enthalten eine Gelfiltrationsmatrix, in der die Proteine ungehindert durch die Säule laufen. Freier Chromophor oder Salz werden zurückgehalten. Eine Konzentration von 10 μ M AgpI in TE-Puffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.8) wurden mit 5 μ M BV (Stammlösung: 2,1 mM), 5 μ M 18EtBV (Stammlösung: 1,16 mM), 5 μ M 15Za (Stammlösung: 0,79 mM), 5 μ M 15Zs (Stammlösung: 0,67 mM), 5 μ M 15Ea (Stammlösung: 2 mM), 5 μ M 15Es (Stammlösung: 0,86 mM), 5 μ M 5Za (Stammlösung: 3 mM) bzw. 5 μ M 5Zs (Stammlösung: 0,3 mM) gemischt und für 200 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 500 μ l Probe auf die mit ca. 10 ml TE-Puffer equilibrierte Säule geladen. Mit 1000 μ l neuem Puffer wurde das Holoprotein eluiert. Schließlich wurde die Probe spektral analysiert.

2.1.2.1. Test der kovalenten Protein-Chromophor-Wechselwirkung.

Für die Überprüfung der kovalenten Bindung zwischen Protein und Chromophor wurde nach Abschluss der Protein-Chromophor Assemblierung SDS zu einer Endkonzentration von 1 %

(Stammlösung 10 %) in das Gemisch gegeben und die Probe für mindestens 10 min inkubiert. Danach wurde die Probe wie oben beschrieben auf eine Entsalzungssäule geladen und eluiert. Die Säule wurde zuvor mit TE-Puffer und 1 % SDS equilibriert. Durch einen Vergleich der Absorptionsspektren vor und nach Säulentrennung wurde die Menge an kovalent gebundenem Chromophor bestimmt. Für den Vergleich wurden die Absorptionsmaxima der Kurven bei 280 nm auf 1 korrigiert.

2.1.2.2. Test der nicht-kovalenten Protein-Chromophor-Wechselwirkung

Um die nicht-kovalente Bindung zwischen Protein und Chromophor zu analysieren, wurde das Apoprotein für 2 h mit 2 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) DTNB inkubiert. DTNB blockiert die kovalente Bindestelle. DTNB reagiert außerdem mit dem reduzierenden Agens in der Proteinlösung. Dadurch entstehen hohe Konzentrationen des gelben 5-thio(2-nitrobenzoesäure)Produktes, welches ein Absorptionsmaximum bei 412 nm hat. Das geblockte Apoprotein wurde deshalb über eine Entsalzungssäule gegeben, um die Konzentration dieser Verbindung zu verringern. Anschließend wurde das geblockte Apoprotein wie oben beschrieben mit dem Chromophor inkubiert und ein Teil der Probe erneut auf eine TE-Puffer equilibrierte Entsalzungssäule geladen und wieder eluiert. Der andere Teil der Probe wurde nicht noch einmal über eine Säule getrennt. Vor Messung der UV/vis - Spektren von Proben vor und nach der zweiten Säulentrennung wurde SDS zu einer Endkonzentration von 1 % dazugegeben, um den Einfluss des Proteins auf das Chromophorspektrum zu minimieren. Durch einen Vergleich der Absorptionsspektren vor und nach der zweiten Säulentrennung wurde die Menge an Chromophor bestimmt, der trotz der Auftrennung am Protein gebunden bleibt. Dazu wurden auch hier wieder die Absorptionsmaxima der Spektren bei 280 nm auf 1 korrigiert.

2.2. Agp1-Konstrukte

Die in Kapitel 2.1 beschriebenen Chromophore wurden mit Agp1 Apoprotein, bzw. mit den Apoproteinen verschiedener Deletionskonstrukte von Agp1 assembliert. Bei den Agp1 Deletionskonstrukten wurden gezielt bestimmte Domänen und Aminosäuren des Proteins entfernt. Im Anschluss an die Klonierung wurden die Agp1 Konstrukte in *E. coli* exprimiert und gereinigt.

2.2.1. Computer unterstützte Datenverarbeitung

Das Programm „BLASTP“ wurde für die Suche von Proteinsequenzen verwendet. Als Datenbank wurde die aus der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) benutzt. Die Proteindomänen von Agp1 wurden mit dem SMART *computer tool* bei der *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL; <http://smart.embl-heidelberg.de>) bzw. dem PFAM *computer tool* aus dem *Sanger Centre* (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) gesucht. Das Design von Primern und Sequenz Alignments wurden mit dem Programm Vector NTI durchgeführt.

2.2.2. Klonierungen

Es wurden 7 verschiedene Deletionskonstrukte von *Agrobacterium* Phytochrom Agp1 hergestellt. Die Klonierung erfolgte auf der Basis eines schon vorhandenen Expressionsvektors mit dem Agp1 Konstrukt (pAG1). Zur Verkürzung der Gene wurden die in Kapitel (2.2.2.3) dargestellten Primer verwendet. Nach der Restriktion des Ausgangsplasmids, der Reinigung, Phosphorylierung und Ligation des PCR-Produktes wurde das Plasmid mit dem verkürzten Agp1-Konstrukt in *E. coli* Zellen transformiert. Von der LB-Amp-Platte (2.2.3.1) mit den transformierten Zellen wurden 5-10 Klone gepickt und in Glasröhrchen mit 5 ml LB-Amp (2.2.3.1) Medium überführt. Als Kontrolle diente LB-Amp Medium ohne Zellen. Nach einem Wachstum der Zellen über Nacht bei 28 °C wurden die Plasmide aus den *E. coli* Zellen isoliert und gereinigt. Anschließend wurde die Sequenz der Agp1 Deletionskonstrukte überprüft. Der Vektor und die erforderlichen Klonierungsschritte werden im Folgenden beschrieben.

2.2.2.1. Expressionsplasmid für *Agrobacterium*-Phytochrom Agp1

Für die Expression von Agp1 und der Deletionskonstrukte wurde der Vektor pQE-12 (Qiagen, Chatsworth, CA) in *E. coli* verwendet. Der Vektor besitzt einen T5 Promotor und zwei lac-Operator Sequenzen. Dieser Klonierungsvektor enthält das Ampicillin-Resistenz-Gen bla (beta Lactamase) und zwei starke Transkriptionsterminatoren, T0 von dem Phagen Lambda und T1 vom rrnBOperon des Bakteriums *E. coli*. Der ORF beginnt mit dem ursprünglichen *start* Codon und endet in 6 zusätzliche Histidin Codons. Dazwischen befindet sich die Sequenz für Agp1. Die Histidin Codons ermöglichen eine Reinigung des Expressionsproteins über Nickelaffinitäts-Chromatographie.

2.2.2.2. Isolation des pAG1 Plasmids für Klonierungen

Der *E.coli* –Stammkultur mit dem pAG1 Plasmid wurde mit einer Impföse Zellen entnommen und in 5 ml LB-Amp-Medium überführt. Nach einem Wachstum der Zellen über Nacht bei 30 °C wurde abzentrifugiert, mit Basispuffer (2.2.5.2/ Tabelle7) 2x gewaschen, nochmal zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Aus den Zellen wurden die *E.coli* Plasmide mit Hilfe eines Plasmid Mini-Isolierungskits (Qiagen GmbH) mittels alkalischer Lysis isoliert und gereinigt.

