

# DER MECHANISMUS DER PHOTOADDUKTBILDUNG IN LOV-DOMÄNEN



## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät IV  
- Chemie und Pharmazie -  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Karin Lanzl**  
aus Wald

Regensburg, 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 17.06.2009

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Bernhard Dick

**Prüfungsausschuss:**

Vorsitzender: Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Prof. Dr. Bernhard Dick

Prof. Dr. Claudia Steinem

Prof. Dr. Günter Hauska

NULLUS EST LIBER TAM MALLUS,  
UT NON ALIQUA PARTE PROSIT.

Plinius der Jüngere  
*Epistolae III, 5*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1 Von Phot-Proteinen ausgelöste biologische Prozesse . . . . .	5
1.2 Flavin als Kofaktor . . . . .	7
1.3 Phot aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . . . . .	8
1.3.1 Aufbau, Sequenz und Struktur . . . . .	8
1.3.2 Der Photozyklus . . . . .	10
1.3.3 Der Mechanismus der Photoadduktbildung . . . . .	13
<b>2 Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>3 Materialien und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1 Puffer und Lösungen . . . . .	22
3.2 Nährmedien . . . . .	24
3.3 Chemikalien und Enzyme . . . . .	25
3.4 Plasmide . . . . .	28
3.5 Molekularbiologische Methoden . . . . .	29
3.5.1 Transformation von <i>E.coli</i> -Bakterien . . . . .	29
3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	30
3.5.3 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen . . . . .	32
3.5.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen . . . . .	33
3.5.5 Bestimmung von DNA-Reinheit und -Konzentration . . . . .	34
3.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten . . . . .	34
3.5.7 Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	35
3.5.8 Ortsgerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung . . . . .	36
3.5.9 Präparation von Plasmid-DNA . . . . .	39

3.5.10 Kolonie-PCR . . . . .	40
3.6 Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden . . . . .	41
3.6.1 Proteinexpression in <i>E.coli</i> -Bakterien . . . . .	41
3.6.2 Ernten und Aufschließen von <i>E.coli</i> -Zellen und Präparation des Cytosols . . . . .	42
3.6.3 Aufreinigung der 12-His-fusionierten Proteine . . . . .	43
3.6.4 Aufreinigung der MBP-fusionierten Proteine . . . . .	44
3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: SDS-PAGE . . . . .	45
3.6.6 Dialyse . . . . .	46
3.6.7 Ansetzen von Glycerinkulturen . . . . .	48
3.6.8 Herstellung kompetenter Zellen . . . . .	48
3.6.9 Entgasen von Proteinlösungen . . . . .	49
3.6.10 Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	51
3.7 Präparation der Methylmerkaptan-Lösung . . . . .	51
3.8 Analytische Methoden . . . . .	52
3.8.1 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie . . . . .	52
3.8.2 CD-Spektroskopie . . . . .	52
3.9 Belichtung der Proben . . . . .	52
3.10 Singulärwertzerlegung (SVD) . . . . .	53
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b> . . . . .	<b>60</b>
4.1 Präparation der Plasmid-DNA . . . . .	60
4.2 Isolierung und Charakterisierung der Protein-Domänen . . . . .	64
4.2.1 Expressionsscreening . . . . .	65
4.2.2 Expression . . . . .	68
4.2.3 Charakterisierung der Doppelmutanten durch UV/Vis-Spektroskopie . . . . .	70
4.3 Photoreduktion mit EDTA - Etablierung des Belichtungsexperiments . . . . .	73
4.3.1 Das Experiment . . . . .	74
4.3.2 Der formale Weg der Auswertung . . . . .	76
4.3.3 Diskussion . . . . .	80
4.4 Thiole in der Rolle des reaktiven Cysteins . . . . .	82

