

**Struktur-, Dynamik- und Interaktionsstudien an Domänen des
bakteriellen Photorezeptors YtvA aus *Bacillus subtilis***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Matthias Dorn
aus Frankfurt (Oder)

2012



Diese Arbeit wurde von April 2008 bis Juni 2012 am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) unter Anleitung von Dr. Peter Schmieder angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat

Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Multhaup

Institut für Chemie und Biochemie - Freie Universität Berlin

Disputation am: 10.12.2012



*Die Vergangenheit entsteht nicht nur aus dem, was geschehen ist,
sondern auch aus all den Dingen, die nicht geschehen sind.*

*Manchmal muss man die Augen erst schließen, um zu begreifen, dass
man nur mit offenen Augen sehen kann.*

Danksagung

Die hier dargestellte Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie in der Arbeitsgruppe „Lösungs-NMR-Spektroskopie“ unter Betreuung von Dr. Peter Schmieder angefertigt. Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die fantastische Arbeitsatmosphäre bedanken. Einigen Personen möchte ich wegen ihres bewundernswerten Engagements und deren fortwährender Unterstützung ganz besonderen Dank aussprechen, da der Erfolg dieser Arbeit ohne sie undenkbar gewesen wäre.

Zu allererst danke ich Dr. Peter Schmieder für dieses spannende Forschungsprojekt und seine hervorragende Betreuung während meiner gesamten Promotion. Ich danke Dir auch für Deine Einführung in die komplexe Materie der NMR-Spektroskopie. Dein „Kugelschreiber“ und die „wackelnden Hände“ werden mir immer in Erinnerung bleiben! Ich möchte mich auch noch einmal ganz besonders dafür bedanken, dass Du mir die Teilnahme an wichtigen Konferenzen ermöglicht hast und mich auch sonst in vielerlei Hinsicht gefördert hast.

Prof. Dr. Hartmut Oschkinat danke ich für die Unterstützung während der Promotion und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Prof. Dr. Gerd Multhaup möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

Frau Dr. Anne Diehl danke ich für die sehr freundliche Aufnahme in ihr Laborteam, ihre andauernde Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und ihre exzellente und so wichtige Unterstützung bei der Herstellung rekombinanter Proteine. Ausserdem danke ich Dir für Dein Vertrauen, mein Potential an allen Geräten voll entfalten zu dürfen und für die Bekanntmachung mit vielen Persönlichkeiten des Instituts.

Marcel Jurk möchte ich ebenfalls ganz besonders danken. Du warst mein Mitstreiter im „Forschungsprojekt YtvA“ und die Zusammenarbeit mit Dir hat mir zu jeder Zeit viel Spass bereitet. Ich kann auch gar nicht genug betonen, wie viel Arbeit mir Deine Skripte erspart haben. Die langen „SAXS-Nächte“ werde ich wohl auch nicht so schnell vergessen. Falls Du mal wieder nach „Rostock“ willst, dann sag Bescheid.

Bei Herrn Dr. Marco Röben möchte ich mich für die vielen anregenden Pausendiskussionen, die Administrierung meines Linuxsystems und die spannenden Tischtennismatches bedanken.

Dr. Janina Hahn und Dr. Matthias Hiller möchte ich für die Schaffung einer ganz besonderen Arbeitsatmosphäre danken. Ihr Beide seid mir während meiner Zeit am FMP wirklich sehr ans Herz gewachsen.

Jun. Prof. Sandro Keller danke ich für die Unterstützung bei der Interpretation einiger ITC-Daten und der Konfidenzintervall-Analyse sowie auch für sein beispielhaftes Engagement und seine andauernde Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich auch bei Natalja Erdmann, Lilo Handel und Martina Leidert für die angenehme Zusammenarbeit im „Wetlab“ bedanken. Schön, dass ich mich so „frei“ bewegen durfte! Natalja, Dir danke ich vor allem für Deine Unterstützung bei den Vorbereitungen der vielen Hochzelldichtefermentationen.

Bei meinem Diplomstudent Aaron Hahn möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei der „Massenproduktion“ verschiedener YtvA-LOV-Varianten bedanken.

Mein Besonderer Dank gilt auch Dr. Tobias Werther, Dr. Frank Eisenmenger und Ingo Breng. Eure Unterstützung hat diese Arbeit in jedem Falle ein gutes Stück vorangebracht.

Dr. Britta Kunert möchte ich für das „leckere Brot“ und die wirklich kurzfristige Auflösung der „Partizipialdingsda“ danken. Britta, damit hast Du mir eine gehörige Anzahl Nerven gerettet.

Meinen Eltern Norbert und Ewa, meinem Bruder Christian und meiner Oma Ursel möchte ich für ihre grenzenlose Unterstützung danken. Danke, dass ihr immer an mich glaubt! Ohne Euren Rückhalt und Eure Wegbereitung wäre diese Arbeit so nicht zustande gekommen. Mama, ohne Dich hätte ich es nicht geschafft! Du hast den bei weitem größten Anteil an dieser Arbeit geleistet! Papa, vielen Dank für Deine Hilfe beim Bau der LED-Lichtquellen! Christian, vielen Dank für die akribische Korrektur der Arbeit!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Anne Wartenberg für die Unterstützung bei diversen ITC-Experimenten bedanken. Darüber hinaus hat mir die sehr anstrengende Zeit meiner Promotion unzählbar oft gezeigt, dass ich mich immer auf Dich verlassen kann. Zusammen mit Dir ließen sich die Höhen und Tiefen viel leichter meistern! Danke, dass Du meine Launen so geduldig ertragen hast und immer für mich da warst!

Inhalt

1	Einleitung	16
1.1	Photorezeptoren - Klassen, Eigenschaften & Funktionen	16
1.2	Photorezeptoren - Mechanismen & Untersuchungsmethoden.....	20
1.3	Phototropine	24
1.3.1	Phototropine - Mechanismen der intramolekularen Signaltransduktion	25
1.4	Lichtdetektion durch LOV-Domänen – Struktur und Funktion.....	32
1.4.1	Strukturmerkmale von LOV-Domänen	33
1.4.2	Photochemie von LOV-Domänen.....	36
1.5	Der blaulicht-sensitive Photorezeptor YtvA aus <i>Bacillus subtilis</i>	39
1.5.1	YtvA – Strukturelle Charakteristika	41
1.5.2	YtvA - Intramolekulare Signaltransduktion.....	44
2	Zielstellung.....	46
3	Material & Methoden.....	48
3.1.1	Chemikalien	48
3.1.2	Molekularbiologische und biochemische Kits.....	49
3.1.3	Nährmedien und Lösungen	49
3.1.4	Geräte, Messinstrumente und technische Systeme	50
3.1.5	Bakterienstämme.....	51
3.1.6	Klonierungsvektor.....	51
3.1.7	Oligonukleotide.....	52
3.1.8	Software	52
3.2	Molekularbiologische Methoden	54
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	54
3.2.2	Agarosegelelektrophorese.....	54
3.2.3	Klonierung	55
3.2.4	Restriktionsverdau	55
3.2.5	Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	56
3.3	Mikrobiologische Methoden.....	56
3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	56
3.3.2	Herstellung von Glycerol-Dauerkulturen.....	56
3.3.3	Expressionstest und Klonselktion	56
3.3.4	Optimierung der Expressionsbedingungen	57
3.3.5	Expression in Schüttelkultur	57
3.3.6	Hochzeldichtefermentation (HZDF).....	57
3.3.7	Kultivierung von <i>Bacillus subtilis</i>	60
3.3.8	Zellernte	60

3.3.9	Zellaufschluss und Separation löslicher Proteine.....	60
3.4	Biochemische Methoden	61
3.4.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
3.4.2	Probenherstellung für SDS-PAGE	61
3.4.3	Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine	61
3.4.4	Herstellung von uniform ¹⁵ N-markiertem Apoprotein.....	63
3.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode	64
3.4.6	Analyse der Chromophorspezies in rekombinant exprimierter LOV-Domäne	65
3.4.7	Analyse von Flavin-Derivaten aus <i>Bacillus subtilis</i>	65
3.4.8	Reinigung von kommerziellem FMN	66
3.4.9	Aufbereitung Flavin-rekonstituierter Proben aus ITC-Experimenten.....	66
3.5	Biophysikalische Methoden	66
3.5.1	Photometrische Messung von Proteinkonzentrationen	66
3.5.2	Photochemische Aktivität und Messung von Halbwertszeiten	67
3.5.3	Circular Dichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)	68
3.5.4	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	68
3.5.5	Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC).....	69
3.5.6	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS).....	70
3.5.7	Lösungs-NMR-Spektroskopie.....	72
4	Ergebnisse	76
4.1	Konstruktion LED-basierter Lichtquellen zur Untersuchung unbelichteter & photoaktivierter YtvA-Konstrukte	76
4.1.1	Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle.....	76
4.1.2	AUZ-LED-Lichtquelle	77
4.1.3	Fasergekoppelte LED-Lichtquelle	78
4.2	Expression und Präparation von YtvA-Konstrukten.....	82
4.2.1	Expressionsbedingungen.....	82
4.2.2	Präparation von Jα-STAS und STAS	82
4.2.3	Präparation von YtvA-LOV-Varianten.....	85
4.2.4	Markierungsmuster und Ausbeuten präparierter YtvA-Konstrukte.....	87
4.3	Strukturelle Charakterisierung der STAS-Domäne.....	88
4.3.1	NMR-spektroskopische Untersuchungen.....	88
4.3.2	Oligomerisierungszustand.....	90
4.4	Untersuchung der Interaktion von GTP mit YtvA bzw. der STAS-Domäne.....	92
4.4.1	Fluoreszenzspektroskopie	93
4.4.2	Isothermale Titrationskalorimetrie	94
4.4.3	Lösungs-NMR-Spektroskopie.....	97
4.5	Charakterisierung verschiedener YtvA-LOV-Varianten.....	104

4.5.1	Photochemische Aktivität	104
4.5.2	CD-spektroskopische Sekundärstrukturanalyse der J α -Sequenz.....	106
4.5.3	Oligomerisierungszustand.....	108
4.5.4	NMR-spektroskopische Untersuchungen	110
4.5.5	Untersuchung lichtinduzierter Strukturänderungen in Ncap-LOV-J α mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung	124
4.5.6	Strukturmodell von unbelichtetem Ncap-LOV-J α	126
4.6	Flavinbindungsstudien	129
4.6.1	Thermodynamik der Flavin-Apoprotein-Wechselwirkung.....	129
4.6.2	Charakterisierung von deflaviniertem & rekonstituiertem Ncap-LOV	131
4.6.3	Deflaviniertes Ncap-LOV als molekulare Sonde zum Flavin-Nachweis	136
5	Diskussion.....	138
5.1	Wechselwirkung zwischen YtvA & GTP	138
5.2	Abgrenzung, Funktion & intramolekulare Organisation distinkter Struktureinheiten von YtvA	142
5.3	Prinzip der lichtgetriebenen molekularen Schaltfunktion von YtvA.....	147
6	Zusammenfassung.....	149
7	Summary	151
8	Literatur.....	153
9	Veröffentlichungen	163
10	Eidesstattliche Erklärung	164
11	Anhang	165

Abbildungen

Abbildung 1:	Domänen-Schema ausgewählter Photorezeptoren.	19
Abbildung 2:	Reaktionsschema der Photoaktivierung und Rückkonversion von AtPhot1-LOV2-J α	27
Abbildung 3:	Überlagerung der schematisierten Strukturen von AsPhot1-LOV2-J α	29
Abbildung 4:	Interaktionsstellen zwischen LOV2 und den N- & C-terminal flankierenden Regionen im Grundzustand.	29
Abbildung 5:	Modell der Aktivierung von CrPhot.	31
Abbildung 6:	Vielfalt von in LOV-Proteinen vorkommenden Effektor-Domänen.	32
Abbildung 7:	Globales Faltungsmuster der LOV-Domäne im Grundzustand.	33
Abbildung 8:	Darstellung konservierter Reste auf der Oberfläche von Phy3-LOV2.	34
Abbildung 9:	Konservierter Signalweg in LOV-Domänen.	35
Abbildung 10:	Angenommene Reaktionsmechanismen für die lichtgetriebene Bildung des Flavin-Cysteinyl-Produktes in LOV-Domänen.	36
Abbildung 11:	Absorptionsspektren des LOV-Proteins YtvA aus <i>Bacillus subtilis</i>	37
Abbildung 12:	Schema des Photozyklus von LOV-Domänen.	39
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur von YtvA.	40
Abbildung 14:	Kristallstruktur von YtvA-LOV-J α	42
Abbildung 15:	Strukturelle Unterschiede zwischen unbelichtetem & belichtetem YtvA-LOV-J α	42
Abbildung 16:	Vektorkarte von pET-30 EK/LIC (Novagen®).	51
Abbildung 17:	Klonierte YtvA-Konstrukte.	55
Abbildung 18:	Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle	77
Abbildung 19:	Bestrahlung von Proben vor SAXS-Experimenten	77
Abbildung 20:	AUZ-LED-Lichtquelle	78
Abbildung 21:	Fasergekoppelte LED-Lichtquelle.	78
Abbildung 22:	Homogene Belichtung von NMR-Proben - Prinzip und praktische Anwendung.	79
Abbildung 23:	Ankopplung des Lichtleiters an die 455 nm LED	80
Abbildung 24:	4-Kanal LED-Controller.	81
Abbildung 25:	SDS-PAGE von Proben aus der Aufreinigung von $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem J α - STAS	82
Abbildung 26:	Gelfiltration von $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem J α -STAS	83
Abbildung 27:	Gelfiltration von STAS.	84
Abbildung 28:	Gelfiltration von uniform $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem STAS	84
Abbildung 29:	Aufreinigung von uniform ^{15}N -markiertem LOV-J α	86
Abbildung 30:	Chromophoranalyse von Ncap-LOV	87
Abbildung 31:	Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von STAS & J α -STAS	89
Abbildung 32:	Konzentrationsabhängige c(S)-Verteilung aus SV-Daten der STAS-Domäne	90
Abbildung 33:	Fluorophorfarbstoffe.	93
Abbildung 34:	Vergleich der Fluoreszenzspektren	94
Abbildung 35:	ITC Titrationskurven von STAS	95
Abbildung 36:	ITC Titrationskurven von YtvA	95
Abbildung 37:	Fitkurve & Konfidenzintervall für die Titration von STAS mit BODIPY [®] -GTP	96
Abbildung 38:	Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC's von STAS in An- & Abwesenheit von Liganden	98
Abbildung 39:	Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY's von YtvA in An- & Abwesenheit von Liganden	99

Abbildung 40:	Plots der Signalintensitätsverhältnisse von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Kreuzsignalen von YtvA.....	100
Abbildung 41:	Ausschnitte liganddetektierter 1D ^1H -NMR-Spektren aus der Analyse schwacher molekularer Interaktionen zwischen unbelichtetem YtvA & BODIPY [®] -GTP.	102
Abbildung 42:	Ausschnitte liganddetektierter 1D ^1H -NMR-Spektren aus der Analyse schwacher molekularer Interaktionen zwischen YtvA & GTP.....	103
Abbildung 43:	UV-Vis-Spektren & Kinetik der Hell-Dunkel-Rückkonversion der 4 LOV-Varianten.....	105
Abbildung 44:	Überlagerung realer & rekonstruierter CD-Spektren von Ncap-LOV & Ncap-LOV-J α	107
Abbildung 45:	c(S)-Verteilung aus SV-Experimenten mit Ncap-LOV-J α & LOV-J α ...	109
Abbildung 46:	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem LOV .	111
Abbildung 47:	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem LOV-J α	112
Abbildung 48:	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV.....	113
Abbildung 49:	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte TROSY-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV-J α	114
Abbildung 50:	Zugeordnete $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen für unbelichtetes Ncap-LOV-J α	116
Abbildung 51:	^{15}N -Spinrelaxationsdaten & Orderparameter von Ncap-LOV-J α	117
Abbildung 52:	RDC-basierte Orientierung der J α -Helix in Ncap-LOV-J α	119
Abbildung 53:	Mögliche Konformationen von Ncap-LOV-J α	119
Abbildung 54:	Korrelationsanalyse der $\omega^1\text{H}_\text{N}$ - & $\omega^{15}\text{N}$ -Werte von YtvA & Ncap-LOV-J α	121
Abbildung 55:	Absolute Differenzen der $\omega^1\text{H}_\text{N}$ -Werte von YtvA & Ncap-LOV-J α	121
Abbildung 56:	^1H -NMR-Spektren von unbelichtetem & photoaktiviertem Ncap-LOV.	122
Abbildung 57:	Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion der YtvA-LOV-Domäne.....	123
Abbildung 58:	SAXS-Streukurven von unbelichtetem & photoaktiviertem Ncap-LOV-J α	124
Abbildung 59:	Paar-Verteilungsfunktionen für unbelichtetes & photoaktiviertes Ncap-LOV-J α	125
Abbildung 60:	Hüllmodell von unbelichtetem, dimerem Ncap-LOV-J α	126
Abbildung 61:	Strukturmodelle von Ncap & J α -Helix.....	127
Abbildung 62:	Rosetta-SAXS-Strukturmodell von dimerem Ncap-LOV-J α	128
Abbildung 63:	ITC-Titrationskurven von Ncap-LOV-Apo mit verschiedenen Flavinen	130
Abbildung 64:	2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von nativem & rekonstituiertem Ncap-LOV	131
Abbildung 65:	2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von nativem, rekonstituiertem & deflaviniertem Ncap-LOV.....	132
Abbildung 66:	Konzentrationsabhängige c(S)-Verteilung aus SV-Daten von Ncap-LOV-Apo.....	134
Abbildung 67:	Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion von mit Flavinen rekonstituiertem Ncap-LOV.....	135
Abbildung 68:	HPLC-Chromatogramm der aus <i>B. subtilis</i> isolierten Flavine.....	136
Abbildung 69:	UV-Vis-Spektren der per HPLC analysierten Flavinspezies.....	137
Abbildung 70:	Einfluss von Ncap auf die LOV-Domäne (1).....	145
Abbildung 71:	Einfluss von Ncap auf die LOV-Domäne (2).....	146

Tabellen

Tabelle 1: In Photorezeptoren am häufigsten vorkommende Chromophore.....	17
Tabelle 2: Spezielle Chemikalien.....	48
Tabelle 3: Molekularbiologische Kits.....	49
Tabelle 4: Nährmedien und Lösungen.....	49
Tabelle 5: Geräte, Messinstrumente und technische Systeme.....	50
Tabelle 6: Bakterienstämme.....	51
Tabelle 7: Oligonukleotide.....	52
Tabelle 8: Software.....	52
Tabelle 9: Parameter der PCR.....	54
Tabelle 10: Expressionsfeed (unmarkiert).....	58
Tabelle 11: Expressionsfeed (uniform ^{15}N -markiert in Vollmedium).....	59
Tabelle 12: Expressionsfeed (uniform ^{15}N - bzw. $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiert in Minimalmedium)....	59
Tabelle 13: Laufpuffer für die Gelfiltration von YtvA-Konstrukten.....	63
Tabelle 14: Puffer zur Herstellung von Apoprotein.....	64
Tabelle 15: Molare Extinktionskoeffizienten der YtvA-Konstrukte.....	67
Tabelle 16: Parameter der Sedimentationsexperimente.....	69
Tabelle 17: Parameter durchgeführter ITC-Experimente.....	70
Tabelle 18: Wellenlängen und Lichtleistungen der Fasergekoppelten LED-Lichtquelle ...	81
Tabelle 19: Eigenschaften von J α -STAS & STAS (FP = Fusionsprotein).....	82
Tabelle 20: Eigenschaften von YtvA-LOV-Varianten (FP = Fusionsprotein).....	85
Tabelle 21: YtvA-Konstrukte - Maximale Ausbeuten & Markierungsmuster.....	87
Tabelle 22: Mit "Sednterp" berechnete Parameter.....	91
Tabelle 23: Daten aus den SV-Experimenten mit STAS.....	91
Tabelle 24: Ergebnisse der ITC-Experimente mit YtvA & STAS.....	94
Tabelle 25: Mit "CDSSTR" berechnete Sekundärstrukturanteile.....	107
Tabelle 26: Mit "Sednterp" berechnete Parameter für die Auswertung der SV-Experimente.....	108
Tabelle 27: Ergebnisse aus den SV-Experimenten mit Ncap-LOV-J α & LOV-J α	109
Tabelle 28: Halbwertszeiten der Hell-Dunkel-Konversion der YtvA-LOV-Domäne.....	123
Tabelle 29: R $_G$ & D $_{\text{max}}$ von unbelichtetem & photoaktiviertem Ncap-LOV-J α	125
Tabelle 30: Ergebnisse der ITC-Experimente von Ncap-LOV-Apo mit verschiedenen Flavinen.....	130
Tabelle 31: Sekundärstrukturanteile in nativem & deflaviniertem.....	133
Tabelle 32: T $_{1/2}$ -Werte von mit FMN, RF & FAD beladenem Ncap-LOV.....	135
Tabelle 33: Retentionszeiten verschiedener Flavine.....	136
Tabelle 34: Chemische Verschiebungen von uniform $^1\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem Ncap-LOV-J α	165

Abkürzungen

ID	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
6xHis / His ₆	Hexa-Histidin-Tag
A / Abs	Absorption
A/G-cycl.	Adenylat-/Guanylat-Cyclase)
Apo-FP	Apo-Fusionsprotein
AS	Aminosäure
AUZ / AUC	Analytische Ultrazentrifugation
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	Bicinchoninic acid
BFM	Biofeuchtmasse
BLUF	sensors of blue light using FAD
bp	Basenpaar
bZ	basischer Zipper
Cam ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CCT	Cryptochrom C-terminale Domäne
CD	Circulardicroismus
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CV	Säulenvolumen
D _{max}	Maximaler Durchmesser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DORIS-III	Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAL	Diguanylat-Phosphodiesterase
F	F-Box
FAD	Photolyase α -Domäne/ Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FP	Fusionsprotein
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
GAF	GAF-Domäne
GF	Gelfiltration
GTP	Guanosintriphosphat
Het	Heteronuklear
HisK	Histidin Kinase
HKRD	Histidin Kinase Related Domain
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
HZDF	Hochzellichtefermentation
HWZ	Halbwertszeit
IC	internal conversion
IMAC	Immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie (immobilized metal affinity chromatography)
ISC	Intersystem-Crossing
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
Kelch	Kelch-Repeat
KOD	rekombinante Form der <i>Thermococcus-kodakaraensis</i> -KOD1-DNA-polymerase
LED	Leuchtdiode (light emitting diode)
LIC	Ligationsunabhängige Klonierung (ligation-independent cloning)
LOV	Light Oxygen Voltage
LWL	Lichtwellenleiter
MW	Molekulargewicht (molecular weight)
MW _{app}	apparentes Molekulargewicht
NA	Numerische Apertur
NMR	Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
NOE	Nuclear Overhauser Effect

Abkürzungen

nrmsd	normalised root-mean-square-deviation
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD _{600nm}	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	PER-ARNT-SIM
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank (http://www.pdb.org)
Photly.	Photolyase α/β Domäne
PHY	Phytochrom
PMMA	Polymethylmethacrylat
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	Teile pro Millionen (parts per million)
PSS	photostationärer Zustand
PYP	Photoactive Yellow Protein
R1	Longitudinale Relaxationsrate von ¹⁵ N-Spins
R2	Transversale Relaxationsrate von ¹⁵ N-Spins
RDC	Residuale dipolare Kopplungen
RF	Riboflavin
R _G	Gyrationsradius
RGB-LED	dreifarbiges LED (Rot, Grün, Blau)
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RR	Response Regulator
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg / Sedimentationskoeffizient
S*	Elektronisch angeregter Singulett-Zustand
S ²	Orderparameter
S _{app}	apparenter Sedimentationskoeffizient
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (Small-angle X-ray scattering)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	Sedimentationsgleichgewicht (sedimentation equilibrium)
Ser/ThrK	Serin/Threonin Kinase
Sm ^R	Streptomycin-Resistenz
STAS	Sulfat Transporter und Antisigma-Faktor Antagonist
STD	Sättigungstransferdifferenz
SV	Sedimentationsgeschwindigkeit (sedimentation velocity)
T*	Elektronisch angeregter Triplett-Zustand
T _{1/2}	Halbwertszeit
Tag	Protein-Tag
T _c	Rotationskorrelationszeit
TEV	Tabakätzvirus (<i>tobacco etch virus</i>)
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
ÜNK	Übernachtkultur
UV/VIS	ultraviolett/sichtbar (ultraviolet/visible)
v-bar	Partialspezifisches Volumen
YtvA	blaulicht-sensitiver Photorezeptor aus <i>Bacillus subtilis</i>
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient
η	Viskosität
θ	Elliptizität
ρ	Dichte

1 Einleitung

Für nahezu alles Leben auf der Erde stellt Licht einen essentiellen Umweltfaktor dar, da es als die wohl wichtigste lebenserhaltende Energiequelle betrachtet werden muss. Es sind bisher nur sehr wenige Organismen bekannt, die von Licht, in seiner Eigenschaft als primärer Energiequelle, völlig unabhängig existieren können [1]. Die Frage, ob auch deren ursprüngliche Entwicklung ohne Licht hätte stattfinden können, ist bis heute aber noch unbeantwortet. Ohne Zweifel führte jedoch ausschließlich die Nutzung des Sonnenlichts als Energieträger zur Entstehung der heutigen Biosphäre. Die Evolution einer immer größer werdenden Zahl photosynthetisch aktiver Organismen erhöhte dabei kontinuierlich den Selektionsdruck und führte so zur Besetzung von noch freien ökologischen Nischen. Diese konnten sich, bezogen auf die Lichtquantität und –qualität sowie deren zeitlichen Änderungen, jedoch erheblich voneinander unterscheiden. Die Fähigkeit zur Detektion dieser Eigenschaften und das Vermögen, entsprechend auf diese reagieren zu können, waren und sind für viele Organismen daher ein entscheidender Vorteil zum Überleben, insbesondere, da Licht auch schädigend auf biologische Materie einwirken kann. Aus diesem Grund hat eine Vielzahl von Organismen aus allen drei Domänen des Lebens, den Bakterien, den Archaeen und den Eukaryoten (Pflanzen, Tiere und Pilze) Mechanismen zur Wahrnehmung verschiedener Eigenschaften des Lichtes entwickelt. Die Perzeption von Licht wird dabei durch sogenannte Photorezeptoren realisiert, wobei auf Lichtwahrnehmungsprozesse bei Tieren im Folgenden nicht eingegangen wird.

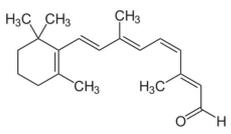
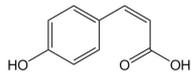
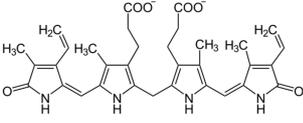
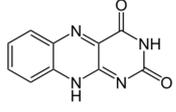
1.1 Photorezeptoren - Klassen, Eigenschaften & Funktionen

Eine besonders hohe Diversität an Photorezeptoren haben vor allem die Pflanzen hervorgebracht, da diese wegen ihrer lebenslangen Standortgebundenheit nur durch physiologische Reaktionen auf sich verändernde Umwelteinflüsse reagieren können. Von verschiedenen Photorezeptoren wahrnehmbare, biotopspezifische Kenngrößen sind die Lichtintensität, die Lichtqualität, also das Vorhandensein bestimmter Wellenlängen sowie deren quantitatives Verhältnis, und die Zeitspanne von Hell- und Dunkelperioden [2–6]. Licht, als extrazellulärer Stimulus, wird durch Photorezeptoren dabei in ein intrazelluläres Signal konvertiert. Die Integration und Kombination dieser transduzierten Informationen ermöglicht den Pflanzen eine Anpassung auf vorhandene und die Reaktion auf sich verändernde Standortverhältnisse.

Die Steuerung der Wuchsrichtung hin zu höheren Lichtintensitäten [6,7], die Anpassung des Photosyntheseapparates an das vorhandene Lichtspektrum durch gezielte Veränderungen der Zusammensetzung von Lichtsammelkomplexen, die Einleitung der Blütenbildung mit zu- oder abnehmender Tageslänge oder die Unterdrückung der Keimung von Samen bei Anwesenheit von Licht sollen hier beispielhaft genannt werden [4–6].

Eine gemeinsame Eigenschaft aller Photorezeptoren ist das Vorhandensein eines Chromophormoleküls innerhalb des Photorezeptorproteins, welches die Lichtabsorption, vor allem im sichtbaren Bereich des Spektrums, ermöglicht. In Tabelle 1 sind die Kernstrukturen der in Photorezeptoren am häufigsten vorkommenden Chromophore aufgeführt.

Tabelle 1: In Photorezeptoren am häufigsten vorkommende Chromophore

Chromophor	Photochemie	Rezeptorklasse
<p>Retinal</p> 	cis-trans Isomerisierung	Rhodopsine
<p>4-Hydroxy-Zimtsäure</p> 	cis-trans Isomerisierung	Xanthopsine
<p>Biline (Bilirubin)</p> 	cis-trans Isomerisierung	Phytochrome
<p>Flavine</p> 	Cystein-Flavin-Thiolbindung Elektronentransfer Protonentransfer	Phototropine Cryptochrome BLUF-Proteine

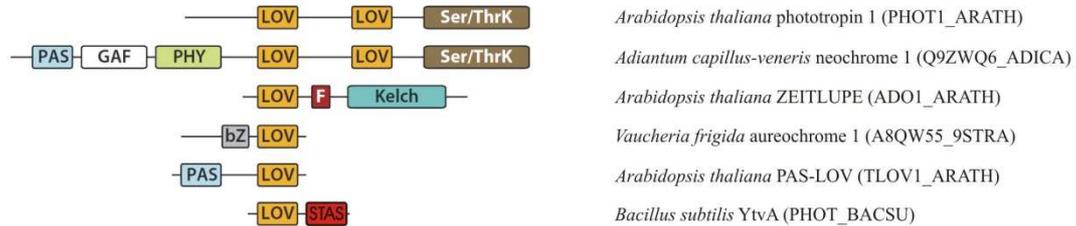
Die chemische Struktur eines Chromophors und seine lokale Umgebung innerhalb des Photorezeptorproteins bestimmen maßgeblich, welche Wellenlängen absorbiert werden können. Die Absorption eines Photons führt zu einer energetischen Anregung des Chromophors und im weiteren Verlauf durch Isomerisierung zu einer Änderung seiner chemischen Struktur und oder auch zur Knüpfung oder Brechung einer kovalenten Bindung zu einer Aminosäure innerhalb der Chromophor-Bindetasche.

Die lichtgetriebenen strukturellen Änderungen des Chromophors induzieren dann eine Konformationsänderung des Photorezeptors. Die Energie des absorbierten Photons wird dabei in chemische, kinetische und vor allem potentielle Energie umgewandelt. Die gespeicherte potentielle Energie ist maßgeblich für die Reversibilität der lichtinduzierten Reaktion verantwortlich und ermöglicht die spontane Rückkonversion aktivierter Photorezeptoren in ihren Grundzustand.

Die Halbwertszeit dieser Rückkonversion stellt eine vom Photorezeptor abhängige, charakteristische Größe dar und kann nur wenige Sekunden, aber auch mehrere Tage lang sein [5]. Die Gesamtheit aller durchlaufenen Zustände, von der Aktivierung bis zur Rückkehr in den Grundzustand, wird dabei als Photozyklus bezeichnet. Funktionell können Photorezeptoren demnach als lichtgesteuerte, molekulare Zeitschalter betrachtet werden. Prinzipiell gilt dieser Mechanismus für alle Photorezeptoren, muss jedoch für die Phytochrome noch etwas differenzierter betrachtet werden, da auch deren aktivierter Zustand thermisch sehr stabil ist. Eine Rückkonversion in den Grundzustand erfolgt bei Phytochromen über die Absorption eines weiteren Lichtquants mit größerer Wellenlänge. Das quantitative Verhältnis von Photonen beider Wellenlängen nimmt auf diese Weise direkten Einfluss auf das Verhältnis von aktivem zu inaktivem Phytochrom und ermöglicht so die Erfassung spektraler Eigenschaften der Umgebung (z.B. direktes Sonnenlicht oder Schatten).

Alle Photorezeptoren sind modular aus funktionell und strukturell klar unterscheidbaren Domänen aufgebaut. Sie bestehen aus mindestens einer, häufig N-terminal lokalisierten und mit dem Chromophor assoziierten photosensitiven Domäne sowie einer C-terminal folgenden Effektor-domäne, können darüber hinaus aber auch noch weitere, regulatorische Domänen enthalten. Die Zahl funktionell unterscheidbarer Sensordomänen ist sehr begrenzt und beschränkt sich auf Subtypen aus nur 6 verschiedenen Klassen (s. Tabelle 1 & Abbildung 1). Im Gegensatz dazu ist die funktionelle Diversität der Effektor-domänen jedoch beträchtlich [8]. Eine kleine Übersicht zur Vielfalt von in Photorezeptoren entdeckten Effektor-domänen zeigt Abbildung 1.

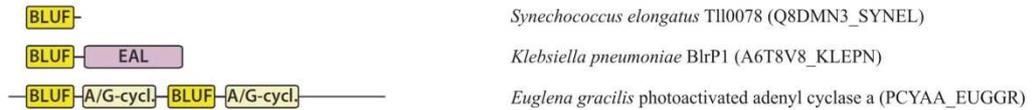
Phototropine / LOV-Proteine



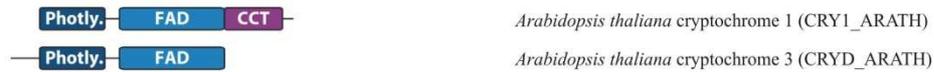
Xanthopsine



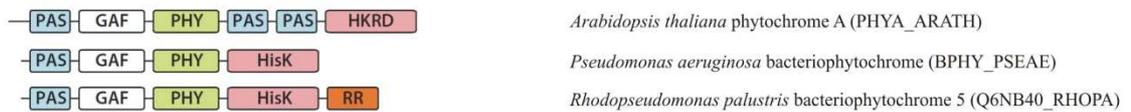
BLUF-Proteine



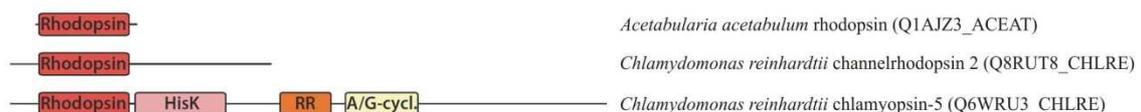
Cryptochrome



Phytochrome



Rhodopsine



200 aa

Abbildung 1: Domänen-Schema ausgewählter Photorezeptoren.

Die verschiedenen Photorezeptoren sind in die 6 Klassen entsprechend der Pfam Datenbank [9] eingeteilt. Die Domänengrößen sind in etwa maßstabsgerecht dargestellt und mit ihren UniProt-Kennungen bezeichnet [10]. Die Domänenbezeichnungen bedeuten LOV (Light Oxygen Voltage), PAS (PER-ARNT-SIM), PYP (Photoactive Yellow Protein), BLUF (Blue-Light sensors using FAD), (Ser/ThrK (Serin/Threonin Kinase), GAF (GAF-Domäne), PHY (Phytochrom), F (F-Box), Kelch (Kelch-Repeat), bZ (basischer Zipper), HisK (Histidin Kinase), HKRD (Histidin Kinase Related Domain), RR (Response Regulator), EAL (Diguanylat-Phosphodiesterase), A/G-cycl. (Adenylat-/Guanylat-Cyclase), Photly. (Photolyase α/β Domäne), FAD (Photolyase α -Domäne), CCT (Cryptochrom C-terminale Domäne), STAS (Sulfat-Transporter und Antisigma-Faktor Antagonist). Grundlegende Inhalte dieser Abbildung wurden aus [8] entnommen.

1.2 Photorezeptoren - Mechanismen & Untersuchungsmethoden

Die grundlegenden Mechanismen der Lichtabsorption und die daraus resultierenden energetischen und strukturellen Veränderungen der Chromophore und deren lokaler Umgebung wurden sehr intensiv erforscht und konnten für eine Reihe verschiedener Photorezeptoren bereits weitestgehend aufgeklärt werden [5]. In besonderem Maße hat dazu die Entwicklung und Anwendung der zeitaufgelösten Ultrakurzzeit FTIR-Spektroskopie, die Röntgenstrukturanalyse und die NMR-Spektroskopie beigetragen.

Die nach Lichtabsorption vom Chromophor vermittelten Kräfte führen bei einigen Photorezeptoren zu erheblichen Konformationsveränderungen, welche nicht nur die Tertiär- und bei Oligomeren zusätzlich die Quartärstruktur beeinflussen, sondern auch Auswirkungen auf Sekundärstrukturanteile haben können. Beispielsweise verändert sich beim blaulicht-sensitiven Photorezeptor Vivid aus dem Pilz *Neurospora crassa* nach Lichtabsorption der Oligomerisierungszustand zu einem schnell austauschenden Dimer [11]. Beim Phototropin Phot1 aus *Avena sativa* führt die Lichtabsorption dagegen zur Entfaltung einer ca. 20 Aminosäure langen α -helikalen Sequenz zwischen dem sensorischen Teil des Rezeptors und dessen Effektordomäne, woraufhin letztere aktiviert wird [12]. Phytochrome, welche unabhängig vom Aktivierungszustand immer Homodimere bilden, verändern nach Aktivierung ebenfalls ihre Tertiär- und damit auch Quartärstruktur, was die Interaktion zu potentiellen Bindepartnern beeinflusst, die enzymatische Aktivität ihrer Effektordomäne reguliert, Phosphorylierungsstellen exponiert oder zu einer Autophosphorylierung führt [8]. Weil bis heute aber noch von keinem vollständigen Phytochrom hochaufgelöste 3D-Strukturen beider Zustände aufgeklärt werden konnten, ist über die Mechanismen ihrer intramolekularen Signaltransduktion nur wenig bekannt [8].

Da Photorezeptoren, wie oben bereits angedeutet, eine Vielzahl physiologischer Funktionen beeinflussen und in entscheidendem Maß zur Entstehung komplexer Organismen beigetragen haben, besteht großes wissenschaftliches Interesse daran, die genauen Mechanismen der durch sie vermittelten, lichtinduzierten Signaltransduktion zu verstehen. Im Zentrum steht dabei die Frage, wie die relativ kleinen strukturellen Veränderungen eines Chromophors zu den oben schon angesprochenen relativ großen Strukturveränderungen des gesamten Photorezeptors führen. Besonders bemerkenswert ist dabei die sehr genau aufeinander abgestimmte Wechselwirkung zwischen Chromophor und Rezeptorprotein, sodass eine zufällige Aktivierung sehr effektiv unterdrückt wird, obwohl zur Signalauslösung nur minimale Veränderungen des Chromophors ausreichen. Die zur Auslösung eines Photozyklus notwendige Aktivierungsenergie muss also hoch genug sein, um die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Überschreitung zu minimieren, sie muss aber auch klein genug sein, um mittels der Energie eines absorbierten Lichtquants sicher überschritten werden zu können.

Eine besondere Art dieser Feinjustierung ist der Natur z.B. bei dem cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 aus *Synechocystis sp.* PCC6803 gelungen. Die Absorption von Photonen mit $\lambda = 658$ nm konvertiert das Cph1 zu >70% in den Pfr-Zustand, welcher durch Bestrahlung mit $\lambda = 702$ nm fast vollständig (>97%) wieder in die Pr-Form rückkonvertiert werden kann [13]. Das verdeutlicht, dass zur detaillierten Aufklärung der intramolekularen Signaltransduktion die Erfassung von atomar aufgelösten Strukturveränderungen notwendig wird.

Die beiden wichtigsten Methoden zur Aufklärung dreidimensionaler Strukturen großer Makromoleküle sind heute die Röntgenstrukturanalyse und die mehrdimensionale, heteronukleare NMR-Spektroskopie. Dabei bietet die erste Methode i.d.R. die bessere Auflösung, wohingegen die NMR-Spektroskopie und insbesondere die Lösungs-NMR-Spektroskopie die Möglichkeit bietet, Proteinstrukturen unter weitgehend nativen Bedingungen zu erfassen. Abhängig vom untersuchten System, können sich beide Methoden daher sehr gut ergänzen. Voraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse ist die Herstellung gut streuender 3D-Kristalle des zu untersuchenden Photorezeptors, wobei aber oft genau darin die größte Herausforderung besteht. Viele Proteine, vor allem, wenn diese flexible Bereiche enthalten (Loops sowie oft auch die N- & C-terminale Regionen) oder eine intrinsisch hohe strukturelle Dynamik aufweisen, lassen sich oft nicht kristallisieren. In vielen Fällen gelang es daher nur, 3D-Kristalle isolierter Domänen herzustellen, wobei zu deren Kristallisation dann oft sehr unphysiologische Bedingungen notwendig waren. Kristallpackungsartefakte, das Fehlen ganzer Sequenzabschnitte des Proteins und unphysiologische Kristallisationsbedingungen können daher dazu führen, dass die ermittelte Röntgenstruktur sich teilweise signifikant von der nativen Struktur unterscheiden kann. Das bezieht sich natürlich nicht auf die globale Tertiär- bzw. Quartiärstruktur, sondern vielmehr auf kleine Unterschiede z.B. in der Orientierung von Seitenketten. Doch gerade bei der Aufklärung der angesprochenen Aktivierungsmechanismen können kleine Unsicherheiten bezüglich struktureller Unterschiede schnell zu falschen Annahmen führen. Ein weiteres Problem entsteht aus der Notwendigkeit, dass zum Strukturvergleich mindestens 2 Strukturen, die des Grundzustandes und des aktivierten Zustandes, vorhanden sein müssen. Da aktivierte Zustände von Photorezeptoren aber aufgrund ihrer oftmals hohen molekularen Dynamik naturgemäß schlecht kristallisieren, gibt es nur sehr selten eine entsprechende Vergleichsstruktur. Wie eingangs bei den Phytochromen schon erwähnt, konnte bis heute noch kein vollständiger Photorezeptor in seinen beiden Zuständen kristallisiert werden.

Einen Ausweg kann hier die mehrdimensionale, heteronukleare Lösungs-NMR-Spektroskopie bieten, da mit Ausnahme der Rhodopsine, alle bekannten Photorezeptoren, auch wenn sie innerhalb der Zelle membranassoziiert vorliegen, lösliche Proteine sind. Wie oben bereits angesprochen, liegt der größte Vorteil der Methode in der Möglichkeit, Proteine in Lösung unter definierten physiologischen Bedingungen bezüglich des pH-

Wertes, der Ionenstärke und der Temperatur zu untersuchen. Darüber hinaus bietet die Methode potentiell aber auch die Möglichkeit, Protein-Protein- und Protein-Ligand-Wechselwirkungen qualitativ und oder quantitativ zu erfassen. Durch die Aufnahme mehrdimensionaler, protonendetektierter NMR-Spektren können die chemischen Verschiebungen der meisten Wasserstoff-, Stickstoff- und Kohlenstoffkerne innerhalb eines Proteins gemessen und zueinander in Beziehung gesetzt werden, sodass dadurch deren Position innerhalb einer Polypeptidkette oder eines Chromophors bestimmt und Abstandsinformationen zu entsprechenden Kernen in deren räumlicher Nähe ermittelt werden können. Mit diesen Informationen ist es dann möglich, die dreidimensionale Struktur des Proteins zu berechnen. Darüber hinaus ist diese Methode auch in der Lage moleküldynamische Parameter, wie die globale Rotationskorrelationszeit (T_c), die interne Mobilität funktioneller Gruppen, Protonenaustauschraten und die räumliche Orientierung von Bindungsvektoren zu erfassen. Die zu untersuchenden Proteine sind allerdings gewissen Einschränkungen unterworfen und müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Da die Signaldispersion in den NMR-Spektren mit zunehmender Molekülgröße abnimmt, ist z.B. die eindeutige Zuordnung von Kernresonanzen in Proteinen >20 kDa eine große Herausforderung. Zusätzlich verstärken sich mit steigender Molekülgröße aber auch Anisotropie- und Relaxationseffekte, was zu Signalverbreiterung und Verminderung der Signalintensitäten führt. Nach Möglichkeit sollten diese Gesichtspunkte bei der Auswahl eines geeigneten Systems Berücksichtigung finden und demnach kleineren Proteinen gegenüber größeren Vorzug gegeben werden.

Unterstützung findet dieses Auswahlkriterium jedoch noch wegen weiterer Bedingungen, welche für strukturelle Untersuchungen von Proteinen mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie zwingend erforderlich sind. Da die natürliche Häufigkeit der NMR-aktiven, also detektierbaren Kerne ^{13}C (1,11%) und ^{15}N (0,37%), sehr gering ist, müssen die zu untersuchenden Proteine möglichst vollständig mit diesen Isotopen angereichert sein, wodurch sich die Intensität der detektierbaren Signale entsprechend erhöht. Für diese sogenannte Isotopenmarkierung ist es i.d.R. notwendig, die Proteine durch rekombinante Expression in einem Wirtsorganismus herzustellen. Die zum Aufbau von Biomasse erforderlichen Grundbausteine werden dem Wirt dabei ausschließlich in entsprechend isotopenmarkierter Form zur Verfügung gestellt.

Sofern überhaupt möglich, kann die Größe des Zielproteins deshalb auch schon während der rekombinanten Expression ein limitierender Faktor sein, da die Ausbeuten mit steigender Molekülmasse meistens schrumpfen. Hohe Ausbeuten sind jedoch sehr wünschenswert, weil die Lösungs-NMR-Spektroskopie eine relativ unempfindliche Methode ist und daher besonders von hohen Probenkonzentrationen profitiert, da sich die Messzeit direkt proportional zur Probenkonzentration verhält. Bei der Aufnahme von Triple-Resonanz-Spektren (s. Abschnitt 3.5.7.2) tritt dieser Zusammenhang sehr deutlich zu Tage.

Dauert die Aufnahme eines Spektrums bei einer üblichen Probenkonzentration von $\sim 500 \mu\text{M}$ z.B. 2 Tage, so verdoppelt sich die benötigte Messzeit, wenn nur die halbe Konzentration zur Verfügung steht.

Leider lässt sich die Proteinkonzentration nicht beliebig erhöhen und so dauert die Aufnahme eines Spektrensatzes zur sequentiellen Zuordnung der Resonanzen und zur Gewinnung von Abstandsinformationen zur Strukturrechnung durchaus mehrere Wochen. Daraus ergibt sich ein weiteres Kriterium für NMR-Proben, denn sie sollten während dieses Zeitraumes stabil bleiben. Ist das nicht gegeben, wird die Präparation mehrerer frischer Proben erforderlich, wobei, wie oben beschrieben, die Molekülgröße erheblichen Einfluss auf die Quantität haben kann.

Wie Abbildung 1 oder ein Blick in die Pfam-Datenbank [9] verdeutlicht, sind die meisten bekannten Photorezeptoren deutlich größer als 50 kDa und daher kaum geeignet, um in ihrer vollständigen Größe mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie strukturell zufriedenstellend charakterisiert werden zu können. Durch die fortschreitende Sequenzierung der Genome verschiedenster Organismen und deren Analyse bezüglich homologer Bereiche zu Gensequenzen [14] schon bekannter Photorezeptoren, wurden in der jüngeren Vergangenheit jedoch u.a. in Bakterien auch relativ kleine ($< 30 \text{ kDa}$), putative Photorezeptoren identifiziert, welche durchaus geeignete Kandidaten für NMR-spektroskopische Untersuchungen darstellen könnten.

Ein besonderer Vorteil bei der Wahl bakterieller Photorezeptoren dürfte auch darin liegen, dass bis heute der überwiegende Anteil isotope-markierter Proteine zur Untersuchung mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie rekombinant in dem gram-negativen Darmbakterium *E. coli* exprimiert wurden. Da es sich um einen bakteriellen Expressionswirt handelt, sollten sich isotope-markierte bakterielle Proteine mit diesem System relativ unkompliziert in nativem Zustand und mit guten Ausbeuten herstellen lassen. Dabei muss berücksichtigt werden, dass *E. coli* natürlicherweise nur bestimmte Flavine herstellen kann, sonst aber keine weiteren Chromophore produziert. Photorezeptoren mit *E. coli*-fremden Chromophoren würden daher nur als Apoproteine exprimiert und müssten anschließend noch mit ihrem Chromophor rekonstituiert werden.

Da *E. coli* in der Lage ist, den mit Phototropinen und LOV-Proteinen assoziierten Chromophor Flavinmononukleotid (FMN) zu synthetisieren, sollten sich diesen Klassen zugehörige Photorezeptoren bzw. deren sensorische Domänen sehr wohl als funktionsfähige Holoenzyme überexprimieren lassen. Daher scheint es naheliegend, Phototropine und die mit ihnen verwandten photosensitiven LOV-Proteine genauer zu betrachten.

1.3 Phototropine

Als Phototropine wird eine erst vor wenigen Jahren entdeckte Klasse blaulicht-sensitiver, membranassoziierter, pflanzlicher Photorezeptoren bezeichnet. Namensgebend waren erste Erkenntnisse über ihre Funktion bei der Regulation des Phototropismus. Diese basieren auf Arbeiten von Christie *et al.*, denen 1998 die Identifizierung des ersten Phototropins, NPH1 aus *Arabidopsis thaliana*, gelang [15]. Gleichzeitig konnten sie nachweisen, dass FMN der mit dem Protein assoziierte Chromophor war. Weitere Untersuchungen zeigten später, dass Phototropine neben dem Phototropismus auch noch andere lichtabhängige physiologische Reaktionen steuern. Zu nennen wären hier Prozesse, wie die lichtinduzierte Öffnung der Stomata, die Verlagerung der Chloroplasten in Abhängigkeit von der Lichtintensität, die Regulation des Blattwachstums oder die schnelle Unterdrückung des Hypocotylwachstums von in Dunkelheit gekeimten Samen bei Anwesenheit von Tageslicht [7,16–21].

Dem allgemeinen Aufbau von Photorezeptoren folgend, sind auch Phototropine bezüglich ihrer Domänen-Organisation klar in einen N-terminalen photosensorischen und einen C-terminalen effektorischen Teil gegliedert. Charakteristisch für Phototropine ist ein konservierter, ca. 20 Aminosäuren langer α -helikaler Sequenzabschnitt (bezeichnet als α -Helix), welcher die Sensor- und die Effektordomäne miteinander verbindet. Es wird angenommen, dass dieser α -helikale Bereich eine entscheidende Rolle in der Signalvermittlung von der Sensor- auf die Effektordomäne spielt [12]. Im Folgenden Abschnitt wird darauf noch genauer eingegangen werden. Der photosensorische Teil besteht u.a. aus 2 diskreten Proteinmotiven, welche Charakteristika der sogenannten PAS-Domänen (PAS; PER/ARNT/SIM) aufweisen [22]. Diese ubiquitär in der Natur vorkommenden Protein-Domänen werden aufgrund der Vielzahl strukturell und funktionell von ihnen ableitbarer Subspezies unter dem Begriff der PAS-Superfamilie zusammengefasst. Genauer handelt es sich bei den beiden photosensitiven Domänen der Phototropine daher um eine Subspezies innerhalb der PAS-Superfamilie, die sogenannten LOV-Domänen [23].

Die Bezeichnung LOV geht zurück auf Huala *et al.* [23] und bezieht sich auf die Natur der Stimuli, wie Licht (Light), Sauerstoff (Oxygen) und Spannung (Voltage), für welche strukturhomologe Protein-Domänen empfindlich sein können. Aufgrund der Inkorporation des Chromophors FMN sind LOV-Domänen selbst aber nur sensitiv für blaues Licht. Die Effektordomäne von Phototropinen ist eine Serin-/Threoninkinase mit einer Autophosphorylierungsfunktion [24]. Bisher ist jedoch noch unklar, ob durch diese nur der Rezeptor selbst oder möglicherweise noch weitere Interaktionspartner phosphoryliert werden [25]. Auch konnte noch nicht geklärt werden, ob die Autophosphorylierung des Rezeptors ausschließlich Teil der Signaltransduktion ist oder möglicherweise auch eine Desensibilisierung bewirkt [25]. Huala *et al.* [23] und Kagawa *et al.* [26] konnten 1997 bzw. 2001 zeigen, dass die Kinasefunktion für die Signaltransduktion essentiell ist.

Da der Photozyklus von Phototropinen maßgeblich von der in Abschnitt 1.4.2 genauer beschriebenen Photochemie der LOV-Domänen bestimmt wird, soll dieser hier nur kurz dargestellt werden. Die Absorption von Licht im Bereich von 420 nm–480 nm (das Absorptionsmaximum kann rezeptorabhängig variieren) führt zur Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen dem Kohlenstoff C4a des Flavin-Isoalloxazinringes und der SH-Gruppe eines hochkonservierten Cysteins innerhalb der Chromophorbindetasche. Dadurch verliert das FMN seine Aromatizität und auch seine planare Struktur, was zusammen mit der neu entstandenen kovalenten Bindung zum Rezeptorprotein zu einer relativ kleinen Konformationsänderung hauptsächlich im Bereich der Bindungstasche führt.

Wie im folgenden Abschnitt näher erläutert, erfährt der gesamte Rezeptor anschließend eine erhebliche strukturelle Veränderung, welche zuerst die Aktivierung seiner Kinasefunktion und seine anschließende Autophosphorylierung nach sich zieht. Abhängig vom betrachteten Phototropin, konvertieren die LOV-Domänen mit Halbwertszeiten von einigen Sekunden bis zu einigen Minuten thermisch zurück in den Grundzustand [27], wobei die kovalente Bindung zwischen FMN und dem Cystein des Rezeptorproteins wieder gebrochen wird. Auf welche Weise der Rezeptor wieder dephosphoryliert wird, konnte bis jetzt noch nicht zufriedenstellend erklärt werden. Im Folgenden wird der angenommene Mechanismus der intramolekularen Signalübertragung von der Sensor- auf die Effektor-domäne genauer dargestellt.

1.3.1 Phototropine - Mechanismen der intramolekularen Signaltransduktion

Da es bisher noch Niemandem gelungen ist, die Struktur eines vollständigen Phototropins im Grund- und aktivierten Zustand aufzuklären, basieren Annahmen bezüglich grundlegender Mechanismen der intramolekularen Signaltransduktion bzw. der Rezeptoraktivierung auf Untersuchungen, die an isolierten Domänen, gekürzten oder mutierten Rezeptorproteinen und lebenden Organismen durchgeführt wurden.

Auch wenn auf diese Weise kein vollständiges Verständnis erreicht werden konnte, war es trotzdem möglich, viele Fragestellungen zu beantworten. Wie bereits erwähnt, besitzen Phototropine im N-terminalen Bereich 2 distinkte LOV-Domänen (LOV1 und LOV2). Es stellte sich daher die Frage, ob diese vielleicht distinkte Funktionen besitzen oder möglicherweise kooperativ eine Funktion realisieren. Christie *et al.* konnten zeigen, dass die beiden LOV-Domänen in AtPhot1 aus *Arabidopsis thaliana* unterschiedliche Funktionen besitzen [24]. Dazu stellten sie Mutanten von *Arabidopsis thaliana* her, die AtPhot1 entweder mit photochemisch inaktiver LOV1- oder LOV2-Domäne exprimierten und untersuchten dann einige, mit Phototropismus assoziierte, physiologische Reaktionen nach Bestrahlung mit Blaulicht. Dabei wurde deutlich, dass anscheinend nur LOV2 die Kinasefunktion aktivieren kann. Vergleichbare Untersuchungen an AtPhot2, einem weiteren Phototropin aus *Arabidopsis thaliana*, erbrachten ein ähnliches Resultat, wobei

LOV1 das Phototropin aber noch in geringem Maße aktivieren konnte [24]. Phototropismus wird in Pflanzen daher wahrscheinlich fast ausschließlich über die LOV2-Domäne vermittelt.

Im Gegensatz dazu konnte der LOV1-Domäne noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Es wäre denkbar, dass LOV1 möglicherweise Einfluss auf die Sensitivität Phototropin-assoziiierter Signalkomplexe nimmt oder eine Wechselwirkung mit noch unbekanntem Interaktionspartnern realisiert [28]. Für LOV1 wurde auch eine mögliche Dimerisierungsfunktion diskutiert, da Briggs *et al.* [29] und Salomon *et al.* [30] gezeigt haben, dass die isolierte LOV1-Domäne aus Phot1a des Hafers (*AsPhot1a*) Homodimere bildet, die isolierte LOV2-Domäne hingegen nicht. Man muss daher immer berücksichtigen, dass Ergebnisse aus Interaktionsstudien isolierter Proteindomänen vorsichtig interpretiert werden sollten und nicht notwendigerweise auch die Eigenschaften im vollständigen Protein widerspiegeln müssen.

Beispielsweise zeigten Nakasone *et al.* 2007, dass die isolierte LOV2-Domäne aus *AtPhot1* im Grundzustand Dimere bildet, welche bei Belichtung dissoziieren [31]. Im Gegensatz dazu verhielt sich ein Konstrukt, bestehend aus LOV2 und α -Helix, jedoch völlig anders und lag unabhängig vom Aktivierungszustand immer als Monomer vor.

Die alleinige Tatsache, dass isolierte LOV-Domänen dimerisieren können, erlaubt also keine Aussage darüber, ob diese Eigenschaft für die Funktion des vollständigen Photorezeptors überhaupt relevant ist. Experimente die 2005 von Matsuoka & Tokutomi mit unterschiedlichen Konstrukten des Phototropins *AtPhot2* durchgeführt wurden, ergaben Hinweise darauf, dass LOV1 die Aktivierung der Kinasefunktion durch LOV2 negativ beeinflusst [32]. Gleichzeitig konnten sie die Ergebnisse von Christie *et al.* [24] bestätigen und ebenfalls zeigen, dass fast ausschließlich LOV2 die Aktivierung der Kinasefunktion vermittelt.

Aufgrund der Vermutung, dass LOV2 eine Schlüsselrolle im Aktivierungsmechanismus zukäme, wurden große Anstrengungen unternommen, die dreidimensionale Struktur dieser Domäne in ihrem Grund- und aktivierten Zustand aufzuklären. Als Ersten gelang das 2002 Crosson und Moffat mittels Röntgenstrukturanalyse von Kristallen der LOV2-Domäne des Phototropins *Phy3* aus *Adiantum* [33]. Überraschenderweise ergab der Strukturvergleich zwischen inaktiver und aktiver Domäne nur minimale Unterschiede, die hauptsächlich auf den Chromophor und seine nähere Umgebung beschränkt waren. Mit diesen Daten war es daher zunächst noch nicht möglich, einen plausiblen Mechanismus für die Aktivierung der Rezeptorkinase abzuleiten. Im Gegensatz dazu zeigten Daten, die mittels FTIR-Spektroskopie von einer sich in Lösung befindenden LOV2-Domäne aufgenommen wurden, dass auch weiter vom Chromophor entfernte Bereiche lichtinduzierten Strukturveränderungen unterworfen waren [34–37]. Zusätzlich konnten Corchnoy *et al.* mittels Circular-Dichroismus-Spektroskopie zeigen, dass sich in LOV2 aus *AsPhot1a* nach Lichtabsorption der α -helikale Strukturanteil verringert [38].

Die gegensätzlichen Ergebnisse aus dem Vergleich der Kristallstrukturen und der in Lösung gemessenen lichtinduzierten Strukturveränderungen lassen daher den Schluss zu, dass sich zumindest die Kristallstruktur der aktivierten LOV2-Domäne von der in Lösung vorliegenden Struktur unterscheidet. Mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie gelang Harper *et al.* 2003 jedoch ein beachtlicher Durchbruch bei der Aufklärung des Mechanismus der lichtinduzierten Aktivierung der Kinasefunktion [12].

An einem Konstrukt, bestehend aus der LOV2-Domäne und der C-terminalen $J\alpha$ -Helix aus AsPhot1, konnten sie zeigen, dass diese Helix mit der LOV2-Domäne interagiert, solange sich das System im Grundzustand befindet, sich jedoch nach Belichtung von LOV2 ablöst und teilweise entfaltet. Dadurch erhöht sich zum einen der Freiheitsgrad der Kinasedomäne, so dass diese spezifische Aminosäurereste am Rezeptor selbst, aber auch an potentiellen Interaktionspartnern phosphorylieren kann. Zum anderen könnten durch die Ablösung und teilweise Entfaltung der $J\alpha$ -Helix aber auch potentielle Phosphorylierungsstellen am Rezeptor exponiert werden. Auf Einzelheiten bezüglich der Autophosphorylierung von Phototropinen wird an dieser Stelle verzichtet, einen grundlegenden Überblick verschafft jedoch die folgende Literatur [39].

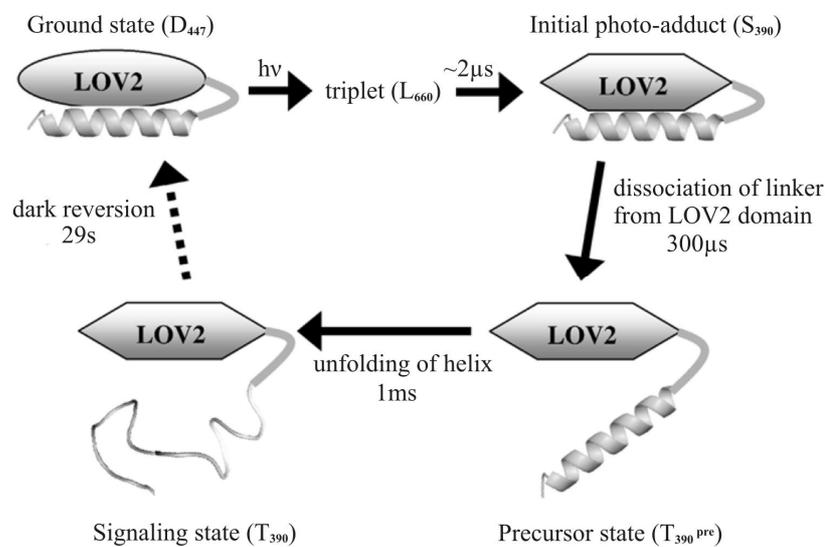


Abbildung 2: Reaktionsschema der Photoaktivierung und Rückkonversion von AtPhot1-LOV2-Jα.

Die Absorption eines Photons ($\lambda \sim 450$ nm) durch FMN in LOV2 führt über einen kurzlebigen intermediären Triplett-Zustand (L_{660}) zur Bildung eines initialen Photo-Adduktes (S_{390}), welches durch die Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen FMN und einem hochkonservierten Cystein in LOV2 gekennzeichnet ist. Ca. 300 μ s später dissoziiert die $J\alpha$ -Helix von LOV2 weg und es entsteht ein weiteres Intermediat (T_{390}^{prec}). Innerhalb einer Millisekunde entfaltet sich dann die $J\alpha$ -Helix, wobei AtPhot-LOV2-Jα in den aktivierten Zustand (T_{390}) überführt wird. Dieser konvertiert dann mit einer Halbwertszeit von 29 s wieder zurück in den Grundzustand. Die Abbildung wurde aus [31] entnommen.

Untersuchungen, die Nakasone *et al.* 2007 an Domänen aus AtPhot1 durchführten [31], zeigten, dass die Aktivierung dieses Phototropins nach dem gleichen Mechanismus abläuft, wie er zuvor von Harper *et al.* für AsPhot1 beschrieben wurde [12]. Nach Belichtung löst sich die J α -Helix von LOV2 ab und entfaltet sich anschließend. Mittels verschiedener optischer Spektroskopietechniken konnten intermediäre Reaktionsschritte während der Aktivierung identifiziert und zeitlich erfasst werden. Abbildung 2 zeigt das aus den gewonnenen Daten abgeleitete Reaktionsschema.

Ein zur Photoaktivierung von AtPhot1-LOV2-J α analoges Reaktionsschema wurde 2007 von Chen *et al.* auch für den Reaktionszyklus von AsPhot1-LOV2-J α nachgewiesen [40]. Da die lichtinduzierten Strukturveränderungen in LOV2 so gering sind, blieb lange unklar, warum sich diese trotzdem so nachhaltig auf die Stärke der Interaktion zwischen LOV2 und J α -Helix auswirken. Teilweise beantwortet ließ sich diese Frage daher erst 2007 durch die Aufklärung hochaufgelöster 3D-Strukturen von inaktivem und aktiviertem AsPhot1-LOV2-J α (Aminosäuren 404–546) mittels Röntgenstrukturanalyse durch Halavaty & Moffat [41]. Ihnen gelang erstmals die Kristallisation einer LOV2-Domäne, die C-terminal von der J α -Helix und N-terminal von einem 10 Aminosäuren langen Sequenzabschnitt flankiert war. Dabei stellte sich heraus, dass der N-terminal flankierende Bereich ein Turn-Helix-Turn Motiv bildet, welches im Grundzustand mit LOV2 und dem Ende der J α -Helix in Interaktion steht. Welche Rolle das für die intramolekulare Signaltransduktion spielt, ist dabei noch unklar.

Die für die Verwirklichung einer molekularen Schaltfunktion vermutlich wichtigste Voraussetzung basiert auf der lichtinduzierten Aufhebung von Interaktionen zwischen Teilen der J α -Helix und Bereichen des zentralen β -Faltblattmotives in LOV2. Wie im Folgenden kurz dargestellt, konnten Halavaty & Moffat sehr detailliert aufklären, wie Teile dieses Prinzips auf molekularer Ebene realisiert werden. Es muss dabei jedoch berücksichtigt werden, dass die Struktur der aktivierten Spezies einen artifiziellen Zustand abbildet, da sie durch Belichtung von Kristallen des inaktiven Proteins erzeugt wurde. Große Konformationsänderungen sind somit zwar ausgeschlossen, da jedoch photochemische Prozesse, Protonierungsreaktionen, Seitenkettenbewegungen und Umlagerungen von Wasserstoffbrückenbindungen weiterhin möglich sind, ließen sich dennoch charakteristische Struktur-Funktions-Beziehungen ableiten. Wie zuvor schon für Phy3-LOV2 beschrieben [33], sind die strukturellen Unterschiede zwischen inaktiver und aktiver Form insgesamt aber sehr gering (s. Abbildung 3).