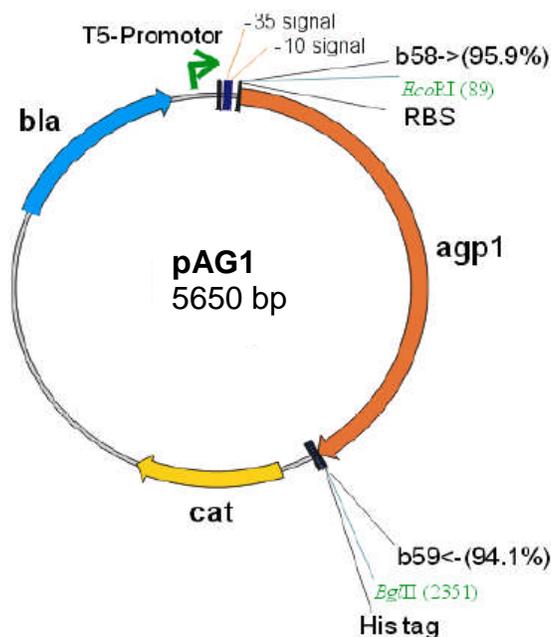


Abbildung 11: Expressionsvektor pAgp1 zur konstitutiven Expression des prokaryotischen Phytochrom aus *Agrobacterium tumefaciens* Agp1. Das Gen wurde unter die Kontrolle eines lac-Operons eingebaut.

2.2.2.3. PCR

Für die Durchführung von PCR-Reaktionen wurden ein Biometra Trio Thermoblock oder ein Biometra TGradient Thermocycler verwendet. Als Polymerase wurde die Pfu-Turbo-Polymerase (STRATAGENE) oder die Taq-DNA-Polymerase (Takara Shozu, Otsu, Japan) benutzt. Die lyophilisierten Primer (BioTez Berlin-Buch GmbH) wurden in einer Konzentration von 100 µM in TE-Puffer gelöst und bei –20°C gelagert. Die folgende Liste zeigt die verwendeten Primer.:

Verwendete Primer:

S2: CTCCTCGCTGCCGCAAGTTCG

S3: CTCTGACCAGGGAAAGGAGG

ti12: CATCACCATCACCATCACTAAGCTTAATTAG

ti17: CTGGGAACTCTGCTCCATCG

t18: TGCGGCGCAGAGCCCATCCAC

nmcutas: CATAGTTAATTTCTCTCTTTAATGAATTCTG

nmcutse: AGTTCACATACGCCGAAACTGGATAGTTGC

A19: GCGTTCTGAACAAATCCAG

J116: GATAACAATTTACACAGAATT

Anschließend an die PCRs zur Umklonierung von Agp1 wurde ein *E. coli* Screening durchgeführt, um positive Klone nachzuweisen. Die PCR Ansätze besaßen ein Endvolumen von 20 µl und waren nach folgendem Schemata zusammengesetzt.

Tabelle 2: Pipettierschema für PCRs zur Herstellung von Agp1-Deletionsmutanten und *E. coli* Screening (PCR-Master-Mix)

	Stammlösung	Endkonzentration	
		Deletionen aus Agp1	Screening von <i>E.coli</i> -Kolonien
Polymerase Puffer	10 x	1 x	1 x
MgCl	25 mM		0,9 mM
Primer sense	100 µM	0,5 µM	0,5 µM
Primer antisense	100 µM	0,5 µM	0,5 µM
DNTPs	2,5 mM	200 µM	200 µM
Pfu-Turbo-Polymerase	2,5 U/µl	0,05 U/µl	
Taq DNA Polymerase	5 U/µl		0,05 U/µl

Für die Herstellung von Agp1-Deletionskonstrukten wurden als *template*-DNA 1 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Die PCR fing mit einer Denaturierung für 1 min bei 95 °C an. Danach folgten 24 Zyklen jeweils 30 sec Denaturierung bei 95°C; 1 min *annealing* der Primer bei 60, 62 oder 65°C und 11 min Elongation bei 72°C. Abschließend wurde auf 4°C heruntergekühlt. Für das *E. coli* Screening wurde die in den Bakterien enthaltene DNA als *template*-DNA verwendet. Dazu wurde eine Bakterienkolonie gepickt und in 20 µl PCR-Master-Mix überführt (Tabelle 2). Die

PCR fing mit einer Denaturierung für 2 min bei 96°C an. Danach folgten 24 Zyklen jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min *annealing* der Primer bei 60°C und 5 min Elongation bei 72°C. Zum Schluß wurde auf 4°C heruntergekühlt. Die *annealing*-Temperatur (T_{an}) für einen Primer wurde nach Baldino et al. (1989) bestimmt, d.h. für jeden Cytosin- und Guaninrest wurden 4°C und für jeden Adenin- und Thyminrest 2°C berechnet. Die Summe der Temperaturen über alle Basen des Primers ergab die *annealing*-Temperatur. Für die Berechnung der Elongationszeit wurde zu Grunde gelegt, dass die *Taq* DNA Polymerase 500-1000 bp/min und die Pfu-Turbo-Polymerase 500bp/min einbaut. Nach Beendigung der PCR wurden 5 µl des PCR-Produktes auf ein Agarosegel (2.2.2.4) aufgetragen und geprüft, ob das erwartete PCR Produkt entstanden ist. Anschließend erfolgte die Reinigung mit einem QIAquick PCR *Purification Kit* (Qiagen GmbH) oder mit dem EasyPure DNA Purification Kit (Biozym, Oldendorf, Deutschland).

2.2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Produkte von DNA-Extraktionen, PCR-Reaktionen, Reinigungen und Restriktionsanalysen wurden mit Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Lösungen und Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese sind in Tabelle 3 angegeben. Für analytische Gele wurde Standard Agarose (AppliChem) in Tris-Borat-EDTA-Puffer (1x TBE) gelöst. Als Laufpuffer wurde ebenso TBE-Puffer verwendet. Präparative Gele wurden mit LMP-Agarose (AppliChem) in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), welcher mit 0,1 µg Ethidiumbromid/ml Puffer versetzt wurde, gegossen. Die Agarosekonzentration lag, je nach Größe der DNA-Fragmente, zwischen 0,7 % und 2 % (w/v). Die Maße der präparativen und analytischen Gele waren 8 x 6 cm bzw. 16 x 15 cm. Die Gele waren 9 mm bzw. 2 mm dick. Nach Zugabe von *sample loading buffer* (SLB) (Tabelle 3) wurden die DNA-Proben aufgetragen. Um die Größe der DNA zu ermitteln, wurden ebenfalls 1kb, 100bp und 50bp Marker von Fermentas verwendet. Die TBE-Gele wurden nach dem Lauf (kleine Gele bei 120 V, große Gele bei 160-180 V) in ein Ethidiumbromidfärbebad (0,5 µg/ml) gelegt. Die präparativen TAE Gele enthielten schon Ethidiumbromid und mussten nicht extra gefärbt werden. Unter dem UV-Licht des Transilluminators (UV-Products Inc., San Gabriel, USA) fluoresziert das an die DNA gebundene Ethidiumbromid orange (etwa bei 590 nm). Um eine deutliche Bande zu erkennen, wurden etwa 5-10 ng DNA benötigt. Alle relevanten Gele wurden mit einer Videokamera (HeroLab,) dokumentiert.