4.4.1	$\beta$ -Merkaptoethanol . . . . .	82
4.4.2	Dithiothreitol (DTT) . . . . .	85
4.4.3	Diskussion . . . . .	86
4.5	Das kleinstmögliche Merkaptan als Donor: Methylmerkaptan . . . . .	87
4.5.1	Methylmerkaptan in "kleiner" Konzentration - anaerob . . . . .	88
4.5.2	Methylmerkaptan in "großer" Konzentration - aerob . . . . .	98
4.5.3	Methylmerkaptan in "großer" Konzentration - anaerob . . . . .	102
4.5.4	Das Photoaddukt und die Massenspektrometrie . . . . .	105
4.5.5	Das Photoaddukt und die CD-Spektroskopie . . . . .	108
4.5.6	Stabilität des Photoaddukts . . . . .	110
4.5.7	Denaturieren der LOV-Domäne . . . . .	111
4.5.8	Diskussion . . . . .	115
4.6	Belichtung von LOV1 C57G in Gegenwart von Dimethylsulfid . . . . .	117
4.7	Belichtung von LOV1 C57S in Gegenwart von Methylmerkaptan . . . . .	119
4.8	Belichtung von freiem FMN in Gegenwart von Methylmerkaptan . . . . .	120
4.9	Die Mutante LOV1 C57G L101C: Belichtung ohne externen Donor . . . . .	125
4.10	Zusammenfassende Diskussion . . . . .	130
<b>Zusammenfassung</b>		<b>140</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>		<b>144</b>
<b>A Abkürzungen und Trivialnamen</b>		<b>155</b>
<b>B Symbole</b>		<b>157</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Licht ist einer der wichtigsten abiotischen Faktoren in der Natur, der das Wachstum und die Entwicklung von Organismen beeinflusst. So gewinnen Pflanzen ihre Energie durch Photosynthese [1] und sind somit auf Sonnenlicht angewiesen. Aus diesem Grund haben sie die Fähigkeit entwickelt, die Lichtverhältnisse ihrer Umgebung wahrzunehmen und diese Information dazu zu nutzen, ihre Entwicklung zu optimieren.

Die “Augen” der Organismen stellen Photorezeptoren dar - spezielle Moleküle, aufgebaut aus einem lichtempfindlichen Chromophor und einem Apoprotein. Je nach dem Bereich des elektromagnetischen Spektrums, auf den diese Proteine ansprechen, unterscheidet man bestimmte Arten von Photorezeptoren. Die Gruppe der Phytochrome reagiert auf Licht aus dem infraroten Spektralbereich [2]. Blaulichtphotorezeptoren vermitteln, wie es der Name bereits andeutet, Reaktionen auf Licht mit Wellenlängen im blauen und UV-A Bereich. Zu dieser Klasse gehört neben den Cryptochromen [3] und den BLUF-Domänen (**B**lue light **s**ensing **u**sing **F**AD) [4] die Familie der Phototropine oder Phot-Proteine [5].

Schon seit einiger Zeit sind Aktionsspektren für Prozesse bekannt, die z.B. wie das Wachstum einer Pflanze zum Licht hin der Optimierung der Photosynthesen dienen. Diese deuten auf ein Flavoprotein als Photorezeptor hin. Allerdings konnte erst 1998 ein entsprechendes Protein identifiziert werden, nämlich das Phototropin [6]. In den Folgejahren wurden durch den Vergleich von DNA-Sequenzen viele Phototropin-ähnliche Proteine gefunden, die daraufhin als Phot-Proteine bezeichnet wurden. Dabei fanden sich sowohl in höheren Pflanzen wie *Arabidopsis*, Hafer

oder Reis als auch in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* derartige Proteine. Im Farn *Adiantum capillus veneris* wurde ein chimäres Protein aus Phot und Phytochrom entdeckt. Die Phototropine der höheren Pflanzen wurden aufgrund von Sequenzanalysen in zwei Gruppen eingeteilt, Phot1 und Phot2 [7]. Diese zeigen aber in ihren Funktionen Redundanzen.