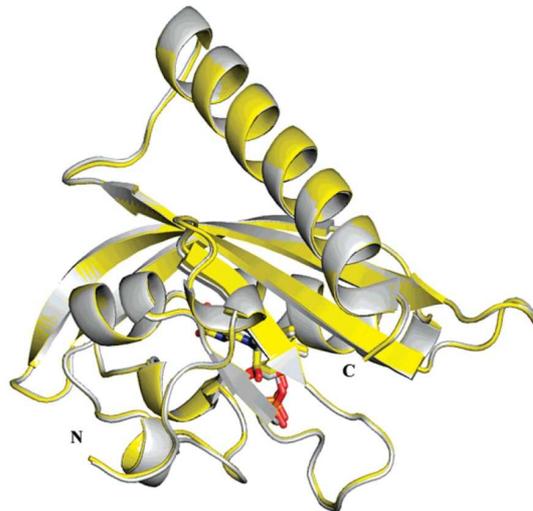


Abbildung 3: Überlagerung der schematisierten Strukturen von AsPhot1-LOV2-J α .

Dargestellt sind die schematisierten Strukturen des Proteinerückgrates von AsPhot-LOV2-J α im Grundzustand (grau) und im aktivierten Zustand (gelb). Die Abbildung wurde entnommen aus [41].

Im Grundzustand bindet die J α -Helix aufgrund ihres amphipatischen Charakters zum einen mit ihrer hydrophoben Seite an hydrophobe Bereiche des zentralen β -Faltblattes, bildet zum anderen aber über hydrophile Reste zusätzlich auch einige Wasserstoffbrücken zu LOV2 aus (s. Abbildung 4).

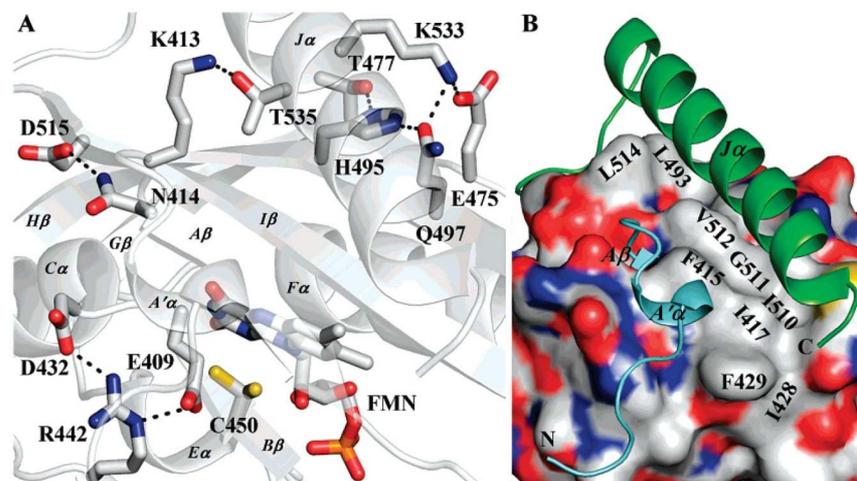


Abbildung 4: Interaktionsstellen zwischen LOV2 und den N- & C-terminal flankierenden Regionen im Grundzustand.

(A) In intramolekularem Kontakt stehende Aminosäuren des N-terminalen Turn-Helix-Turn Motives, der J α -Helix und der LOV2-Domäne sind in Stabform dargestellt. Die Elemente sind farbig hervorgehoben: Kohlenstoff (grau), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot); Wasserstoffbrücken sind als gepunktete Linien dargestellt. (B) Darstellung der Orientierung des Turn-Helix-Turn Motives (hellblau) und der J α -Helix (grün) zu hydrophoben Regionen auf der Oberfläche der LOV2-Domäne. Die Farben der Oberfläche von LOV2 repräsentieren verschiedene Elemente entsprechend dem Schema in (A). Die Abbildung wurde entnommen aus [41].

Lichtabsorption durch FMN bewirkt zuerst eine Rotation und Deprotonierung der Sulfhydryl-Seitenkette des Cysteins (Cys450) und führt anschließend zur kovalenten Verknüpfung des Flavins mit Cys450. FMN verliert daraufhin seinen aromatischen Charakter, wird an N5 protoniert und geht von einer planaren in eine leicht abgewinkelte Konformation über. Das führt zu einer Umorientierung von Wasserstoffbrücken innerhalb der Chromophorbindetasche, bewirkt aufgrund der Protonierung von N5 aber auch eine Umorientierung der Aminogruppen eines innerhalb der Bindetasche befindlichen konservierten Glutamins (Gln513), welches dann eine neue Wasserstoffbrücke zu einem N-terminal liegenden Asparagin (Asn414) ausbildet. Es wird angenommen, dass die Umorientierung der Glutamin-Seitenketten die Schnittstelle zur Vermittlung struktureller Änderungen von FMN zur Proteinoberfläche darstellt, da die im Grundzustand vorhandene, oberflächenexponierte Wasserstoffbrücke zwischen Asn414 und Asp515 durch Belichtung bzw. der damit einhergehenden Interaktion zwischen Gln513 und Asn414 gebrochen wird.

Aufgrund der Kristallpackung kann sich die $J\alpha$ -Helix trotz Belichtung jedoch nicht von LOV2 ablösen und auch nicht entfalten. Es blieb daher unklar, welche weiteren Prozesse die Aufhebung der hydrophoben Wechselwirkungen sowie die Brechung entsprechender Wasserstoffbrücken bewirken und letztendlich zur Ablösung der $J\alpha$ -Helix führen. Die einzigen Strukturveränderungen in $J\alpha$ waren im mittleren Teil der Helix (Lys533-Ile539) lokalisiert und könnten ein Indiz dafür sein, dass dieser Bereich für die Vermittlung der Interaktion zwischen LOV2 und $J\alpha$ besonders wichtig ist. Unterstützung findet diese Annahme auch durch Ergebnisse aus Mutationsstudien an AsPhot1 und AtPhot1, die 2004 von Harper *et al.* [42] bzw. 2006 von Jones *et al.* [43] veröffentlicht wurden. Der Austausch von jeweils nur einer hydrophoben Aminosäure des mittleren $J\alpha$ -Helix-Bereiches gegen Glutamat führte bei beiden Phototropinen zur Zerstörung der Interaktion mit LOV2 und zu einer lichtunabhängigen, konstitutiven Aktivierung der Kinasefunktion. Punktmutationen an anderen Positionen der Helix hatten dagegen kaum Einfluss auf die Funktion. Weitere Indizien für die besondere Bedeutung dieser Interaktionsstelle wurden 2009 auch durch Yamamoto *et al.* gefunden [44]. Mittels FTIR-Spektroskopie konnten sie zeigen, dass in AtPhot1-LOV2 lichtinduzierte Strukturveränderungen u.a. innerhalb der Region auftraten, welche im Grundzustand die Interaktion mit dem mittleren Teil der $J\alpha$ -Helix vermittelt.

Die lichtinduzierte Veränderung der Interaktionsfläche zwischen dem mittleren $J\alpha$ -Helix-Bereich und LOV2 könnte demnach eine wichtige Voraussetzung für die Dissoziation der $J\alpha$ -Helix sein. Ob die lichtabhängige Beeinflussung der Wechselwirkung zwischen $J\alpha$ -Helix und LOV2-Domäne hingegen ein allgemeines Prinzip ist, das sich auf alle Phototropine übertragen lässt, ist noch unklar. Eine 2009 von Koyama *et al.* veröffentlichte Arbeit lässt vermuten, dass die $J\alpha$ -Helix in verschiedenen Phototropinen verschiedene Funktionen zu besitzen scheint [45].

Wie in diesem Abschnitt verdeutlicht werden sollte, konnte durch die Kombination sich ergänzender Methoden gezeigt werden, dass zumindest die hier betrachteten Phototropine bzw. deren LOV2-Domänen nach dem gleichen Grundprinzip funktionieren. Untersuchungen die Pfeifer *et al.* 2010 durchführten haben gezeigt, dass die lichtinduzierte Dissoziation und teilweise Entfaltung der $J\alpha$ -Helix kein artifiziieller Effekt einzelner LOV2-Konstrukte ist, sondern so auch in einem vollständigen Phototropin (CrPhot aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*) stattfindet [46]. Darüber hinaus konnten sie auch zeigen, dass LOV2 im Grundzustand zusätzlich an die Kinase-Domäne bindet und deren katalytisches Zentrum blockiert. In Abbildung 5 ist das aus den Daten abgeleitete Modell dargestellt.

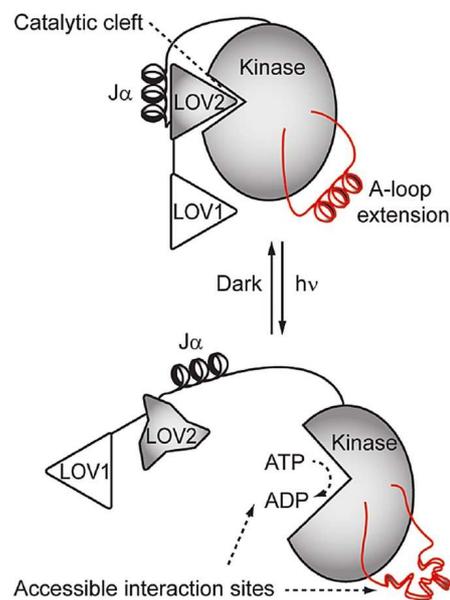


Abbildung 5: Modell der Aktivierung von CrPhot.

Im Grundzustand wird das katalytische Zentrum der Kinase durch LOV2 blockiert. Nach Absorption von Licht verändert sich die Sekundärstruktur von LOV2, die $J\alpha$ -Helix dissoziiert ab und die Blockierung der Kinasefunktion wird aufgehoben. Zusätzlich ändern sich auch Strukturelemente der Kinase-Domäne (A-loop extension), was möglicherweise die Wechselwirkung mit noch unbekanntem Interaktionspartnern beeinflusst. Die Abbildung wurde entnommen aus [46].

Im Folgenden soll nun genauer betrachtet werden, welche strukturellen Charakteristika LOV-Domänen auszeichnen und welche photochemischen Eigenschaften es möglich machen, die Energie absorbierten Lichtes in Strukturänderungen umzuwandeln. LOV-Domänen beschränken sich dabei aber nicht nur auf Phototropine, sondern müssen vielmehr als ein universelles lichtdetektierendes Sensormodul betrachtet werden, welches eine große Zahl verschiedener Effektor-Domänen steuern kann.

1.4 Lichtdetektion durch LOV-Domänen – Struktur und Funktion

LOV-Domänen, ursprünglich identifiziert als die in Phototropinen für die Absorption von blauem Licht verantwortlichen Module, wurden kurze Zeit später auch in diversen anderen Proteinen photosynthetisch und nicht photosynthetisch aktiver Organismen gefunden [47–49]. So fungiert die LOV-Domäne z.B. auch als photosensorisches Modul in F-Box und DNA-bindenden Proteinen, welche den circadianen Rhythmus in höheren Pflanzen [50] und Pilzen [51] steuern. Im Gegensatz zu Phototropinen kommt in all diesen Proteinen aber nur eine N-terminal lokalisierte LOV-Domäne vor [47] und bisher ist auch erst wenig darüber bekannt, auf welche Weise sie deren Aktivität oder Funktion beeinflusst. Besonders bemerkenswert ist dabei die große strukturelle und funktionelle Vielfalt der durch LOV-Domänen regulierten Effektor-Domänen [47] [52]. Abbildung 6 gibt dazu einen guten Überblick.

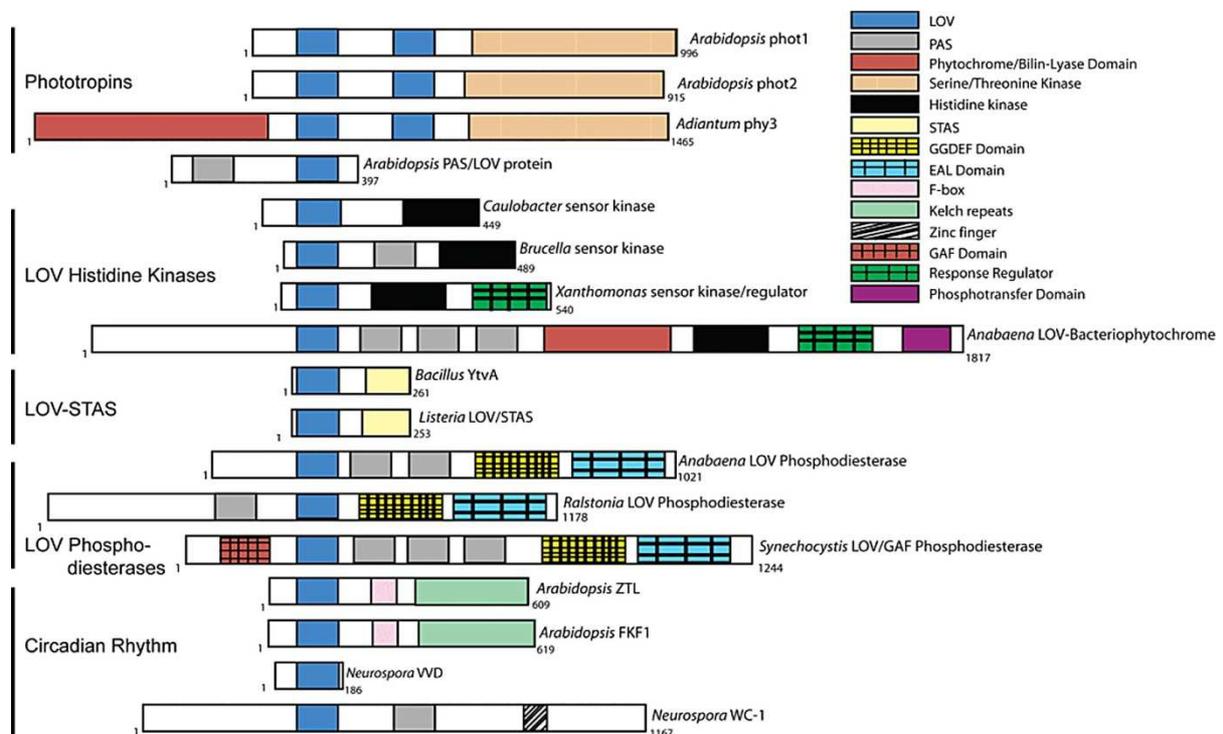


Abbildung 6: Vielfalt von in LOV-Proteinen vorkommenden Effektor-Domänen.

Die Abbildung wurde entnommen aus [47].

Die Tatsache, dass LOV-Domänen von der Natur als ein sehr universelles, photo-schaltbares Funktionsmodul eingesetzt werden, basiert u.a. auf der Möglichkeit, kleine lichtinduzierte Konformationsänderungen in sehr unterschiedlicher Weise an eine Effektor-Domäne weitergeben zu können. Ein solcher Mechanismus, die Aktivierung der Kinasefunktion in Phototropinen, wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Daneben existieren noch weitere Aktivierungsmechanismen, welche etwa auf

der Änderung des Oligomerisierungszustandes [11] oder auf der Umorientierung monomerer Untereinheiten in Homodimeren [53] basieren.

1.4.1 Strukturmerkmale von LOV-Domänen

LOV-Domänen bestehen aus etwa 110 Aminosäuren, binden ein Flavinmolekül (meist FMN) und durchlaufen nach Absorption von blauem Licht einen charakteristischen Photozyklus (s. Abschnitt 1.4.2) [33,54]. Ihre Sekundärstrukturelemente sowie deren räumliche Anordnung bilden die für PAS-Domänen typische Tertiärstruktur aus [55,56]. Diese ist gekennzeichnet durch ein fünf-strängiges, antiparalleles, gebogenes β -Faltblatt, welches von einem Helix-Turn-Helix Motiv ($\alpha A/\alpha B$), einer einzelnen 3_{10} -helikalen Windung ($\alpha' A$) sowie einer 15 AS langen α -Helix (αC) flankiert wird.

Im Grundzustand wird FMN im Kern der Domäne nicht-kovalent über mehrere polare Wechselwirkungen mit dem Pyrimidin-Teil und über unpolare Wechselwirkungen mit dem Dimethylbenzen-Teil des Isoalloxazin-Ringes gebunden. Die Bindung wird zusätzlich durch Wasserstoffbrücken zur Ribityl-Seitenkette und zur terminalen Phosphatgruppe stabilisiert. Der Chromophor wird dadurch so koordiniert, dass sich die SH-Seitenkette des in der $\alpha' A$ -Helix lokalisierten, hochkonservierten Cysteins in räumlicher Nähe zum Kohlenstoff C4a des Isoalloxazin-Ringes befindet. Ein weiteres, hochkonserviertes Strukturmerkmal bildet eine von einem Tyrosin flankierte, relativ oberflächennah exponierte Salzbrücke zwischen einem Glutamat der αB -Helix und einem Lysin in der $\beta C/\beta D$ Schleife [47]. In Abbildung 7 sind die strukturellen Charakteristika der LOV-Domäne auf Basis der Kristallstruktur von Phy3-LOV2 verdeutlicht.

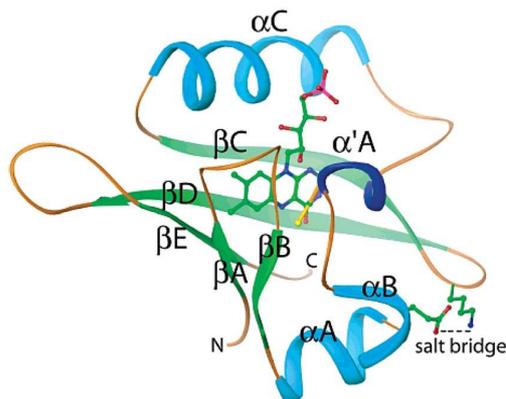


Abbildung 7: Globales Faltungsmuster der LOV-Domäne im Grundzustand.

Dargestellt ist die schematisierte Struktur des Protein-Rückgrates von Phy3-LOV2 mit Bezeichnung der Sekundärstrukturelemente. Die Lage des Chromophors und die Position der Salzbrücke zwischen Glutamat (E960) und Lysin (K1001) sind ebenfalls gezeigt. Die 3_{10} -Helix ($\alpha' A$), welche das konservierte Cystein enthält, ist dunkelblau gezeichnet. Die Elemente des Cofaktors sowie der dargestellten Seitenketten sind farblich hervorgehoben: Kohlenstoff (grün), Stickstoff (blau), Sauerstoff (rot); Schwefel (gelb); Phosphor (pink). Die Abbildung wurde entnommen aus [47].

Strukturvergleiche zwischen den LOV-Domänen diverser Proteine bestätigten die Gültigkeit dieses generellen Strukturprinzips [47]. Die Struktur der 3_{10} -Helix sowie des zentralen β -Faltblattes ist dabei hochkonserviert, die Länge einzelner Helices oder Schleifen kann aber durchaus etwas variieren [56]. Eine vergleichende Analyse der Aminosäuresequenzen von 37 bekannten und putativen LOV-Domänen zeigte eine große Variabilität innerhalb der Bereiche, die Schleifen bilden, führte zugleich aber auch zur Identifizierung absolut homologer Bereiche [47].

Alle Sequenzen enthalten das photoaktive Cystein sowie mindestens 9 von den 10 weiteren Resten, die in Phy3-LOV2 mit FMN interagieren. Die Reste, welche die Salzbrücke bilden, sind ebenfalls in allen Sequenzen konserviert. Zusätzlich konnte ein für LOV-Domänen spezifisches Konsensus-Motiv, **GXNCRFLQ**, abgeleitet werden. Ein besonders interessantes Bild entstand aber erst durch die Kombination von Strukturinformationen mit Ergebnissen aus der Sequenzanalyse (Abbildung 8).

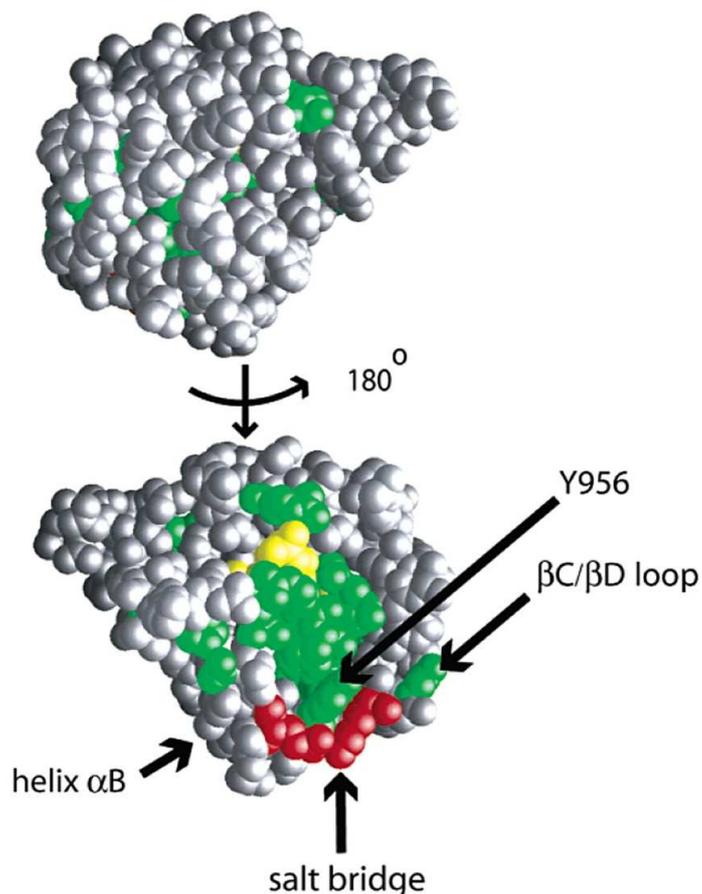


Abbildung 8: Darstellung konservierter Reste auf der Oberfläche von Phy3-LOV2.

Reste, die auf Basis des Sequenzvergleiches von 37 LOV-Domänen 100% Ähnlichkeit aufweisen, sind grün hervorgehoben. Die Phosphatgruppe von FMN ist gelb und Reste im Bereich der Salzbrücke sind rot dargestellt. Das die Salzbrücke flankierende Tyrosin (Y956) ist in vielen LOV-Domänen ebenfalls hoch konserviert. Die Abbildung wurde entnommen aus [47].

Die Aminosäuren, welche in allen 37 LOV-Sequenzen zu 100% ähnlich sind, konzentrieren sich überwiegend in der Region der α 'A-Helix, der Chromophorbindetasche sowie der Salzbrücke und formen innerhalb der Domäne eine konservierte Volumeneinheit. In van der Waals Kontakt stehende Reste bilden darin ein intramolekulares Netzwerk zwischen FMN, oberflächenexponierten Aminosäuren und der Salzbrücke (Abbildung 9).

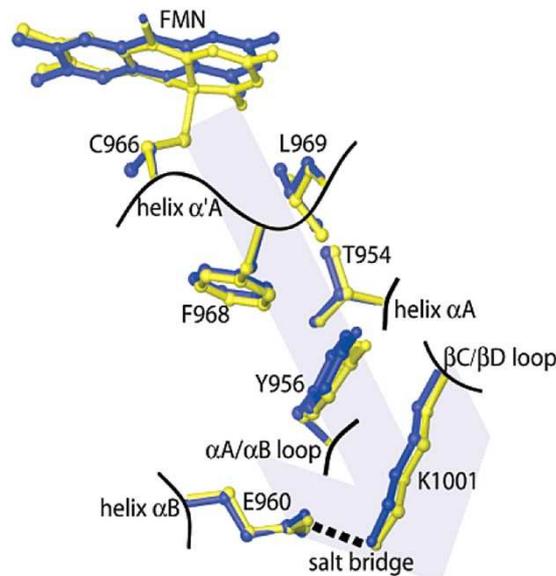


Abbildung 9: Konservierter Signalweg in LOV-Domänen.

Dargestellt sind die in Phy3-LOV2 in van der Waals Kontakt stehenden Aminosäuren, welche ausgehend von FMN über die konservierte Oberfläche bis zur Salzbrücke ein in LOV-Domänen konserviertes Signalnetzwerk bilden. Der graue Pfeil verdeutlicht die Richtung der Signalweiterleitung. Die Struktur des Grundzustandes ist blau, die des aktivierten Zustandes gelb dargestellt. Die Abbildung wurde entnommen aus [47].

Auf diese Weise können lichtinduzierte Strukturänderungen innerhalb der Chromophorbindetasche direkt auf die Oberfläche transformiert werden und so die Interaktion mit potentiellen Bindepartnern beeinflussen. Wie in Abschnitt 1.3.1 dargestellt, könnte die lichtinduzierte Dissoziation der α -Helix in Phototropinen auf diesem Prinzip beruhen. Die Funktion der Salzbrücke ist noch weitgehend unklar, abhängig von ihrer Exposition zum umgebenden Lösungsmittel könnte sie jedoch die Konformation oder Dynamik der Domäne beeinflussen. Basierend auf dieser Annahme könnte eine lichtinduzierte Destabilisierung bzw. Zerstörung der Salzbrücke entweder eine Konformationsänderung bewirken oder aber die Flexibilität der Ausgangskonformation erhöhen. Das könnte auch ein Grund für die Fähigkeit von LOV-Domänen sein, diverse Effektor-domänen steuern zu können, da beide Mechanismen die Interaktion zu potentiellen Bindepartnern auf sehr verschiedene Weise beeinflussen. 2006 von Freddolino *et al.* durchgeführte Studien bestätigten, dass die Salzbrücke lichtabhängigen Veränderungen

unterworfen ist, zeigten aber auch, dass sie in aktiven und inaktiven LOV-Domänen existent sein kann [57].

1.4.2 Photochemie von LOV-Domänen

Das wichtigste Charakteristikum der Photochemie von LOV-Domänen ist die lichtinduzierte Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen dem Kohlenstoff C4a des Flavin-Isoalloxazinringes und dem Schwefel eines hochkonservierten Cysteins. Durch dieses Prinzip wird der durch Absorption eines Photons elektronisch angeregte Zustand des Chromophors in eine gerichtete Konformationsänderung umgesetzt.

Diese Form der Signaltransduktion kommt ausschließlich in LOV-Domänen vor und wurde erstmalig im Jahr 2000 von Salomon *et al.* beschrieben [58]. Für den Reaktionsverlauf wurden zwei Möglichkeiten diskutiert, ein ionischer und ein Radikal-Paar Mechanismus [59], wobei der Radikal-Paar-Mechanismus jedoch wahrscheinlicher erscheint [60]. Beim ionischen Reaktionsverlauf wird der Wasserstoff der Sulphydryl-Seitenkette als Proton, beim Radikal-Paar-Mechanismus dagegen in atomarer Form auf N5 des Isoalloxazinringes übertragen (Abbildung 10).

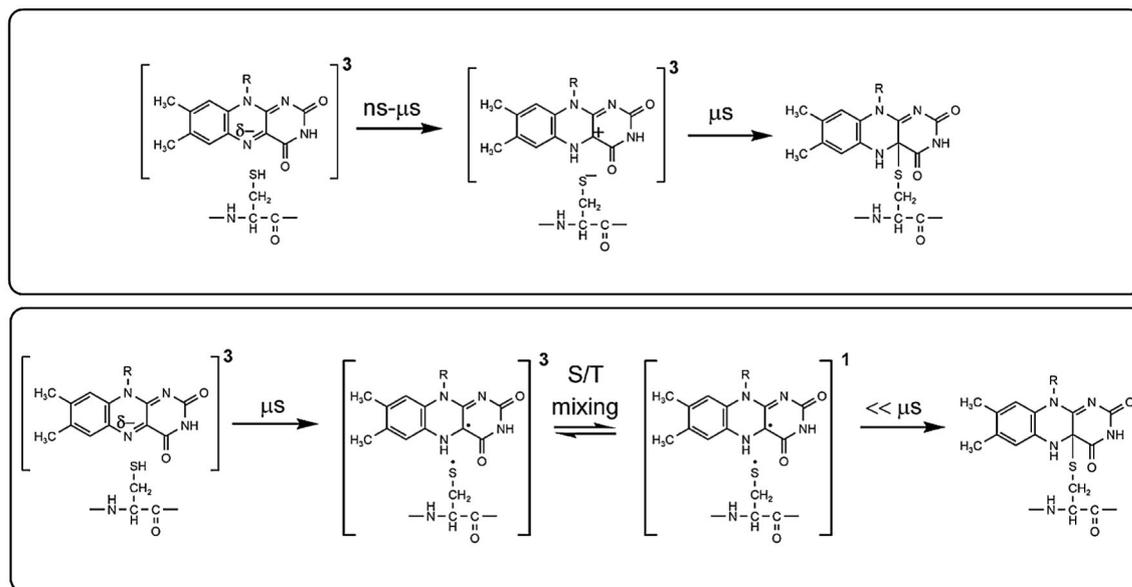


Abbildung 10: Angenommene Reaktionsmechanismen für die lichtgetriebene Bildung des Flavin-Cysteinyll-Produktes in LOV-Domänen.

Der ionische Mechanismus ist oben, der Radikal-Paar-Mechanismus unten dargestellt. Hochzahlen bezeichnen angeregte Zustände (1 = Singulett; 3 = Triplett). Die Abbildung wurde entnommen aus [60].

Triebkraft und Voraussetzung für beide Reaktionsverläufe ist der energetisch angeregte Triplet-Zustand des Flavins. Ausgehend von der vereinfachenden Annahme, alle reversiblen Reaktionsschritte wären gleich wahrscheinlich, lässt sich die Bildung des Triplet-Zustandes wie folgt beschreiben.

Die Absorption eines Photons überführt das FMN zunächst in den elektronisch angeregten Singulett-Zustand (S^*), der mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% durch „Intersystem-Crossing“ in den Triplett-Zustand (T^*) übergehen kann. Die Hälfte aller absorbierten Photonen kann durch Fluoreszenz beim Übergang von S^* zurück in den Grundzustand aber auch wieder emittiert werden. Die Halbwertszeit von S^* liegt bei wenigen Nanosekunden, die von T^* im Bereich von Mikrosekunden. Aufgrund der relativ langen Lebensdauer von T^* wird die kovalente Verknüpfung von FMN und Cystein erst möglich, da diese Reaktion ebenfalls einige Mikrosekunden benötigt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% kann T^* aber noch vor Ablauf der Reaktion wieder nach S^* konvertieren, so dass durchschnittlich nur jedes 4. absorbierte Photon tatsächlich zur Bildung eines Flavin-Cysteinyl-Adduktes führt.

Die Untersuchung einer Reihe von LOV-Domänen hat ergeben, dass dieses Modell qualitativ gültig ist, da jedoch die Eigenschaften der Chromophorbindetasche die Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen Grundzustand, S^* und T^* entscheidend beeinflussen, können sich die Quantenausbeuten zwischen verschiedenen LOV-Domänen beträchtlich unterscheiden [59]. Variationen des Typs, des Verhältnisses und der räumlichen Verteilung polarer und unpolarer Aminosäuren innerhalb der Chromophorbindetasche beeinflussen darüber hinaus aber auch die Absorptionscharakteristika und die Halbwertszeit der thermischen Rückkonversion. Die Absorptionsspektren verschiedener LOV-Domänen unterscheiden sich bezüglich der Lage und Höhe einzelner Maxima bzw. Minima jedoch nur wenig und zeigen immer einen LOV-spezifischen Verlauf (s. Abbildung 11).

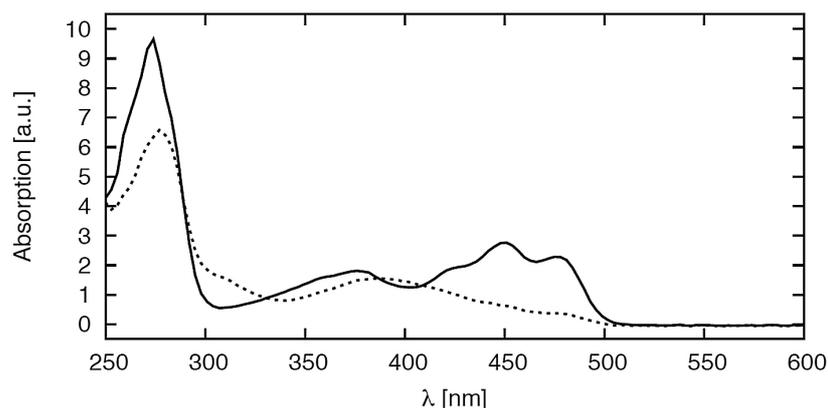


Abbildung 11: Absorptionsspektren des LOV-Proteins YtvA aus *Bacillus subtilis*.

Grundzustand (durchgehende Linie), aktivierter Zustand (gepunktete Linie). Die Abbildung wurde entnommen aus [61].

Die Halbwertszeiten für die Rückkonvertierung in den Grundzustand können sich dagegen um mehrere Größenordnungen unterscheiden und Werte zwischen wenigen Sekunden bis zu mehreren Tagen annehmen [62]. Mutationsstudien haben gezeigt, dass schon der Austausch einzelner Aminosäuren erheblichen Einfluss auf die Reaktionskinetik haben kann, vor allem, wenn dadurch das FMN koordinierende Wasserstoffbrücken-Netzwerk modifiziert wird [63].

Verglichen mit der Geschwindigkeit der Photoaktivierung verläuft die thermische Rückkonversion sehr langsam. Der initiale und zugleich geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Deprotonierung von N5 des Isoalloxazinringes, welche über einen basen-katalysierten Mechanismus ablaufen könnte [59]. Durch Protonentranslokation innerhalb eines Wasserstoffbrücken-Netzwerkes könnte der basische Charakter einer von N5 weiter entfernten Gruppe auf eine zu N5 näherstehende Gruppe übertragen werden, welche ihrerseits dann das Proton von N5 abstrahiert [59]. Da N5 dadurch nukleophil wird, kann es das elektrophile C4a angreifen. Daraufhin bricht die Bindung zwischen C4a und Cystein, der aromatische Charakter des FMN wird wiederhergestellt und das System befindet sich erneut im Grundzustand. Bestätigung findet diese Theorie aufgrund zweier Phänomene. Zum ersten haben Untersuchungen gezeigt, dass sich die Halbwertszeit der Rückkonversion in deuterierten LOV-Domänen um den Faktor 2-3 verlängert und zum zweiten konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der Rückkonversion vom pH-Wert beeinflusst wird [59].

Ein sehr interessantes, bis heute aber erst wenig erforschtes Phänomen ist die lichtinduzierte Rückkonversion des photoaktiven Zustandes. Wie gezeigt werden konnte, lassen sich einige LOV-Domänen auch durch Bestrahlung mit Licht des nahen UV-Bereiches (≤ 400 nm) schnell in den Grundzustand zurückschalten [59]. Ob diese Eigenschaft in vivo relevant ist oder eher nur ein unvermeidliches Nebenprodukt der LOV-Photochemie darstellt, ist bisher noch unklar. Analog zu Phytochromen könnten möglicherweise auch einige LOV-Proteine wie photochrome Schalter funktionieren, indem sie die spektralen Eigenschaften der Umgebung über das Verhältnis zwischen Spezies im Grund- und aktivierten Zustand abbilden. Basierend auf den bisher gewonnenen Erkenntnissen sind in Abbildung 12 die wichtigsten Schritte im Photozyklus von LOV-Domänen zusammengefasst.

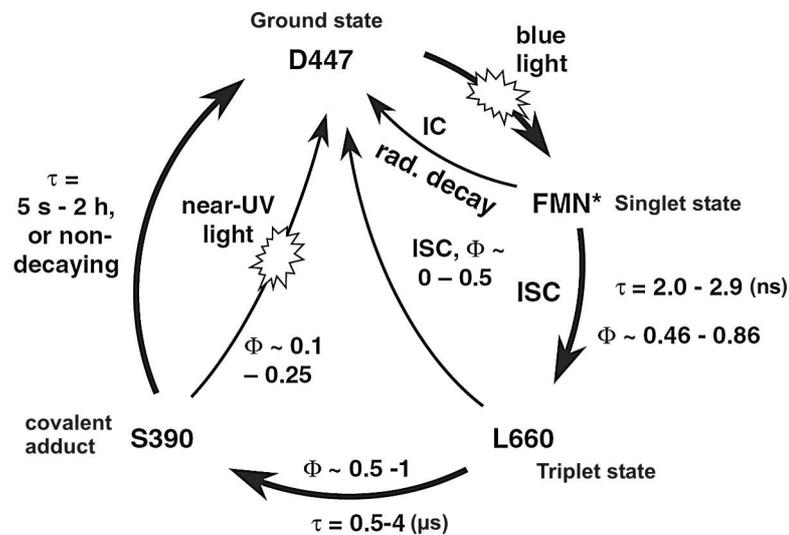


Abbildung 12: Schema des Photozyklus von LOV-Domänen.

Die Darstellung fasst Daten aus Untersuchungen von LOV1 & LOV2 aus pflanzlichen Phototropinen, LOV1 & LOV2 aus *Chlamydomonas* Phototropin, LOV aus *Bacillus subtilis* YtvA und *Pseudomonas putida* PpSB2-LOV zusammen. τ gibt den Bereich beobachteter Zeitkonstanten und ϕ den Bereich möglicher Reaktionsausbeuten an. IC = „internal conversion“, ISC = „Intersystem-Crossing“. Grundlegende Inhalte dieser Abbildung wurden aus [59] entnommen.

1.5 Der blaulicht-sensitive Photorezeptor YtvA aus *Bacillus subtilis*

Als besonders geeignet zur Untersuchung grundlegender molekularer Mechanismen der lichtinduzierten Signaltransduktion mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie erscheint der blaulicht-sensitive Photorezeptor YtvA aus dem gram-positiven Bodenbakterium *Bacillus subtilis*, da dieser viele der in Abschnitt 1.2 angeführten Voraussetzungen erfüllt. YtvA ist zwar schon seit einigen Jahren der Gegenstand intensiver Forschung, doch wurden bisher weder seine physiologische Funktionsweise, noch der zugrundeliegende intramolekulare Signaltransduktionsmechanismus zufriedenstellend aufgeklärt. Die bis zu Beginn dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen im Folgenden zusammenfassend dargestellt werden.

Das Protein YtvA, benannt nach seinem kodierenden Gen, wurde erstmalig 2001 in einer Arbeit von Akbar *et al.* als ein positiver Regulator des Stressantwort-vermittelnden Transkriptionsfaktors SigmaB identifiziert [64]. In dieser Studie blieb aber zunächst unklar, welche Stress-assoziierten Stimuli es vermitteln oder auf welche Weise es in die generelle Stressantwort von *Bacillus subtilis* involviert sein könnte. Da der N-terminale Bereich Homologie zu PAS-Domänen zeigte, wurde Licht als ein möglicher Stimulus in Betracht gezogen.

Erste Hinweise, dass YtvA ein putativer Photorezeptor sein könnte, wurden 2002 von Losi *et al.* gefunden [48]. Wie sich dabei herausstellte, enthält YtvA eine N-terminale, mit FMN assoziierte LOV-Domäne, deren Photozyklus analog zu Phototropinen verläuft und eine C-terminale STAS-Domäne (Sulfat Transporter und Anti-Sigma-Faktor Antagonist) [65] mit einer putativ Nukleotid-bindenden Funktion. Beide Domänen sind über einen 19 AS langen α -helikalen Bereich, ebenfalls als Ja-Helix bezeichnet, miteinander verbunden [66,67]. Insgesamt besteht YtvA aus 261 AS und sein Molekulargewicht beträgt ca. 30 kDa.

Da die Form der Domänen-Organisation ein spezifisches Merkmal pflanzlicher Phototropine ist, wird YtvA auch als bakterielles Gegenstück dieser Photorezeptoren angesehen [68]. Abbildung 13 veranschaulicht den modularen Aufbau von YtvA.

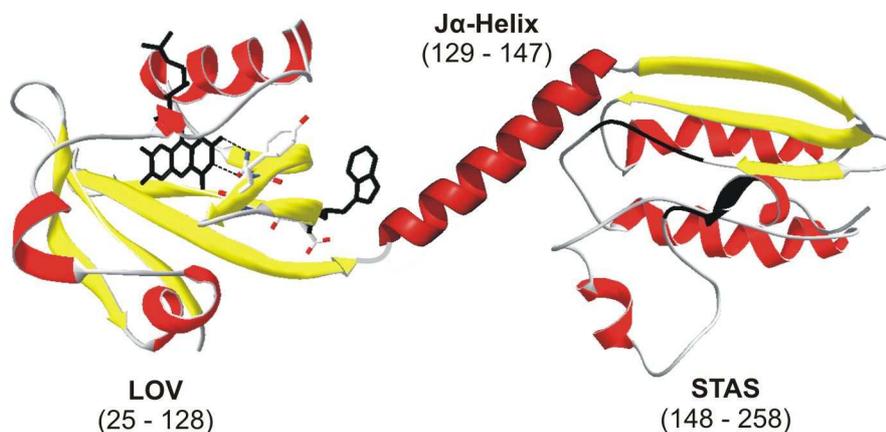


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von YtvA.

Visualisiert ist hier lediglich ein fiktives Modell, keine realen Verhältnisse. Zahlen in Klammern repräsentieren Domänengrenzen. Die Homologiemodelle der LOV- und der STAS-Domäne wurden entnommen aus [69].

Im Unterschied zu Phototropinen konvertiert YtvA mit einer Halbwertszeit von ca. 45 min relativ langsam in den Grundzustand zurück [70]. Bezogen auf die durchschnittliche Generationszeit von *B. subtilis* (ca. 1h bei optimalen Wachstumsbedingungen) stellt sich daher die Frage, ob die physiologische Anpassung an ein erhöhtes Stressniveau möglicherweise eine längere Triggerphase benötigt. Die vergleichsweise lange Halbwertszeit könnte aber auch das Resultat einer evolutionären Anpassung an geringe Lichtintensitäten sein, da sie die Beleuchtungsstärke der Umgebung mit dem Grad der mittleren Rezeptoraktivität korreliert, d.h. je länger die Halbwertszeit, desto mehr aktivierte Photorezeptormoleküle werden akkumuliert und umso stärker ist das an die Zelle vermittelte Signal. Auf diese Weise können selbst geringe Lichtintensitäten nach einer gewissen Zeit ein intrazelluläres Signal auslösen.

Den Nachweis, dass die lichtabhängige Aktivierung des stressassoziierten Transkriptionsfaktors SigmaB in *B. subtilis* durch YtvA vermittelt wird, erbrachten 2006 Avila-Perez *et al.* [71] und Gaidenko *et al.* [72], wobei letztgenannte Arbeitsgruppe zusätzlich zeigen konnte, dass YtvA in vivo mit einem großen Komplex aus paralogen Signalproteinen assoziiert ist. Aufgrund dieser Resultate wurde daher zunächst angenommen, die physiologische Funktion von YtvA wäre damit offengelegt, d.h. seine Photoaktivierung würde generell zur Auslösung einer Stressantwort führen.

Wie sich jedoch später in einer Studie von Suzuki *et al.* jedoch herausstellte, war diese Annahme scheinbar nicht zutreffend [73]. Demnach konnte in *B. subtilis*, das YtvA in wildtypspezifischen Mengen exprimiert, allein mittels Licht keine Stressantwort ausgelöst werden. Vielmehr erfolgte eine lichtabhängige Erhöhung der SigmaB-Aktivität nur, wenn über andere Stressfaktoren (z.B. Salzstress) bereits zuvor eine Stressantwort ausgelöst worden war. YtvA scheint eine Stressantwort also nur zu verstärken, kann selbst aber keine auslösen. Bezüglich der physiologischen Wirkungsweise könnte aber auch noch ein weiterer Faktor eine wichtige Rolle spielen, da Ergebnisse von Buttani *et al.* darauf hindeuten, dass YtvA die Nukleotide GTP und ATP mit mikromolarer Affinität bindet und sich die Stärke dieser Interaktion nach Photoaktivierung verringert [69,74]. Da die Bindestelle mit hoher Wahrscheinlichkeit in der STAS-Domäne lokalisiert und ihre Affinität lichtabhängig modulierbar ist, könnte sie die Schnittstelle zwischen intramolekularer und intermolekularer Signaltransduktion darstellen.

1.5.1 YtvA – Strukturelle Charakteristika

Die dreidimensionale Struktur des vollständigen Proteins wurde bisher noch nicht aufgeklärt, Möglich & Moffat konnten 2007 aber ein Teilstück des Rezeptors kristallisieren und davon mittels Röntgenstrukturanalyse eine hochaufgelöste 3D-Struktur berechnen [75] (Abbildung 14). Dieses Fragment, im Weiteren als YtvA-LOV-J α bezeichnet, beinhaltet die Aminosäuren 21-147, bestand also aus der LOV-Domäne (AS 25-126) sowie der C-terminalen J α -Helix (AS 127-147). Da YtvA-LOV-J α die photoaktive LOV-Domäne enthält, ergab sich die Möglichkeit, Strukturinformationen über den Grundzustand (PDB-Eintrag 2PR5) als auch den photoaktivierten Zustand (PDB-Eintrag 2PR6) zu gewinnen und anschließend miteinander zu vergleichen. Analog zu LOV2-Domänen pflanzlicher Phototropine, sind die strukturellen Unterschiede zwischen unbelichtetem und photoaktiviertem YtvA-LOV ebenfalls sehr klein (Abbildung 15). Dabei muss unbedingt berücksichtigt werden, dass die Struktur des aktiven Zustandes nur die Verhältnisse in einem belichteten Kristall widerspiegelt, da YtvA-LOV-J α nur im Grundzustand, also in Abwesenheit von Licht kristallisiert wurde.

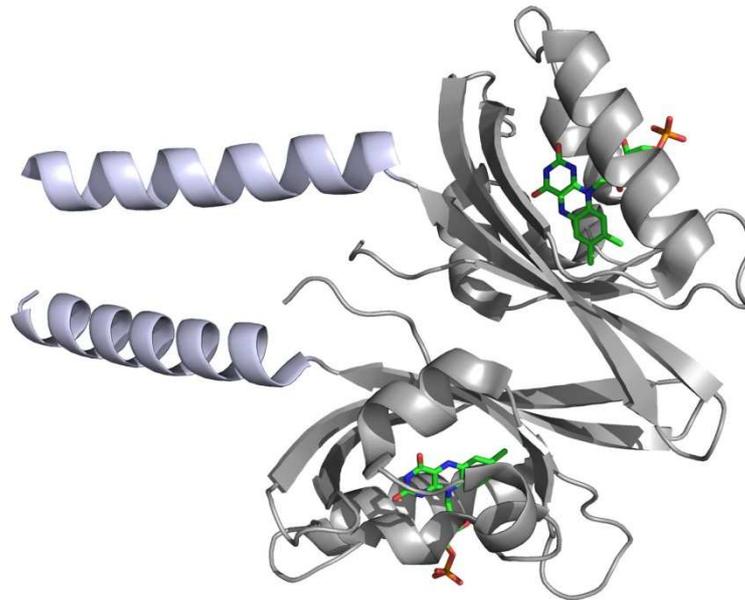


Abbildung 14: Kristallstruktur von YtvA-LOV-J α

Schematische Darstellung der von Möglich *et al.* [75] ermittelten 3D-Kristallstruktur von YtvA-LOV-J α im Grundzustand (PDB-Eintrag: 2PR5).

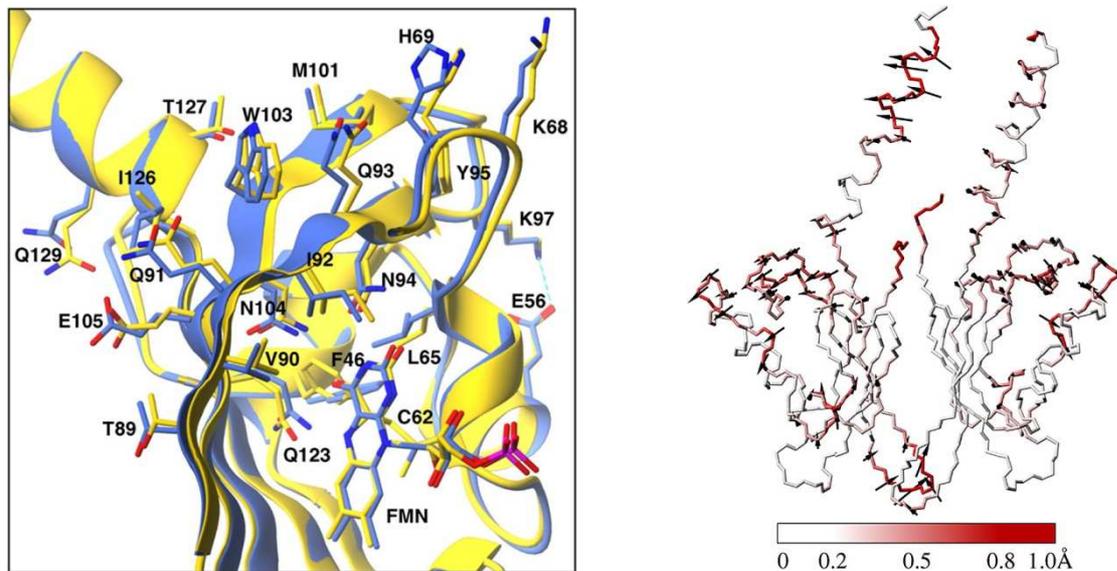


Abbildung 15: Strukturelle Unterschiede zwischen unbelichtetem & belichtetem YtvA-LOV-J α

Links: Überlagerung der unbelichteten (blau) und belichteten (gelb) YtvA-LOV-J α Struktur im Bereich der FMN-Bindetasche. Seitenketten sind nur von den Resten mit signifikanten Strukturunterschieden dargestellt. Rechts: Visualisierung der lichtinduzierten Strukturunterschiede auf Basis ermittelter Positionsunterschiede zwischen den Ca-Atomen der unbelichteten und belichteten Form (siehe Farbkodierung). Die Pfeile repräsentieren die Richtung und den Wert von Strukturveränderungen größer 0,4 Å Die Abbildungen wurden entnommen aus [75].

Wie schon in Abschnitt 1.3.1 bei der Betrachtung von AsPhot1-LOV2-J α erwähnt, führt dessen Aktivierung unter nativen Bedingungen zu einer beträchtlichen Strukturveränderung der J α -Helix bzw. zu ihrer Ablösung von der LOV2-Domäne. Da dieser Vorgang in Kristallen jedoch nicht möglich ist und daher auch nicht über den Vergleich von Kristallstrukturen erfasst werden kann, ist keine Aussage darüber möglich, ob sich die J α -Helix von YtvA-LOV-J α unter nativen Bedingungen bei Belichtung ebenfalls entfaltet. Basierend auf den Ergebnissen von Möglich & Moffat [75] soll deshalb zunächst nur die Struktur des Grundzustandes näher betrachtet werden.

Im Gegensatz zu den monomeren LOV-J α -Konstrukten pflanzlicher Phototropine bildet YtvA-LOV-J α ein nahezu symmetrisches Homodimer („Head to Head Dimer“). Beide J α -Helices sind lösungsexponiert, in dieselbe Richtung orientiert und stehen über einige Aminosäuren in intermolekularem Kontakt mit J α -Helices benachbarter Dimere. Diese Interaktion ist jedoch die Folge der Kristallpackung, sodass keine Aussage darüber möglich ist, wie die J α -Helices unter nativen Bedingungen tatsächlich orientiert sind. Die Dimerisierungsfunktion wird über das zentrale β -Faltblattmotiv der LOV-Domäne realisiert und basiert auf hydrophoben Wechselwirkungen. Aufgrund der großen Kontaktfläche ($\sim 1280 \text{ \AA}^2$) beträgt die freie Energie der Dimerisierung etwa -30 bis -40 kJ/mol.

Mittels Analytischer Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass die Dimerisierung von YtvA-LOV-J α auch dem Zustand in Lösung entspricht und nicht etwa ein Kristallisationsartefakt darstellt. Basierend auf Analytischer Gelfiltration wurde diese Eigenschaft auch zuvor schon von Buttani *et al.* beschrieben, zusätzlich deuten ihre Ergebnisse aber auch darauf hin, dass YtvA in Lösung hauptsächlich als Monomer vorliegt [76]. Da die Exposition der hydrophoben LOV-LOV Interaktionsfläche energetisch sehr unwahrscheinlich ist, muss diese in der monomeren Spezies über die Interaktion mit der STAS-Domäne abgesättigt sein. Ein Nachweis für diese Interaktion steht noch aus.

Im Unterschied zu Phototropinen besitzt die J α -Helix in YtvA einen weniger amphipatischen Charakter und ist über eine deutlich kürzere Loopsequenz mit der LOV-Domäne verbunden [66,67]. Eine Assoziation zwischen LOV-Domäne und J α -Helix analog zu Phototropinen erscheint daher sehr unwahrscheinlich [75]. Strukturinformationen über den N-terminalen Teil (AS 1-24, nachfolgend als Ncap bezeichnet) und die STAS-Domäne beruhen lediglich auf Sekundärstrukturvorhersagen und Daten aus CD-Messungen, sowie für STAS zusätzlich auf Homologiemodellen [69,76]. Ncap scheint demnach hauptsächlich α -helikale Strukturanteile zu besitzen, genauere Details sind bisher aber noch unbekannt.

Auf Basis der Kristallstruktur des Anti-Sigma-Faktor Antagonisten TM1442 (PDB-Eintrag: 1VC1) aus *Thermotoga maritima* berechneten Buttani *et al.* ein Strukturmodell der STAS-Domäne (s. Abbildung 13), dass wegen der geringen Sequenzhomologie zwischen TM1442 und YtvA-STAS aber nur als eine grobe Näherung betrachtet werden

sollte [69]. Das gilt insbesondere für die Regionen, welche die Nukleotid-Bindung vermitteln könnten, da deren Raumstruktur erheblich von der Orientierung wenig strukturierter Loops determiniert wird. In YtvA-STAS sind das die Sequenzbereiche D₁₉₃LSG und N₂₃₆KLD, zwei klassische Motive, die auch in vielen anderen Proteinen an der Bindung von Nukleotiden beteiligt sind [77].

1.5.2 YtvA - Intramolekulare Signaltransduktion

Da bislang noch Unklarheit darüber herrscht, in welchem Oligomerisierungszustand YtvA tatsächlich vorliegt (Monomer oder Dimer), werden derzeit 2 Modelle zur Beschreibung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen bzw. deren lichtabhängiger Beeinflussung diskutiert. Der initiale Vorgang der intramolekularen Signaltransduktion, die lichtinduzierte Veränderung der Eigenschaften des zentralen β -Faltblattes, gilt für beide Modelle jedoch gleichermaßen.

In der monomeren Form würde dadurch die LOV-STAS-Interaktion verändert, bisher ist aber unklar, auf welche Weise das zur Aktivierung der STAS-Domäne führt, denn unabhängig vom Aktivierungszustand scheinen LOV und STAS in engem Kontakt zu bleiben und weder Konformation noch Sekundärstruktur erfahren größere lichtabhängige Veränderungen [66,67,70]. Losi *et al.* vermuteten daher, Wechselwirkungen mit potentiellen Interaktionspartnern würden weniger durch Konformationsänderungen, sondern vielmehr durch eine veränderte Protein-Dynamik beeinflusst [70].

Im Gegensatz dazu favorisieren Möglich *et al.* ein Dimer-Modell, in welchem die molekulare Schaltfunktion über eine lichtinduzierte Reorientierung der monomeren Untereinheiten realisiert wird [75]. Die $J\alpha$ -Helices scheinen dabei wie verlängerte Hebel der LOV-Domänen zu wirken, wodurch eine kleine gegensätzliche Rotation des LOV-LOV-Dimers in eine größere Auslenkung der C-terminalen Helixenden transformiert wird. Im Prinzip ähnelt das der Funktionsweise einer Schere, deren Lager im Bereich des β -Faltblattes lokalisiert ist. Der Rezeptor könnte auf diese Weise entweder in eine weiter geöffnete Konformation oder einen Zustand veränderter konformationeller Dynamik übergehen, ohne dass dazu größere Strukturveränderungen seiner monomeren Untereinheiten notwendig wären.

Wie CD-spektroskopische Untersuchungen gezeigt haben, scheint sich der α -helikale Strukturanteil in YtvA-LOV- $J\alpha$ bei Belichtung um ca. 10% zu verringern, sodass für Möglich *et al.* auch ein Mechanismus vorstellbar wäre, der eine partielle Entfaltung der $J\alpha$ -Helix berücksichtigt [75]. Da in YtvA aber prinzipiell auch die STAS-Domänen miteinander in Interaktion stehen könnten, ergibt sich für den Ablauf der intramolekularen Signaltransduktion eine Vielzahl an Möglichkeiten.

Obwohl die Domänenorganisation in YtvA dem Aufbau pflanzlicher Phototropine (ab der LOV2-Domäne) im Prinzip sehr ähnlich ist und der $J\alpha$ -Helix in beiden Rezeptortypen eine zentrale Funktion bei der Signalübertragung von der Sensor- auf die Effektordomäne zukommt, unterscheidet sich der Mechanismus der intramolekularen Signaltransduktion zwischen diesen Photorezeptoren jedoch grundlegend.

Ein Ziel dieser Arbeit, die Untersuchung der molekularen Wechselwirkungen zwischen den Domänen in YtvA, könnte daher erheblich dazu beitragen, besser zu verstehen, welche Eigenschaften die LOV-Domäne zu einem so universellen Sensormodul machen und durch welche intra- bzw. intermolekularen Interaktionen die Aktivität von Effektordomänen gesteuert wird.

2 Zielstellung

Licht, als primärer, lebenserhaltender Energieträger oder als Charakteristikum der Umwelt, spielt für eine Vielzahl von Organismen eine essentielle Rolle. Vor allem Pflanzen, aber auch Pilze und Bakterien haben daher eine Reihe verschiedener Photorezeptoren zur Wahrnehmung von Licht entwickelt. Diese ermöglichen eine lichtabhängige Regulation von biochemischen Stoffwechselwegen und die Steuerung physiologischer Reaktionen. Das Verständnis dieser lichtgesteuerten regulatorischen Mechanismen ist daher ein wichtiges Anliegen der aktuellen Forschung. Photorezeptoren fungieren dabei als die Signalwandler, welche das Licht, also einen extrazellulären Stimulus, in ein intrazelluläres Signal konvertieren.

Grundlegende Prinzipien dieser Form der Signaltransduktion können jedoch nur durch die Untersuchung von Vorgängen auf atomarer Ebene abgeleitet werden. Eine sehr leistungsfähige Methode zum Studium dieser Vorgänge und zur Aufklärung molekularer Strukturen ist die Lösungs-NMR Spektroskopie. Sie bietet die Möglichkeit, Proteine unter nativen Bedingungen und bei physiologischen Temperaturen strukturell zu charakterisieren und darüber hinaus auch strukturdynamische Prozesse zu erfassen.

Der bakterielle Photorezeptor YtvA erfüllt viele der notwendigen Voraussetzungen, um als Modellsystem zur Untersuchung von Mechanismen der lichtabhängigen Signaltransduktion zwischen einer Sensor- und einer Effektor-domäne eingesetzt zu werden (s. Abschnitt 1.2). Die relativ simple Domänenstruktur (s. Abschnitt 1.5) und der bereits sehr detailliert aufgeklärte Photozyklus [70] sind weitere Eigenschaften, die YtvA als geeignetes Modellsystem prädestinieren.

Die LOV-Domäne konnte in unbelichtetem Zustand kristallisiert und ihre dreidimensionale Struktur in atomarer Auflösung per Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden [75]. Da die kristallisierte Domäne photochemisch aktiv war, konnten auch einige Merkmale der photoaktivierten Form erfasst werden.

Unklar ist bisher, in welchem Oligomerisierungszustand (Monomer/Dimer) YtvA vorliegt, wie die Domänen innerhalb des Proteins organisiert oder miteinander assoziiert sein könnten und wie ein lichtinduziertes Signal von der LOV- auf die STAS-Domäne übertragen wird. Der Mechanismus der intermolekularen Signaltransduktion von YtvA auf potentielle Zielmoleküle ist bisher ebenfalls noch unverstanden. Es wird vermutet, dass die STAS-Domäne mit GTP interagiert und dass diese Interaktion lichtabhängig moduliert wird [69].

Die Beantwortung dieser Fragen ist das gemeinsame Ziel zweier Forschungsarbeiten.

Während sich eine Forschungsarbeit vor allem mit der Struktur bzw. den lichtinduzierten Strukturänderungen des Volllängeproteins beschäftigt und auch die möglichen Interaktionspartner von YtvA untersucht, befasst sich diese Arbeit vorrangig mit der Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen N- und C-terminal verschiedener terminierter Versionen der isolierten Sensor- und Effektor-domäne.

Die Aufteilung des Projektes erfolgte aufgrund des hohen, zu erwartenden Arbeitsaufwandes für die Präparation verschiedener und unterschiedlich isotopenmarkierter Proteine bzw. Proteindomänen. Da YtvA bereits als Monomer ein Molekulargewicht von etwa 30 kDa besitzt, ist die angestrebte sequentielle Zuordnung seiner Aminosäuren keine triviale Aufgabe und weil auch der photoaktivierte Zustand erfasst werden soll, vervielfacht sich der Arbeitsaufwand zusätzlich.

Daher ist es sinnvoll, die kleineren Einzeldomänen sequentiell zuzuordnen und diese Ergebnisse dann zur sequentiellen Zuordnung von YtvA zu nutzen. Auf dieser Basis soll dann auch die Proteindynamik der unbelichteten und photoaktivierten Proteine untersucht werden. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit ist die genaue Lokalisation der GTP-Bindestelle, da die lichtinduzierte Modulation der GTP-Bindung das entscheidende Bindeglied zwischen intra- und intermolekularer Signaltransduktion darstellen könnte.

Neben der Lösungs-NMR-Spektroskopie sollen auch die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) und die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) zur Anwendung kommen.

Da YtvA bzw. die LOV-Domäne eine, bezogen auf die Dauer von NMR-, AUZ- und SAXS-Experimenten, sehr kurze Halbwertszeit des photaktivierten Zustandes besitzen (~45 min bei 25°C), können die photoaktivierten Proteine mit diesen Methoden nur bei kontinuierlicher Belichtung untersucht werden. Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit ist daher auch die Entwicklung und der Aufbau von speziell an diese Methoden angepassten Belichtungssystemen. Den Schwerpunkt bildet dabei der Bau einer glasfasergekoppelten Lichtquelle, die eine Bestrahlung von NMR-Proben direkt im NMR-Spektrometer ermöglicht.

3 Material & Methoden

3.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien zur Herstellung von Pufferlösungen, Nährmedien und Elektrophorese-Gelen von den Firmen Merck®, Sigma-Aldrich®, Roth®, VWR-International®, Invitrogen®, Roche-Diagnostics® und Calbiochem® in hohen (zur Synthese) bis höchsten (pro Analyse) Reinheitsgraden verwendet. Für speziellere Einsatzzwecke wurden darüber hinaus die in Tabelle 2 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tabelle 2: Spezielle Chemikalien

Substanz	Hersteller
¹⁵ N-Ammoniumchlorid	Cambridge Isotope Laboratories
Autoinduktionsmedium (Overnight Express™)	Novagen®
D-(+)-Biotin	Roth®
BODIPY®-TR-Methylester	Invitrogen®
BODIPY®-TR-GTP	Invitrogen®
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich®
Bromphenolblau	Roth®
Chloramphenicol	Roth®
Complete® Protease Inhibitor Mix (EDTA-frei)	Roche-Diagnostics®
Coomassie Brilliant Blau G250 & R250	Roth®
Deuteriumoxid (D ₂ O) 99,8%	Eurisotop®
Dithiothreitol (DTT)	Roth®
Ethidiumbromid	Roth®
Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich®
Flavinmononukleotid (FMN), Natriumsalz	Sigma-Aldrich®
D-(+)-Glucose, wasserfrei	Roth®
D-(+)- ¹³ C-Glucose	Cambridge Isotope Laboratories
D-(+)- ¹³ C-D ₇ -Glucose	Cambridge Isotope Laboratories
Guanosintriphosphat (GTP)	Invitrogen®
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth®
Kanamycin	Sigma-Aldrich®
Natriumdeuteroxid (NaOD)	Sigma-Aldrich®
N-Laurylsarkosin	Sigma-Aldrich®
β-Mercaptoethanol	Roth®
Natriumazid	Roth®
Pfl-Phagen (50 mg/ml) Lot:11083	Hyglos GmbH
Riboflavin	Roth®
TCEP (Tris-(2-chlorethyl)-phosphat)	Calbiochem®
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth®
Thiamin-HCl	Serva Feinbiochemika®

3.1.2 Molekularbiologische und biochemische Kits

Tabelle 3: Molekularbiologische Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Montage DNA Gel Extraction Kit	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Millipore®
KOD HotStart PCR Kit	Polymerase-Kettenreaktion	Novagen®
Nucleospin® Plasmid Preparation Kit	Isolierung von Plasmiden aus E. coli	Macherey-Nagel®
Ligation Independent Cloning Kit	Ligationsfreie Klonierung von DNA-Sequenzen in LIC-kompatible Vektoren	Novagen®
FastDigest® Restriction System	Restriktionsverdau von DNA	Fermentas®
BCA Protein Assay Kit	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	Pierce®

3.1.3 Nährmedien und Lösungen

Tabelle 4: Nährmedien und Lösungen

Medium	Zusammensetzung (für 1 Liter)
LB-Medium	5 g Hefeextrakt 10 g Pepton 10 g NaCl
LB-Agar	5 g Hefeextrakt 10 g Pepton 10 g NaCl 15 g Agar-Agar
TB-Medium	24 g Hefeextrakt 12 g Pepton 2,31 g KH ₂ PO ₄ 12,54 g K ₂ HPO ₄ 4 ml Glycerol
Nährbouillon	3 g Fleischextrakt
2xM9-Medium	200 ml 10xM9-Salzlösung 20 ml Spurenelemente-Lösung (100x) 2 mM MgSO ₄ 300 µM CaCl ₂ 3 mg Thiamin-HCl 3 mg Biotin 8 g Glucose 2 g NH ₄ Cl
10xM9-Salzlösung	72,8 g Na ₂ HPO ₄ 20 g KH ₂ PO ₄ 5 g NaCl
100x Spurenelemente-Lösung	5 g EDTA 500 mg FeSO ₄ 50 mg ZnCl ₂ 10 mg CuSO ₄

3.1.4 Geräte, Messinstrumente und technische Systeme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden u.a. die in folgender Tabelle aufgeführten Geräte, Messinstrumente und technischen Systeme verwendet.

