

4 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien stammten entweder von Karl Roth (Karlsruhe) oder von Sigma (München). Isotopenangereicherte Verbindungen wurden von Cambridge Isotopes (CIL, MA, USA) bezogen, markierte Vollmedien waren von Silantes (München). Als Rot- und Dunkelrotlichtquellen dienten Leuchtdioden (Light emitting diodes, LEDs). Die Rotlichtquelle hatte ein Emissionsmaximum bei 654 nm (im Text mit R bezeichnet), die Dunkelrotquelle emittierte maximal bei 730 nm (im Text mit FR bezeichnet). Als Grünlichtquellen dienten ebenfalls LEDs mit einem Emissionsmaximum bei 505 nm. Absorptionsspektren wurden mit einem Beckmann DU520- oder einem PerkinElmer lambda 9 UV/vis-Spektrometer aufgenommen. Alle weiteren Geräte und Hilfsmittel wurden verwendet wie vorgefunden oder sind angegeben.

4.1 Proteinherstellung und Reinigung

4.1.1 Expressionssysteme

Für die hier vorgestellten Experimente wurde ausschließlich Cph1 Δ 2 verwendet. Im Gegensatz zum Vollängenprotein weist dieses Protein eine wesentlich bessere Löslichkeit auf. Das für die Expression von apo-Cph1 Δ 2 verwendete Plasmid p929.5 wurde von Jon Hughes (JLU Gießen) kloniert und zur Verfügung gestellt. Es basiert auf dem pQE12 Expressionvektor (Qiagen). Das Genprodukt trägt eine C-terminale Erweiterung von 6 Histidinen, um eine Aufreinigung zu erleichtern.

Folgende Stämme von *E.coli* fanden Verwendung:

- X11-blue (Stratagene)
- M15 (Qiagen), mit dem Helferplasmid pREP4, das für das *lagI^q*-Gen kodiert
- B121-DE3 (Novagen), mit dem Helferplasmid pSE111, das für die *laqI^q*- und *Arg^U*-Gene kodiert.

Das Plasmid pSE111 wurde von Eberhard Scherzinger kloniert und von Konrad Büssow zur Verfügung gestellt.

Für die Expression in X11-blue wurde dem Medium Ampicillin (100 μ g/mL), für die Expression in M15 und B121-DE3 wurden, aufgrund der vorhandenen Helferplasmide, jeweils Ampicillin (100 μ g/mL) und Kanamycin (25 μ g/mL) zugegeben.

M15 erwies sich in den erzielten Ausbeuten an Cph1Δ2 als nicht befriedigend und wurde nicht weiter verwendet. X11-blue erbrachte routinemäßig ca. 20 mg Cph1Δ2/L Medium, jedoch nur etwa 3 mg Cph1Δ2/L Medium in deuteriertem Vollmedium. Dies gilt auch im Fall der ²H/¹⁵N- und ²H/¹³C/¹⁵N-markierten Vollmedien. Aufgrund des extrem langsamen Wachstums in unmarkiertem Minimalmedium wurde X11-blue nicht als Expressionsstamm in Minimalmedium verwendet. B121 erbrachte ca. 80 mg Cph1Δ2/L Medium, in deuteriertem Minimalmedium etwa 20 mg Cph1Δ2/L Medium, deuteriertes Vollmedium wurde mit diesem Stamm nicht getestet. Alle Ausbeuteangaben beziehen sich auf Cph1Δ2 nach Größenausschlußchromatographie mit einem spezifischen Absorptionsverhältnis > 1. Dieser Parameter, der in der Literatur als SAR bezeichnet wird (SAR, specific absorbance ratio), ist definiert als das Verhältnis des langwelligen Absorptionsmaximums um 660 nm zur Absorption bei 280 nm in der Pr-Form.

4.1.2 Medien und Puffer

Für die Expression von unmarkiertem apo-Cph1Δ2 wurde *rich broth* (RB-Medium) verwendet (Sambrook et al., 2001), für die Expression von ²H, ²H/¹⁵N und ²H/¹⁵N/¹³C markiertem Apoprotein wurde entsprechend markiertes Vollmedium der Firma Silantes (München) verwendet. Weiterhin wurde für die Expression von ²H-markiertem Apoprotein deuteriertes M9-Medium (Sambrook et al., 2001) verwendet. Als Kohlenstoffquelle dienten Glycerol bzw. perdeuteriertes Glycerol, Endkonzentration 4g/L.

Folgende Puffer fanden im Verlauf der Aufreinigung und für die verschiedenen durchgeführten Untersuchungen Verwendung:

Grundpuffer	Puffer E
50 mM Tris	50 mM Tris
300 mM NaCl	300 mM NaCl
5 mM EDTA	250 mM Imidazol
Puffer B	NMR-Puffer
50 mM Tris	50 mM Na ₂ PO ₄
300 mM NaCl	1 mM EDTA
40 mM Imidazol	

Ammoniumsulfat- (AmS-) Puffer

3.3 M $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$

5 mM EDTA

50 mM Tris

Der pH der Puffer war immer 7.8.

