

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bilinchromophore

Für Assemblierungen von Phytochrom-Apoproteinen mit Bilinchromophoren wurden die Tetrapyrrole PCB, PEB und BV verwendet. Um die Biline so rein wie möglich einzusetzen, wurden nach der Entfernung von Chlorophyllen und der Extraktion der Biline aus den Zellen eine chemische Reinigung und eine chromatographische Trennung durchgeführt.

2.1.1 Reinigung von Phycocyanobilin

Roh-PCB wurde aus dem Cyanobakterium *Spirulina geitlerie* durch Methanolyse (Terry et al., 1993; Kunkel et al., 1993; Arciero et al., 1988; Kufer und Scheer, 1979; Deforce et al., 1991) in einer Soxhlett Apparatur extrahiert. Zunächst wurden 50 g getrocknete Algen bei 4°C mit 300 ml Methanol geschüttelt, um die Chlorophylle zu entfernen. Nach etwa 2 h wurde das MeOH durch eine Fritte entfernt. Dieser Waschvorgang wurde so oft wiederholt bis die Cyanobakterien nicht mehr grün, sondern blau aussahen.

Die gewaschenen Zellen wurden in eine Soxhlett Apparatur überführt und mit 200 ml MeOH gekocht. Während der 48 stündigen Methanolyse wurde das MeOH mehrfach durch frisches Lösungsmittel ersetzt. Die blauen Fraktionen wurden gesammelt und im Rotationsverdampfer bei 40 °C Wasserbadtemperatur (Druck < 200 mbar) eingeeengt.

Zu dem eingeeengten Extrakt wurden 70 ml Diethylether gegeben. Nach Mischung mit 100 ml 1% Zitronensäure wurden die Phasen im Scheidetrichter durch vorsichtiges Schwenken und Entlüften getrennt. In der oberen blaugrünen Etherphase befand sich das PCB, das schnellstmöglich mit dem gleichen Volumen kalten NaHCO₃ (0.5 % w/v) ausgeschüttelt wurde. Das PCB befand sich danach in der unteren wässrigen Phase. Ab hier wurde auf Eis weitergearbeitet. Weil PCB bei alkalischem pH instabil ist, wurde sofort feste Zitronensäure zugegeben, bis der pH von 3.6 erreicht war. Der Extrakt wurde 2 mal in 50 ml Chloroform ausgeschüttelt. Nun befand sich das PCB in der unteren Chloroform-Phase. Diese Phase wurde mit H₂O ausgeschüttelt, um die restlichen Spuren der Säure zu entfernen. Um das restliche Wasser zu entziehen, wurde eine Spatelspitze

Natriumsulfat zugegeben und anschließend abfiltriert (Filter IG 3 von Schott). Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer bei 30 °C auf etwa 10 ml eingeeengt.

Der eingeeengte CHCl₃-Extrakt wurde in eiskaltes Hexan gegeben. Das PCB kristallisierte über Nacht bei 4 °C aus. Die PCB-Kristalle wurden vorsichtig von Hexan getrennt. Um restliches Hexan zu entfernen, wurde das kristallisierte PCB bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert. In einer *Speed-Vac* (Druck bei 200 mbar) wurden die Kristalle getrocknet und in MeOH gelöst. Die PCB-Lösung wurde bei -70 °C gelagert.

2.1.1.1 HPLC-Reinigung

Für manche Versuche wurde PCB nach Ausschüttelung mittels HPLC an einer C-18 Säule (UltraSep ES PHARM RP 18,8 x 250 mm, SepServ, Berlin, Deutschland) mit einer Flussrate von 3 ml/min (max. Druck 210 bar) gereinigt. Essigsäure/Methanol/H₂O 1:50:50 (v/v/v) wurde für die isokratische Trennung benutzt. Vor jedem Lauf wurden 300 µl PCB mit 200 µl Laufmittel gemischt. Die OD war etwa 40. Das Absorptionsspektrum des Eluats, dessen Maximum bei 687 nm liegen sollte, zeigte einen optimalen Peak nach etwa 40 min. Nach jedem Lauf wurde die Säule mit 2% Essigsäure in Methanol gespült. Die PCB-haltigen Fraktionen wurden bis zu zwei Wochen bei -20 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben 1:4 mit Wasser verdünnt, um den Methanolgehalt unter 12 % zu halten. Mit NaOH wurde der pH auf 5.5 eingestellt und durch eine C18 Kartusche (Sep-Pak Cartridges; Water; Massachusetts, USA) filtriert. Das PCB wurde absorbiert und mit Methanol mit 0.1 % Essigsäure desorbiert. Das PCB wurde bei -70 °C aufbewahrt.

2.1.2 Reinigung von Phycoerythrin

PEB wurde aus *Porphyridium cruentum* durch mehrere Zentrifugation-Einfrieren/Auftauen-Zyklen extrahiert. Die Reinigung wurde von der technischen Assistentin Cornelia Görick entwickelt und durchgeführt.

Zuerst wurden die Algen nicht zu dünn in Anzuchtmedium überimpft und 6 bis 8 Wochen bei 16 h Licht und 8 h Dunkel wachsen gelassen. Die *Porphyridium* Zellen wurden für 30 min bei 11.000 g zentrifugiert. Da die Zellen sich sehr leicht von der Wandung lösen, wurde die Zentrifugation ohne Bremse durchgeführt. Dieses Pellet wurde in 60 ml Aufschlusspuffer (s. 2.3.3) resuspendiert und gewaschen. In 60 ml frischem Aufschlusspuffer wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren und anschließend aufgetaut.

Diese Einfrier-Auftau- Prozedur wurde 7 bis 10 Mal wiederholt, um möglichst viel Phycoerythrin zu extrahieren.

Mit dem konzentrierten Extrakt wurde eine Ammoniumsulfatfällung (95% Ammoniumsulfat) durchgeführt. Pro 100 ml Extrakt wurden 65 g festes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben. Durch 30 min Zentrifugation ohne Bremse bei 11.000 g wurde das gefällte Protein vorsichtig von der Flüssigkeit getrennt. Zum Teil schwamm das gefällte Protein oben, zum Teil war es sedimentiert. Das Protein wurde in möglichst wenig Aufschlusspuffer homogenisiert. Nach diese Fällung wurde eine neue Fällung, dieses Mal mit EtOH durchgeführt. Dazu wurde EtOH in einer Endkonzentration von 80 % zugegeben. Die Zentrifugation wurde ebenfalls bis 11.000 g, 30 min durchgeführt. Das gefällte Protein wurde in eine Extraktionshülse überführt und ca. 24 h in einer Soxhlet-Apparatur methanolysiert (s. 2.1.1) . Das Volumen der rosa Fraktionen wurde auf etwa 10 ml eingengt. Danach wurde die Probe bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Anschließend erfolgte eine HPLC-Reinigung der extrahierten PEB Fraktionen, die auch PCB enthalten. Diese Reinigung des PEB erfolgte wie für PCB. Das Maximum des Absorptionsspektrums des Eluats lag bei 579 nm. Das PEB eluierte nach 23 min. Das über eine C18 Kartusche aufkonzentrierte und in MeOH gelöste PEB wurde bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.1.3 Biliverdin

Biliverdin wurde bei Porphyrin Products (Logan, UT, USA) gekauft und in MeOH bis zu einer Konzentration von 5 mM gelöst und aufbewahrt.

2.1.4 Spektrale Messungen von PCB, PEB und BV

Alle spektralen Messungen der Chromophore wurden mit einem Uvikon 941 oder einem Uvikon 931 Spektrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) bei $18\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Messungen wurden in der Regel von dem technischen Assistenten Norbert Michael durchgeführt. Für die Bestimmung der Konzentration wurden 10 μl gereinigtes PCB, PEB oder BV mit 490 μl Methanol mit 5% HCl gemischt. Die Mischung wurde immer frisch und kurz vor Verwendung angesetzt.

2.1.5 Bestimmung der PCB-, PEB- und BV-Extinktion

Sowohl das in Methanol gelöste PCB und PEB als auch BV wurden bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Die Proben wurde nach Cole (Cole et al., 1967) und Chapman (Chapman et

al., 1967) vorbereitet. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten für die Berechnung der Konzentration sind in Tabelle 1. Für die Berechnung wurde das Lambert Beer'sche-Gesetz: $E = \epsilon \times c \times d$ zu grunde gelegt. Das heißt: $c = E / (\epsilon \times d)$

E = Extinktion; ϵ = Extintionskoeffizient beim entsprechenden Absorptionmaximum ;d = 1 cm Schichtdicke

	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)	O.D. (nm)	
PCB	37,9	690	
PEB	25,2	594	A
BV	30,8	696	
PCB	16	610	
PEB	15	538	B
BV	13	674	

Tabelle 1: Extinktionkoeffizienten (ϵ) der Biline PCB (Cole et al., 1967), PEB (Chapman et al., 1967) und BV (McDonagh, 1979). Spektrophotometrische Messungen in HCl-(5%)Methanol (A) oder in 50 mM Tris/HCl pH7.8, 5 mM EDTA Puffer (B)

2.1.6 Test der Protein-Chromophor-Wechselwirkung

Diese Methode erlaubte die Untersuchung von der Wechselwirkung des Protein-Chromophor-Komplexes im nativen und SDS-denaturierten Zustand. Für die Tests wurden NAP-5 Entsalzungssäulen (Amersham Pharmacia) verwendet. Diese Säulen enthalten eine Gelfiltrationsmatrix, in der die Proteine ungehindert durch die Säule laufen. Freier Chromophor oder Salz werden zurückgehalten. Eine Konzentration von 10 μ M Agp1 oder Cph1 in TE-Puffer (50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7.8) wurden mit 4 μ M BV bzw. PCB (Stammlösung: 1 mM) gemischt und für 5 min in Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 500 μ l Probe auf die mit ca. 5 ml TE-Puffer equilibrierte Säule geladen. Mit 750 μ l neuem Puffer wurde das Holoprotein eluiert. Schließlich wurde die Probe spektral analysiert.