Tabelle 5: Geräte, Messinstrumente und technische Systeme

Inkubatoren	Multriton-2 (INFORS) Innova® 4000 Incubator (New Brunswick Scientific)
Homogenisierer	EmulsiFlex-C3 High-Pressure Homogenizer (Avestin®)
Lyophilisationsanlage	Christ® alpha2-4 (Sartorius®)
Zentrifugen	Avanti® J-25 Centrifuge (Beckman-Coulter®) Allegra® X-22R (Beckman-Coulter®) Allegra® 21R (Beckman-Coulter®) Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf®)
ITC-Calorimeter	Microcal® VP-ITC
Flüssigkeitschromatographie	FPLC-System LKB-GP-10 (PharmaciaBiotech®) Workstation Vision® (Applied Biosystems®) Profinia Purification System (Bio-Rad®) Äkta Purifier FPLC-System (GE-Healthcare®) HPLC-System LC-6A (Shimadzu®) HPLC-System
NMR-Spektrometer (mit „5mm triple-resonance PFG (z-axis) cryo probe head“)	Bruker Avance™ II 600 MHz Bruker Avance™ III 600 MHz Bruker Avance™ II 750 MHz Bruker Avance™ II 900 MHz
UV-Vis Photometer	NanoDrop® DU-520 (Beckman-Coulter®) Ultrospec2000 (Pharmacia Biotech®)
CD-Spektrometer	Jasco® Spectropolarimeter J-720
Fluoreszenzspektrometer	Jasco® Spectrofluorometer FP-6500
Analytische Ultrazentrifuge	Optima® XL-I (Beckman-Coulter®)
Massenspektrometer	MALDI-TOF/TOF™ 5800
Hochzelldichte-Fermentation	FedBatch Pro® (Dasgip®)
PCR-Thermocycler	Mastercycler® ep gradient S (Eppendorf®)
Tecan-Reader™	Tecan Safire
Geldokumentation	Gel-Doc EQ (Bio-Rad®)
Fasergekoppelte Lichtquelle	Eigenentwicklung in dieser Arbeit (s. Abschnitt 4.1.3)
AUZ-Lichtquelle	Eigenentwicklung in dieser Arbeit (s. Abschnitt 4.1.2)
Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle	Eigenentwicklung in dieser Arbeit (s. Abschnitt 4.1.1)
Kleinwinkel-Röntgenstreuung	X33-Kamera, Speicherring DORIS-III am EMBL in Hamburg

3.1.5 Bakterienstämme

Zur Klonierung, zur Expression rekombinanter Proteine sowie für biochemische Untersuchungen wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 6 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Tabelle 6: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> NovaBlue	endA1 hsdR17 (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA gyrA96 relA1 lacF' [proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15::Tn10] (Tet ^R)	Novagen®
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ φ80lac15 D(lacZY A'argF) U169 recA1 hsdR17 (rK ⁻ mK ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen®
<i>E. coli</i> T7-Express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene 1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dem] R(zgb-210::Tn10--TetS)endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	NEB®
<i>E. coli</i> T7-Express Rosetta-2	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene 1 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--TetS)2 [dem] R(zgb-210::Tn10--TetS)endA1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10 pRARE2 (Cam^R)</i>	NEB®
<i>B. subtilis</i> DSM-402	Wildtyp	Deutsche Stammsammlung

3.1.6 Klonierungsvektor

Für die ligationsfreie Klonierung sowie die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* wurde ausschließlich der Vektor pET-30 EK/LIC der Firma Novagen® verwendet. Dieser vermittelt Resistenz gegen Kanamycin und ermöglicht eine vom T7-Promoter kontrollierte Expression rekombinanter Proteine, die eine N-terminale Hexa-Histidin-Sequenz enthalten. Abbildung 16 zeigt schematisch die Vektorkarte sowie die Region um die multiple Klonierungsstelle.

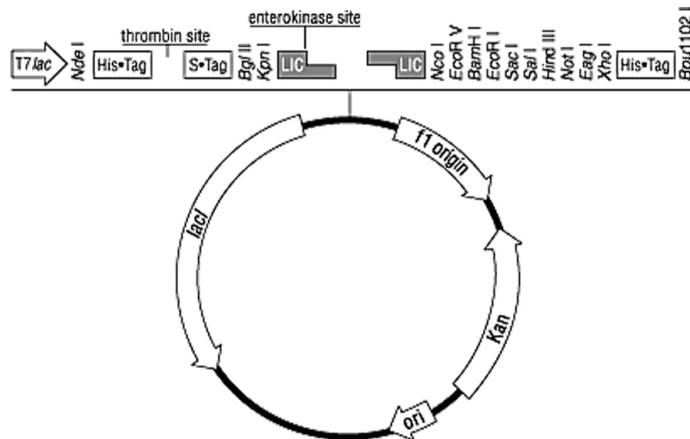


Abbildung 16: Vektorkarte von pET-30 EK/LIC (Novagen®)

3.1.7 Oligonukleotide

Zur Amplifizierung von Gensequenzen mittels PCR wurden in dieser Arbeit die folgenden, von der Firma Biotex® (Berlin) synthetisierten Oligonukleotide verwendet. Die Oligonukleotide Nr. 1-7 wurden mit der Software „FastPCR“ entworfen und auf einen möglichst gleichen Schmelztemperaturbereich optimiert. Die Oligonukleotide Nr. 9 & 10 wurden von der Firma Invitex® (Berlin) zur Sequenzierung verwendet.

Tabelle 7: Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz
1	TEV_YtvA_A2	5'-AACCTGTATTTCCAGGGAGCTAGTTTTCAATCATTGGGATAC-3'
2	TEV_YtvA_D21	5'-AACCTGTATTTCCAGGGAGATCACGTGCGAGTCGGT-3'
3	TEV_STAS_K128	5'-AACCTGTATTTCCAGGGAAAGCAAAAAGAATATGAAAAGC-3'
4	TEV_STAS_T148	5'-AACCTGTATTTCCAGGGAACCTCCTATTGTCCCGATTTCG-3'
5	YtvA_K128_STOP	5'-GAGGAGAAGCCCGGTTTACTTGGTGATATCATTCTGA-3'
6	YtvA_S147_STOP	5'-GAGGAGAAGCCCGGTTTATGAAAGTGCAGTAATTTCCGT-3'
7	YtvA_M261_STOP	5'-GAGGAGAAGCCCGGTTTACATAATCGGAAGCACTTTAACG-3'
8	EK_LIC_TEV	5'-GACGACGACAAGATGGAAAACCTGTATTTCCAG-3'
9	T7_Promoter	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
10	T7_Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

3.1.8 Software

Für die Bearbeitung, Auswertung und graphische Darstellung experimenteller Daten wurden die folgenden Programme, Softwarepakete und webbasierten Anwendungen benutzt.

Tabelle 8: Software

Anwendung	Hersteller / Referenz
Adobe Photoshop 6.0	Adobe®
Amber 11.0	http://ambermd.org [78]
CCPN 2.1.5	[79]
ChemBioOffice 2008	PerkinElmer®
Corel Draw 11	Corel Corporation®
CS-Rosetta	http://spin.niddk.nih.gov/bax [80,81]
CurveFit 1.4	http://www.palmer.hs.columbia.edu/software/curvefit.html [82] (© Arthur G. Palmer)
DAMAVER	Volkov, V. V. & Svergun, D. I. [83]

Anwendung	Hersteller / Referenz
DAMMIF	Franke, D. & Svergun, D. I. [84]
DAMMIN	Svergun, D. I. [85]
DichroWeb	http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml [86,87]
FastPCR	http://primerdigital.com/fastpcr.html [88]
GASBOR	Svergun <i>et al.</i> [89]
GNOM	Svergun <i>et al.</i> [90]
Gnuplot	http://www.gnuplot.info
HeliQuest	http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/ [91]
MS Office 2003 / 2007	Microsoft® Corporation
Module 1.0	http://www.ibs.fr/ext/labos/LRMN/softs/module.html [92]
NMR-Pipe	http://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe [93]
Notepad++ 4.9.1	http://notepad-plus-plus.org
Origin® 7.0 / 8.5	OriginLab®
Pine Webserver	http://pine.nmrfam.wisc.edu [94]
PRIMUS	Konarev <i>et al.</i> [95]
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam [96]
Pymol	http://pymol.org [97,98]
Reference Manager 10	Thomson Reuters®
Sedfit	http://www.analyticalultracentrifugation.com [99,100]
Sednterp 1.09	http://www.jphilo.mailway.com/download.htm [101] (University of New Hampshire)
Sedphat 9.01	http://www.analyticalultracentrifugation.com [102–108]
SUPCOMB	Kozin, M. B. & Svergun, D. I. [109]
Talos+	http://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/talos [110]
Tensor2	http://rmni.iqfr.csic.es/HTML-manuals/TENSORV2_DOC/theory.html [111]
Topspin 2.1	Bruker BioSpin®
UCSF-Chimera	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera [112]
UltraSpin 2.7	http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/dbv/ultraspin2 (Medical Research Council, UK)
Vector-NTI® Advance 11	Invitrogen®
WinLens 4.4	Linos® Photonics
WinNonLin 1.06	http://www.biotech.uconn.edu/auf/?i=aufftp [113]

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Sequenzen wurde mittels PCR in einem Thermocycler durchgeführt. Zur Herstellung entsprechender Reaktionsansätze wurde das „KOD HotStart PCR-Kit“ gemäß Herstellerangaben verwendet. Als DNA-Matrize wurde ein von Losi *et al.* generierter Vektor eingesetzt, welcher die kodierende Sequenz von YtvA (GeneID: NC_000964.3) enthält [48]. Um die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Hexa-Histidin-Tags zu ermöglichen (s. Abschnitt 3.4.3.2), wurde zunächst in einer ersten PCR über entsprechende Vorwärts-Primer die kodierende Sequenz für die Spaltstelle der TEV-Protease (TEV = Tobacco Etch Virus) angefügt. Das Codon des N-terminalen Methionins wurde dabei durch eine für Glycin kodierende Sequenz ersetzt. Nach Abtrennung über eine Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 3.2.2) und anschließender Extraktion aus dem Agarosegel mittels des „Montage DNA Gel Extraction Kit“, wurden die PCR-Produkte als Matrizen in einer zweiten PCR eingesetzt. Durch Verwendung des Vorwärts-Primers „EK_LIC_TEV“ (s. Tabelle 7) wurden in dieser Reaktion anschließend Sequenzen mit entsprechenden 5'-Überhängen für die ligationsunabhängige Klonierung (s. Abschnitt 3.2.3) generiert. Die Isolierung und Reinigung der PCR-Produkte erfolgte, wie zuvor beschrieben. Die für die PCR verwendeten Parameter sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 9: Parameter der PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	20	
Anlagerung	54	30	30
Elongation	72	45	
Terminale Elongation	72	300	1
Lagerung	4	∞	1

3.2.2 Agarosegelelektrophorese

Diese Methode [114] wurde zur Analyse und Isolierung von PCR-Produkten sowie zur Kontrolle von Restriktionsverdauen eingesetzt. Je nach Länge der aufzutrennenden DNA wurden Gele mit 1-1,5% Agarose verwendet. Zur Anfärbung der DNA enthielten diese 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Der Laufpuffer bestand aus 40 mM Tris-Acetat pH=8 und 100 µM Na₂EDTA. Zu analysierende Proben wurden im Verhältnis 6:1 mit 6x Probenpuffer (60 mM Tris-HCl pH=7,6 / 6 mM EDTA / 60 Vol-% Glycerol / 0,03% Bromphenolblau) gemischt. Pro Geltasche wurden maximal 15 µl Probe aufgetragen. Die

Elektrophorese wurde im „Hoefer® HE33 Gelsystem“ bei einer Spannung von 120 V durchgeführt. Als Größenstandard wurden Marker der Serie „FastRuler®“ (#SM1103, #SM1113, #SM1123) von Fermentas® verwendet. Die Analyse und Dokumentation der Gele erfolgte mit dem „Gel Doc EQ“ von Bio-Rad®.

3.2.3 Klonierung

DNA-Sequenzen wurden über eine ligationsunabhängige Klonierung (LIC = Ligation Independent Cloning) [115] in den Zielvektor pET-30 EK/LIC inseriert. Dazu wurde das „LIC-System“ von Novagen® entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Insgesamt wurden kodierende Sequenzen für 8 verschiedene YtvA-Konstrukte (s. Abbildung 17) kloniert, wobei das Konstrukt YtvA_D21S147 (LOV-Jα) von Aaron Hahn im Rahmen seiner von mir betreuten Diplomarbeit kloniert wurde.

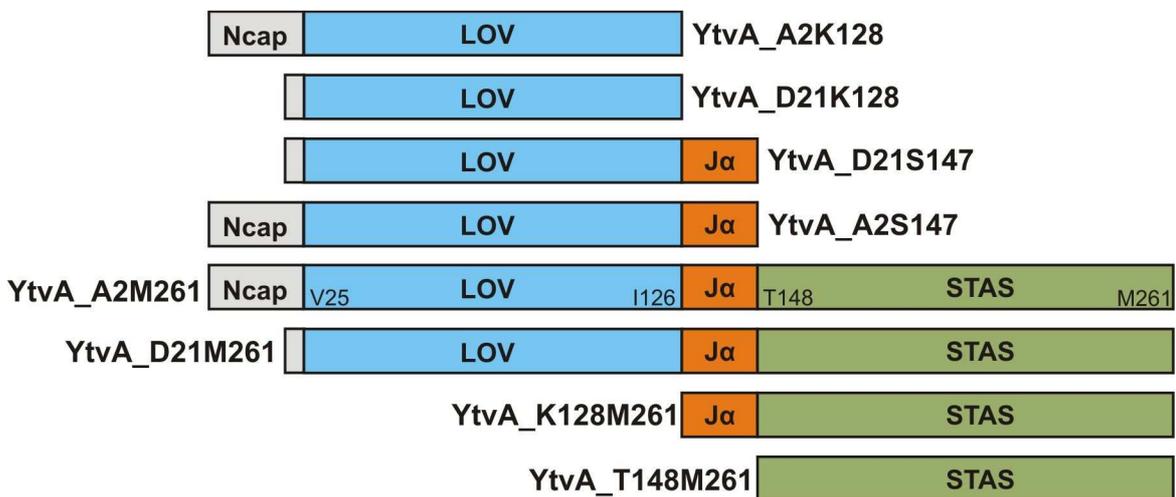


Abbildung 17: Klonierte YtvA-Konstrukte.

Zur Abgrenzung von Domänen (LOV & STAS) bzw. Sequenzelementen (Ncap & Jα) sind diese farblich hervorgehoben. Die N- und C-terminalen Aminosäuren der einzelnen Konstrukte sind in der Bezeichnung angegeben und entsprechen den Sequenzpositionen im vollständigen Protein.

Die Integrität der klonierten Sequenzen wurde durch Restriktionsverdau (s. Abschnitt 3.2.4) und bidirektionale Sequenzanalyse überprüft. Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Invitek® (Berlin) ausgeführt.

3.2.4 Restriktionsverdau

Die Insertion von YtvA-Sequenzen in den Zielvektor pET-30 EK/LIC wurde mittels Restriktionsverdau und anschließender Agarosegelelektrophorese (s. Abschnitt 3.2.2) überprüft. Der Restriktionsverdau erfolgte mit dem „FastDigest® Restriction System“ von Fermentas® gemäß Herstelleranweisung. Als Restriktionsendonuklease wurde *PstI* eingesetzt. Da nur die klonierten YtvA-Sequenzen diese Schnittstelle besitzen, werden durch *PstI* nur Vektoren mit eben diesen Sequenzen linearisiert. Die Auswahl von *PstI*

erfolgte aufgrund einer vorangegangenen Restriktionsanalyse der gesamten Vektorsequenz mittels der Software „Vector-NTI® Advance 11“ von Invitrogen®.

3.2.5 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli*

Zur Plasmidpräparation aus *E. coli* wurde das „Nucleospin® Plasmid Preparation Kit“ von Macherey-Nagel® gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Transformation von *E. coli*

Plasmide wurden für Klonierungszwecke sowie zur Proteinexpression ausschließlich per Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Dazu wurden in dieser Arbeit die in Tabelle 6 aufgeführten *E. coli* Stämme verwendet. Aliquots (20-50 µl) chemisch kompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-Lösung ($V = 0,5 \mu\text{l}$, $c = 50\text{-}200 \text{ ng}/\mu\text{l}$) versetzt, 5 Minuten auf Eis inkubiert, 60 Sekunden auf 42°C temperiert und für 5 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Aliquots mit 250-500 µl LB-Medium (+ 2% Glucose) versetzt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Davon wurden dann 50-75 µl auf LB-Agar-Platten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und die Platten für 24-36 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion wurden 50 µg/ml Kanamycin und bei Verwendung von Rosetta2® Stämmen zusätzlich 34 µg/ml Chloramphenicol eingesetzt.

3.3.2 Herstellung von Glycerol-Dauerkulturen

Von einer frischen Transformationsplatte wurden mit sterilen Eppendorf-Spitzen mindestens 4 Einzelkolonien entnommen, separat in Kulturröhrchen mit 3,5 ml LB-Medium (+ 2% Glucose, + Selektionsantibiotikum) überführt und im Schüttelinkubator bei 37°C einige Stunden kultiviert ($OD_{600} = 0,5\text{-}1/\text{ml}$). Danach wurden von jeder Kultur 500 µl abgenommen, separat in Kryoröhrchen mit 500 µl 50% Glycerol gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C eingelagert.

3.3.3 Expressionstest und Klonselktion

Die Kulturen, welche zur Herstellung von Glycerol-Dauerkulturen dienten, wurden auch zur Analyse der Proteinexpression der einzelnen Klone verwendet. Als Negativkontrolle wurden zunächst 1 OD_{600} Zellen abgenommen und bei -20°C eingefroren. Der Rest der Kultur wurde mit IPTG (Endkonzentration = 1 mM) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Davon wurden ebenfalls 1 OD_{600} Zellen entnommen und aus diesen sowie den Zellen der Negativkontrolle SDS-Proben hergestellt (s. Abschnitt 3.4.2). Mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.4.1) wurde anschließend der am stärksten überexprimierende Klon identifiziert.

3.3.4 Optimierung der Expressionsbedingungen

Zur Maximierung der exprimierten Proteinmenge wurde die Stärke der Proteiexpression von zuvor selektierten Klonen (s. Abschnitt 3.3.3) bei verschiedenen Temperaturen und nach verschiedenen Zeitintervallen analysiert. Zunächst wurden Übernachtskulturen (ÜNK) angesetzt (3,5 ml LB-Medium, + 2% Glucose, + Selektionsantibiotikum), wobei das Medium direkt aus Glycerol-Dauerkulturen angeimpft und bei 37°C inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurde damit frisches Medium (wie oben, V = 25 ml) zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,1/ml angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8/ml inkubiert. Danach wurden 1 OD₆₀₀ Zellen als Negativkontrolle abgenommen und die Kultur in 3,5 ml Aliquots auf eine entsprechend benötigte Anzahl Kulturröhrchen verteilt. Diese wurden dann bei verschiedenen Temperaturen (37°C, 30°C, 25°C, 22°C) inkubiert und ca. 20 min später mit IPTG (Endkonzentration = 1 mM) induziert. Nach verschiedenen Zeiträumen (1 h, 2 h, 4 h, 18 h) wurden davon Proben entnommen (je 1 OD₆₀₀) und zusammen mit der Kontrolle per SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.4.1) analysiert.

3.3.5 Expression in Schüttelkultur

In Schüttelkultur wurden ausschließlich unmarkierte Proteine hergestellt. 25 ml TB-Medium (+ 2% Glucose, + Selektionsantibiotikum), angeimpft mit entsprechender Glycerol-Dauerkultur, wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Damit wurden dann 400 ml Großkulturen (Medium wie oben) zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,15/ml angeimpft, diese bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,8-1,2/ml bei 37°C inkubiert, dann auf die entsprechende Expressionstemperatur abgekühlt, mit IPTG induziert und für ca. 18 h inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet (s. Abschnitt 3.3.8).

3.3.6 Hochzelldichtefermentation (HZDF)

Zur Herstellung größerer Mengen Biofeuchtmasse (BFM) mit isotope-markierten sowie unmarkierten Proteinen, wurden Hochzelldichtefermentationen durchgeführt [116]. Dazu wurde das Bioreaktorsystem FedBatch-Pro® der Firma Dargip® mit 250 ml und 1000 ml Reaktoren verwendet. Die Temperatur, der pH-Wert und die Rührdrehzahl wurden während der Fermentation computergestützt geregelt. Der pH-Wert wurde dabei durch die Zufuhr von 1 M NaOH (1 M NaOD für deuterierte Medien) im neutralen Bereich gehalten und die Temperatur während der Wachstumsphase auf 37°C geregelt. Die zugeführte Luftmenge wurde manuell anhand von Gasdurchfluß-Messgeräten eingestellt (250 ml Reaktor: 6-11,5 l/h; 1000 ml Reaktor: 22-38 l/h). Der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) wurde während der Fermentation kontinuierlich erfasst und als Parameter zur Steuerung der Rührdrehzahl sowie zur Auslösung der Expressionsphase benutzt. Der Schwellenwert für die Erhöhung der minimalen Rührdrehzahl (250 ml Reaktor: 500 U/min; 1000 ml Reaktor: 250 U/min) wurde auf 30% pO₂ für wässrige und 45% pO₂ für deuterierte Medien

festgelegt. Die Unterschreitung dieser Schwellen führte zu einer pO₂-abhängigen Erhöhung der Rührdrehzahl bis zum Maximalwert (250 ml Reaktor: 1100 U/min; 1000 ml Reaktor: 800 U/min), diente gleichzeitig aber auch als erstes notwendiges Triggersignal für die Auslösung der Expressionsphase. Der Anstieg des pO₂ durch Verbrauch der Kohlenstoff- und/oder Stickstoffquellen diente als zweites Triggersignal (pO₂ > 70% für wässrige Medien; pO₂ > 60% für deuterierte Medien) und leitete die Expressionsphase ein. Nach Überschreitung der angegebenen Schwellenwerte wurden die Reaktoren innerhalb von 20 min auf die gewünschte Expressionstemperatur abgekühlt und danach der entsprechende Expressionsfeed kontinuierlich zugeführt (250 ml Reaktor: 1,3 ml/h; 1000 ml Reaktor: 5 ml/h). Die Proteinexpression wurde 30 min nach dem zweiten Triggersignal durch Zufuhr von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) induziert. Die Expressionsphase dauerte mindestens 12 h. War der pO₂ nach dieser Zeit noch geringer als 90% wurde der Glucose-Gehalt im Medium gemessen und die Fermentation so lange fortgeführt, bis diese vollständig verbraucht war. Anschließend erfolgte die Ernte der Zellen (s. Abschnitt 3.3.8). Abhängig davon, ob unmarkierte oder mit bestimmten Isotopen angereicherte Proteine exprimiert werden sollten, kamen unterschiedliche Strategien bezüglich der Vorkulturen sowie der eingesetzten Expressionsfeeds zur Anwendung. Diese werden im Folgenden erläutert.

3.3.6.1 Expression unmarkierter Proteine

Die Zellen aus Vorkulturen (400 ml TB-Medium, + 2% Glucose, + Selektionsantibiotika) mit einer OD₆₀₀ zwischen 2-4,5/ml wurden durch milde Zentrifugation (10 min; 1000 x g) pelletiert, in 40 ml frischem Medium (wie oben) resuspendiert und zum Animpfen von zwei 250 ml Reaktoren oder einem 1000 ml Reaktor benutzt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 13-18/ml wurde die Expressionsphase ausgelöst. Die Zusammensetzung des Expressionsfeeds ist Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Expressionsfeed (unmarkiert)

Komponente	Menge für 250 ml Reaktor	Menge für 1000 ml Reaktor
Glucose	1,25 g	5 g
NH ₄ Cl	0,1 g	0,4 g
Kanamycin (50 mg/ml)	15 µl	60 µl
Chloramphenicol (34 mg/ml)	15 µl	60 µl
TB-Medium	ad 15 ml	ad 60 ml

3.3.6.2 Expression uniform ¹⁵N-markierter Proteine in Vollmedium

Die Zellen aus Vorkulturen (400 ml TB-Medium, + 2% Glucose, + Selektionsantibiotika) mit einer OD₆₀₀ zwischen 2-4,5/ml wurden durch milde Zentrifugation (10 min; 1000 x g) pelletiert, in 40 ml frischem Medium (wie oben, + 2 g/l ¹⁵NH₄Cl) resuspendiert und zum

Animpfen von zwei 250 ml Reaktoren benutzt. Nach Auslösung des zweiten Triggersignals ($pO_2 > 70\%$) wurde die Expressionsphase eingeleitet (s. Abschnitt 3.3.6). Die Zusammensetzung des Expressionsfeeds ist Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: Expressionsfeed (uniform ^{15}N -markiert in Vollmedium)

Komponente	Menge für 250 ml Reaktor
Glucose	3,75 g
$^{15}NH_4Cl$	0,95 g
Kanamycin (50 mg/ml)	15 μ l
Chloramphenicol (34 mg/ml)	15 μ l
10x M9-Salz	7,5 ml
H ₂ O	ad 15 ml

3.3.6.3 Expression uniform ^{15}N - & $^{15}N^{13}C$ -markierter Proteine in Minimalmedium

Für die Expression uniform ^{15}N -markierter Proteine wurden die Zellen aus Vorkulturen (400 ml TB-Medium, + 2% Glucose, + Selektionsantibiotika) mit einer OD_{600} zwischen 1,5-2/ml durch milde Zentrifugation (10 min; 1000 x g) pelletiert, in 40 ml 2x M9-Medium (+ Selektionsantibiotika) resuspendiert und zum Animpfen von zwei 250 ml Reaktoren bzw. einem 1000 ml Reaktor benutzt. Für die Expression uniform $^{15}N^{13}C$ -markierter Proteine wurden die Zellen aus Vorkulturen (400 ml 2x M9-Medium, + Selektionsantibiotika) mit einer OD_{600} zwischen 0,8-1,5/ml durch milde Zentrifugation (10 min; 1000 x g) pelletiert, in 20 ml 2x M9-Medium (+ Selektionsantibiotika) resuspendiert und zum Animpfen von einem 250 ml Reaktor benutzt. Die weitere Fermentation erfolgte wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Die Zusammensetzung der Expressionsfeeds für 250 ml Reaktoren ist Tabelle 12 zu entnehmen. Für 1000 ml Reaktoren wurde die vierfache Menge Expressionsfeed eingesetzt.

Tabelle 12: Expressionsfeed (uniform ^{15}N - bzw. $^{15}N^{13}C$ -markiert in Minimalmedium)

Komponente	uniform ^{15}N -markiert	uniform $^{15}N^{13}C$ -markiert
10x M9-Salz	7,5 ml	7,5 ml
100x Spurenelemente	1,875 ml	1,875 ml
Thiamin (1mg/ml)	120 μ l	120 μ l
Biotin (0,1 mg/ml)	1,2 ml	1,2 ml
Glucose	3,75 g	/
^{13}C -Glucose	/	3,75 g
$^{15}NH_4Cl$	0,95 g	0,95 g
Kanamycin (50 mg/ml)	15 μ l	15 μ l
Chloramphenicol (34 mg/ml)	15 μ l	15 μ l
H ₂ O	ad 15 ml	ad 15 ml

3.3.6.4 Expression uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markierter Proteine in D_2O -Minimalmedium

Zur Herstellung deuterierter Medien wurden nur deuterierte Vorratslösungen verwendet, welche durch Lösen entsprechend wasserfreier Ausgangsstoffe in 99,8% D_2O hergestellt worden sind. Die Zellen aus Vorkulturen (400 ml 2x M9-Medium, + Selektionsantibiotika) mit einer OD_{600} zwischen 0,8-1,5/ml wurden durch milde Zentrifugation (10 min; 1000 x g) pelletiert, in 20 ml 2x D_2O -M9-Medium (+ Selektionsantibiotika) resuspendiert, erneut durch milde Zentrifugation pelletiert, in 20 ml 2x D_2O -M9-Medium (+ Selektionsantibiotika) resuspendiert und zum Animpfen von einem 250 ml Reaktor benutzt. Die weitere Fermentation erfolgte wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Die Zusammensetzung des Expressionsfeeds entspricht jenem für die Herstellung uniform $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markierter Proteine aus Tabelle 12, mit der Ausnahme, dass nur deuterierte Vorratslösungen sowie ^{13}C - D_7 -Glucose verwendet wurden.

3.3.7 Kultivierung von *Bacillus subtilis*

Der *Bacillus subtilis* Wildtypstamm DSM-402 wurde in Nährbouillon, LB-Medium oder TB-Medium bei 25°C unter mäßigem Schütteln (~80 U/min) angezogen. Dazu wurden 400 ml Medium (in Schikanekolben) direkt aus einer Glycerol-Dauerkultur angeimpft. Die Zellernte und der Zellaufschluss erfolgten wie in Abschnitt 3.3.8 bzw. Abschnitt 3.3.9 beschrieben.

3.3.8 Zellernte

Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min, 6000 x g) pelletiert, der Überstand vorsichtig dekantiert, das Pellet gewogen und in 3-5 ml pro Gramm BFM His-Bond-Puffer (30 mM Tris-HCl pH = 7,9; 300 mM NaCl; 1 mM MgSO_4 ; 5 mM Imidazol; 5% Glycerol; EDTA-freier Complete® Protease Inhibitor Mix (1 Tablette pro 50 ml)) resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend entweder direkt aufgeschlossen (Abschnitt 3.3.9) oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.9 Zellaufschluss und Separation löslicher Proteine

In His-Bond-Puffer resuspendierte Zellen (Abschnitt 3.3.8) wurden mit einem Hochdruck-Homogenisator (EmulsiFlex-C3 High-Pressure Homogenizer von Avestin®) aufgeschlossen. Die eisgekühlte Zellsuspension wurde dabei unter einem Druck von ~1500 Bar mindestens 4 mal durch das ebenfalls gekühlte Gerät gepumpt. Das Homogenisat wurde anschließend bei 4°C zentrifugiert (45 min; 45000 x g). Danach wurde der Überstand (mit den löslichen Proteinen) vom Pellet getrennt und entweder sofort für die Proteinaufreinigung weiterverwendet oder bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Proteinexpression per SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.1) wurden Proben vom Homogenisat, vom Überstand und vom Pellet abgenommen.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Komplexe Proteingemische, proteinhaltige Fraktionen aus Aufreinigungsschritten und Lösungen gereinigter Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach Laemmli [117] analysiert. Für die Elektrophorese wurden „Hoefer SE250 Gelelectrophoresis Units“ oder „Large SDS Gel Units“ benutzt. Zur effizienteren Beladung der großen Gele mittels 12-fach Automatikpipette (Matrix[®]) wurden selbstangefertigte Teflonkämme eingesetzt. I.d.R. wurden als Sammelgel 5%-ige und als Trenngel 18%-ige Polyacrylamidgele verwendet. Diese wurden entsprechend des Herstellerprotokolls von Roth[®] für die Verwendung des Rotiphorese Acrylamids 40AA hergestellt. Als Laufpuffer wurde ein Gemisch aus 25 mM Tris-HCl, 190 mM Glycin und 0,01% SDS in H₂O verwendet. Pro Geltasche wurden jeweils 10 µl Probe geladen. Die Probenherstellung erfolgte, wie in Abschnitt 3.4.2 dargestellt. Als Molekulargewichtsstandard kam i.d.R. der Proteinmarker „Prestained Precision Plus[®]“ von BioRad[®] zum Einsatz. Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom durchgeführt (20 mA pro Minigel; 120 mA pro großem Gel). Die Gele wurden nach der Methode von Schägger *et al.* [118] entwickelt. Die Fixierung (10min) erfolgte in 10% Essigsäure und 50% Ethanol, danach wurde 30 min mit einer Lösung aus 0,025% Coomassie Brilliant Blue G250, 0,025% Coomassie Brilliant Blue R250 und 10% Essigsäure gefärbt und anschließend in 10% Essigsäure entfärbt.

3.4.2 Probenherstellung für SDS-PAGE

Zur Analyse von Zellproteinen per SDS-PAGE wurden 1 OD₆₀₀ Zellen in 25 µl Sarkosyl-Lysepuffer (2x SDS-Probenpuffer; 1% Sarkosyl; 1 mM NaOH) resuspendiert, 15 min bei 95°C inkubiert und anschließend 75 µl 1x SDS-Probenpuffer (SDS-PP) zugesetzt. Proteinhaltige Fraktionen aus Aufreinigungsschritten oder Lösungen gereinigter Proteine wurden je nach zu erwartendem Proteingehalt 1:1 mit 2x SDS-PP oder 5:1 mit 6x SDS-PP (375 mM Tris-HCl pH = 6,8; 12% SDS; 60% Glycerol; 0,02% Bromphenolblau; 600 mM DTT) gemischt und 15 min bei 95°C inkubiert. Totallysate und Überstände mit löslichen Proteinen aus Homogenisaten (Abschnitt 3.3.9) wurden 1:1 mit 2x SDS-PP gemischt, 15 min bei 95°C inkubiert und anschließend 1:5 mit 1x SDS-PP verdünnt.

3.4.3 Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine

Alle chromatographischen Methoden wurden bei 4°C bis 8°C durchgeführt. Zur Kontrolle und Dokumentation der Reinigungsschritte wurden von ausgewählten Fraktionen Proben für die SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.1 & 3.4.2) abgenommen.

3.4.3.1 Erste Affinitätschromatographie

Sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden als Fusionsproteine mit einer N-terminalen Hexa-Histidin Sequenz exprimiert und in einem ersten Reinigungsschritt mittels immobilisierter Metall-Affinitätschromatographie (IMAC) aus den Überständen homogenisierter Zellysate isoliert. Dazu wurden die Chromatographiesysteme „Workstation Vision®“ (Applied Biosystems®), „Profinia®“ (Biorad®) sowie „Äkta Purifier®“ (GE Healthcare®) gemäß Herstelleranweisung und unter Verwendung der von den Herstellern empfohlenen Standardpuffer benutzt. Als Chromatographiesäulen wurden „Poros® 20 MC-Säulen“ (Workstation Vision®) sowie „Bio-Rad® Bio-Scale® Mini Profinity® IMAC Cartridge 5 ml“ und „Pharmacia® HisTrap® HP Cartridge 5 ml“ (Profinia® & Äkta Purifier®) eingesetzt. Die Elution erfolgte mit Imidazol (linearer Konzentrationsgradient von 5-500 mM oder ohne Gradient mit 400 mM). Bei Verwendung der Profinia® wurde das Eluat über eine Entsalzungssäule (Bio-Scale® Mini Biogel® P-6 Desalting Cartridge 50 ml, Bio-Rad®) vom Imidazol befreit.

3.4.3.2 Proteolytische Abspaltung der Hexa-Histidin-Sequenz

Zur proteolytischen Abspaltung der Hexa-Histidin-Sequenz wurde die TEV-Protease eingesetzt. Diese wurde in der Abteilung Oschkinat rekombinant in *E. coli* (BL21-DE3) als Hexa-Histidin-Sequenz enthaltendes Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Der entsprechende Klon wurde von Gunter Stier (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Wie in Abschnitt 3.2.1 erläutert, wurde per PCR in alle YtvA-Konstrukte eine N-terminal lokalisierte TEV-Spaltungssequenz (ENLYFQG) integriert, wobei die proteolytische Spaltung spezifisch zwischen Glutamin und Glycin erfolgt [119]. Zusätzlich zur entsprechenden YtvA-Sequenz enthalten die Konstrukte nach der Spaltung daher ein N-terminales Glycin. Die TEV-Spaltung wurde während der Dialyse von Eluaten aus der ersten IMAC bei 8°C über Nacht durchgeführt. Zu 100 OD₂₈₀ Fusionsprotein wurden 1 OD₂₈₀ TEV-Protease gegeben. Der Dialysepuffer bestand aus 30 mM Tris-HCl pH = 7,5; 300 mM NaCl; 1 mM 2-Mercaptoethanol.

3.4.3.3 Zweite Affinitätschromatographie

Zur Abtrennung der Hexa-Histidin-Sequenz sowie ungeschnittenem Fusionsprotein und der TEV-Protease wurde der TEV-Spaltungsansatz über eine zweite IMAC gereinigt. Das gewünschte YtvA-Konstrukt war dabei im Durchlauf enthalten. Alle anderen zuvor im Spaltungsansatz enthaltenen Proteinspezies befanden sich im Eluat. Bei unvollständiger Spaltung wurde das Eluat gegebenenfalls nochmals mit TEV-Protease behandelt und aufgereinigt.

3.4.3.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Durchläufe aus der zweiten IMAC wurden zur Volumenverringering und Konzentrationserhöhung für die anschließende Gelfiltration (Abschnitt 3.4.3.6) in Amicon® Rührzellen bei 4°C aufkonzentriert. Je nach Molekulargewicht der Proteine wurden Membranen (YM-10 oder PLBC Ultrafiltrationsmembranen von Millipore®) mit Ausschlußgrößen zwischen 2000-10000 kDa benutzt.

3.4.3.5 Rekonstitution von YtvA-Konstrukten mit LOV-Domäne

YtvA-Konstrukte, welche die LOV-Domäne beinhalten, wurden vor der abschließenden Gelfiltration mit dem Chromophor Flavinmononukleotid (FMN) rekonstituiert, um eventuell vorhandene Anteile von Apoprotein in Holoprotein umzuwandeln sowie um inkorporiertes Riboflavin zu verdrängen. Die Proben wurden dazu mit FMN (Reinheit >95%, s. Abschnitt 3.4.8) versetzt (Endkonzentration FMN ~10 mM) und über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.3.6 Gelfiltration

Zur Herstellung hochreiner Proteinlösungen wurden die Durchläufe der zweiten IMAC, nach entsprechender Konzentrierung, mittels Gelfiltration weiter gereinigt. Dafür wurde das „LKB GP-10 FPLC-System“ (Pharmacia Biotech®), bestückt mit einer 26/60 Superdex-75 Säule, auf Basis der Herstellerempfehlungen eingesetzt. Die Säule wurde zuvor mit 3 Säulenvolumen entsprechendem Laufpuffer (s. Tabelle 13) equilibriert. Es wurden jeweils 5 ml Fraktionen gesammelt, diese per SDS-PAGE analysiert und anschließend alle Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden auf Proteinkonzentrationen zwischen 2-15 mg/ml aufkonzentriert, aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

Tabelle 13: Laufpuffer für die Gelfiltration von YtvA-Konstrukten

Laufpuffer für YtvA-Konstrukte mit LOV-Domäne	Laufpuffer für YtvA-Konstrukte ohne LOV-Domäne
20 mM PO ₄ (Na-Salze) pH = 7,4	20 mM PO ₄ (Na-Salze) pH = 7,5
50 mM NaCl	150 mM NaCl
1 mM DTT	1 mM DTT

3.4.4 Herstellung von uniform ¹⁵N-markiertem Apoprotein

In dieser Arbeit wurde ausschließlich uniform ¹⁵N-markiertes Ncap-LOV als Apofusionsprotein mit Hexa-Histidin-Tag (FP-Ncap-LOV-Apo) sowie das TEV-Protease-behandelte Apoprotein ohne Hexa-Histidin-Tag (Ncap-LOV-Apo) hergestellt. Alle verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 14 aufgeführt. Proben ausgewählter Fraktionen wurden per SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.4.1) und UV-Vis-Spektroskopie (s. Abschnitt 3.5.1) analysiert. Alle Arbeitsschritte bis zur Rückfaltung des Apo-

Fusionsproteins wurden bei Rotlicht ($\lambda = 620 \text{ nm}$) oder in absoluter Dunkelheit durchgeführt. Aufgereinigtes Fusionsprotein (Abschnitt 3.4.3) ($V = 9 \text{ ml}$; $c = 8,5 \text{ mg/ml}$) wurde über Nacht bei 8°C gegen $2,5 \text{ l}$ Tris-Puffer-1 dialysiert, danach mit 39 ml Denaturierungspuffer versetzt (Endkonzentration Urea = $6,5 \text{ M}$) und anschließend bei Raumtemperatur (RT) für 2 h auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Der Ansatz wurde dann per Peristaltikpumpe (Flussrate 1 ml/min) auf eine zuvor mit $10 \text{ Säulenvolumen (CV)}$ Equilibrierungspuffer gespülte 5 ml HisTrap® HP-Säule (Pharmacia Biotech®) geladen und diese danach mit 5 CV Waschpuffer gespült. Durch Spülen der Säule mit 6 CV Rückfaltungspuffer (Flussrate $0,5 \text{ ml/min}$) wurde das Apo-Fusionsprotein dann auf der Säule renaturiert, danach mit 3 CV Elutionspuffer eluiert und das Eluat anschließend auf 5 ml eingengt. 1 ml des Eluates wurde dann über Nacht bei 8°C gegen 2 l Tris-Puffer-2 dialysiert, photometrisch die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 3.5.1) und bei -80°C eingelagert. Die restlichen 4 ml des Eluates wurden mit TEV-Protease behandelt (s. Abschnitt 3.4.3.2) und das geschnittene Apoprotein anschließend per IMAC isoliert, auf 4 ml eingengt, über Nacht bei 8°C gegen 2 l Tris-Puffer-2 dialysiert, photometrisch die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abschnitt 3.5.1) und bei -80°C eingelagert.

Tabelle 14: Puffer zur Herstellung von Apoprotein

Puffer	Zusammensetzung
Tris-Puffer-1	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 300 mM NaCl
Tris-Puffer-2	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl
Denaturierungspuffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl 8 M Urea
Equilibrierungspuffer Waschpuffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl 6,5 M Urea
Rückfaltungspuffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl 1 mM DTT
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5) 150 mM NaCl 400 mM Imidazol

3.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Methode

Neben der photometrischen Messung von Proteinkonzentrationen (s. Abschnitt 3.5.1) wurden die Konzentrationen von YtvA-Konstrukten ohne LOV-Domäne (J α -STAS & STAS) auch mittels der BCA-Methode [120] bestimmt. Dazu wurde das „BCA Protein Assay Kit“ von Pierce® gemäß Herstellerangaben verwendet.

3.4.6 Analyse der Chromophorspezies in rekombinant exprimierter LOV-Domäne

Zur Analyse der in rekombinant exprimiertem YtvA-LOV-Varianten enthaltenen Flavine sowie zur Kontrolle, ob mit FMN rekonstituiertes Protein homogen mit FMN beladen werden konnte, wurden entsprechende Proben ($V = 100 \mu\text{l}$; $c = 100 \mu\text{M}$) nach 24-stündiger Inkubation in Dunkelheit für 15 min auf 95°C erhitzt und das denaturierte Protein anschließend durch Zugabe von $400 \mu\text{l}$ Aceton ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 min; $10000 \times g$) wurde der Überstand abgenommen, mittels Vakuumzentrifugation getrocknet und das entstandene Pellet in $50 \mu\text{l}$ H_2O gelöst. $15 \mu\text{l}$ dieser Lösung wurden dann per HPLC (Shimadzu LC 6A) über eine C18-Pyramid Säule (Nucleodur®; 10 cm Länge; 5 mm Durchmesser) mittels Acetonitril-Gradient (0-80%) aufgetrennt. Detektiert wurde bei 280 nm & 447 nm. Als Referenz zur Ermittlung der Retentionszeiten wurden zuvor Läufe mit FMN ($10 \mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich®) und Riboflavin ($10 \mu\text{g/ml}$; Roth®) gefahren.

3.4.7 Analyse von Flavin-Derivaten aus *Bacillus subtilis*

Aufgrund der Eigenschaft von deflaviniertem YtvA-LOV, die natürlichen Flavine FMN, FAD sowie Riboflavin mit hoher Affinität binden zu können (Ergebnisse aus dieser Arbeit; s. Abschnitt 4.6), wurde das Apo-Fusionsprotein FP-Ncap-LOV-Apo als molekulare Sonde zum qualitativen Nachweis dieser Flavine in Zelllysat aus *Bacillus subtilis* verwendet. Zu diesem Zweck wurden ca. 22 mg des Apo-Fusionsproteins auf einer 5 ml HisTrap® HP-Säule (Pharmacia Biotech®) gebunden und anschließend der zentrifugierte Überstand (~40 ml) des Zelllysates von 8,7 g BFM *Bacillus subtilis* zweimal über die Säule gepumpt (Flussrate = 1 ml/min). Danach wurde mit 10 CV His-Bond-Puffer (s. Abschnitt 3.3.8) gewaschen und mit 3 CV Elutionspuffer (s. Tabelle 14) eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wurde das Eluat auf 1 ml eingeeengt, das Konzentrat mit 12 ml Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl pH = 7,5; 300 mM NaCl) verdünnt und erneut auf 1 ml eingeeengt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt und das Konzentrat anschließend in der Dunkelheit für 48 h bei 4°C gelagert. Zur Chromophorfreisetzung wurde die weiterhin von Licht abgeschirmte Lösung dann 15 min auf 95°C erhitzt, 2 min kräftig gemixt, 15 min zentrifugiert ($10000 \times g$) und der Überstand abgenommen. Durch anschließende Ultrafiltration (Vivaspin® Centrifugal Ultrafiltration Device; 2 kDa MWCO) wurden im Überstand gelöste Proteine entfernt. Im Filtrat enthaltene Flavine wurden mittels HPLC (HP 1100 series) über eine „Nucleodur® C18-Pyramid Säule“ (L = 250 mm; D = 5 mm; Macherey-Nagel®) aufgetrennt (Injektionsvolumen = $30 \mu\text{l}$; Flussrate = 1 ml/min; linearer Acetonitril-Gradient von 5-95%). Zur Aufzeichnung des Chromatogramms wurde bei 450 nm detektiert, mittels Diodenarray an jedem Messpunkt aber auch ein komplettes UV-Vis-Spektrum (200-800 nm) aufgezeichnet. Als Referenz zur Ermittlung der Retentionszeiten wurden zuvor Läufe mit FMN, FAD und Riboflavin (jeweils $10 \mu\text{g/ml}$) gefahren. Alle Chromatographieläufe sind dreimal durchgeführt worden.

3.4.8 Reinigung von kommerziellem FMN

Da kommerziell verfügbares FMN (Sigma-Aldrich®) ca. 10-15% Riboflavin enthielt, wurde dieses über eine Anionenaustauschchromatographie entfernt. Dazu wurde das FMN in H₂O gelöst (10 mg/ml), 20 ml dieser Lösung auf eine selbstgepackte 10 ml Q-Sepharose-Säule (Q-Sepharose® FF; GE-Healthcare®) aufgetragen, mit 200 ml H₂O gewaschen und mit 4 CV 150 mM NaCl eluiert. Der Riboflavingehalt im Eluat wurde mittels HPLC (s. Abschnitt 3.4.6) analysiert und betrug weniger als 3%. Die Etablierung des Reinigungsprotokolls und die Herstellung gereinigter FMN-Lösung wurden von Marcel Jurk (AG-Schmieder; FMP-Berlin) durchgeführt.

3.4.9 Aufbereitung Flavin-rekonstituierter Proben aus ITC-Experimenten

Um die durch Titration von Ncap-LOV mit FMN, Riboflavin bzw. FAD in ITC-Experimenten erzeugten Proben (s. Abschnitt 3.5.5) auch für weitere Untersuchungen nutzen zu können, musste darin noch enthaltenes Apoprotein vollständig mit dem entsprechenden Chromophor rekonstituiert werden. Dazu wurde jeder Probe der 5-fache Überschuss des entsprechenden Flavins zugesetzt (300 µM Endkonzentration), die Ansätze 30 min bei RT inkubiert und anschließend für 24 h bei 8°C gegen Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl pH = 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM β-Mercaptoethanol) dialysiert. Durch Ultrafiltration wurde das Probenvolumen auf 500 µl reduziert und die Proben bei -80°C eingelagert.

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Photometrische Messung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentrationen von Apo-Fusionsprotein (Apo-FP), Apoprotein (Apo) und YtvA-Konstrukten ohne LOV-Domäne (Jα-STAS & STAS) wurden durch die Messung der Absorption bei 280 nm über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet. Dazu wurden die mittels „ProtParam“ [96] anhand der Aminosäuresequenz berechneten molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ_{280}) verwendet (s. Tabelle 15). Die Konzentration von YtvA-Konstrukten mit LOV-Domäne wurde für unbelichtete Proben durch die Messung der Absorption bei 450 nm und für belichtete Proben durch die Messung der Absorption an den isosbestischen Punkten bei 385 nm und 407 nm über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet. Anhand der Absorptionsmessung an den isosbestischen Punkten berechnete Konzentrationsangaben sind als Mittelwert aus beiden Messungen angegeben. Ausgangswert für die Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{385} = 9375$ und $\epsilon_{407} = 7500$ ist der von Losi *et al.* [48] für unbelichtetes YtvA publizierte Wert von $\epsilon_{450} = 12500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ergeben sich aus der Summe des Wertes für FMN ($\epsilon_{280} = 26200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [67] und des entsprechenden

Apoproteins (Apo). In Tabelle 15 sind alle verwendeten Werte zusammengefasst (FP = Fusionsprotein).

Tabelle 15: Molare Extinktionskoeffizienten der YtvA-Konstrukte

Protein	ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)	Protein	ϵ_{280} ($M^{-1}cm^{-1}$)
FP-Ncap-LOV	39150	Ncap-LOV	37660
FP-Ncap-LOV-Apo	12950	Ncap-LOV-Apo	11460
FP-Ncap-LOV-J α	40640	Ncap-LOV-J α	39150
FP-YtvA	43745	YtvA	42255
FP-LOV	39150	LOV	37660
FP-LOV-J α	40640	LOV-J α	39150
FP-LOV-J α -STAS	43745	LOV-J α -STAS	42255
FP-J α -STAS	5960	J α -STAS	4470
FP-STAS	4470	STAS	2980

3.5.2 Photochemische Aktivität und Messung von Halbwertszeiten

Zur Kontrolle der photochemischen Aktivität von YtvA-Konstrukten mit Flavin-assoziiierter LOV-Domäne sowie zur Messung von Halbwertszeiten der Hell-Dunkel-Konversion wurden verschiedene Experimente, basierend auf UV-Vis-Spektroskopie und Lösungs-NMR-Spektroskopie (s. Abschnitt 3.5.7.1), durchgeführt.

➤ Vergleich von UV-Vis-Absorptionspektren:

Dazu wurde zuerst ein UV-Vis-Spektrum (200-600 nm) der unbelichteten Probe ($c = 15-30 \mu M$) aufgenommen, die Probe anschließend 30 s mit der Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle belichtet (s. Abschnitt 4.1.1) und sofort ein weiteres UV-Vis-Spektrum gemessen. Eine charakteristische Verringerung der Absorption bei 450 nm (A_{450} -belichtet $< 0,25A_{450}$ -unbelichtet) ist ein eindeutiger Beweis für die photochemische Aktivität der LOV-Domäne.

➤ Photometrische Messung der Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion

Zur Kontrolle der photochemischen Aktivität sowie zur Berechnung von Halbwertszeiten wurde die Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion durch Messung der Absorption bei 450 nm verfolgt. Die belichtete Probe (s. Abschnitt 4.1.1) wurde dazu in eine luftdicht verschlossene Küvette überführt und in Intervallen von 3 min die Absorption bei 450 nm im Spektrophotometer „DU-520“ (Beckman Coulter®) bei Raumtemperatur für mindestens 300 min gemessen. Die Berechnung der Halbwertszeit wurde mit „Origin® 8.5“ durch nichtlineare Regression der Messdaten auf Basis einer monoexponentiellen Fitfunktion durchgeführt.

➤ NMR-Spektroskopische Messung der Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion

Diese Methode ist in Abschnitt 3.5.7.1 beschrieben.

3.5.3 Circular Dichroismus Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

CD-spektroskopische Messungen zur Analyse von Sekundärstrukturanteilen wurden mit dem Spectropolarimeter J-720 von Jasco® durchgeführt. Es wurden Küvetten mit Schichtdicken von 1 mm & 0,1 mm verwendet. Proben wurden vor der Messung für 24h bei 8°C gegen CD-Puffer (20 mM Na-Phosphat pH = 7,4-7,5; 50 mM NaF) dialysiert. Abhängig vom untersuchten YtvA-Konstrukt wurde bei Temperaturen zwischen 12-25°C gemessen. CD-Spektren wurden i.d.R. im Bereich von 190-260 nm mit einer Scanrate von 50 nm/min und einer spektralen Auflösung von 0,1 nm aufgezeichnet. Für jede Probe wurden mindestens 10 Messungen akkumuliert und die resultierenden Spektren mit einer entsprechenden Pufferkontrolle korrigiert. Die Elliptizität (θ) wurde anschließend nach folgender Gleichung in die mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest ($[\theta]_{MRE}$) umgerechnet:

$$[\theta]_{MRE} = \frac{\theta \cdot MW}{10 \cdot c \cdot d \cdot N_A \cdot 3298}$$

$[\theta]_{MRE}$	Mittlere Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm ² dmol ⁻¹)
θ	gemessene Elliptizität (mdeg)
c	Proteinkonzentration (mg/ml)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)
MW	Molare Masse des Proteins (g/mol)
N_A	Anzahl der Aminosäuren im Protein

Die Berechnung von Sekundärstrukturanteilen wurde auf dem Webserver „Dichroweb“ [86,87] unter Verwendung des „CDSSTR-Algorithmus“ [121] durchgeführt.

3.5.4 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Sedimentationsexperimente wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge „Beckman® Optima® XL-I“, bestückt mit einer Absorptions- & Interferenzoptik, unter Verwendung eines 4-Loch-Rotors durchgeführt. Für Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe (SV) wurden 2-Sektor Titan- oder Epon-Zellen (400 µl Probe/Sektor), für Sedimentationsgleichgewichtsläufe (SE) 6-Sektor Epon-Zellen (100 µl Probe/Sektor) benutzt. Proteinlösungen und Referenzpuffer wurden vor jedem Lauf ins Dialysegleichgewicht gebracht (24 h Dialyse gegen 1000-fachen Überschuss Puffer bei 8°C). In Tabelle 16 sind die verwendeten Puffer und die in den jeweiligen Sedimentationsexperimenten verwendeten Parameter angegeben. SV-Daten wurden mit der Interferenzoptik bei 675 nm und mit der Absorptionsoptik bei den in Tabelle 16 angegebenen Wellenlängen mit einer radialen Auflösung von 0,01 cm (3 Akkumulationen pro Messpunkt) in Intervallen von 3-8 min aufgenommen. SE-Daten wurden mittels Absorptionsoptik nach jeweils 24-stündiger Equilibrierung bei entsprechender Drehzahl in Intervallen von 1 h während eines Zeitraumes von 6 h aufgenommen. Zur Untersuchung von YtvA-Konstrukten in photoaktiviertem Zustand wurden die Messzellen während der Sedimentationsexperimente

kontinuierlich belichtet (s. Abschnitt 4.1.2). Durch Wellenlängenscans im Bereich von 260-600 nm bei $r = 6,5$ cm wurde vor und nach jedem Experiment der photoaktivierte Zustand überprüft. Die Prozessierung und Auswertung der Daten wurde mit Sedfit [99,100], und für SE-Daten zusätzlich mit WinNonLin 1.06 [113] sowie Ultraspin 2.7 (Tabelle 8) durchgeführt. Die Pufferdichte und Viskosität sowie das partialspezifische Volumen des Proteins wurden mit SEDNTERP 1.09 [101] berechnet.

Tabelle 16: Parameter der Sedimentationsexperimente

Protein	Konz. (mg/ml)	Puffer	T (°C)	Exp.	Drehzahl (U/min)	λ_{Scan} (nm)	Zustand
STAS	1,0 - 4,0	20 mM Phosphat 150 mM NaCl 2 mM DTT pH = 7,5	12	SV	50000	280	unbelichtet
STAS	0,3 - 4,0			SE	21000 24000		
Ncap-LOV-Apo	0,25 - 1,0	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 500 μ M TCEP pH = 7,5	25	SV	45000	280	unbelichtet
Ncap-LOV-Apo	0,2 - 1,5			SE	12000 18000 24000		
Ncap-LOV-Apo	0,2 - 1,5			SE	21000 25000 37000		
Ncap-LOV-J α	0,5 - 1,5	20 mM Phosphat 50 mM NaCl pH = 7,4	20	SV	45000	386	unbelichtet
Ncap-LOV-J α	0,5 - 1,5			SV	45000	386	belichtet
LOV-J α	0,45 - 1,35			SV	45000	385	unbelichtet
LOV-J α	0,45 - 1,35			SV	45000	385	belichtet

3.5.5 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

ITC-Experimente [122] zur thermodynamischen Charakterisierung der Bindungsreaktionen von verschiedenen Flavinen mit der deflavinierten YtvA-LOV-Domäne, als auch von YtvA-Konstrukten mit GTP bzw. BODIPY®-GTP (ein fluoreszenzmarkiertes GTP-Analogon), wurden mit der „VP-ITC“ von Microcal® durchgeführt. Soweit möglich, wurden alle Proben ins Dialysegleichgewicht gebracht, mit Dialysepuffer die benötigten Konzentrationen eingestellt, diese photometrisch erfasst (s. Abschnitt 3.5.1) und alle verwendeten Lösungen anschließend entgast. Die Titrationsen wurden zum einen klassisch, d.h. durch Zugabe von Ligand zu vorgelegter Proteinlösung und zum anderen revers, d.h. durch Zugabe von Protein zu vorgelegtem Liganden, durchgeführt. Nach einer primären Injektion von 2 μ l, wurden pro Titrationschritt jeweils 7-10 μ l des Analyten in die Messzelle injiziert. Die Zeitintervalle zwischen den Injektionen wurden so gewählt, dass sich nach jedem Titrationschritt eine stabile Basislinie einstellen konnte. Zur Erfassung

von Verdünnungseffekten wurden die jeweiligen Analyte in den entsprechenden Dialysepuffer titriert. In Tabelle 17 sind die wichtigsten Parameter der durchgeführten Experimente zusammengefasst. Die Integration der Reaktionswärmen und die Korrektur der Basislinien wurden manuell mit Hilfe der Gerätesoftware „Microcal® Origin 7.0“ durchgeführt. Die Auswertung der Thermogramme erfolgte mit „Microcal® Origin 7.0“ oder „Sedphat v9.01“ [103]. Die Herkunft der eingesetzten Liganden ist Tabelle 2 zu entnehmen, wobei FMN zuvor noch gereinigt wurde (s. Abschnitt 3.4.8).

Tabelle 17: Parameter durchgeführter ITC-Experimente

Experiment	Titration	c_{Protein} (mM)	c_{Ligand} (mM)	T (°C)	Puffer
STAS + GTP	klassisch	0,1	1	12	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 100 μ M TCEP pH = 7,5
STAS + BODIPY®-GTP	klassisch	0,05	0,5	12	
Ytva + GTP	klassisch	0,06	0,5	25	20 mM Tris-HCl 50 mM NaCl 100 μ M TCEP pH = 7,4
Ytva + BODIPY®-GTP	klassisch	0,03 0,06	0,5	25	
Ncap-LOV-Apo + FMN	klassisch	0,05	0,5	25	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 500 μ M TCEP pH = 7,5
FMN + Ncap-LOV-Apo	revers	0,4	0,05	25	
Riboflavin + Ncap-LOV-Apo	revers	0,4	0,05	25	
FAD + Ncap-LOV-Apo	revers	0,4	0,05	25	

3.5.6 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

Die Daten der Kleinwinkel-Röntgenstreuung wurden mit der X33-Kamera vom EMBL am Speicherring DORIS-III (Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg) aufgenommen [123]. Zur Detektion der Streustrahlung ($\lambda = 1,5 \text{ \AA}$) wurde ein von der Probenzelle 2,7 m entfernter Detektor („Photon-counting Pilatus 1M detector“) verwendet. Mit diesem konnte die Impulsübertragung im Bereich $0.1 < s < 6 \text{ nm}^{-1}$ (mit $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, wobei 2θ den Streuwinkel bezeichnet) erfasst werden. Die Proteine Ncap-LOV & Ncap-LOV-Ja wurden bei 6 verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 1,5-12,8 mg/ml jeweils im

unbelichteten sowie in photoaktiviertem Zustand gemessen. Der automatische Probenwechsler der Messanlage sowie die Messzelle selbst wurden von jeglichem Umgebungslicht abgeschirmt. Zur Untersuchung unbelichteter Proben wurde der Probenwechsler mit rotem Licht ($\lambda > 600$ nm) und zur Untersuchung photoaktivierter Proben mit blauem Licht ($\lambda = 455$ nm) illuminiert (s. Abschnitt 4.1.1). Um die korrekte Befüllung und Spülung der Messzelle beobachten zu können, wurde diese mit einer roten LED ($\lambda > 600$ nm) beleuchtet. Die Zeitspanne zwischen letztem Kontakt von photoaktivierten Proben mit blauem Licht und dem Ende einer Messung betrug weniger als 5 min, sodass innerhalb dieser Zeit weniger als 5% des Proteins in den Grundzustand zurückkonvertiert sind. Die Photokonversion belichteter Proben wurde durch die Aufnahme und den Vergleich von UV-Vis-Absorptionsspektren direkt vor und sofort nach einer SAXS-Messung überprüft. Strahlenschäden an den Proben wurden ausgeschlossen, wenn die Intensitätswerte aus 4 aufeinanderfolgenden Messungen mit jeweils 30 s Expositionsdauer keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Die Daten wurden bezüglich der transmittierten Strahlintensität normalisiert, radial gemittelt, die Streukurve des Puffers subtrahiert und die resultierenden Streukurven auf die Proteinkonzentration skaliert. Zur Generierung der finalen Streukurve wurden die für kleine Streuwinkel bei geringer Proteinkonzentration gemessenen Daten zur Extrapolation von Intensitätswerten bei unendlicher Verdünnung verwendet und mit den Daten der höher konzentrierten Proben zusammengeführt. Zur Durchführung der einzelnen Prozessierungsschritte wurde das Softwarepaket „PRIMUS“ [95] benutzt. Die Vorwärtsstreuung $I(0)$ und der Gyrationradius R_g wurden über die Guinier-Approximation [124] oder die Paarverteilungsfunktion $P(r)$ ermittelt. $P(r)$ und der maximale Durchmesser (D_{\max}) der untersuchten Proteine wurden mit dem Softwarepaket „GNOM“ [90] auf Basis der in „PRIMUS“ generierten Streukurve berechnet.

➤ ***Ab initio* Berechnung der globalen Molekülform**

Auf Basis der mit „GNOM“ berechneten Parameter $P(r)$ und D_{\max} , wurden mit den Programmen „DAMMIN“ [85], „DAMMIF“ [84] und „GASBOR“ [89] *ab initio* Modelle der globalen Molekülform von unbelichtetem Ncap-LOV und Ncap-LOV- α berechnet. Die Auflösung struktureller Charakteristika beträgt nur etwa 5 \AA , da die Molekülform lediglich durch eine Ansammlung dicht gepackter Kugeln repräsentiert wird. Die Berechnung der Modelle basiert auf „simulierter Abkühlung“. Dabei wurde die räumliche Anordnung der Kugeln solange variiert, bis die Abweichung χ^2 zwischen berechneten $I_{\text{calc}}(s)$ und experimentellen Daten $I_{\text{exp}}(s)$ ein globales Minimum erreicht hatte:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{exp}(s_j) - cI_{calc}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2$$

N	Anzahl experimenteller Datenpunkte
c	Skalierungsfaktor
s_j	Impulsübertragung
$\sigma(s_j)$	experimenteller Fehler der Impulsübertragung

Mit jedem Programm wurden 20 *ab initio* Strukturmodelle mit P1-Symmetrie (Dimer-Form) und 20 *ab initio* Strukturmodelle mit P2-Symmetrie (Monomer-Form) berechnet. Aus allen Modellen wurde mit den Programmen „DAMAVER“ [83], „SUPCOMB“ [109], und „DAMFILT“ anschließend ein gemitteltes Strukturmodell erzeugt.