4.1.3 Proteinexpression und Reinigung

Die Expression und Aufreinigung orientiert sich an der in (Lamparter et al., 2001) gegebenen und von Norbert Michael (Pflanzenphysiologie, FU Berlin) optimierten Vorschrift für Cph1 und Cph1 Δ 2. Alle Schritte wurden bei 0-10 °C in einer Klimakammer oder auf Eis durchgeführt. Die Arbeitsschritte, die mit Holoprotein zu tun hatten, wurden unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt. Alle chromatographischen Säulen wurden ohne Pumpe mit umweltfreundlicher Schwerkraft betrieben.

Für unmarkiertes Protein wurden aus 3 mL einer Übernachtskultur 50 mL Vorkultur hergestellt ($\text{OD}_{600} \sim 0.8$, Wachstum bei 30 °C). 1L RB-Medium wurde mit ca. 20 mL Vorkultur angeimpft und gleichmäßig auf 3 Erlenmeyerkolben (Kolbenvolumen 2L) verteilt und bei 30 °C geschüttelt, bis $\text{OD}_{600} \sim 0.4$. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Kolben für ca. 15 min auf Eis gestellt und die Expression mit 20 μM IPTG (Endkonzentration) induziert. Daraufhin wurde die Bakterienkultur ca. 18 h bei 18 °C geschüttelt (200 U/min), die Zellen durch Zentrifugation (10 000 \times g, 4 °C, 10 Minuten) geerntet und in Grundpuffer, 1 mM DTT, 10 μL Benzonase (Novagen), eine proteasefreie Nuclease, resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mit 2 Passagen durch eine *French-pressure cell*. Zelltrümmer und hochmolekulare Aggregate wurden von der löslichen Fraktion mittels Zentrifugation (75 000 \times g, 4 °C, 30 Minuten) getrennt, der Überstand abgenommen und auf Eis gestellt. Zu diesem Zeitpunkt wurde das entsprechend markierte PCB in methanolischer Lösung (s. Abschnitt 4.2) zugegeben, und zwar solange, bis ein deutlicher Überschuss an freiem PCB erkennbar war (gemessen im Wellenlängenbereich 500-800 nm) und sich das Differenzspektrum (Pr)-(PrPfr) nicht mehr veränderte. Dieses Vorgehen erschien geeignet, eine vollständige Absättigung von löslichem apo-Cph1 Δ 2 mit PCB zu erreichen. Nachdem sämtliches Apoprotein abgesättigt erschien, wurden die löslichen Proteine durch Zugabe von AmS-Puffer im Volumenverhältnis 1:1 gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (75 000 \times g, 4 °C, 30 Minuten) wurde das Pellet in Puffer B gelöst, erneut zentrifugiert (75 000 \times g, 4 °C, 30 Minuten) und danach auf eine entsprechend äquilibrierte Ni-NTA-Agarose Säule gegeben (Qiagen). Der Überstand der AmS-Fällung wurde jeweils noch durch Messung

eines Differenzspektrums nach R/FR-Bestrahlung auf gelöstes Cph1Δ2 getestet, gegebenenfalls wurde noch festes AmS zugegeben, bis kein gelöstes Cph1Δ2 mehr nachweisbar war. Das auf der Ni-NTA-Säule gebundene Protein wurde solange mit Puffer B gewaschen, bis über einen Zeitraum von 30 Minuten keine signifikante Änderung der Absorption des Eluats bei 280 nm mehr zu detektieren war. Das Protein wurde dann mit Puffer E eluiert und hatte zu diesem Zeitpunkt ein SAR von 0.7-1.1. Danach erfolgte eine weitere Fällung des Proteins durch AmS-Puffer, nach Zentrifugation (75 000 x g, 4 °C, 30 Minuten) wurde das Pellet in einem möglichst kleinen Volumen von Grundpuffer wieder gelöst, erneut zentrifugiert, und der Überstand auf eine SEC-Säule (C26/100, Sephacryl S-300 HR) (Pharmacia/GE) gegeben und mit Grundpuffer eluiert. Das auf diesem Wege gereinigte Cph1Δ2 hatte routinemäßig ein SAR von > 1.1, der maximal erreichte Wert war 1.27. Dies deckt sich mit den Erfahrungen von Norbert Michael und Jon Hughes (persönl. Mitteilungen, maximaler SAR von 1.3), und scheint der maximal erreichbare Wert zu sein.