2.2 Bakterienstämme

Die Transformationen von den Ligationen mit dem Phytochromexpressionsvektor pQE-12 (Qiagen) wurden mit den Bakterien-Stämmen *Escherichia coli* L.; XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) und *Escherichia coli* L. K12; DH5 α (mcr) (Gibco BRL) durchgeführt. XL1-Blue enthält eine episomale Kopie von laq I^q (Mutation von laqI), die sehr hohe Mengen des lac Repressors produziert. Das Episom enthält zudem eine Kopie des Tet^r Gens. In Kombination mit geeigneten Plasmiden wie pBluescript oder pTAdvantage erlaubt DH5 α (mcr) eine blau/weis Selektion durch α -Komplementation. Der mcrA- und mcrBC- Genotyp erlaubt die Klonierung von Cytosin- oder Adenin-methylierter DNA (Sambrook und Russell, 2001). DH5 α (mcr) wurde als Wirt für durch SDM veränderte Plasmide verwendet. In manchen Fällen wurde der *E.coli* Stamm Rosetta-gamiTM(DE3)pLacI (Novagen, Madison, USA) verwendet. Dieser Stamm codiert seltene tRNAs für AGG, AGA, AUA, CUA, CCC und GGA auf einem chloramphenicolresistenten Plasmid, das einen lac Repressor und ein T7 Lysozym Gen besitzt. Die Anzahl von Schwefel-Bindungen im Zytoplasma wurden durch Mutationen in *trxB* und *gor* Gen erhöht (Bessette et al., 1999). Dieser Stamm eignet sich für die Expression von Peptiden, die häufig in *inclusions bodies* vorliegen. Die Expression der seltenen tRNA Gene in diesem Stamm bewirkt eine höhere Expression von Genen, die diese seltenen Codonen beinhalten.

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Anhang 1 zusammengestellt.

2.3.2 Antibiotika

Zur Selektion transformierten Bakterien wurden, je nach verwendetem Vektor die Antibiotika Ampicilin (50 μg / ml), Tetracyclin (15 μg / ml), Kanamycin (15 μg / ml) oder Chloramphenicol (34 μg / ml) eingesetzt. Von allen Antibiotika wurden 1000 fache Stammlösungen in Wasser (Ampicilin und Kanamycin) oder in 96 % EtOH (Tetracyclin und Chloramphenicol) angesetzt und durch einen 0.20 μm Filter (Sterile, non-pyrogenic, hydrophilic filter, Roth, Deutschland) steril filtriert. Die Stammlösungen wurden in 1 ml

Portionen aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die gelösten Antibiotika wurden mit flüssigem Agar-Medium gemischt oder auf die Platte pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel verteilt. Die Zellen wuchsen in Dunkeln, wenn das lichtempfindliche Tetracyclin verwendet wurde.

2.3.3 Bakterienmedien

Die Bakterienmedien wurden vor Verwendung mit den entsprechenden Antibiotika, IPTG oder X-Gal gemischt.

2.3.3.1 Luria-Bertani (LB) Medium

Für das Wachstum der Zellen wurde LB-Medium als Standardmedium mit den entsprechenden Antibiotika verwendet. Das Medium besteht aus: Trypton (10 g/l), Hefe-Extrakt (5 g/l) und NaCl (10 g/l). Die angegebenen Substanzen wurden in Wasser gelöst. Der pH wurde mit NaOH auf pH 7.6 eingestellt. Danach wurde das Medium autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium für Petrischalen wurde Bacto-Agar (1.5 % w/v) (Sigma A9799) zugegeben.

2.3.3.2 Liquid Rose Bengal (RB) Medium

Das Medium besteht aus: Trypton (10 g/l), Hefeextrakt (5g/l), NaCl (5g/l) und Glucose (2 g/l). In unserem Fall wurde Glucose als 25 g/l Stammlösung verwendet und getrennt vom Medium autoklaviert. Der pH wurde durch Zugabe von NaCl bei 7.6 eingestellt.

2.3.3.3 SOC-Wachstumspuffer

Elektrokompetente, transformierte Zellen sind in diesem Medium für 1 h gewachsen. Das Medium besteht aus: Trypton (20 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 0.4 % (w/v) Glucose. Der pH wurde nicht eingestellt.

2.3.4 Lösungen für die Extraktion von PEB aus *Porphyridium cruentum*

Das *Porphyridium* war in der Regel von Dr. Shoshana Arad aus dem *Institute for Applied Biosciences at Ben-Gurion* (Universität von Negev, Israel) zu Verfügung gestellt.

Spurenelementenpuffer	Anzuchtpuffer	Aufschlusspuffer (mM)
mg/l	mg/l	
750 EDTA	1000 NaNO ₃	20 KH ₂ PO ₄ , pH 8.5
97 FeCl ₃ ·6H ₂ O	50 KH ₂ PO ₄	1 MgCl ₂
41 MnCl ₂ ·4H ₂ O	2440 MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 NH ₄ SO ₄
5 ZnCl ₂	600 KCl	2 DTT
2 CoCl ₂ ·6H ₂ O	300 CaCl ₂ ·2H ₂ O	
4 NaMoO ₄ ·2H ₂ O	1000 Tris	
	15000 NaCl	
	6 ml	
	Spurenelementpuffer	

Nach dem Lösen von 750 mg EDTA bei dem Spurenelementepuffer müssen die entsprechende Salze in genau dieser Reihenfolge zugegeben werden. Zum Anzuchtpuffer wurden 6 ml/ 1 Spurenelementpuffer gegeben. Der pH-Wert wurde mit 1N HCl auf 8.0 eingestellt. DTT wurde immer frisch zugegeben.

2.3.5 Lösungen für die Phytochromextraktion aus Bakterien

Waschpuffer (mM)	Extraktionspuffer (mM)	Amoniumsulfatpuffer (mM)
50 Tris	50 Tris	50 Tris
5 EDTA	5 EDTA	5 EDTA
300 NaCl	300 NaCl	300 NaCl
	1 TCP	3300 (NH ₄) ₂ SO ₄

Der pH wurde mit HCl auf 7.8 eingestellt. Für die Cph1-Extraktion und Reinigung wurde den Puffern noch 0.01 % Natriumcholat (Basispuffer) zugesetzt. Der Extraktionspuffer wurde noch zusätzlich mit PMSF, 1-2 mg in 100 µl MeOH gelöst, versetzt.

2.3.6 Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie

Equilibrierungspuffer (mM)	Waschpuffer (mM)	Elutionspuffer (mM)
50 Tris	50 Tris	50 Tris
5 Imi	10 Imi	250 Imi
300 NaCl	300 NaCl	300 NaCl

Der pH wurde nach HCl-Zugabe bei 7.8 eingestellt.

2.3.7 Detergenzien

Insgesamt 48 verschiedene Detergenzien (Anatrace, USA) wurden eingesetzt. Die Endkonzentration lag zwischen 1 und 0.1 %.

2.3.8 Lösungen für analytische Gel-Filtration

Als Laufpuffer wurde 50 mM Tris, 5 mM EDTA und 150 mM NaCl verwendet. Der pH wurde mit HCl auf 7.8 eingestellt. Alle Lösungen wurden filtriert (Membranfilter 0.6 µm, Schleicher & Schuell, Dassel Deutschland) und mit einer Vakuum-Saugflasche bei 80 mbar (CUC-2 Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) entgast. Zum Lagern wurde die Säule mit 20% Ethanol gespült.

2.3.9 Lösung für preparative Gel-Filtration

Für jede Chromatographie wurde 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl und 100 mg/l NTCH als Laufpuffer eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7.8 eingestellt.

2.3.10 Lösung für Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Für 500 ml Lösung wurden 50 mg Coomassie G250, 25 ml 95 % EtOH und 50 ml 85 % Phosphorsäure gemischt. Die Lösung wurde zunächst ca. 2 Stunden abgedunkelt gerührt. Anschließend wurden 425 ml Wasser zugegeben. Die Lösung wurde filtriert und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Mit jeder neu eingesetzten Lösung wurde eine Kalibrierkurve ermittelt.

2.3.11 Lösungen für Proteolyse

Für die Proteolyse wurden 50 mM Tris, 5 mM EDTA und 300 mM NaCl als Basispuffer eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7.8 eingestellt. Als Stoppuffer wurde der 3x-Probenpuffer verwendet. Die Enzyme (s. 2.10.1) wurden kurz vor Verwendung frisch zu gesetzt. Die Endoproteinase V8 wurde in H₂O gelöst, aliquotiert und im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.3.12 Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Probenpuffer (3x)	Trenngelpuffer (4x)	Sammelpuffer (4x)	Laufpuffer
30 % Glycerin	1.5 M Tris	500 mM Tris	25 mM Tris
6 % SDS	0.6 % SDS	0.6 % SDS	0.15 % SDS
300 mM DTT			192 mM Glycin
0.01 % Bromphenolblau			
4.8 ml Sammelgelpuffer pro 10 ml	pH 8.8 mit HCl	pH 6.8 mit HCl	

Die **Acryl-/Bisacrylamid-Stammlösung** besteht aus 30 % Acrylamid und 0.8 % Bisacrylamid. Außerdem wurden **APS- und TEMED-Stammlösungen** mit 10 % APS bzw. 40 % TEMED in H₂O eingesetzt.

In der Regel wurden 13 % Gele nach folgende Einsatz verwendet:

	Trenngel-Stammlösung (μ l)	Sammelpel-Stammlösung (μ l)
Acryl-/Bisacrylamid-Stamml.	4150	670
Trenngelpuffer	2500	
Sammelpelpuffer		1250
Wasser	3300	3080
TEMED	12.5	6
APS	50	16

2.3.12.1 Lösungen für die NuPAGE-Gelelektrophorese

Als 20x Laufpuffer wurden 1 M MES, 1M Tris, 2 % SDS und 20,5 mM EDTA eingesetzt. Vom 1x Laufpuffer wurde der pH 7,3 kurz vor Verwendung kontrolliert.

2.3.13 Lösungen für Elektroelution

Die Elektroelution wurde mit 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS als Elutionspuffer durchgeführt. Alle Puffer wurden bei 4 °C gelagert. Der Protein-Elutionspuffer wurde vor Nutzung auf 37 °C erwärmt.

2.3.14 Lösungen für die Präparative-Gelelektrophorese (*Prep Cell*)

Für das Trenngel würde als Stammlösung 6 % Acrylamid, 0,16 % Bisacrylamid und 500 mM Tris verwendet. Als Laufpuffer wurde 25 mM Tris und 192 mM Glycin verwendet. Der pH von beiden Lösungen lag nach HCl-Zugabe bei 8,8 bzw. 8,4.