Tabelle 3: Lösungen für Agarose-Gelelektrophoresen

10x TE-Stammlösung (mM)	10x SLB
100 Tris/HCl, pH 8.0	50 % Glycerol (v/v)
10 EDTA, pH 8.0	2,5 µg/ml Xylene cyanol
	2,5 µg/ml Bromophenol blau

5x TBE Laufpuffer	50x TAE Laufpuffer
54 g/l Tris	242 g/l Tris
27,5 g/l Borsäure	57,1 ml/l Essigsäure
20 ml/l 0,5 M pH 8 EDTA	100 ml/l 0,5 M pH 8 EDTA

2.2.2.5. Reinigung, Ligation und Restriktionsverdau von DNA

Das PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) aus dem Agarosegelstück eluiert. Um spezifisch DNA (z.B. Plasmid-DNA) abzubauen, wurde die Restriktionsendonuklease DpnI eingesetzt. Nichtmethylierte DNA (z.B. PCR-Produkte) wird von DpnI nicht geschnitten. Für Ligationen wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. Für die Phosphorylierung der 5'-Enden von PCR-Produkten wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK) gemäß den Angaben des Herstellers (BioLabs) verwendet. Restriktionsenzyme, Ligasen und PNK wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Promega oder Boehringer bezogen.

Tabelle4: Verwendete Restriktionsendonuklease (DpnI), Polynukleotidkinase (PNK) und Ligase; A: Restriktionsverdau mit DPNI. B: Phosphorylierung des Inserts. C: Ligationsansatz.

	Stammlösung	Endkonzentration	
DpnI	20 Units /µl	0,4 Units /µl	A
Plasmid mit Agp1-Fragment		3 ng/µl	
Ligase Puffer	10 fach	1 fach	B
T4 PNK	10 Units /µl	0,5 Units /µl	
Plasmid mit Agp1-Fragment		3 ng/µl	
T4 Ligase	400 Units /µl	36 Units /µl	C

2.2.2.6. Sequenzierung

Für die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen transformierter *E. coli* Zellen extrahiert. Die Konzentration der extrahierten Plasmid-DNA wurde auf 100 ng/µl eingestellt. Die beiden Sequenzierungs-Primer wurden so konzipiert, dass sie auf dem pQE-12 Vektor jeweils etwa 30-50 bp vor dem Start- bzw. Stopkodon des zu sequenzierenden Gens binden. Von jeder Seite wurden bis zu 500 bp des entsprechenden Gens sequenziert. Für die Sequenzierung von Genen im pQE-12 Vektor wurden die Primer A19 und J116 verwendet.:

A19: GCGTTCTGAACAAATCCAG

J116: GATAACAATTTACACAGAATT

Die beiden Primer wurden so verdünnt, dass sich 50 pMol des Primers in 5 µl Volumen befinden.

Die Sequenzierungsreaktionen wurden bei Martin Meixner (DLMBC, Berlin) durchgeführt. Dazu wurden ein ABI Prism-Dye-Terminator-System (Big Dye / FS-Kit, Perkin Elmer) und ein Trio Thermoblock (Biometra) benutzt. Das Prism-Dye-Terminator-System funktioniert wie die von Sanger (Sanger et al., 1977) beschriebene Didesoxy-Terminations-Sequenzierungs-Reaktion. Mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden die End-Didesoxynukleotide markiert.

Die Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mit dem Programm Vector NTI. Hierbei wurden die DNA Bereiche der sequenzierten Basen mit denen des konstruierten Plasmids verglichen. Im Bereich des klonierten Gens sollte eine 100%-ige Übereinstimmung zwischen der theoretischen und analysierten Basenpaarzusammensetzung herrschen.

2.2.3. Kultivierung der Bakterien

Nach Abschluss der Klonierungsexperimente wurden die Expressionsplasmide in elektrokompente Bakterien (2.2.3.2) transformiert und Stammkulturen positiver Klone angelegt. Die Transformation der Expressionsvektoren wurde mit den Bakterien-Stämmen *Escherichia coli* L.; XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.3.1. Antibiotika und Medien

Zur Selektion der mit den Expressionsvektoren transformierten Bakterien wurde das Antibiotikum Ampicilin (50µg/ml) eingesetzt. Von Ampicilin wurde eine 1000 fache Stammlösung in Wasser angesetzt und durch einen 0,20 µm Filter (Sterile, non-pyrogenic, hydrophilic filter, Roth, Deutschland) steril filtriert. Die Stammlösung wurde in 1 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Das gelöste Antibiotikum wurde mit flüssigem Agar-Medium gemischt.

Elektrokompetente, frisch transformierte Zellen werden in SOC-Medium überführt und für 1 h inkubiert. Das Medium besteht aus: Trypton (20 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 0.4 % (w/v) Glucose. Der pH wurde nicht eingestellt.

Für das Wachstum der *E. coli*-Zellen wurde LB-Medium als Standardmedium mit dem Antibiotikum Ampicilin verwendet. Das Medium besteht aus: Trypton (10 g/l), Hefe-Extrakt (5 g/l) und NaCl (10 g/l). Die angegebenen Substanzen wurden in Wasser gelöst. Der pH wurde mit NaOH auf 7,6 eingestellt. Danach wurde das Medium autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium für Petrischalen wurde Bacto-Agar (1.5 % w/v) (Sigma A9799) zugegeben.

Das RB Medium wurde für den Ansatz größerer *E. coli* Kulturen mit dem Zweck der Proteinexpression verwendet. Das Medium besteht aus: Trypton (10 g/l), Hefeextrakt (5g/l), NaCl (5g/l) und Glucose (2 g/l). In unserem Fall wurde Glucose als 25 g/l Stammlösung verwendet und getrennt vom Medium autoklaviert. Der pH wurde durch Zugabe von HCl bei 7,6 eingestellt.

2.2.3.2. Transformation von Bakterien

Die für die Transformation verwendeten elektrokompetenten Zellen wurden nach Sambrook und Russel (Sambrook et al.,1989) hergestellt. Die Zellen sind in 500 ml LB Medium über Nacht bei 18-20°C bis zur OD₆₀₀ von 0,5-0,6 gewachsen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal in eiskaltem Wasser gewaschen und abschließend in 4 ml eiskaltem 7% DMSO in H₂O resuspendiert. Die Bakterien wurden aliquotiert und bei -70°C bis zur Transformation gelagert. Die Transformation von DNA in das Bakterium *E.coli* erfolgte mittels Elektroporation (Easyject

PLUS Elektroporator, PeqLab) nach Dower (Dower et al., 1988; Miller et al., 1988). Für die Elektroporation wurden Küvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand (BioRad) verwendet. Eine Transformation erfolgte mit folgenden Parametern: $U = 2000 \text{ V}$; $R = 200$; Kapazität = $25 \mu\text{F}$; Pulsdauer = 5 ms. Nach der Transformation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium (2.2.3.1) gegeben und 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf die entsprechende Platte gegossen und 15-24 h bei 37°C inkubiert.

2.2.3.3. Anlegen von Stammkulturen

In der Regel wurden von 3-5 positiven Kolonien Stammkulturen angesetzt. Dazu wurden 5 ml LB-Amp-Medium (2.2.3.1) mit den Zellen beimpft und diese bei 37°C ü.N. geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 850 μl mit 150 μl Glycerin gemischt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4. Auswahl positiver Klone durch Proteinexpressions- und Spektrenkontrolle

Im Anschluss an die Transformation wurden einige Kolonien bezüglich ihrer Fähigkeit, das gewünschte Protein zu exprimieren, überprüft. Im Falle einer Expression wurde das Protein auf seine Löslichkeit und spektralen Eigenschaften getestet. Teilweise erfolgte eine Expression und Reinigung im großen Maßstab für Strukturuntersuchungen durch Kristallisation, Limitierte Proteolyse, Gelfiltration und „Crosslinking“. Einen wichtigen Bestandteil dieser Untersuchungen bildete die SDS-Gelelektrophorese. Diese wird daher im Vorfeld erwähnt.