Für die Expression von deuteriertem Protein wurde diese Vorschrift folgendermaßen modifiziert:

- Markiertes Vollmedium: die Vorkultur wurde in RB-Medium durchgeführt, die Zellen geerntet und in deuteriertem Medium resuspendiert. Im weiteren wurde verfahren wie oben angegeben, die Expressionszeit wurde auf 48 Stunden angehoben.
- M9-Medium: die Vorkultur und das Wachstum der Zellen in Erlenmeyerkolben erfolgte in H₂O-M9-Medium. Nachdem die Zellen die entsprechende OD₆₀₀ erreicht hatten, wurden sie geerntet, mit D₂O-M9-Medium gewaschen und im äquivalenten Volumen von D₂O-M9-Medium resuspendiert. Vor der Induktion wurden die Zellen noch 30 Minuten bei 18 °C geschüttelt. Die Expressionszeit wurde auf 60 Stunden angehoben.

4.2 Chromophorherstellung und Reinigung

Für die Herstellung von isotoopenmarkiertem (¹⁵N und ¹³C/¹⁵N) Phycocyanobilin (PCB) wurde die Blaualge *Synechocystis* sp. PCC6803 gewählt und unter photoautotrophen Bedingungen kultiviert. Eine axenische Startkultur wurde dankenswerterweise von Annegret Wilde (HU Berlin) zur Verfügung gestellt. Das entsprechend markierte PCB befindet sich in den Phycobilisomen (PBS) der Zellen. Um die PBS von assoziierten Thylakoidmembranfragmenten zu reinigen, wurde eine Sucrosedichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Das kovalent über eine Thioetherbindung an die Proteinmatrix gebundene PCB wurde dann durch Methanolyse in einem Soxhletextraktor abgespalten.

4.2.1 Photoautotrophe Medien

Das Standardmedium für die Kultur photoautotropher Blaualgen ist BG11 (Castenholz, 1988), das für die jeweiligen Isotopenmarkierungen modifiziert wurde (Tab. 9).

Substanz	Unmarkiert	¹⁵ N	¹³ C/ ¹⁵ N
NaNO ₃	17.65	17.65 ^B (Na ¹⁵ NO ₃)	4.41 (Na ¹⁵ NO ₃)
K ₂ HPO ₄	0.227	0.227	0.227
MgSO ₄	0.304	0.304	0.304
CaCl ₂	0.245	0.245	0.245
Zitronensäure	0.031	0.031	0.031
Eisen[III]ammonium-Zitrat ^A	6 mg	6 mg	6 mg
Na ₂ -EDTA	0.0027	0.0027	0.0027
NaHCO ₃	-	-	47.6 (NaH ¹³ CO ₃)
CHES	-	-	60
Spurenelementlösung	1 mL	1 mL	1 mL
Spurenelementlösung (Stamm, 1L)			
H ₃ BO ₃	46.26	46.26	46.26
MnCl ₂	9.15	9.15	9.15
ZnSO ₄	0.772	0.772	0.772
Na ₂ MoO ₄	1.78	1.78	1.78
CuSO ₄	0.316	0.316	0.316
Co(NO ₃) ₂	0.17	0.17	0.17

Tab. 9 Mengenangaben für je 1L BG11-Medium. Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich um millimolare Konzentrationen.

^A undefinierte Stöchiometrie, daher keine molaren Angaben möglich

^B für anfängliche Experimente wurde Na¹⁵NO₃, wie in der Originalvorschrift angegeben, gegen K¹⁵NO₃ ausgetauscht, da diese Substanz schon im Labor vorhanden war. Um teilweise die fehlenden Na⁺-Ionen zu ersetzen, wurde K₂HPO₄ (Originalvorschrift) gegen Na₂HPO₄ in gleicher Menge ausgetauscht.

Die Kulturen wurden in Standardlaborflaschen (0.2-5L Volumen) bei RT (24 ± 3 °C) gehalten und kontinuierlich mit weißem Licht bestrahlt (Sylvania GroLux, Osram, München). Unmarkierte und ¹⁵N-Kulturen wurden kontinuierlich mit steriler Luft durchblasen. Dies wurde durch eine

Standardlaborpumpe erreicht (Flußrate 6 L/min). Zwischen Pumpe und Flasche wurde noch ein 0.22 µM-Filter mit PTFE-Membran geschaltet (Acro 50, PALL). Zwischen Pumpe und Filter wurde die Luft durch eine Gaswaschflasche mit destilliertem Wasser geleitet. Jeweils 10-15 Volumen-% einer gesättigten Kultur des passenden Markierungsmusters wurden als Inokkulum für frisches Medium verwendet.

Unmarkiertes und ¹⁵N-markiertes Medium wurde ohne Anpassung des pH-Wertes vorbereitet und direkt in den verwendeten Kulturflaschen autoklaviert.

Für doppelt ¹³C¹⁵N-markiertes Medium wurde CHES dem Medium als pH-wirksame, metabolisch inerte Komponente zugefügt. Eine wäßrige CHES-Lösung hat einen pH-Wert von ca. 4. Daher wurden erst alle in Tab. 9 angegebenen Komponenten außer dem NaH¹³CO₃ in ca. 80% des Endvolumens gelöst und der pH mit NaOH auf 8 angehoben. Danach wurde das NaH¹³CO₃ zugegeben (der pH stieg dabei geringfügig auf ca. 8.2), auf das Endvolumen aufgefüllt, und das Medium direkt in vorher autoklavierte Kulturflaschen sterilfiltriert.