2.3.15 Lösungen für die Phosphorylierung

Mastermix-Stammlösung (mM)	Mastermix-verwendete Volumen (µl)
1000 Tris, pH 7,8	0,5
100 MgCl ₂	1
80 β-Mercaptoethanol	1
1000 KCl	1
100 Ethylenglycol	1
H ₂ O	
1 ATP kalt	1
[γ- ³² P]ATP	

2.3.16 Lösungen für das *Blotting*

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

2.3.17 Lösungen für die Extraktion von DNA aus *Agrobacterium*

STET-Puffer (100 ml)	2N Natriumhydroxid (10 ml)
8 % Saccharose	0,8 g NaOH
0,5 ml Triton X-100	
10 ml 0.5 M EDTA	
1 ml 1 M Tris, pH 8.0	

2.3.18 Lösungen für Agarose-Gelelektrophoresen

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

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

Natriumacetat	Ammoniumacetat
3 M NaC ₂ O ₂ H ₃ , pH 5.5	10 M (NH ₄)C ₂ O ₂ H ₃

2.4 Computer unterstützte Datenverarbeitung

Das Programm „BLASTP“ wurde für die Suche von Proteinsequenzen verwendet. Als Datenbank wurde die aus der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) benutzt. *Agrobacterium tumefaciens* Phytochrom Agp1 wurde nach der Sequenzierung des Genoms von der Cph1 gefunden. Die Suche nach den verschiedenen Responsregulatoren und Kinasen aus *Agrobacterium* wurde mit Hilfe bekannter Sequenzen (Yeh et al., 1997) durchgeführt. Die Proteindomänen wurden mit dem SMART *computer tool* bei der *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL; <http://smart.embl-heidelberg.de>) gesucht. Für die Erkennung der PHY-Domäne wurde der PFAM *computer tool* aus dem *Sanger Centre* (www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/) verwendet. Sequenz *Alignments* wurden mit CLUSTALX V.1.8 (Thompson et al., 1997) durchgeführt. Schließlich wurde für die Prognose der Sekundärstruktur des Proteins das PHD-Programm (Rost et al., 1994; Rost und Sander, 1993) bei der EMBL Predict Protein server (www.wmbl-heidelberg.de/predictprotein/) verwendet.

2.5 DNA-Isolierung aus *Agrobacterium*

Für die Isolierung der DNA wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Die hier beschriebene Methode wurde hauptsächlich nach Sambrook and Russel, 2001 durchgeführt. Alternativ wurde das NucleoSpin Tissue Kit für genomische DNA (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.5.1 *Agrobacterium*-DNA-Miniprep für PCR.

Diese Methode diente der Extraktion kleiner Mengen DNA. Für die Durchführung von DNA-Minipreps wurde 18 h vorher eine 3 ml Kultur (s. 2.7.1) angeimpft. In ein 1.6 ml Reaktionsgefäß wurden 1.5 ml über Nacht gewachsene Zellen überführt und für 15 s bei RT (7000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl STET-Puffer (s. 2.3.13) vorsichtig gelöst. Um die Zellwand zu zerstören, wurden 25 µl Lysozym

(10 mg/ml in 25 mM Tris, pH 8.0) zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Reaktionsgefäße gemischt. Sofort danach wurde die Probe in kochendem Wasser für 45 s inkubiert. Längere Inkubationszeiten der DNA bei höherer Temperatur könnten zu einer unumkehrbaren Denaturierung der DNA führen (Vinograd und Lebowitz, 1966). Nach Zentrifugation bei 7000 g für 10 min erschienen zusammengeballte Reste. Diese wurden mit einem Zahnstocher entfernt. Zu der restlichen Probe wurden 350 µl Isopropanol zugegeben. Die Lösung wurde gut gemischt und für 10 min bei RT (7000 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 350 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach 3 min Zentrifugation wurde das EtOH entfernt, das Pellet leicht angetrocknet und in 25-50 µl TE/RNase-Puffer gelöst. Um die RNase zu entfernen, wurde eine Phenolfällung mit Natriumacetat durchgeführt. Dafür wurde die Probe mit dem gleichen Volumen Phenol gemischt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die obere Phase weiter mit 1 Volumen Phenol /Chloroform (1:1) (Chloroform: Chloroform+ Isoamylalkohol 24:1) versetzt und die obere Phase nach Zentrifugation nochmals mit Chloroform gemischt, zentrifugiert und getrennt. Die wässrige Phase wurde weiter mit ¼ Volumen 10M Natriumacetat und 2.5 Volumen 100 % Ethanol gemischt und für 4 Stunden bei -20 °C gelagert. Nach 30 min Zentrifugation bei 51.000 g wurde das Pellet mehrmals mit 1.5 ml 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet der letzten Zentrifugation in TE-Puffer resuspendiert. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde mittels UV-Spektrum von 200-300 nm ermittelt. Der A_{260}/A_{280} Wert sollte größer als 1.8 sein. Von allen Werten wurde A_{300} zuvor abgezogen. Die Konzentration c wurde nach (Sambrook und Russell, 2001) mit der Formel $c_{(\mu\text{g/ml})} = A_{260} \times 50_{\mu\text{g/ml}} \times [\text{Verdünnungs-Faktor}]$ bestimmt. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der DNA-Lösung auf ein 0.7 % TBE-Gel aufgetragen.

2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

Klonierungen wurden hauptsächlich wie bei (Sambrook et al., 1989) durchgeführt. Als Komplement wurden die Protokolle in (Sambrook und Russell, 2001) nachgeschlagen.

2.6.1 Präparation von Plasmid-DNA

E.coli Plasmide wurden mit Hilfe eines Plasmid Mini-Isolierungskits (Qiagen GmbH) mittels alkalischer Lysis aus 3-5 ml ü.N. gewachsener Bakterienkultur isoliert und gereinigt.

2.6.2 PCR

Die PCRs wurden hauptsächlich nach (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Für die Durchführung von PCR-Reaktionen wurden ein Biometra Trio Thermoblock oder ein Biometra TGradient Thermocycler verwendet. Als Polymerase wurde die Vent-Polymerase (Vent; Biolabs, Northbrook, IL) oder TaKaRa Ex Taq-DNA-Polymerase (Takara Shozu, Otsu, Japan) benutzt. Die lyophilisierten Primer (BioTez Berlin-Buch GmbH) wurden in einer Konzentration von 100 μM in TE-Puffer gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Eine Liste der verwendeten Primer steht unter 2.6.9. Für Standard-PCRs wurden immer 60 μl Endvolumen eingesetzt nach folgendem Schema:

	Stammlösung	Endkonzentration
Polymerase Puffer	10x	1x
Primer sense	100 μM	0.5 μM
Primer antisense	100 μM	0.5 μM
dNTPs	2.5 mM	200 μM
TaKaRa Ex Polymerase	5u/ μl	1.5u/ μl

Als *Template*-DNA wurden 10-100 ng genomische DNA bzw. 1-10 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Die PCR fing mit einer Denaturierung für 1 min bei $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ an. Dannach folgten 5 Zyklen jeweils 1 min Denaturierung bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1 min T_{an} -Primer a; x min Elongation bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 25 Zyklen jeweils 1 min Denaturierung bei $94\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1 min T_{an} -Primer b; y min Elongation bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abschließend wurde für weitere 5 min bei $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und zum Schluss auf $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt.

Die *Annealing*-Temperaturen (T_{an}) wurde nach Baldino *et al.*, (1989) berechnet d.h., $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für jeden Cytosin- und Guaninrest, und $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ für jeden Adenin- und Thyminrest. Die Summe von allen ergab die *Annealing*-Temperatur der Primer. Die Temperaturen lagen

zwischen 54 °C und 68 °C. Bei Primerpaaren mit unterschiedlichen T_{an} wurde die PCR, wie in der oben genannte Prozedur, in zwei Zyklen geteilt. Für die Extensionszeit wurden pro 1000 bp des erwarteten PCR-Produkts 60 s gewählt. Die PCR-Produkte wurden nach Auftrag von etwa 5 µl in Agarosegel (s. 2.6.3) getestet und mit dem QIAquick PCR *Purification Kit* (Qiagen GmbH) oder mit dem EasyPure DNA Purification Kit (Biozym, Oldendorf, Deutschland) gereinigt.

2.6.3 Agarosegel-Elektrophorese

Produkte von DNA-Extraktionen, PCR-Reaktionen, Reinigungen und Restriktionsanalysen wurden in Agarosegelen untersucht. Für analytische Gele wurde Agarose in Tris-Borat-EDTA-Puffer (1x TBE) gelöst. Als Laufpuffer wurde ebenso TBE-Puffer verwendet. Präparative Gele wurden mit LMP-Agarose in Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE), welcher mit 0.1 µg Ethidiumbromid/ml Puffer versetzt wurde, gegossen. Die Maße der präparativen und analytischen Gele waren 8 x 6 cm bzw. 16 x 15 cm. Die Gele waren 9 mm bzw. 2 mm dick. Die TBE-Gele wurden nach dem Lauf (kleine Gele bei 120 V, große Gele bei 160-180 V) in ein Ethidiumbromidfärbebad (0.5 µg/ml) gelegt. Die Agarosekonzentrationen von normalen Agarosegelen als auch von LMP-Gelen lag, je nach Größe der DNA-Fragmente, zwischen 0.7 % und 2 % (w/v). Nach Zugabe von SLB (s. 2.3.17) wurden die DNA-Proben aufgetragen. Unter dem UV-Licht des Transilluminators (UV-Products Inc., San Gabriel, USA) fluoresziert das an DNA gebundene Ethidiumbromid orange (etwa bei 590 nm). Um eine deutliche Bande zu erkennen, wurden etwa 5-10 ng DNA benötigt. Alle relevanten Gele wurden mit einer Videokamera (HeroLab,) dokumentiert.