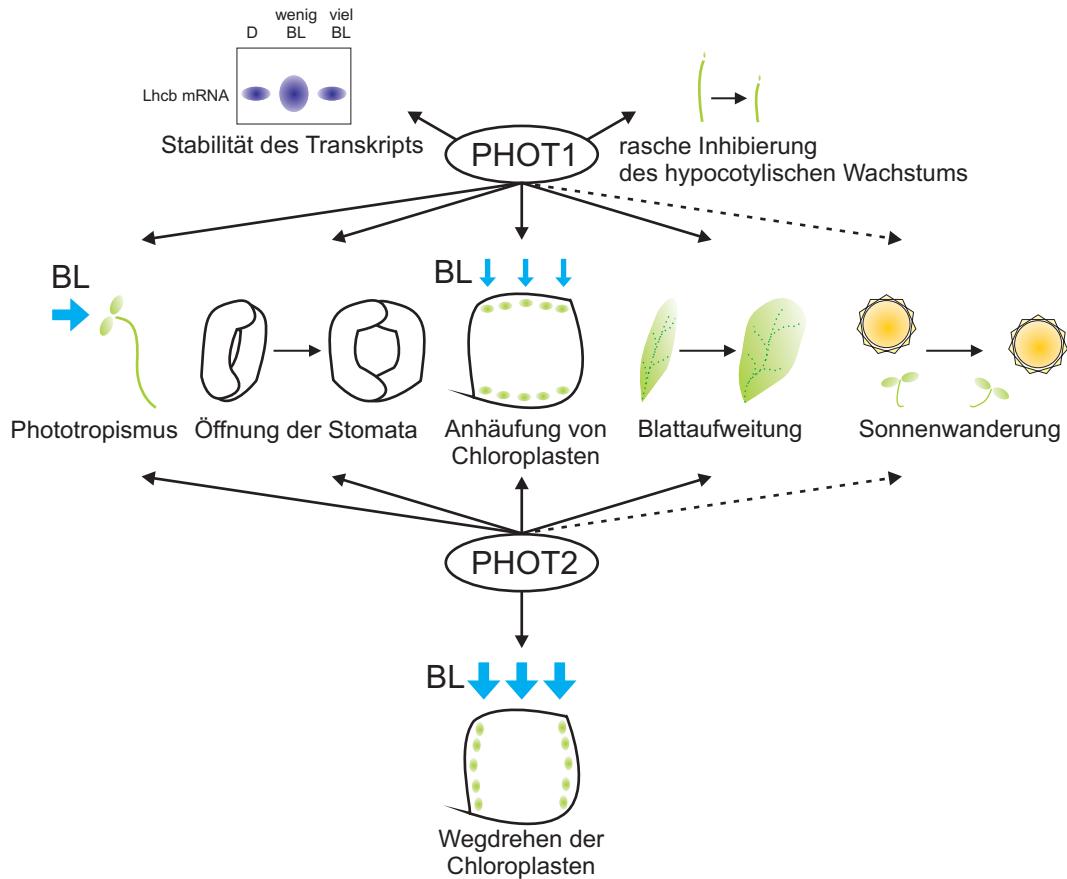
Vorliegende Arbeit präsentiert die Ergebnisse unserer Studie zur LOV1-Domäne aus dem Phot-Protein der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*. Im Folgenden soll dieses Protein zunächst näher vorgestellt werden.

## 1.1 Von Phot-Proteinen ausgelöste biologische Prozesse

Unter den Vertretern der Proteinfamilie der Phototropine wurde als erstes das Phot1-Protein aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert. Als erste von ihm ausgelöste biologische Reaktion wurde ihm das Wachstum von Pflanzen zum Licht hin zugeordnet. Auf diese als Phototropismus bekannte Erscheinung geht schließlich der Name dieses speziellen Photorezeptors zurück [8]. Im Weiteren wurden auch alle Phototropin-ähnlichen Proteine aus den verschiedensten Organismen als Phot-Proteine oder Phototropine bezeichnet.

Das namensgebende Phänomen des Phototropismus allerdings ist nicht die einzige Art von durch Licht ausgelöster Bewegung in Pflanzen. Auch auf zellulärer Ebene gibt es Bewegungen, die durch Licht initialisiert werden. Dies betrifft die Stomata von Pflanzen, also die Poren in der Epidermis, der äußersten Zellschicht von Pflanzen, über die sie z.B. Gase wie CO<sub>2</sub> mit der Umgebung austauschen. Genetische Studien haben gezeigt, dass das Öffnen dieser auch Spaltöffnungen genannten Poren wie auch der Phototropismus in *Arabidopsis* gleichermaßen durch Phot1 und Phot2 kontrolliert werden [9].