4.3 Aufreinigung von PBS und Isolierung von PCB

Die Aufreinigung von PBS erfolgte nach Standardprotokollen (Glazer, 1988). Die Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt (10 000 × g, 18 °C, 10 Minuten) und in Hochsalzpuffer (0.75 KiPO₄, pH 7) aufgenommen. Um eine Desintegration der PBS zu vermeiden, wurde bei Temperaturen ≥ 18 °C gearbeitet. Der Zellaufschluß erfolgte mit 2 Passagen durch eine *French-pressure cell*. Zelltrümmer, hochmolekulare Aggregate und Membranfragmente wurden von der löslichen Fraktion mittels Zentrifugation (75 000 × g, 18 °C, 30 Minuten) getrennt und der Überstand abgenommen. Um evtl. noch anhaftende Thylakoidmembranfragmente abzutrennen, wurde Triton X-100 im Volumenverhältnis 1/30 zugegeben und 1 Stunde bei RT geschüttelt. Diese Lösung wurde dann auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten (1.5/1/0.75/0.5 M Sucrose in Hochsalzpuffer, Volumenverhältnisse 1/1/1.43/1) geschichtet und 18 Stunden bei 18 °C und 110 000 × g in einem *swing-out* Rotor zentrifugiert. PBS reicherten sich in der 1 M Sucrosefraktion an. Auf diesem Wege gereinigte PBS hatten routinemäßig ein Verhältnis $A_{622}/A_{280} > 3$. Die vereinigten PBS-Fractionen wurden mit H₂O in einem Ultrafiltrationsmodul salzfrei gewaschen, in einem kleinen Volumen H₂O gelöst und anschließend lyophilisiert. In dieser Form wurden die erhaltenen Proben auch gelagert. Die lyophilisierten Proben wurden bei Bedarf in eine Soxhletthülse gegeben und mit Methanol in einem Soxhletextraktor für 24 Stunden extrahiert. Das so erhaltene PCB wurde an einem

Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und anschließend in einem kleinen Volumen Methanol wieder aufgenommen und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht länger als 3 Monate gelagert.

Eine weitere Charakterisierung des erhaltenen PCBs wurde dankenswerterweise im Arbeitskreis von Wolfgang Gärtner (MPI f. Bioanorganische Chemie, Mülheim) mittels HPLC und ESI-MS nach publizierten Vorschriften durchgeführt (Lindner et al., 2000).

Wahlweise wurde für die Präparation von unmarkiertem PCB auch gefriergetrocknete Zellen von *Spirulina* sp. (Sigma) verwendet. Dabei wurden die Zellen solange mit kaltem Methanol gewaschen, bis sie kein Chlorophyll mehr enthielten, erkennbar an einer schwach gelblichen Färbung der Waschlösung, im Gegensatz zur starken Grünfärbung zu Anfang des Waschvorgangs. Anschließend wurden das PCB durch Methanolyse wie oben beschrieben freigesetzt.

4.4 Probenpräparation für NMR

Passende Fraktionen nach SEC wurden gesammelt und mit Ultrafiltration auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert. Hierzu wurden Vivaspin-Konzentratoren (Millipore) verwendet, die vor Gebrauch dreimal mit dem maximal möglichen Volumen an H_2O gewaschen wurden. Dies war notwendig, um in der Membran enthaltenes Glyzerin zu entfernen, das sowohl bei NMR- als auch bei FT-RR-Messungen störende Signale verursacht. Grundpuffer wurde gegen NMR-Puffer in $\text{H}_2\text{O}/10$ Volumen-% D_2O oder D_2O mit einer PD10-Säule (Pharmacia/GE) nach Herstellervorschrift ausgetauscht. Dieser Prozess wurde zweimal durchgeführt, um eine möglichst vollständige Abtrennung unerwünschter Pufferbestandteile zu erreichen. Danach wurde die Lösung auf das gewünschte Endvolumen ($200\text{-}500\text{ }\mu\text{L}$ für NMR-Röhrchen mit 5 mm , $3\text{-}4\text{ mL}$ für NMR-Röhrchen mit 10 mm Innendurchmesser) eingeeengt und in das entsprechende Röhrchen gefüllt. Die Proben hatten standardmäßig eine Konzentration von $> 20\text{ mg/mL}$ ($> 330\text{ }\mu\text{M}$) mit einem SAR von > 1 . Proteinkonzentrationen wurden UV-spektroskopisch unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten bei 280 nm von $59\text{ mM}^{-1}\text{ x cm}^{-1}$ gemessen. Extinktionskoeffizienten bei anderen Wellenlängen wurden relativ zu diesem Wert bestimmt.