2.6.4 Reinigung, Ligation und Restriktionsverdau von DNA

Wenn neben dem erwarteten PCR-Produkt auch andere PCR-Nebenprodukte zu sehen waren, wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente mit dem DNA *Purification Kit* (Biozym Diagnostik GmbH) gereinigt. Wenn das PCR-Produkt sauber war, wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) verwendet. Für Ligationen wurde entweder die T4 DNA-Ligase oder das Quick Ligation Kit (NEB) nach Herstellerangaben verwendet. Ligationen von DNA-Fragmenten mit glatten Enden wurden vor Ligation mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E.coli* oder der Vent-Polymerase nach Angabe des Herstellers *geblunted*. Für die Phosphorylierung der 5'-Enden von PCR-

Produkten und die Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK) bzw. die Alkalische Phosphatase aus Kälberdam (CIAP) gemäß den Angaben des Herstellers (BioLabs) verwendet. Um spezifisch DNA (z.B. Plasmid-DNA) abzubauen, wurde die Restriktionsendonuklease DpnI eingesetzt. Nicht-methylierte DNA (z.B. PCR-Produkte) werden von DpnI nicht geschnitten. Restriktionsenzyme, Ligasen, CIAP und PNK wurden von den Firmen New England Biolabs (NEB), Promega oder Boehringer bezogen.

	Stammlösung	Endkonzentration	
DNA-Fragment oder Plasmid	500 ng/μl	25-100 ng/μl	
<i>EcoR I</i>	10 u/μl	0.3 u/μl	
<i>Bgl II</i>	10 u/μl	0.3 u/μl	A
BSA	10 mg/ml	100μg/ml	
A (Plasmid) + CIAP	10 u/μl	0.5 u/μl	B
DNA-Fragment (Insert)		12.5 ng/μl	
Ligase Puffer	10 fach	1 fach	C
T4 PNK	10 u/μl	0.3 u/μl	
DNA-Fragment (Insert)	12.5 ng/μl	6.2 ng/μl	
Plasmid	100 ng/μl	5 ng/μl	D
T4 Ligase			

Tabelle 2: Beispiele für verwendete Restriktionsenzyme, DNA-Vektoren (Plasmid-DNA), DNA-Fragmente, BSA, Phosphatase etc. A: Getrennter Verdau von Plasmid pQE-12 und Insert mit zwei Restriktionsenzymen. B: Dephosphorylierung von pQE-12. C: Phosphorylierung des Inserts. D: Ligationsansätze.

2.6.5 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden linearisierte Plasmide oder PCR-Produkte eingesetzt. Ein ABI Prism-Dye-Terminator-System (Big Dye / FS-Kit, Perkin Elmer) und ein Trio Thermoblock (Biometra) wurden benutzt. Das Prism-Dye-Terminator-System funktioniert

wie die von Sanger (Sanger et al., 1977) beschriebene Didesoxy-Terminations-Sequenzierungs-Reaktion. Mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wurden die End-Didesoxynukleotide markiert. Die Sequenzierungsreaktionen wurden von Martin Meixner (DLMBC, Berlin) durchgeführt.

2.6.6 Klonierungen für Expressionskonstrukte in *E.coli*

Die Plasmide pET11a (Novagen, Madison, WI, USA) und pQE-12 (Qiagen, Chatsworth, CA) wurden für die Expression von Genen in *E.coli* verwendet. Der Vektor pQE-12 besitzt einen T5 Promotor und zwei lac-Operator Sequenzen. Dieser Klonierungsvektor enthält das Ampicillin-Resistenz-Gen bla (beta Lactamase Gen) und zwei starke Transkriptionsterminatoren, T0 von dem Phagen Lambda und T1 vom rrnB-Operon des Bakteriums *E.coli*. Das Plasmid pET11a enthält eine Sequenz des T7 Promotors und eines des lac-Operators. Um eine Reinigung des Expressionsproteins über eine Nickelaffinitäts-Chromatographie zu ermöglichen, besitzen beide Vektoren eine Region, die für sechs zusätzliche Histidinreste kodieren. Der in allen Fällen einzusetzende 5'-Primer (s. 2.6.9) besitzt eine *EcoR* I-Erkennungssequenz und die Shine-Dalgarno-Sequenz sowie die ersten Nukleotide des entsprechenden Gens. Zusätzlich wurde vor der *EcoR* I-Erkennungssequenz ein Nukleotid (G) kloniert, um eine effektive Restriktion am Rande von DNA-Fragmenten zu gewährleisten. Dadurch sollte *EcoR* I mehr als 90 % der Standard-Aktivität erreichen (NEB-Produktinformation). Der 3'-Primer enthält die letzten Nukleotide dieses Gen einschließlich des Stopcodons sowie eine *Bgl* II-Erkennungssequenz. Die *EcoR* I- und *Bgl* II-Restriktionsstellen im PCR-Produkt erlaubten die *sticky-end*-Klonierung des gesamten Gens zwischen den entsprechenden Restriktionsstellen von pQE-12. Nach Ligation von Vektor mit Insert wurden Einzel- und Doppeltestverdaue mit den Restriktionsendonukleasen oder eine PCR mit den Primern durchgeführt, um die korrekte Orientierung des insertierten Gens zu überprüfen.

2.6.6.1 Verwendete Konstrukte

Das Plasmid pF10His für die Expression des Phytochroms Cph1 wurde von Franz Mittmann kloniert (Lamparter et al., 1997; Hughes et al., 1997). Genomische DNA aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 wurde von Anne Wilde (Institut für Biologie/Genetik, Humboldt Universität, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Für die konstitutive Expression von Rcp1 wurde das Plasmid pET11b (Novagen) verwendet. Die Klonierung wurde von der Hilfskraftstudentin Nadine Querfurth durchgeführt. Das 450 bp Insert wurde zwischen *Bam* H1 und *Nde* I kloniert. Die Transformation wurde in den *E.coli* Stamm DH5 α (DE3) durchgeführt.

2.6.6.2 Konstruktion eines Expressionsplasmids für *Agrobacterium-Phytochrom*

Für die Klonierung wurde das Gen *agp1* (Locus AE008116) (Wood et al., 2001) mittels PCR amplifiziert. Als Template der PCR Reaktion wurde genomische DNA von *Agrobacterium tumefaciens*, Abstammung C58 extrahiert (s. 2.5). Für die Expression von Agp1 wurde das Plasmid pQE-12 verwendet. Die PCR wurde mit den Primern b58 und b59 durchgeführt (s. Primerliste 2.6.9). Sowohl der Expressionsvektor pQE-12 als auch das 2238 bp-DNA-Fragment wurden mit den Restriktionsenzymen *Eco*R I und *Bgl* II verdaut. Die Phosphorylierung des PCR-Produktes und die Dephosphorylierung des Vektor wurden, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Die Orientierung der ligierten DNA-Fragmente wurde mittels PCR mit den Primern J116 und a19 untersucht. Das resultierende ORF fängt mit dem ursprünglichen *start* Codon an und endet in 6 zusätzlichen Histidin Codons. Die Sequenz wurde wie in 2.6.5 überprüft.

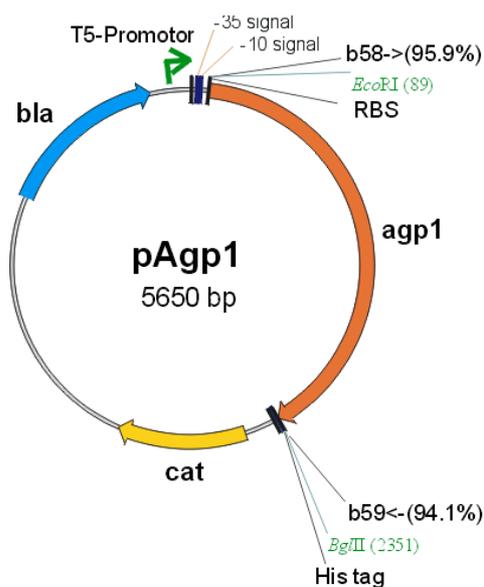


Abbildung 1: Expressionsvektor pAgp1 zur konstitutiven Expression des prokaryotischen Phytochrom aus *Agrobacterium tumefaciens* Agp1. Das Gen wurde unter die Kontrolle eines lac-Operons eingebaut.

2.6.6.3 Expressionsplasmide für die agrobakteriellen Responsoren Rap1, ExsF und VirG bzw. die Kinase ExsG

Die Gene *rap1* (Atu1990), *exsG* (Atu1988) und *exsF* (Atu1987) liegen zusammen mit *agp1* in einem Operon (Locus NC_003304). Rap1 und ExsF sind beide Responsoren, ExsG ist eine Kinase mit Responsor. Das Gen *virG* (Atu6178) codiert für einen weiteren Responsor. Dieses Gen liegt auf dem Ti-Plasmid.