3.5.7 Lösungs-NMR-Spektroskopie

Lösungs-NMR-Experimente wurden mit den in Tabelle 5 aufgeführten NMR-Spektrometern unter Verwendung von „5 mm Triple-Resonanz PFG (Z-Achse) Kryoprobenköpfen“ durchgeführt. Alle Proben (550-600 μ l) wurden in 5 mm NMR-Röhrchen von Norell® gemessen. Abhängig von Experiment und Fragestellung wurden Proteine in einem Konzentrationsbereich von 0,03-1 mM als auch kleine organische Moleküle in einem Bereich von 0,1-5 mM untersucht. Wenn nicht anders angegeben, wurde als Lösungsmittel NMR-Puffer (20 mM Na-Phosphat pH = 7,4; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 10% D₂O) eingesetzt und die Experimente bei 27°C durchgeführt. Das H₂O-Signal wurde mittels „Watergate-Pulssequenz“ [125] unterdrückt. Zur Untersuchung von YtvA-Konstrukten in photoaktiviertem Zustand wurden entsprechende Proben während der Messung kontinuierlich mit Licht ($\lambda = 455$ nm) bestrahlt (s. Abschnitt 4.1.3). Die Prozessierung von NMR-Spektren, die Messung von Signalintensitäten in 1D-Spektren und die Erstellung vieler Konturplots erfolgten mit „TopSpin® 2.1“ (Bruker®). Die Ermittlung von Signalintensitäten, Veränderungen chemischer Verschiebungen, die Erstellung einiger Konturplots sowie die Zuordnung von Resonanzen in 2D- & 3D-Spektren, wurden mit dem Softwarepaket „CCPNMR 2.1“ [79] durchgeführt. Die Planung und Durchführung von NMR-Experimenten wurden von Dr. Peter Schmieder (AG Schmieder; FMP-Berlin) begleitet.

3.5.7.1 Kontrolle der photochemischen Aktivität & Bestimmung von Halbwertszeiten

Zur Kontrolle der photochemischen Aktivität entsprechender YtvA-Konstrukte wurden 1D ¹H-Spektren von unbelichteten und belichteten Proben aufgenommen und auf charakteristische Signalveränderungen untersucht. I.d.R. wurde in den ¹H-Spektren dabei mindestens ein distinktes Signal gefunden, dass bei Belichtung entweder neu entstanden oder verschwunden war. In Serien nacheinander aufgenommener ¹H-Spektren dienten

diese Signale bzw. deren Intensitätsänderung als Indikator des photostationären Zustandes (PSS). Waren innerhalb eines Zeitintervalls von 5 min keine Signalveränderungen zu detektieren, galt die Konvertierung in den PSS als vollständig. Zur Bestimmung der Halbwertszeit ($T_{1/2}$) wurde ein pseudo-2D ^1H -Spektrum des zurückkonvertierenden Proteins aufgenommen. Die indirekte Dimension entspricht dabei einer Zeitdomäne, welche durch die aufeinanderfolgende Aufnahme von 1D ^1H -Spektren inkrementiert ist und dadurch eine Darstellung der Signalintensität als Funktion der Zeit ermöglicht. Die Berechnung von $T_{1/2}$ wurde mit „Origin® 8.5“ durch nichtlineare Regression der Messdaten auf Basis einer monoexponentiellen Fitfunktion durchgeführt.

3.5.7.2 Aufnahme mehrdimensionaler, heteronuklearer NMR-Spektren zur sequentiellen Zuordnung der Resonanzen des Proteinrückgrates

Für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Atome $^1\text{H}_\text{N}$, ^{15}N , ^{13}CO , $^{13}\text{C}\alpha$ und $^{13}\text{C}\beta$ innerhalb des Proteinrückgrates verschiedener YtvA-Konstrukte wurden 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren (HSQC = Heteronuclear Single Quantum Correlation) [126], 2D ^1H - ^{15}N -TROSY-Spektren (TROSY = Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy) [127,128] sowie HSQC- oder TROSY-basierte Versionen der dreidimensionalen, heteronuklearen Triple-Resonanz-Spektren HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, HN(CO)CACB, HN(CA)CO und HNCO [129–131] aufgenommen. Es wurden dazu Proben mit uniform $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markierten oder uniform $^2\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen verwendet.

3.5.7.3 Untersuchung der Interaktion der STAS-Domäne mit GTP und BODIPY®-GTP

Zur Untersuchung der Interaktion von GTP und BODIPY®-GTP mit der YtvA-STAS-Domäne wurden 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des uniform ^{15}N -markierten Proteins bei Ab- und Anwesenheit entsprechender Liganden aufgenommen. Innerhalb einer Messreihe wurde in allen Proben dieselbe Proteinkonzentration eingesetzt. Durch die Aufnahme verschiedener Messreihen wurden Konzentrationsverhältnisse zwischen Protein & Ligand im Bereich von 1:6 bis 1:25 untersucht. Alle Spektren sind mit identischen Parametern prozessiert und auf Veränderungen der chemischen Verschiebung und Intensität von Kreuzsignalen analysiert worden.

3.5.7.4 Messung ^{15}N -basierter Spinrelaxation (^{15}N -R1, ^{15}N -R2 & $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HetNOE)

Zur Erfassung moleküldynamischer Parameter wurden die longitudinale (R1) und transversale (R2) Relaxationsrate sowie die Verstärkung der heteronuklearen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOE's ($^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HetNOE; NOE = Nuclear Overhauser Effect) der Amidstickstoffkerne uniform ^{15}N -markierter YtvA-Konstrukte gemessen [132,133]. Die dazu durchgeführten Experimente basierten auf $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierten 2D HSQC- oder TROSY-Spektren [134].

^{15}N -R1-Experimente wurden mit Relaxationsperioden von 12 ; 52 ; 102 ; 152 ; 202 ; 302 ; 402 ; 602 ; 902 ; 2002 und 5002 ms und ^{15}N -R2-Experimente mit Relaxationsperioden von 4 ; 8 ; 16 ; 32 ; 40 ; 80 ; 120 ; 160 ; 200 und 240 ms aufgenommen. Um aus Probandeneration resultierende Effekte zu minimieren, wurden die Spektren innerhalb einer Experimentserie alternierend, d.h. zuerst mit kürzester, dann mit längster, danach mit zweitkürzester usw. Relaxationsperiode gemessen. Die Intensitätswerte korrespondierender $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale wurden mit „CCPNMR 2.1“ [79] ermittelt, gegen die Dauer der Relaxationsperiode aufgetragen und mittels „CurveFit“ [82] über eine monoexponentielle Fitfunktion daraus die Relaxationsraten berechnet. Die Quantifizierung der HetNOE's erfolgte mit „CCPNMR 2.1“ [79]. Aus der Kombination der Relaxationsdaten jeder eindeutig zugeordneten Amidgruppe des Proteins wurde mit dem Programm „TENSOR2“ die globale Rotationskorrelationszeit (T_c) des gesamten Proteins, die T_c einzelner Domänen bzw. Funktionseinheiten sowie die „Orderparameter“ (S^2) der einzelnen Amidgruppen berechnet [111,135–139]. Dazu wurden mit einem, von Marcel Jurk (AG Schmieder; FMP Berlin) geschriebenen, Python-Skript alle ermittelten Relaxationswerte in eine speziell formatierte, mit dem Programm „TENSOR2“ kompatible Datei, konvertiert.

3.5.7.5 Messung residueller dipolarer Kopplungen (RDC's)

Durch die Messung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -RDC's [140–142] sollten Informationen zur relativen Orientierung der α -Helix zur LOV-Domäne gewonnen werden. Dazu wurden 2D ^1H - ^{15}N -„TROSY-RDC-Spektren“ [143] von uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV- α in isotroper (NMR-Puffer) und anisotroper (NMR-Puffer mit 10 mg/ml Pf1-Phagen; s. Tabelle 2) Lösung aufgenommen. Von jeder Probe wurden vier „TROSY-RDC-Spektren“ mit jeweils unterschiedlich langer TROSY- / Anti-TROSY-Mischzeit innerhalb der „RDC κ -Block-Pulssequenz“ [143] aufgenommen. Es wurden κ -Faktoren mit den Werten $\kappa = 0$ / $\kappa = 0,5$ / $\kappa = 1$ & $\kappa = 1,5$ verwendet. Weil auf Basis von „TROSY-RDC-Spektren“ nur die Summe aus skalarer Kopplung (J_{HN}) und RDC eines $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spinsystems gemessen werden kann, muss für die Berechnung von RDC's der Wert der J_{HN} -Kopplung bekannt sein. Da RDC's in isotroper Lösung keinen Beitrag zur mittels „TROSY-RDC-Spektren“ gemessenen Kopplung leisten, konnte J_{HN} aus den unter isotropen Bedingungen aufgenommenen „TROSY-RDC-Spektren“ ermittelt werden. Nach manueller Übertragung der sequentiellen Zuordnung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Resonanzen auf die Kreuzsignale in den „TROSY-RDC-Spektren“, wurde mittels „CCPNMR 2.1“ [79] deren κ -abhängig (isotrope Lösung) bzw. RDC- und κ -abhängig (anisotrope Lösung) veränderte ^{15}N chemische Verschiebung bezüglich der entsprechenden ^{15}N chemischen Verschiebung bei $\kappa = 0$ ermittelt und diese nach folgender Gleichung in eine Frequenz umgerechnet.

$$\nu_{HN} = \frac{1}{2} \nu_0 \times \frac{(|\omega_{\kappa(0)} - \omega_{\kappa(x)}|)}{\kappa(x)}$$

ν_{HN}	$^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kopplung (skalar + dipolar) (Hz)
ν_0	Spektrometerfrequenz für ^{15}N bei 0 ppm (Hz)
$\omega_{\kappa(0)}$	^{15}N chemische Verschiebung eines $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignals bei $\kappa = 0$ (ppm)
$\omega_{\kappa(x)}$	^{15}N chemische Verschiebung eines $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignals bei $\kappa = x$ (ppm)
$\kappa(x)$	κ -Faktor mit Wert = x ($\kappa = x$; mit $x = 0,5$ oder $x = 1$ oder $x = 1,5$)

Pro Spektrensatz wurden auf diese Weise für jedes Spinsystem jeweils drei Frequenzwerte ermittelt und diese nachfolgend zu einem Mittelwert mit Standardabweichung verrechnet. Der Wert der residualen dipolaren Kopplung eines Spinsystems ergab sich aus der Differenz von gemittelter Kopplungsfrequenz in anisotroper Lösung und der gemittelten Frequenz der J_{HN} -Kopplung. Auf Basis der Kristallstruktur von unbelichtetem YtvA-LOV- $J\alpha$ (PDB-Eintrag: 2PR5; Möglich *et al.* 2007 [75]) wurde mit dem Programm „Module 1.0“ [92] die aus den gemessenen RDC's resultierende Orientierung der N-H-Bindungsvektoren berechnet. Dabei wurden RDC's, deren Betrag kleiner als die doppelte Standardabweichung war, ausgefiltert und nicht berücksichtigt. Ausgehend von den mit „CCPNMR 2.1“ erstellten Resonanzlisten, wurde die Berechnung und Filterung der RDC's sowie deren Konvertierung in ein „Module 1.0“ kompatibles Dateiformat mit Hilfe eines von Marcel Jurk (AG-Schmieder; FMP Berlin) geschriebenen Python-Skriptes bewerkstelligt.

4 Ergebnisse

4.1 Konstruktion LED-basierter Lichtquellen zur Untersuchung unbelichteter & photoaktivierter YtvA-Konstrukte

Um die strukturelle, photochemische und moleküldynamische Charakterisierung der unbelichteten und photoaktivierten Form des bakteriellen Photorezeptors YtvA sowie dessen verkürzter, photoaktiver Varianten zu ermöglichen, war es zwingend erforderlich, die lichtabhängige Konvertierung zwischen beiden Zuständen gezielt herbeizuführen oder zu unterdrücken. Darüber hinaus erforderte die Untersuchung photoaktivierter Proteine mit zeitintensiven Methoden (NMR, SAXS, AUZ) außerdem eine kontinuierliche Belichtung der Proben, da die Halbwertszeit der Hell-Dunkel-Konversion nur ca. 45 min beträgt (s. Abschnitt 4.5.4.5). Weil für so spezielle Einsatzzwecke keine kommerziellen Produkte verfügbar waren, wurden die benötigten Belichtungssysteme selbst entwickelt und aufgebaut. Die im Hinblick auf die benötigten Wellenlängen und Lichtintensitäten an die Lichtquellen gestellten Anforderungen, konnten dabei durch die Verwendung verschiedener Hochleistungs-LED's erfüllt werden. Im Folgenden sind die von mir im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Lichtquellen dargestellt.

4.1.1 Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle

Die Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle (Abbildung 18) konnte für die Durchführung einer Vielzahl verschiedener Experimente eingesetzt werden, da die verwendete RGB-LED (H6-RGB-9; Roithner Lasertechnik) Licht hoher Intensität mit Strahlungsmaxima bei entweder 620 nm (Rot), 515 nm (Grün) oder 460 nm (Blau) abgeben konnte. Aufgrund der hohen thermischen Leistung (3 W) wurde die LED auf einen Kühlkörper montiert. Zum Schutz der Augen und zur Erhöhung der Beleuchtungsstärke wurde das emittierte Licht mit einer speziellen Sammellinse (Art-Nr: 175070, Conrad Elektronik) auf einen Abstrahlwinkel von $\pm 8^\circ$ gebündelt. Mittels eines selbstgebauten LED-Treibers konnte eine Lichtintensität zwischen 0-100% eingestellt werden. Dabei entsprechen 100% einem Lichtstrom (in Lumen) von 60 lm (Rot), 70 lm (Grün), bzw. 25 lm (Blau). Bei Experimenten mit dunkeladaptierten Photorezeptorproteinen diente der Rotlichtmodus zur Ausleuchtung von Arbeitsbereichen, welche zur Unterdrückung der Photokonversion verdunkelt werden mussten. Der Blaulichtmodus wurde für die Photoaktivierung der LOV-Domäne z.B. vor der Aufnahme von UV-Vis-Spektren als auch zum Aufrechterhalten des photostationären Zustandes während der Durchführung von SAXS-Experimenten verwendet (Abbildung 19). Das Grünspektrum hatte für die Durchführung dieser Arbeit keine Bedeutung, wurde im Rahmen anderer Forschungsprojekte aber für die Arbeit mit Phytochromen genutzt.



Abbildung 18: Hochleistungs-RGB-LED-Lichtquelle

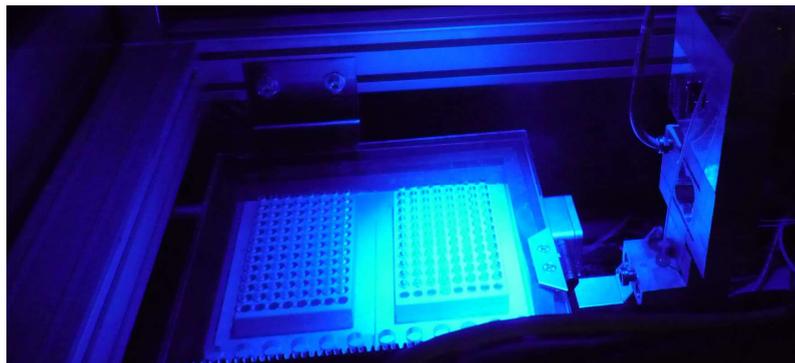


Abbildung 19: Bestrahlung von Proben vor SAXS-Experimenten

4.1.2 AUZ-LED-Lichtquelle

Um mittels Analytischer Ultrazentrifugation Informationen über den Oligomerisierungszustand photoaktivierter YtvA-Konstrukte gewinnen zu können, mussten diese während der Experimente durch kontinuierliche Belichtung im photostationären Zustand gehalten werden. Weil an der Ultrazentrifuge keine baulichen Veränderungen vorgenommen werden sollten, wurde eine autonome, akkubetriebene LED-Lichtquelle konstruiert (s. Abbildung 20A). Da in der Rotorkammer ein Hochvakuum erzeugt wird, wurde für die Akkus (3x Mignon NiMH, 1100 mAh) ein entsprechend vakuumdichtes Gehäuse aus Edelstahl gebaut. Dieses konnte so am optischen System befestigt werden, dass die LED ($\lambda_{\text{Peak}} = 455 \text{ nm}$, LUXEON LXHL-NRR8) mit 5 cm Abstand über die im Rotor befindlichen Messzellen positioniert war (s. Abbildung 20B). Die LED wurde mit 17,5 mA betrieben, sodass bis zu 60 h dauernde Experimente durchgeführt werden konnten. Die abgestrahlte Lichtleistung betrug dabei ca. 4 mW ($\lambda = 435\text{-}475\text{nm}$).

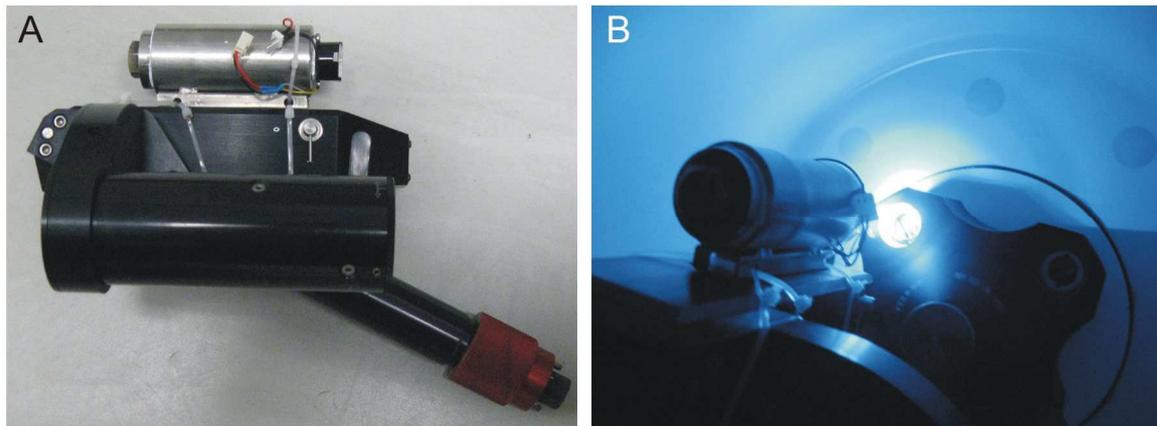


Abbildung 20: AUZ-LED-Lichtquelle

Optisches System der Analytischen Ultrazentrifuge mit der montierten AUZ-LED-Lichtquelle (A) und dessen Einsatz in der Rotorkammer zur Belichtung der im Rotor befindlichen Messzellen (B).

4.1.3 Fasergekoppelte LED-Lichtquelle

Zur Untersuchung photoaktivierter YtvA-Konstrukte mit Methoden der Lösungs-NMR-Spektroskopie, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die NMR-Proben innerhalb des Magneten kontinuierlich belichten zu können. Bedingt durch den Aufbau des NMR-Magneten, kam dafür nur die Verwendung eines Lichtwellenleiters (LWL) in Frage. Dieser sollte eine Mindestlänge von 10 m haben, um einen ausreichenden Abstand zwischen Lichtquelle und NMR-Magnet zu gewährleisten. Das für diesen Einsatz entwickelte System ist in Abbildung 21 gezeigt.

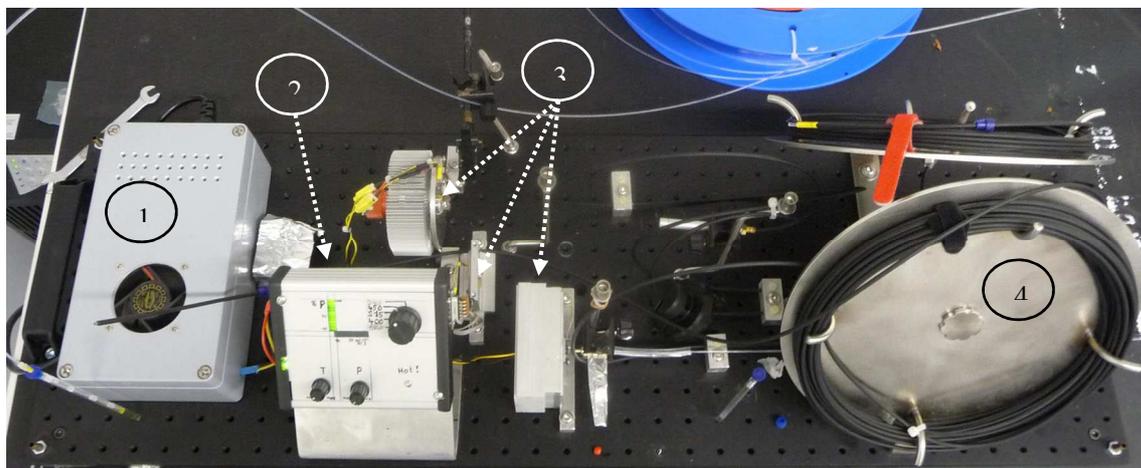


Abbildung 21: Fasergekoppelte LED-Lichtquelle

Alle Komponenten wurden auf eine 90 x 30 cm Aluminium-Lochplatte (Thorlabs®) montiert. Die mit Zahlen bezeichneten Aufbauten sind das Schaltnetzteil (1), der 4-Kanal LED-Controller (2), die verschiedenen LED-Lichtquellen (3) und der Träger zur Aufnahme der LWL (4).

Da sich nur ein geringer Teil des Lichts einer nichtkohärenten Lichtquelle, wie einer LED, in eine optische Faser einkoppeln lässt, wurde als Lichtquelle die leistungsfähigste, zu diesem Zeitpunkt erhältliche 455 nm LED, eine 5 Watt LUXEON LXHL-LR5C mit 500 mW Strahlungsleistung ($\lambda = 435\text{-}475$ nm), eingesetzt. Die Auswahl eines geeigneten

Lichtwellenleiters erfolgte ebenfalls unter der Vorgabe, ein Maximum an Licht zur Probe zu transportieren. Die entscheidenden Parameter sind dabei der Querschnitt und die Numerische Apertur (NA) einer optischen Faser, da die einkoppelbare Lichtmenge proportional mit dem Faserquerschnitt und überproportional mit der Numerischen Apertur zunimmt. Zunächst wurde daher eine PMMA-Faser mit 2 mm Kerndurchmesser verwendet (CK80S, Universal Fibre Optics), da diese gerade noch in ein 5 mm NMR-Röhrchen passt und mit einem Wert von 0,5 eine sehr hohe Numerische Apertur besitzt. Ein Faserende wurde mit einem angefertigten Adapter auf Stoß an die LED gekoppelt und das andere Ende im NMR-Röhrchen ca. 2 mm tief in die NMR-Probe getaucht. Aufgrund des großen Streuwinkels ($\pm 30^\circ$) der am Faserende emittierten Strahlung, konnten auf diese Weise jedoch nur Proben mit maximal 300 μM Proteinkonzentration vollständig in den PSS konvertiert werden. Da für die angestrebten Experimente jedoch Proteinkonzentrationen größer 500 μM eingesetzt werden sollten, musste eine Möglichkeit gefunden werden, einen höheren Anteil des eingekoppelten Lichtes für die Photokonversion nutzbar zu machen. Gelöst wurde dieses Problem durch die Anwendung einer von *Kuprov et al.* entwickelten Methode zur homogenen Belichtung optisch dichter NMR-Proben [144]. Darauf basierend wurde zur Probenbelichtung ein Ende einer 1 mm Quarzglasfaser (0,48 NA Multimode Faser BFH48-1000, Thorlabs®) durch ein spezielles Ätzverfahren so modifiziert, dass sich auf einer Länge von etwa 3 cm ein stufenweise verringernder Durchmesser ergab. Die optischen Eigenschaften dieser Geometrie führen an den Stufenübergängen zu einer winkelabhängigen Lichtauskopplung. Dabei wird das innerhalb der Glasfaser mit größeren Winkeln reflektierte Licht an den Stufen zu größeren Faserdurchmessern und das unter kleineren Winkeln reflektierte Licht an den Stufen zu kleineren Faserdurchmessern sowie am Faserende in die Probe emittiert (s. Abbildung 22).

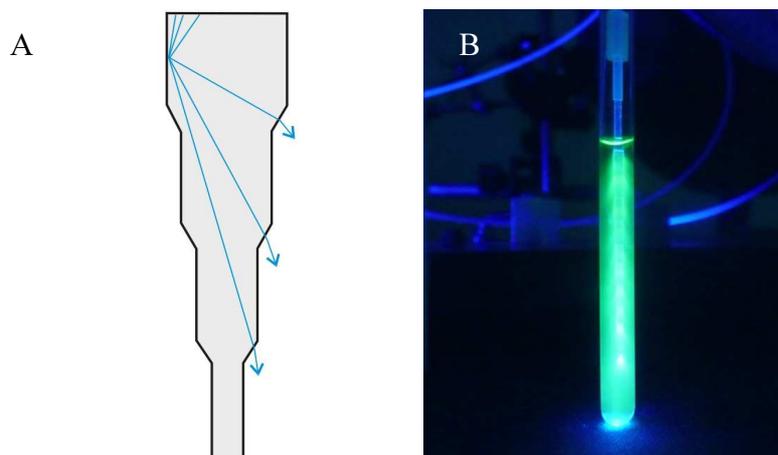


Abbildung 22: Homogene Belichtung von NMR-Proben - Prinzip und praktische Anwendung

A: Prinzip der seitlichen, winkelabhängigen Lichtauskopplung (blaue Pfeile) aus einem sich stufenweise verjüngenden Glasfaserende. B: Belichtung ($\lambda_{\text{Peak}} = 455 \text{ nm}$) einer 500 μM Probe von Ncap-LOV-J α direkt im NMR-Röhrchen. Durch die unabhängig vom Aktivierungszustand von der LOV-Domäne emittierte, grüne Fluoreszenzstrahlung wird das seitlich aus dem Faserende ausgekoppelte Licht deutlich sichtbar.

Die Ankopplung an die LED erfolgte, analog zur PMMA-Faser, zunächst ebenfalls durch Positionierung des polierten Faserendes direkt vor der LED-Linse. Obwohl sich, bedingt durch den im Vergleich zur PMMA-Faser kleineren Querschnitt, nur 25% der Lichtmenge in die Quarzglasfaser einkoppeln ließen, konnten mit diesem System NMR-Proben mit Proteinkonzentrationen zwischen 500 μM und 1 mM innerhalb von 5 bis 20 min vollständig in den PSS konvertiert werden. Aufgrund dieses Erfolges wurde das System mit LED's weiterer Wellenlängen ergänzt (s. Tabelle 18), so dass damit z.B. auch die photostationären Zustände photoschaltbarer cyclischer Peptide NMR-spektroskopisch untersucht werden konnten. Da sich die Bauformen der verwendeten LED's stark unterscheiden, konnte der an die 455 nm LED angepasste Koppeladapter jedoch nicht weiterverwendet werden. Stattdessen wurde das Faserende mit einem SMA-Stecker versehen, der zur Ankopplung an die diversen LED's in eine justierbare Haltevorrichtung eingespannt werden konnte. Um zumindest bei der Ankopplung an die 455 nm LED eine zeitaufwendige Justierung zu vermeiden, wurde die LED über eine angefertigte Adapterplatte mit einer SMA-Buchse zum direkten Anschluss des Lichtleiters versehen (Abbildung 23A & B). In diesem Zuge wurde auch die LED-Linse aufgeschliffen, der innere Silikonkern entfernt und so der lichtemittierende Halbleiterchip freigelegt (Abbildung 23C). Da die Adapterplatte so bemessen wurde, dass der angeschlossene Lichtleiter nur noch einen Abstand von ca. 0,2 mm zum Halbleiterchip hat, konnte auf diese Weise fast die maximal mögliche Lichtmenge eingekoppelt werden.

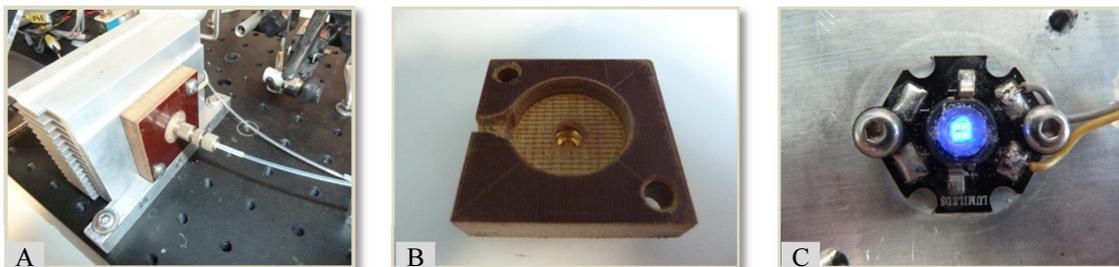


Abbildung 23: Ankopplung des Lichtleiters an die 455 nm LED

A: An die modifizierte 455 nm LED (C) über die angefertigte Adapterplatte (B) per SMA-Verbinder angekoppelter Lichtleiter.

Nach dieser Modifikation konnte eine 1 mM NMR-Probe innerhalb von 2 min in den PSS konvertiert werden und mit etwa 15% der maximalen Lichtleistung im PSS gehalten werden. Um die diversen LED's innerhalb ihrer spezifizierten Parameter zu betreiben und um deren Ausgangsleistung zu regeln, kam ein selbstentwickelter 4-Kanal LED-Controller zum Einsatz (Abbildung 24). Dieser stellt Maximalströme von 20 mA (Kanal 1), 350 mA (Kanal 2), 500 mA (Kanal 3) bzw. 750 mA (Kanal 4) bereit. Mit dem Controller kann unabhängig voneinander die maximale Intensität (linear geregelte Strombegrenzung) und die relative Einschaltdauer (150 Hz Pulsweitenmodulator) einer LED in einem Bereich

zwischen 0-100% geregelt werden. Zur Visualisierung der eingestellten Werte wurden beide Regelkreise mit einer linearen Balkenanzeige ausgestattet.

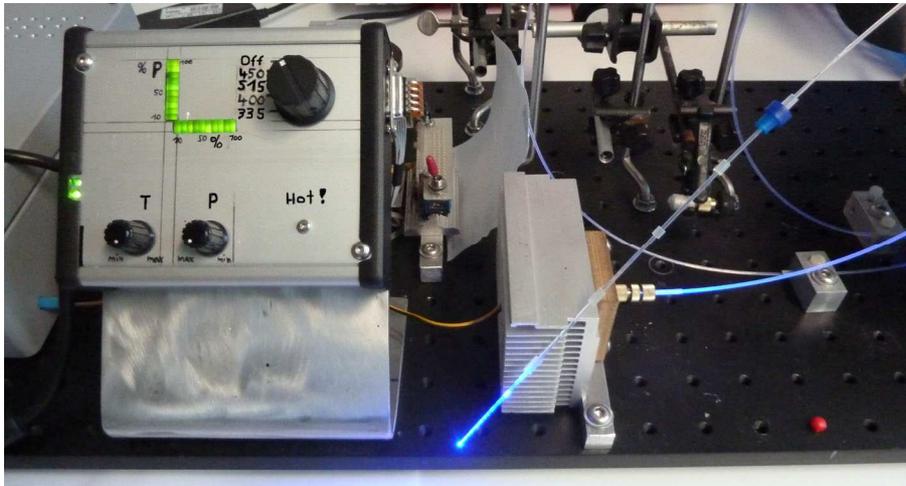


Abbildung 24: 4-Kanal LED-Controller

Die bei den verschiedenen Wellenlängen aus dem Lichtleiter ausgekoppelte optische Maximalleistung wurde mit einem speziellen Lichtleistungsmessgerät (S302C Thermal Power Head, Thorlabs®) ermittelt. Da der für die Probenbelichtung angefertigte Lichtleiter aufgrund seiner Geometrie nicht verwendet werden konnte, wurde dazu die aus einem 1 m langen Referenz-Lichtleiter gleichen Typs austretende optische Leistung gemessen. In Tabelle 18 sind die ermittelten Werte zusammengefasst.

Tabelle 18: Wellenlängen und Lichtleistungen der Fasergekoppelten LED-Lichtquelle

LED (Typ)	Bezugsquelle	Dominante Wellenlänge	Leistung (ausgekoppelt)	Anzahl Photonen (gesamtes Emissionsspektrum)
UVTOP335-BL-TO39	Roithner Lasertechnik	335 nm	65 μ W	0,182 nmol s ⁻¹
UVTOP355-BL-TO39		355 nm	92 μ W	0,273 nmol s ⁻¹
M3L1-HU-30		400 nm	470 μ W	1,572 nmol s ⁻¹
H2A1-H420		420 nm	2,02 mW	7,092 nmol s ⁻¹
LXHL-LR5C	Conrad Elektronik	455 nm	10,5 mW	39,932 nmol s ⁻¹
H6-RGB-9	Roithner Lasertechnik	460 nm	920 μ W	3,538 nmol s ⁻¹
H6-RGB-9		515 nm	1,02 mW	4,391 nmol s ⁻¹
H6-RGB-9		620 nm	985 μ W	5,105 nmol s ⁻¹
H2A1-H690		690 nm	575 μ W	3,317 nmol s ⁻¹

4.2 Expression und Präparation von YtvA-Konstrukten

4.2.1 Expressionsbedingungen

Auf Basis der durchgeführten Expressionstests (Abschnitt 3.3.4) wurde für die Expression von J α -STAS sowie STAS eine Temperatur von 22°C und für alle YtvA-Varianten, welche die LOV-Domäne enthalten, eine Temperatur von 25°C gewählt. Die Proteinexpression wurde in allen Fermentationen durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Unabhängig vom jeweils verwendeten Medium wurden Schüttelkulturen nach einer Expressionsphase von 18 h und Kulturen aus Hochzelldichtefermentationen nach Verbrauch der Kohlenstoff- bzw. der Stickstoffquelle geerntet.

4.2.2 Präparation von J α -STAS und STAS

Tabelle 19: Eigenschaften von J α -STAS & STAS (FP = Fusionsprotein)

Protein	Anzahl AS	Theoretischer pI	MW (kDa)
FP-STAS	185	5,72	20,577
STAS	135	5,40	14,864
FP-J α -STAS	165	6,03	18,256
J α -STAS	115	6,78	12,544

Die klonierten Varianten der in YtvA enthaltenen STAS-Domäne, J α -STAS und STAS, konnten in Vollmedium mit guten und in Minimalmedium mit mäßigen Ausbeuten exprimiert werden (Tabelle 21). Die Aufreinigung per IMAC funktionierte erwartungsgemäß und abhängig von der Aktivität der eingesetzten TEV-Protease ließ sich in den meisten Fällen auch der Reinigungstag nahezu vollständig abspalten. Abbildung 25 zeigt dazu beispielhaft die per SDS-PAGE dokumentierte Aufreinigung von uniform $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem J α -STAS.

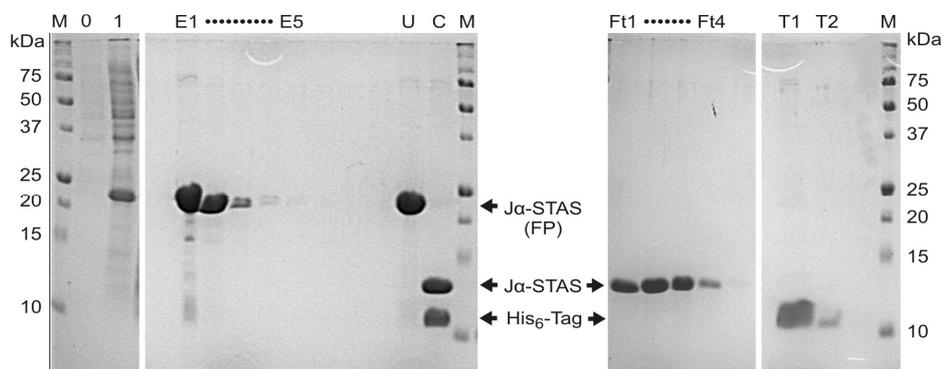


Abbildung 25: SDS-PAGE von Proben aus der Aufreinigung von $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem J α -STAS

Neben dem Proteinmarker (M) wurden folgende Proben aufgetragen: nichtinduzierte Zellen (0), induzierte Zellen (1), Eluatfraktionen (E1 bis E5) der 1. IMAC mit J α -STAS-FP, vereinigte Eluatfraktionen vor Zugabe von TEV-Protease (U), Ansatz nach proteolytischer Abspaltung des His₆-Tags (C), Durchflussfraktionen (Ft1 bis Ft4) der 2. IMAC mit J α -STAS, Eluatfraktionen (T1 & T2) der 2. IMAC mit His₆-Tag.

Über eine Gelfiltration wurde der Reinheitsgrad der isolierten Proteine weiter erhöht und der Erfolg der Methode ebenfalls per SDS-PAGE analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass J α -STAS bei allen durchgeführten Präparationen stets in zwei diskrete Spezies unterschiedlichen Molekulargewichtes separiert wurde (Abbildung 26A). Verglichen mit der Kalibrierungskurve der GF-Säule, entsprechen deren mittlere Retentionsvolumina dabei mit großer Wahrscheinlichkeit der monomeren (14,9 kDa) und einer dimeren (29,8 kDa) Form. Abhängig von der auf die GF-Säule geladenen Proteinkonzentration änderte sich auch das Mengenverhältnis zwischen beiden Formen, d.h. der Dimeranteil erhöhte sich bei größeren Proteinkonzentrationen. Wie in Abbildung 26B gezeigt, sind die beiden Spezies im SDS-Gel nicht zu unterscheiden.

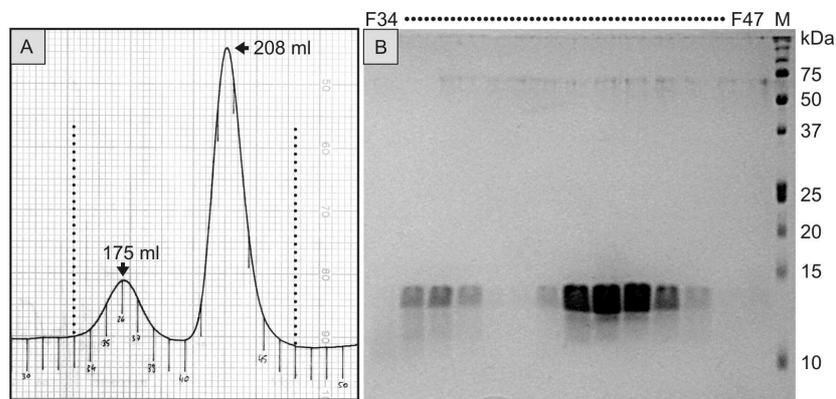


Abbildung 26: Gelfiltration von $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markiertem J α -STAS

A: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Gelfiltration von J α -STAS mit Angabe der Retentionsvolumina (26/600 Superdex 75 Säule), Fraktionsvolumen 5 ml. Die Fraktionen innerhalb der gepunkteten Linien wurden per SDS-PAGE analysiert (B).

Die breiten Proteinbanden sowie die darunter sichtbare, diffuse Anfärbung deuten auf einen Proteinabbau hin. Da sich dieser auch durch Zugabe von Natriumazid (0,03%) und Proteaseinhibitoren (Complete® Protease Inhibitor Mix, Roche®) nicht effektiv aufhalten ließ, scheint ein Protease-getriebener Abbau eher unwahrscheinlich zu sein. Dieses Phänomen war auch kein Artefakt der gezeigten Präparation, da es in allen Aufreinigungen reproduzierbar aufgetreten ist. Um die Degradation von J α -STAS zu verlangsamen, wurden die zur Herstellung verschiedener Proben notwendigen Arbeitsschritte auf Eis, im Kühlraum und wenn möglich in gekühlten Geräten durchgeführt. Der Umgang mit dem Protein wurde zusätzlich dadurch erschwert, dass es konzentrations- und temperaturabhängig spontan präzipitierte. Bei 4°C, z.B. während der Aufkonzentrierung, setzte dieser Vorgang ab ca. 800 μM und bei Raumtemperatur sogar schon ab Konzentrationen von 500 μM ein. Unterhalb dieser Grenzwerte fand zwar kein so schneller Phasenübergang mehr statt, aber selbst bei 4°C fiel innerhalb weniger Tage trotzdem immer ein kleiner Teil des Proteins aus. Als Kompromiss zwischen Probenstabilität, Konzentration und Temperatur wurden nach Bekanntwerden dieses Phänomens

insbesondere längerdauernde NMR-Messungen daher bei 12°C und mit Proteinkonzentrationen kleiner 500 µM durchgeführt.

STAS besitzt nahezu gleiche Eigenschaften wie Jα-STAS, ist im Gegensatz dazu aber bei Temperaturen bis 12°C etwas länger stabil und präzipitiert erst oberhalb einer Konzentration von 1 mM spontan. Analog zu Jα-STAS, fällt auch die STAS-Domäne bei Lagerung um 4°C nach einigen Tagen teilweise aus und degradiert bei Raumtemperatur und Konzentrationen unterhalb von 500 µM innerhalb einer Woche fast vollständig. Wie die in den Abbildung 27 & Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse aus zwei verschiedenen Gelfiltrationen belegen, steht auch STAS in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht. Da für die Gelfiltrationen Konzentrationen von ca. 200 µM STAS (Abbildung 27) bzw. ca. 300 µM STAS (Abbildung 28) eingesetzt wurden und das Gleichgewicht dabei zu mindestens 80% auf Seiten des Monomers liegt, könnte die Dissoziationskonstante durchaus im unteren millimolaren Bereich liegen.

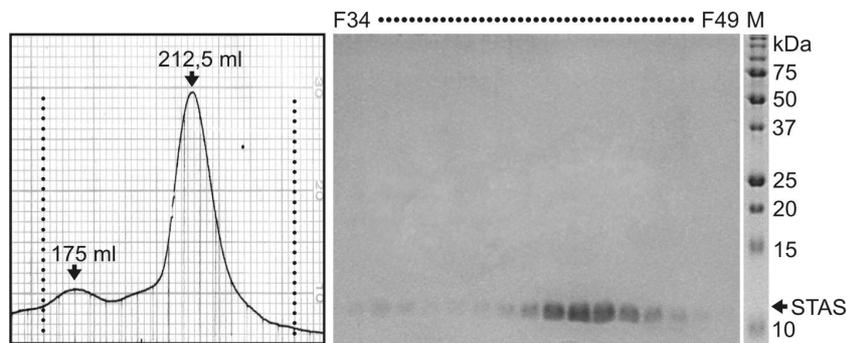


Abbildung 27: Gelfiltration von STAS

Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Gelfiltration von STAS mit Angabe der Retentionsvolumina. Es wurde ein Probevolumen von 4,5 ml (~200 µM STAS) auf eine 26/600 Superdex 75 Säule geladen. Das Fraktionsvolumen betrug 5 ml. Die Fraktionen innerhalb der gepunkteten Linien wurden per SDS-PAGE analysiert.

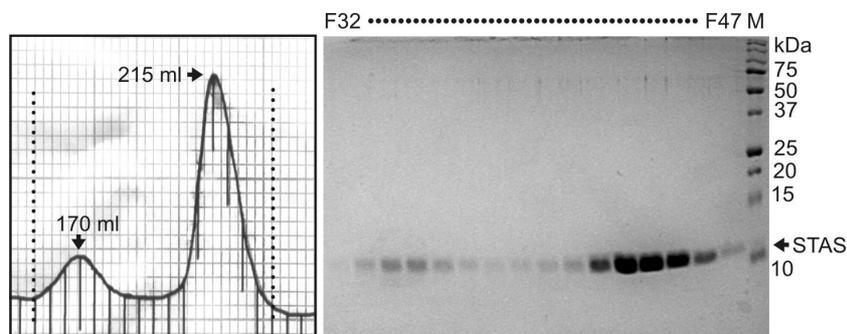


Abbildung 28: Gelfiltration von uniform ¹⁵N¹³C-markiertem STAS

Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Gelfiltration von uniform ¹⁵N¹³C-markiertem STAS mit Angabe der Retentionsvolumina. Es wurde ein Probevolumen von 9 ml (~300 µM STAS) auf eine 26/600 Superdex 75 Säule geladen. Das Fraktionsvolumen betrug 5 ml. Die Fraktionen innerhalb der gepunkteten Linien wurden per SDS-PAGE analysiert.

Weil die GF natürlich nur eine grobe Schätzung des Monomer-Dimer-Verhältnisses zulässt, wurde der Oligomerisierungszustand von STAS daher zusätzlich mittels AUZ bei klar definierten Bedingungen untersucht (Abschnitt 4.3.2).

Während der Arbeit mit gereinigtem STAS zeigte dieses Protein reproduzierbar und unabhängig von der präparierten Charge ein für Proteine ungewöhnliches Verhalten. Wurden höher konzentrierte Lösungen (ab ca. 500 μ M STAS) langsam auf RT erwärmt, so wurde die Lösung zuerst leicht trüb, dann milchig weiß und einige Minuten später begann das Protein auszufallen. Kühlte man die Lösung jedoch noch vor der beginnenden Präzipitation wieder auf 4°C ab, so wurde diese erneut vollkommen farblos und das Protein blieb in Lösung. Die beobachtete Zunahme der Lichtstreuung ließe sich im Prinzip durch die Bildung sehr großer Molekülkomplexe bzw. homogen in der Lösung verteilter Aggregate erklären. Ab einer gewissen Größe präzipitieren diese dann irreversibel. Unklar blieb jedoch, welcher molekulare Mechanismus die temperaturabhängige, reversible Assoziation bzw. Dissoziation der STAS-Moleküle bewirkte.

4.2.3 Präparation von YtvA-LOV-Varianten

Tabelle 20: Eigenschaften von YtvA-LOV-Varianten (FP = Fusionsprotein)

Synonym	Anzahl AS	Theoretischer pI	MW (kDa)
FP-YtvA	311	5,15	34,833
YtvA	261	4,88	29,120
FP-LOV-J α -STAS	292	5,06	32,817
LOV-J α -STAS	242	4,79	27,105
FP-Ncap-LOV	178	5,16	20,172
Ncap-LOV	128	4,72	14,459
FP-Ncap-LOV-J α	197	4,96	22,364
Ncap-LOV-J α	147	4,60	16,652
FP-LOV	159	5,03	18,156
LOV	109	4,57	12,444
FP-LOV-J α	178	4,86	20,349
LOV-J α	128	4,48	14,636

Mit YtvA und dessen verkürzter Variante LOV-J α -STAS wurden nur Expressionstests durchgeführt, die am stärksten exprimierenden Klone ausgewählt und diese sowie die zugehörigen Plasmide im Rahmen der aufgeteilten Projektbearbeitung weitergegeben (s. Abschnitt 2).

Die übrigen, in Tabelle 20 angegebenen LOV-Proteine, konnten in löslicher Form in Vollmedium mit sehr guten und in Minimalmedium mit mäßig guten (deuteriert) bis guten Ausbeuten exprimiert werden (s. Tabelle 21). Die Isolierung von Ncap-LOV und Ncap-LOV-J α funktionierte problemlos, da sich der Reinigungstag bei diesen Proteinen nahezu vollständig abspalten ließ. Im Gegensatz dazu verlief die Spaltung von FP-LOV und FP-LOV-J α auch nach Zugabe der dreifachen Menge TEV-Protease und Verdopplung der

Inkubationszeit auf 48 h selbst bei Raumtemperatur nur unvollständig. Um dennoch möglichst viel geschnittenes Protein zu erhalten, wurde das im Eluat der 2. IMAC noch enthaltene Fusionsprotein in einem zweiten Durchlauf nochmals mit TEV-Protease inkubiert. Obwohl auch dabei wieder nur ein Teil des Fusionsproteins gespalten wurde, konnte dadurch die Ausbeute an LOV bzw. LOV-J α auf insgesamt etwa 75% gesteigert werden. In Abbildung 29 ist dieser Sachverhalt anhand der mittels SDS-PAGE dokumentierten Aufreinigung von LOV-J α exemplarisch dargestellt.

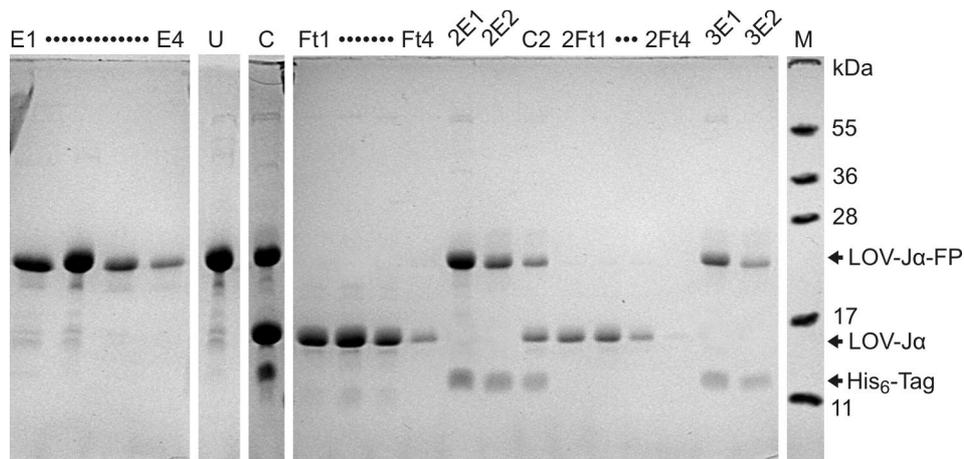


Abbildung 29: Aufreinigung von uniform ^{15}N -markiertem LOV-J α

Das SDS-Gel zeigt Proben ausgewählter Fraktionen aus 3 nacheinander durchgeführten IMAC-Läufen. Neben dem Proteinmarker (M) wurden folgende Proben aufgetragen: Die Eluatfraktionen (E1 bis E4) der 1. IMAC, die vereinigten Eluatfraktionen E1 bis E4 vor Zugabe von TEV-Protease (U), der Ansatz nach der ersten proteolytischen Abspaltung des His₆-Tags (C), die Durchflussfraktionen (Ft1 bis Ft4) der 2. IMAC, die Eluatfraktionen (2E1 & 2E2) der 2. IMAC, der Ansatz nach der zweiten proteolytischen Abspaltung des His₆-Tags (C2), die Durchflussfraktionen (2Ft1 bis 2Ft4) der 3. IMAC sowie die Eluatfraktionen (3E1 & 3E2) der 3. IMAC. Die Bandenintensitäten spiegeln nicht die absoluten Konzentrationsverhältnisse zwischen einzelnen Fraktionen wieder, da höher konzentrierte Proben zur Vermeidung einer Gel-Überladung stärker mit Probenpuffer verdünnt wurden.

Wie eine mit Ncap-LOV durchgeführte Chromophoranalyse ergeben hat (Abschnitt 3.4.6), enthält die in *E. coli* exprimierte LOV-Domäne neben FMN auch 11% Riboflavin (Abbildung 30A). Um in allen weiteren Experimenten jedoch möglichst homogen mit FMN assoziierte LOV-Proteine einsetzen zu können und um eventuell vorhandene Anteile an Apoprotein zu minimieren, wurden alle LOV-Proteine daher zunächst mit einem hohen Überschuss FMN inkubiert (Abschnitt 3.4.3.5). Über eine anschließende Gelfiltration wurden danach das überschüssige FMN sowie eventuell noch vorhandene, unerwünschte Proteinspezies entfernt. Wie die Chromophoranalyse von so behandeltem Ncap-LOV belegt, konnte auf diese Weise nahezu das gesamte Riboflavin durch FMN substituiert werden (Abbildung 30B).

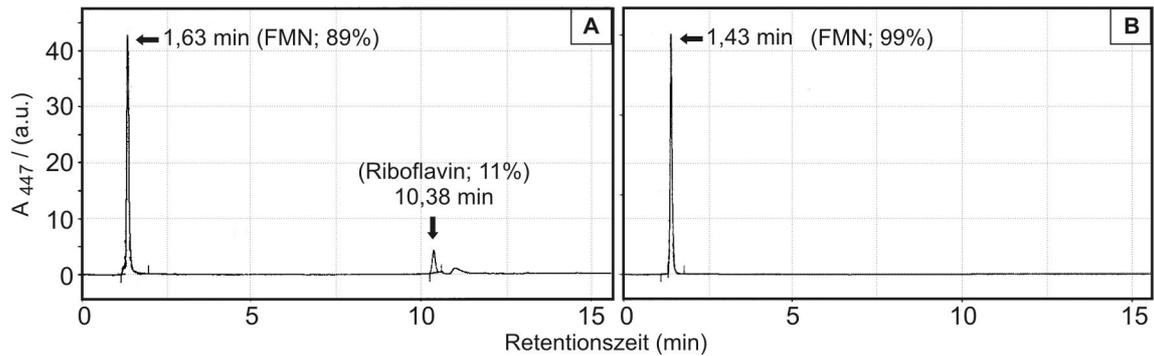


Abbildung 30: Chromophoranalyse von Ncap-LOV

Chromatogramme der HPLC mit den aus Ncap-LOV vor (A) und nach (B) der FMN-Rekonstitution extrahierten Flavine. Angegeben sind die Retentionszeit, das korrespondierende Flavin und der prozentuale Anteil der Signalfäche. Detektiert wurde die Flavin-spezifische Absorption bei 447 nm.

Die GF zeigte auch, dass die vier Varianten der LOV-Proteine bei den eingesetzten Konzentrationen ausschließlich als Dimere vorlagen. Da wegen der undefinierten Lichtverhältnisse unklar war, in welchem Zustand die Proteine vorlagen (Grundzustand, photoaktiviert oder Mischform), wurde in AUZ-Experimenten untersucht, ob sich der Oligomerisierungszustand möglicherweise lichtabhängig verändert (s. Abschnitt 0).

4.2.4 Markierungsmuster und Ausbeuten präparierter YtvA-Konstrukte

In folgender Tabelle sind die maximal erreichten Ausbeuten und die Markierungsmuster der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Proteinspezies zusammengefasst. Die Ausbeuten bezeichnen die resultierende Menge nach der Aufreinigung bezogen auf 1 l Kulturvolumen.

Tabelle 21: YtvA-Konstrukte - Maximale Ausbeuten & Markierungsmuster

Protein	Fermentation	Markierung	BFM (g/l)	Menge (mg/l)
Ja- α -STAS	Schüttelkultur	^{15}N	9,3	14,2
	HCDF	$^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	23,2	36,4
	HCDF	$^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	21,2	36,0
STAS	Schüttelkultur	unmarkiert	13,9	44,5
	HCDF	^{15}N	22,8	36,0
	HCDF	$^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	20,8	62,0
Ncap-LOV	HCDF	$^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	26,8	42,5
	Schüttelkultur	unmarkiert	14,8	58,0
	HCDF	^{15}N	54,6	240
Ncap-LOV- α	HCDF	$^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	48,2	208
	HCDF	$^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	31,8	112
	HCDF	unmarkiert	51,0	212
	HCDF	^{15}N	47,0	180
LOV	HCDF	^{15}N (Vollmedium)	44,8	218
	HCDF	$^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	43,0	143
	HCDF	$^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$	38,0	86
	HCDF	^{15}N	54,4	124
LOV- α	HCDF	^{15}N	52,6	106

4.3 Strukturelle Charakterisierung der STAS-Domäne

Da der Mechanismus der intramolekularen Signaltransduktion in YtvA nur durch die Erfassung von Strukturunterschieden und/oder Veränderungen der Proteindynamik detailliert aufgeklärt werden kann, es bislang aber weder vom Grundzustand noch von der photoaktivierten Form eine hochaufgelöste 3D-Struktur gibt, besteht ein langfristiges Ziel dieses Forschungsprojektes darin, beide Strukturen mit Methoden der Lösungs-NMR-Spektroskopie aufzuklären. Aufgrund seiner Molekülgröße und wegen der Vermutung, YtvA könnte zumindest im Grundzustand als Dimer vorliegen, zwei Faktoren, welche die Detektion und die eindeutige Zuordnung von Resonanzen des vollständigen Proteins sehr erschweren können, erschien es sinnvoll, zunächst die isolierten Einzeldomänen von YtvA zu untersuchen. Da beide YtvA-Domänen, LOV und STAS, distinkte Funktionseinheiten darstellen, sollten sich einige der gewonnenen Erkenntnisse auch auf das vollständige Protein übertragen lassen und so zu dessen Strukturaufklärung und zur Erfassung moleküldynamischer Eigenschaften beitragen. Die NMR-spektroskopische Untersuchung der STAS-Domäne war dabei von besonderem Interesse, da nur ein homologiebasiertes Strukturmodell [69], jedoch keine hochaufgelöste 3D-Struktur verfügbar war und weil die in der STAS-Domäne vermutete Bindestelle für GTP bzw. ATP [69,74] noch nicht eindeutig identifiziert wurde. Darüber hinaus sollte der Vergleich von $J\alpha$ -STAS und STAS Informationen darüber liefern, ob die STAS-Domäne durch die $J\alpha$ -Helix strukturell, funktionell oder moleküldynamisch beeinflusst wird.

4.3.1 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Die Untersuchung der STAS-Domäne mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie konnte aufgrund der bereits in Abschnitt 4.2.2 erwähnten Instabilität dieses Proteins nur mit erheblichem Material- und Zeitaufwand bewerkstelligt werden. Da zu Beginn dieser Forschungsarbeit noch nicht bekannt war, dass STAS und $J\alpha$ -STAS erst unterhalb von 12°C einigermaßen stabil blieben, wurden viele NMR-Experimente daher bei der Standardtemperatur von 27°C durchgeführt, wodurch die Proben bereits nach der Aufnahme eines einzigen 3D-Spektrums unbrauchbar wurden und dementsprechend viel Protein präpariert werden musste.

Wie Abbildung 31 zeigt, sind die meisten Resonanzen in den ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren beider Proteine gut aufgelöst und es ist eine Vielzahl der zu erwarteten Kreuzsignale vorhanden. Im mittleren Bereich des Spektrums von $J\alpha$ -STAS ist nur eine geringfügig größere Signalüberlagerung erkennbar, als bei STAS, sodass davon auszugehen ist, dass die $J\alpha$ -Helix tatsächlich zu einer α -Helix gefaltet ist. Da die Positionen der Resonanzen von $J\alpha$ -STAS und STAS eine sehr gute Übereinstimmung zeigen, dürften die Strukturen beider Proteine sehr ähnlich sein.

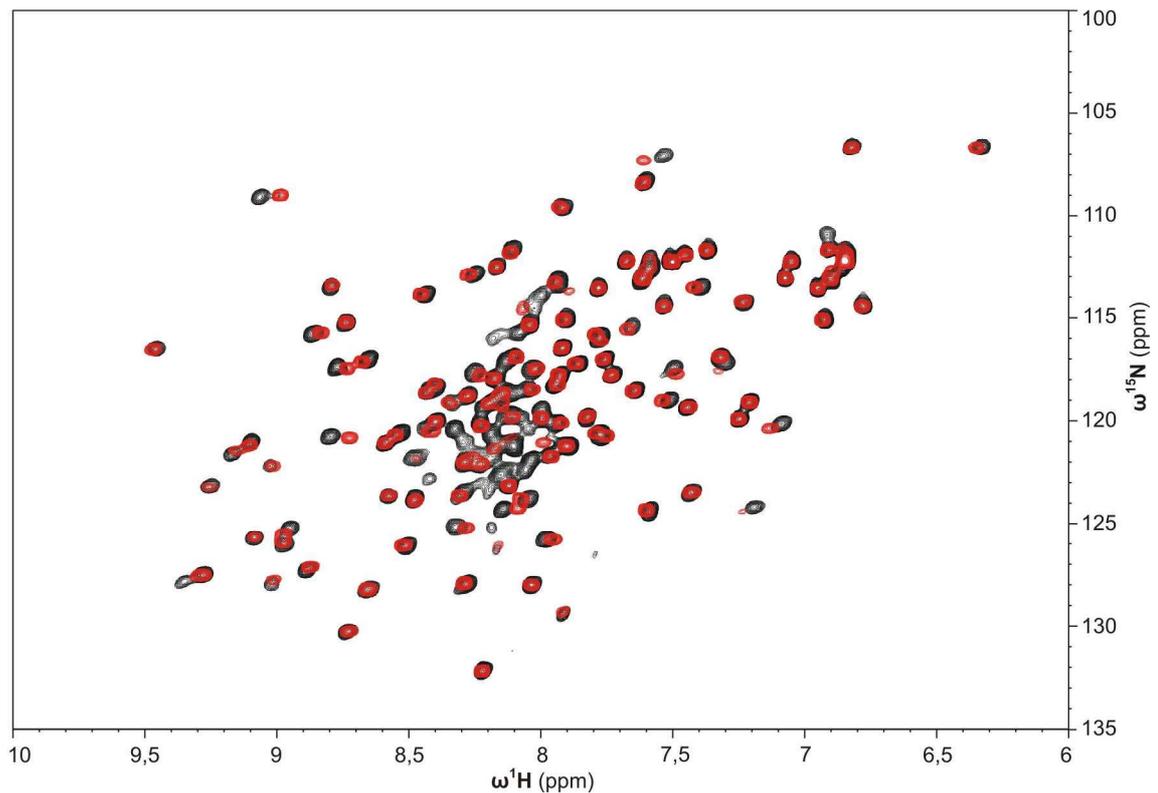


Abbildung 31: Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von STAS & $J\alpha$ -STAS

Das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von uniform ^{15}N -markiertem $J\alpha$ -STAS ist schwarz, das von STAS rot dargestellt. Die Spektren wurden mit einem 600 MHz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

Um über weitere Experimente moleküldynamische Eigenschaften sowie strukturelevante Daten erfassen zu können und um die mit GTP interagierenden Aminosäuren identifizieren zu können, wurden eine Reihe verschiedener 3D-Spektren für die sequentielle Zuordnung der $^1\text{H}_{\text{N}}$ -, ^{15}N -, $^{13}\text{C}\alpha$ - und $^{13}\text{C}\beta$ -Resonanzen aufgenommen. Wie sich dabei herausstellte, konnte eine Vielzahl der zur Identifizierung charakteristischer Aminosäuren benötigten $^{13}\text{C}\beta$ -Resonanzen und demzufolge viele sequenzspezifische Korrelationen nicht detektiert werden. Abgesehen davon führte die bei 27°C relativ schnell verlaufende Probendegeneration zu einer verstärkten Detektion von Resonanzen der Abbauprodukte, was in den 3D-Spektren störende Signalartefakte erzeugte. Durch die Absenkung der Messtemperatur auf 12°C konnte zwar letzterem relativ gut entgegengewirkt werden, dafür verringerte sich aber auch die Zahl detektierbarer Resonanzen erheblich. Wegen dieser Umstände war es daher auch nach intensiven Bemühungen nicht möglich, STAS bzw. $J\alpha$ -STAS sequentiell zuzuordnen. Durch die Verwendung uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markierter Proteine und die Anwendung TROSY-basierter Techniken [127,128] konnte die Qualität der Spektren immerhin verbessert werden, sodass die Zuordnung der STAS-Domäne prinzipiell möglich gewesen wäre, da die entsprechenden Aminosäuren jedoch auch in deuteriertem YtvA zugeordnet werden konnten [145], wurden diesbezüglich keine weiteren Anstrengungen unternommen.

4.3.2 Oligomerisierungszustand

Wie in Abschnitt 4.2.2 bereits angeführt, deutete sich schon während der Präparation der STAS-Domäne an, dass diese möglicherweise Dimere bildet. Um diese Annahme zu verifizieren, und auch, um das Monomer-Dimer-Verhältnis besser quantifizieren zu können, wurde der Oligomerisierungszustand von STAS mittels analytischer Ultrazentrifugation (Abschnitt 3.5.4) untersucht. Dazu wurde in einem Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment der zeitliche Verlauf der Sedimentation von STAS bei drei verschiedenen Konzentrationen (1, 2 und 4 mg/ml) aufgezeichnet. Die Detektion sedimentierender Spezies erfolgte durch die simultane Messung der Absorption bei 280 nm (0,003 cm radiale Auflösung) und die Aufzeichnung von Interferenzscans in Intervallen von 330 Sekunden über einen Zeitraum von 11 Stunden. Mit „Sedfit“ [99,100] wurde aus den Daten anschließend die Konzentration der sedimentierenden Spezies ($c(S)$) in Abhängigkeit vom Sedimentationskoeffizienten (S) auf Basis einer kontinuierlichen $c(S)$ -Verteilung berechnet. In Abbildung 32 sind die so ermittelten $c(S)$ -Verteilungen für die drei untersuchten STAS-Konzentrationen dargestellt.

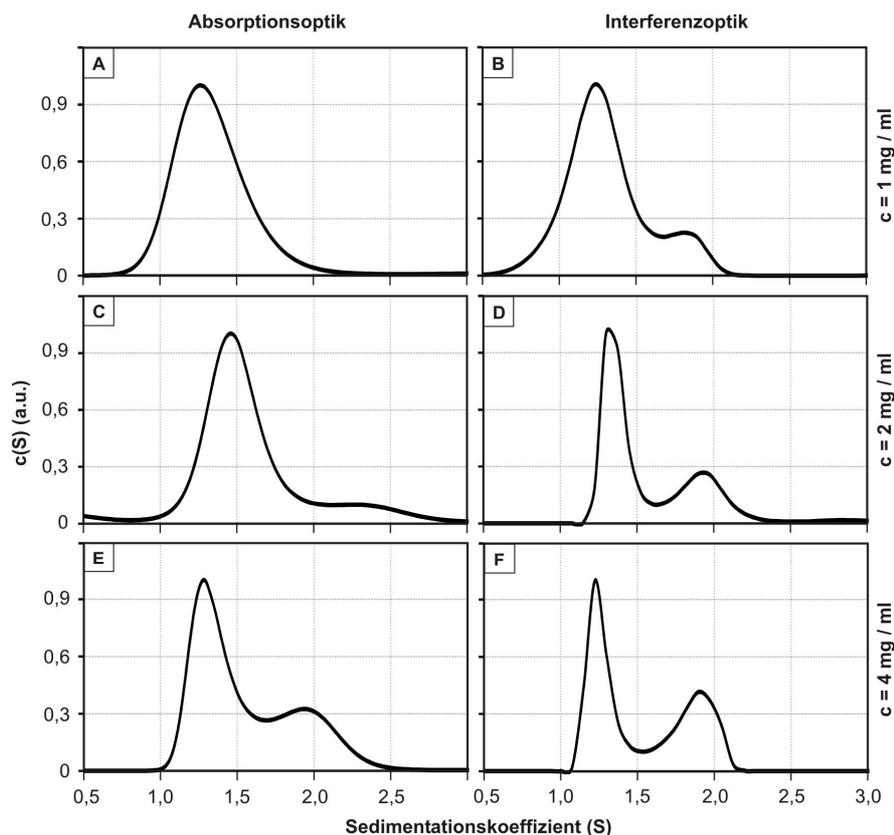


Abbildung 32: Konzentrationsabhängige $c(S)$ -Verteilung aus SV-Daten der STAS-Domäne

Kurven der konzentrationsabhängigen Verteilung der Sedimentationskoeffizienten für STAS-Konzentrationen von 1 mg/ml (oben), 2 mg/ml (Mitte) und 4 mg/ml (unten). Die Kurven in A, C und E wurden aus Absorptionsscans, die Kurven in B, D und E aus Interferenzscans berechnet. Die Konzentrationswerte der Kurvenmaxima wurden auf 1 normiert.