Aufgrund der spektralen Überlappung von Pr und Pfr ist es nicht möglich, durch Bestrahlung allein eine reine Pfr-Probe zu erhalten. Das maximal erreichbare Verhältnis der beiden Formen bei Bestrahlung im Absorptionsmaximum von Pr beträgt 30% Pr und 70% Pfr (photostationäres Gleichgewicht, Lamparter et al., 1997). Bei Bestrahlung im Absorptionsmaximum von Pfr verbleiben jedoch lediglich ca. 3% der gesamten Proteinmenge im Pfr-Zustand. Bei Proteinlösungen mit den für NMR-Messungen notwendigen Konzentrationen ist die optische Dichte im Absorptionsmaximum von

Pr so hoch, daß es nicht möglich ist, mit den zur Verfügung stehenden Lichtquellen eine ausreichende Eindringtiefe des phototransformierenden Lichtes zu erreichen (bezogen auf eine Schichtdicke von 5 mm, dem Innendurchmesser der am häufigsten verwendeten NMR-Röhrchen). Um in Proben dieser Konzentration eine vollständige Phototransformation zu erreichen, wurden verschiedene Strategien gewählt: die entsprechende Probe wurde mit Hilfe einer gasdichten Hamiltonspritze in ein ausreichend langes Glasröhrchen mit 1 mm Innendurchmesser gesaugt, welches dann rundum mit Rotlicht bestrahlt wurde, solange bis die Probe im photostationären Gleichgewicht war. Bei Verwendung von Shigemi-Röhrchen wurde der Stempel mehrere Male langsam bis zum Boden des Röhrchens gedrückt und wieder nach oben gezogen. Dieser Prozeß wurde ca. 10-mal wiederholt, dabei wurde der Bereich um den Stempel mit Rotlicht bestrahlt. Die Schichtdicke zwischen Stempel und Röhrchenwand ist dünn genug, um eine vollständige Durchstrahlung und damit Phototransformation zu erreichen. 10 mm-Röhrchen wurden horizontal in einen langsam rotierenden (ca. 10 U/min) Labormischer eingespannt und rundum für ca. 60 Minuten mit Rotlicht bestrahlt. Durch die horizontale Lage des Röhrchens wird eine geringe Schichtdicke der Lösung erreicht, die konstante Rotation durchmischt die Probe.

Die Einstellung des Photogleichgewichtes wurde überprüft, indem ein Aliquot der zu transformierenden Probe 1:100 ohne weitere Rotlichteinstrahlung verdünnt wurde. Von dieser Probe wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen (500-800 nm). Dann wurde eine Minute mit Rotlicht bestrahlt und erneut ein Absorptionsspektrum gemessen. War zwischen beiden Spektren keine Änderungen erkennbar, wurde davon ausgegangen, daß die konzentrierte Probe komplett phototransformiert war.

4.5 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

AUZ-Experimente wurden mit einer BeckmannCoulter XI-I analytischen Ultrazentrifuge und einem TI-60 4-Loch Rotor durchgeführt. Die Stromversorgung des Interferenzlaser wurde manuell unterbrochen, da sich gezeigt hatte, daß der Laser beim Starten der Maschine kurz angeschaltet wird und er aufgrund seiner Emissionswellenlänge (675 nm) die vorgegebenen Verhältnisse Pr/Pfr auf nicht kontrollierbare Art verändert hätte. Konzentrationsgradienten wurden mit der Absorptionsoptik bei geeigneten Wellenlängen im Bereich zwischen 240 nm und 350 nm detektiert. Dabei wurden für jeden Meßpunkt 10 Einzelmessungen durchgeführt und gemittelt, der radiale Abstand zwischen zwei Meßpunkten betrug 0.001 cm. Für die Messung von Wellenlängenspektren wurden 100 Einzelmessungen pro Meßpunkt gemittelt. Sedimentationsgleichgewichtsexperimente wurden bei Geschwindigkeiten im Bereich zwischen 8 000 und 20 000 U/min durchgeführt. Für die Bestimmung

von Assoziationskoeffizienten wurden 3 verschiedene Geschwindigkeiten gewählt (als Funktion der erwarteten apparenten Molekulargewichte, typischerweise jedoch 8 000/12 000/16 000 U/min), um die statistische Sicherheit der zu bestimmenden exponentiellen Parameter in einer globalen Kurvenanpassung zu erhöhen. Die Einstellung eines stationären Konzentrationsgradienten bei konstanter Geschwindigkeit (apparentes Sedimentationsgleichgewicht) wurde überprüft, indem aufeinanderfolgende Konzentrationsgradienten (jeweils 2 Stunden auseinander) miteinander verglichen wurden. Hierzu wurde das Programm MATCH verwendet. Es wurde davon ausgegangen, daß ein gemessener Konzentrationsgradient stationär war, wenn über einen Zeitraum von mindestens sechs Stunden keine systematischen Veränderungen der Konzentrationsverteilung detektierbar waren. Für die Analyse der erhaltenen Konzentrationsgradienten wurden die Programme UltraScan6.0 und NONLIN verwendet, für Analysen mit der M^* -Funktion (Creeth & Harding, 1982) wurde ein Skript für Origin6.0 verwendet, das von Dr. K. Schilling (Nanolytics, Dallgow, Deutschland) verfaßt und dankenswerterweise bereitgestellt wurde.