2.2.4.1. SDS-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine auf der kathodischen Seite eines Gels mit der in Tabelle 6 angegebenen Zusammensetzung aufgetragen. Die Proben werden vorher im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer (3x) (Tabelle 5) versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und für 20 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Gel befindet sich in einer mit Laufpuffer (Tabelle 5) gefüllten Apparatur. Nach Anlegen einer Spannung wandert das Protein im elektrischen Feld in Richtung Anode. Bei der Wanderung durch die netzartige Struktur des Polyacrylamid-Gels werden die Proteine nach ihrer Größe getrennt. Die Färbung der Gele erfolgt mit Coomassieblau (Tabelle 5) für mindestens 1 h und die Entfärbung mit 40 %-igem Methanol.

Tabelle 5: Zusammensetzung verschiedener Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese.

SDS-Probenpuffer (3x)	Trenngelpuffer (4x)	Sammgelpuffer (4x)	Laufpuffer	Coomassie Färbelösung
30 % Glycerin	1,5 M Tris	500 mM Tris	25 mM Tris	400 mg
6 % SDS	0,6 % SDS	0,6 % SDS	0,15 % SDS	50%
300 mM DTT			192 mM	Methanol
0,01 % Bromphenolblau			Glycin	10%
4,8 ml	pH 8,8 mit HCl	PH 6,8 mit HCl		Essigsäure
Sammelgelpuffer pro 10 ml				

Die **Acryl-/Bisacrylamid-Stammlösung** wurde fertig gekauft (Carl Roth GmbH) und besteht aus 30 % Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid. Die **TEMED-Stammlösung** wurde bei AppliChem gekauft und enthält 40 % TEMED. Außerdem wurde eine **APS-Stammlösungen** mit 10 % Ammoniumpersulfat (APS) in Aqua bidest eingesetzt. In der Regel wurden 13 % Gele folgender Zusammensetzung verwendet:

Tabelle 6: Pipettierschema für SDS Trenn- und Sammelgele.

	Trenngel-Stammlösung	Sammelgel-Stammlösung
Acryl-/Bisacrylamid-Stamml.	4150 µl	670 µl
Trenngelpuffer	2500µl	
Sammelgelpuffer		1250 µl
Wasser	3300 µl	3080 µl
TEMED	12,5 µl	6 µl
APS	50 µl	16 µl

2.2.4.2. NuPAGE-Gelelektrophorese

In manchen Fällen wurden NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gele von Invitrogen verwendet. Als 20x Laufpuffer wurden 1 M MES (2-Morpholinoethansulfonsäure), 1M Tris, 2 % SDS und 20,5 mM EDTA eingesetzt. Es wurde derselbe Probenpuffer wie für die SDS-Gelelektrophorese (Tabelle 5) verwendet. Die NuPAGE-Gele ermöglichen eine bessere Trennung und wurden hauptsächlich eingesetzt, wenn die Ergebnisse dokumentiert oder die genaue Größe der Proteinbanden ermittelt werden sollten.

2.2.4.3. Expressionstest

Von den nach Transformation der Deletionskonstrukte gewachsenen Kolonien wurden 5 bis 10 mit der Spitze einer sterilen Impföse gepickt und in separate Reagenzgläser mit 3ml LB/Amp überführt. Es wurden gleichzeitig eine Negativkontrolle und der Agp1-Wildtyp angeimpft, bzw. eine Sterilkontrolle mit nicht angeimpftem LB-Amp-Medium angesetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 30°C sollten die angeimpften Kulturen getrübt und die Sterilkontrolle klar sein. Ein ml jeder Kultur wurde in einen 100 ml Kolben mit 30 ml RB/Amp überführt und etwa 4 h bei 30°C geschüttelt. Nachdem die Kulturen eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht hatten, wurden sie für 10 min auf Eis überführt. Anschließend wurden aus einer 60 mg/ml Isopropyl-β-D-Thiogalactoside (IPTG) - Stammlösung 20 µl in die Kultur überführt und die Kolben bei 20 bis 22°C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde den Kulturen jeweils 1ml entnommen, in Eppendorfgefäße überführt und für 3 min bei 6000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 0,5 ml Basispuffer (Tabelle 7) resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde dieser Waschvorgang wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet mit 50 µl SDS-Probenpuffer (Tabelle 5) resuspendiert. Die Eppendorfgefäße wurden für 5 min bei 95 °C gekocht und für 20 min bei 20 °C und 50000 g zentrifugiert.

Von jeder Probe wurden 5 µl auf ein SDS-Gel gegeben. Jedes SDS-Gel enthielt eine Spur mit 10 µl Prestained Molecular Weight Standard Marker (Sigma-Aldrich), eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle. Nach Laufen des Gels wurde für ein bis zwei Stunden mit Coomassielösung angefärbt und anschließend mit 40 % Methanol entfärbt.

2.2.4.4. Löslichkeit

Es wurden 25 ml, der wie oben beschrieben, angeimpften, gewachsenen und induzierten Kulturen von 7 Klonen und dem Wildtyp in Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 6000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml Basispuffer (Tabelle 7) resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 1ml Extraktionspuffer (Tabelle 7) gelöst. Die Proben wurden mit einer French Press Zelle bei 800 psi zweimal aufgeschlossen. Zwischen verschiedenen Proben wurde die French Press Zelle mit Aqua dest gespült. Die aufgeschlossenen Proben wurden 20 min bei 50000 g und 4°C zentrifugiert.

Durch einen Vergleich des Proteingehaltes in Pellet und Überstand der aufgeschlossenen *E. coli* Zellen können Aussagen zur Löslichkeit des jeweiligen Agp1-Konstruktes getroffen werden. Dazu wurde nach Zentrifugation der Überstand in einen Messzylinder abdekantiert. Das Pellet wurde in Grundpuffer gelöst, so dass die Volumina des Überstandes und des gelösten Pellets gleich waren. Ein Aliquot des Überstandes bzw. des gelösten Pellets wurde mit SDS-Probenpuffer (Tabelle 5) vermischt. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht, 20 min bei 20°C und 50000g zentrifugiert und anschließend auf ein SDS-gel aufgetragen. Nach 2 h Färben mit Coomassielösung und Entfärben mit 40 % Methanol kann der Gehalt an Phytochrom im Überstand und im Pellet anhand der Bandenstärke auf dem SDS-Gel verglichen werden. Aus diesem Vergleich lassen sich Aussagen über die Löslichkeit der jeweiligen Agp1-Konstrukte treffen.

2.2.4.5. Spektrale Kontrolle

Mit Hilfe der UV/vis Spektroskopie wurde überprüft, ob das Apoprotein den Chromophor einbaut und eine Photokonversion stattfindet. Aus einer Biliverdin Stammlösung wurde durch Verdünnung mit Aqua dest. eine 0,1 mM Arbeitslösung hergestellt. Der Überstand, der wie in 2.2.4.4 aufgeschlossenen und abzentrifugierten Proben wird 1:10 mit Basispuffer (Tabelle7) verdünnt. 500 µl der verdünnten Probe werden mit 50 µl Biliverdin Arbeitslösung vermischt und in eine Quarzküvette überführt. Zur Überprüfung der Photokonversion wird ein Spektrum von 350 bis 900 nm gemessen. Anschließend wird für 2 min mit rotem Licht (650 nm) bestrahlt und ein zweites Spektrum gemessen. Zur Kontrolle werden 50 µl BV Arbeitslösung mit 500 µl Grundpuffer gemischt und spektral gemessen.