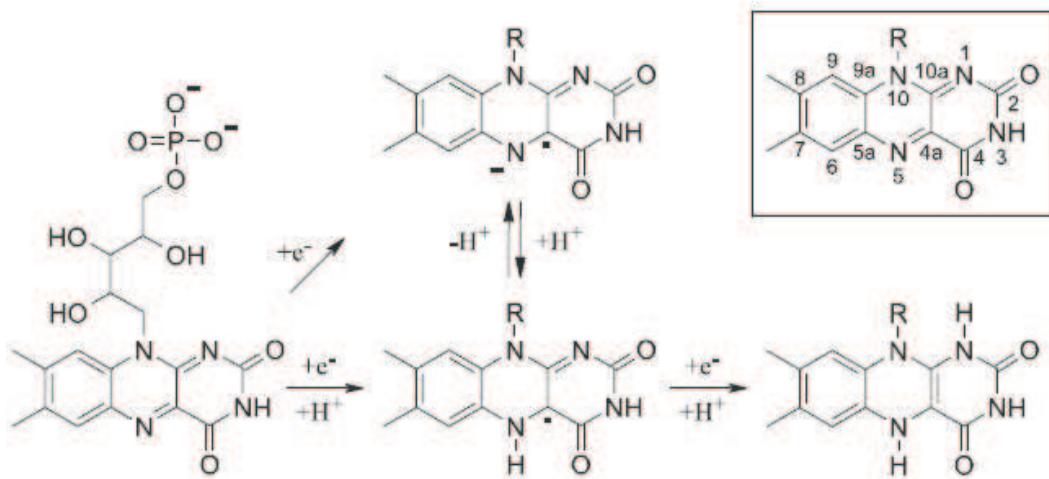
Darüber hinaus tritt durch Licht stimulierte Bewegung in Pflanzen wie *Arabidopsis* auch auf subzellulärem Level auf. So bewegen sich z. B. die Chloroplasten in den Zellen als Reaktion auf Veränderungen der eingestrahlten Lichtintensität. Bei niedriger Lichtintensität verteilen sie sich so, dass der Einfang von Licht maximiert wird. Ist die Lichtintensität dagegen hoch, dann ordnen sie sich so an, dass sie sich gegenseitig Schatten spenden, dass sie also eine mögliche Schädigung



**Abbildung 1.1:** Durch Phot1 und Phot2 aktivierte biologische und physiologische Prozesse nach [14].

durch zu große Lichtintensität vermeiden. Entsprechende Studien haben gezeigt, dass die Reaktion bei niedriger Lichtintensität (*low-light accumulation response*) von Phot1 und Phot2 aktiviert wird [10], während im Falle der Antwort bei hoher Lichtintensität (*high-light avoidance response*) ausschließlich Phot2 aktiv ist [11]. Wie der Phototropismus und das Öffnen der Stomata dient auch die Bewegung der Chloroplasten dazu, die Effizienz der Photosynthese zu regulieren.

Abbildung 1.1 skizziert die geschilderten biologischen Reaktionen schematisch und vervollständigt die Liste mit Prozessen wie z.B. dem *solar tracking* [12], der Blattaufweitung [13] und der raschen Inhibition von hypocotylischem Wachstum, auf die hier nicht explizit eingegangen wird.



**Abbildung 1.2:** Die verschiedenen Redoxzustände des FMN: Oxidiertes Flavin, Flavosemichinon-Radikal (neutral und anionisch) und Dihydroflavin. Im Kasten Nummerierung laut IUPAC.

## 1.2 Flavin als Kofaktor

Flavin ist in der Natur weit verbreitet und kommt in Form von Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>), Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) vor. Da es chemisch recht vielseitig ist, ist es in vielen Proteinen als prosthetische Gruppe eingebaut, dies zumeist nicht-kovalent. Bereits ausführlich untersucht wurde die Beteiligung von Flavoproteinen an Redoxprozessen im Dunkeln. In den Katalysezyklen der Dehydrogenasen, Disulfidreduktasen und Monooxygenasen durchläuft sein Isoalloxazinring drei Redoxzustände. Diese sind in Abbildung 1.2 zusammen mit der IUPAC-Nummerierung von Flavin gezeigt. Ebenso steuern Flavoproteine als Photorezeptoren blaulichtabhängige Prozesse, deren Mechanismen in jüngerer Zeit Gegenstand der Forschung sind.

Der bei Anwesenheit von Luftsauerstoff stabile Zustand des Flavin ist der zweifach oxidierte, das sogenannte Flavochinon. Diesem wird durch eine Absorptionsbande des konjugierten Ringsystems bei 450 nm eine charakteristische gelbe Farbe verliehen. Über eine Einelektronenreduktion wird das Flavochinon zum Flavosemichinon, dem Flavinradikal umgewandelt. Dieses ist frei in Lösung nicht über einen längeren Zeitraum stabil, es wird allerdings durch eine Proteinumgebung

stabilisiert. Es gibt zwei verschiedene Formen des Radikals: das neutrale Flavinradikal mit blauer Farbe und Absorptionsmaxima bei 570 nm und 620 nm sowie das rötlich erscheinende anionische Radikal mit einer Bande bei 490 nm [15]. Werden zwei Elektronen auf das Flavochinon übertragen, so gelangt man schließlich zum Dihydroflavin oder Flavohydrochinon. Darin ist das konjugierte System zumeist durch eine Winkelung der Struktur unterbrochen. Diese Form des Flavins ist daher farblos und absorbiert in einer unpolaren Umgebung wie im Protein bei 340-365 nm [16].