Alle speziell für die Analyse von AUZ-Daten verwendeten Programme sind frei erhältlich über

<http://www.bbri.org/RASMB/rasmb.html>

<http://analyticalultracentrifugation.com>

<http://ultrascan.biochem.northwestern.edu/>

<http://www.biotech.uconn.edu/auf/>

(Stand November 2005)

Die jeweiligen Experimente wurden in 50 mM Tris, pH 7.8, 5 mM EDTA und 0/150/300 mM NaCl durchgeführt, bei Temperaturen von 10/20/30 °C, wie angegeben. Die Dichte des Puffers bei den entsprechenden Bedingungen wurde mit Hilfe des Programms SEDNTERP berechnet. Das partielle spezifische Volumen (\bar{v}) von Cph1 Δ 2 wurde aus der Sequenz berechnet (\bar{v} von apo-Cph1 Δ 2: 0.7393 mL/g, M_r = 58699 Da), das \bar{v} des Chromophors wurde durch Addition publizierter Dichteinkremente der entsprechenden chemischen Gruppen berechnet (Hoiland, 1986). Der gefundene Wert für PCB war 0.8194 mL/g mit einem M_r = 585 Da. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem von (Mayer et al., 2002) auf gleichem Wege gefundenen Wert für Häm von 0.82 mL/g. Daraus ergab sich das \bar{v} des Holoproteins durch Addition der Massenanteile von Apoprotein und Chromophor zu 0.74 mL/g.

Für Experimente, die mit Hilfe der M^* -Funktion analysiert werden sollten, wurden 150 μL Proteinlösung in 2-Sektor Mittelstücke gefüllt. Es wurde keine unabhängige Bestimmung der Basislinie vorgenommen und angenommen, daß diese den Wert 0 für alle verwendeten Gradienten hatte.

Lösungen, die lediglich eine makromolekulare Komponente (Pr oder Pfr) enthielten, wurden in drei verschiedene Anfangskonzentrationen (1:1/1:2/1:10 Verdünnung, $c_{\text{Stock}} \cong 1 \text{ mg/mL}$) eingesetzt, die bei jeweils drei verschiedenen Wellenlängen detektiert wurden. Daten mit einer OD > 1.2 wurden von der Analyse ausgeschlossen. Für Lösungen, die nur Pr enthielten, wurden 120 μL Füllvolumen in 6-Sektor Mittelstücken verwendet, für Lösungen, die nur Pfr enthielten, 150 μL in 2-Sektor Mittelstücken. Diese Experimente wurden mit Hilfe des Programms UltraScan6.0 analysiert. Die Relevanz der bestimmten Parameter wurde durch Monte-Carlo-Simulationen überprüft (Straume und Johnson, 1992). Dabei wurden mindestens 5 000 Simulationen durchgeführt.

Um Lösungen zu analysieren, die Pr und Pfr enthielten, wurden je 120 μL einer nur Pr enthaltenden Lösung (1:1/1:2/1:10 Verdünnung, $c_{\text{Stock}} \cong 1 \text{ mg/mL}$) in ein 6-Sektor Mittelstück gefüllt. Zwei andere Zellen wurden mit zwei verschiedenen Verdünnungen (1:1/1:5) derselben Stammlösung befüllt, die jeweils steigende Volumenanteile (0.3/0.6/1) einer vollständig phototransformierten Lösung enthielten. Auch hier war das Füllvolumen 120 μL . Die jeweiligen Konzentrationsgradienten wurden an den isobestischen Punkten für Pr und Pfr bei 291 nm und 323 nm detektiert. Das Verhältnis ihrer Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{291}/\epsilon_{323} \cong 5$. Mit diesem Protokoll konnte die Gesamtkonzentration der Pfr-Form in den verschiedenen Lösung über mehr als eine Größenordnung variiert werden.