2.2.5. Expression, Extraktion und Reinigung

Diese Methode diente a priori der Expression größerer Mengen an Protein für spektrale Messungen und Strukturuntersuchungen, sowie der Kristallisierung im Fall vom M15. Die Extraktion und Reinigung von Agp1 erfolgte unter Abänderungen nach Lamparter et al. (1997). Alle spektralen Messungen während der Expression und Reinigung wurden mit einem Uvikon 941 oder einem Uvikon 931 Spektrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) durchgeführt.

Die Proteinkonzentration wurde entweder photometrisch bei 280 nm oder nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Für 500 ml Bradford-Lösung wurden 50 mg Coomassie G250, 25 ml

95 % EtOH und 50 ml 85 % Phosphorsäure gemischt. Die Lösung wurde zunächst ca. 2 Stunden abgedunkelt gerührt. Anschließend wurden 425 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wurde filtriert und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Mit jeder neu angesetzten Lösung wurde eine Kalibrierkurve ermittelt. Für die Proteinbestimmung wurden 990 µl Bradfordreagenz mit 10 µl der Probe gemischt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Anhand einer Eichkurve wurde die Proteinkonzentration errechnet.

2.2.5.1. Expression der Agp1 Deletionskonstrukte

Die bei -70°C aufbewahrte Stammkultur wurde auf einer LB/Amp-Agarplatte ausgestrichen. Mit der Spitze einer sterilen Impföse wurden die Zellen auf die Platte überführt. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert. Eine Kolonie von einer Platte wurde mit der Spitze einer sterilen Impföse gepickt. Damit wurden 5 ml LB-Medium beimpft. Als Kontrolle wurde LB/Amp ohne Zellen verwendet. Nach Inkubation bei 28°C ü.N. wurden 3 ml aus der Vorkultur verwendet, um 47 ml frisches Medium in einen 200 ml Kolben zu beimpfen. Diese Kultur wurde bei 28°C geschüttelt, bis die OD₆₀₀ bei 1 war. Dann wurden die Zellen bei 4°C ü.N. gekühlt, um das Wachstum zu stoppen. Von dieser Kultur wurden am nächsten Tag 50 ml in 1950 ml RB/Amp überführt, auf vier 2 l-Kolben verteilt und bei 28°C weiter geschüttelt. Nach 5 h war eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,6 erreicht. Die auf vier Kolben verteilte Kultur wurde wieder vereinigt und die Proteinexpression mit 84 µM IPTG induziert. Die Kultur wurde dann auf acht 2 l-Kolben verteilt und bei 20°C (Agp1) in einem Wasserbad (GFL 1083, Burgwedel, Deutschland) ü.N. geschüttelt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen für die Extraktion gesammelt.

2.2.5.2. Extraktion von Phytochrom

Die gesamte Extraktion und Reinigung wurde bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in einer Sorvall Zentrifuge mit einem GS3 Rotor bei 6000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vom Überstand getrennt und in 250 ml Basispuffer (Tabelle 7) mit Hilfe eines Homogenisators resuspendiert. Danach wurde 5 min bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden in 40 ml Extraktionspuffer (Tabelle 7) resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer „French Press“ (SLM Aminco FA 030, USA) 2 Mal bei 130 MPa extrahiert. Die zerstörten Zellen wurden für 20 min bei 25000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Das Pellet wurde mit Basispuffer (Tabelle 7) resuspendiert. Es wurde soviel Puffer eingesetzt, dass die Suspension dem Volumen des Überstandes entsprach. Sowohl vom

Überstand als auch vom gelösten Pellet wurden 300 µl-Aliquots entnommen, um den Phytochromgehalt mittels SDS-Gelelektrophorese zu kontrollieren. Anschließend wurden die Proteine des Überstandes mit Ammoniumsulfat Puffer (Tabelle 7) gefällt. Dadurch wurde EDTA entfernt, welches bei der Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie stört. Außerdem wurde das gewünschte Protein weiter gereinigt und konzentriert. Für die Fällung von Agp1-Deletionsmutanten wurde 1 Teil Protein mit 3 Teilen EDTA-freiem Ammoniumsulfat-Puffer (Tabelle 7) gemischt. Die Probe wurde für 20 min bei 15000 rpm (SS-34-Rotor, Sorvall RC-5B) zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 30 ml Equilibrierungspuffer (Tabelle 8) resuspendiert und für weitere 20 min zentrifugiert.

Tabelle 7: Lösungen für die Phytochromextraktion aus Bakterien

Basispuffer	Extraktionspuffer	Amoniumsulfatpuffer vor Nickel-NTA-Chromatographie	Amoniumsulfatpuffer nach Nickel-NTA-Chromatographie
50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM Tris
5 mM EDTA	5 mM EDTA	300 mM NaCl	5 mM EDTA
300 mM NaCl	300 mM NaCl	3300 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	300 mM NaCl
	1 µM TCEP (Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride)		3300 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
	100 µM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)		

Der pH-Wert von allen Puffern wurde mit HCl auf 7,8 eingestellt.

2.2.5.3. Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie

Eine 30 ml Nickel-NTA Säule (6 x 3 cm) (Qiagen GmbH, Deutschland) wurde nach Anleitung des Herstellers regeneriert und mit ca. 150 ml Equilibrierungspuffer (Tabelle 8) gespült. Anschließend wurde die Säule mit dem durch Ammoniumsulfat-Puffer (Tabelle 7) gefällten und anschließend in Equilibrierungspuffer (Tabelle 8) resuspendierten Zellaufschluss beladen. Nachdem der Zellaufschluss in das Säulenmaterial eingelaufen ist, wurde der Säulenausgang verschlossen und die beladene Säule für 5 min inkubiert. Anschließend wurde der Waschvorgang gestartet. Es wurde erwartet, dass das Protein über die 6 C-terminalen Histidine an die auf der Säule immobilisierten Ni²⁺-Ionen bindet. Um die Bindung des Phytochroms durch die Nickel-NTA Säule zu überprüfen, wurden die ersten 10 ml Elutionsvolumen (erster Durchbruch) nach