Da der Isoalloxazinring des oxidierten Flavins über weite pH-Bereiche in seiner neutralen Form vorliegt, ist das Absorptionsspektrum von FMN weitgehend unempfindlich gegenüber pH-Änderungen. Es weist nur eine relevante Protonierungsstufe mit einem  $pK_a$ -Wert von 10.3 auf, die einer Protonierung an der N(3)-Position entspricht. Der Phosphatrest des FMN ist bei neutralem pH-Wert aufgrund seiner  $pK_a$ -Werte von 2.1 und 6.2 vollständig deprotoniert [17].

Im Gegensatz dazu ist die Fluoreszenzintensität des FMN sehr wohl vom pH-Wert abhängig. In neutraler wässriger Lösung fluoresziert es relativ stark mit einem Maximum bei 520 nm und einer Quantenausbeute von 26 % [18]. Im pH-Bereich von 4 bis 9 ist diese Fluoreszenz konstant, wie am Beispiel des Riboflavin gezeigt wurde [19]. Über pH 9 bildet sich die nur schwach fluoreszierende anionische Form, während unterhalb pH 4 die Emission durch Protonierung im angeregten Zustand gequencht wird [19]. Flavoproteine fluoreszieren meist nur schwach, was durch eine Komplexbildung mit benachbarten Aminosäuren erklärt wird [20]. Auch eine Reduktion des Flavins führt zum Verlust der Fluoreszenz [16].

## 1.3 Phot aus *Chlamydomonas reinhardtii*

### 1.3.1 Aufbau, Sequenz und Struktur

Allen Phot-Proteinen gemeinsam ist ihr Aufbau aus zwei LOV-Domänen am N-Terminus und einer Serin/Threonin-Kinase am C-Terminus, wie Abbildung 1.3 schematisch skizziert. Das Akronym LOV bringt zum Ausdruck, dass solche Domänen auf externe Signale wie Licht, Sauerstoff oder ein Potenti-

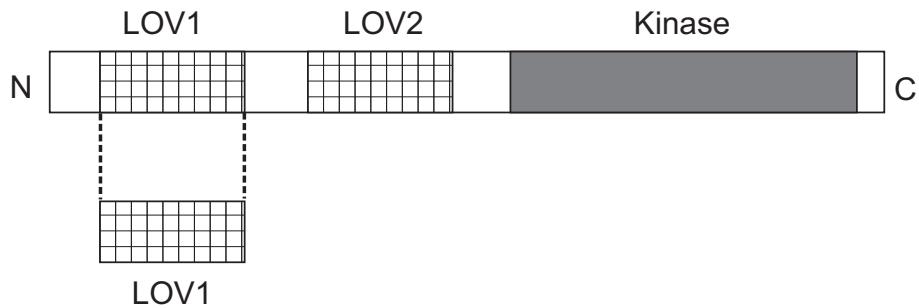


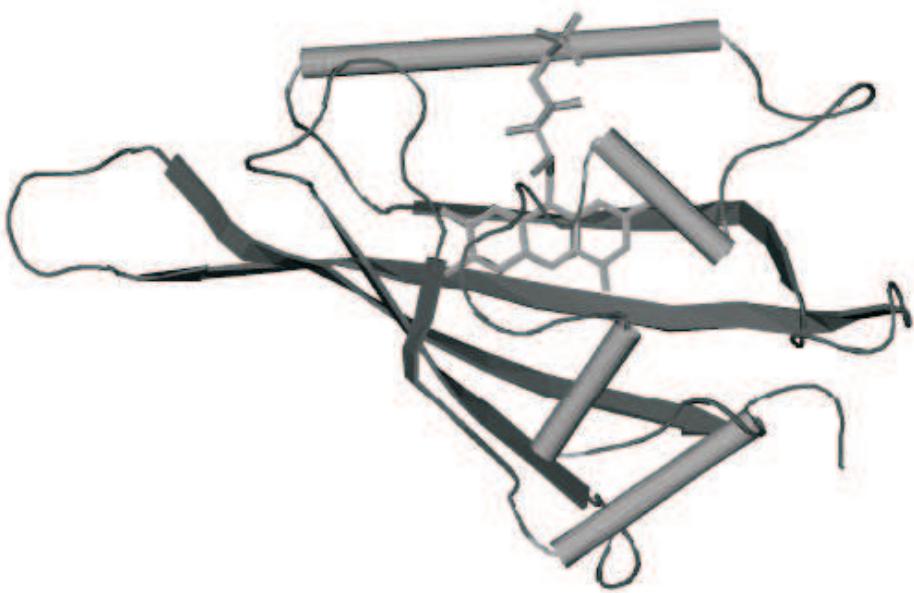
Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau des Phot-Proteins aus *Chlamydomonas reinhardtii*.