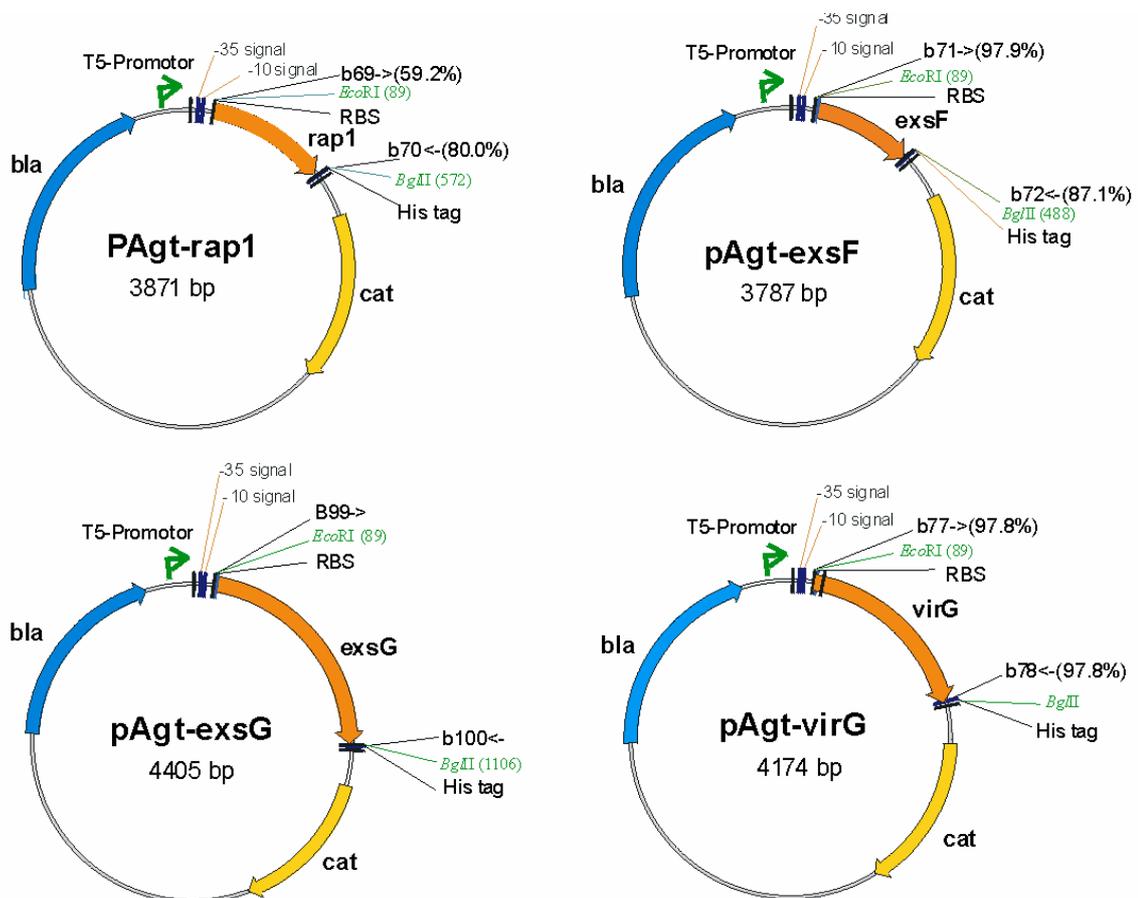


Abbildung 2 : Karten der klonierten Expressionsvektoren Rap1, ExsF und VirG und der Histidinkinase ExsG. Die Plasmide pAgt-exsG und pAgt-virG wurden in den E.coli Stamm Rosetta-gamiTM(DE3)pLacI transformiert. Für pAgt-rap1 und pAgt-exsF wurden *E.coli* XL-1Blue verwendet.

Die offenen Leseraster (ORF) wurden mittels PCR mit TaKaRa Ex-Polymerase amplifiziert. Für die PCR- wurden die Primer b69, b70 (rap1); b99, b100 (exsG); b71, b72 (exsF) und b77, b78 (virG) verwendet. Die 456 (rap1), 990 (exsG), 372 (exsF) und 759 (virG) bp-DNA-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Bgl* II verdaut. Die weitere Klonierungsschritte wurden wie bei Agp1 durchgeführt (s. 2.6.6.2). Die Orientierung der ligierten DNA-Fragmente und die Bestimmung der Sequenzen wurden mittels PCR mit den Primer J116 und a19 untersucht.

2.6.6.4 Konstruktion eines Expressionsplasmid für Deletionen aus Cph1

Ausgehend von pF10-His wurden zwei Cph1 Deletionsklone hergestellt. Die verkürzten Gene wurden mit den Primern b85 bzw. f23 und. b86 durchgeführt (s. 2.6.9). Der Expressionsvektor pQE-12 und die 915 bzw. 960 bp-DNA-PCR-Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Bgl* II verdaut. Die Phosphorylierung des PCR-Produktes und die Dephosphorylierung des Vektors wurden, wie unter 2.6.4 beschrieben, durchgeführt. Nach Ligation und Transformation wurde die Orientierung der ligierten DNA-Fragmente mittels PCR mit den Primern J116 und a19 untersucht. Die entsprechenden Sequenzen wurden geprüft.

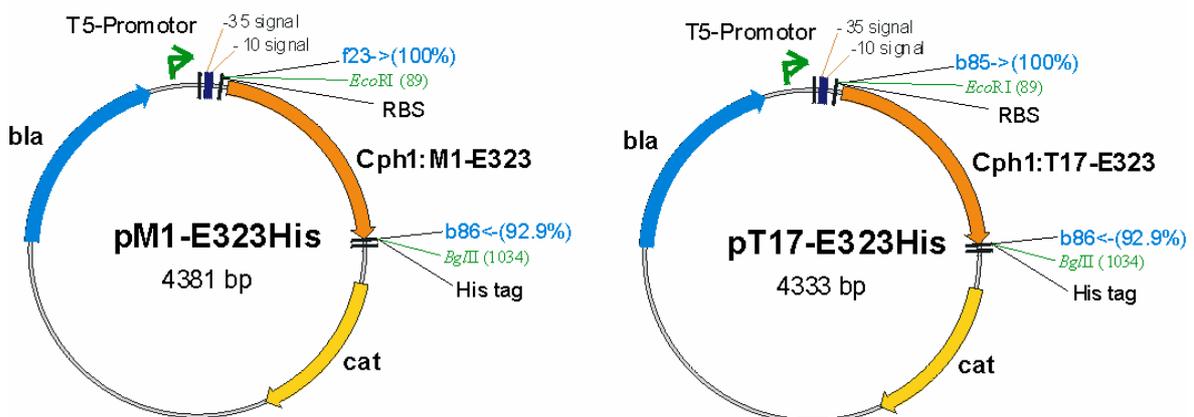


Abbildung 3: Expressionsvektoren pM1-E323 und pT17-E323 zur konstitutiven Expression des Deletionschromoproteine Cph1:M1-E323 und Cph1:T17-E323 aus Cph1.

2.6.7 Site Directed Mutagenesis über PCR

Es handelt sich hierbei um die gezielte Veränderung ausgewählter Nukleotide des Expressionsplasmids für das *Synechocystis* Phytochrom Cph1, um eine Punktmutation durchzuführen. An dem 5'-Ende der einzusetzenden Primer waren die mutierten Nukleotide. Die 3'-Enden der Primer wiesen in entgegengesetzte Richtungen, so dass durch die PCR der gesamte Vektor amplifiziert wird. Nach dieser inversen PCR mit TaKaRaEx Polymerase wurde das Amplifikat für 30 min bei 72 °C mit Vent-Polymerase behandelt, um die zusätzlichen Adeninreste am 3'-Enden zu entfernen. Nach Reinigung und Phosphorylierung des 5'-Endes wurde ü. N. ligiert. Danach wurde für den Verdau von methylierten Produkten DpnI nach Angabe des Herstellers verwendet.

In das Cph1-Expressionsplasmid pF10-His wurden einzelne Punktmutationen im Codon 323, 472 und 520 eingefügt. Mit der oben beschriebenen Methode wurden das Glutamat (E) und das Arginin (R) gegen Aspartat (D), Prolin (P) oder Alanin (A) getauscht. Die SDM wurde mit den Primer b34-b35 (E323D), b36-b35 (E323P), b42-b43 (R472A), b44-b43 (R472P), b45-b46 (R520A) und b47-b46 (R520P) durchgeführt. Die resultierenden Plasmide pCph1:E323D, pCph1:E323P, pCph1:R472A, pCph1:R472P, pCph1:R520A und pCph1:R520P wurden über PCR-screening der Kolonie, Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert.

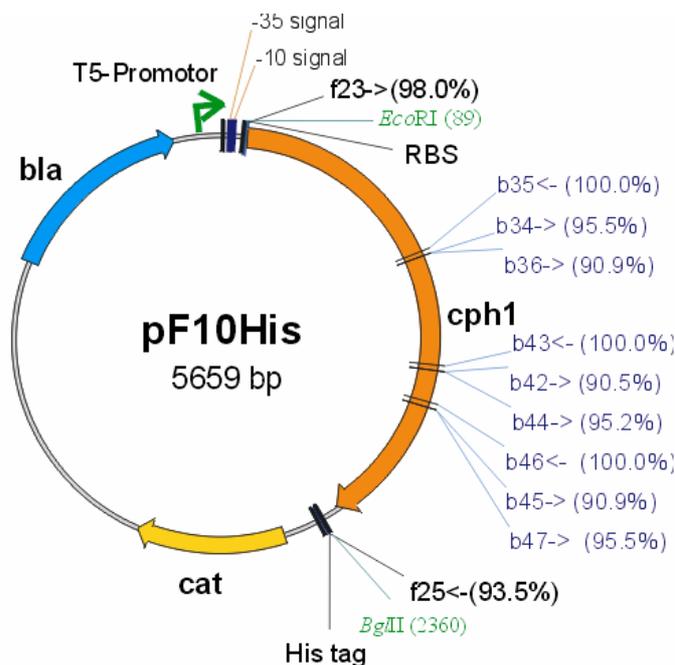


Abbildung 4: Verwendete Cph1-Expressionsvektormodell zur konstitutiven Expression der mutierten Phytochrome: Cph1E323D, Cph1E323P, Cph1R472A, Cph1R472P, Cph1R520A und Cph1R520P. Die punktmultierten Gene wurden zwischen *EcoR* I und *Bgl* II stromabwärts bzw stromvorwärts des T5-Promoter ligiert

2.6.8 Transformation von Bakterien

Die Transformation von DNA in das Bakterium *E.coli* erfolgte mittels Elektroporation (Easyject PLUS Elektroporator, PeqLab) nach Dower (Dower et al., 1988; Miller et al., 1988). Die *E.coli*-Rosetta-gamiTM(DE3)pLacI gekauften kompetenten Zellen (Novagen Kit Competent Cells, Madison, USA) wurden nach Anleitung des Herstellers chemisch transformiert.

2.6.8.1 Elektrokompetente Zellen

Die elektrokompetenten Zellen wurden nach Sambrook und Russel (Sambrook et al., 1989) hergestellt. Die modifizierten Zellen sind in 500 ml LB Medium über Nacht bei 18-20 °C bis zur OD₆₀₀ von 0.4-0.7 gewachsen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet dreimal in eiskaltem Wasser gewaschen und abschließend in 4 ml eiskaltem 7 % DMSO in H₂O resuspendiert. Die Bakterien wurden aliquotiert und bei -70 °C bis zur Transformation gelagert.

2.6.8.2 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden Küvetten mit 0.2 cm Elektrodenabstand (BioRad) verwendet. Eine Transformation erfolgte mit folgenden Parametern: U = 2000 V; R = 200; Kapazität = 25 µF; Pulsdauer = 5 ms. Nach der Transformation wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium (s. 2.3.3.3) gegeben und 1h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf die entsprechende Platte gegossen und 15-24 h bei 37 °C inkubiert.