Beginn des Waschvorgangs separat aufgefangen und später auf den Phytochromgehalt hin überprüft. Die Säule wurde mit Equilibrierungspuffer solange gewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm $< 0,01$ war. Die Extinktion bei 280 nm wurde mit einem Eppendorf-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg) bestimmt. Zur Messung des Phytochromgehaltes im ersten Durchbruch wurde ein Aliquot von 700 μ l mit Biliverdin gemischt und ein UV/vis-Spektrum aufgenommen. Waren größere Mengen Phytochrom nachweisbar, so war das ein Hinweis darauf, dass dieses schlecht oder gar nicht an die Säule gebunden wurde. Nach Beendigung des Waschvorgangs wurde das an die Säule gebundene Phytochrom mit Elutionspuffer (Tabelle 8) von der Säule eluiert und in 15 ml Glasröhrchen fraktioniert, wobei eine Fraktion ein Volumen von 10 ml einnahm. Von allen Fraktionen wurde mit Hilfe eines Eppendorf-Photometers die Extinktion bei 280 nm oder die Proteingesamtkonzentration nach Bradford bestimmt. Zur Entfernung des Imidazols wurden die Proteinfractionen mit der höchsten OD₂₈₀ sofort nach der Elution vereinigt und durch eine Ammoniumsulfatfällung mit EDTA-haltigem Ammoniumsulfatpuffer (Tabelle 7) im Verhältnis 1:3 konzentriert und umgepuffert. Für die Bestimmung der resultierenden Proteinkonzentration wurde die OD bei 280 nm gemessen (für Agp1-FL 1 Extinktions Einheit (EE) = 0,84 mg/ml; für Agp1-M15 1 EE = 0,71 mg/ml; für Agp1-M15 Δ 9N 1 EE = 0,7 mg/ml; für Agp1-M15 Δ 18N 1 EE = 0,69 mg/ml; für Agp1-M20 1 EE = 1 mg/ml; für Agp1-M16 1 EE = 0,69 mg/ml; für Agp1-M17 1 EE = 0,68 mg/ml). Schließlich wurden in der Regel 10 bis 15 mg/ml Phytochrom in Basispuffer (Tabelle 7) mit 1 μ M TCEP eingesetzt. Das gereinigte Protein wurde auf 1,6 ml-Reaktionsgefäße verteilt, mit 1 ml Volumen pro Gefäß. Danach wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 70 °C gelagert.

Tabelle 8: Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie

Equilibrierungspuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
50 mM Tris	50 mM Tris	50 mM Tris
10 mM Imidazol	10 mM Imidazol	250 mM Imidazol
300 mM NaCl	300 mM NaCl	300 mM NaCl

Der pH wurde nach HCl-Zugabe bei 7,8 eingestellt.

2.2.5.4. Präparative Gel-Filtrationschromatographie

Für Zwecke der Kristallisation wurde Phytochrom aus der letzten Ammoniumsulfat-Fällung über Gelfiltration gereinigt. Dazu wurde eine 2,6 x 95 cm Glassäule mit Sephacryl S-300 HR

(Pharmacia Amersham) nach Anleitung des Herstellers gefüllt. Das nach Affinitäts-Chromatographie in Ammoniumsulfat gefällte Phytochrom wurde in 7-15 ml Basispuffer (Tabelle 7) aufgenommen und für 10 min bei 25000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Equilibrierung der Säule mit Laufpuffer 1 (Basispuffer, siehe Tabelle 7) wurde der Überstand aufgetragen. Der Durchlauf wurde mit einem an einen Y/t-Schreiber (Bio-Rad) angeschlossenen UV-Monitor (Bio-Rad Econo UV Monitor) verfolgt und auf einem Fraktionssammler (FRAC-100, Pharmacia Biotech) in Fraktionen a ca. 10 ml gesammelt. Die Fraktionen mit einer $OD_{280} > 1$ wurden vereinigt, mit EDTA-haltigem Ammoniumsulfat Puffer (Tabelle 7) gefällt, pelletiert, in Laufpuffer 2 (20 mM Tris/ Cl, 50 mM NaCl, pH 7,8) resuspendiert und erneut auf eine Sephacryl S-300 HR Säule mit den Abmessungen 1,5 x 90 cm aufgetragen. Es wurden diesmal 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Trennung erfolgte über Nacht in einer auf 4 °C gekühlten, mit grünem Sicherheitslicht ausgestatteten Klimakammer. In der Regel wurde nur die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration (10-20 mg/ml) verwendet.

2.2.6. Dokumentation der Extraktion und Reinigung

Nach wichtigen Schritten der Extraktion und Reinigung von Phytochrom (Tabelle 9) wurden Aliquots genommen, um die jeweilige Ausbeute und den Reinheitsgrad zu bestimmen. Nach dem French Press Aufschluss wurde zusätzlich der Phytochromgehalt in Pellet und Überstand verglichen. Das Pellet wurde dazu in Basispuffer (Tabelle 7) resuspendiert. Es wurde soviel Puffer verwendet, dass das Volumen des gelösten Pellets dem des Überstands entsprach. Für den Vergleich wurden beide Proben nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (Tabelle 5), 5 min Erhitzen und 20 min Zentrifugation bei 13000 rpm auf ein SDS-Gel aufgetragen. Sowohl für den French Press Aufschluss als auch für alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurde ein UV/vis Spektrum aufgenommen. Dazu wurde die Probe 1:10 mit Grundpuffer verdünnt und Biliverdin zugegeben. Ein Anstieg der Absorption bei 700 nm ist ein Hinweis dafür, dass die Probe Phytochrom enthält. Das Verhältnis der Absorption bei 700 nm zu dem bei 280 nm wird als SAR bezeichnet und ist ein Maß für die Reinheit der Probe. Je größer dieser Wert ist, desto höher ist der Reinheitsgrad der Probe. Die Reinheitsbestimmung über den SAR ist nur möglich, wenn kein freier Chromophor in der Probe enthalten ist. Zur Reinheitsbestimmung wurde ebenfalls SDS-PAGE durchgeführt. Für die Durchführung des SDS-PAGE wurden 100 µl Aliquot der entsprechenden Probe mit 50 µl 3x Probenpuffer gemischt. Die Elektrophorese-Gele wurden mit Coomassie (Tabelle 5) gefärbt und in Cellophan getrocknet. Indem Proteinproben von allen in Tabelle 9

dargestellten Reinigungsschritten auf ein Gel aufgetragen wurden, konnte ebenfalls die Zunahme der Reinheit des Phytochroms überprüft werden. Nach der zweiten Ammoniumsulfatfällung und nach der ersten und zweiten Gelsäule kann davon ausgegangen werden, dass das Phytochrom einen hohen Reinheitsgrad besitzt. Deshalb kann die Konzentration von Phytochrom zu diesem Zeitpunkt aus der OD bei 280 nm oder nach Bradford abgeschätzt werden.

Tabelle 9: Aliquots nach jeweiligem Reinigungsschritt für die Bestimmung von Ausbeute und Reinigung

Schritt	Probe	Volumen (µl)
Nach <i>French Pressure Cell</i>	Pellet	500
	Überstand	500
Nach erster Ammoniumsulfat Fällung	Pellet	500
	Überstand	500
Nach Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie	Durchlauf	500
	Waschlauf	500
	Eluat (Pool)	100
Nach zweiter Ammoniumsulfat Fällung	Überstand	100 µl
Nach erster Gelsäule	Eluat (Pool)	100 µl
Nach zweiter Gelsäule	Eluat	100 µl