Für die Kurvenanpassung wurde das Molekulargewicht (bzw. das auftriebskorrigierte und reduzierte Molekulargewicht σ (Yphantis, 1964)) auf den theoretischen Wert fixiert und der Assoziationskoeffizient der Pr-Form ($K_{A,Pr}$) mit Hilfe der nur Pr enthaltenden Lösung gefunden. Dieser Wert wurde im Anschluß vorgegeben, wenn Mischungen von Pr und Pfr analysiert wurden. Da die Masse beider Formen praktisch gleich ist, und ihre relativen Beiträge zur radialen Konzentrationsverteilung ebenfalls gleich sind, ist der einzige exponentielle Parameter, der dann noch durch Kurvenanpassung gefunden werden muß, der Assoziationskoeffizient der Pfr-Form (K_{A,Pfr^*}). Dabei ist zu beachten, daß der so gefundene Parameter nur dann mit dem tatsächlichen Assoziationskoeffizienten für die Reaktion $2 \text{ Cph1}\Delta 2\text{-Pfr} \leftrightarrow (\text{Cph1}\Delta 2\text{-Pfr})_2$ übereinstimmt, wenn keine andere Spezies einen signifikanten Beitrag zu den gemessenen Konzentrationsgradienten leistet. Diese Annahme läßt sich jedoch aufgrund der gleichen Massen der Pr- und der Pfr-Form praktisch nicht verifizieren, so daß der erhaltene Parameter ein apparenter ist, der aber von der Reaktion $2 \text{ Cph1}\Delta 2\text{-}$

Pfr \leftrightarrow (Cph1 Δ 2-Pfr)₂ dominiert werden wird. Eine analoge Betrachtung gilt auch für die Assoziationskoeffizienten für Pr, das nur dann in reiner Form vorliegt, wenn es in strikter Dunkelheit präpariert wird, was für die hier vorgestellten Versuche jedoch nicht gilt.

Cph1 Δ 2-Pfr (spektrale Reinheit > 95%) wurde mittels SEC (C15/70, Superdex 200) (Pharmacia/GE) in Grundpuffer präpariert. Fraktionen von 500 μ L wurden gesammelt und 80 μ L in einer Ultramikroküvette UV/vis-spektroskopisch im Bereich zwischen 250 nm und 800 nm untersucht. Die erhaltenen Spektren wurden mit einem berechneten Pfr-Spektrum verglichen, das dankenswerterweise von J. Hughes zur Verfügung gestellt wurde.

4.6 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Peter Schmieder an Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Für zweidimensionale (2D-)Spektren wurden Probenröhrchen mit 5 mm Innendurchmesser (200-500 μ L Probenvolumen) verwendet, für eindimensionale (1D-)¹⁵N-Spektren wurden solche mit 10 mm Innendurchmesser (3500 μ L Probenvolumen) verwendet. Alle gezeigten Spektren wurden bei 300 K (27 °C) gemessen.

Die eindimensionalen ¹⁵N-Spektren wurden mit einem DMX600-Spektrometer und einem 10 mm BBO-Probenkopf aufgenommen. Es wurden 200 000 scans mit 65 536 Punkten aufgezeichnet, die Gesamtmeßzeit für ein solches Spektrum betrug 15 Tage.

NOE-Spektren wurden mit einem DMX600-Spektrometer und einem 5 mm TCI-Probenkopf aufgenommen. In Vorversuchen wurde die Mischzeit variiert. Bei 50 ms wurden die meisten Signale erhalten. Damit wurde dieser Wert für alle nachfolgenden Spektren verwendet. Das Lösungsmittel war für diese Spektren D₂O, um Signale von restlichem HDO zu unterdrücken, wurde mit schwacher Vorsättigung gearbeitet.

¹H-¹⁵N HMQC-Spektren (Bax et al., 1983) wurden mit einem DMX750-Spektrometer und einem 5 mm TCI-Kryoprobenkopf aufgenommen. Das Lösungsmittel war H₂O mit 10 Vol-% D₂O. Um eine Wasserunterdrückung im Fall des ¹H-¹⁵N-HMQCs zu erreichen, wurde eine 11-Echo Sequenz verwendet (Sklenar & Bax, 1987). Spektren der Pr-Form und der Pr/Pfr-Mischungen wurden mit 5120 scans und 512 x 60 Punkten aufgenommen. Damit betrug die Gesamtmeßzeit für ein derartiges Spektrum 128 Stunden.

¹H-¹³C HMQC-Spektren wurden mit einem DMX600-Spektrometer aufgenommen. Es wurde ein 5 mm TCI-Kryoprobenkopf zur Detektion benutzt. Diese Spektren wurden mit D₂O als

Lösungsmittel aufgenommen, um Signale von residuellem HDO zu unterdrücken, wurde mit schwacher Vorsättigung gearbeitet. Zuerst wurden Spektren beider Formen mit 32 scans und einer Auflösung von 512 x 64 Punkten aufgenommen. Dies ergab eine Gesamtmeßzeit von 45 Minuten für die jeweiligen Spektren. Danach wurde mit 664 scans und einer Auflösung von 1000 x 256 Punkten ein Spektrum der Pr-Form aufgenommen. Die Gesamtmeßzeit betrug für dieses Spektrum 70 Stunden.