2.6.8.3 Screening von *E.coli*-Kolonien

Die Analyse von *E.coli*-Kolonien wurde mit Hilfe einer PCR-Reaktion durchgeführt (Marchuk, 1991). Die selektierten Bakterien-Kolonien wurden als *template*-DNA mit Zugabe von 20 µl PCR-Master-Mix (Polymerase, dNTPs, H₂O und Polymerase-Puffer) und zwei passenden Primern verwendet. In der Regel wurden von 3-5 positiven Kolonien Stammkulturen angesetzt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium-Ampicilin mit den Zellen beimpft und diese bei 37 °C ü.N. wachsen gelassen. Von dieser Kultur wurden 850µl mit 150 µl Glycerin gemischt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.6.9 Verwendete Primer

a19: GCGTTCTGAACAAATCCAG

b34: GATACCTTCGATTACCGGGTGC

b35: CGTATCTTCCTGGGCGGA

b36: CCAACCTTCGATTACCGGGTGC

b42: GCCCAATCCTTTGACCTCTGG

b43: GGGATGGAGCTCGATTTTACC

b44: CCCCAATCCTTTGACCTCTGG

b45: GCCAACTTGGAACGCTCCAACG

b46: GGCTAACTGGGCCAATTCTTC

b47: CCCAACTTGGAACGCTCCAACG

b58: GGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGCAAAGAGAGCGGCTGGAG

b59: GGGAGATCTGGCAATTTTTTCCTCTTCAACTTTC

b69: GGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGTTGCCTGAACTCAGACCC

b70: GGGAGATCTTCCGCCATTGCGATATGCACC

b71: GGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGAGCTATAATTTTCAGGG

b72: GGGAGATCTGTTGGTCAGTAGAAACTCATTC

b77: GGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGGCTGGCCAGGATCC

b78: GGGAGATCTGGCCGCCATCACACCCC

b85: GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGGAAACCCTCGCCATCCAC

b86: GGGAGATCTTTCCTGGGCGGAAATGTTG

b89: GGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGGAGGCAAGCAGGCTTC

b90: GGGAGATCTGTCCAGAGGAAAGATAACCC

f23: GGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTA ACTATGGCCACCACCGTACA ACTCG

f25: GGGAGATCTGTTGCCAATGGGGATGGAGAAG

j116: GATAACAATTTACACAGAATT

2.7 Expression, Extraktion und Reinigung

Diese Methode diente a priori der Expression größerer Mengen nichtaggregierten Proteins für mögliche künftige Kristallisierung. Die Extraktion und Reinigung von Cph1 und Agp1 erfolgte unter Abänderungen nach (Lamparter et al., 1997). Die bei -70 °C aufbewahrten Stammkultur wurde auf einer LB/Amp-Agarplatte ausgestrichen. Mit der Spitze einer sterilen Impföse wurden die Zellen auf die Platte überführt. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert. Sowohl optimale Temperaturen, Sauerstoffbedarf und Inkubationszeit während des Wachstums, als auch optimale IPTG- Konzentration für die beste Induktion des Proteins wurden untersucht. Während der Expression wurde immer steril gearbeitet. Alle spektralen Messungen wurden mit einem Uvikon 941 oder einem Uvikon 931 Spektrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) durchgeführt.

2.7.1 Expression von den Phytochromen Cph1 und Agp1

Die hier verwendeten Platten und Medien erhielten Ampicillin und Tetracyclin (s. 2.3.2). Eine Kolonie von einer Platte wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt. Damit wurden 5 ml LB-Medium beimpft. Als Kontrolle wurde LB/Amp ohne Zellen verwendet. Nach Inkubation bei 28 °C ü.N. wurden 3 ml aus der Vorkultur verwendet, um 47 ml frisches Medium in einen 200 ml Kolben zu beimpfen. Diese Kultur wurde bei 28 °C geschüttelt, bis die O.D.₆₀₀ bei 1 war. Dann wurden die Zellen auf 4 °C ü.N. abgekühlt, um das Wachstum zu stoppen. Von dieser Kultur wurden 50 ml in 1950 ml RB/Amp überführt, auf vier 2 l-Kolben verteilt und bei 28 °C weiter geschüttelt. Nach 5 h war eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0.6 erreicht. Die auf vier Kolben verteilte Kultur wurde wieder vereinigt, und die Proteinexpression mit 20 µM (Cph1) oder 84 µM (Agp1) Isopropyl β-D-Thiogalactoside (IPTG) induziert. Die 2 l Kultur wurde auf acht 2 l-Kolben verteilt und bei 18 °C (Cph1) oder 20 °C (Agp1) in einem Wasserbad (GFL 1083, Burgwedel, Deutschland) ü.N. geschüttelt. Die OD₆₀₀ sollte nach etwa 15 Stunden nicht über 1.0 liegen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen für die Extraktion gesammelt.

2.7.2 Extraktion und Reinigung von den Phytochromen Cph1 und Agp1

Die Zellen wurden in einer Sorvall Zentrifuge mit einem GS3 Rotor bei 6000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die gesamte Extraktion und Reinigung wurde auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde vom Überstand getrennt und in 250 ml Waschpuffer (s. 2.3.3) mit Hilfe eines Homogenisators resuspendiert. Danach wurde 5 min bei 8000 g

zentrifugiert. Die Zellen wurden in 40 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Wenn Cph1 als Holoprotein gereinigt wurde, fand die Extraktion in Gegenwart von gereinigtem PCB oder PEB (s. 2.2) (Endkonzentration 20 μ M) statt. Die Zelle wurden mit Hilfe eine *French pressure cell* (SLM Aminco FA 030, USA) 2 Mal bei 130 MPa extrahiert. Die zerstörten Zellen wurden für 20 min bei 25000 g zentrifugiert. Vom Pellet und Überstand wurden ca. 300 μ l-Aliquote entnommen, um den Aufschluß mittels SDS-PAGE Elektrophorese zu kontrollieren.

2.7.2.1 Ammoniumsulfat Fällung

Anschließend wurden die Proteine des Überstandes mit Ammoniumsulfat gefällt (s. 2.3.5). Dadurch wird EDTA entfernt, welches bei der Affinitätschromatographie stört. Außerdem werden das gewünschte Protein weiter gereinigt und konzentriert. Für die Fällung von Cph1 und Agp1 wurden 1:1 bzw. 1:2 EDTA-freier-Ammoniumsulfatpuffer (s. 2.3.5) verwendet. Die Probe wurde für 20 min bei 15000 rpm (SS-34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes erneut kurz zentrifugiert, so dass die restliche Flüssigkeit besser entfernt werden konnte. Das Pellet wurde in 30 ml Equilibrierungspuffer resuspendiert und für weitere 20 min zentrifugiert.

2.7.2.2 Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie

Eine 30 ml Nickel-NTA Säule (6 x 3 cm) (Qiagen GmbH, Deutschland) wurde nach Anleitung des Herstellers regeneriert und mit ca. 150 ml Equilibrierungspuffer (s. 2.3.6) gespült. Für die Chromatographie wurde eine Pumpe (Bio-Rad Econo Pump,) verwendet. Die Geschwindigkeit war 3 ml/min (0.05 bis 0.1 Volumen der Säule / min). Die Proteine wurden mit einem an die Pumpe angeschlossenen UV-Monitor (Bio-Rad Econo UV Monitor) detektiert. Durchlauf, Waschfraktionen und Eluat wurden mit einem Fraktionssammler (FRAC-100, Pharmacia Biotech) in 15 ml Glasröhrchen (10 ml /Fraktion) gesammelt. Da Imidazol die native Struktur des Phytochroms beschädigen kann, ist es wichtig, dass die eluierten Proteinfractionen (OD_{280} ca. 1) sofort nach der Elution vereinigt und durch eine (in der 2.3.6 genannten Konzentration) Ammoniumsulfatfällung mit EDTA-haltigem-Ammoniumsulfatpuffer konzentriert und umgepuffert werden. Für die Bestimmung der Konzentration des Proteins (1 Extinktions-Einheit = 1 mg / ml) wurde ein 1:50 verdünntes Aliquot verwendet. Alternativ wurde der Phytochromgehalt bei dem Holoprotein über ein Differenzspektrum bestimmt. Schließlich wurden in der Regel 10 bis

15 mg/ml Phytochrom in Extraktionspuffer eingesetzt. Das Endvolumen (10-15 ml) wurde auf 1.6 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 25000 g für 3 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 70 °C gelagert.

2.7.2.3 Präparative Gel-Filtrationschromatographie

In manchen Fällen wurde Phytochrom aus der letzten Ammoniumsulfatfällung über Gelfiltration gereinigt. Diese Reinigung wurde von dem technischen Assistenten Norbert Michael durchgeführt. Eine 2.6 x 95 cm Glassäule wurde mit Sephacryl S-300 HR (Pharmacia Amersham) nach Anleitung des Herstellers gefüllt. Das nach Affinitätschromatographie in Ammoniumsulfat gefällte Phytochrom wurde in 7-15 ml Laufpuffer (8-12 mg/ml) (s. 2.3.9) aufgenommen und für 10 min bei 25000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Equilibrierung der Säule mit Laufpuffer bei einer Flussrate von 46 ml/h, wurde der Überstand aufgetragen. Der Durchlauf wurde mit einem an einen Y/t-Schreiber (Bio-Rad) UV-Monitor (Bio-Rad Econo UV Monitor) verfolgt und auf einem Fraktionssammler (FRAC-100, Pharmacia Biotech) in Fraktionen a ca. 10 ml gesammelt. In der Regel wurde nur die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration (3-6 mg/ml) verwendet. In manchen Fällen wurden die Fraktionen mit einer Extinktion bei 280 nm größer als 1 vereinigt und erneut aufgetragen. Die Trennung erfolgte über Nacht in einer auf 4 °C gekühlten mit grünem Sicherheitslicht ausgestatteter Klimakammer.

2.7.2.4 Dokumentation der Extraktion und Reinigung

Die folgenden Aliquote wurden von jedem Schritt der Extraktion und Reinigung genommen: Die Proteinkonzentration von jeder Probe wurde zur Ausbeuteberechnung nach Bradford (Bradford, 1976; Spector, 1978) bestimmt. Außerdem wurden SDS-PAGE und UV-VIS Spektroskopie mit allen Proben zur Reinheitsbestimmung durchgeführt. Für die Durchführung des SDS-PAGE wurde ein 100 µl Aliquot mit 50 µl 3x Probenpuffer verwendet. Im Fall der Holoproteine wurde der Laufpuffer nach Zugabe von 1 mM Zinkacetat verwendet. Das Zink bindet am Chromophor (Berkelman und Lagarias, 1986), reduziert die gesamte Ladung von dem SDS-Holoprotein-Komplex (Wang et al., 1991) und UV-Illumination induziert die Tetrapyrrolfluoreszenz. Anschließend wurde das elektrophoretisch aufgetrennte Phytochrom mit Coomassie (s. 2.3.12) gefärbt und in Cellophan getrocknet.