al (*light-, oxygen-, voltage-sensitive domains*) ansprechen. LOV-Domänen bilden eine Untergruppe der großen und vielfältigen Familie der PAS-Domänen (**PER/Arnt/SIM**). PAS-Domänen sind in der Natur weit verbreitet und spielen häufig eine Rolle bei der Anbindung von Kofaktoren. Jede LOV-Domäne besteht aus ca. 110 Aminosäuren und bindet ein Molekül Flavinmononukleotid (FMN) in vollständig oxidiertem Zustand nicht-kovalent als prosthetische Gruppe. Die am C-Terminus befindliche Kinase-Domäne enthält elf konservierte, für eine Kinase-Domäne typische Subdomänen [21].

In vorliegender Arbeit war ausschließlich eine einzelne LOV1-Domäne Gegenstand der Untersuchung.

Im Gegensatz zu höheren Pflanzen enthält das Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* nur ein einzelnes Gen, das für ein Phot-Protein kodiert [22]. Die Aminosäuresequenz zeigt Homologie zu Phot-Proteinen aus höheren Pflanzen, allerdings ist das Protein deutlich kleiner. Berechnet wurde eine Größe von 81.4 kDa, das isolierte Protein zeigt eine Masse von 75 kDa [23]. Mit 70 bis 80 % ist die Homologie der LOV-Domänen zu Phot1 aus höheren Pflanzen sogar recht hoch [22]. Insbesondere sind diejenigen Aminosäuren konserviert, die die Bindungstasche für den Chromophor FMN bilden. In dem bekannten, vollständig konservierten Bereich NCRLQG befindet sich auch das im weiteren Verlauf der Arbeit wichtige Cystein 57 [24].

Die Kristallstruktur der LOV1-Domäne aus *Chlamydomonas reinhardtii* wurde mit atomarer Auflösung (1.9 Å) bestimmt [24]. Sie zeigt, wie Abbildung 1.4 zu entnehmen ist, die charakteristische Sekundärstruktur der bereits genannten PAS-Domänen. Diese besteht aus drei kleineren  $\alpha$ -Helices, einem langen helicalen Ver-



**Abbildung 1.4:** Sekundärstruktur der LOV1-Domäne (PDB Nr. 1N9L).

bindungsstück und einer fünfsträngigen  $\beta$ -Faltblattstruktur. Abbildung 1.4 zeigt weiterhin, dass sich der Isoalloxazinring des Chromophors FMN im Inneren der Domäne befindet, während sein Phosphatrest an der Oberfläche liegt. Die Thiolgruppe des reaktiven Cysteins 57 weist in der Struktur zwei verschiedene Konformationen auf, in denen sie 3.5 Å bzw. 4.4 Å von der C(4a)-Position des Flavins entfernt ist.