Die Daten der Interferenzscans (Abbildung 32B, D und F) zeigen, dass bereits ab einer STAS-Konzentration von 1 mg/ml 2 diskrete Spezies (#1 & #2 in Tabelle 23) mit einem mittleren apparenten Sedimentationskoeffizienten (S_{app}) von 1,25 S bzw. 1,84 S sedimentieren und dass der Anteil der „schwereren“ Spezies in höher konzentrierten Proben zunimmt. Dieser Trend wird auch von den Absorptionsscans bestätigt, wegen der geringeren radialen Auflösung und dem sehr kleinen molaren Extinktionskoeffizienten ($2980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) konnte eine zweite Spezies hier jedoch erst ab einer Konzentration von 2 mg/ml detektiert werden (Abbildung 32A, C & E). Die von „Sedfit“ zur Berechnung der Friktionskoeffizientenverhältnisse (f/f_0) sowie der davon abhängigen mittleren apparenten Molekulargewichte (MW_{app}) benötigten Parameter (Pufferdichte (ρ), Pufferviskosität (η) partialspezifisches Volumen (\bar{v})), wurden mit „Sednterp“ [101] kalkuliert. Unter Berücksichtigung der Pufferzusammensetzung, des pH-Wertes, der Temperatur und der Aminosäuresequenz von STAS ergaben sich die in Tabelle 22 aufgeführten Werte.

Tabelle 22: Mit "Sednterp" berechnete Parameter

ρ	η	\bar{v}	MW
1,00855 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,01238 $\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$	0,7535 ml	12,544 kDa

Zur quantitativen Abschätzung der Mengenverhältnisse zwischen den sedimentierenden Spezies wurden die Signalflächen der $c(S)$ -Verteilung mit „Sedfit“ integriert. Tabelle 23 fasst alle ermittelten Werte zusammen.

Tabelle 23: Daten aus den SV-Experimenten mit STAS

Konzentration (mg/ml)	Detektion	Fitgüte (rmsd)	f/f_0	#1: S_{app}	#2: S_{app}
				#1: MW_{app}	#2: MW_{app}
				#1: Intergral	#2: Intergral
1	UV	0,0120	1,162	1,34 S	/
				14,1 kDa	/
				100%	/
2	UV	0,0120	1,059	1,51 S	2,48 S
				15,7 kDa	32,9 kDa
				89,3%	10,7%
4	UV	0,1360	1,073	1,36 S	1,98 S
				13,7 kDa	24 kDa
				68,1%	31,9%
1	IF	0,0078	1,272	1,25 S	1,84 S
				15,6 kDa	27,7 kDa
				87,3%	12,7%
2	IF	0,0082	1,144	1,37 S	1,93 S
				15,2 kDa	25,3 kDa
				66,5%	33,5%
4	IF	0,0144	1,075	1,27 S	1,86 S
				12,4 kDa	21,9 kDa
				57,2%	42,8%

Auch wenn sich die berechneten MW_{app} z.T. deutlich vom theoretischen Wert unterscheiden, belegen die gemessenen $c(S)$ -Verteilungen eindeutig die konzentrationsabhängige Dimerisierung der STAS-Domäne. Zwar lässt sich aus der in Abbildung 32F gezeigten $c(S)$ -Verteilung wegen der Signalüberlappung das Monomer-Dimer-Verhältnis nicht genau quantifizieren, mit einiger Sicherheit wird das untere Limit der Dissoziationskonstante aber größer als die eingesetzte STAS-Konzentration von $320 \mu\text{M}$ ($\pm 4 \text{ mg/ml}$) sein (57,2% Monomer zu 42,8% Dimer). Weil sich das System während der Sedimentation jedoch nicht im Gleichgewicht befindet und die ermittelten Konzentrationsverhältnisse nicht den Gleichgewichtskonzentrationen entsprechen, kann K_D nicht hinreichend genau berechnet werden. Daher wurde versucht, K_D mittels Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten zu bestimmen. Leider war das trotz intensiver Bemühungen nicht möglich, da STAS während der mehrere Tage dauernden Messungen zu stark degenerierte und deswegen kein konsistenter Datensatz zu erhalten war.

4.4 Untersuchung der Interaktion von GTP mit YtvA bzw. der STAS-Domäne

Aufgrund der Sequenzhomologie zwischen Teilbereichen der STAS-Domäne von YtvA und der GTP-bindenden STAS-Domäne von SPOIIAA [65,146], aber auch weil YtvA-STAS die klassischen Sequenzmotive DXXG & NKXD ($D^{193}\text{LSG}$ & $N^{236}\text{KLD}$ in YtvA-STAS) enthält, welche die GTP-Bindung in G-Proteinen vermitteln [54], wurde angenommen, YtvA könnte ebenfalls ein GTP-bindendes Protein sein. Diese Vermutung schien sich 2006 zu bestätigen, indem Buttani *et al.* gezeigt haben, dass das fluoreszenzmarkierte GTP-Analogon BODIPY[®]-GTP (s. Abbildung 33) mit YtvA interagiert und sich die Stärke dieser Interaktion durch Belichtung des Proteins verringert [69]. Für photoaktiviertes YtvA wurde eine Bindekonstante von $K_D = 38 \mu\text{M}$ angegeben. Basierend auf dieser Methode wurde BODIPY[®]-GTP dann als Marker benutzt, um den Einfluss verschiedener Mutationen auf die YtvA-GTP-Interaktion zu untersuchen [69,74,147,148], wobei das GTP-bindende Motiv allerdings nicht identifiziert werden konnte.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war daher die genaue Lokalisation der Bindestelle, da die lichtinduzierte Modulation der GTP-Bindung das entscheidende Bindeglied zwischen intra- und intermolekularer Signaltransduktion darstellen könnte. Da mittels heteronuklearer NMR-Spektroskopie auch nach mehrfachen Versuchen keine Interaktion zwischen GTP und YtvA oder dessen isolierter STAS-Domäne zu detektieren war, überprüften wir die GTP-Bindungseigenschaften der präparierten Proteine daraufhin analog zum Protokoll von Buttani *et al.* [69]. Neben der fluoreszenz-spektroskopischen Interaktionsanalyse untersuchten wir die Wechselwirkung zwischen GTP und YtvA bzw. der isolierten STAS-Domäne zusätzlich mit Isothermaler Titrationskalorimetrie sowie Liganden- und Proteindetektierender Methoden der Lösungs-NMR-Spektroskopie. Um

mögliche Effekte des Fluorophors zu erfassen, wurden alle Experimente mit BODIPY[®]-GTP wiederholt und mittels Fluoreszenzspektroskopie darüber hinaus geprüft, ob auch der reine Fluorophor BODIPY[®] (s. Abbildung 33) mit den Proteinen in Interaktion tritt.

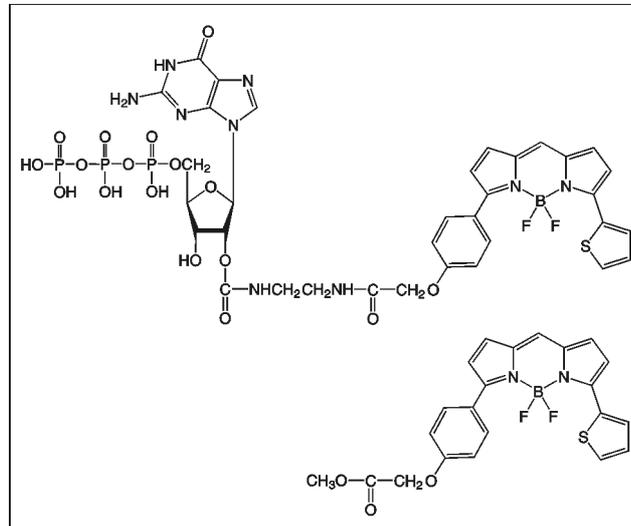


Abbildung 33: Fluorophorfarbstoffe
 Strukturformeln von BODIPY[®]-GTP (oben) und
 BODIPY[®]-Methylester (unten).

4.4.1 Fluoreszenzspektroskopie

Die fluoreszenzspektroskopischen Experimente zeigten eindeutig, dass BODIPY[®]-GTP mit YtvA und STAS interagiert, da sich die relative Fluoreszenz nach Zugabe von YtvA bzw. STAS zur Fluorophorlösung signifikant erhöhte (Abbildung 34A). Das stimmt soweit mit den in der Literatur publizierten Ergebnissen überein [69,149]. Wegen der Hydrophobizität von BODIPY[®] könnte die Bindung aber auch auf die Interaktion mit hydrophoben Oberflächenbereichen zurückzuführen sein und da solch unspezifische Wechselwirkungen ebenfalls einen Fluoreszenzanstieg bewirken, würde dies zu einem falsch-positives Signal führen. Dadurch wäre es dann unmöglich festzustellen, wie groß der Anteil der GTP-getriebenen Fluoreszenzerhöhung tatsächlich ist. Die Experimente wurden daher mit dem reinen Fluorophor wiederholt und dabei ein mit BODIPY[®]-GTP vergleichbarer Fluoreszenzanstieg gemessen (s. Abbildung 34B). Das deutet darauf hin, dass lediglich der Fluorophor für die Interaktion verantwortlich ist und GTP nicht an das Protein bindet. Letzteres lässt sich allerdings nicht komplett ausschließen, da eine schwache Wechselwirkung durch den vom Fluorophor verursachten Fluoreszenzanstieg maskiert werden könnte.

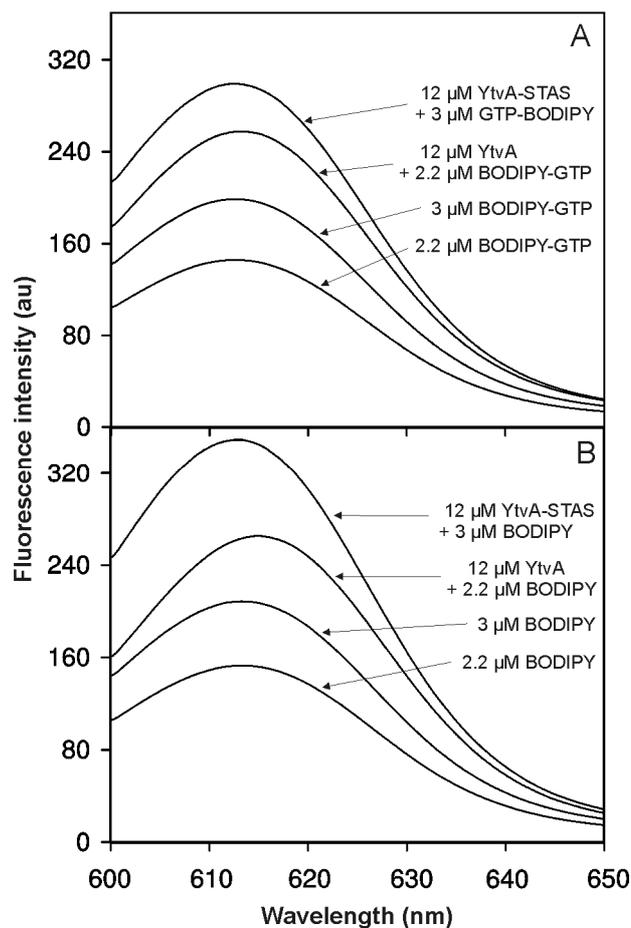


Abbildung 34: Vergleich der Fluoreszenzspektren
 Fluoreszenzspektren aus den Experimenten mit BODIPY[®]-GTP (A) und BODIPY[®] (B).

4.4.2 Isothermale Titrationskalorimetrie

Der Vorteil der ITC bestand darin, dass neben BODIPY[®]-GTP auch die Wechselwirkung zwischen YtvA bzw. STAS und reinem GTP untersucht werden konnte. BODIPY[®]-GTP wurde aufgrund der bereits nachgewiesenen Interaktion mit beiden Proteinen als Positivkontrolle eingesetzt, wohingegen der reine Fluorophor wegen seiner geringen Löslichkeit nicht für die ITC verwendet werden konnte. In Tabelle 24 sind die aus den jeweiligen Experimenten berechneten Werte angegeben und in Abbildung 35 & Abbildung 36 die entsprechenden Titrationskurven gezeigt.

Tabelle 24: Ergebnisse der ITC-Experimente mit YtvA & STAS

Protein	Ligand	ΔH (kcal·mol ⁻¹)	$-T\Delta S$ (kcal·mol ⁻¹)	N	KD (μ M)	ΔG° (kcal·mol ⁻¹)
STAS	GTP	/	/	/	/	/
STAS	BODIPY [®] -GTP	-48	41,3	0,96	7,6	-6,7
YtvA	GTP	/	/	/	/	/
YtvA	BODIPY [®] -GTP	-9,6±0,3	2,0	0,54±0,01	2,5±0,3	-7,6

Ergebnisse

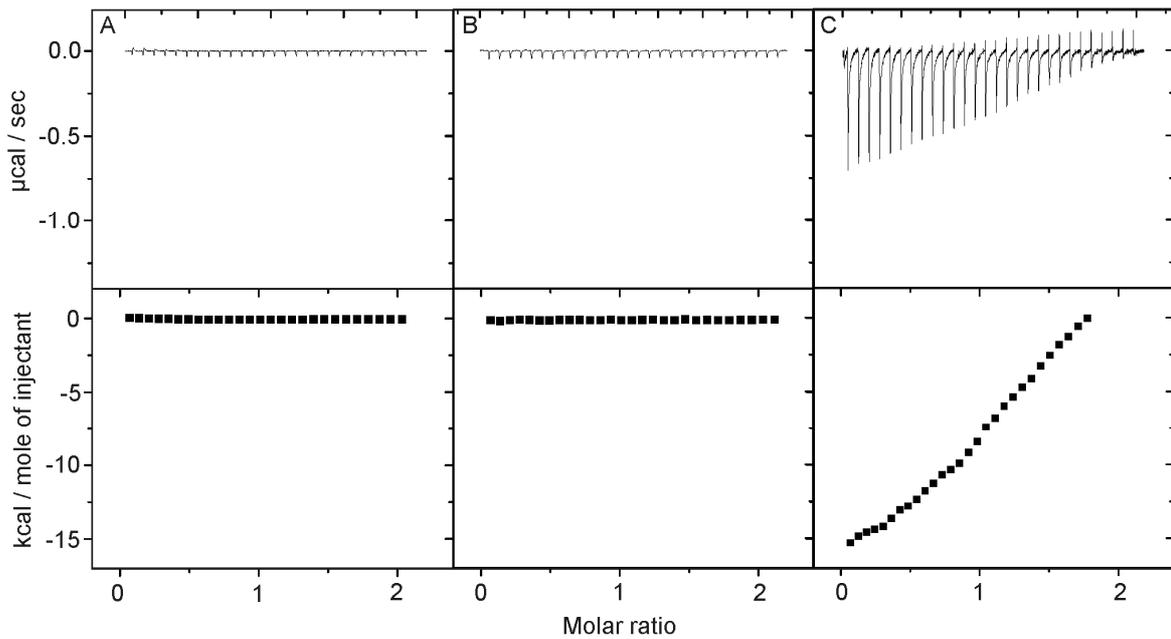


Abbildung 35: ITC Titrationskurven von STAS

(A) 1 mM GTP in Puffer, (B) 1 mM GTP in 100 μM STAS und (C) 500 μM BODIPY[®]-GTP in 50 μM STAS. Alle Titrations wurden bei 12°C durchgeführt.

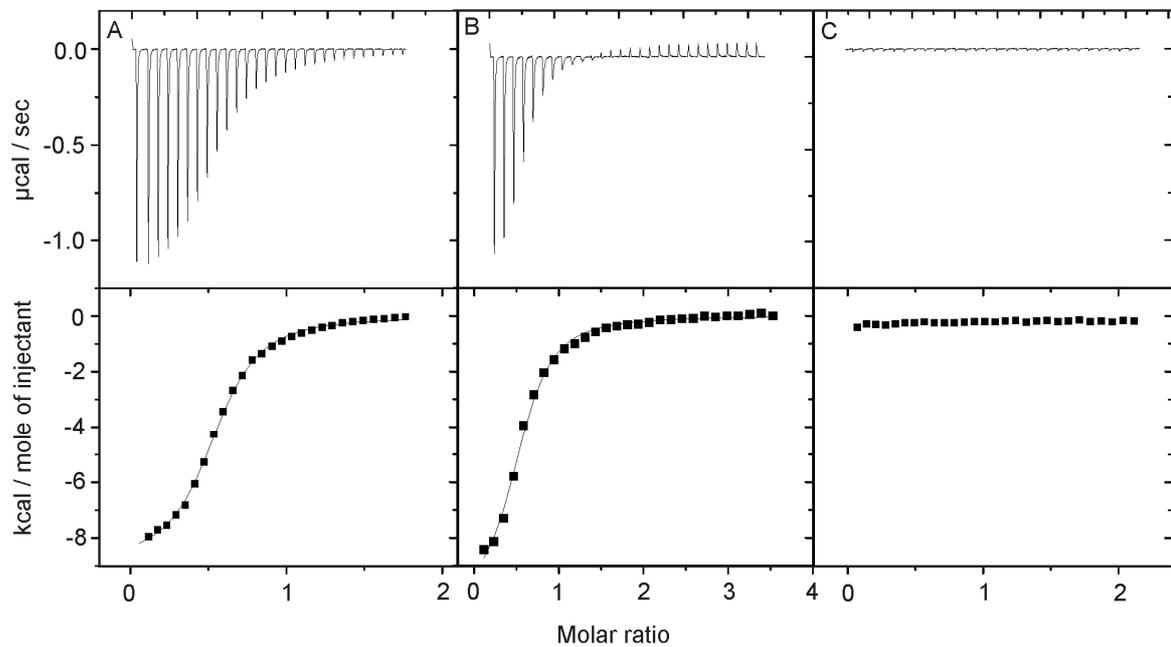


Abbildung 36: ITC Titrationskurven von YtvA

(A) 500 μM BODIPY[®]-GTP in 60 μM YtvA, (B) 500 μM BODIPY[®]-GTP in 30 μM YtvA und (C) 500 μM GTP in 60 μM YtvA. Alle Titrations wurden bei 25°C durchgeführt.

Eine Interaktion zwischen GTP und YtvA bzw. STAS wurde nicht detektiert, nur minimale Verdünnungswärmen waren messbar. Die Titration von YtvA mit BODIPY[®]-GTP produzierte dagegen typische Bindungskurven, aus denen ein K_D von 2,5 μM berechnet wurde. Die Daten aus der Titration von STAS mit BODIPY[®]-GTP wurden mit „Sedphat v9.01“ [103] ausgewertet, da die Titration nicht zu einer vollständigen Sättigung führte und daher mit der Standardsoftware der ITC (Microcal-Origin[®]) nicht zufriedenstellend ausgewertet werden konnte. Die Qualität der experimentellen Daten aus der STAS-Titration erreicht nicht das Niveau der YtvA-Titration, was der geringeren Temperatur, vor allem aber der Instabilität von STAS geschuldet sein dürfte. Nichtsdestotrotz konnte „Sedphat“ Daten unvollständig gesättigter Titrationsreihen bedeutend besser verarbeiten und produzierte eine relativ gut gefittete Bindekurve (s. Abbildung 37A). Daraus ergaben sich für die thermodynamischen Parameter Werte von $K_D = 7,6 \mu\text{M}$ und $\Delta H = -48 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

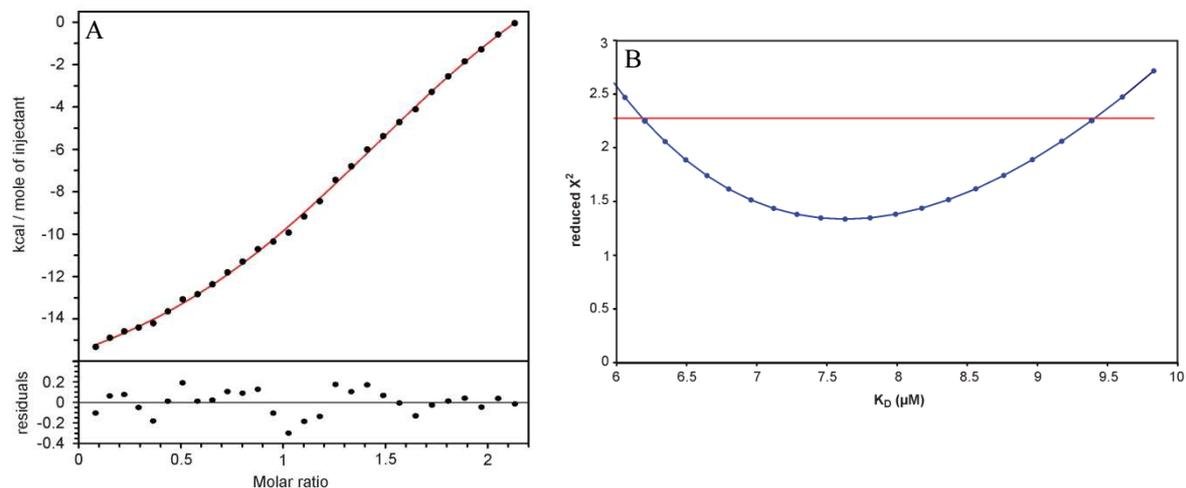


Abbildung 37: Fitkurve & Konfidenzintervall für die Titration von STAS mit BODIPY[®]-GTP

A: Die Bindekurve und die Residuen wurden mit „Sedphat v9.01“ berechnet. B: Projektion der reduzierten χ^2 -Werte auf die Ebene der K_D -Werte (blaue Punkte) und Schwellenwert des reduzierten χ^2 -Wertes für das 99% Konfidenzintervall (rote Linie). Das 99% Konfidenzintervall für K_D (alle Werte auf und unterhalb des Schwellenwertes) reicht von 6,2 - 9,4 μM .

Der Wert von ΔH ist mit großer Unsicherheit behaftet. Wie die Variation der reduzierten χ^2 -Werte um das Minimum des besten Fits [150,151] zeigt, wurde K_D aber sehr präzise bestimmt. Bei dieser Prozedur wird der K_D -Wert nahe, aber abweichend von seinem am besten gefitteten Wert konstant gehalten und der Fit unter Optimierung der anderen Parameter (ΔH , Verdünnungswärme, aktive Konzentration von BODIPY[®]-GTP in der Spritze) wiederholt. Die sich daraus ergebenden Werte wurden als Projektion der reduzierten χ^2 -Werte auf die Ebene der K_D -Werte dargestellt (s. Abbildung 37B, blaue Punkte). Dann wurde auf Basis von Fischer's F-Verteilung der Schwellenwert des reduzierten χ^2 für ein 99% Konfidenzintervall berechnet (s. Abbildung 37B, rote Linie).

Der K_D -Wert kann innerhalb des berechneten 99% Konfidenzintervalls in einem Bereich von 6,2-9,4 μM liegen.

Die ITC-Daten bestätigen die Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie und damit die Vermutung, dass scheinbar nur der Fluorophor bindet, GTP jedoch nicht. Zusätzlich deuten die Daten auch daraufhin, dass die Interaktionsstelle auf der STAS-Domäne lokalisiert ist. Darüber hinaus ergaben sich auch signifikante Unterschiede zwischen den Stöchiometrien der Reaktion von BODIPY[®]-GTP mit YtvA bzw. STAS. Während STAS den Liganden 1:1 bindet, beträgt dieses Verhältnis im Komplex von BODIPY[®]-GTP und YtvA dagegen 1:2. Grund dafür könnte der unterschiedliche Oligomerisierungszustand beider Proteine sein. Wie wir zeigen konnten, ist YtvA ein Dimer [61], STAS liegt unter den verwendeten Bedingungen hingegen hauptsächlich als Monomer vor und tendiert bei höheren Konzentrationen zur Dimerisierung (s. Abschnitt 4.3.2 und [145]). Darüber hinaus ist STAS nur bei geringen Temperaturen ($\leq 12^\circ\text{C}$) einigermaßen stabil, beginnt bei physiologischen Temperaturen aber zu aggregieren, während YtvA sehr viel stabiler ist. Wir nehmen daher an, dass STAS an seiner Oberfläche hydrophobe Bereiche exponiert und dass diese Bereiche in YtvA aufgrund einer STAS-STAS-Interaktion teilweise verdeckt sein könnten. Da die Wechselwirkung mit BODIPY[®]-GTP höchstwahrscheinlich hydrophober Natur ist, könnte das die oben erwähnten Unterschiede der Stöchiometrien erklären.

4.4.3 Lösungs-NMR-Spektroskopie

Die Lösungs-NMR-Spektroskopie ist eine etablierte Methode zur Untersuchung von Interaktionen zwischen Proteinen und kleinen Liganden, insbesondere wenn diese Interaktionen eher schwach sind. Prinzipiell sind dazu 2 verschiedene Arten von Experimenten möglich. Zum einen kann uniform ^{15}N -markiertes Protein eingesetzt und dessen Signale sowie die durch eine Protein-Ligand-Interaktion auftretende Signalveränderung detektiert werden. Zum anderen können Liganden-detektierende Experimente, wie Sättigungstransferdifferenz (STD) [152] oder WaterLOGSY [153,154] in An- und Abwesenheit von unmarkiertem Protein zum Nachweis einer Interaktion durchgeführt werden. Durch die während dieser Arbeit entwickelte fasergekoppelte LED-Lichtquelle (s. Abschnitt 4.1.3) konnten wir mittels NMR darüber hinaus auch die Wechselwirkung zwischen GTP bzw. BODIPY[®]-GTP und photaktiviertem YtvA untersuchen. Da die meisten $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen von unbelichtetem YtvA zugeordnet werden konnten [145], war es auch möglich, die im unbelichteten Protein an der Interaktion mit BODIPY[®]-GTP beteiligten Aminosäuren zu identifizieren.

Abbildung 38A zeigt eine Überlagerung der 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren ($^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC's) von uniform ^{15}N -markiertem STAS ($c = 30 \mu\text{M}$) bei An- und Abwesenheit eines 6-fachen Überschusses GTP. Da sich beide Spektren weder bezüglich der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen, noch der Signalintensitäten der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Kreuzsignale

signifikant unterscheiden, findet keine messbare Interaktion mit GTP statt. Im Gegensatz dazu zeigt die Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC's von STAS ($c = 30 \mu\text{M}$) bei An- und Abwesenheit eines 6-fachen Überschusses BODIPY[®]-GTP bei einer Vielzahl von Kreuzsignalen große Intensitätsveränderungen (s. Abbildung 38B). Das bestätigt die Interaktion beider Spezies und zeigt außerdem, dass BODIPY[®]-GTP, bezogen auf die NMR-Zeitskala, einem intermediären Austausch unterliegt, der eine Linienverbreiterung und damit einhergehend eine Abnahme der Signalintensität der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren bewirkt.

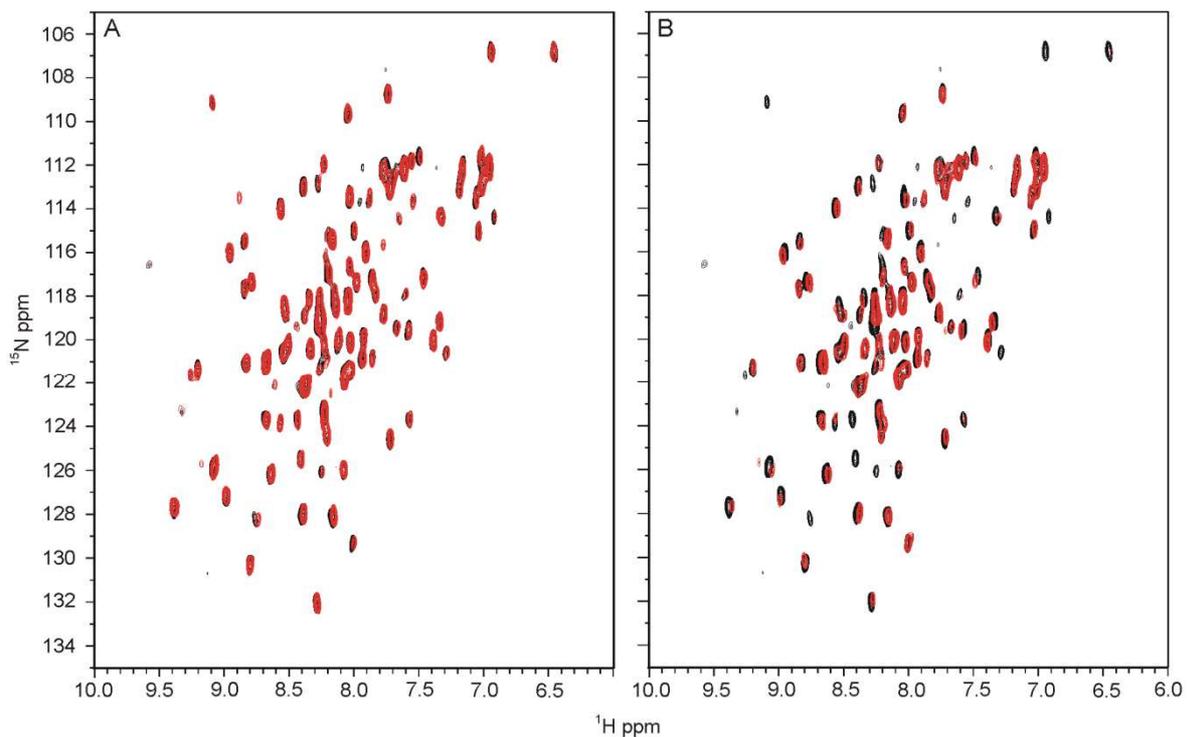


Abbildung 38: Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC's von STAS in An- & Abwesenheit von Liganden
 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC's von (A) $30 \mu\text{M}$ uniform ^{15}N -markiertem STAS ohne (schwarz) und mit (rot) $180 \mu\text{M}$ GTP und (B) $30 \mu\text{M}$ uniform ^{15}N -markiertem STAS ohne (schwarz) und mit (rot) $180 \mu\text{M}$ BODIPY[®]-GTP.

Wir haben analoge Experimente auch mit uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -markiertem YtvA ($50 \mu\text{M}$, unbelichtet) durchgeführt, aber einen 10-fachen Überschuss entsprechender Liganden zugesetzt und, wegen des größeren Molekulargewichtes, die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen als $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren ($^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY's) aufgenommen [127,128]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit STAS, konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY's bei An- und Abwesenheit von GTP (s. Abbildung 39A), aber eine erhebliche Intensitätsabnahme diverser Kreuzsignale in Gegenwart von BODIPY[®]-GTP detektiert werden (s. Abbildung 39B).

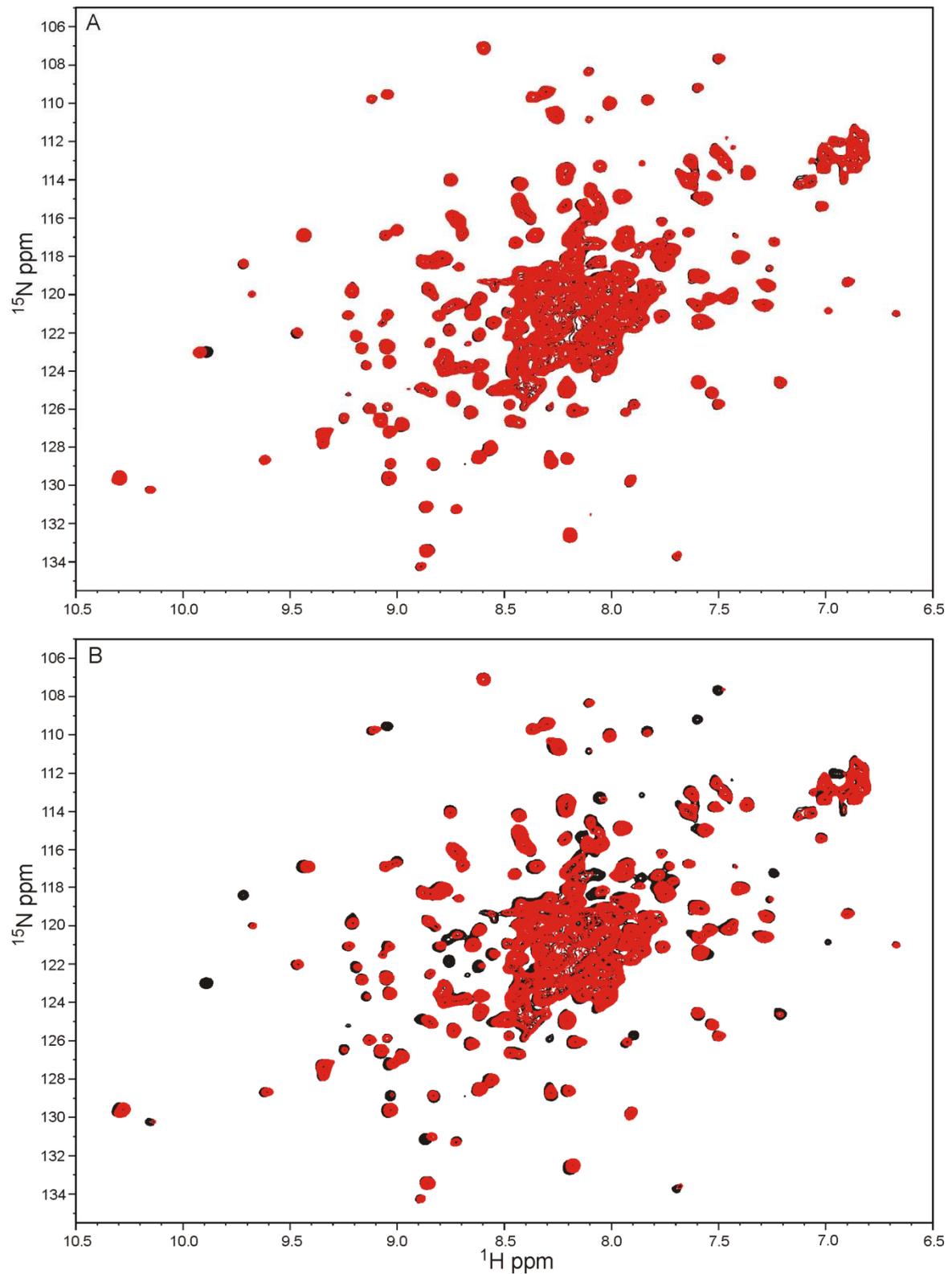


Abbildung 39: Überlagerung von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY's von YtvA in An- & Abwesenheit von Liganden
 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY's von (A) 50 μM uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -markiertem YtvA ohne (schwarz) und mit (rot) 500 μM GTP und (B) 50 μM uniform $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -markiertem YtvA ohne (schwarz) und mit (rot) 500 μM BODIPY[®]-GTP. Die Spektren wurden mit unbelichtetem YtvA aufgenommen.

Auf Basis der sequentiellen Zuordnung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen von YtvA konnten die Effekte der Liganden für alle gut aufgelösten Kreuzsignale quantifizieren werden. Abbildung 40 zeigt die Auftragung der Signalintensitätsverhältnisse gegen die entsprechenden Aminosäuren der YtvA-Sequenz für die Interaktion mit GTP (Abbildung 40A) und BODIPY[®]-GTP (Abbildung 40B). Im Fall von GTP fluktuieren die Intensitätsverhältnisse um den Wert 1, d.h. die entsprechenden Spektren unterscheiden sich nahezu nicht voneinander. Insbesondere die auswertbaren Kreuzsignale des D¹⁹³LSG- und des N²³⁶KLD-Motivs (D¹⁹³, L¹⁹⁴, G¹⁹⁶, & L²³⁸) blieben von GTP unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu erzeugt die Bindung von BODIPY[®]-GTP deutliche Effekte. Während die LOV-Domäne (AS 26-128) kaum beeinflusst wird (der Mittelwert aller Intensitätsverhältnisse beträgt hier $0,93\pm 0,1$), sind die J α -Helix sowie die STAS-Domäne stark betroffen. Die gemittelten Intensitätsverhältnisse betragen $0,60\pm 0,21$ für J α und $0,61\pm 0,17$ für die STAS-Domäne.

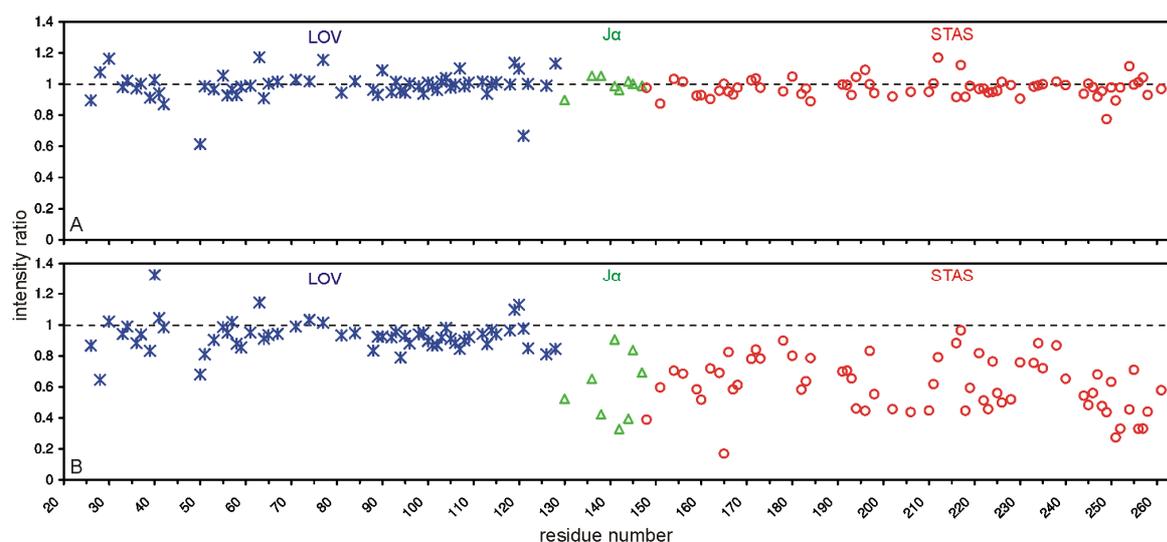


Abbildung 40: Plots der Signalintensitätsverhältnisse von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Kreuzsignalen von YtvA

Plots der gegen die YtvA-Sequenz aufgetragenen Signalintensitätsverhältnisse von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Kreuzsignalen von (A) $50\ \mu\text{M}$ uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -markiertem YtvA ohne und mit $500\ \mu\text{M}$ GTP und (B) $50\ \mu\text{M}$ uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}$ -markiertem YtvA ohne und mit $500\ \mu\text{M}$ BODIPY[®]-GTP. Die entsprechenden $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren wurden mit unbelichtetem YtvA aufgenommen. Die Werte sind unterschiedlich hervorgehoben für die LOV-Domäne (blaue Kreuze), die J α -Helix (grüne Dreiecke) und die STAS-Domäne (rote Kreise). Ein Intensitätsverhältnis von 1 (gestrichelte Linie) bedeutet, dass die Zugabe des entsprechenden Liganden keinen Effekt verursacht.

Die Bindung von BODIPY[®]-GTP scheint demnach auf die J α -Helix und die STAS-Domäne beschränkt und eher unspezifisch zu sein. Ein ähnlich unspezifischer Mechanismus wurde von Nakasone *et al.* auch für die Interaktion von BODIPY[®]-GTP mit hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche verschiedener Varianten der isolierten YtvA-LOV-Domäne vorgeschlagen [149]. Das Fehlen von N- und C-terminal der LOV-Domäne

lokalisierter Sequenzabschnitte scheint dabei Einfluss auf die Hydrophobizität dieser Proteinvarianten zu haben, wodurch diese ebenfalls mit BODIPY[®]-GTP interagieren. Im vollständigen Protein scheint die LOV-Domäne dagegen kaum hydrophobe Bereiche zu besitzen, sodass die BODIPY[®]-GTP-Interaktion in unseren Experimenten auf die $J\alpha$ -Helix und die STAS-Domäne beschränkt ist. Wie die ITC-Experimente gezeigt haben, verhält sich auch die isolierte STAS-Domäne anders, als YtvA. Aus vorangegangenen NMR-Experimenten mit YtvA wissen wir auch, dass die $J\alpha$ -Helix und die STAS-Domäne flexibler als die LOV-Domäne sind [145] und deshalb möglicherweise eher hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können, als die relativ starre und fest zum Dimer gebundene LOV-Domäne. Davon abgesehen ist das wirklich wichtige Ergebnis der Experimente aber die Tatsache, dass weder die STAS-Domäne noch YtvA mit GTP interagieren.

Um diese Resultate nochmals zu bestätigen, und auch, um eine mögliche Interaktion zwischen GTP und photoaktiviertem YtvA zu untersuchen, nutzten wir noch zwei weitere NMR-Techniken, das STD-Experiment [152] und das WaterLOGSY-Experiment [153,154]. Beide Techniken basieren auf der Detektion des Liganden und messen die durch seine Interaktion mit dem Protein auftretenden Veränderungen seines Protonenspektrums. Während eine Protein-Ligand-Interaktion im STD-Spektrum durch die Anwesenheit von Signalen des Liganden angezeigt wird, offenbart ein Vorzeichenwechsel der Ligandensignale im WaterLOGSY-Spektrum, dass keine Interaktion stattfindet. Da letztere Technik auf einem Magnetisierungstransfer zwischen Wassermolekülen und Ligand basiert, erscheinen Signale austauschbarer Ligandprotonen jedoch unabhängig von einer stattfindenden Interaktion immer mit positivem Vorzeichen im Ligandenspektrum. Als Positivkontrolle haben wir alle Experimente zuerst mit BODIPY[®]-GTP durchgeführt und konnten dessen Interaktion mit YtvA eindeutig bestätigen. Abbildung 41 zeigt Ausschnitte der aufgenommenen NMR-Spektren, wobei die in Anwesenheit des Liganden aufgenommenen WaterLOGSY- und STD-Spektren in Abbildung 41A bzw. Abbildung 41B und die Referenzspektren von YtvA und BODIPY[®]-GTP in Abbildung 41C bzw. Abbildung 41D dargestellt sind. Die Signale der aromatischen Protonen des Fluorophors sind mit Sternchen gekennzeichnet. Das mit dem Pfeil markierte Signal resultiert von einem austauschbaren Proton des Liganden und ist daher nur im Referenz- und im WaterLOGSY-Spektrum sichtbar. Beide Experimenttypen bestätigen, dass der hydrophobe Fluorophorteil für die Interaktion verantwortlich ist. Die Wiederholung der Experimente mit photoaktiviertem YtvA ergab vergleichbare Resultate.

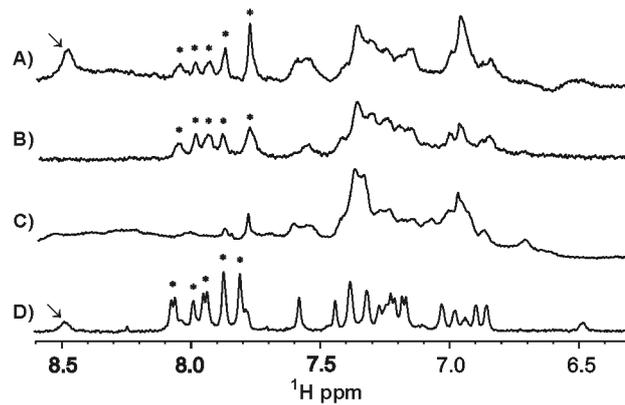


Abbildung 41: Ausschnitte liganddetektierter 1D ^1H -NMR-Spektren aus der Analyse schwacher molekularer Interaktionen zwischen unbelichtetem YtvA & BODIPY[®]-GTP.

WaterLOGSY (A) & STD-Watergate (B) von 20 μM YtvA + 200 μM BODIPY[®]-GTP. Watergate von 20 μM YtvA (C) & 200 μM BODIPY[®]-GTP (D). Signale der aromatischen Protonen des Fluorophors sind mit Sternchen, austauschbare Ligandprotonen mit Pfeilen markiert.

Zur Untersuchung der Interaktion mit GTP wurden die Experimente analog zur vorangegangenen Analyse wiederholt. Ausschnitte der aufgenommenen Spektren sind in Abbildung 42 gezeigt. Ein 1D ^1H -NMR-Referenzspektrum von YtvA ist nur für die unbelichtete Form gezeigt (Abbildung 42E), da die spektralen Unterschiede zu photoaktiviertem YtvA nur minimal waren. Das Referenzspektrum von GTP ist in Abbildung 42F, das WaterLOGSY- und das STD-Spektrum von unbelichtetem YtvA in Gegenwart von GTP in Abbildung 42A bzw. Abbildung 42B gezeigt. Das entsprechend bei kontinuierlicher Belichtung aufgenommene WaterLOGSY-Spektrum ist in Abbildung 42C und das STD-Spektrum in Abbildung 42D dargestellt. Das mit dem Pfeil markierte Signal resultiert von einem mit Wasser austauschenden Proton in GTP. Das im GTP-Referenzspektrum bei 8,25 ppm detektierte Signal stammt von dem an C8 des Purins gebundenen Proton und das bei 6,04 ppm detektierte Signaldublett vom H1' der Ribose. Beide Signale sind im STD-Spektrum nicht vorhanden und im WaterLOGSY negativ. Diese Daten belegen eindeutig, dass YtvA, unabhängig vom Aktivierungszustand, nicht mit GTP interagiert.

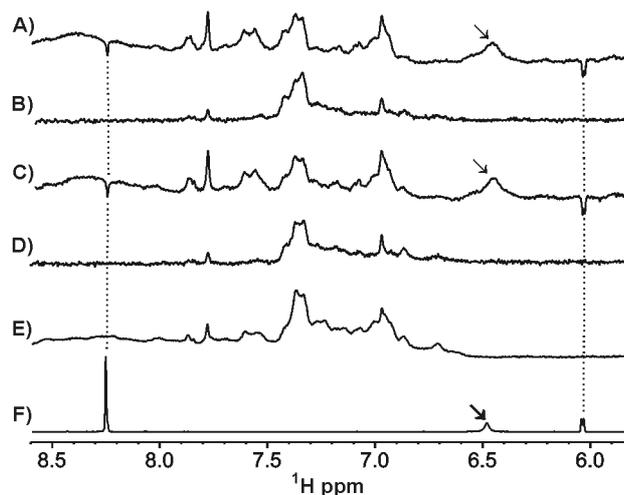


Abbildung 42: Ausschnitte liganddetektierter 1D ^1H -NMR-Spektren aus der Analyse schwacher molekularer Interaktionen zwischen YtvA & GTP.

WaterLOGSY (A) & STD-Watergate (B) von 20 μM unbelichtetem YtvA + 200 μM GTP. WaterLOGSY (C) & STD-Watergate (D) von 20 μM photoaktiviertem YtvA + 200 μM GTP. Watergate von 20 μM unbelichtetem YtvA (E) & 200 μM GTP (F). Signale von GTP sind mit gepunkteten Linien verbunden, austauschbare Ligandprotonen mit Pfeilen markiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass wir mit den aufgeführten, biophysikalischen Methoden unzweideutig zeigen konnten, dass das fluoreszenzmarkierte GTP-Analogon BODIPY[®]-GTP tatsächlich und eher unspezifisch mit YtvA interagiert, GTP selbst aber nicht an das Protein bindet, und dass diese Effekte vom Aktivierungszustand unabhängig sind. YtvA scheint demzufolge kein GTP-bindendes Protein zu sein.

Die Durchführung von in dieser Interaktionsstudie angewendeten, in dieser Arbeit aber nicht explizit aufgeführten Methoden, kann dieser Publikation entnommen werden [155].

4.5 Charakterisierung verschiedener YtvA-LOV-Varianten

Durch die Untersuchung und den Vergleich der funktionellen und strukturellen Eigenschaften von vier N- und C-terminal unterschiedlich terminierten Varianten der YtvA-LOV-Domäne, sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie die lichtgetriebene molekulare Schaltfunktion im Photorezeptor realisiert wird. Da die Struktur von YtvA-LOV-J α (AS 21-147, kurz LOV-J α) und deren lichtabhängige Veränderungen bereits von Möglich *et al.* mittels Röntgenstrukturanalyse in atomarer Auflösung erfasst wurden [75], lag der Fokus dabei vor allem auf der Klärung von Fragestellungen, welche durch die Untersuchung von LOV-J α -Kristallen bisher nicht oder nicht eindeutig beantwortet werden konnten.

So war bisher unklar, ob die J α -Sequenz auch in Lösung eine helikale Struktur annimmt und wenn ja, ob diese zur LOV-Domäne möglicherweise spezifisch orientiert ist oder sich eher unabhängig von ihr bewegen kann. Die Existenz der J α -Helix vorausgesetzt, sollte dann untersucht werden, ob diese sich, analog zu Phototropinen (s. Abschnitt 1.3.1), lichtabhängig entfaltet oder wenn nicht, sich möglicherweise ihre Orientierung zur LOV-Domäne oder ihre Dynamik verändert.

Ein weiteres Ziel war es auch, Informationen zur Struktur, der möglichen Orientierung und der Dynamik des N-terminal vor der LOV-Domäne lokalisierten Sequenzabschnittes (Ncap, AS 2-20) zu gewinnen.

Die genannten Fragestellungen sollten in erster Linie mit Methoden der Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht werden, doch da diese Methode jedoch sehr zeit- und kostenintensiv ist, wurde noch vor der Planung von NMR-Experimenten geprüft, ob alle 4 LOV-Varianten auch photochemisch aktiv sind. Mittels CD-Spektroskopie wurde darüber hinaus untersucht, ob die J α -Sequenz als α -Helix vorliegt. Zusätzlich wurde mittels AUZ geprüft, ob die An- bzw. Abwesenheit von Ncap oder der J α -Helix einen Einfluss auf den Oligomerisierungszustand der LOV-Domäne hat oder diesen möglicherweise lichtabhängig verändert. Bisher wurde nur der Oligomerisierungszustand von unbelichtetem LOV-J α untersucht und gezeigt, dass dieses als Dimer vorliegt ($K_D \leq 200$ nM) [75].

4.5.1 Photochemische Aktivität

Die photochemische Aktivität der LOV-Varianten wurde zum einen durch den Vergleich von UV-Vis-Spektren unbelichteter und belichteter Proteine sowie durch die Aufnahme der Kinetik der Hell-Dunkel-Rückkonversion überprüft (s. Abschnitt 3.5.2). Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind in Abbildung 43 zusammengestellt.

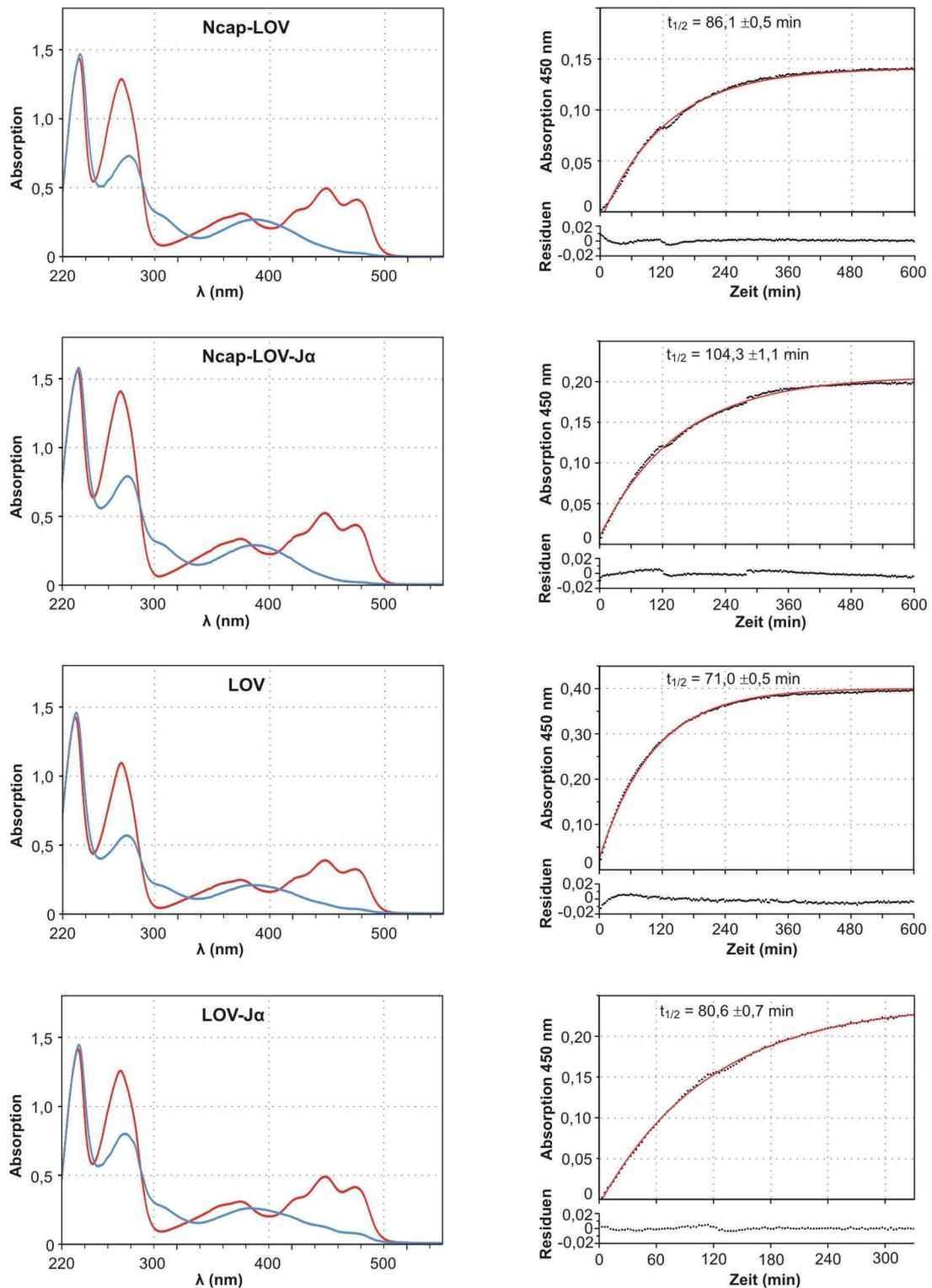


Abbildung 43: UV-Vis-Spektren & Kinetik der Hell-Dunkel-Rückkonversion der 4 LOV-Varianten

Auf der linken Seite sind von den 4 untersuchten LOV-Varianten jeweils das UV-Vis-Spektrum der unbelichteten (rot) und der belichteten Form (blau) dargestellt. Rechts daneben ist entsprechend die zeitliche Veränderung der Absorption bei 450 nm während der Hell-Dunkel-Rückkonversion abgebildet. Die Daten wurden monoexponentiell gefittet (rote Kurve). Die Residuen zwischen Messdaten und Fitkurve sind unterhalb der Datendiagramme gezeigt.

Wie die entsprechenden UV-Vis-Spektren zeigen, führte die Belichtung bei allen 4 LOV-Varianten zum Verschwinden der Absorptionsmaxima bei 450 und 475 nm sowie zu einer signifikanten Verringerung des Absorptionsmaximums bei 272 nm. Da dieses Verhalten ein charakteristisches Merkmal der Photochemie von LOV-Domänen darstellt (s. Abschnitt 1.4.2), können alle LOV-Varianten als photochemisch aktiv im Sinne von photoaktivierbar betrachtet werden. In diesem Zusammenhang gilt insbesondere die lichtinduzierte Verringerung der Absorption bei 272 nm als ein direkter Hinweis für die Bildung des Flavin-Cystein-Adduktes, da das Flavin durch den Verlust der Aromatizität nicht mehr bei dieser Wellenlänge absorbiert. Ein weiteres Merkmal der photochemischen Aktivität ist die Reversibilität dieser Reaktion und wie aus den in Abbildung 43 gezeigten Reaktionsverläufen der Hell-Dunkel-Rückkonversion hervorgeht, wird auch dieses Kriterium von allen LOV-Varianten erfüllt. Die in den Diagrammen angegebenen Halbwertszeiten ($T_{1/2}$, auch HWZ) wurden mit „Origin 8.5“ über einen monoexponentiellen Fit der Messdaten berechnet. Zwar sind die Halbwertszeiten durchaus mit Literaturwerten vergleichbar [156], aufgrund der Temperaturschwankungen (das verwendete Photometer war nicht temperierbar) sind die mittels UV-Vis-Spektroskopie ermittelten HWZ aber eher als Richtwerte anzusehen. Um die HWZ verschiedener LOV-Varianten miteinander vergleichen zu können, wurde die Kinetik der Rückkonversion daher zusätzlich mit Methoden der Lösungs-NMR-Spektroskopie gemessen (s. Abschnitt 3.5.7.1 & 4.5.4.5).

4.5.2 CD-spektroskopische Sekundärstrukturanalyse der $J\alpha$ -Sequenz

Um erste Informationen über die Sekundärstruktur der $J\alpha$ -Sequenz zu gewinnen, wurden CD-Spektren von den unbelichteten Formen der LOV-Varianten Ncap-LOV und Ncap-LOV- $J\alpha$ aufgenommen (s. Abschnitt 3.5.3). Mit dem internetbasierten Programm „Dichroweb“ [86,87] wurden daraus die Anteile der erfassbaren Sekundärstrukturen ermittelt und diese anschließend miteinander verglichen. Die Berechnung der Sekundärstrukturanteile erfolgte mit dem „CDSSTR-Algorithmus“ [121] auf Basis der CD-Spektren von Referenzproteinen, deren Sekundärstrukturanteile bekannt sind (Referenzdatenbank 7). Ziel ist dabei, durch eine variierende Kombination unterschiedlicher Teilbereiche verschiedener Referenzspektren, das gemessene CD-Spektrum möglichst genau zu rekonstruieren und daraus die Sekundärstrukturanteile des untersuchten Proteins zu quantifizieren. Abbildung 44 zeigt für beide LOV-Varianten jeweils eine Überlagerung der experimentell gemessenen und der rekonstruierten CD-Spektren.

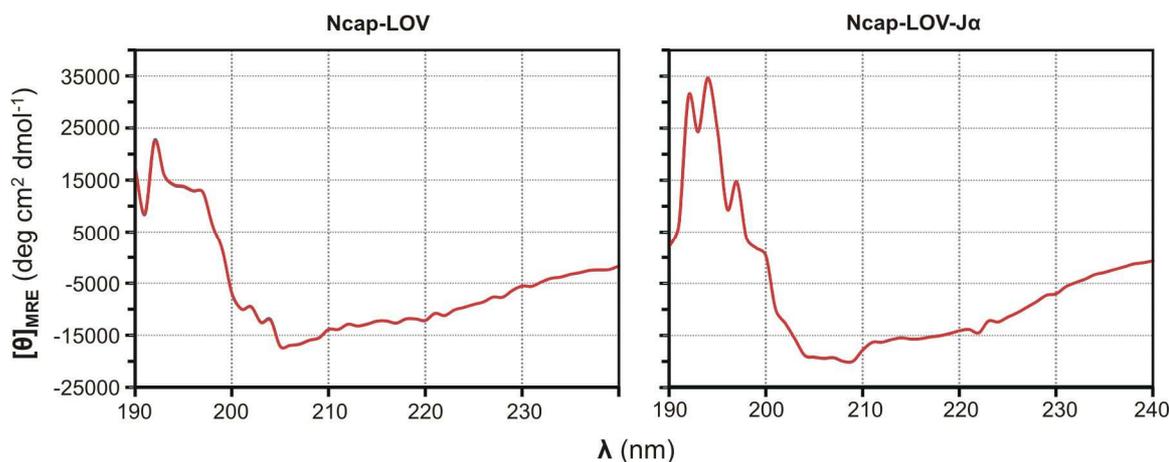


Abbildung 44: Überlagerung realer & rekonstruierter CD-Spektren von Ncap-LOV & Ncap-LOV-J α
 Überlagerung gemessener (blau) und mittels „CDSSTR-Algorithmus“ rekonstruierter CD-Spektren (rot) von Ncap-LOV & Ncap-LOV-J α (beide unbelichtet). Die rekonstruierten Spektren unterscheiden sich nur minimal von den entsprechenden realen Spektren und überdecken letztere daher fast vollständig.

Es wird deutlich, dass sich die rekonstruierten Spektren beider Proteine praktisch nicht von den korrespondierenden, realen Spektren unterscheiden (Abweichung s. Tabelle 25). Daher ist anzunehmen, dass die in den Proteinen tatsächlich vorhandenen Sekundärstrukturanteile relativ gut durch die berechneten Werte abgebildet werden. Die Resultate der Analyse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Mit "CDSSTR" berechnete Sekundärstrukturanteile

	Ncap-LOV	Ncap-LOV-J α
α -Helix	45%	58%
β -Strang	23%	19%
Schleifen	10%	7%
unstrukturiert	19%	16%
nrmsd*	0,007	0,003

*normalised root-mean-square-deviation [157]

Der α -helikale Strukturanteil ist in Ncap-LOV-J α signifikant höher, als in Ncap-LOV. Bei der Gegenüberstellung der berechneten Werte ist aber zu beachten, dass diese nicht direkt miteinander verglichen werden können, sondern auf die Gesamtzahl der vorhandenen Aminosäuren bezogen werden müssen. In Ncap-LOV (128 AS) befinden sich demnach etwa 58 AS und in Ncap-LOV-J α (147 AS) etwa 85 AS in α -helikalen Strukturelementen. Das bedeutet, dass selbst wenn der α -helikale Strukturanteil in Ncap-LOV 3% zu niedrig und in Ncap-LOV-J α 3% zu hoch bestimmt sein sollte, die 19 AS lange J α -Sequenz in Form einer α -Helix vorliegen muss.

Die Frage, ob sich die J α -Helix möglicherweise lichtabhängig entfaltet, konnte mit der CD-Spektroskopie nicht zufriedenstellend beantwortet werden, da eine Belichtung der Proben während der Messung nicht möglich war und zuvor photoaktivierte Proteine

innerhalb der ca. 15 min dauernden Messung kontinuierlich in den Grundzustand konvertierten.

4.5.3 Oligomerisierungszustand

Dass die von der J α -Helix terminierte LOV-Domäne in unbelichteter Form als Dimer vorliegt, wurde bereits von Möglich *et al.* gezeigt [75], unklar war bisher aber noch, ob sich der Oligomerisierungszustand lichtabhängig verändert oder ob die Dimerisierung der LOV-Domäne möglicherweise sogar einen artifiziellen Zustand darstellt, der durch das Fehlen der N-terminalen Ncap-Sequenz hervorgerufen oder begünstigt wird. So wurde beispielsweise bei der Untersuchung der LOV-Domäne des Phototropins AtPhot1 festgestellt, dass diese artifiziell dimerisiert, wenn vor und hinter der Domäne liegende Sequenzabschnitte fehlen [31].

Zwar wurden bei den Bedingungen der während der Präparation aller 4 LOV-Varianten routinemäßig durchgeführten Gelfiltrationen keine monomeren Spezies detektiert, aufgrund der geringen Empfindlichkeit und der undefinierten Belichtungsverhältnisse ließ sich deren Vorhandensein mit dieser Methode allerdings auch nicht zweifelsfrei ausschließen. Daher wurde mittels AUZ geprüft, ob die Ncap-Sequenz oder die Anwesenheit von Licht Einfluss auf den Oligomerisierungszustand der YtvA-LOV-Domäne nehmen. Dazu wurde mit Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten (SV) das Sedimentationsverhalten der LOV-Varianten Ncap-LOV und LOV-J α bei Dunkelheit und kontinuierlicher Belichtung untersucht (s. Abschnitt 3.5.4). Die niedrigste eingesetzte Proteinkonzentration betrug 30 μ M. Durch Absorptionsmessungen bei 386 nm, einem der isosbestischen Punkte der YtvA-LOV-Domäne, konnte die Sedimentation der LOV-Varianten selektiv und unabhängig vom Belichtungszustand erfasst werden. Insgesamt wurden jeweils 100 Absorptionsscans (0,003 cm radiale Auflösung, 6 min Scanintervall) aufgenommen. Die Auswertung der Daten und die Berechnung der dafür erforderlichen Parameter (s. Tabelle 26), wurde, wie in Abschnitt 3.5.4 und 4.3.2 beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 26: Mit "Sednterp" berechnete Parameter für die Auswertung der SV-Experimente

	ρ (g cm ⁻³)	η (N s m ⁻²)	\bar{v} (ml)	MW (kDa)
Ncap-LOV-Jα	1,00209	0,01014	0,7368	16,652
LOV-Jα	1,00209	0,01014	0,7349	14,636

Wie aus den in Abbildung 45 gezeigten c(S)-Verteilungen eindeutig hervorgeht, sedimentierten beide LOV-Varianten unabhängig vom Belichtungszustand jeweils in Form einer einzelnen Spezies.