2.2.7. Analytische Gelfiltration

Die Analytische Gelfiltration dient zur Untersuchung der Reinheit des Proteins und der Bestimmung des scheinbaren Molekulargewichtes. Für die Durchführung der Gelfiltration (GFC) wurde eine Superdex-Säule (Superdex 200 HR 10/30, Amersham/Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Säule war an eine peristaltische Pumpe (Pump P-500 Pharmacia Biotech, Deutschland) angeschlossen. Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris, 5 mM EDTA und 150 mM NaCl verwendet. Der pH wurde mit HCl auf 7,8 eingestellt. Die Lösung wurde filtriert (Membranfilter 0,6 µm, Schleicher & Schuell, Dassel Deutschland) und mit einer Vakuum-Saugflasche bei 80 mbar (CUC-2 Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) entgast. Die Flussrate wurde auf 30 ml/h gesetzt. Die Proteine wurden über eine 200 µl-Schleife injiziert und auf die Säule aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem UV/vis-Monitor (GAT LCD 501, Gamma Analysen Technik GmbH, Deutschland). Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen und mit

einem Y/t-Schreiber aufgezeichnet. Das System wurde mit den folgenden Proteinmarkern kalibriert.: Cytochrom C (12,4 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa), CEA (Chicken Egg Albumin) (45 kDa), BSA (Bovine Serum Albumin) (66 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), β -Amylase (299 kDa) und Apoferritin (443 kDa) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Das Durchbruchsvolumen V_0 der Säule, d.h. das Volumen des umgebenden Lösungsmittels wurde mit Blue Dextran 2000 (2 MDa) ermittelt. Alle Proteinmarker wurden bei Sigma, Deisenhofen, Deutschland gekauft. Das Elutionsvolumen einer gelösten Substanz V_e ist das erforderliche Volumen zur Elution einer aufgetragenen Substanz von der Säule. Das Verhalten einer gegebenen Substanz in einem definierten Gel wird durch das Verhältnis V_e/V_0 charakterisiert. Dieses Verhältnis wird als das relative Elutionsvolumen bezeichnet. Über einen großen Molekulargewichtsbereich besteht eine lineare Beziehung zwischen dem relativen Elutionsvolumen (V_e/V_0) einer Substanz und dem Logarithmus seiner molaren Masse. Mit Hilfe der oben genannten Proteinmarker mit bekannter molarer Masse kann ein Diagramm für eine bestimmte Gelfiltrationssäule aufgenommen werden. Die molare Masse einer unbekanntenen Substanz kann daher durch ihren V_e -Wert im Diagramm abgeschätzt werden.

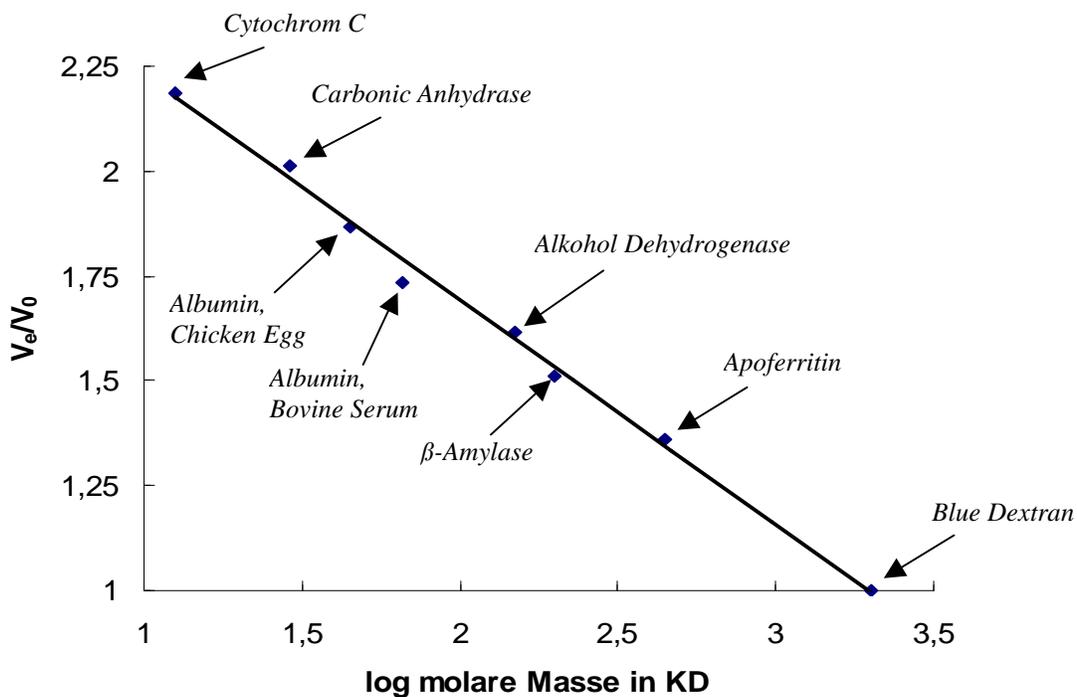


Abbildung 12: Korrelation zwischen dem relativen Elutionsvolumen verschiedener Proteinmarker auf der Superdex 200-Säule und dem Logarithmus ihrer molaren Masse (pH 7,5).

2.2.8. Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse wurde wie nach Nakazawa et al. (1993) beschrieben, durchgeführt. Die Proteine und Proteasen wurden mit Basispuffer (Tabelle 7) verdünnt. Als Stopppuffer wurde der 3x-Probenpuffer (Tabelle 5) verwendet. Für die Proteolyse wurden die Endopeptidasen Trypsin (TPCK-behandelt) (aus Rinderpankreas; Sigma, Deutschland) und die Endoproteinase Glu-C (V8) (aus *Staphylococcus aureus* Stamm V8 Typ XVII-B; Sigma) verwendet. Die Endoproteinase V8 wurde mit Aqua bidest auf eine Konzentration von 10 mg/ml verdünnt, aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Trypsin wurde pulverförmig bei -20°C aufbewahrt und kurz vor der Verwendung in Wasser gelöst und sofort eingesetzt.

Gereinigtes Apo-Phytochrom wurde mit Basispuffer (Tabelle 7) auf 1 mg/ml verdünnt und für 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteolyse wurde mit Apo-Phytochrom von Agp1, M15, M20, M15 Δ 18N und M15 Δ 9N, mit im Dunkeln assembliertem BV-Agp1, BV-M15, BV-M20, BV-M15 Δ 18N, BV-M15 Δ 9N, 18ETBV-Agp1 und mit Hellrot-Licht (68 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; λ_{max} 654 nm; 10 min Bestrahlungsdauer) bestrahltem Phytochrom (siehe oben genannte BV und 18EtBV assemblierte Phytochrome) durchgeführt. Mit den synthetischen Chromophoren 15Za, 15Zs, 15Ea und 15Es assembliertes Agp1 wurde ebenfalls durch Limitierte Proteolyse untersucht. Die Enzyme wurden kurz vor Verwendung frisch verdünnt und der Proteinlösung zugesetzt. Die Endkonzentration der Proteasen betrug 0,03 mg/ml bzw. 0,6 $\mu\text{g/ml}$ für Trypsin und 0,01 mg/ml für V8. Die Proben und Enzyme wurden bis zur Bestrahlung und zum Verdau ständig auf Eis gelagert. Der Verdau wurde bei 18°C unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt. Für lange Inkubationszeiten wurden die Proben in eine Dunkelbox gestellt oder auf eine Hellrotlichtquelle gelegt. Der Trypsinverdau wurde nach 30 min, der V8-Verdau nach 3 h mit dem gleichen Volumen (entsprechend des Reaktionsvolumens) 3x Probenpuffer (Tabelle 5) abgestoppt. Anschließend wurden die Proben zusammen mit HMW- und LMW-Markern auf ein SDS-PAGE oder NuPAGE-Gel aufgetragen.

2.2.9. Massenspektrometrische Untersuchungen

Die Sequenzanalyse der Proteolysefragmente durch Massenspektrometrie wurde von Dr. Ran Rosen (Department of Molecular Microbiology and Biotechnology; Tel Aviv University, Israel) durchgeführt und ist in (Rosen et al, 2004) beschrieben.