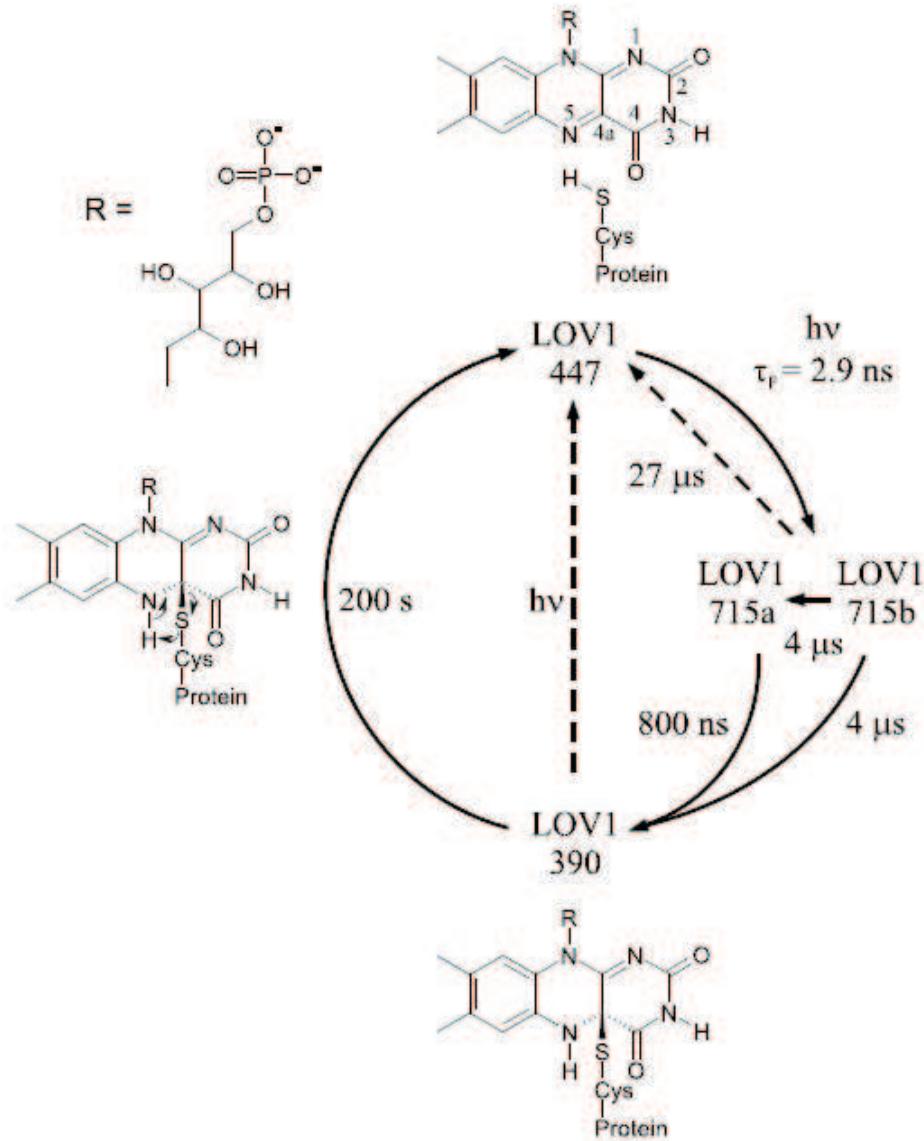
### 1.3.2 Der Photozyklus

Eine Aktivierung eines biologischen Prozesses durch den Rezeptor Phototropin kann man sich vereinfacht folgendermaßen vorstellen: Die LOV-Domänen absorbieren durch den Chromophor FMN blaues Licht. Dadurch wird innerhalb der LOV-Domänen eine Serie photophysikalischer und photochemischer Prozesse initiiert. Als Folge daraus wiederum wird eine Veränderung der Konformation der LOV-Domänen verursacht, wodurch schließlich die Kinase-Domäne aktiviert wird. Diese phosphoryliert das Protein an bestimmten Aminosäureresten, es kommt also zu einer Autophosphorylierung [25]. Der genaue Weg der Signal-

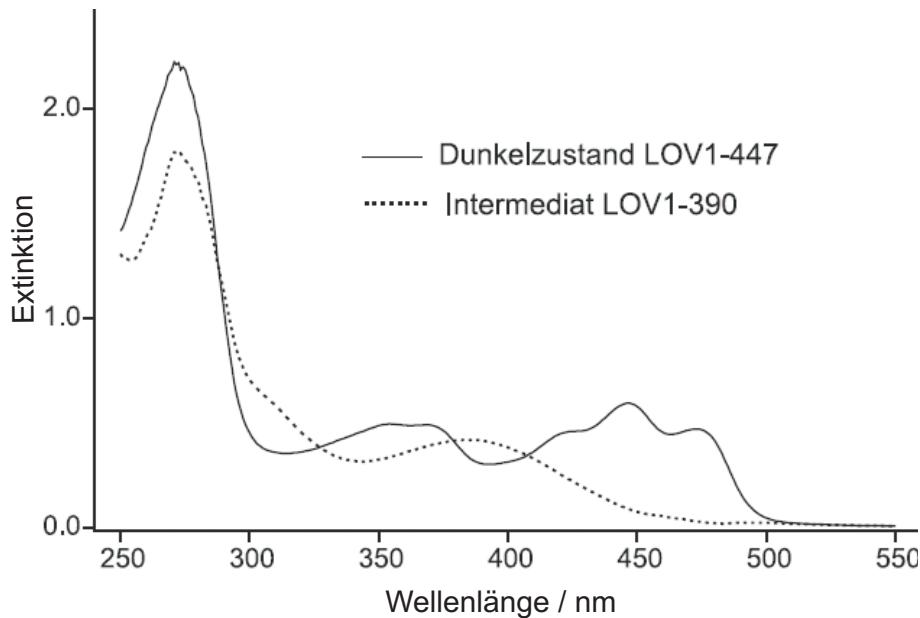
transduktion ist augenblicklich Gegenstand der Forschung und soll hier nicht näher besprochen werden. Der Fokus vorliegender Arbeit ist auf die primären Reaktionen innerhalb der LOV-Domänen gerichtet, die in dem in Abbildung 1.5 für den Fall der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* gezeigten Photozyklus zusammengefasst werden [26]. In dieser Darstellung werden die einzelnen Spezies gemäß der Konvention nach ihrer längstwelligen Absorptionsbande benannt.