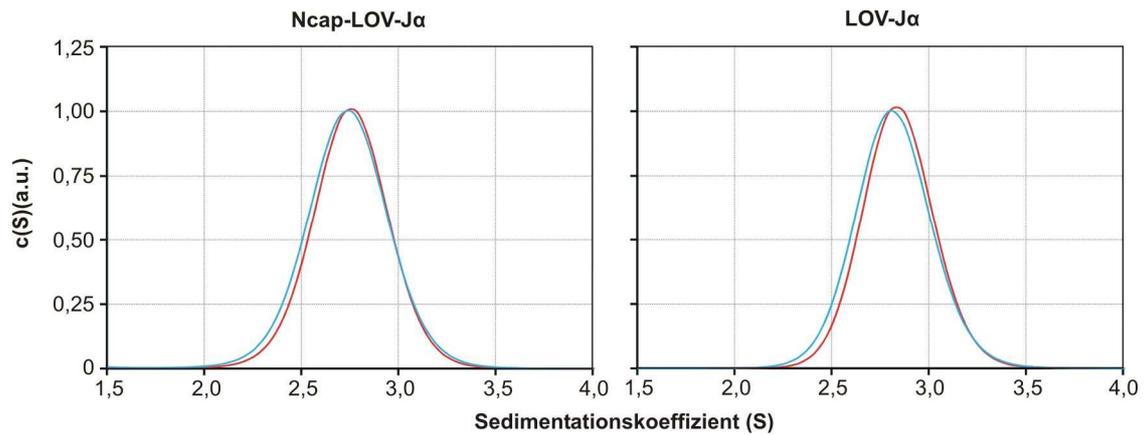


Abbildung 45: $c(S)$ -Verteilung aus SV-Experimenten mit Ncap-LOV- α & LOV- α

Plots der aus SV-Experimenten ermittelten $c(S)$ -Verteilung von Ncap-LOV- α & LOV- α . Die $c(S)$ -Verteilung unbelichteter Spezies ist in rot und die der photoaktivierten Spezies in blau dargestellt. Die Sedimentation der Proteine wurde durch Absorptionsmessung bei 386 nm verfolgt. Es wurden jeweils 30 μM Protein eingesetzt. Die Werte der Kurvenmaxima wurden auf 1 normiert.

Die mittleren, apparenten Sedimentationskoeffizienten bzw. die daraus abgeleiteten, mittleren apparenten Molmassen (s. Tabelle 27) entsprechen mit guter Übereinstimmung den theoretischen Molekulargewichten von dimerisiertem Ncap-LOV- α bzw. LOV- α . Obwohl ca. 4 kDa schwerer, scheint Ncap-LOV- α sogar geringfügig langsamer zu sedimentieren, als LOV- α . Das könnte darauf hindeuten, dass Letzteres eine kompaktere Molekülform aufweist, eine eindeutige Aussage lassen die Daten aber nicht zu. Dagegen zeigen die Ergebnisse wohl zweifelsfrei, dass die LOV-Varianten im untersuchten Konzentrationsbereich und unabhängig vom Belichtungszustand oder der Anwesenheit der N-terminalen Ncap-Sequenz fast ausschließlich als Dimere vorliegen.

Tabelle 27: Ergebnisse aus den SV-Experimenten mit Ncap-LOV- α & LOV- α

	Ncap-LOV- α		LOV- α	
	unbelichtet	belichtet	unbelichtet	belichtet
Fitgüte (rmsd)	0,0066	0,0079	0,0075	0,0078
f / f_0	1,25	1,26	1,19	1,28
S_{app} (S)	2,75	2,74	2,85	2,82
MW_{app} (kDa)	31,7	31,8	30,3	33,5

4.5.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen

Wie bereits mehrfach angesprochen, bestand ein wichtiges Ziel dieses Forschungsprojektes darin, besser zu verstehen, wie die lichtgetriebene, molekulare Schaltfunktion in YtvA realisiert wird. Eine unabdingbare Voraussetzung für die Beantwortung dieser Frage ist natürlich die Verfügbarkeit von umfassenden Strukturinformationen beider Schaltzustände. Da ein solches Informationspaket bisher noch für keinen vollständigen Photorezeptor verfügbar ist wird deutlich, dass dieses Ziel eine enorme Herausforderung darstellt. Darüber hinaus hat sich in der jüngeren Vergangenheit auch gezeigt, dass sich allein aus der räumlichen Struktur eines biologischen Makromoleküls nicht immer etwas über dessen „interaktive“ Eigenschaften ableiten lässt. Doch gerade die Modulierbarkeit dieser Eigenschaften bildet die Grundlage für das komplexe Zusammenspiel der intra- und intermolekularen Interaktionen in allen biologischen Systemen. Um diese Wechselwirkungen besser zu verstehen kann es hilfreich sein, neben der räumlichen Struktur auch deren strukturelle bzw. konformationelle Dynamik zu untersuchen.

Vor diesem Hintergrund wurden die unterschiedlichen LOV-Varianten mit verschiedenen Experimenten der Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht, da diese Methode den Zugang zu strukturellen und strukturdynamischen Information bietet. Der Fokus lag dabei nicht in der Gewinnung hochaufgelöster Strukturdaten, sondern vielmehr darin, über die sequentielle Zuordnung der $^1\text{H}_\text{N}$ -, ^{15}N -, ^{13}CO -, $^{13}\text{C}\alpha$ - und $^{13}\text{C}\beta$ -Resonanzen innerhalb des Proteinrückgrates von unbelichtetem und photoaktiviertem Ncap-LOV- $\text{J}\alpha$ Informationen über dessen Sekundärstruktur, der Strukturdynamik und der Orientierung der $\text{J}\alpha$ -Helix zu gewinnen. Diese Informationen sollten dazu beitragen, die sequentielle Zuordnung des vollständigen Photorezeptors zu erleichtern bzw. zu verifizieren und die Funktion von Ncap und $\text{J}\alpha$ bei der lichtinduzierten, intramolekularen Signalweiterleitung zu charakterisieren. Zusätzlich wurde die Halbwertszeit der Hell-Dunkel-Rückkonversion von YtvA- LOV-Varianten und YtvA bei definierter Temperatur bestimmt.

Um zu beurteilen, inwiefern die 4 LOV-Varianten prinzipiell für die geplanten Experimente geeignet sind, wurden von jedem Protein (uniform ^{15}N -markiert) zweidimensionale $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des unbelichteten und des photoaktivierten Zustandes aufgenommen. Diese NMR-Spektren repräsentieren sozusagen den „Fingerabdruck“ eines Proteins und geben Anhaltspunkte zum Faltungszustand und der ungefähren Anzahl sequentiell erfassbarer $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen. In den Abbildung 46 bis Abbildung 49 sind die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (bzw. $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY's) der unbelichteten und Überlagerungen von $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektren der unbelichteten und belichteten LOV-Varianten dargestellt.

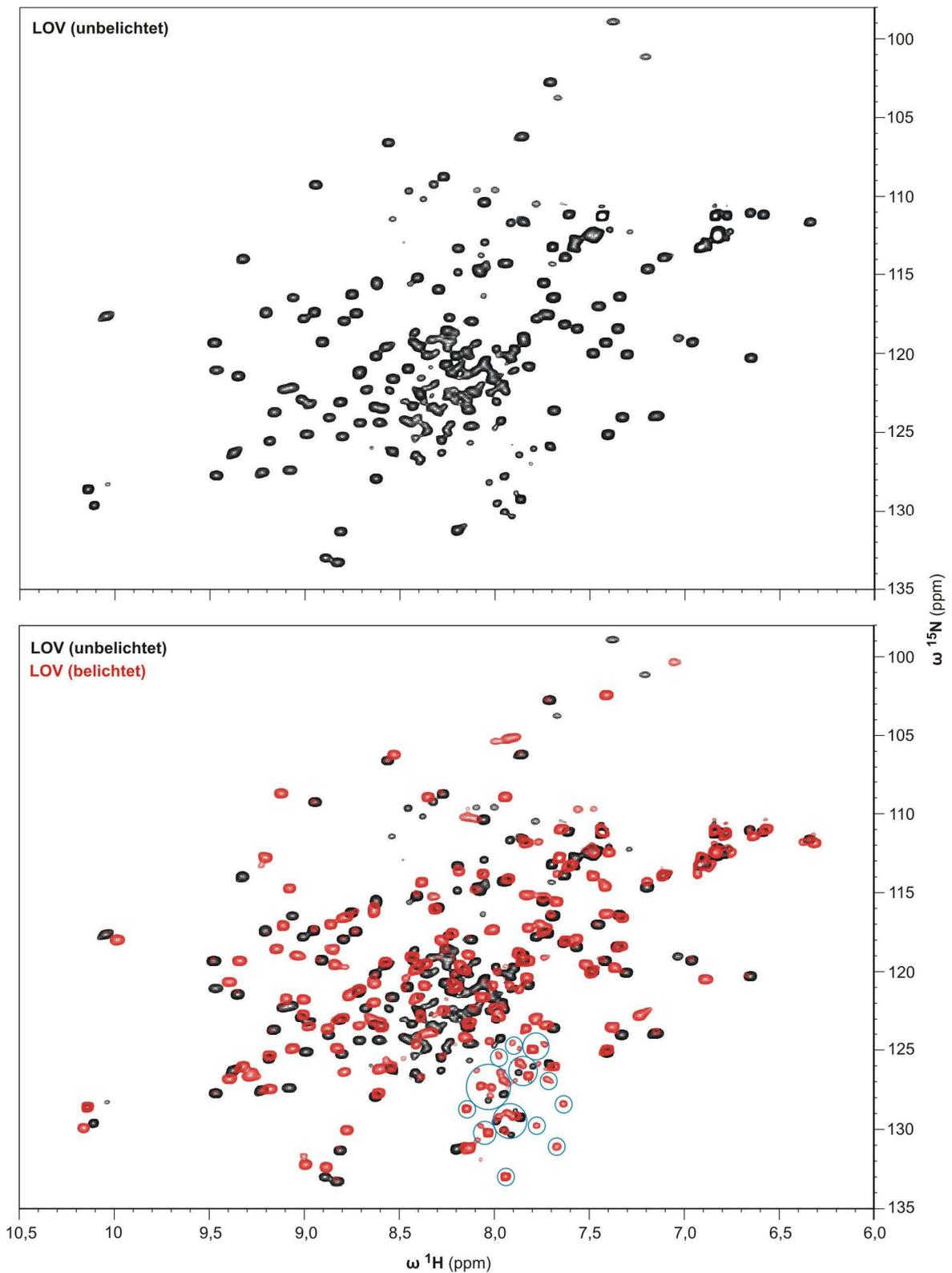


Abbildung 46: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem LOV
 Oben ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektrum des unbelichteten Proteins und unten eine Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des unbelichteten (schwarz) und des photoaktivierten Proteins (rot) gezeigt. Letzteres wurde nach 4 Tagen Dauerbelichtung aufgenommen und zeigt zusätzliche, auf beschleunigten Proteinabbau zurückzuführende Signale (blaue Kreise). Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

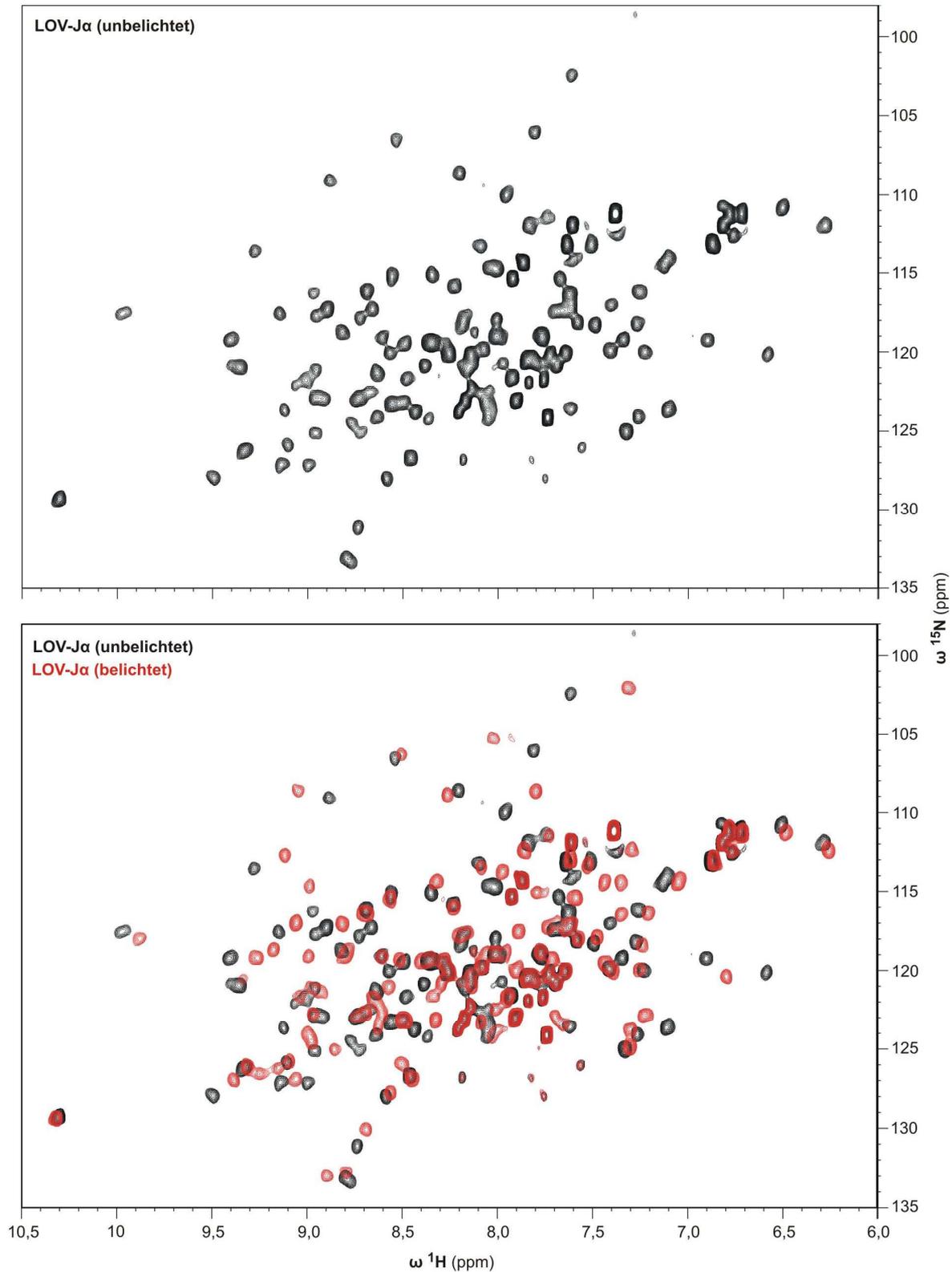


Abbildung 47: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem LOV-Jα
 Oben ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektrum des unbelichteten Proteins und unten eine Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des unbelichteten (schwarz) und des photoaktivierten Proteins (rot) gezeigt. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

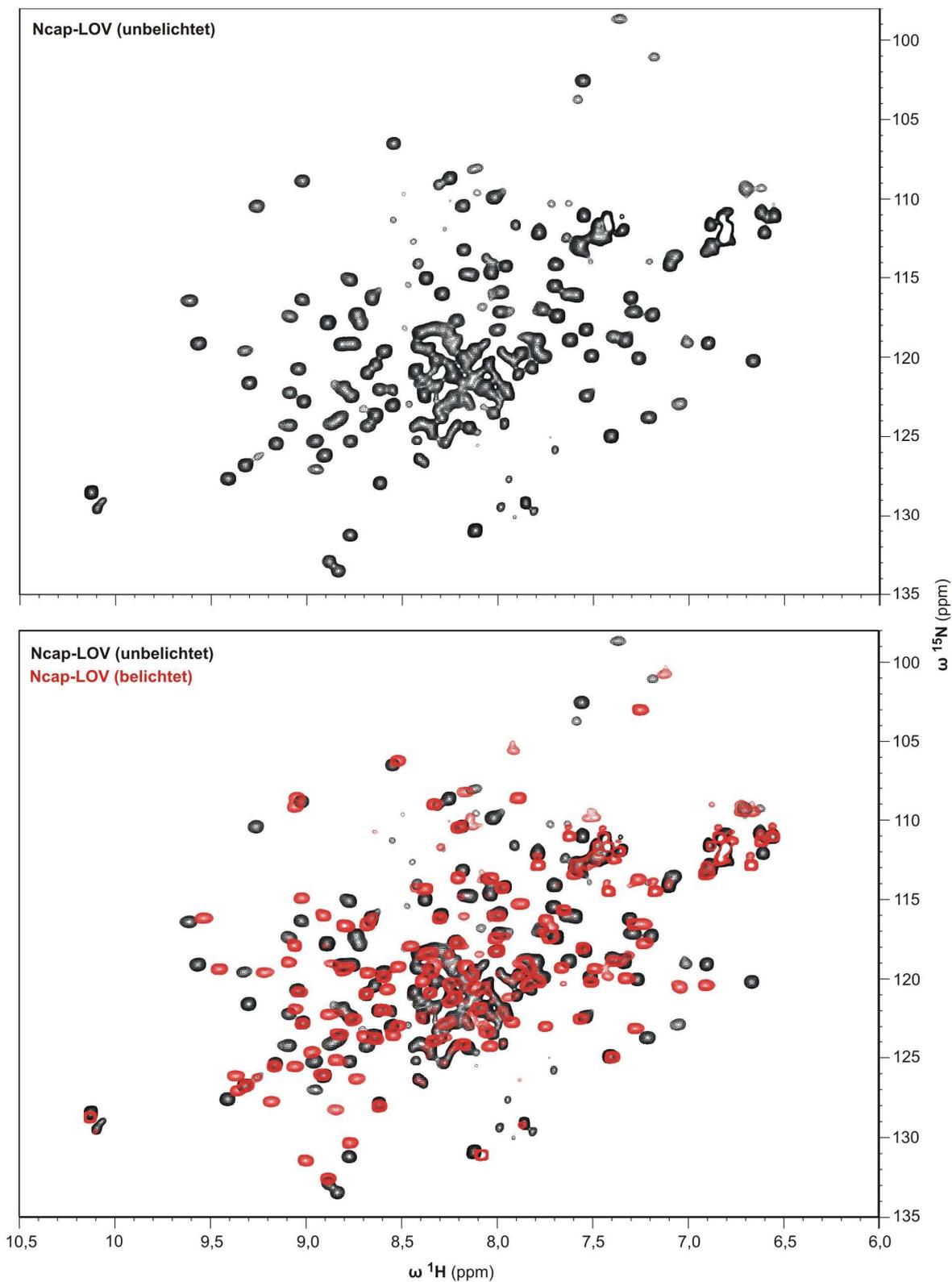


Abbildung 48: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte HSQC-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV
 Oben ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektrum des unbelichteten Proteins und unten eine Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des unbelichteten (schwarz) und des photoaktivierten Proteins (rot) gezeigt. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

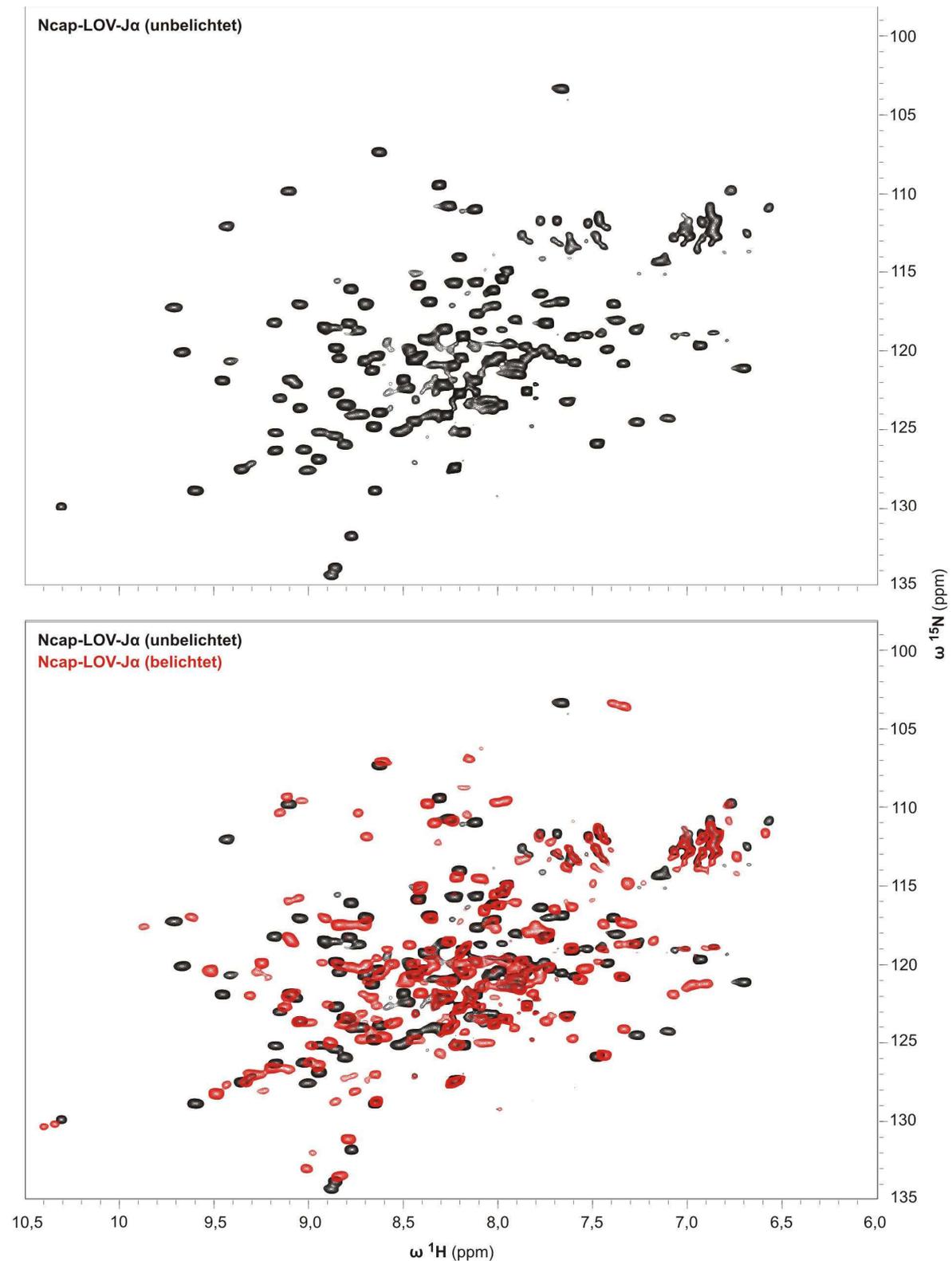


Abbildung 49: $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierte TROSY-Spektren von uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV-Jα
 Oben ist das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektrum des unbelichteten Proteins und unten eine Überlagerung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren des unbelichteten (schwarz) und des photoaktivierten Proteins (rot) gezeigt. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

Obwohl alle LOV-Varianten als Dimere vorliegen, sind die Kreuzsignale in allen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektren relativ gut aufgelöst und entsprechen in ihrer spektralen Verteilung dem Erwartungsmuster eines gleichermaßen aus α -Helices und β -Strängen aufgebauten Proteins. Verglichen mit LOV und LOV- Ja , überlagern sich die Kreuzsignale im mittleren Bereich der Spektren von Ncap-LOV bzw. Ncap-LOV- Ja etwas stärker, was darauf hindeuten könnte, dass die Ncap-Sequenz teilweise unstrukturiert sein könnte. Wie die entsprechenden Überlagerungen der Spektren von unbelichteter und photoaktivierter Form zeigen, führt die Belichtung der LOV-Varianten bei einer Mehrzahl von Kreuzsignalen zu signifikanten Frequenzverschiebungen. Das belegt zum einen die photochemische Aktivität der Proteine und bedeutet zum anderen, dass auch der photoaktivierte Zustand NMR-spektroskopisch erfasst werden kann. Bei der Untersuchung der photoaktivierten Formen stellte sich allerdings auch heraus, dass die kontinuierliche Belichtung zu einer beschleunigten Degradation der Proteine führt. In dem in Abbildung 46 gezeigten, nach 4 Tagen Dauerbelichtung aufgenommenen HSQC-Spektrum von photoaktiviertem LOV sind die abbaubedingten, zusätzlichen Kreuzsignale bereits deutlich erkennbar. Da auch das TROSY-Spektrum von Ncap-LOV- Ja , der längsten LOV-Variante, noch sehr gut aufgelöst war, wurden die NMR-Experimente zur sequentiellen Zuordnung mit diesem Protein durchgeführt.

4.5.4.1 Sequentielle Zuordnung von Ncap-LOV- Ja

Zur sequentiellen Zuordnung der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen des unbelichteten Proteins wurden zunächst HSQC-basierte Versionen der dreidimensionalen, heteronuklearen Triple-Resonanz-Spektren HNCACB und HN(CO)CACB von uniform $^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem Ncap-LOV- Ja aufgenommen (s. Abschnitt 3.5.7.2). Bedingt durch das verhältnismäßig große Molekulargewicht ($\sim 33,3$ kDa) und der daraus resultierenden, schnellen Signalrelaxation, konnten jedoch viele C β -Resonanzen nicht detektiert und damit auch keine sequentielle Zuordnung erreicht werden. Um die Relaxationswirkung nicht austauschbarer Protonen zu umgehen und die Signalintensität und Signaldispersion in den Spektren zu erhöhen, wurden dann TROSY-basierte HNCA-, HNCACB- und HN(CO)CACB-Spektren von uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem Ncap-LOV- Ja aufgenommen (s. Abschnitt 3.5.7.2). Auf Basis dieser Spektren konnten ca. 67% der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen zugeordnet werden. Durch die Aufnahme von TROSY-basierten HN(CA)CO- und HNCO-Spektren konnten schließlich 127 von 140 möglichen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen eindeutig zugeordnet werden (s. Abbildung 50). Die chemischen Verschiebungen aller zugeordneten Resonanzen sind in Tabelle 34 im Anhang aufgeführt.

	10	20	30	40	50
G	ASFGSFGIP	GQLEVIKKAL	DHVRVGVVIT	DPALDNPVIV	YVNQGFVQMT
	60	70	80	90	100
	GYETEEILGK	NCRFLQGKHT	DPAEVDNIRT	ALQNKEPVTV	QIQNYKKDGT
	110	120	130	140	
	MFWNELNIDP	MEIEDKTYFV	GIQNDITKQK	EYEKLLDSL	TEITALS

Abbildung 50: Zugeordnete $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen für unbelichtetes Ncap-LOV-Ja

Aminosäuren mit eindeutig zugeordneten $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen sind grün, nicht zugeordnete AS rot und Proline grau hinterlegt. Das in der Wildtypsequenz N-terminal normalerweise vorhandene Methionin wurde durch Einführung der Erkennungssequenz der TEV-Protease durch Glycin ersetzt.

Die sequentielle Zuordnung der Resonanzen von photoaktiviertem Ncap-LOV-Ja erwies sich ungleich schwieriger. Zum einen ließen sich die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen des unbelichteten Proteins wegen der Größe der lichtinduzierten Frequenzverschiebungen nur in Einzelfällen zur Identifikation der korrespondierenden Korrelationen des photoaktivierten Proteins nutzen und zum anderen kam es bei einer Reihe von Resonanzen zu Signalaufspaltungen, verstärkten Signalüberlagerungen und verringerten Signalintensitäten bis hin zum Fehlen einiger $\text{C}\alpha$ -, $\text{C}\beta$ - sowie CO-Resonanzen. Aufgrund dieser Umstände war es im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit daher nicht möglich, die Resonanzen des photoaktivierten Proteins eindeutig zuzuordnen.

4.5.4.2 Strukturdynamische Eigenschaften von unbelichtetem Ncap-LOV-Ja

Durch die Messung der longitudinalen (R_1) und transversalen (R_2) Relaxationsraten der ^{15}N -Amidstickstoffkerne sowie durch Messung der heteronuklearen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NOE-Verstärkung (^{15}N -HetNOE) sollte die Dynamik des Proteinrückgrates näher charakterisiert werden (s. Abschnitt 3.5.7.4). Auf Basis einer „modellfreien“ Herangehensweise („Model-free Approach“ [132,135–139]), d.h. ohne die Art und Amplitude der der Dynamik zugrundeliegenden Bewegungsmoden genau zu kennen, können aus der Kombination dieser Daten strukturdynamische Eigenschaften abgeleitet werden. Das sind zum einen die globale Rotationskorrelationszeit (T_c) des Proteins bzw. einzelner Proteindomänen oder Struktureinheiten und zum anderen der sogenannte „Orderparameter“ (S^2), dessen Wert ein Maß für die strukturelle Beweglichkeit einer einzelnen Aminosäure ist. Der Orderparameter umfasst einen Wertebereich von 0 (sehr dynamischer Rest) bis 1 (sehr rigider Rest). Die Berechnung dieser Parameter wurde mit dem Programm „Tensor2“ durchgeführt [111]. Die dieser Analyse zugrundegelegten, experimentell ermittelten, ^{15}N -basierten Relaxationsraten bzw. ^{15}N -HetNOE's sind in Abbildung 51A-Abbildung 51C und die berechneten Orderparameter in Abbildung 51D dargestellt. Insgesamt konnten die Orderparameter von 126 Aminosäureresten ermittelt werden, davon 11 in der Ncap-Sequenz, 96 in der LOV-Domäne und 19 in der $\text{J}\alpha$ -Helix.

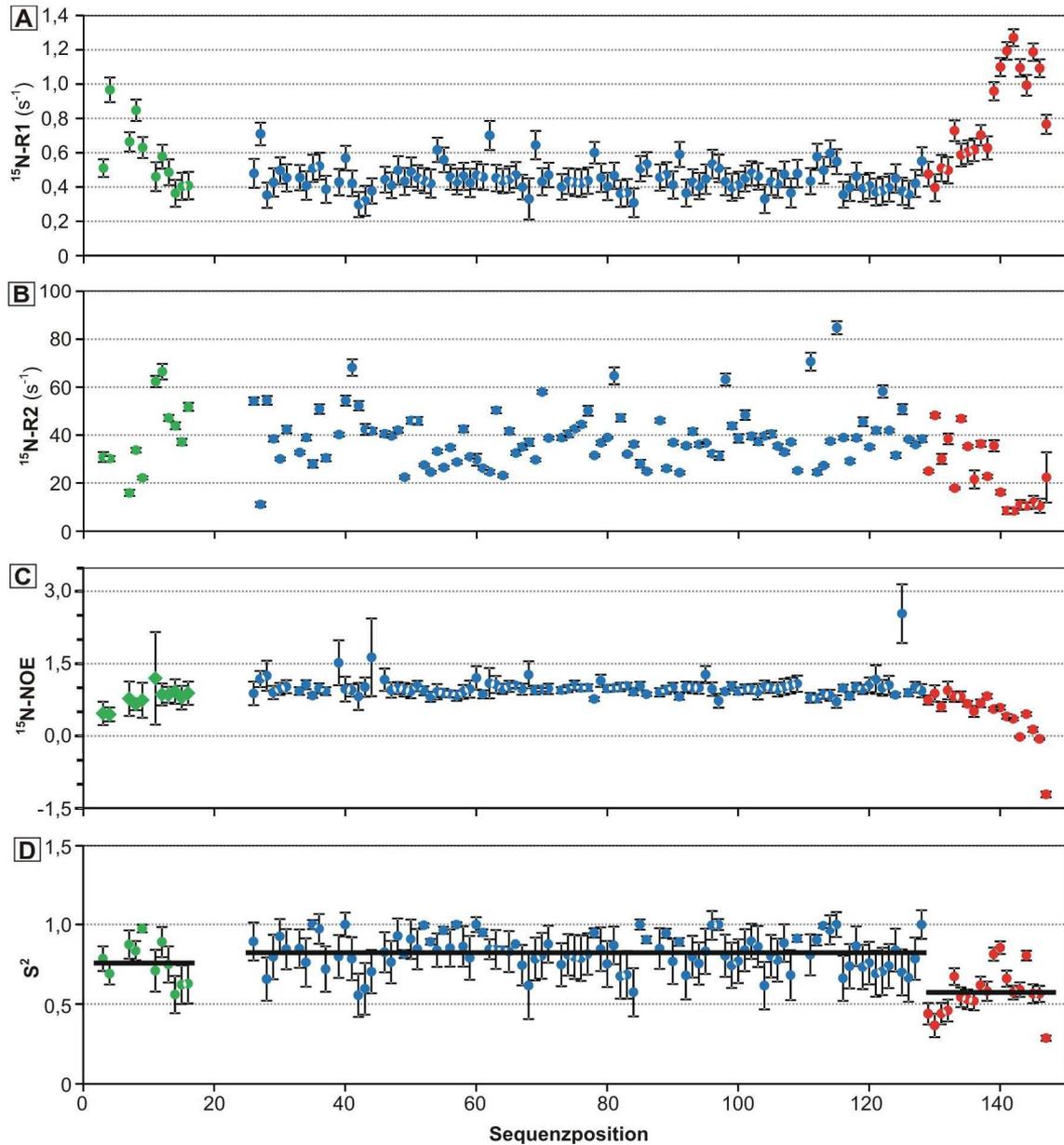


Abbildung 51: ^{15}N -Spinrelaxationsdaten & Orderparameter von Ncap-LOV-J α

Plots der experimentell ermittelten Werte der longitudinalen (A) und der transversalen ^{15}N -Spinrelaxation (B), der $^1\text{H}^{15}\text{N-NOE}$'s (C) und der berechneten Orderparameter (D). Alle Werte sind gegen die entsprechende Sequenzposition aufgetragen. Die Fehlerbalken entsprechen absoluten Fehlerwerten. Der Bereich der Ncap-Sequenz ist grün, der Bereich der LOV-Domäne blau und der Sequenzbereich der J α -Helix rot hervorgehoben. Die horizontalen Linien in D repräsentieren die Werte der gemittelten Orderparameter der einzelnen Sequenzbereiche (Ncap = 0,76; LOV = 0,82 & J α = 0,57). Alle ^{15}N -basierten Spinrelaxationsdaten wurden an einem 900 MHz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

Wie aus dem Vergleich der mittleren S^2 -Werte der Ncap-Sequenz ($0,76 \pm 0,13$), der LOV-Domäne ($0,82 \pm 0,11$) und der $J\alpha$ -Helix ($0,57 \pm 0,15$) hervorgeht (s. Abbildung 51D), ist die $J\alpha$ -Helix bedeutend beweglicher, als die LOV-Domäne. Der signifikante, sprunghafte Abfall der S^2 -Werte zwischen K^{128} und Q^{129} deutet darauf hin, dass die Dynamik der $J\alpha$ -Helix von der LOV-Domäne nahezu entkoppelt ist und dass sich an dieser Position tatsächlich eine Domänengrenze befindet (s. Abbildung 51D). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die mittleren S^2 -Werte von Ncap und LOV-Domäne nicht signifikant, was darauf hindeutet, dass entweder beide Funktionseinheiten miteinander assoziiert sind oder dass die Ncap-Bereiche beider Monomeruntereinheiten in Interaktion stehen könnten. Da für die unmittelbar vor der LOV-Domäne befindlichen Reste keine Dynamikparameter vorliegen, ist darüber jedoch keine zuverlässige Aussage möglich. Aufgrund des relativ hohen mittleren S^2 -Wertes ist aber davon auszugehen, dass sich die erfassten Reste in einem relativ rigiden Strukturelement befinden. Da die Rotationskorrelationszeiten die Gesamtdynamik der einzelnen Struktureinheiten abbilden, bietet deren Vergleich eine weitere Möglichkeit, potentielle Interaktionen zwischen benachbarten Struktureinheiten zu verifizieren oder auszuschließen. Wie die berechneten Werte von Ncap ($T_c = 12,6$ ns), LOV-Domäne ($T_c = 15,3$ ns) und $J\alpha$ -Helix ($T_c = 7,27$ ns) zeigen, ist die Beweglichkeit der $J\alpha$ -Helix bedeutend größer, als die der LOV-Domäne. Eine Assoziation zwischen beiden Elementen scheint somit ausgeschlossen und es erscheint darüber hinaus auch eher unwahrscheinlich, dass die Helices miteinander interagieren. Die Ncap-Sequenz ist nur wenig beweglicher, als die LOV-Domäne, sodass anzunehmen ist, dass die erfassten Reste bzw. das Sekundärstrukturelement, das sie zu bilden scheinen, relativ fest mit der LOV-Domäne assoziiert sein könnte. Eine Interaktion zwischen den beiden Ncap's der monomeren Untereinheiten wäre ebenfalls denkbar.

4.5.4.3 Orientierung der $J\alpha$ -Helix in unbelichtetem Ncap-LOV- $J\alpha$

Durch Messung residueller dipolarer Kopplungen (RDC's) zwischen den ^1H - und ^{15}N -Kernen innerhalb der Amidgruppen von Ncap-LOV- $J\alpha$ wurde die mittlere Orientierung der $J\alpha$ -Helix bezüglich der LOV-Domäne untersucht (s. Abschnitt 3.5.7.5). Da diese Analyse gut aufgelöste 3D-Strukturdaten erfordert, wurde hier auf die Kristallstruktur von unbelichtetem LOV- $J\alpha$ (PDB-Eintrag: 2PR5) [75], genauer auf die Struktur der monomeren Untereinheit A, zurückgegriffen. Diese wurde in „Module 1.0“ [92] zunächst in zwei separate Strukturuntereinheiten, die LOV-Domäne und die $J\alpha$ -Helix, getrennt und dann als Basis für die Berechnung der NH-Orientierungsvektoren aus den gemessenen RDC's verwendet. Dazu wurden insgesamt 120 $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -RDC's, 101 aus der LOV-Domäne und 19 aus der $J\alpha$ -Helix, verwendet. Unter der Voraussetzung, dass die $J\alpha$ -Helix in Ncap-LOV- $J\alpha$ analog zur Kristallstruktur durchgehend α -helikal ist und unter Berücksichtigung, dass die RDC's in nur einem „Alignmentmedium“ gemessen wurden, ergaben sich 2 mögliche Orientierungsvektoren zwischen LOV-Domäne und $J\alpha$ -Helix.

Dies ist in Abbildung 52 anhand der Überlagerung beider Strukturvarianten dargestellt. Die Ausrichtung der Moleküle erfolgte in „Pymol“ [97,98] über ein „Alignment“ der $C\alpha$ -Atome beider LOV-Domänen. Übertragen auf die Dimerstruktur, könnte Ncap-LOV-J α prinzipiell in drei verschiedenen Konformationen vorliegen (s. Abbildung 53). Gemeinsames Merkmal aller Variationen ist dabei die Tatsache, dass die J α -Helix, abgesehen von ihrer sequentiellen Verknüpfung, nicht mit der LOV-Domäne in Interaktion steht.

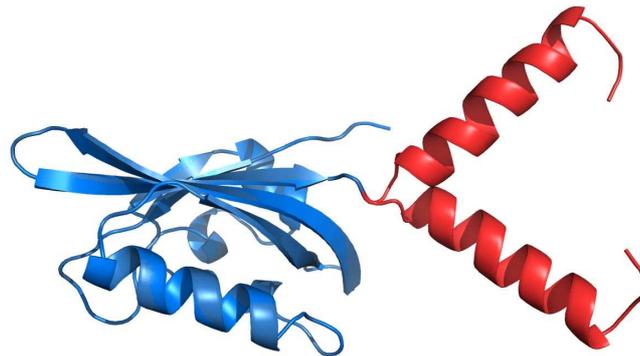


Abbildung 52: RDC-basierte Orientierung der J α -Helix in Ncap-LOV-J α

Die beiden mit „Module“ berechneten Orientierungsmöglichkeiten der J α -Helix wurden auf die Kristallstruktur der monomeren Untereinheit A von unbelichtetem LOV-J α (PDB-Eintrag: 2PR5) [75] übertragen und die zwei resultierenden Strukturmodelle mit „Pymol“ auf die $C\alpha$ -Atome der LOV-Domäne ausgerichtet. Mangels Strukturinformationen von Ncap, sind nur die J α -Helix (rot) und die überlagerten LOV-Domänen (blau) dargestellt.

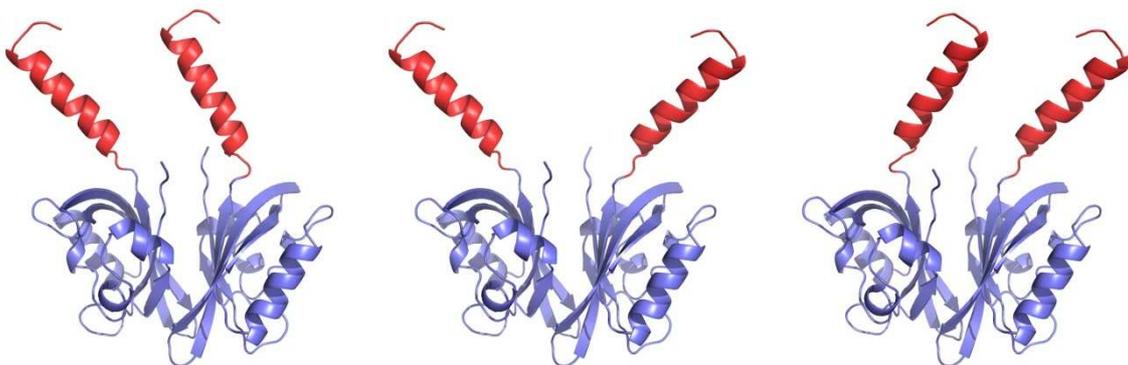


Abbildung 53: Mögliche Konformationen von Ncap-LOV-J α

Die Übertragung der mit „Module“ berechneten J α -Helix-Orientierungen auf die Kristallstruktur von LOV-J α (PDB-Eintrag: 2PR5) [75] ergab drei mögliche Konformationen für Ncap-LOV-J α . Eine „offene“ Konformation, in der J α -Helices entgegengesetzt ausgerichtet sind (Mitte) und 2 Konformationen mit sehr ähnlicher Ausrichtung der J α -Helices (links, rechts). Die Strukturmodelle wurden mit „Pymol“ auf die entsprechenden $C\alpha$ -Atome der LOV-Domänen ausgerichtet. Die J α -Helices sind rot und die LOV-Domänen blau dargestellt.

4.5.4.4 Analyse der Interaktion zwischen LOV- & STAS-Domäne

Durch die Analyse der sequenzpositionsspezifischen Korrelation zwischen den chemischen Verschiebungen ($\omega^1\text{H}_\text{N}$, $\omega^{15}\text{N}$) von uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem Ncap-LOV-J α und uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem YtvA konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion zwischen der LOV- und STAS-Domäne in unbelichtetem YtvA sehr unwahrscheinlich ist. Dazu wurden jeweils die $\omega^1\text{H}_\text{N}$ - und $\omega^{15}\text{N}$ -Werte sowie zusätzlich auch die „gewichteten“ Vektorsummen (NH-Vektor) der $\omega^1\text{H}_\text{N}$ und $\omega^{15}\text{N}$ -Werte der analogen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spinsysteme beider Proteine gegeneinander aufgetragen und das Bestimmtheitsmaß ihrer linearen Korrelation (R^2) berechnet. Diese Prozedur wurde jeweils auf die Spinsysteme der Ncap-Sequenz (Abbildung 54A, D, G), der LOV-Domäne (Abbildung 54B, E, H) und der J α -Helix angewendet (Abbildung 54C, F, I). Da das Gyromagnetische Verhältnis von ^{15}N -Kernen ca. 10-mal kleiner ist, als das von Protonen [158], wurden die $\omega^{15}\text{N}$ -Werte zur Berechnung der „gewichteten“ Vektorsummen mit einem Faktor von 0,1 multipliziert. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Korrelation wird nicht von globalen systematischen Abweichungen beeinflusst (z.B. resultierend aus nicht korrekt referenzierten $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren). Es indiziert aber sehr genau, wie stark sich die relativen Signalpositionen innerhalb eines Spektrum von den relativen Positionen der analogen Signale innerhalb eines zweiten Spektrums unterscheiden. Da der Einfluss eines einzelnen relativen Positionsunterschiedes mit der Anzahl der betrachteten Gesamtsignale abnimmt, muss hier aber definiert werden, ab welchem R^2 -Wert ein spektraler Unterschied als signifikant anzusehen ist. Der untere Grenzwert für eine nicht signifikante spektrale Abweichung zwischen den LOV-Domänen wurde hier auf $R^2 = 0,999$ festgesetzt, da dieser Wert bereits unterschritten würde, wenn sich die $\omega^1\text{H}$ -Werte an nur 5 der 95 erfassten, analogen Sequenzpositionen um 0,1 ppm, bzw. die $\omega^{15}\text{N}$ -Werte um 1 ppm unterscheiden würden. Wie aus den Abbildung 54 zu entnehmenden R^2 -Werten hervorgeht, gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den sequenzpositionsspezifischen chemischen Verschiebungen der LOV-Domänen beider Proteine. Das trifft ebenso auf die Ncap-Sequenz zu, da hier bereits eine Abweichung von $\omega^1\text{H}_\text{N} \geq 0,1$ ppm an nur einer Sequenzposition in einem $R^2 < 0,995$ resultieren würde. Es kann daher mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die LOV-Domäne sowie die Ncap-Sequenz nicht mit der STAS-Domäne in Interaktion stehen. Im Gegensatz dazu sind die ω -Werte der J α -Helices nicht linear korreliert. Demzufolge muss die chemische Umgebung dieses Sequenzbereiches in beiden Proteinen verschieden sein. Um die Korrelationsanalyse zu verifizieren, wurden zusätzlich die absoluten Differenzen der $\omega^1\text{H}_\text{N}$ -Werte auf die entsprechenden Sequenzpositionen abgebildet (s. Abbildung 55). Abgesehen von Gly²⁶ ($\Delta\omega^1\text{H}_\text{N} = 0,07$ ppm) sind innerhalb der LOV-Domäne alle $\Delta\omega^1\text{H}_\text{N}$ -Werte $\leq 0,05$ ppm und daher konform mit dem Ergebnis der Korrelationsanalyse. Letzteres gilt ebenso für die

Ncap-Sequenz. Darüber hinaus bestätigte diese Analyse auch, dass die chemische Umgebung der α -Helix in Ncap-LOV- α und YtvA verschieden ist.

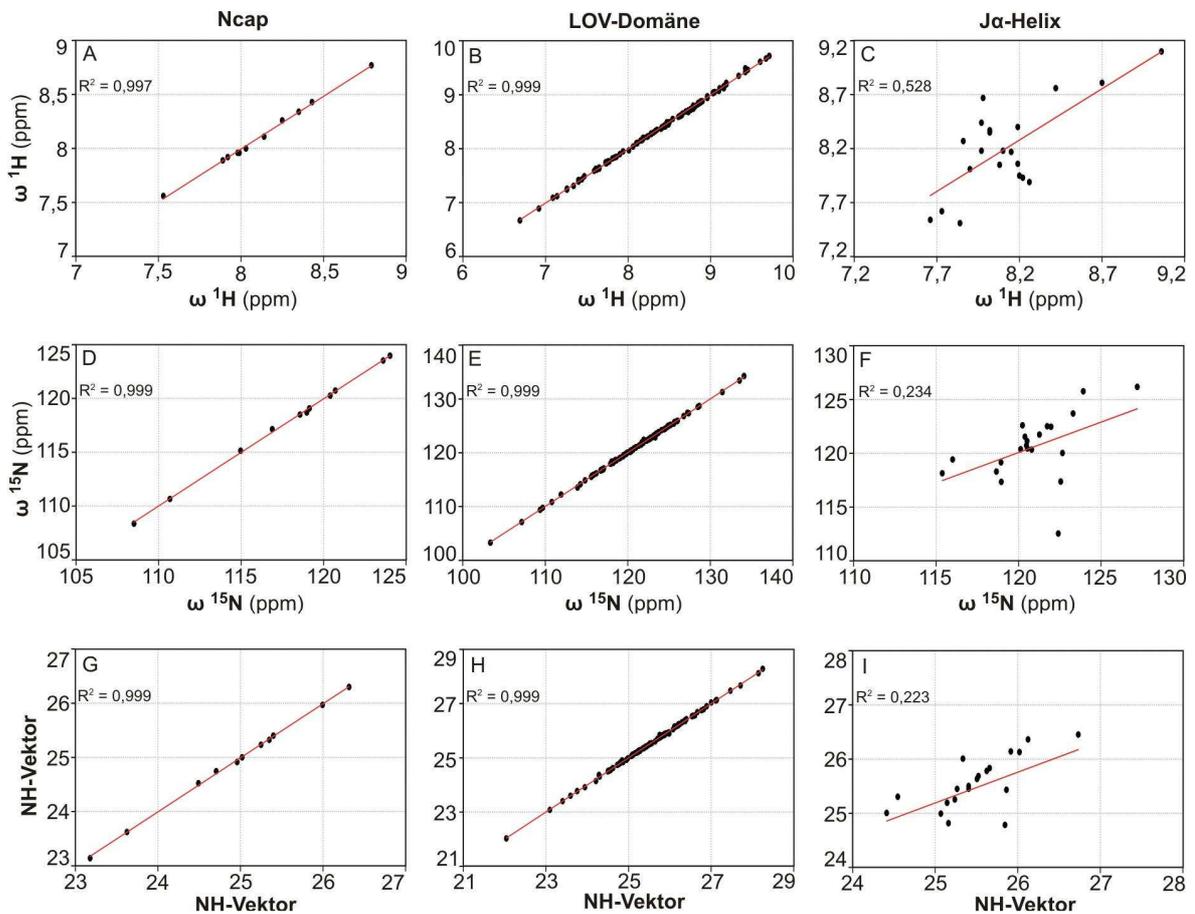


Abbildung 54: Korrelationsanalyse der $\omega^1\text{H}_\text{N}$ - & $\omega^{15}\text{N}$ -Werte von YtvA & Ncap-LOV- α

Die chemischen Verschiebungen bzw. die gewichtete NH-Vektorsumme analoger $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spinsysteme innerhalb der Ncap-Sequenz (A, D & G), der LOV-Domäne (B, E & H) und der α -Helix (C, F & I) von YtvA & Ncap-LOV- α wurden gegeneinander aufgetragen und mittels Linearregression das Bestimmtheitsmaß (R^2) der Korrelation zwischen beiden Proteinen berechnet. Für die Korrelationen wurden 11 von 24 Amidgruppen aus Ncap, 95 von 102 Amidgruppen aus der LOV-Domäne und 21 Amidgruppen aus der α -Helix (ab T^{127}) berücksichtigt.

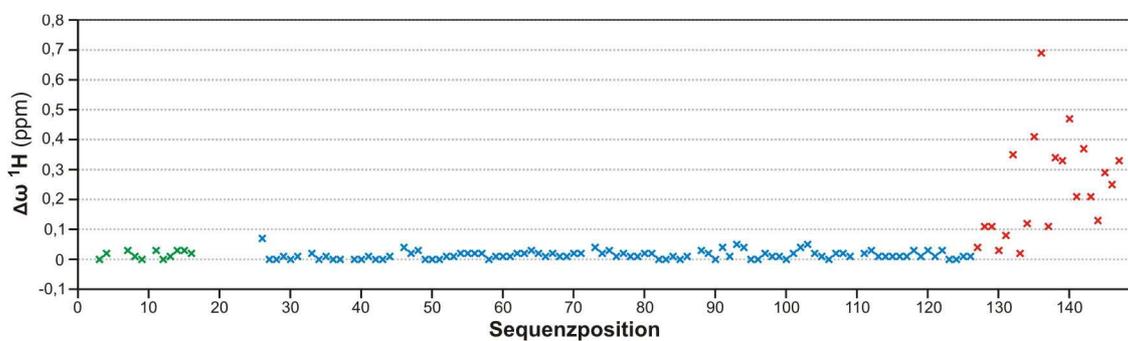


Abbildung 55: Absolute Differenzen der $\omega^1\text{H}_\text{N}$ -Werte von YtvA & Ncap-LOV- α

Die $\Delta\omega^1\text{H}_\text{N}$ -Werte der in YtvA und Ncap-LOV- α an analoger Sequenzposition befindlichen Aminosäuren wurden gegen die entsprechende Sequenzposition aufgetragen. Die Abweichungen sind als Absolutbeträge angegeben. Die Werte der Ncap-Sequenz sind grün, die der LOV-Domäne blau und die der α -Helix rot hervorgehoben.

4.5.4.5 Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion von YtvA & YtvA-LOV-Varianten

Ergebnissen von Losi *et al.* zufolge [70], scheint die Photochemie der YtvA-LOV-Domäne signifikant von weiteren, in YtvA vorhandenen Strukturelementen beeinflusst zu werden. Demnach beträgt die Halbwertszeit ($T_{1/2}$) von photoaktiviertem YtvA bei 25°C ca. 45 min und die der isolierten YtvA-LOV-Domäne (hier As 26-127) ca. 30 min. Um zu verifizieren, welches Strukturelement (STAS-Domäne, Ncap oder J α -Helix) für diese Differenz verantwortlich sein könnte, wurden die $T_{1/2}$ -Werte von YtvA, Ncap-LOV und LOV-J α ermittelt. Da die photometrisch bestimmten Halbwertszeiten nicht auf eine exakte Temperatur bezogen werden konnten (s. Abschnitt 3.5.2 & 4.5.1), erlaubte deren Vergleich keine eindeutige Aussage darüber, ob der Photozyklus der LOV-Domäne durch die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Strukturelemente tatsächlich beeinflusst wird oder nicht. Um temperaturbedingte Unterschiede auszuschließen, wurden die $T_{1/2}$ -Werte daraufhin mit Lösungs-NMR-spektroskopischen Experimenten ermittelt (s. Abschnitt 3.5.7.1). Die Kinetik der Hell-Dunkel-Rückkonversion wurde durch eine zeitlich inkrementierte Messung der Intensitätsveränderung zweier diskreter Signale im Protonenspektrum des jeweiligen Proteins erfasst. Das ist in Abbildung 56 am Beispiel der ^1H -Spektren von unbelichtetem und photoaktiviertem Ncap-LOV verdeutlicht. Die gemessenen Intensitäten wurden über die Zeit aufgetragen und mit „Origin 8.5“ monoexponentiell gefittet (s. Abbildung 57). Die resultierenden $T_{1/2}$ -Werte korrespondierender Kurven wurden anschließend gemittelt (s. Tabelle 28).

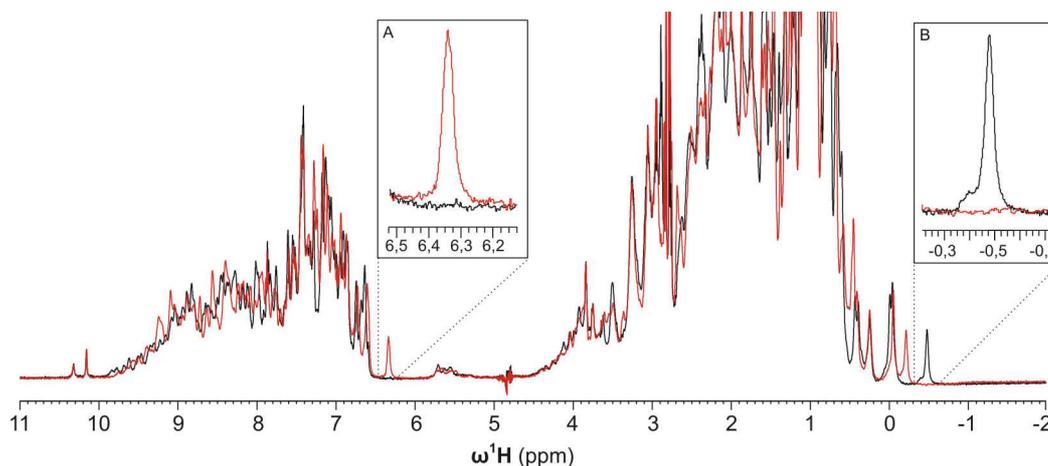


Abbildung 56: ^1H -NMR-Spektren von unbelichtetem & photoaktiviertem Ncap-LOV

Überlagerung von Ausschnitten der ^1H -NMR-Spektren von unbelichtetem (schwarz) und photoaktiviertem (rot) Ncap-LOV. In den Boxen sind die zur Verfolgung der Hell-Dunkel-Konversionskinetik ausgewählten Signale dargestellt. Das Signal in A relaxiert und das in B wächst während der Rückkonversion. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen. Die Unterdrückung der Protonensignale des Wassers wurde über eine „Watergate-Pulssequenz“ realisiert [125].

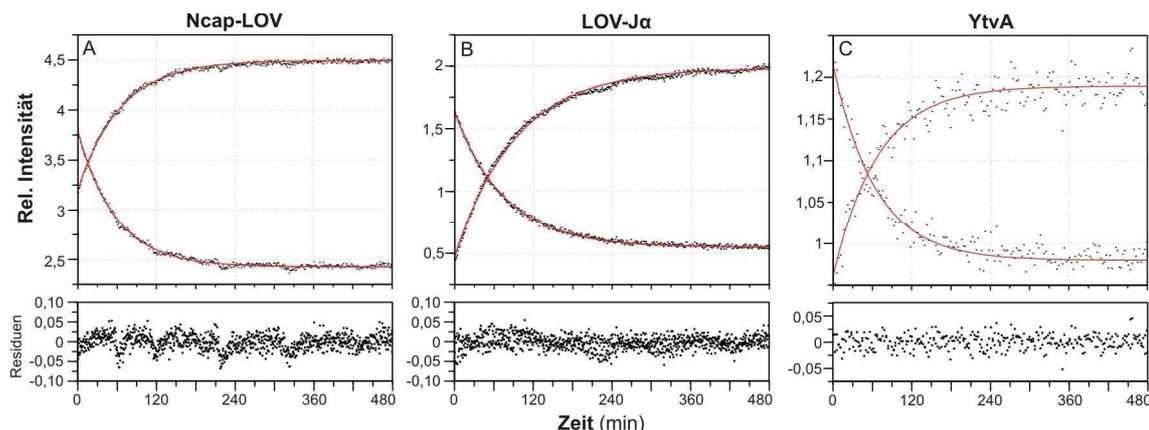


Abbildung 57: Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion der YtvA-LOV-Domäne

Die Kinetiken wurden durch Detektion der Intensitätsveränderung von jeweils 2 diskreten Signalen innerhalb einer Serie zeitlich inkrementiert aufgenommener $^1\text{H-NMR}$ -Spektren verfolgt. Die berechneten, monoexponentiellen Fitkurven (rot) wurden jeweils mit den korrespondierenden, experimentellen Daten überlagert und die resultierenden Abweichungen in den darunterliegenden Diagrammen aufgetragen. Die Daten wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen. Die Pufferzusammensetzung war für alle Proteine identisch: 20 mM Phosphatpuffer pH = 7,4; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 10 % D_2O .

Tabelle 28: Halbwertszeiten der Hell-Dunkel-Konversion der YtvA-LOV-Domäne

Protein	Ncap-LOV	LOV-J α	YtvA
$T_{1/2}$ (27°C)	$42,4 \pm 0,3$ min	$59,0 \pm 0,2$ min	$46,1 \pm 1,7$ min

Da sich die Halbwertszeiten von Ncap-LOV und YtvA nur unwesentlich unterscheiden, scheint weder die STAS-Domäne noch die $J\alpha$ -Helix die Hell-Dunkel-Konversionsrate der LOV-Domäne zu beeinflussen. Dagegen führt die Abwesenheit der Ncap-Sequenz zu einer deutlich verlangsamten Reaktionskinetik. Das könnte darauf hindeuten, dass Ncap und LOV-Domäne in YtvA sowie in Ncap-LOV in einer Interaktion stehen, welche die Geschwindigkeit eines oder mehrerer Reaktionsschritte des Photozyklus signifikant erhöht. Beide Resultate unterstützen nicht die von Losi *et al.* angeführte Vermutung [70], dass die Lebensdauer des photoaktivierten Zustandes der LOV-Domäne von der Anwesenheit der STAS-Domäne beeinflusst wird und beide Domänen deshalb im direkten, physischen Kontakt stehen könnten.

4.5.5 Untersuchung lichtinduzierter Strukturänderungen in Ncap-LOV-J α mit Kleinwinkel-Röntgenstreuung

Die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS = Small-Angle X-Ray Scattering) bietet die Möglichkeit, die „globale“ Molekülform von in Lösung vorliegenden Proteinen zu erfassen. Aus der Korrelation von Intensität (I) und Winkel (θ) bzw. Streuvektor (S) der an einem Protein elastisch gestreuten Röntgenstrahlung kann dessen Gyrationradius (R_G), Volumen und globale Form abgeleitet und, mit speziellen Computerprogrammen, daraus ein gemittelt geometrisches Modell der Proteinhülle berechnet werden (s. Abschnitt 3.5.6). Die kleinste, noch auflösbare Strukturbreite beträgt dabei etwa 10 Å.

Wie aus dem Vergleich der in Abbildung 58A überlagert dargestellten Streukurven von unbelichtetem und photoaktiviertem Ncap-LOV-J α hervorgeht, erzeugten beide Formen ein nahezu identisches Streumuster. Das heisst, beide Molekülformen sind im Rahmen der erfassbaren räumlichen Auflösung nicht voneinander zu unterscheiden. Die Kongruenz der nach Kratky aufgetragenen Streukurven belegt dies zusätzlich (s. Abbildung 58B). Bei dieser Auftragung wird der Streuvektorbereich, in welchem vor allem die Information über die globale Molekülform kodiert ist ($0,2 < S < 1,5$), besonders betont, sodass entsprechende Unterschiede hier am deutlichsten zu erkennen wären.

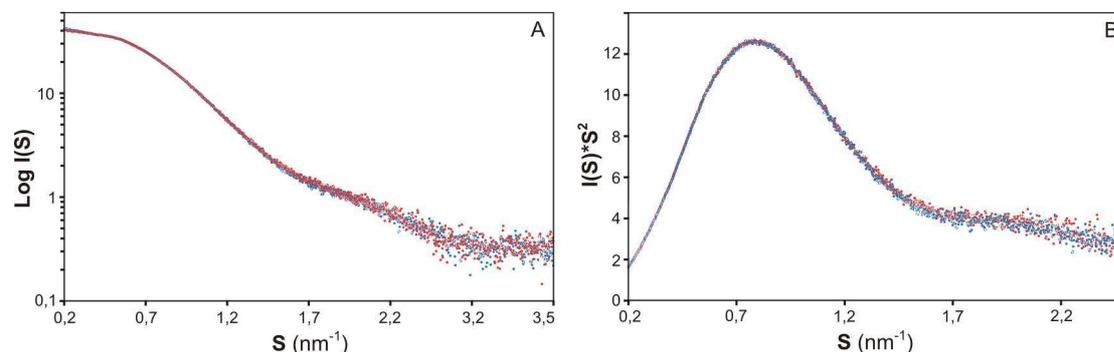


Abbildung 58: SAXS-Streukurven von unbelichtetem & photoaktiviertem Ncap-LOV-J α

Überlagerung der prozessierten Streukurven von unbelichtetem (rot) und photoaktiviertem (blau) Ncap-LOV-J α . In Abhängigkeit des Streuvektors sind in A die Intensitäten und in B das Produkt aus Intensität und Streuvektorquadrat (Kratky-Plot) aufgetragen.

Die mittels des Softwarepaketes „GNOM“ [90] aus den Streukurven abgeleiteten Paar-Verteilungsfunktionen ($P(r)$) zeigen dementsprechend ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (s. Abbildung 59). Der Verlauf der $P(r)$ -Funktion lässt bereits auf die globale Molekülform schließen und deutet an, dass Ncap-LOV-J α unabhängig vom Belichtungszustand in Form eines ellipsoiden Körpers vorliegt.

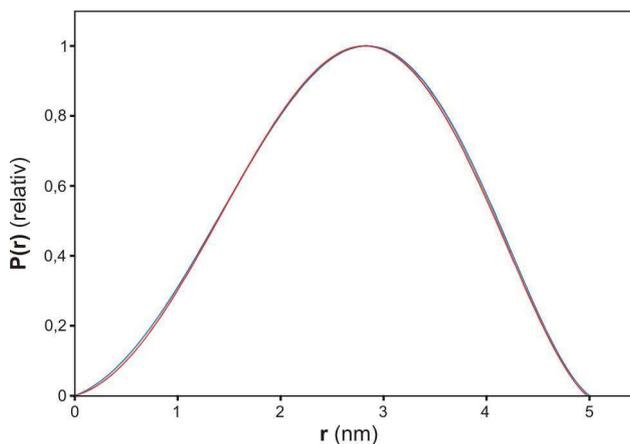


Abbildung 59: Paar-Verteilungsfunktionen für unbelichtetes & photoaktiviertes Ncap-LOV-J α

Das Maxima der P(r)-Funktion von unbelichtetem (rot) und photoaktiviertem (blau) Ncap-LOV-J α wurde jeweils auf 1 normiert.

Veranschaulicht ist die P(r)-Funktion ein Maß für die Zahl der Volumenelemente, die sich im Abstand (r) von einem beliebig gewählten Punkt innerhalb eines Partikels befinden. Der Abstand ihrer Nullstellen gibt darüber hinaus die maximale Ausdehnung des Partikels (D_{\max}) an. Bei der Ableitung der P(r)-Funktion wurden mit „GNOM“ zusätzlich die R_G beider Proteinformen berechnet (s. Tabelle 29).