Schritt	Probe	Volumen (μl)
Nach <i>French Pressure Cell</i>	Pellet	300
	Überstand	300
Nach erster Ammoniumsulfat Fällung	Pellet	300
	Überstand	300
Nach Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie	Durchlauf	300
	Waschlauf	300
	Eluat (Pool)	50
Nach zweiter Ammoniumsulfat Fällung	Überstand	20

2.8 Analytische Gel-Filtration

Für die Durchführung der Gelfiltration (GFC) wurde eine Superdex-Säule (Superdex 200 HR 10/30, Amersham/Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Säule war an eine peristaltische Pumpe (Pump P-500 Pharmacia Biotech, Deutschland) angeschlossen. Die Flussrate wurde auf 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ gesetzt. Die Proteine wurden über eine 200 μl -Schleife injiziert und auf die Säule aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit einem hinter der Säule angeschlossenen UV/VIS-Monitor (GAT LCD 501, Gamma Analysen Technik GmbH, Deutschland). Die Absorption wurde bei 280 nm, 579 nm, 655 nm oder 700 nm gemessen und mit einem Y/t-Schreiber aufgezeichnet. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (Model 2110 Fraction Collector, Bio-Rad) gesammelt. Das System wurde regelmäßig mit den folgenden Proteinmarkern kalibriert: Cytochrom C (12.4 kDa), Carbonic Anhydrase (29 kDa), BSA (66 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), β -Amylase (299 kDa) und Apoferritin (443 kDa) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Das Totvolumen der Säule wurde mit Blue Dextran 2000 (2 MDa) (alle von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ermittelt. Die Säule wurde nach 8-10 Verwendungen mit NaOH und HCl nach Anleitung des Herstellers regeneriert.

2.9 Präparative Native Elektrophorese: *Prep Cell*

Für die präparative native Elektrophorese wurde eine Apparatur von BioRad (*Prep Cell* Model 491, BioRad, Hercules, CA, USA) verwendet. Die hier beschriebene Elutionselektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V durchgeführt. In der Regel wurden 50 ml Trenngel-Stammlösung ohne SDS 24 h vor Verwendung in einen doppelwandigen Zylinder mit 37 mm Innendurchmesser gegossen und bei 4 °C gelagert. Das Giessen erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

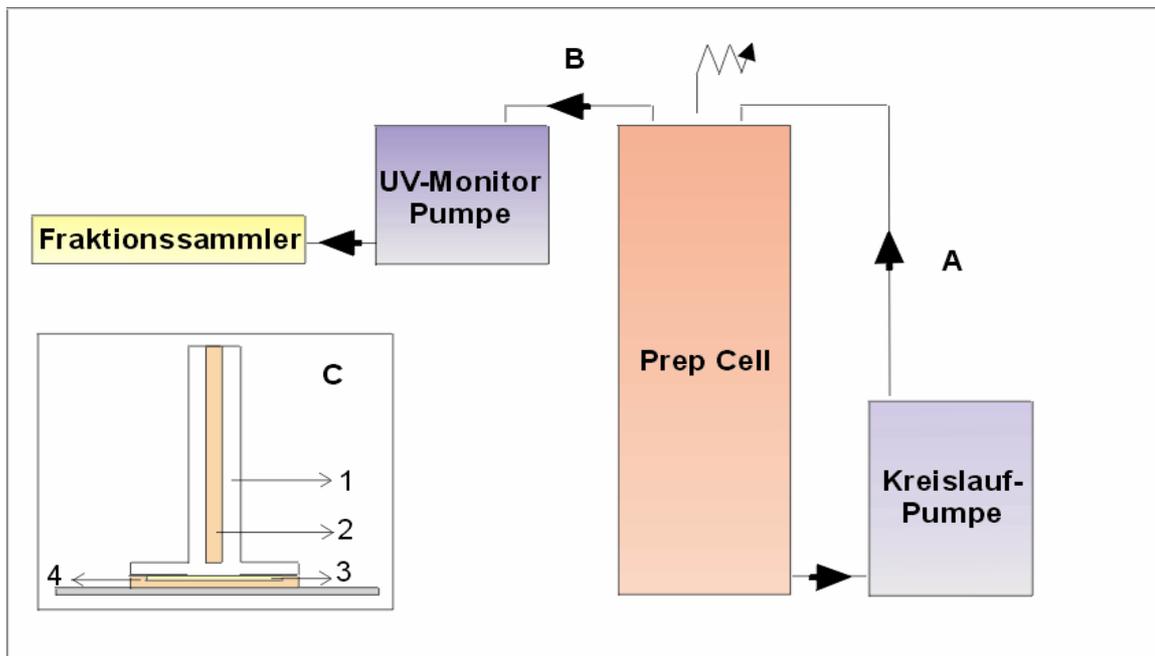


Abbildung 5: Schema einer präparativen Elektrophorese (*Prep Cell*). Die Pfeile zeigen die Flussrichtung des Laufpuffers (A) und der Probe (B) an. In C wird die Zusammensetzung der Säule mit dem inneren Zylinder (2) und der Gelmatrix (1) gezeigt. Die Membran (3) wird zwischen die Gelmatrix (1) und einer Polyethylen-Fritte (4) eingebaut. Die Elektrophorese wurde bei 4 °C für ca. 15 h bei 200 V durchgeführt.

Da die Moleküle durch die zylindrische Gelmatrix wanderten, wurden die Peptide in ringförmigen Banden getrennt. Jede Bande floß in eine Kammer, welche aus einer schmalen Polyethylen-Fritte mit einer Membran bestand. Elutionspuffer (s. 2.3.14) floss in die Fritte. Mit Hilfe einer Kreislauf-Pumpe, die den Laufpuffer durch den Zylinder fließen ließ, blieb die innere und äußere Temperatur des Gels konstant. Die eluierten Peptide wurden durch einen UV-Monitor (Econo UV-Monitor, Bio-Rad) mit Hilfe einer peristaltische Pumpe (Econo Pump, Bio-Rad) geführt und in 10 ml Glasröhrchen mit

einem Fraktionssammler (FRAC-100, Pharmacia Biotech) bei 1 ml/min eingesammelt (Abbildung 9). Die Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden vereint und mittels Ultrafiltration mit einer Centriprep-10 Patrone (Filtron, Northborough, MA, USA) bis ca. 2 mg/ml konzentriert. Um die Probe umzupuffern, wurden NAP-10 Säulen (Amersham Pharmacia) verwendet. Elutionselektrophorese, Konzentrierung und Umpufferung wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.10 Proteolyse von Cph1

Die limitierte Proteolyse wurde hauptsächlich, wie bei Nakazawa et al. (1993) beschrieben, durchgeführt. Die Proteolyse erfolgte in einer auf 18 °C temperierten mit grünem Sicherheitslicht ausgestatteten Klimakammer. Die Proben wurden bis zur Bestrahlung und zum Verdau ständig auf Eis gelagert.

2.10.1 Enzymvorbereitung

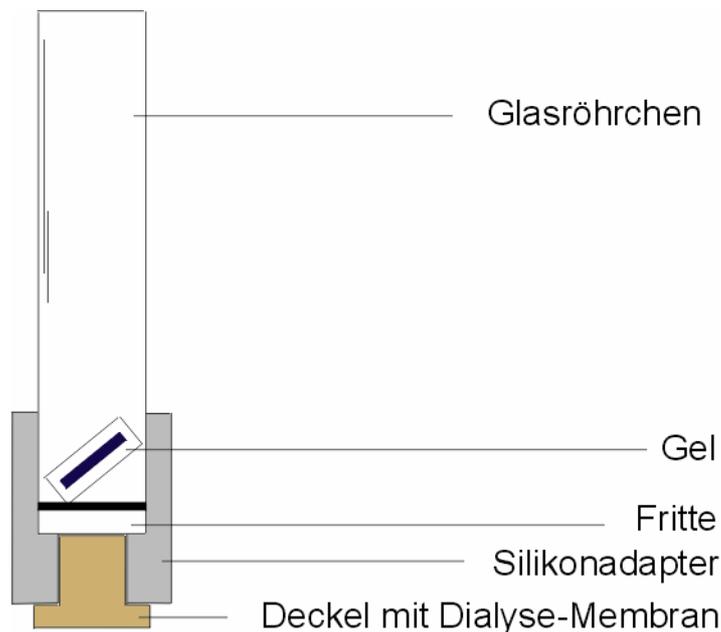
Für die Proteolyse wurden die Endopeptidasen Trypsin (TPCK-behandelt) aus Rinderpankreas; Sigma, Deutschland), Endoproteinase Glu-C (V8) (aus *Staphylococcus aureus* Stamm V8 Typ XVII-B; Sigma), Subtilisin (Typ XXVII; Sigma) und Thermolysin (aus *Bacillus thermoproteolyticus rokko* Typ X; Sigma) verwendet. Die Endkonzentration der Proteasen war 5 µg/ml Trypsin, 0.75 µg/ml Subtilisin, 5 µg/ml V8 bzw. 0.5 mg/ml Thermolysin. Die Enzyme Trypsin, Subtilisin und Thermolysin wurden kurz vor Verwendung in Wasser gelöst und sofort eingesetzt. V8 wurde aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.10.2 Verdau des prokaryotischen Phytochrom Cph1

Gereinigtes Cph1 wurde mit Basispuffer auf 1.2-1.5 mg/ml verdünnt und für 5 min bei 51000 g und 4 °C zentrifugiert. Vor Zugabe der Protease wurde Cph1 entweder mit Hellrot- ($32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}} 730 \text{ nm}$) oder Dunkelrot-Licht ($68 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; $\lambda_{\text{max}} 654 \text{ nm}$) für 10 min bestrahlt. Der Verdau wurde im Dunkeln durchgeführt. Für lange Inkubationszeiten wurden die Proben in eine Dunkelbox gestellt. Aliquote wurden zu verschiedene Zeiten entnommen und mit dem gleichen Volumen 3x Probenpuffer (s. 2.3.12) gestoppt. Anschließend wurden die Proben auf einem SDS-PAGE oder NuPAGE-Gel mit HMW-, LMW- oder Mark 12-Marker aufgetragen.