Die Coomassie-gefärbten NuPAGE - Gele mit den proteolytischen Fragmenten wurden zwei Mal für 1h mit Aqua bidest gespült. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten, in gekennzeichnete Eppendorfgeläße überführt und zur Analyse nach Israel geschickt, wo die Probenaufbereitung und Identifizierung mit LC/MS/MS erfolgte.

Dazu wurden die Gelstücke in einer Lösung mit 200 mM NH_4HCO_3 und 50% Acetonitril für 30 min bei 37°C gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke in einer SpeedVac für 30 min getrocknet. Die Gelstücke wurden dann in einer Trypsinlösung (Promega, Madison, WI, USA) rehydriert und die Proteine für 16 h bei 37°C verdaut. Die Peptide wurden durch Diffusion in Wasser aus dem Gel extrahiert. Anschließend erfolgte die Identifizierung durch LC/MS/MS unter Verwendung einer UltimateTM nano HPLC (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) und einem Qstar Pulsar Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.2.10. „Crosslinking“

Das „Crosslinking“ erfolgte mit dem „crosslinker“ Glutaraldehyd (Sigma, Deutschland). Glutaraldehyd wurde bei -20°C gelagert und kurz vor Experimentbeginn verdünnt und zugesetzt. Das Protein und Glutaraldehyd wurden in Phosphat-Puffer (Tabelle 10) gelöst.

Tabelle 10: Lösungen für die Herstellung von Phosphatpuffer. Beide Lösungen werden so gemischt, dass sich der pH-Wert bei 7,8 einstellt.

Di-Na-hydrogenphosphat-Puffer	Na-di-hydrogenphosphat-Puffer
20 mM Di-Na-hydrogenphosphat	20 mM Na-di-hydrogenphosphat
(Na_2HPO_4)	(NaH_2PO_4)
1 mM EDTA	1 mM EDTA
5 % Glycerin	5 % Glycerin

Das „crosslinking“ wurde für Agp1, M15, M20, M15 Δ 18N und M15 Δ 9N in der jeweils Apo-, Pr- und Pfr-Form durchgeführt.

Apo- und Holophytochrom wurden auf Konzentrationen von 1; 0,5; 0,25; 0,13; 0,06 und 0,03 mg/ml verdünnt und für 20 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Glutaraldehyd wurde in einer Endkonzentration von 5mM verwendet. Vor der Zugabe von Glutaraldehyd wurde ein Teil des im Dunkeln mit Biliverdin assemblierten Phytochromes mit Hellrotlicht ($68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}}654 \text{ nm}$) bestrahlt. Die Inkubation mit Glutaraldehyd wurde im Dunkeln bei 18°C durchgeführt. Ein Teil der Holoprotein-Proben wurde in Dunkelboxen aufbewahrt, ein anderer

Teil während der gesamten Inkubationszeit mit Hellrotlicht bestrahlt. Das „crosslinking“ wurde nach 3 h mit SDS-Probenpuffer (Tabelle 5) abgestoppt. Die Proben wurden für 20 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und auf NuPAGE-Gele aufgetragen. Die Größe der Proteinbanden konnte anschließend mit Hilfe von LMW und HMW Markern bestimmt werden.

2.2.11. Phosphorylierung

Die Autophosphorylierung wurde nach Yeh et al. (1997) durchgeführt. Die Konzentrationen aller Peptide wurden spektral bei 280 nm mit einem Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Das Protein wurde mit Basispuffer (Tabelle 7) verdünnt. Die Autophosphorylierung wurde für Agp1-Apoprotein und nach Assemblierung mit verschiedenen Chromophoren untersucht. Agp1 (10 μ M) wurde mit 20 μ M BV, 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es assembliert. Die Phosphorylierung von BV-Agp1 und 18EtBV-Agp1 wurde nach Assemblierung im Dunkeln (Pr) und nach Rotlichtbestrahlung (Pfr) untersucht. Für die Rotlichtbestrahlung wurde eine Leuchtdiode (Emissionsmaximum: 654 nm) verwendet. 5 μ l Phytochrom wurden zu 15 μ l Phosphorylierungspuffer (Mastermix mit 0,1 MBq [γ -³²P]ATP Endkonzentration) (Tabelle 11) gegeben und für 30 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 10 μ l 3 x Probenpuffer (Tabelle 5) gestoppt. Die Peptide wurden in einem SDS-Gel getrennt. HMW, LMW oder PMS wurden als Marker verwendet. Die Phosphorylierung erfolgte unter grünem Sicherheitslicht. Die Proben wurden bis zur Bestrahlung auf Eis gelagert. Die elektrophoretisch aufgetrennten Peptide wurden auf eine 8 x 6 cm große PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) mit Hilfe einer Blott-Apparatur (OWL Separation Systems, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) transferiert. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung in 100 % Methanol getaucht und in TGM-Puffer (Tabelle 14) equilibriert. Parallel dazu wurden vier gleichgroße Filterpapierstücke (Millipore, Deutschland) mit TGM-Puffer (Tabelle 14) befeuchtet. Die Anordnung der verschiedenen Komponenten ist in Abbildung 13 dargestellt. Nach ca. 30 min Transfer bei 700 mA wurde die Membran bei 30 °C getrocknet und auf eine 20 x 40 cm große Phosphoimager-Platte (Imagin Plate BAS-MP 2040S, Fujifilm) gelegt. Für die Detektion eines radioaktiven Signals wurde ein von Prof. Dr. Regina Hengge (Abteilung Mikrobiologie, Freie Universität, Berlin) zur Verfügung gestellter *Fluorescent image analyzer* (FLA 2000, Fuji) verwendet. Die Signalstärke wurde durch entsprechende Software quantifiziert.

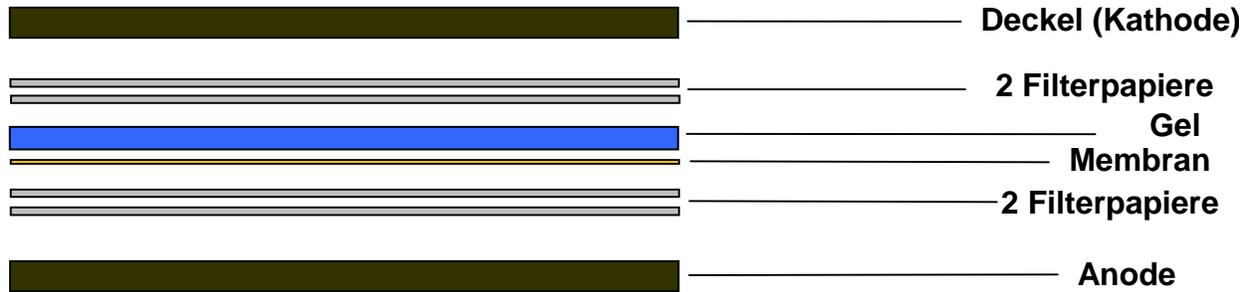


Abbildung 13: Reihenfolge der verschiedenen Schichten für *Western-Blotting*. Um die Akkumulation von Luftblasen zu vermeiden, wurde TGM-Puffer zwischen die Schichten gegeben.

Tabelle 14: Lösungen für das *Blotting*

SDS-PAGE-running-Puffer	TGM-Puffer
50 mM Tris	400 ml SDS-PAGE-running-Puffer
348 mM Glycin	100 ml Methanol
1 mM EDTA	
0,1 % SDS	