Tabelle 29: R_G & D_{\max} von unbelichtetem & photoaktiviertem Ncap-LOV-J α

Belichtungszustand	R_G (nm)	D_{\max} (nm)
unbelichtet	2,03 \pm 0,02	5,00 \pm 0,05
photoaktiviert	2,04 \pm 0,02	4,98 \pm 0,05

Da sich R_G und D_{\max} zwischen unbelichtetem und photoaktiviertem Ncap-LOV-J α nicht signifikant unterscheiden, ist davon auszugehen, dass die Belichtung des Proteins zu keinen mittels SAXS detektierbaren Konformationsveränderungen führt. Weil aus dem Vergleich der berechneten Hüllmodelle von unbelichtetem und photoaktiviertem Protein somit kein Informationsgewinn resultieren kann, wurden lediglich Hüllmodelle des unbelichteten Proteins berechnet (s. Abschnitt 3.5.6). Ein aus 80 Modellen gemitteltes Hüllmodell ist in Abbildung 60 dargestellt.

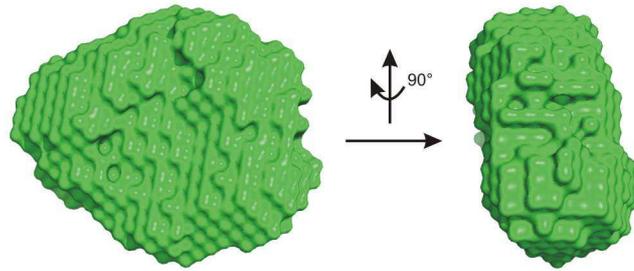


Abbildung 60: Hüllmodell von unbelichtetem, dimerem Ncap-LOV-J α

Das Modell entspricht der mittleren räumlichen Ausdehnung von insgesamt 80 separat berechneten Einzelmodellen. Dazu wurden mit den Programmen „Gasbor“ und „Dammif“ jeweils 20 Modelle in P1- und P2-Symmetrie berechnet und mit dem Programm „Damfilt“ daraus ein gemittelttes Hüllmodell erzeugt.

4.5.6 Strukturmodell von unbelichtetem Ncap-LOV-J α

Auf Basis der chemischen Verschiebungen der zugeordneten $^1\text{H}_\text{N}$ -, ^{15}N -, ^{13}CO -, $^{13}\text{C}\alpha$ - und $^{13}\text{C}\beta$ -Resonanzen, der ermittelten RDC's, der SAXS-Streukurve, den Ergebnissen aus 4 verschiedenen Sekundärstrukturvorhersage-Algorithmen (PROF [159], JUFO [160], PsiPred [161] & SAM [162] und der Röntgenstruktur der LOV-Domäne (AS 25 -128 aus PDB-Eintrag 2PR5) wurde mit dem Strukturberechnungsprogramm „Rosetta“ [80,81] ein Strukturmodell (bzw. Strukturvorhersagemodell) von unbelichtetem Ncap-LOV-J α berechnet. Dadurch sollte überprüft werden, ob die Ncap-Sequenz, wie die Relaxationsdaten (s. Abschnitt 4.5.4.2) und die Analyse der Halbwertszeiten des photoaktivierten Zustandes (s. Abschnitt 4.5.4.5) vermuten lassen, mit der LOV-Domäne assoziiert sein könnte. Mit allen oben aufgeführten Eingangsparametern, außer der SAXS-Streukurve und der LOV-Kristallstruktur, wurden zunächst je 10000 Strukturmodelle von Ncap (Gly + AS 2-24) und der J α -Helix (AS 129-147) berechnet und die jeweils energieärmste Struktur für die weiteren Berechnungen ausgewählt. Für alle Modelle eines Sequenzelementes sind in Abbildung 61A & D jeweils die Korrelation von Gesamtenergie und Grad der strukturellen Abweichung zur energieärmsten Struktur (angegeben als RMSD = „Root Mean Square Deviation“) dargestellt. In Abbildung 61B & E ist jeweils eine Überlagerung der 10 energieärmsten Modellstrukturen und in Abbildung 61C & F die jeweils energieärmste Modellstruktur gezeigt. Da der Grad struktureller Unterschiede zwischen den berechneten Modellen mit sinkender Gesamtenergie kleiner wird, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Geometrie der energieärmsten Strukturen von Ncap und J α -Helix deren tatsächlicher Strukturgeometrie nahe kommt. Der maximale „RMSD“ der 10 energieärmsten Strukturen beträgt für Ncap 0,18 Å und für die J α -Helix 1,3 Å. Anders als in der Kristallstruktur, bildet die J α -Sequenz jedoch keine durchgehende α -Helix. Die Aminosäuren S¹³⁹LTEI bilden hier eine Loop-Sequenz und die α -helikal strukturierten Reste T¹⁴⁴-L¹⁴⁶ des C-Terminus sind auf den N-Terminus zurückgefaltet.

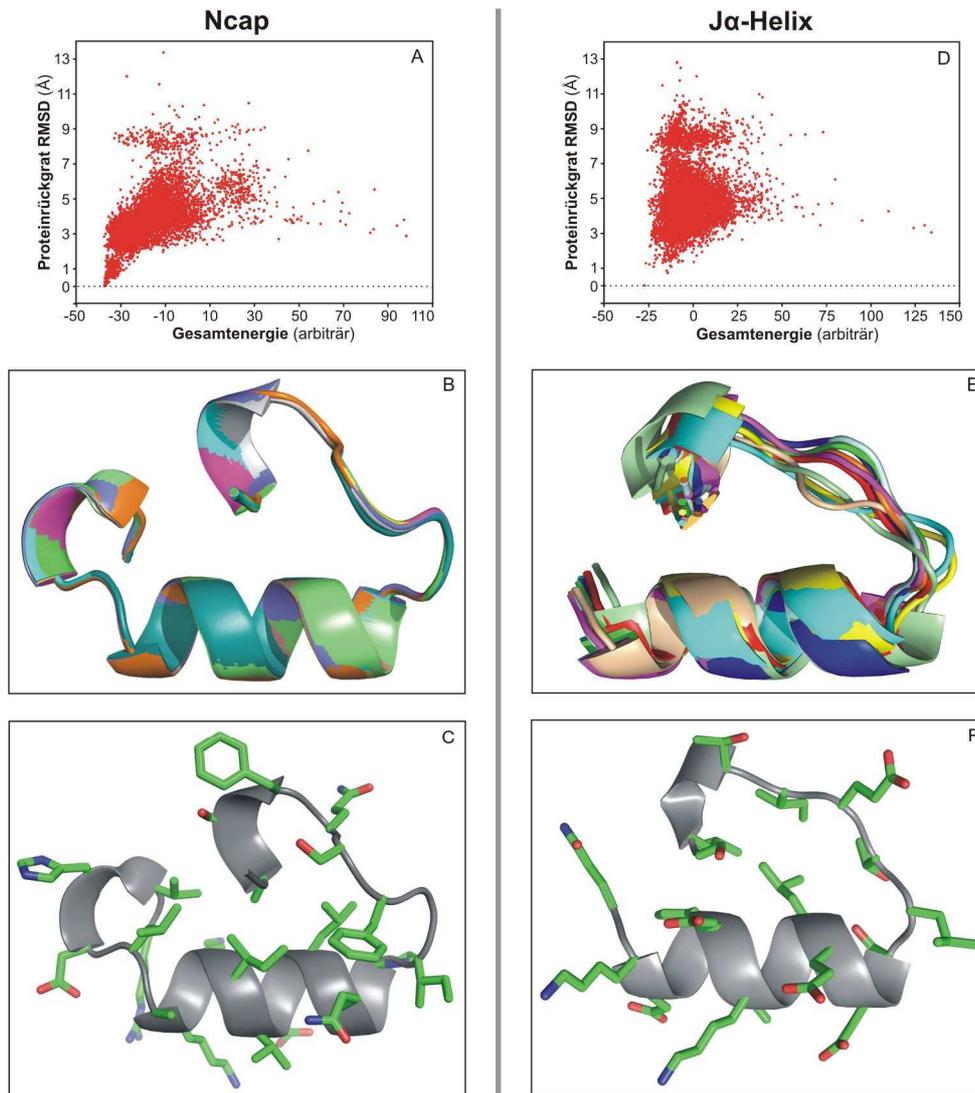


Abbildung 61: Strukturmodelle von Ncap & J α -Helix

Von beiden Sequenzelementen wurden mit „Rosetta“ jeweils 10000 Strukturmodelle berechnet und die Gesamtenergie jeder Struktur gegen den Grad ihrer strukturellen Abweichung bezüglich der Proteinrückgratstruktur des energieärmsten Modells aufgetragen (A & D). Jeweils die 10 energieärmsten Modelle wurden mit „Pymol“ überlagert, auf die C α -Atome des energieärmsten Modells ausgerichtet, unterschiedlich koloriert und in Form der schematisierten Sekundärstruktur des Proteinrückgrates dargestellt (B & E). In der Darstellung der Struktur des jeweils energieärmsten Modells (C & F) sind zusätzlich Stabmodelle der Seitenketten eingezeichnet (C-Atome = grün, N-Atome = blau, O-Atome = rot).

Die ausgewählten Strukturelemente wurden mit den entsprechenden Sequenzenden der LOV-Kristallstruktur verbunden. Dieses Modell diente dann als Startstruktur für die Berechnung von Strukturmodellen, deren zurückgerechnete SAXS-Streukurven konform mit der experimentell ermittelten Streukurve sein sollten. Als Bedingung wurde festgelegt, dass „Rosetta“ die Startstruktur dabei nur durch eine Veränderung der relativen Orientierung der Aminosäuren H²²-R²⁴ (zur Umorientierung der Ncap-Sequenz) und Q¹²⁹-E¹³¹ (zur Umorientierung der J α -Helix) modifizierte.

Die vorhandenen Grundstrukturen von Ncap, LOV-Domäne und J α -Helix wurden dabei also nicht verändert sondern nur relativ zueinander umorientiert. Es wurden insgesamt 480 Strukturmodelle berechnet. Das Strukturmodell mit der geringsten Gesamtenergie wurde dann in das gemittelte SAXS-Hüllmodell von Ncap-LOV-J α (s. Abschnitt 4.5.5) eingepasst. Die schematisierte Struktur des energieärmsten Modells und dessen Überlagerung mit dem SAXS-Hüllmodell ist in Abbildung 62 aus 3 verschiedenen Perspektiven dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die längere α -Helix von Ncap (Reste P¹⁰-A¹⁹) nicht vom Hüllmodell eingeschlossen wird und, da mit „Pymol“ keine polaren Kontakte zwischen Ncap und LOV-Domäne gefunden wurden, beide Strukturelemente offensichtlich nicht miteinander assoziiert sind. Da dieses Modell weder von den Daten der Relaxationsanalyse (s. Abschnitt 4.5.4.2) noch von denen der Halbwertszeitbestimmung (s. Abschnitt 4.5.4.5) und auch nicht zufriedenstellend von den SAXS-Daten (s. Abschnitt 4.5.5) unterstützt wird, kann es sich nur um ein Artefakt der Strukturvorhersage handeln, das wieder verworfen werden muss.

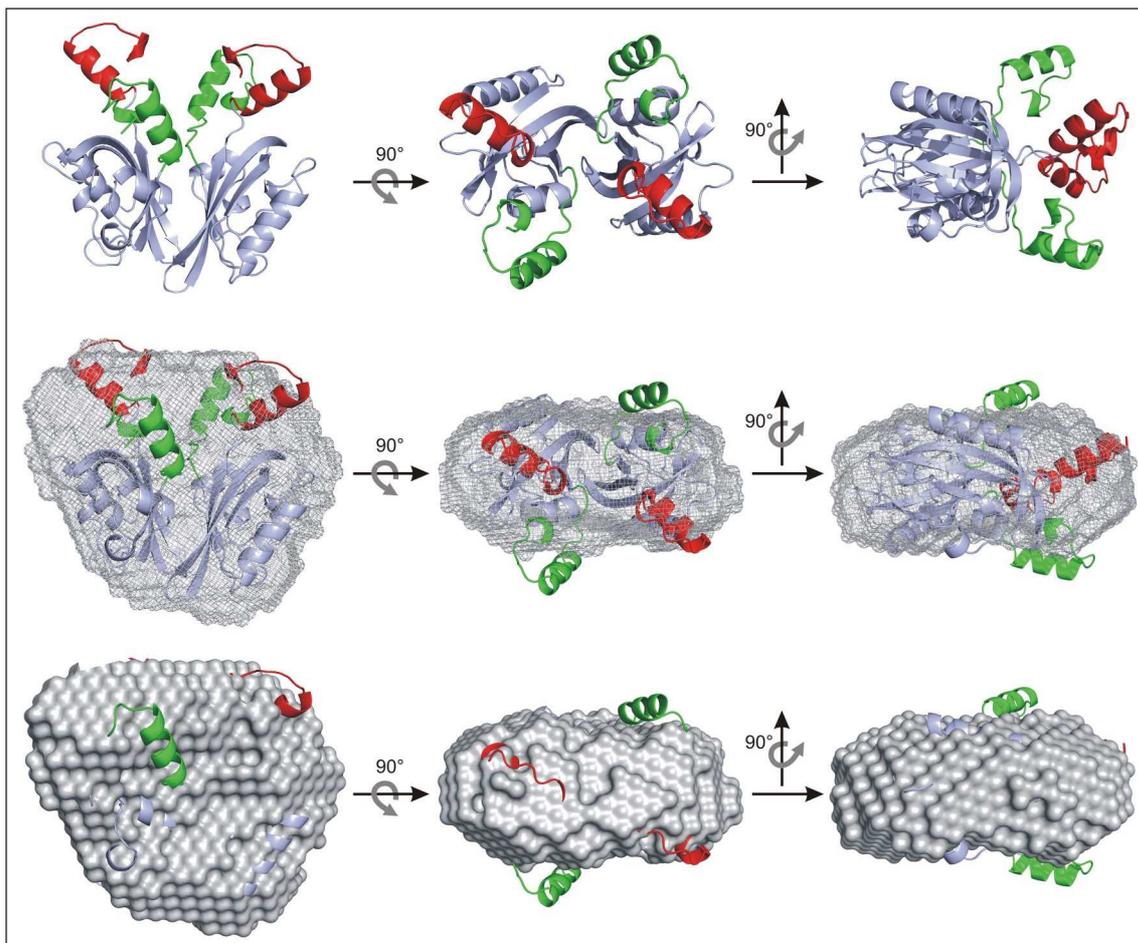


Abbildung 62: Rosetta-SAXS-Strukturmodell von dimerem Ncap-LOV-J α

Die schematisierte Struktur des energieärmsten Modells von dimerem Ncap-LOV-J α ist in der oberen Reihe und deren Einpassung in das SAXS-Hüllmodell in der mittleren (Oberflächengitteransicht) bzw. unteren (Oberflächenansicht) Reihe dargestellt. Die Proteinrückgratstruktur der LOV-Domäne ist hellblau, die der Ncap-Sequenz grün und die der J α -Helix rot gezeichnet. Die Bilder wurden mit „Pymol“ erstellt.

4.6 Flavinbindungsstudien

In Abschnitt 4.2.3 wurde bereits gezeigt, dass in rekombinant exprimierten YtvA-LOV-Varianten neben FMN auch Riboflavin enthalten ist und Mansurova *et al.* haben demonstriert, dass sich darüber hinaus auch noch andere Flavine (in vitro unter denaturierenden Bedingungen) in die LOV-Domäne inkorporieren lassen [156]. Bisher wurde jedoch noch nie gezeigt, wie stark der Flavin-Chromophor mit der LOV-Domäne assoziiert ist, wobei diese Fragestellung ausschließlich auf den Grundzustand zu beziehen ist, da der Chromophor im photoaktivierten Protein kovalent mit der Proteinstruktur verknüpft ist.

Mittels ITC (s. Abschnitt 3.5.5) konnten im Rahmen dieser Arbeit, so weit bekannt, nun erstmals Bindekonstanten und thermodynamische Parameter der Assoziation zwischen einem LOV-Apoprotein und Flavin-Mononukleotid (FMN), Riboflavin (RF) sowie Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) bestimmt werden. Für diese Experimente wurde deflaviniertes Ncap-LOV (nachfolgend Ncap-LOV-Apo bezeichnet) eingesetzt. Darüber hinaus konnte mit AUZ-Experimenten (s. Abschnitt 3.5.4) gezeigt werden, dass sich Ncap-LOV-Apo bei mikromolaren Konzentrationen in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht befindet. Um das in der ITC mit den verschiedenen Flavinen rekonstituierte Ncap-LOV sowie auch das Apoprotein selbst mit Experimenten der heteronuklearen Lösungs-NMR-Spektroskopie charakterisieren zu können, wurde das Apoprotein aus uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV hergestellt (s. Abschnitt 3.4.4). Um präparationsbedingte Einflüsse auszuschließen, wurden alle Experimente, einen ersten ITC-Testlauf ausgenommen, mit Aliquots aus einer einzigen Proteinstammlösung durchgeführt.

4.6.1 Thermodynamik der Flavin-Apoprotein-Wechselwirkung

Bereits ein erstes ITC-Experiment, durchgeführt mit His₆-Tag enthaltendem, Ncap-LOV-Apo und FMN, produzierte eine vielversprechende Bindekurve. Dieses Experiment wurde „klassisch“ durchgeführt, d.h. der Ligand wurde zum Protein titriert. Aufgrund der geringen Löslichkeit von RF (max $\sim 170\mu\text{M}$), konnte dieses Flavin jedoch nicht auf diese Weise eingesetzt werden. Daher wurden alle folgenden Experimente, bei denen dann ^{15}N -markiertes, His₆-Tag freies Ncap-LOV-Apo eingesetzt wurde, „revers“ durchgeführt, sprich der entsprechende Ligand wurde vorgelegt und das Apoprotein hinzutitriert. In Abbildung 63 ist jeweils ein ITC-Thermogramm sowie die zugehörige Bindekurve der Interaktion von FMN, RF und FAD dargestellt. Die jeweils mit der ITC-Software aus den Fitkurven der Datensätze zweier Experimente berechneten Dissoziationskonstanten und thermodynamischen Parameter wurden gemittelt und sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

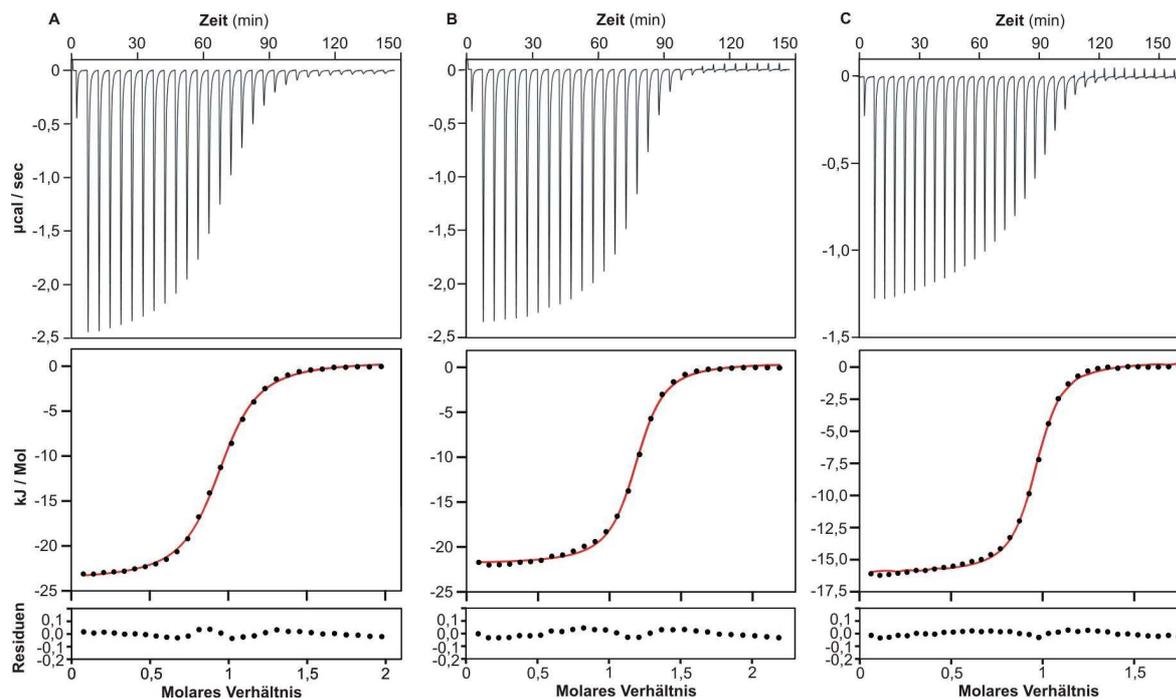


Abbildung 63: ITC-Titrationskurven von Ncap-LOV-Apo mit verschiedenen Flavinen

Oben ist jeweils das Thermogramm, darunter die integrierten Wärmemengen sowie die resultierende Fitkurve (rot) und unten die Residuen zwischen experimentellen Daten und Fitkurve aus den Titrationsen von 400 μM Ncap-LOV-Apo zu 43 μM FMN (A), 39 μM RF (B) und 40 μM FAD (C) dargestellt. Alle Titrationsen wurden bei 25°C durchgeführt.

Tabelle 30: Ergebnisse der ITC-Experimente von Ncap-LOV-Apo mit verschiedenen Flavinen

Flavin	ΔH (kcal mol ⁻¹)	-TAS (kcal mol ⁻¹)	N	K _D (nM)	ΔG° (kcal mol ⁻¹)
FMN	-23,19 ± 0,05	14,71 ± 0,05	0,926 ± 0,003	612 ± 3	-8,741 ± 0,003
RF	-22,03 ± 0,04	13,11 ± 0,04	1,130 ± 0,028	291 ± 22	-8,912 ± 0,045
FAD	-16,43 ± 0,08	7,26 ± 0,07	0,931 ± 0,010	191 ± 15	-9,163 ± 0,047

Die Dissoziationskonstanten liegen durchweg im dreistelligen nanomolaren Bereich, wobei RF und FAD deutlich stärker mit der LOV-Domäne assoziiert sind, als FMN. Die Reaktionen haben eine 1:1 Stöchiometrie. Die kleinen Abweichungen von 1 sind darauf zurückzuführen, dass die tatsächliche Konzentration der Flavine in geringem Maß von der photometrisch bestimmten Konzentration abweicht. Im Vergleich zu FMN und RF führt die Bindung von FAD zu einer geringeren Entropieabnahme im System. Das könnte darauf hindeuten, dass der Adenin-Teil des Moleküls aus der LOV-Domäne heraussteht und sich mit einem größeren Freiheitsgrad bewegen kann, als der Flavin-Teil bzw. als die beiden anderen Flavine.

4.6.2 Charakterisierung von deflaviniertem & rekonstituiertem Ncap-LOV

Von Ncap-LOV-Apo und von den während der ITC mit den verschiedenen Flavinen rekonstituierten Proteinen wurden, nach vollständiger Rekonstitution (s. Abschnitt 3.4.9), 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren aufgenommen und mit einem entsprechenden Spektrum von nativ präpariertem Ncap-LOV überlagert (s. Abbildung 64A & B und Abbildung 65A & B).

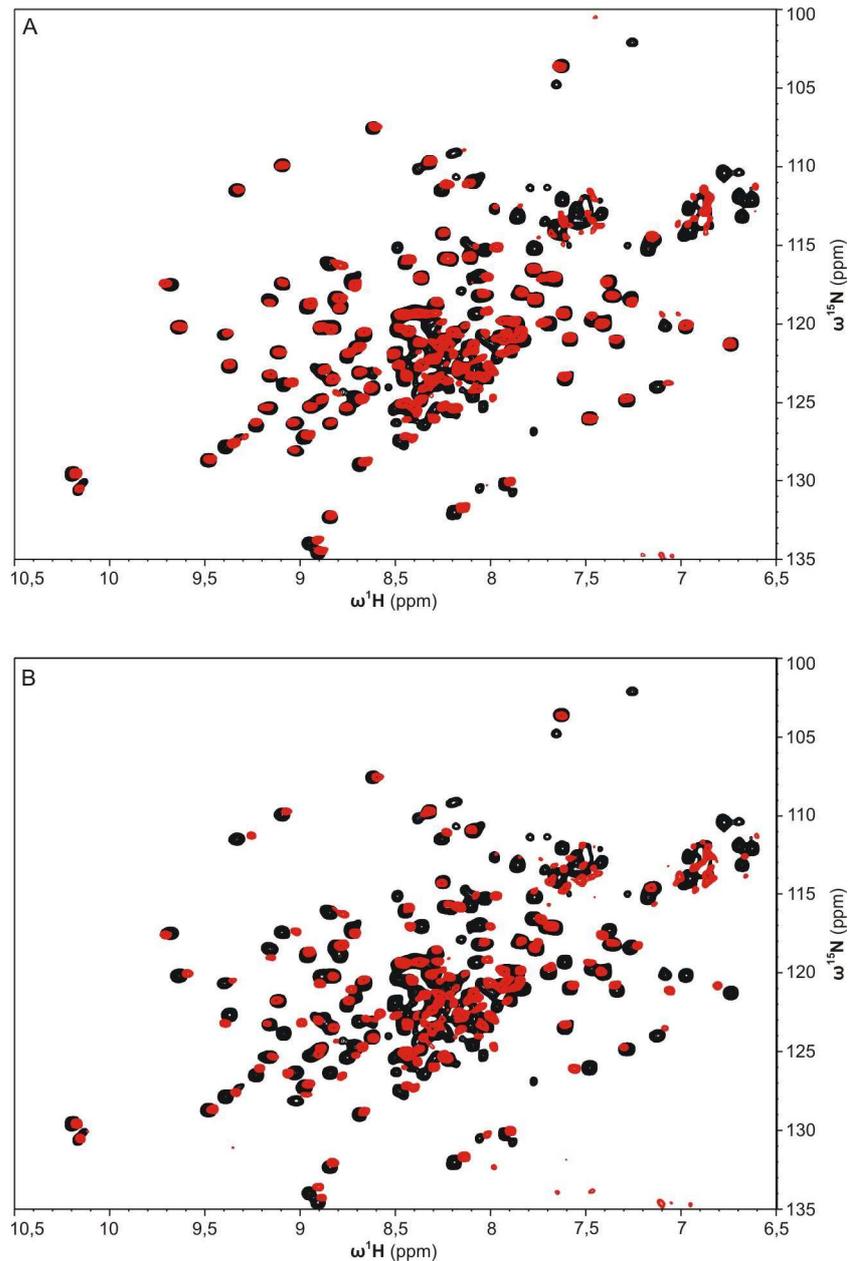


Abbildung 64: 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von nativem & rekonstituiertem Ncap-LOV

Das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von nativ präpariertem Ncap-LOV (schwarz) ist mit den $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren (rot) von FMN-rekonstituiertem (A) und RF-rekonstituiertem Ncap-LOV (B) überlagert. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

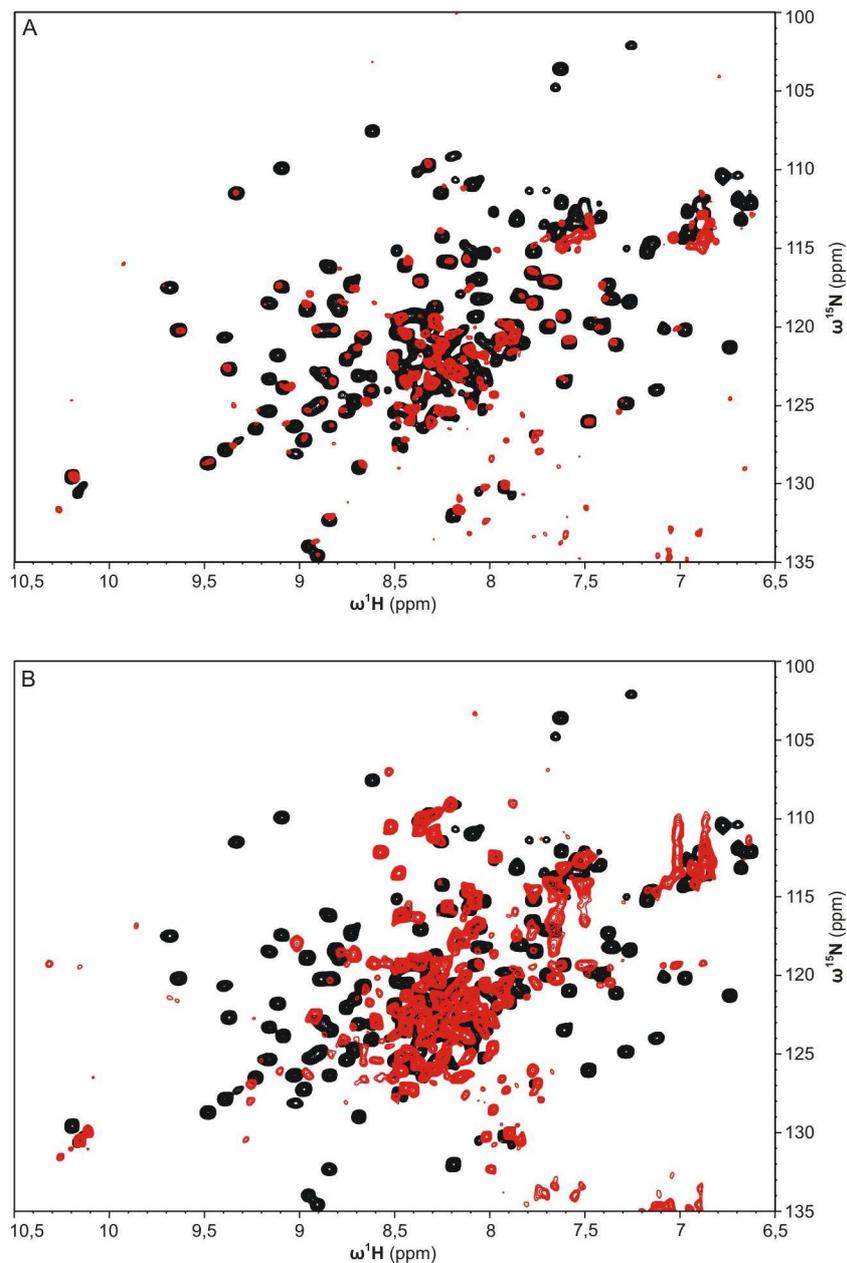


Abbildung 65: 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren von nativem, rekonstituiertem & deflaviniertem Ncap-LOV
Das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von nativ präpariertem Ncap-LOV (schwarz) ist mit den $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -TROSY-Spektren (rot) von FAD-rekonstituiertem (A) und deflaviniertem Ncap-LOV (B) überlagert. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen.

Wie durch Abbildung 64A deutlich wird, unterscheiden sich die $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -korrelierten NMR-Spektren von nativ präpariertem und mit FMN rekonstituiertem Ncap-LOV bezüglich Anzahl und Position der Kreuzsignale kaum voneinander. Demzufolge müssen auch die Strukturen von nativem und FMN-rekonstituiertem Protein nahezu identisch sein und die in der ITC detektierte Interaktion kann daher nur auf die Inkorporation von FMN in die LOV-Domäne zurückgeführt werden.

Diese Schlussfolgerung kann ebenso auf das mit RF rekonstituierte Ncap-LOV übertragen werden, da auch dessen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Spektrum die gleiche charakteristische Signaldispersion und Signalanzahl wie das Spektrum von nativem Ncap-LOV aufweist (s. Abbildung 64B). Die Abwesenheit der Phosphatgruppe wirkt sich jedoch signifikant auf die Intensität und Position einiger Kreuzsignale aus.

Die Anwesenheit von FAD führte dazu, dass fast alle Kreuzsignale, die nicht im mittleren Bereich des Spektrums lagen oder von der Tryptophanseitenkette (bei $\sim 10,2$ ppm) stammten, zwar noch vorhanden, aber wenig intensiv und daher nur schwach detektierbar waren (s. Abbildung 65A). Das Protein besitzt demnach eine definierte Struktur, doch könnte es, bezogen auf die NMR-Zeitskala, möglicherweise in intermediärer Zeitspanne zwischen verschiedenen Konformationen wechseln, was zum Verschwinden der Kreuzsignale betroffener Aminosäuren führt. Ein weiterer Hinweis, dass das Protein eine wohldefinierte Struktur besitzen muss, ergibt sich auch aus der Tatsache, dass die Signalüberlagerung im mittleren Spektralbereich nicht wesentlich größer ist, als bei dem mit FMN bzw. RF rekonstituierten Protein. Das heisst, wäre der Intensitätsverlust der Kreuzsignale in den äußeren Spektralbereichen die Folge eines Strukturverlustes, dann müssten Signalintensität und Signalüberlagerung im mittleren Spektralbereich aufgrund der relativen Zunahme unstrukturierter Bereiche deutlich größer sein. Auf das Apoprotein scheint Letzteres dagegen zuzutreffen, denn wie das entsprechende Spektrum zeigt (s. Abbildung 65B), konzentrieren sich hier fast alle sequentiellen Kreuzsignale ausschließlich auf die Spektrenmitte. Ein bedeutender Anteil des Apoproteins scheint demnach keine wohldefinierte Struktur auszubilden. Anhand eines CD-Spektrums konnte diese Annahme zusätzlich untermauert werden (Aufnahme und Auswertung wie in Abschnitt 3.5.3 bzw. Abschnitt 4.5.2 beschrieben). Die berechneten Sekundärstrukturanteile von nativem und deflaviniertem Ncap-LOV sind in Tabelle 31 zusammengestellt. Vor allem der Anteil α -helikaler Bereiche ist im deflavinierten Protein deutlich kleiner, als in nativem Ncap-LOV. Der Anteil von β -Strängen ist zwar auch erniedrigt, aber in weit geringerem Ausmaß.

Tabelle 31: Sekundärstrukturanteile in nativem & deflaviniertem Ncap-LOV

	Ncap-LOV	Ncap-LOV-Apo
α -Helix	45%	6%
β -Strang	23%	16%
Schleifen	10%	11%
unstrukturiert	19%	67%
nrmsd*	0,007	0,015

*normalised root-mean-square-deviation [157]

Da das β -Faltblatt der LOV-Domäne maßgeblich für deren Dimerisierung verantwortlich ist [75], wurde mittels AUZ in einem Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment untersucht, ob die Deflaviniierung diese Eigenschaft verändert. In Abbildung 66 ist die konzentrationsabhängige $c(S)$ -Verteilung für Ncap-LOV-Apo-Konzentrationen von $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\sim 17,5 \text{ }\mu\text{M}$) und $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\sim 70 \text{ }\mu\text{M}$) dargestellt.

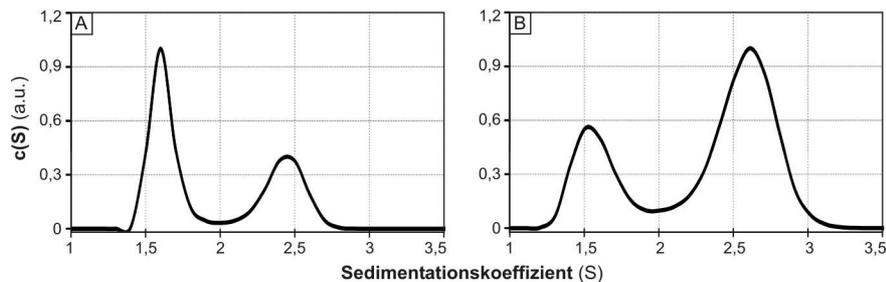


Abbildung 66: Konzentrationsabhängige $c(S)$ -Verteilung aus SV-Daten von Ncap-LOV-Apo

Kurven der konzentrationsabhängigen Verteilung der Sedimentationskoeffizienten für Ncap-LOV-Apo-Konzentrationen von $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A) und $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (B). Die Kurven wurden aus Interferenzscans berechnet. Die Konzentrationswerte der Kurvenmaxima wurden jeweils auf 1 normiert.

Für die monomere Spezies wurde ein mittleres apparentes Molekulargewicht (MW_{app}) von 12 kDa und für das Dimer ein MW_{app} von 23 kDa berechnet. Diese Werte liegen etwas unterhalb der theoretischen Molekulargewichte (Monomer, ^{15}N -markiert, 14,6 kDa), doch da die Probe nur Ncap-LOV-Apo enthält, ist davon auszugehen, dass es sich tatsächlich nur um das Monomer und das Dimer handeln kann. Die $c(S)$ -Verteilungen zeigen also, dass deflaviniertes Ncap-LOV in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht steht und dass dessen K_D -Wert innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches liegen muss. Die Deflaviniierung führt demnach zu einer starken Verringerung der vom β -Faltblatt vermittelten, intermolekularen Wechselwirkung. Obwohl im $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -NMR-Spektrum die für β -Stränge charakteristischen Kreuzsignale fehlen (s. Abbildung 65B), muss das nicht bedeuten, dass keine β -Faltblattstruktur mehr vorliegt, da Monomer und Dimer in einer Austauschreaktion stehen könnten, deren Geschwindigkeit bezüglich der NMR-Zeitskala im intermediären Bereich liegt. Wie oben bereits angesprochen, wären die Kreuzsignale der davon betroffenen Aminosäuren dann nicht mehr zu detektieren. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass Ncap-LOV-Apo-Monomere unspezifisch miteinander wechselwirken.

Ein Experiment, mit dem eindeutig belegt werden konnte, dass die rekonstituierten Proteine die typische Struktur der LOV-Domäne besitzen müssen, war der Nachweis ihrer photochemischen Aktivität. Dieser Nachweis wurde durch die NMR-spektroskopische Erfassung der Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion erbracht (Durchführung & Auswertung s. Abschnitt 3.5.7.1 & 4.5.4.5). Die gemessenen Intensitäten wurden über die Zeit aufgetragen und mit „Origin 8.5“ monoexponentiell gefittet (s. Abbildung 67). Die resultierenden $T_{1/2}$ -Werte korrespondierender Kurven wurden anschließend gemittelt (s. Tabelle 32).

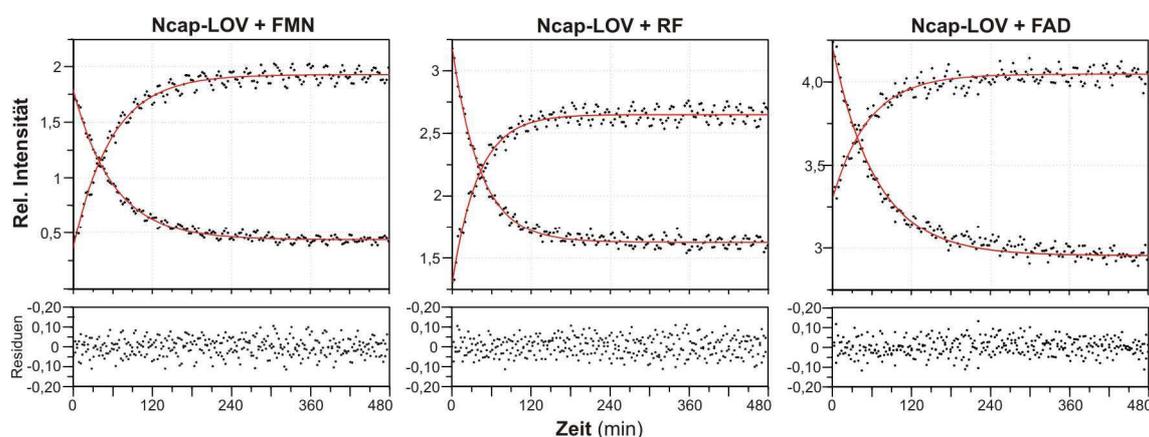


Abbildung 67: Kinetik der Hell-Dunkel-Konversion von mit Flavinen rekonstituiertem Ncap-LOV

Die Kinetiken wurden durch Detektion der Intensitätsveränderung von jeweils 2 diskreten Signalen innerhalb einer Serie zeitlich inkrementiert aufgenommener ^1H -NMR-Spektren verfolgt. Die berechneten, monoexponentiellen Fitkurven (rot) wurden jeweils mit den korrespondierenden, experimentellen Daten überlagert und die resultierenden Abweichungen in den darunterliegenden Diagrammen aufgetragen. Die Daten wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C aufgenommen. Die Pufferzusammensetzung war in allen Proben identisch: 20 mM Tris-HCl pH = 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM β -Mercaptoethanol; 10 % D_2O .

Tabelle 32: $T_{1/2}$ -Werte von mit FMN, RF & FAD beladenem Ncap-LOV

Ncap-LOV	+ FMN	+RF	+FAD
$T_{1/2}$ (27°C)	$41,3 \pm 0,9$ min	$28,6 \pm 0,8$ min	$42,4 \pm 1,3$ min

Die Halbwertszeiten von mit FMN und FAD rekonstituiertem Ncap-LOV sind mit denen des nativ präparierten Proteins vergleichbar (s. Abschnitt 4.5.4.5). Ist die LOV-Domäne dagegen mit Riboflavin rekonstituiert, verkürzt sich die Halbwertszeit des photoaktivierten Zustandes um mehr als 25%. Da RF, im Unterschied zu FMN und FAD, keine Phosphatgruppe besitzt, die Protonen in Wasserstoffbrücken arretieren könnte [75], wäre denkbar, dass dadurch die basenkatalysierte Protonenabstraktion innerhalb des Wasserstoffbrückennetzwerkes der Chromophorumgebung erleichtert und so die Hell-Dunkel-Rückkonvertierung beschleunigt wird.

4.6.3 Deflaviniertes Ncap-LOV als molekulare Sonde zum Flavin-Nachweis

Aufgrund der großen Affinität zu den natürlichen Flavinen FMN, RF und FAD, wurde deflaviniertes Ncap-LOV (hier als Fusionsprotein mit His₆-Tag) als molekulare Sonde für die Analyse der in *Bacillus subtilis* vorhandenen Flavinspezies eingesetzt. Diese Untersuchung sollte Aufschluss darüber geben, mit welchen Flavinchromophoren YtvA in vivo assoziiert ist. In allen bisher dazu durchgeführten Untersuchungen wurde in YtvA, neben einem geringen Anteil RF, ausschließlich FMN als Chromophor nachgewiesen. Doch da für diesen Nachweis entweder rekombinant in *E. coli* hergestelltes oder in *B. subtilis* stark überexprimiertes Protein verwendet wurde, kann dieses Resultat nicht unmittelbar auf das in *B. subtilis* Wildtypzellen vorhandene YtvA übertragen werden. Mit der in Abschnitt 3.4.7 beschriebenen, in dieser Arbeit entwickelten Methode konnte dagegen untersucht werden, mit welchen Flavinen (FMN, RF und FAD) YtvA im Zytosol von *B. subtilis* Wildtypzellen in Interaktion steht.

Zur Identifizierung der mit Ncap-LOV-Apo aus *B. subtilis* Zelllysat isolierten und anschließend aus dem Protein freigesetzten Flavinspezies, wurden Letztere mittels HPLC-Chromatographie aufgetrennt (s. Abbildung 68) und die Retentionszeiten (t_R) der detektierten Signale mit den zuvor ermittelten Retentionszeiten von FAD, FMN und RF verglichen (s. Tabelle 33).

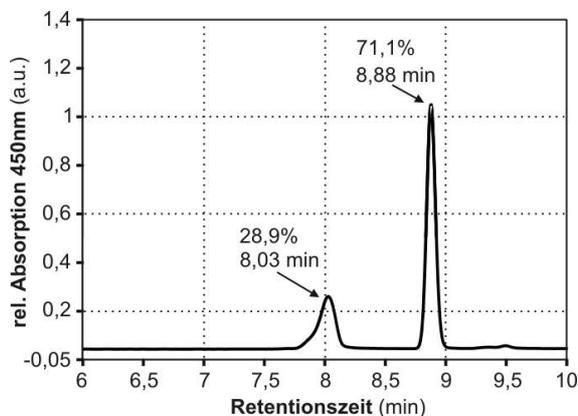


Abbildung 68: HPLC-Chromatogramm der aus *B. subtilis* isolierten Flavine

Die Auftrennung erfolgte über eine C-18 Pyramid-Säule mittels linearem H₂O-/Acetonitril-Gradient (0-100%). Die Flavine wurden spezifisch bei 450 nm detektiert. Das Absorptionsmaximum wurde auf 1 normiert.

Tabelle 33: Retentionszeiten verschiedener Flavine

Probe	FAD	FMN	RF	<i>B. subtilis</i>	
				Signal 1 (28,9%)	Signal 2 (71,1%)
t_R (min)	$7,75 \pm 0,26$	$8,24 \pm 0,11$	$8,88 \pm 0,0$	$8,03 \pm 0,05$	$8,88 \pm 0,0$

Dadurch ließ sich das Signal bei $t_R = 8,88$ min eindeutig Riboflavin zuordnen, welches mit einem Anteil von 71.1% demnach der in vivo dominierende Chromophor von YtvA zu sein scheint. Das Signal bei $t_R = 8,04$ min liegt genau zwischen den Retentionszeiten von FAD und FMN, sodass es zunächst keinem dieser Flavine eindeutig zugeordnet werden konnte. Basierend auf UV-Vis-Spektren, die jeweils an den Signalmaxima eluierender Spezies aufgezeichnet wurden (s. Abbildung 69), konnte dieses Signal aber eindeutig auf FMN zurückgeführt werden.

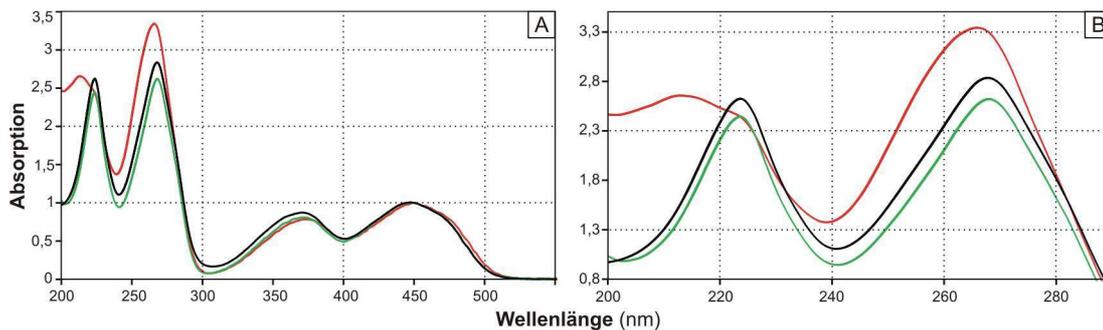


Abbildung 69: UV-Vis-Spektren der per HPLC analysierten Flavinspezies

Die Spektren von FMN (grün), FAD (rot) und der bei $t_R = 8,03$ min eluierten Spezies wurden während der HPLC an den entsprechenden Signalmaxima aufgenommen. Rechts ist ein vergrößerter Ausschnitt der Spektren aus (A) gezeigt. Die Absorptionswerte bei 450 nm wurden jeweils auf 1 normiert.

Das UV-Vis-Spektrum des aus *B.subtilis* isolierten Flavins ist nahezu identisch mit dem Spektrum der FMN-Referenz, unterscheidet sich aber vor allem im Bereich zwischen 200 - 270 nm signifikant vom FAD-Spektrum, das aufgrund des in FAD enthaltenen Adenins ein zusätzliches Maximum bei 210 nm und höhere Absorptionswerte bei 270 nm besitzt. Die Anwesenheit von FAD konnte somit ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst zeigte diese Analyse, dass YtvA in vivo mit großer Wahrscheinlichkeit zu etwa 30% mit FMN und etwa 70% mit Riboflavin assoziiert ist und deshalb beide Flavine als die natürlichen Chromophore des Proteins betrachtet werden sollten.

5 Diskussion

Um die molekulare Funktionsweise eines Photorezeptors zu verstehen, müssen die strukturellen und strukturdynamischen Charakteristika von jeweils zwei Zuständen, der unbelichteten und der photoaktivierten Form, studiert werden. Abhängig von der Lebensdauer der belichteten Form, kann es für eine Vielzahl von Untersuchungsmethoden erforderlich sein, die Rezeptormoleküle entweder durch kontinuierliche Bestrahlung im photostationären Zustand zu halten oder durch entsprechende Mutationen in einem „quasi-photostationären“ Zustand zu arretieren. Da die erste Variante den Vorteil bietet, das Protein in seiner nativen Form untersuchen zu können, wurden für die Untersuchung des blaulicht-sensitiven, bakteriellen Photorezeptors YtvA und dessen isolierter LOV-Domäne in dieser Arbeit eine Reihe verschiedener Belichtungssysteme entwickelt. Damit war es u.a. möglich, die Eigenschaften der photoaktivierten Spezies mit SAXS-, AUZ- und Lösungs-NMR-spektroskopischen Experimenten zu erfassen.

Neben dem vollständigen Photorezeptor wurden in dieser Arbeit vor allem Varianten dessen isolierter LOV- und STAS-Domäne untersucht. Mit den dabei gewonnenen Erkenntnissen konnten viele der zu Beginn dieser Forschungsarbeit gestellten Fragen beantwortet und ein umfassenderes Verständnis der molekularen Funktionsweise einzelner Sequenzelemente und auch des vollständigen Photorezeptors erreicht werden. Die wichtigsten Forschungsergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst und unter Einbeziehung von Ergebnissen anderer Forschungsgruppen diskutiert.

5.1 Wechselwirkung zwischen YtvA & GTP

Wie in Abschnitt 4.4 bereits dargelegt wurde, war aufgrund mehrerer Publikationen davon auszugehen, dass YtvA ein GTP-bindender Photorezeptor sei und dass diese Funktion einer lichtinduzierten Modulation unterworfen wäre [69,74,147,148]. Die Interaktionsstelle wurde in der STAS-Domäne vermutet, ohne jedoch eindeutig identifiziert worden zu sein. Da deren lichtinduzierte Veränderung ein entscheidendes Bindeglied zwischen intra- und intermolekularer Signaltransduktion darzustellen schien, war es ein wichtiges Ziel dieser Arbeit, diese genau zu lokalisieren. Für die Interaktion wurde von *Buttani et al.* eine Dissoziationskonstante von 38 μM für unbelichtetes und ein nicht genau spezifizierter, aber größerer Wert für photoaktiviertes YtvA angegeben [69].

Mittels heteronuklearer 2D Lösungs-NMR-Spektroskopie konnte jedoch auch nach mehrfach wiederholten Experimenten keine GTP-YtvA- bzw. GTP-STAS-Interaktion nachgewiesen werden. Um zu prüfen, ob die eingesetzten Proteine aktiv waren, wurden daher zunächst die von *Buttani et al.* beschriebenen Interaktionsexperimente durchgeführt.

Diese bestätigten, dass YtvA und auch die isolierte STAS-Domäne mit dem für den Nachweis der GTP-Bindung eingesetzten, fluoreszenzmarkierten GTP-Analogen, BODIPY[®]-GTP, interagierten (s. Abbildung 34). Zusätzlich zu den von *Buttani et al.* durchgeführten Experimenten, wurde auch die Interaktion zwischen YtvA bzw. STAS und dem isolierten Fluorophor, BODIPY[®], untersucht. Dabei zeigte sich, dass dieser mit vergleichbarer Affinität gebunden wurde (s. Abbildung 34), sodass BODIPY[®]-GTP als Sonde für den zweifelsfreien Nachweis einer GTP-vermittelten Interaktion ungeeignet schien. Hier könnte nicht unterschieden werden, ob ein Fluoreszenzanstieg aus unspezifischen, hydrophoben Wechselwirkungen oder einer GTP-vermittelten Bindung resultiert. *Nakasone et al.* haben vergleichbare Experimente durchgeführt und führten die Interaktion von YtvA und BODIPY[®]-GTP ebenfalls auf eine unspezifische, hydrophobe Wechselwirkung zurück [149].

Weil sich mit der Fluoreszenzspektroskopie eine mögliche GTP-Interaktion weder bestätigen noch ausschließen ließ, wurde die Wechselwirkung dann mit Methoden untersucht, in denen auch unmodifiziertes GTP eingesetzt werden konnte. Dazu zählte die ITC (s. Abschnitt 4.4.2) sowie zwei verschiedene Arten von Experimenten der Lösungs-NMR-Spektroskopie (s. Abschnitt 4.4.3). Als Positivkontrolle wurden alle Experimente zusätzlich auch mit BODIPY[®]-GTP durchgeführt.

Die ITC-Daten bestätigten die Ergebnisse der Fluoreszenzspektroskopie und damit die Vermutung, dass scheinbar nur der Fluorophor bindet, GTP jedoch nicht. Zusätzlich deuteten die Daten auch darauf, dass die Interaktionsstelle auf der STAS-Domäne lokalisiert ist. Darüber hinaus ergaben sich auch signifikante Unterschiede zwischen den Stöchiometrien der Reaktion von BODIPY[®]-GTP mit YtvA bzw. STAS. Während STAS den Liganden 1:1 bindet, beträgt dieses Verhältnis im Komplex von BODIPY[®]-GTP und YtvA dagegen 1:2. Grund dafür könnte der unterschiedliche Oligomerisierungszustand beider Proteine sein. Wie wir zeigen konnten, ist YtvA ein Dimer [61], wohingegen STAS im untersuchten Konzentrationsbereich hauptsächlich als Monomer vorliegt und erst bei höheren Konzentrationen zur Dimerisierung tendiert (s. Abschnitt 4.3.2 & [145]). Darüber hinaus ist STAS nur bei geringen Temperaturen ($\leq 12^{\circ}\text{C}$) einigermaßen stabil, beginnt bei physiologischen Temperaturen aber zu aggregieren (s. Abschnitt 4.2.2), während YtvA sehr viel stabiler ist. Es ist daher anzunehmen, dass STAS an seiner Oberfläche hydrophobe Bereiche exponiert und dass diese Bereiche in YtvA aufgrund einer STAS-STAS-Interaktion teilweise verdeckt sein könnten. Da die Wechselwirkung mit BODIPY[®]-GTP höchstwahrscheinlich hydrophober Natur ist, könnte das die oben erwähnten Unterschiede der Stöchiometrien erklären.

Wie oben bereits angedeutet, wurde die Interaktion von YtvA bzw. STAS mit GTP und BODIPY[®]-GTP auch mit 2 verschiedenen Experimenten der Lösungs-NMR-Spektroskopie untersucht. Zum einen wurde uniform ¹⁵N-markiertes Protein eingesetzt und dessen Signale sowie die durch eine Protein-Ligand-Interaktion auftretende Signalveränderung detektiert und zum anderen wurden Liganden-detektierende Experimente, wie Sättigungstransferdifferenz (STD) [152] und WaterLOGSY [153,154] in An- und Abwesenheit von unmarkiertem Protein zum Nachweis einer Interaktion durchgeführt.

Analog zu den Resultaten der Fluoreszenzspektroskopie und der ITC, bestätigten die proteindetektierenden Experimente, dass BODIPY[®]-GTP an YtvA und STAS bindet, beide Proteine jedoch nicht mit GTP interagieren. Die in Abbildung 38 & Abbildung 39 dargestellten ¹H¹⁵N-Korrelationsspektren zeigen außerdem, dass BODIPY[®]-GTP, bezogen auf die NMR-Zeitskala, einem intermediären Austausch unterliegt, der eine Linienverbreiterung und damit einhergehend eine Abnahme der Signalintensität der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren bewirkt. Da die meisten ¹H¹⁵N-Korrelationen von unbelichtetem YtvA zugeordnet werden konnten [145], war es auch möglich, die im unbelichteten Protein an der Interaktion mit BODIPY[®]-GTP beteiligten Aminosäuren zu identifizieren und die Effekte beider Liganden für alle gut aufgelösten ¹H¹⁵N-Kreuzsignale zu quantifizieren (s. Abbildung 40). Dabei zeigte sich, dass insbesondere die auswertbaren Kreuzsignale des D¹⁹³LSG- und des N²³⁶KLD-Motivs (D¹⁹³, L¹⁹⁴, G¹⁹⁶, & L²³⁸) von GTP unbeeinflusst blieben. Weil diese beiden klassischen Sequenzmotive (allgemein DXXG & NKXD) die GTP-Bindung in G-Proteinen vermitteln [54], wurde angenommen, dass YtvA über diese Motive mit GTP interagieren würde. Die Bindung von BODIPY[®]-GTP führte dagegen bei einer Vielzahl von Kreuzsignalen zu deutlichen Effekten: Während die LOV-Domäne (AS 26-128) kaum beeinflusst wurde, waren die J α -Helix sowie die STAS-Domäne stark betroffen. Die Bindung von BODIPY[®]-GTP scheint demnach auf die J α -Helix und die STAS-Domäne beschränkt und eher unspezifisch zu sein. Ein ähnlich unspezifischer Mechanismus wurde von Nakasone *et al.* auch für die Interaktion von BODIPY[®]-GTP mit hydrophoben Bereichen auf der Oberfläche verschiedener Varianten der isolierten YtvA-LOV-Domäne vorgeschlagen [149]. Das Fehlen von N- und C-terminal der LOV-Domäne lokalisierten Sequenzabschnitten scheint dabei Einfluss auf die Hydrophobizität dieser Proteinvarianten zu haben, wodurch diese ebenfalls mit BODIPY[®]-GTP interagierten. Im vollständigen Protein scheint die LOV-Domäne dagegen kaum hydrophobe Bereiche zu besitzen, sodass die BODIPY[®]-GTP-Interaktion sich in den hier durchgeführten Experimenten auf die J α -Helix und die STAS-Domäne beschränkte. Wie die ITC-Experimente gezeigt haben, verhielt sich ja auch die isolierte STAS-Domäne anders, als YtvA.

In anderen, mit YtvA durchgeführten NMR-Experimenten, zeigte sich auch, dass die α -Helix und die STAS-Domäne flexibler als die LOV-Domäne sind [145] und deshalb möglicherweise eher hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden können, als die relativ starre und fest zum Dimer gebundene LOV-Domäne. Das entscheidende Ergebnis der proteindetektierenden Experimente ist jedoch die Tatsache, dass weder die STAS-Domäne noch YtvA mit GTP interagieren.

Durch den Einsatz der in dieser Arbeit entwickelten Fasergekoppelten LED-Lichtquelle (s. Abschnitt 4.1.3), war es auch möglich, neben unbelichtetem YtvA zusätzlich die Wechselwirkung zwischen GTP bzw. BODIPY[®]-GTP und photaktiviertem YtvA untersuchen. Zu diesem Zweck und um die Resultate der vorangegangenen Experimente zu verifizieren, wurden STD- [152] und WaterLOGSY-Experimente [153,154] durchgeführt. Beide Techniken basieren auf der Detektion des Liganden und messen die aus der Interaktion mit dem Protein resultierenden Veränderungen seines Protonenspektrums. Während eine Protein-Ligand-Interaktion im STD-Spektrum durch die Anwesenheit von Signalen des Liganden angezeigt wird, offenbart ein Vorzeichenwechsel der Ligandensignale im WaterLOGSY-Spektrum, dass keine Interaktion stattfindet. Da letztgenannte Technik auf einem Magnetisierungstransfer zwischen Wasser- und Ligandmolekülen basiert, erscheinen Signale austauschbarer Ligandprotonen jedoch unabhängig von einer stattfindenden Interaktion immer mit positivem Vorzeichen im Ligandenspektrum. Wie die entsprechenden, in Abbildung 41 & Abbildung 42 dargestellten ¹H-Spektren belegen, konnte mit beiden Experimenttypen bestätigt werden, dass YtvA, unabhängig vom Belichtungszustand, nicht mit GTP, sondern ausschließlich mit BODIPY[®]-GTP interagiert. Da in den ¹H-Spektren des STD- und des WaterLOGSY-Experiments die Signale der aromatischen Protonen des Fluorophors sehr deutlich detektiert werden konnten, bestätigten beide Experimente zusätzlich die Vermutung, dass die Interaktion mit BODIPY[®]-GTP über dessen hydrophoben Fluorophorteil vermittelt wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit den aufgeführten biophysikalischen Methoden unzweideutig gezeigt werden konnte, dass das fluoreszenzmarkierte GTP-Analogon, BODIPY[®]-GTP, tatsächlich und eher unspezifisch mit YtvA interagiert, GTP selbst aber nicht an das Protein bindet, und dass diese Effekte nicht vom Belichtungszustand abhängig sind. YtvA scheint demzufolge kein GTP-bindendes Protein zu sein, sodass experimentelle Ergebnisse, welche unter der Annahme einer YtvA-GTP-Interaktion interpretiert wurden, neu überdacht werden sollten. Das gilt insbesondere für die Theorien, in denen GTP eine Rolle für die Funktion oder den Aktivierungsmechanismus von YtvA zugeschrieben wird und ganz besonders auch für die Interpretation von Ergebnissen aus in vivo Mutationsstudien [69,74,147,148].

5.2 Abgrenzung, Funktion & intramolekulare Organisation distinkter Struktureinheiten von YtvA

Basierend auf der von *Möglich et al.* durchgeführten Untersuchung der C-terminal von der $\text{J}\alpha$ -Helix terminierten YtvA-LOV-Domäne [75] sowie den publizierten Ergebnissen von *Losi et al.* [66,67] und *Buttani et al.* [69,74,76], ließ sich YtvA in vier distinkte Struktureinheiten, die Ncap-Sequenz (AS 1-24), die LOV-Domäne (AS 25-126), die $\text{J}\alpha$ -Helix (AS 128-147) und die STAS-Domäne (AS 148-261) unterteilen.

Um Zugang zu den Wechselbeziehungen und möglichen Funktion dieser Struktureinheiten zu bekommen, wurden in dieser Arbeit 4 verschieden terminierte Varianten der LOV-Domäne (LOV, Ncap-LOV, LOV- $\text{J}\alpha$, Ncap-LOV- $\text{J}\alpha$) und 2 verschieden terminierte Varianten der STAS-Domäne ($\text{J}\alpha$ -STAS, STAS) untersucht. Aufgrund der geringen Stabilität waren die STAS-Varianten (vor allem $\text{J}\alpha$ -STAS) jedoch gerade den wichtigen strukturabbildenden Methoden (Lösungs-NMR-Spektroskopie, SAXS) nur wenig zugänglich. Der Vergleich der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationspektren von $\text{J}\alpha$ -STAS und STAS (s. Abbildung 31) ließ zwar vermuten, dass die $\text{J}\alpha$ -Helix in $\text{J}\alpha$ -STAS mit einiger Wahrscheinlichkeit als α -helikales Strukturelement vorliegt, ob dieses aber möglicherweise auch mit der STAS-Domäne in Interaktion steht, konnte hier nicht geklärt werden. Mit Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten (kurz SV-Experimente) konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass STAS durch schwache intermolekulare Wechselwirkungen in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht steht (s. Abschnitt 4.3.2). Die Dissoziationskonstante konnte hier nur abgeschätzt werden, dürfte aber etwa im Bereich von $K_D \sim 400\text{-}500 \mu\text{M}$ liegen.

Die LOV-Varianten Ncap-LOV- $\text{J}\alpha$ und LOV- $\text{J}\alpha$ (jeweils unbelichtet) stehen ebenfalls in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht, allerdings liegt deren K_D -Wert im nanomolaren Bereich oder noch darunter, da selbst bei der kleinsten untersuchten Konzentration ($30 \mu\text{M}$) innerhalb der Nachweisgrenze von etwa $1 \mu\text{M}$ kein Monomer detektiert werden konnte (s. Abschnitt 0). Das deckt sich auch mit den Daten, die *Möglich et al.* für unbelichtetes LOV- $\text{J}\alpha$ angegeben haben ($K_D < 200 \text{ nM}$) [75]. Die An- oder Abwesenheit von Ncap hatte auf die Dimerisierung keine nachweisbaren Auswirkungen. Der Oligomerisierungszustand der LOV-Kerndomäne wurde nicht mit einem SV-Experiment untersucht, da diese Variante in Gelfiltrationen aber ebenfalls als Dimer eluierte (s. Abschnitt 4.2.3) und sich in der ^{15}N -Spinrelaxationsanalyse gezeigt hat, dass sich die $\text{J}\alpha$ -Helices sehr dynamisch bewegen können (s. Abschnitt 4.5.4.2), ist davon auszugehen, dass die Dimerisierung wohl nahezu vollständig auf einer LOV-LOV-Interaktion beruht. Diese Wechselwirkung kann auch kein artifizierlicher Zustand sein, der aus der Abwesenheit der STAS-Domäne resultieren könnte, da wir gezeigt haben, dass auch YtvA als fest assoziiertes Dimer vorliegt [61]. Eine „artifizierliche“ Dimerisierung wurde z.B. für die isolierte LOV2-Domäne des Phototropins AtPhot1 beschrieben [31].