2.11 Elektroelution

Für Massenspektrometrieanalysen wurden Peptide aus einem SDS-Gel eluiert. Für diesen Zweck wurde ein Elektroelutionsgerät (Model 422 Electro-Eluter, Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Nach Anfärben des Gels wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und zusammen mit 600 µl Elutionspuffer in Elutionsröhrchen gegeben. Jeder einzelne Behälter bestand aus einem Elutionsröhrchen (1 cm breit x 6 cm hoch), einem Polyethylen-Deckel mit einer Dialysemembran, einer Fritte und einem Siliconadapter (s. untere Abbildung). Die Deckel wurden mindestens 1h vor Verwendung bei 60 °C in Elutionspuffer (s.2.3.13) eingeweicht und nach Ablauf des Versuchs in Elutionspuffer mit 0.05 % NaN₃ bei 4 °C aufbewahrt. Da die Gefahr bestand, dass Luftblasen auf der Dialysemembran bleiben, wurden Deckel und Adapter erst zusammen gebaut und dann mit Elutionspuffer gefüllt. In eine Kammer konnten bis zu 6 Dialysebehälter eingebaut werden. Anschließend wurde die Kammer mit 600 ml Puffer gefüllt.



Für die Elektroelution der verschiedenen Cph1-Verdaufragmente wurde ein 13 %iges SDS-Gel verwendet. Nach Coomassiefärbung wurden die Fragmente herausgeschnitten. Die etwa 3 mm breiten und 7 mm langen Gel-Stücke sedimentierten in dem mit Elektroelutionspuffer gefüllten Behälter. Die Elution wurde bei 8-10 mA / Behälter für 5 h durchgeführt. Nach vollständiger Entnahme des Puffers wurden 400-600 µl Elutionsprobe

aus der Dialyse-Membran in ein 1.6 ml Reaktionsgefäß überführt. Weitere 200 µl Elutionspuffer wurden für die Spülung der Membran verwendet und zur Elutionsprobe dazugegeben. Da SDS bei der Massenspektrometrie stört, wurde der Elutionspuffer durch 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA-Wasser) in einem Ultrazentrifugation Filter (Centrex UF-2, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) bei 4 °C und 5000 g ausgetauscht. Die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -70 °C gelagert.

2.12 Micro-HPLC angeschlossen an ein Ion Trap Tandem Massenspektrometer

Die Messungen wurden von Dr. Joaquín Abián und der wissenschaftlichen Mitarbeiterin Montserrat Carrascal (Unidad de Espectrometría de Masas Estructural y Biológica. Departamento de Bioanalítica Médica, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC-IDIBAPS, España) durchgeführt. Die Probe wird auf eine microHPLC (Carrascal et al., 2002) appliziert, welche direkt danach in einem Finnigan LCQ *ion trap* Mass Spektrometer (ThermoQuest, Finnigan MAT, San Jose, CA) eingeführt wurde. Als Interfase wurde eine ESI (*Electrospray Ionization*) verwendet (Abb.10). Die Aufbau der Interfase wurde bei Carrascal *et al.* 2002 beschrieben.



Abbildung 6: Schema eines Ion-Trap Tandem Massenspektrometers.

Vor der Messung wurden alle Proben (elektroeluierte Proben wie in 2.11.1 oder direkt aus dem SDS-PAGE Gel ausgeschnitten) mit 10 mM DTT und 55 mM Iodacetamid versetzt. Mit DTT werden die Proteine reduziert, während Iodacetamid eine Alkylierung durchführt. Danach wurde die Probe mit Trypsin (Promega, Madison, WI) nach konventioneller Angabe verdaut. Die Messungen wurden nach Carrascal et al. (2002) durchgeführt.

2.13 Phosphorylierung

Die Autophosphorylierung wurde nach Yeh *et al.* (Yeh et al., 1997) durchgeführt. Zunächst wurden die vorher chromatographisch gereinigten Peptide für 5 min bei 51000 g und 4 °C zentrifugiert, um die möglichen Einschlusskörper, die sich durch das Einfrieren-Auftauen Vorgehen bildeten, zu entfernen. Die Konzentrationen alle Peptide wurden spektral bei 280 nm mit einem Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Je nach Konzentration des Proteins wurde mit Basispuffer (s. 2.3.5) verdünnt oder mit 10-30 kDa Ultrazentrifugation Filter (Centrex UF-0.5, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) bei 4 °C und 5000 g konzentriert. Die Phytochrome (10 µM) wurden mit 4 µM PCB oder BV assembliert. Nach einer 1:50 Verdünnung der Stammkonzentration der Biline wurden davon 50 µl zu 500 µl Apophytochrom gegeben. Für Proben mit Überschuss von Bilinen wurden 50 µl Chromophor aus 20 µM Bilin zu 200 µl Apophytochrom gegeben. Cph1 wurde mit Rot- oder Dunkelrot-Licht bis zur Sättigung bestrahlt, während Agp1 nicht bestrahlt wurde. Für die Bestrahlung wurden Leuchtdioden (Emission Maximum: 660 bzw. 730 nm) verwendet. 5µl Phytochrom wurden zu dem entsprechenden Volumen Phosphorylierungspuffer (Mastermix mit 0.1 MBq [γ - 32 P]ATP-Endkonzentration) gegeben (Tabelle 3) und für 30 min im Dunkeln und bei RT inkubiert..

	A (µl)	B (µl)	C (µl)	D (µl)
Phytochrom nach HR	5		5	
Phytochrom nach DR		5		5
Responsregulator			5	5
Basispuffer	5	5		
Mastermix	10	10	10	10
Probenpuffer	10	10	10	10

Tabelle 3: Zusammensetzungsschema nach Bestrahlung des Holophytochroms mit Dunkelrot oder Hellrotlicht und Zugabe von Mastermix und Responsregulatoren oder Basispuffer. Nach der entsprechende Inkubationszeit wurde der Probenpuffer zugegeben.

Das Volumen des Phosphorylierungspuffers variierte in Bezug auf das Vorhandensein von anderen Peptiden. Die Reaktionen wurden mit Probenpuffer (s. 2.3.12) gestoppt. Die

Peptide wurden in einem SDS-Gel getrennt. HMW, LMW oder PMS wurden als Marker verwendet. Die Phosphorylierung erfolgte unter grünem Sicherheitslicht. Die Proben wurden bis zur Bestrahlung auf Eis gelagert. Die elektrophoretisch aufzutrennenden Peptide wurden auf eine 8 x 6 cm große PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) mit Hilfe einer Blott-Apparatur (OWL Separation Systems, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) transferiert. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung in 100 % Methanol getaucht und in TGM-Puffer (s. 2.3.16) equilibriert. Parallel dazu wurden vier gleichgroße Filterpapierstücke (Millipore, Deutschland) mit TGM-Puffer befeuchtet. Die Anordnung der verschiedenen Komponenten ist in der Abbildung 11. dargestellt. Nach ca. 30 min Transfer bei 700 mA wurde die Membran bei 30 °C getrocknet und auf eine 20 x 40 cm große Phosphoimager-Platte (Imagin Plate BAS-MP 2040S, Fujifilm) gelegt. In manchen Fällen wurde die Membran geteilt und vor dem Auflegen in 1M HCl, 3M KOH oder Trispuffer (pH 7.4) inkubiert.

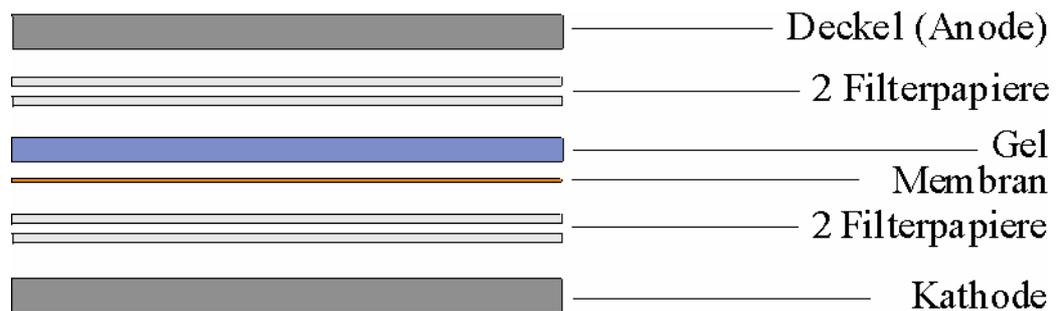


Abbildung 7: Reihenfolge der verschiedenen Schichten für *Western-Blotting*. Um die Akkumulation von Luftblasen zu vermeiden, wurde TGM-Puffer zwischen die Schichten gegeben.

Für die Detektion eines radioaktiven Signals wurde ein von Prof. Dr. Regina Hengge-Aronis (Abteilung Mikrobiologie, Freie Universität, Berlin) zur Verfügung gestellter *Fluorescent image analyzer* (FLA 2000, Fuji) verwendet. Die Signalstärke wurde durch entsprechende Software quantifiziert. Alternativ wurde die PVDF-Membran auf einen Photofilm (ILFORD, ILFOSPEED RC 153-24M, Cheshire) gelegt. Dieser wurde fixiert und entwickelt (Fixier und Entwickler, Kodak, Frankreich). Je nach Intensität des radioaktiven Signals lag die Expositionsdauer zwischen 1 min und 24 h.

2.14 Kristallisationstest

Die Standard Kristallisations *Screening*- Test I und II (Jancarik und Kim, 1991) wurden mit PCB-Cph1 und PEB-Cph1 durchgeführt. Dafür wurden 3 μl Probe mit 3 μl der entsprechenden Lösung gemischt. Die 6 μl wurden auf ein Deckglas pipettiert, welches jeweils ein Well einer Multiwellschale mit der Probe nach unten abdeckte. Jedes Well enthielt 800 μl einer entsprechenden Lösung. Die Vorbehandlung der Deckgläsern erfolgte nach einer Standardprozedur entsprechend der Vorschrift des *Screening*-Tests. Die Proben wurden im Dunkeln bei 15 °C stehengelassen.