4.7 Fourier-Transform Resonanz-Raman (FT-RR)

Spektroskopie

FT-RR Messungen wurden in Zusammenarbeit mit David von Stetten im Arbeitskreis von Peter Hildebrandt an der TU Berlin durchgeführt. Das Meßprotokoll sowie die Probenvorbereitung orientieren sich weitgehend an dem von Christa Kneip beschriebenen Vorgehen (Kneip, 1998), mit einigen wichtigen apparativen Veränderungen.

Die für FT-RR verwendeten Proben wurden in Grundpuffer präpariert wie oben beschrieben und mit gründlich gewaschenen Vivaspin-Konzentratoren (s. Abschnitt 4.6) auf Konzentrationen von > 100 mg/mL aufkonzentriert. Das Gesamtvolumen solcher Proben betrug jeweils etwa 40-50 µL. Für einen Austausch von H₂O gegen D₂O wurde eine gegebene Probe aufkonzentriert, mit 1 mL deuteriertem Grundpuffer verdünnt und erneut aufkonzentriert. Dies wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Pro Messung wurden 10-30 µL der konzentrierten Probe verwendet. Bestrahlung der Proben mit R oder FR wurde bei RT für jeweils etwa 20 Minuten durchgeführt. Aufgrund des geringen Probenvolumens und der resultierenden geringen Schichtdicke konnte auch bei Bestrahlung mit R eine ausreichende Anreicherung (im Sinn des gemessenen Signals) von Pfr erreicht werden, auch wenn die Proben dabei nicht notwendigerweise im Photogleichgewicht waren. Alle Messungen wurden bei -140 °C durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein KONTI-Kryostat „Spekto“ (CryoVac) in Kombination mit einem konischen Aluminiumtiegel verwendet (Kneip, 1998). Die entsprechende Probe wurde dabei in den Tiegel gefüllt, der dann mit flüssigem Stickstoff eingefroren und so in den Kryostaten eingebracht wurde. Später wurde ein Linkam THMS 600-Kryostat (Resultec) verwendet. Hier wurde die Probe auf eine Quarzplatte gegeben, die dann im Kryostaten von RT auf kryogene Temperaturen gebracht wurde. Damit wird ein diffuser und nicht reproduzierbarer Basislinienseffekt vermieden, der ansonsten in den Spektren vorhanden war, und wahrscheinlich vom Glas der Kryostatenfenster und von Oberflächeneffekten des Aluminiumtiegels herrührte (Kneip, 1998). Dieser diffuse Hintergrund wurde durch Subtraktion einer empirisch ermittelten Basislinie entfernt.

Die Spektren wurden mit einem Digilab/Biorad FT-RR-Spektrometer aufgenommen. Die Anregung erfolgte durch einen FC-106V Nd:YVO₄-Laser (Spectra Physics) bei einer Wellenlänge von 1064 nm bei einer Linienbreite von $< 1 \text{ cm}^{-1}$, die Laserleistung betrug 660 mW in der Probenkammer. Die so generierte Streustrahlung wurde in einem Winkel von 180° zum einfallenden Laser detektiert. Dabei war noch ein Filter vorgeschaltet, um die Rayleighstrahlung herauszufiltern, die den Hauptteil der Streustrahlung ausmacht. Als Detektor diente ein mit flüssigem Stickstoff gekühlter Germaniumdetektor. 4500 Einzelspektren wurden zu einem Spektrum zusammengefaßt, um auf diesem Wege das Signal/Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die Gesamtmeßzeit für ein derartiges Spektrum betrug etwa zwei Stunden.

Bei Bestrahlung mit FR lagen immer noch mindestens 3% Pfr vor, mit R bestrahlte Proben enthielten jeweils nicht genauer bekannte Mengen an Pfr, maximal aber lediglich 70%. Um das Spektrum des jeweiligen reinen Zustands zu erhalten, mußte dieser Anteil vom Spektrum des Gemisches subtrahiert werden. Hierbei wurden zuerst Banden identifiziert, deren Intensität beim Übergang zu Pfr geringer wurde. Es wurde dann solange das Spektrum von Pr subtrahiert, bis die identifizierten Banden verschwunden waren und an keiner Stelle des Spektrums negative Banden entstanden waren. Diese Subtraktion erfolgte empirisch und ist daher mit einem sog. Nasenfaktor behaftet (von Stetten, persönl. Mitteilung). Wenn möglich, wurde das auf diesem Wege generierte, reine Pfr-Spektrum noch von den Pr-Spektren subtrahiert, um die geringen Anteile von Pfr aus diesen Spektren zu entfernen.

Die Dekonvolution der Banden wurde mit dem Programm Origin6.0 (Microcal, MA, USA) durchgeführt. Dabei wurde eine Lorenz-Bandenform vorausgesetzt.

4.8 Quantenchemische Berechnung

Die Berechnung der ¹⁵N-chemischen Verschiebungen und von Ramanspektren in Abhängigkeit von der Chromophorkonformation und -konfiguration wurden von Maria-Andrea Mroginski und David von Stetten durchgeführt.