Durch den Einsatz der in dieser Arbeit entwickelten AUZ-LED-Lichtquelle (s. Abschnitt 4.1.2) konnte in SV-Experimenten zusätzlich gezeigt werden, dass sich das Sedimentationsverhalten der photoaktivierten Formen (einschließlich YtvA) praktisch nicht von den unbelichteten Proteinen unterscheidet. In den LOV-Varianten scheint eine lichtinduzierte Entfaltung der J α -Helix, das Schlüsselement der intramolekularen Signaltransduktion in Phototropinen (s. Abschnitt 1.3.1), somit unwahrscheinlich, da sich dadurch der Diffusionskoeffizient und demzufolge auch der mittlere apparente Sedimentationskoeffizient signifikant verändern würde. Diese Annahme wird auch von den SAXS-Daten gestützt (s. Abschnitt 4.5.5), da sich die Streukurven von unbelichtetem und photoaktiviertem Ncap-LOV-J α nicht signifikant unterscheiden (s. Abbildung 58). Zwar lag die Untergrenze der räumlichen Auflösung bei nur 5 Å, die Entfaltung einer 20 AS langen α -Helix hätte jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit ein abweichendes Streumuster erzeugt. Ein weiteres Indiz, dass die J α -Helix bei Belichtung intakt zu bleiben scheint, liefert der Vergleich der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren von unbelichtetem und photoaktiviertem LOV-J α bzw. Ncap-LOV-J α (s. Abbildung 47 & Abbildung 49). Nach Belichtung wird die Signalüberlagerung im mittleren Bereich der Spektren zwar etwas größer, ist aber bei weitem nicht so stark ausgeprägt, wie für 20 unstrukturiert vorliegende Aminosäuren zu erwarten wäre. Die Daten der SV-, SAXS- und NMR-Experimente deuten also übereinstimmend darauf hin, dass die J α -Helix keine detektierbare lichtinduzierte Strukturveränderung erfährt, eine partielle Entfaltung, wie sie auch von *Möglich et al.* [75] und *Losi et al.* [67] in Betracht gezogen wurde, kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Aus der Kombination der experimentell ermittelten Residualen Dipolaren Kopplungen (RDC's) und der Kristallstruktur von LOV-J α (PDB-Eintrag 2PR5, [75]) konnten auch die möglichen mittleren Orientierungsvektoren zwischen LOV-Domäne und J α -Helix in unbelichtetem Ncap-LOV-J α berechnet werden (s. Abschnitt 4.5.4.3). Daraus ergaben sich 3 mögliche Modelle, in denen die J α -Helices zwar unterschiedlich orientiert, jedoch nicht mit der LOV-Domäne assoziiert sind (s. Abbildung 53). Die Daten der ^{15}N -Spinrelaxationsexperimente sind mit dieser Konfiguration konform und deuten ebenfalls darauf hin, dass die J α -Helices, abgesehen von ihrer sequentiellen Verbindung, nicht mit den LOV-Domänen und auch nicht miteinander assoziiert zu sein scheinen (s. Abbildung 51). Wie aus der in Abschnitt 4.5.4.4 dargestellten Korrelationsanalyse hervorgeht, kann dieses Resultat auch auf unbelichtetes YtvA übertragen werden. Im vollständigen Photorezeptor befinden sich die J α -Helices zwar in einer anderen chemischen Umgebung, als in Ncap-LOV-J α und können demzufolge auch völlig anders orientiert sein oder miteinander bzw. mit den STAS-Domänen in Interaktion stehen, es ist aber nahezu ausgeschlossen, dass sie mit den LOV-Domänen assoziiert sind. Darüber hinaus zeigte diese Analyse, dass in YtvA auch die STAS-Domänen praktisch nicht mit den LOV-Domänen assoziiert sein können.

Wie schon von *Möglich et al.* vorgeschlagen [75], könnten die $J\alpha$ -Helices wie starre Hebel wirken, die eine kleine, lichtinduzierte Reorientierung der LOV-Domänen in eine größere Auslenkung umwandeln, wodurch der Abstand oder eine putative Wechselwirkung zwischen den STAS-Domänen verändert werden könnte. Die beobachtete intermolekulare Wechselwirkung zwischen den isolierten STAS-Domänen könnte in YtvA durchaus relevant sein und dort durch die von den $J\alpha$ -Helices übermittelten Kräfte möglicherweise so modifiziert werden, dass infolgedessen auch die Interaktion zu einem potentiellen Zielprotein verändert würde. Auf Basis der hier nachgewiesenen STAS-STAS-Interaktion, des aus der SAXS-Streukurve von unbelichtetem YtvA berechneten „H-förmigen“ Hüllmodells [61] und der Ergebnisse diverser NMR-spektroskopischer Experimente konnten wir zeigen, dass die STAS-Domänen in unbelichtetem, dimerem YtvA tatsächlich miteinander assoziiert zu sein scheinen [145].

Über die Funktion, Konformation und intra- bzw. intermolekulare Organisation der Ncap-Sequenz sind bisher nur wenige Informationen verfügbar. In CD-spektroskopischen Untersuchungen fanden *Losi et al.*, dass Ncap vermutlich α -helikale Strukturanteile enthält, quantifizierten diese aber nicht genauer [76]. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Ncap-Strukturmodell (s. Abbildung 61) bestätigte sich diese Vermutung. Demnach bildet Ncap wahrscheinlich ein Helix-Turn-Helix-Motiv, es ist aber unklar, ob dieses Motiv so auch in Ncap-LOV- $J\alpha$ bzw. YtvA vorliegt. Die letzte und die folgenden Aussagen beziehen sich dabei auf die unbelichteten Proteine. Die dynamischen Eigenschaften dieses Sequenzelementes legen nahe, dass es sich nicht so unabhängig bewegen kann, wie die $J\alpha$ -Helices (s. Abschnitt 4.5.4.2 & Abbildung 51). Es wäre daher denkbar, dass Ncap entweder mit der LOV-Domäne oder seinem Gegenstück im benachbarten Monomer assoziiert sein könnte. Bezüglich des SAXS-Hüllmodells von Ncap-LOV- $J\alpha$, scheint eine Strukturvariante, in der Ncap dicht an den LOV-Domänen anliegt, am wahrscheinlichsten. Das artifizielle Strukturvorhersagemodell von Ncap-LOV- $J\alpha$, in welchem die Ncap-Sequenzen von den LOV-Domänen wegzeigen und dadurch nicht mehr vom SAXS-Modell eingeschlossen werden, veranschaulicht diese Einschätzung (s. Abbildung 62). Ein weiteres Indiz, das für eine Ncap-LOV-Interaktion spricht, ergibt sich aus der um ca. 24% verlangsamten Kinetik der Hell-Dunkel-Rückkonversion bei Abwesenheit von Ncap (s. Abschnitt 4.5.4.5). Da *Losi et al.* bei der Untersuchung der photochemischen Halbwertszeit verschiedener YtvA-LOV-Varianten jedoch ein gegensätzliches Ergebnis erhalten haben [70] und *Nakasone et al.* keine Unterschiede feststellen konnten [149], müsste dieser Effekt erst systematisch untersucht werden.

Wie aus der Korrelation der $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ chemischen Verschiebungen von YtvA und Ncap-LOV-J α hervorgeht (s. Abbildung 54), sind alle Ncap betreffenden Aussagen (ausgenommen proteindynamische Untersuchungen) zwischen YtvA und Ncap-LOV-J α übertragbar und gelten unabhängig davon, mit welchem der beiden Proteine die Untersuchungen durchgeführt wurden. Mit großer Wahrscheinlichkeit dürfte das auch auf die folgenden Ausführungen zutreffen, dass wurde allerdings nicht experimentell geprüft. Wie der Vergleich der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektren von uniform ^{15}N -markiertem Ncap-LOV-J α und LOV-J α zeigt (s. Abbildung 70), wirkt sich die Abwesenheit der Ncap-Sequenz erheblich auf die $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ chemischen Verschiebungen zahlreicher Amidgruppen der LOV-Domäne aus.

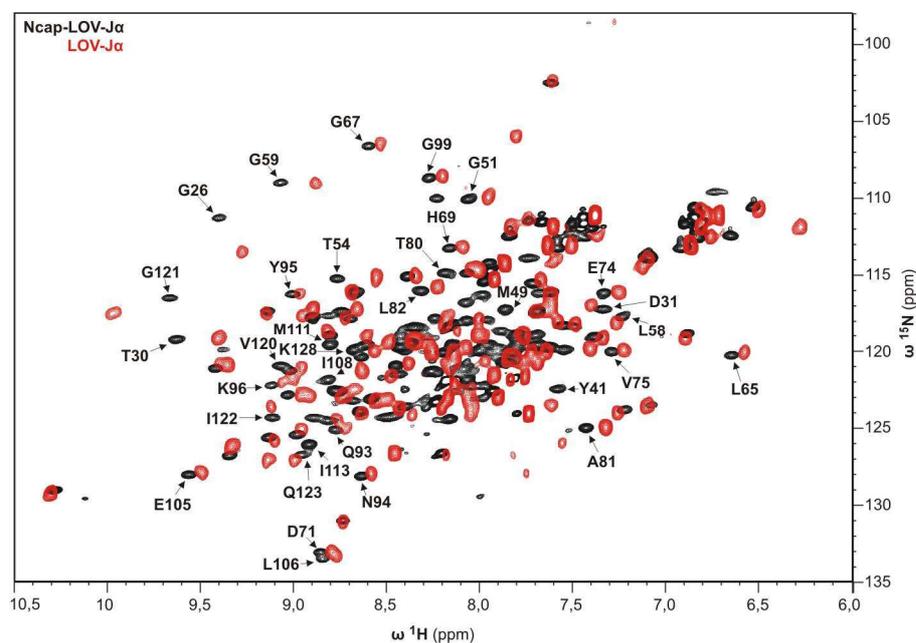


Abbildung 70: Einfluss von Ncap auf die LOV-Domäne (1)

Das $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationsspektrum von Ncap-LOV-J α ist schwarz, das von LOV-J α rot dargestellt. Für einige Kreuzsignale der Amidgruppen von Aminosäuren der LOV-Domäne, deren chemische Umgebung in Ncap-LOV-J α eindeutig von der Ncap-Sequenz beeinflusst wird, sind Aminosäuretyp und Sequenzposition angegeben. Die Spektren wurden mit einem 600 Mhz Spektrometer bei 27°C und gleicher Pufferzusammensetzung aufgenommen.

Das bedeutet im Umkehrschluss, dass Ncap die chemische Umgebung zahlreicher Aminosäuren innerhalb der LOV-Domäne beeinflusst. Über die Ursachen dieses Phänomens kann hier allerdings nur spekuliert werden. Ncap könnte z.B. mit der sequentiell nachfolgenden oder der benachbarten LOV-Domäne über einen größeren Bereich der Struktur assoziiert sein. Dafür spricht, dass sich die durch Anwesenheit von Ncap beeinflussten Reste zum einen über die gesamte LOV-Domäne verteilen und dass zum anderen überdurchschnittlich viele der betroffenen Reste im zentralen β -Faltblattmotiv lokalisiert sind (s. Abbildung 71).

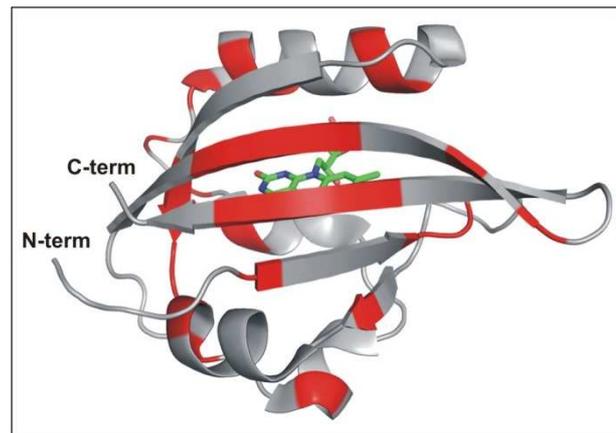


Abbildung 71: Einfluss von Ncap auf die LOV-Domäne (2)

Schematisierte Struktur der LOV-Domäne (AS 21-126) von YtvA, wie sie in der Kristallstruktur der monomeren Untereinheit A von YtvA-LOV-J α (PDB-Eintrag: 2PR5, [75]) vorliegt. Aminosäuren innerhalb der LOV-Domäne, deren chemische Umgebung signifikant von Ncap beeinflusst wird ($\Delta\omega^1\text{H} \geq 0,1$ ppm und/oder $\Delta\omega^{15}\text{N} \geq 1$ ppm) sind rot hervorgehoben. Die Abbildung wurde mit „Pymol“ erstellt.

Da die beiden β -Faltblattmotive im LOV-LOV-Dimer sehr fest miteinander assoziiert sind und eine direkte Interaktion zwischen diesen und Ncap sehr unwahrscheinlich ist, wäre deren „Modifikation“ mit der angenommenen, auf einen größeren Strukturbereich verteilten Ncap-LOV-Assoziation jedenfalls plausibel zu erklären.

Die Abwesenheit von Ncap verändert u.a. aber auch die chemische Umgebung von T³⁰, L⁶⁵, L⁸², N⁹⁴, L¹⁰⁶, I¹⁰⁸ und Q¹²³, und, wie *Möglich et al.* gezeigt haben, stehen diese Reste (zumindest in LOV-J α) über Wasserstoffbrücken (nur N⁹⁴ & Q¹²³) bzw. hydrophobe Wechselwirkungen in direkter Interaktion mit dem Chromophor [75]. Der für Ncap nachgewiesene Einfluss auf die Photochemie der LOV-Domäne (s. oben), könnte nach diesen Erkenntnissen also tatsächlich mit einer Veränderung der unmittelbaren Chromophorumgebung zusammenhängen.

Über die Funktion von Ncap können keine klaren Aussagen getroffen werden, denkbar wäre aber, dass es eine Rolle für die „korrekte“ Orientierung der monomeren Untereinheiten im YtvA-Dimer spielt, eine noch unbekannt Funktion bei der intermolekularen Signaltransduktion erfüllt oder überhaupt keine spezielle Funktion besitzt.

Welchen lichtinduzierten Veränderungen Ncap möglicherweise unterworfen ist, konnte in dieser Arbeit nicht im Detail aufgeklärt werden. Im Rahmen der Auflösungsgrenze der durchgeführten SAXS-Experimente, ließen sich keine strukturellen Veränderungen zwischen unbelichtetem und photoaktiviertem Ncap-LOV bzw. Ncap-LOV-J α feststellen (s. Abschnitt 4.5.5). Aus den SAXS-Experimenten mit YtvA konnten dazu ebenfalls keine Aussagen abgeleitet werden [61].

5.3 Prinzip der lichtgetriebenen molekularen Schaltfunktion von YtvA

Über das in YtvA verwirklichte molekulare „Schaltprinzip“ wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (s. Abschnitt 1.5.2). Während *Möglich et al.* einen Mechanismus vorgeschlagen haben, in dem YtvA, unabhängig vom Belichtungszustand, ein Homodimer bildet, dessen monomere Untereinheiten eine lichtinduzierte Reorientierung durchlaufen [56,75,163], favorisierten andere Forschungsgruppen ein Modell, dass auf monomerem YtvA und einer lichtabhängig veränderten Wechselwirkung zwischen dessen LOV- und STAS-Domäne sowie zwischen YtvA und GTP basiert [66,67,69,74,76,147,148].

Wie wir gezeigt haben, kommt ein auf monomerem YtvA basierendes Modell nicht in Betracht [61,145] und eine YtvA-GTP-Interaktion ist ebenfalls auszuschließen (s. Abschnitt 4.4) [155]. Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits diskutiert wurde, konnten wir darüber hinaus auch die von *Buttani et al.* [76] vermutete Assoziation zwischen LOV- und STAS-Domäne ausschließen und in den durchgeführten Experimenten auch keine Hinweise dafür finden, dass sich die $J\alpha$ -Helix lichtinduziert entfalten würde oder mit der LOV-Domäne assoziiert wäre. Ein intramolekularer Signaltransduktionsmechanismus, wie er in Phototropinen realisiert ist (s. Abschnitt 1.3.1), spielt für die lichtabhängige Aktivierung der STAS-Domäne in YtvA also keine Rolle. Da in den durchgeführten SAXS- und AYZ-Experimente (s. Abschnitt 4.5.5 & [61]) keine lichtabhängige Veränderung des Oligomerisierungszustandes oder eine signifikante Vergrößerung des hydrodynamischen Radius der LOV- bzw. YtvA-Dimere zu beobachten war, bildet photoaktiviertes YtvA mit großer Wahrscheinlichkeit auch kein schnell austauschendes, in seinem Molekülradius fluktuierendes Dimer. Diese Art Aktivierungsmechanismus, wie er für das LOV-Protein Vivid aus *Neurospora crassa* beschrieben wurde [11], ist demnach auch kein in YtvA verwirklichtes Prinzip.

Die im Rahmen dieser Arbeit und des gemeinsamen Forschungsprojektes gewonnenen Erkenntnisse deuten vielmehr darauf, dass in YtvA ein weiteres Prinzip der intramolekularen Signaltransduktion zwischen einer LOV- und einer Effektor-domäne realisiert ist. Analog zu Phototropinen, stellt die $J\alpha$ -Helix auch in YtvA das zentrale Element der Informationsweiterleitung von der LOV- auf die Effektor-domäne, bzw. in diesem Fall die STAS-Domäne, dar. Wie bereits oben und im letzten Abschnitt angesprochen, ist deren Funktionsprinzip hier jedoch ein grundlegend anderes. Nach unseren Erkenntnissen könnten die $J\alpha$ -Helices in YtvA, bezogen auf ihre Längsachse, wie starre Hebel wirken, die eine relativ kleine lichtinduzierte Reorientierung oder Rotation zwischen den LOV-Domänen in eine größere oder spezifisch ausgerichtete Bewegung umformen.

Davon ausgehend, dass die STAS-Domänen im unbelichteten Dimer miteinander assoziiert sind, würde das dann eine Veränderung dieser Interaktion bewirken. Vorstellbar wäre, dass dadurch der Abstand zwischen den STAS-Domänen wächst und Raum für die Bindung eines potentiellen Interaktionspartners entsteht oder dass sich die STAS-Domänen ebenfalls umorientieren und eine vorher verdeckte Interaktionsschnittstelle präsentieren oder dass sich die Dynamik der STAS-STAS-Wechselwirkung ändert und damit einhergehend die Wechselwirkung zu einem unbekanntem Zielprotein beeinflusst wird.

Wie von *Möglich et al.* vorgeschlagen, könnten die $J\alpha$ -Helices durchaus auch in einer „Coiled-Coil-Konformation“ vorliegen [56,75,163]. Das Funktionsprinzip, bezogen auf die Übertragung einer gerichteten Bewegung, bliebe dabei aber im wesentlichen gleich.

In jedem Fall ist der Aktivierungsmechanismus von YtvA ein weiteres Beispiel dafür, dass die LOV-Domäne von der Natur in vielfältiger Weise zur Steuerung einer Vielzahl verschiedener Effektor-domänen eingesetzt wird.

6 Zusammenfassung

Bereits kurz nach der Entdeckung der Phototropine, einer Klasse von blaulicht-sensitiven Photorezeptoren, welche maßgeblich den Phototropismus von Pflanzen steuern, wurde in dem Bodenbakterium *Bacillus subtilis* ein Protein mit einer sequenzhomologen photosensorischen Domäne identifiziert. Wie sich später herausstellte, handelte es sich bei dem nach seinem kodierenden Gen YtvA benannten Protein tatsächlich um einen blaulicht-sensitiven Photorezeptor, der viele Merkmale pflanzlicher Phototropine aufweist. Bei beiden Rezeptortypen führt das von einer N-terminalen LOV-Domäne absorbierte Licht ($\lambda_{\max} = 450 \text{ nm}$) zu einer über die sogenannte $J\alpha$ -Helix vermittelten Aktivierung einer C-terminalen Effektordomäne. YtvA wurde deshalb auch als das bakterielle Pendant der pflanzlichen Phototropine betrachtet. Unklar war jedoch, wie die intramolekulare Signaltransduktion von der YtvA-LOV-Domäne über die $J\alpha$ -Helix auf die YtvA-STAS-Domäne im Detail realisiert ist. Eine lichtinduzierte Entfaltung der $J\alpha$ -Helix, das molekulare Schaltprinzip der Phototropine, konnte für YtvA bisher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden und, im Gegensatz zu Phototropinen, schien das von YtvA an die Zelle vermittelte Signal auf einer lichtabhängig veränderbaren Interaktion zwischen YtvA und GTP zu basieren. Die GTP-Bindestelle wurde zwar in der YtvA-STAS-Domäne vermutet, konnte bisher aber nicht eindeutig identifiziert werden. Unklar war darüber hinaus auch, in welchem Oligomerisierungszustand (Monomer/Dimer) YtvA vorliegt und wie die Domänen (LOV & STAS) und Sequenzelemente (Ncap & $J\alpha$ -Helix) innerhalb des Proteins organisiert bzw. miteinander assoziiert sind.

Die Beantwortung dieser Fragen war das gemeinsame Ziel zweier Forschungsarbeiten. Während sich eine Forschungsarbeit vor allem mit der Struktur bzw. den lichtinduzierten Strukturänderungen des Volllänge Proteins beschäftigte und auch die möglichen Interaktionspartner von YtvA untersuchte, befasste sich diese Arbeit vorrangig mit der Untersuchung von Struktur-Funktions-Beziehungen N- und C-terminal verschiedener terminierter Versionen der isolierten Sensor- und Effektordomäne.

Primäres Ziel war es, Informationen über die Struktur, strukturdynamische Eigenschaften, intramolekulare Interaktionen zwischen einzelnen Sequenzelementen und die Wechselwirkung von GTP mit YtvA bzw. der isolierten STAS-Domäne zu gewinnen und so zur Aufklärung des in YtvA realisierten molekularen Schaltprinzips beizutragen. Die wichtigsten angewendeten Methoden waren die mehrdimensionale, heteronukleare Lösungs-NMR-Spektroskopie, die Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS), die Analytische Ultrazentrifugation (AUZ), die CD-Spektroskopie und die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Da die Aufklärung des intramolekularen Signaltransduktionsmechanismus nur durch den Vergleich struktureller bzw. strukturdynamischer Eigenschaften der unbelichteten und der photoaktivierten Form möglich ist, wurden in dieser Arbeit darüber

hinaus spezielle Belichtungssysteme entwickelt, mit denen die LOV-Domäne während NMR-, SAXS- und AUZ-Experimenten im photostationären Zustand gehalten werden konnte. Dadurch konnte eindeutig belegt werden, dass YtvA und auch die hier untersuchten Varianten der isolierten LOV-Domäne unabhängig vom Belichtungszustand fest assoziierte Homodimere bilden ($K_D < 200$ nm) und ein auf monomerem YtvA basierender Signaltransduktionsmechanismus ausgeschlossen ist. Zusätzlich konnte dadurch auch gezeigt werden, dass weder YtvA noch dessen isolierte LOV-Domäne grössere lichtinduzierte Strukturveränderungen erfahren. Ein Signaltransduktionsmechanismus, wie er für Phototropine beschrieben wurde, ist für YtvA daher zweifelsfrei auszuschließen. Durch die Aufnahme TROSY-basierter 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ - und 3D $^1\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -Korrelationsspektren (HNCA, HNCACB, HN(CO)CACB, HN(CA)CO und HNCO) der uniform $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markierten LOV-Variante Ncap-LOV-J α , konnten 127 von 140 möglichen $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -Korrelationen des Proteins (unbelichteter Zustand) sequentiell zugeordnet werden. Basierend auf dieser Zuordnung konnte mit weiteren NMR-Experimenten (Messung residueller dipolarer $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ -Kopplungen und ^{15}N -Spinrelaxationsparameter) gezeigt werden, dass die J α -Helix nicht mit der LOV-Domäne assoziiert ist und sich relativ unabhängig von dieser bewegen kann, wobei Letzteres jedoch nicht für den vollständigen Photorezeptor gilt. Wie sich in Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimenten herausstellte, bildet auch die isolierte STAS-Domäne Homodimere ($K_D \sim 400\text{-}500$ μM), sodass davon auszugehen ist, dass diese auch in YtvA miteinander wechselwirken und deshalb die Dynamik der J α -Helix im vollständigen Photorezeptor wesentlich geringer ist, als in Ncap-LOV-J α . Durch eine sequenzpositionsspezifische Korrelationsanalyse der $^1\text{H}_\text{N}$ bzw. ^{15}N chemischen Verschiebungen von Ncap-LOV-J α und YtvA konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die STAS-Domänen in YtvA nicht mit den LOV-Domänen assoziiert sein können. Die Funktion oder Orientierung der Ncap-Sequenz konnte nicht klar definiert werden, wie jedoch ein Vergleich der $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Ncap-LOV-J α und LOV-J α ergeben hat, scheint dieses Sequenzelement sehr wahrscheinlich mit der LOV-Domäne assoziiert zu sein. Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte auch zweifelsfrei gezeigt werden, dass weder YtvA (unabhängig vom Belichtungszustand) noch die isolierte STAS-Domäne mit GTP interagiert.

In dieser Arbeit wurden, soweit bekannt, auch erstmals Dissoziationskonstanten für die Wechselwirkung zwischen der LOV-Domäne und den natürlichen Flavinen Riboflavin (RF), Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenin-Dinukleotid (FAD) bestimmt. Aufgrund der starken Flavin-LOV-Interaktion wurde deflaviniertes Ncap-LOV auch erfolgreich als molekulare Sonde für die Analyse dieser Flavine in Zelllysaten von *Bacillus subtilis* eingesetzt und gezeigt, dass die YtvA-LOV-Domäne in vivo mit hoher Wahrscheinlichkeit zu 30% mit FMN und 70% mit RF beladen sein könnte.

7 Summary

Shortly after the discovery of a class of blue-light sensitive photoreceptors, the Phototropins, which control predominantly the plant phototropism, a protein with a sequence homologous photosensory domain has been also identified in the soil bacterium *Bacillus subtilis*. This protein has been denoted YtvA, according to its coding sequence and it turned out that it indeed is a photoreceptor, sharing many of the characteristics of phototropins. In both receptor types the absorption of blue-light ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) by the N-terminal LOV domain leads to the activation of a C-terminal effector domain in which this intramolecular signal transduction is mediated by the so called $J\alpha$ -Helix. Therefore YtvA is considered to be the bacterial counterpart of plant phototropins. However, it was not clear how the light signal is transmitted from the LOV domain via the $J\alpha$ -Helix to the STAS domain. A light-induced unfolding of the $J\alpha$ -Helix, the molecular switching principle of plant phototropins, has yet been neither confirmed nor excluded for YtvA. Furthermore, in contrast to phototropins, a light-modulated YtvA-GTP-interaction seemed to play a crucial role in the intermolecular signal transduction process. The binding site has been suspected in the YtvA-STAS domain, but could not yet be clearly identified. It was also unclear which oligomerization state (monomer/dimer) YtvA adopts and how the domains (LOV & STAS) and sequence elements (Ncap & $J\alpha$ -helix) are associated with each other and organized within the protein, respectively. Answering these questions was the common goal of two research studies. While the first research dealt mainly with the structure, the light-induced structural changes and putative interaction partners of the full-length protein, this work is mainly focused on the investigation of structure-function relationships of N- and C-terminally different truncated variants of the isolated sensor and effector domain. The primary aim was to gain information about the structure, structural dynamic properties, intramolecular interactions between the individual sequence elements and the interaction of GTP with YtvA and its isolated STAS domain and thus, to contribute to the elucidation of the molecular switching principle realized in YtvA. The predominantly used methods were multidimensional heteronuclear Solution-NMR-Spectroscopy, Small Angle X-Ray Scattering (SAXS), Analytical Ultracentrifugation (AUC), CD-Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry (ITC). Since the elucidation of the intramolecular signal transduction mechanism is possible only through the comparison of structural and structural dynamic properties of the dark-state and the photo-activated protein. For this reason customized illumination systems have also been developed in this research work. These special light sources maintained the LOV domain in the photostationary state during NMR, SAXS and AUC experiments. In this way it could be clearly shown that YtvA and its isolated LOV domain form tight binding homodimers ($K_D < 200 \text{ nM}$) and that the dimerization is not affected by the presence of blue light.

Therefore, a signal transduction mechanism based on monomeric YtvA could be clearly excluded. By means of the performed AUC and SAXS experiments no large light-induced structural changes were observed for YtvA and its isolated LOV domain, respectively. An intramolecular signal transduction mechanism as it occurs in phototropins could therefore also be excluded. 127 out of 140 possible $^1\text{H}^{15}\text{N}$ spin-systems of the uniformly $^2\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -labeled LOV variant Ncap-LOV-J α (dark state) could be sequentially assigned using TROSY-based 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ - and 3D $^1\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -correlation spectra (HNCA, HNCACB, HN(CO)CACB, HN(CA)CO and HNCO). Based upon this assignment, it could be shown by further NMR experiments (measurement of residual dipolar $^1\text{H}_\text{N}^{15}\text{N}$ spin-couplings and ^{15}N spin-relaxation parameters) that the J α -helix is not associated with the LOV domain and can move relatively independently of it. However, the latter does not apply to the whole photoreceptor. As it turned out in sedimentation velocity experiments, the isolated STAS domain forms also homodimers ($K_\text{D} \sim 400\text{-}500 \mu\text{M}$), thus it can be assumed that these interact in YtvA with each other too, leading to a much lower dynamic of the J α -Helix in full-length YtvA compared to Ncap-LOV-J α . By a sequence-position-specific correlation analysis of the $^1\text{H}_\text{N}$ and ^{15}N chemical shifts of Ncap-LOV-J α and YtvA was furthermore shown that the STAS domains in dimeric YtvA can not be associated with the LOV domains. The function or orientation of the Ncap sequence could not be clearly defined. As it is shown by a comparison of $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC spectra of Ncap-LOV-J α and LOV-J α , this sequence element seems very likely to be associated with the LOV domain. With the help of experiments performed in this work it could be shown beyond doubt that neither YtvA (regardless of the presence of blue light) nor the isolated STAS domain interacts with GTP. As far as known, in this research study dissociation constants for the interaction between the LOV domain and the natural flavins riboflavin (RF), flavinmononucleotide (FMN) and flavinadenine-dinucleotide (FAD) have been determined for the first time. Due to the strong flavin-LOV-interaction flavin-free Ncap-LOV was also used successfully as a molecular probe for the analysis of these flavins in *Bacillus subtilis* cell lysates. This could be shown that the YtvA-LOV domain most likely contains 30% FMN and 70% RF in vivo.

8 Literatur

1. Lin LH, Wang PL, Rumble D, Lippmann-Pipke J, Boice E, Pratt LM, Lollar BS, Brodie EL, Hazen TC, Andersen GL, DeSantis TZ, Moser DP, Kershaw D, Onstott TC (2006) Long-term sustainability of a high-energy, low-diversity crustal biome. *Science* 314: 479-482.
2. Chory J (2010) Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant Journal* 61: 982-991.
3. Van der Horst MA, Hellingwerf KJ (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": A review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Accounts of Chemical Research* 37: 13-20.
4. Briggs WR, Olney MA (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. Five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiology* 125: 85-88.
5. Tu SL, Lagarias JC, Huq E, Quail PH, Batschauer A, et al. (2005) Handbook of Photosensory Receptors. In: Briggs WR, Spudich JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
6. Gartner, W., Braslavsky, S. E., Nagy, F., Kevei, E., Harter, K., Schaefer, E., Salomon, M., Santiago-Ong, M., Lin, C., Wada, M., and Devlin, P. F. (2005) *Comprehensive Series in Photochemistry & Photobiology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
7. Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 7: 204-210.
8. Moglich A, Yang XJ, Ayers RA, Moffat K (2010) Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61 61: 21-47.
9. Finn RD, Mistry J, Tate J, Coghill P, Heger A, Pollington JE, Gavin OL, Gunasekaran P, Ceric G, Forslund K, Holm L, Sonnhammer ELL, Eddy SR, Bateman A (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 38: D211-D222.
10. Bairoch A, Bougueleret L, Altairac S, Amendolia V, Auchincloss A, et al. (2008) The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Research* 36: D190-D195.
11. Zoltowski BD, Crane BR (2008) Light activation of the LOV protein Vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry* 47: 7012-7019.
12. Harper SM, Neil LC, Gardner KH (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301: 1541-1544.
13. Lamparter T, Mittmann F, Gartner W, Borner T, Hartmann E, Hughes J (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 11792-11797.
14. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
15. Christie JM, Reymond P, Powell GK, Bernasconi P, Raibekas AA, Liscum E, Briggs WR (1998) *Arabidopsis* NPH1: A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* 282: 1698-1701.
16. Christie JM, Briggs WR (2001) Blue light sensing in higher plants. *Journal of Biological Chemistry* 276: 11457-11460.

17. Folta KM, Spalding EP (2001) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant Journal* 26: 471-478.
18. Kagawa T, Wada M (2002) Blue light-induced chloroplast relocation. *Plant and Cell Physiology* 43: 367-371.
19. Kagawa T (2003) The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *Journal of Plant Research* 116: 77-82.
20. Liscum E (2002) Phototropism: mechanisms and outcome. In: Somerville CR, Meyerowitz EM, editors. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.
21. Wada M, Kagawa T, Sato Y (2003) Chloroplast movement. *Annual Review of Plant Biology* 54: 455-468.
22. Taylor BL, Zhulin IB (1999) PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 479-+.
23. Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR (1997) Arabidopsis NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120-2123.
24. Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR (2002) Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant Journal* 32: 205-219.
25. Christie JM, Briggs WR (2005) LOV Domain Structure and Function. In: Briggs WR, Spudich JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
26. Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M (2001) Arabidopsis NPL1: A phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* 291: 2138-2141.
27. Christie JM, Briggs WR (2005) Phototropin Recovery. In: Briggs WR, Spudich JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 292-293.
28. Christie JM, Briggs WR (2005) Are Two LOVs Better than One? In: Briggs WR, Spudich JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
29. Briggs WR, Christie JM, Salomon M (2001) Phototropins: A new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxidants & Redox Signaling* 3: 775-788.
30. Salomon M, Lempert U, Rudiger W (2004) Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *Febs Letters* 572: 8-10.
31. Nakasone Y, Eitoku T, Matsuoka D, Tokutomi S, Terazima M (2007) Dynamics of conformational changes of Arabidopsis phototropin 1 LOV2 with the linker domain. *Journal of Molecular Biology* 367: 432-442.
32. Matsuoka D, Tokutomi S (2005) Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 13337-13342.
33. Crosson S, Moffat K (2002) Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14: 1067-1075.
34. Crosson S (2005) LOV-Domain Structure, Dynamics, and Diversity. In: Briggs WR, Spudich JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 323-328.

35. Iwata T, Nozaki D, Tokutomi S, Kagawa T, Wada M, Kandori H (2003) Light-induced structural changes in the LOV2 domain of *Adiantum* phytochrome3 studied by low-temperature FTIR and UV-visible spectroscopy. *Biochemistry* 42: 8183-8191.
36. Swartz TE, Wenzel PJ, Corchnoy SB, Christie JM, Briggs WR, Bogomolni RA (2002) Light-induced structural changes in a domain of phototropin monitored by FTIR spectroscopy. *Biophysical Journal* 82: 517A.
37. Swartz TE, Wenzel PJ, Corchnoy SB, Briggs WR, Bogomolni RA (2002) Vibration spectroscopy reveals light-induced chromophore and protein structural changes in the LOV2 domain of the plant blue-light receptor phototropin 1. *Biochemistry* 41: 7183-7189.
38. Corchnoy SB, Swartz TE, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA (2003) Intramolecular proton transfers and structural changes during the photocycle of the LOV2 domain of phototropin 1. *Journal of Biological Chemistry* 278: 724-731.
39. Christie JM, Briggs WR (2005) Blue Light Sensing and Signaling by the Phototropins. In: Briggs WR, Spudis JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 291-293.
40. Chen EF, Swartz TE, Bogomolni RA, Kliger DS (2007) A LOV story: The signaling state of the Phot1 LOV2 photocycle involves chromophore-triggered protein structure relaxation, as probed by far-UV time-resolved optical rotatory dispersion spectroscopy. *Biochemistry* 46: 4619-4624.
41. Halavaty AS, Moffat K (2007) N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from *Avena sativa*. *Biochemistry* 46: 14001-14009.
42. Harper SM, Christie JM, Gardner KH (2004) Disruption of the LOV-J alpha helix interaction activates phototropin kinase activity. *Biochemistry* 43: 16184-16192.
43. Jones MA, Feeney KA, Kelly SM, Christie JM (2007) Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission. *Journal of Biological Chemistry* 282: 6405-6414.
44. Yamamoto A, Iwata T, Sato Y, Matsuoka D, Tokutomi S, Kandori H (2009) Light Signal Transduction Pathway from Flavin Chromophore to the J alpha Helix of *Arabidopsis* Phototropin1. *Biophysical Journal* 96: 2771-2778.
45. Koyama T, Iwata T, Yamamoto A, Sato Y, Matsuoka D, Tokutomi S, Kandori H (2009) Different Role of the J alpha Helix in the Light-Induced Activation of the LOV2 Domains in Various Phototropins. *Biochemistry* 48: 7621-7628.
46. Pfeifer A, Mathes T, Lu YH, Hegemann P, Kottke T (2010) Blue Light Induces Global and Localized Conformational Changes in the Kinase Domain of Full-Length Phototropin. *Biochemistry* 49: 1024-1032.
47. Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003) The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42: 2-10.
48. Losi A, Polverini E, Quest B, Gartner W (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophysical Journal* 82: 2627-2634.
49. Krauss U, Minh BQ, Losi A, Gartner W, Eggert T, von Haeseler A, Jaeger KE (2009) Distribution and Phylogeny of Light-Oxygen-Voltage-Blue-Light-Signaling Proteins in the Three Kingdoms of Life. *Journal of Bacteriology* 191: 7234-7242.
50. Imaizumi T, Tran HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 426: 302-306.

51. Cheng P, He QY, Yang YH, Wang LX, Liu Y (2003) Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5938-5943.
52. Briggs WR (2007) The LOV domain: a chromophore module servicing multiple photoreceptors. *Journal of Biomedical Science* 14: 499-504.
53. Moglich A, Moffat K (2010) Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9: 1286-1300.
54. Salomon M, Eisenreich W, Durr H, Schleicher E, Knieb E, Massey V, Rudiger W, Muller F, Bacher A, Richter G (2001) An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 12357-12361.
55. Crosson S (2005) LOV Domain Architecture and Chromophore Environment. In: Briggs WR, Spudich JL, editors. *Handbook of Photosensory Receptors*. WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
56. Moglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. *Structure* 17: 1282-1294.
57. Freddolino PL, Dittrich M, Schulten K (2006) Dynamic switching mechanisms in LOV1 and LOV2 domains of plant phototropins. *Biophysical Journal* 91: 3630-3639.
58. Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* 39: 9401-9410.
59. Kennis, J. T. M. and Alexandre, M. T. A. (2006) *Flavins: Photochemistry and Photobiology*. Royal Society for Chemistry Publishing, Cambridge, UK. 319 p.
60. Alexandre MTA, Domratcheva T, Bonetti C, van Wilderen LJGW, van Grondelle R, Groot ML, Hellingwerf KJ, Kennis JTM (2009) Primary Reactions of the LOV2 Domain of Phototropin Studied with Ultrafast Mid-infrared Spectroscopy and Quantum Chemistry. *Biophysical Journal* 97: 227-237.
61. Jurk M, Dorn M, Kikhney A, Svergun D, Gartner W, Schmieder P (2010) The Switch that Does Not Flip: The Blue-Light Receptor YtvA from *Bacillus subtilis* Adopts an Elongated Dimer Conformation Independent of the Activation State as Revealed by a Combined AUC and SAXS Study. *Journal of Molecular Biology* 403: 78-87.
62. Nash AI, Ko WH, Harper SM, Gardner KH (2008) A Conserved Glutamine Plays a Central Role in LOV Domain Signal Transmission and Its Duration. *Biochemistry* 47: 13842-13849.
63. Raffelberg S, Mansurova M, Gartner W, Losi A (2011) Modulation of the Photocycle of a LOV Domain Photoreceptor by the Hydrogen-Bonding Network. *Journal of the American Chemical Society* 133: 5346-5356.
64. Akbar S, Gaidenko TA, Kang CM, O'Reilly M, Devine KM, Price CW (2001) New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma(B) of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 183: 1329-1338.
65. Aravind L, Koonin EV (2000) The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol* 10: R53-R55.
66. Losi A, Ternelli E, Gärtner W (2004) Tryptophan fluorescence in the *Bacillus subtilis* phototropin-related protein YtvA as a marker of interdomain interaction. *Photochem Photobiol* 80: 150-153.
67. Losi A, Ghiraldelli E, Jansen S, Gärtner W (2005) Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA. *Photochem Photobiol* 81: 1145-1152.

68. Losi A (2004) The bacterial counterparts of plant phototropins. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3: 566-574.
69. Buttani V, Losi A, Polverini E, Gärtner W (2006) Blue news: NTP binding properties of the blue-light sensitive YtvA protein from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* 580: 3818-3822.
70. Losi A, Quest B, Gärtner W (2003) Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2: 759-766.
71. Avila-Pérez M, Hellingwerf KJ, Kort R (2006) Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol* 188: 6411-6414.
72. Gaidenko TA, Kim TJ, Weigel AL, Brody MS, Price CW (2006) The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188: 6387-6395.
73. Suzuki N, Takaya N, Hoshino T, Nakamura A (2007) Enhancement of a sigma(B)-dependent stress response in *Bacillus subtilis* by light via YtvA photoreceptor. *J Gen Appl Microbiol* 53: 81-88.
74. Buttani V, Gärtner W, Losi A (2007) NTP-binding properties of the blue-light receptor YtvA and effects of the E105L mutation. *Eur Biophys J* 36: 831-839.
75. Möglich A, Moffat K (2007) Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J Mol Biol* 373: 112-126.
76. Buttani V, Losi A, Eggert T, Krauss U, Jaeger KE, Cao Z, Gärtner W (2007) Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV-LOV dimerization and interdomain interactions. *Photochem Photobiol Sci* 6: 41-49.
77. Kjeldgaard M, Nyborg J, Clark BFC (1996) Protein motifs .10. The GTP binding motif: Variations on a theme. *Faseb Journal* 10: 1347-1368.
78. Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J et al. (2010) Amber 11, version University of California, San Francisco.
79. Vranken WF, Boucher W, Stevens TJ, Fogh RH, Pajon A, Llinas P, Ulrich EL, Markley JL, Ionides J, Laue ED (2005) The CCPN data model for NMR spectroscopy: Development of a software pipeline. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 59: 687-696.
80. Shen Y, Lange O, Delaglio F, Rossi P, Aramini JM, Liu GH, Eletsky A, Wu YB, Singarapu KK, Lemak A, Ignatchenko A, Arrowsmith CH, Szyperski T, Montelione GT, Baker D, Bax A (2008) Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4685-4690.
81. Shen Y, Vernon R, Baker D, Bax A (2009) De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments. *Journal of Biomolecular Nmr* 43: 63-78.
82. Palmer AG (1998) Program CurveFit: General fitting program for batch use., version Department of Biochemistry and Molecular Biophysics at Columbia University.
83. Volkov VV, Svergun DI (2003) Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* 36: 860-864.
84. Franke D, Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography* 42: 342-346.
85. Svergun DI (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal* 76: 2879-2886.
86. Whitmore L, Wallace BA (2008) Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *Biopolymers* 89: 392-400.

87. Whitmore L, Wallace BA (2004) DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* 32: W668-W673.
88. Kalendar R, Schulman AH (2009) FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics* 3: 1-14.
89. Svergun DI, Petoukhov MV, Koch MHJ (2001) Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophysical Journal* 80: 2946-2953.
90. Svergun DI (1992) Determination of the Regularization Parameter in Indirect-Transform Methods Using Perceptual Criteria. *Journal of Applied Crystallography* 25: 495-503.
91. Gautier R, Douguet D, Antonny B, Drin G (2008) HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* 24: 2101-2102.
92. Dosset P, Hus JC, Marion D, Blackledge M (2001) A novel interactive tool for rigid-body modeling of multi-domain macromolecules using residual dipolar couplings. *Journal of Biomolecular Nmr* 20: 223-231.
93. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A (1995) Nmrpipe - A Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. *Journal of Biomolecular Nmr* 6: 277-293.
94. Bahrami A, Assadi AH, Markley JL, Eghbalnia HR (2009) Probabilistic Interaction Network of Evidence Algorithm and its Application to Complete Labeling of Peak Lists from Protein NMR Spectroscopy. *Plos Computational Biology* 5.
95. Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, Svergun DI (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography* 36: 1277-1282.
96. Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31: 3784-3788.
97. Delano WL, Lam JW (2005) PyMOL: A communications tool for computational models. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 230: U1371-U1372.
98. Delano WL (2009) PyMOL molecular viewer: Updates and refinements. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 238.
99. Schuck P (2000) Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical Journal* 78: 1606-1619.
100. Schuck P, Perugini MA, Gonzales NR, Howlett GJ, Schubert D (2002) Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: Strategies and application to model systems. *Biophysical Journal* 82: 1096-1111.
101. Hayes D, Laue T, Philo J (1995) Program Sednterp: Sedimentation Interpretation Program., version Alliance Protein Laboratories, Thousand Oaks, CA, USA.
102. Balbo A, Minor KH, Velikovskiy CA, Mariuzza RA, Peterson CB, Schuck P (2005) Studying multiprotein complexes by multisignal sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 81-86.
103. Houtman JCD, Brown PH, Bowden B, Yamaguchi H, Appella E, Samelson LE, Schuck P (2007) Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: Application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Protein Science* 16: 30-42.
104. Schuck P (2003) On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Analytical Biochemistry* 320: 104-124.

105. Vistica J, Dam J, Balbo A, Yikilmaz E, Mariuzza RA, Rouault TA, Schuck P (2004) Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. *Analytical Biochemistry* 326: 234-256.
106. Schuck P (2005) Diffusion-deconvoluted sedimentation coefficient distributions for the analysis of interacting and non-interacting protein mixtures. In: Scott DJ, Harding SE, Rowe AJ, editors. *Modern Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
107. Dam J, Velikovskiy CA, Mariuzza RA, Urbanke C, Schuck P (2005) Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Lamm equation modeling and sedimentation coefficient distributions $c(s)$. *Biophysical Journal* 89: 619-634.
108. Dam J, Schuck P (2005) Sedimentation velocity analysis of heterogeneous protein-protein interactions: Sedimentation coefficient distributions $c(s)$ and asymptotic boundary profiles from Gilbert-Jenkins theory. *Biophysical Journal* 89: 651-666.
109. Kozin MB, Svergun DI (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *Journal of Applied Crystallography* 34: 33-41.
110. Shen Y, Delaglio F, Cornilescu G, Bax A (2009) TALOS plus : a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *Journal of Biomolecular Nmr* 44: 213-223.
111. Dosset P, Hus JC, Blackledge M, Marion D (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *Journal of Biomolecular Nmr* 16: 23-28.
112. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25: 1605-1612.
113. Johnson ML, Correia JJ, Yphantis DA, Halvorson HR (1981) Analysis of Data from the Analytical Ultra-Centrifuge by Non-Linear Least-Squares Techniques. *Biophysical Journal* 36: 575-588.
114. Sambrook, J, Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
115. Aslanidis C, Dejong PJ (1990) Ligation-Independent Cloning of Pcr Products (Lic-Pcr). *Nucleic Acids Research* 18: 6069-6074.
116. Fiedler S, Knocke C, Vogt J, Oschkinat H, Diehl A (2007) HCDF as a Protein Labeling Methodology. *GEN* 27.
117. Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227: 680-&.
118. Schagger H, Aquila H, Vonjagow G (1988) Coomassie Blue Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for Direct Visualization of Polypeptides During Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 173: 201-205.
119. Dougherty WG, Carrington JC, Cary SM, Parks TD (1988) Biochemical and Mutational Analysis of A Plant-Virus Polyprotein Cleavage Site. *Embo Journal* 7: 1281-1287.
120. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
121. Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry* 287: 252-260.

122. Freyer MW, Lewis EA (2008) Isothermal titration calorimetry: Experimental design, data analysis, and probing Macromolecule/Ligand binding and kinetic interactions. *Biophysical Tools for Biologists: Vol 1 in Vitro Techniques* 84: 79-113.
123. Roessle MW, Klaering R, Ristau U, Robrahn B, Jahn D, Gehrmann T, Konarev P, Round A, Fiedler S, Hermes C, Svergun D (2007) Upgrade of the small-angle X-ray scattering beamline X33 at the European Molecular Biology Laboratory, Hamburg. *Journal of Applied Crystallography* 40: S190-S194.
124. Guinier A (1939) La diffraction des rayons X aux très faibles angles: applications à l'étude des phénomènes ultra-microscopiques. *Ann Phys* 12: 161-237.
125. Piotto M, Saudek V, Sklenar V (1992) Gradient-Tailored Excitation for Single-Quantum Nmr-Spectroscopy of Aqueous-Solutions. *Journal of Biomolecular Nmr* 2: 661-665.
126. Bodenhausen G, Ruben DJ (1980) Natural Abundance N-15 Nmr by Enhanced Heteronuclear Spectroscopy. *Chemical Physics Letters* 69: 185-189.
127. Pervushin K, Riek R, Wider G, Wuthrich K (1997) Attenuated T-2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12366-12371.
128. Zhu G, Yao XJ (2008) TROSY-based NMR experiments for NMR studies of large biomolecules. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 52: 49-68.
129. Ikura M, Kay LE, Bax A (1990) A Novel-Approach for Sequential Assignment of H-1, C-13, and N-15 Spectra of Larger Proteins - Heteronuclear Triple-Resonance 3-Dimensional Nmr-Spectroscopy - Application to Calmodulin. *Biochemistry* 29: 4659-4667.
130. Grzesiek S, Bax A (1992) Improved 3D Triple-Resonance Nmr Techniques Applied to A 31-Kda Protein. *Journal of Magnetic Resonance* 96: 432-440.
131. Yamazaki T, Lee W, Arrowsmith CH, Muhandiram DR, Kay LE (1994) A Suite of Triple-Resonance Nmr Experiments for the Backbone Assignment of N-15, C-13, H-2 Labeled Proteins with High-Sensitivity. *Journal of the American Chemical Society* 116: 11655-11666.
132. Morin S (2011) A practical guide to protein dynamics from N-15 spin relaxation in solution. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 59: 245-262.
133. Farina B, Pirone L, Russo L, Viparelli F, Doti N, Pedone C, Pedone EM, Fattorusso R (2010) NMR backbone dynamics studies of human PED/PEA-15 outline protein functional sites. *Febs Journal* 277: 4229-4240.
134. Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, Gish G, Shoelson SE, Pawson T, FormanKay JD, Kay LE (1994) Backbone Dynamics of A Free and A Phosphopeptide-Complexed Src Homology-2 Domain Studied by N-15 Nmr Relaxation. *Biochemistry* 33: 5984-6003.
135. d'Auvergne EJ, Gooley PR (2007) Set theory formulation of the model-free problem and the diffusion seeded model-free paradigm. *Molecular Biosystems* 3: 483-494.
136. d'Auvergne EJ, Gooley PR (2006) Model-free model elimination: A new step in the model-free dynamic analysis of NMR relaxation data. *Journal of Biomolecular Nmr* 35: 117-135.
137. d'Auvergne EJ, Gooley PR (2008) Optimisation of NMR dynamic models I. Minimisation algorithms and their performance within the model-free and Brownian rotational diffusion spaces. *Journal of Biomolecular Nmr* 40: 107-119.
138. d'Auvergne EJ, Gooley PR (2008) Optimisation of NMR dynamic models II. A new methodology for the dual optimisation of the model-free parameters and the Brownian rotational diffusion tensor. *Journal of Biomolecular Nmr* 40: 121-133.

139. d'Auvergne EJ, Gooley PR (2003) The use of model selection in the model-free analysis of protein dynamics. *Journal of Biomolecular Nmr* 25: 25-39.
140. Tolman JR, Flanagan JM, Kennedy MA, Prestegard JH (1995) Nuclear Magnetic Dipole Interactions in Field-Oriented Proteins - Information for Structure Determination in Solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9279-9283.
141. Tjandra N, Bax A (1997) Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* 278: 1111-1114.
142. Fischer MWF, Losonczi JA, Weaver JL, Prestegard JH (1999) Domain orientation and dynamics in multidomain proteins from residual dipolar couplings. *Biochemistry* 38: 9013-9022.
143. Bhattacharya A, Revington M, Zuiderweg ERP (2010) Measurement and interpretation of N-15-H-1 residual dipolar couplings in larger proteins. *Journal of Magnetic Resonance* 203: 11-28.
144. Kuprov I, Hore PJ (2004) Uniform illumination of optically dense NMR samples. *Journal of Magnetic Resonance* 171: 171-175.
145. Jurk M, Dorn M, Schmieder P (2011) Blue Flickers of Hope: Secondary Structure, Dynamics, and Putative Dimerization Interface of the Blue-Light Receptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 50: 8163-8171.
146. Najafi SMA, Harris DA, Yudkin MD (1996) The SpoIIAA protein of *Bacillus subtilis* has GTP-binding properties. *Journal of Bacteriology* 178: 6632-6634.
147. Avila-Pérez M, Vreede J, Tang Y, Bende O, Losi A, Gärtner W, Hellingwerf K (2009) In vivo mutational analysis of YtvA from *Bacillus subtilis*: mechanism of light activation of the general stress response. *J Biol Chem* 284: 24958-24964.
148. Tang YF, Cao Z, Livoti E, Krauss U, Jaeger KE, Gartner W, Losi A (2010) Interdomain signalling in the blue-light sensing and GTP-binding protein YtvA: A mutagenesis study uncovering the importance of specific protein sites. *Photochemical & Photobiological Sciences* 9: 47-56.
149. Nakasone Y, Hellingwerf KJ (2011) On the Binding of BODIPY-GTP by the Photosensory Protein YtvA from the Common Soil Bacterium *Bacillus subtilis*. *Photochemistry and Photobiology* 87: 542-547.
150. Kemmer G, Keller S (2010) Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nature Protocols* 5: 267-281.
151. Broecker J, Vargas C, Keller S (2011) Revisiting the optimal c value for isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry* 418: 307-309.
152. Mayer M, Meyer B (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society* 123: 6108-6117.
153. Dalvit C, Pevarello P, Tato M, Veronesi M, Vulpetti A, Sundstrom M (2000) Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water. *Journal of Biomolecular Nmr* 18: 65-68.
154. Dalvit C, Fogliatto G, Stewart A, Veronesi M, Stockman B (2001) WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: Practical aspects and range of applicability. *Journal of Biomolecular Nmr* 21: 349-359.
155. Dorn M, Jurk M, Schmieder P (2012) Blue News Update: BODIPY-GTP Binds to the Blue-Light Receptor YtvA While GTP Does Not. *Plos One* 7.
156. Mansurova M, Scheercousse P, Simon J, Kluth M, Gartner W (2011) Chromophore Exchange in the Blue Light-Sensitive Photoreceptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *Chembiochem* 12: 641-646.

157. Mao D, Wachter E, Wallace BA (1982) Folding of the Mitochondrial Proton Adenosine-Triphosphatase Proteolipid Channel in Phospholipid-Vesicles. *Biochemistry* 21: 4960-4968.
158. Rule, G. S. and Hitchens, T. K. (2006) *FUNDAMENTALS OF PROTEIN NMR SPECTROSCOPY*. Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands.
159. Ouali M, King RD (2000) Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Science* 9: 1162-1176.
160. Bradley P, Chivian D, Meiler J, Misura KMS, Rohl CA, Schief WR, Wedemeyer WJ, Schueler-Furman O, Murphy P, Schonbrun J, Strauss CEM, Baker D (2003) Rosetta predictions in CASP5: Successes, failures, and prospects for complete automation. *Proteins-Structure Function and Genetics* 53: 457-468.
161. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404-405.
162. Karplus K, Barrett C, Cline M, Diekhans M, Grate L, Hughey R (1999) Predicting protein structure using only sequence information. *Proteins-Structure Function and Genetics* 121-125.
163. Moglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases. *Journal of Molecular Biology* 385: 1433-1444.

9 Veröffentlichungen

Jurk M, **Dorn M**, Kikhney A, Svergun D, Gartner W, Schmieder P (2010) The Switch that Does Not Flip: The Blue-Light Receptor YtvA from *Bacillus subtilis* Adopts an Elongated Dimer Conformation Independent of the Activation State as Revealed by a Combined AUC and SAXS Study. *Journal of Molecular Biology* 403: 78-87.

Jurk M, **Dorn M**, Schmieder P (2011) Blue Flickers of Hope: Secondary Structure, Dynamics, and Putative Dimerization Interface of the Blue-Light Receptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 50: 8163-8171.

Dorn M, Jurk M, Schmieder P (2012) Blue News Update: BODIPY-GTP Binds to the Blue-Light Receptor YtvA While GTP Does Not. *Plos One* 7.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin,

.....
(Matthias Dorn)

11 Anhang

Tabelle 34: Chemische Verschiebungen von uniform $^1\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}$ -markiertem Ncap-LOV-Ja

Rest	$\omega^{1\text{H}_\text{N}}$ (ppm)	$\omega^{15\text{N}}$ (ppm)	$\omega^{13\text{C}\alpha}$ (ppm)	$\omega^{13\text{C}\beta}$ (ppm)	$\omega^{13\text{C}\text{O}}$ (ppm)
2Ala	-	-	-	-	176,32
3Ser	8,43	114,97	57,07	64,37	174,7
4Phe	8,79	124,02	-	-	176,51
5Gln	-	-	-	-	-
6Ser	-	-	58,81	62,96	174,36
7Phe	8,03	123,61	56,36	39,05	176,24
8Gly	8,25	110,69	44,82	-	173,96
9Ile	7,92	120,4	62,03	31,94	176,08
10Pro	-	-	64,97	30,21	178,64
11Gly	8,14	108,51	45,76	-	175,26
12Gln	7,89	120,71	58,71	28,26	177,49
13Leu	8,35	119,14	58,18	40,73	177,65
14Glu	7,99	116,89	59,16	28,55	179,18
15Val	7,53	118,98	65,79	-	177,36
16Ile	7,98	118,57	63,41	35,42	178,15
17Lys	-	-	-	-	-
18Lys	-	-	-	-	-
19Ala	-	-	-	-	-
20Leu	-	-	-	-	-
21Asp	-	-	-	-	-
22His	-	-	-	-	-
23Val	-	-	-	-	-
24Arg	-	-	-	-	-
25Val	-	-	-	-	176,16
26Gly	9,42	111,91	45,18	-	172,9
27Val	8,15	122,43	61,23	-	175,16
28Val	9,19	118,24	57,63	34,99	175,02
29Ile	8,5	122,28	58,98	40,24	176,35
30Thr	9,67	119,94	59,8	69,97	173,46
31Asp	7,4	117,97	48,94	43,43	175,26
32Pro	-	-	63,33	31,07	177,51
33Ala	8,62	123,67	52,74	17,94	178,7
34Leu	7,59	120,61	-	41,97	176,92
35Glu	8,28	121,87	57,74	28,63	177,41
36Asp	9,04	123,49	54,57	41,49	175,49
37Asn	8,11	115,65	52,3	36,9	170,58
38Pro	-	-	61,69	32,68	176,63
39Ile	7,73	116,84	62,77	38,52	177,62
40Val	9,42	120,61	60,3	32,3	174,83
41Tyr	7,62	123,17	58,75	41,53	172,32
42Val	7,09	124,1	-	33,59	172,22

Rest	$\omega^1\text{H}_\text{N}$ (ppm)	$\omega^{15}\text{N}$ (ppm)	$\omega^{13}\text{C}\alpha$ (ppm)	$\omega^{13}\text{C}\beta$ (ppm)	$\omega^{13}\text{CO}$ (ppm)
43Asn	8,33	123,75	51,05	41,3	175,62
44Gln	8,87	118,25	57,34	27,21	178,57
45Gly	-	-	46,66	-	176,21
46Phe	8,01	122,99	61,82	39,65	178,41
47Val	7,26	124,42	65,37	31,45	179,5
48Gln	8,4	119,09	57,98	27,68	178,17
49Met	7,9	117,9	-	33,7	176,73
50Thr	7,65	103,35	62,85	70,58	175,18
51Gly	8,1	110,8	45,18	-	173,81
52Tyr	7,44	119,82	58,37	39,32	174,22
53Glu	8,79	118,04	54,74	29,78	179,53
54Thr	8,76	115,87	66,98	67,88	177,15
55Glu	8,9	118,26	58,81	28,12	178,08
56Glu	7,65	116,72	56,47	30	176,11
57Ile	7,14	114,26	61,32	39,38	175,1
58Leu	7,26	118,53	56,16	41,01	178,64
59Gly	9,11	109,69	44,84	-	173,68
60Lys	7,76	119,76	54,15	33,67	176,02
61Asn	8,66	120,99	53,8	40,26	176,42
62Cys	8,06	122,79	60,9	25,4	174,09
63Arg	8,73	118,62	58,09	28,85	177,1
64Phe	6,92	119,43	58,55	36,66	175,86
65Leu	6,69	120,97	55,55	42,48	176,89
66Gln	7,74	118,16	-	27,22	175,78
67Gly	8,61	107,14	45,93	-	175,76
68Lys	8,17	123,33	59,58	31,74	177,92
69His	8,19	113,91	55,51	29,01	175,13
70Thr	7,73	118,05	64,61	68,8	174,94
71Asp	8,88	133,54	52,2	41,66	175,35
72Pro	-	-	64,26	31,37	179,04
73Ala	8,49	121,64	54,47	17,44	181,53
74Glu	7,4	117,04	57,02	28,49	179,77
75Val	7,34	120,63	67,08	30,11	178,75
76Asp	8,23	120,74	57,35	39,74	178,65
77Asn	7,61	118,97	55,6	36,84	178,89
78Ile	7,86	121,37	65,61	37,24	176,54
79Arg	8,44	119,84	60,11	29,71	179,91
80Thr	8,42	115,69	65,89	68,75	175,78
81Ala	7,47	125,67	55,38	17,17	180,91
82Leu	8,35	116,75	57,52	39,5	181,33
83Gln	7,84	119,49	58,2	27,73	177,76
84Asn	7,77	116,17	52,85	38,49	173,99
85Lys	8,18	120,39	57,83	29,1	173,85
86Glu	8,41	120,21	52,56	31,08	173,21
87Pro	-	-	62,21	31,94	176,83
88Val	8,64	120,29	60,06	34,09	172,6

Anhang

Rest	ω $^1\text{H}_\text{N}$ (ppm)	ω ^{15}N (ppm)	ω $^{13}\text{C}\alpha$ (ppm)	ω $^{13}\text{C}\beta$ (ppm)	ω ^{13}CO (ppm)
89Thr	8,18	124,94	60,79	70,97	174,3
90Val	8,85	119,72	58,61	35,25	173,87
91Gln	8,45	120,38	54,46	28,1	175,51
92Ile	9,45	121,71	59,15	43,32	172,8
93Gln	8,79	125,57	56,32	26,21	175,39
94Asn	8,76	131,46	50,1	45,75	170,87
95Tyr	9,05	116,88	57,71	40,84	177,06
96Lys	9,16	122,77	55,93	32,68	177,85
97Lys	8,47	124,8	59,31	30,41	177,65
98Asp	7,94	114,82	53,29	39,19	177,35
99Gly	8,31	109,38	44,63	-	175,22
100Thr	8,28	118,45	63,88	69,09	173,7
101Met	8,64	128,5	55,13	32,06	175,98
102Phe	9,16	126,03	55,54	41,42	173,26
103Trp	8,73	123,73	57,21	30,08	173,6
104Asn	8,86	125,18	50,13	39,93	176,45
105Glu	9,6	128,67	56,39	29,88	172,41
106Leu	8,88	134,09	52,99	43,51	174,91
107Asn	8,96	124,9	51,73	42,18	174,65
108Ile	8,87	122,62	59,41	39,68	174,72
109Asp	9,03	125,99	50,86	43,33	173,72
110Pro	-	-	61,55	30,83	175,97
111Met	8,84	120,36	54,49	35,75	173,73
112Glu	8,65	124,57	54,82	30,27	176,04
113Ile	8,96	126,77	59,69	38,54	175,74
114Glu	9,34	127,38	57,8	26,52	175,42
115Asp	8,7	116,93	54,81	39,42	175
116Lys	8,11	122,58	55,11	34,03	174,93
117Thr	7,81	119,97	62,07	69,65	173,17
118Tyr	8,81	123,12	56,59	42,12	174,75
119Phe	8,24	115,57	57,74	41,69	174,44
120Val	9,1	121,64	58,35	33,57	173,36
121Gly	9,71	117,08	43,94	-	170,16
122Ile	9,19	125,16	57,75	38,26	176,48
123Gln	9,03	127,24	56,46	27,59	174,53
124Asn	8,28	121,93	51,14	40,7	174,21
125Asp	8,54	124,9	53,74	39,22	177,92
126Ile	8,79	123,42	60,69	37,27	176,52
127Thr	9,06	121,96	69,07	-	176,42
128Lys	8,7	120,51	58,95	30,47	178,31
129Gln	7,73	120,12	58,77	27,58	178,51
130Lys	8,08	118,65	57,06	29,32	179,78
131Glu	8,1	121,73	58,86	28,36	179,35
132Tyr	8,02	120,53	59,55	36,77	177,72
133Glu	8,15	118,93	58,89	28,76	178,92
134Lys	7,66	120,38	57,78	31,08	178,23

Anhang

Rest	ω $^1\text{H}_\text{N}$ (ppm)	ω ^{15}N (ppm)	ω $^{13}\text{C}\alpha$ (ppm)	ω $^{13}\text{C}\beta$ (ppm)	ω ^{13}CO (ppm)
135Leu	7,86	120,79	56,99	41,17	179,99
136Leu	7,98	120,23	56,32	40,96	178,93
137Glu	7,9	121,26	58,32	29,09	178,4
138Asp	8,42	120,47	55,42	40,16	177,69
139Ser	8,02	116	59,33	63,17	175,16
140Leu	7,97	123,3	55,39	41,11	178,13
141Thr	7,97	115,37	62,35	69,32	174,8
142Glu	8,26	123,92	56,39	29,53	176,7
143Ile	8,19	122,66	61,12	37,73	176,91
144Thr	8,19	118,95	61,86	69,4	174,41
145Ala	8,22	127,19	52,15	18,5	177,61
146Leu	8,2	122,55	54,91	41,41	176,88
147Ser	7,84	122,4	59,65	64,42	178,71