Es ist bekannt, dass das Protein-gebundene FMN nach Absorption von blauem Licht vom  $S_0$ -Zustand (LOV1-447) in den  $S_1$ -Zustand übergeht und dann durch *intersystem crossing* (ISC) den  $T_1$ -Zustand LOV1-715 annimmt. Man vermutet, dass es zwei verschiedene Triplet-Spezies gibt, die anhand ihres Absorptionspektrums nicht zu unterscheiden sind, die aber unterschiedlich schnell weiterreagieren. Diese Annahme kommt in der Nomenklatur a und b bzw. den beiden Lebensdauern 800 ns und 4  $\mu$ s in Abbildung 1.5 zum Ausdruck. Jedenfalls geht der  $T_1$ -Zustand über in den Zustand LOV1-390, der als Signalzustand aufgefasst wird. Man nimmt an, dass die Bildung des Signalzustands eine Änderung der Proteinkonformation zur Folge hat. LOV1-390 ist metastabil und kehrt thermisch innerhalb von Minuten in den Dunkelzustand LOV1-447 zurück. Es gibt außerdem Hinweise auf eine photochemische Rückreaktion, wie die gestrichelte Linie in 1.5 andeutet. [26]

Die LOV-Domänen besitzen in dem hochkonservierten Bereich NCRFLQG das reaktive Cystein, in LOV1 an Position 57. Dieser Aminosäure kommt bei der Ausbildung von LOV1-390 eine entscheidende Rolle zu. Seine Thiolfunktion addiert sich nämlich, wie in Abbildung 1.5 gezeigt ist, an die C(4a)-Position des FMN. Diese Struktur des Signalzustands LOV1-390 - auch Photoaddukt genannt - wurde anhand von Mutationsexperimenten nachgewiesen, in denen das reaktive Cystein 57 z.B. gegen die Aminosäure Serin ausgetauscht wurde. Bestrahlt man diese Mutante LOV1 C57S mit blauem Licht, dann findet zwar die Bildung des Tripletzustands statt, aber keine Adduktbildung [26]. Dies legt nahe, dass die photochemische Reaktion die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen FMN und der Seitenkette des Cystein 57 beinhaltet. Die Ausbildung dieser Struktur, auch als Flavin-Cysteinyl-Addukt bekannt, wurde inzwischen durch eine Vielzahl von biophysikalischen Studien bestätigt (vgl. [27], [28], [29], [30], [31], [32]). In einer Kristallstruktur des belichteten Zustands ist zu sehen, dass die Bindungslänge



**Abbildung 1.5:** Der Photozyklus der LOV1-Domäne aus *Chlamydomonas reinhardtii* nach [26]. Die Bezeichnung der einzelnen Spezies folgt gemäß der Konvention ihrer längstwelligen Absorptionsbande. So benennt LOV1-447 den Dunkelzustand der LOV1-Domäne, LOV1-715a bzw. b den Tripletzustand und LOV1-390 den Signalzustand.



**Abbildung 1.6:** Absorptionsspektrum von Dunkelzustand LOV1-447 bzw. Signalzustand LOV1-390 aus [23].

zwischen Flavin-C(4a) und dem Schwefel der Thiolgruppe 1.89 Å beträgt. Das Flavin hat darin seine planare Struktur aufgrund der  $sp^3$ -Hybridisierung des C(4a) eingebüßt. Im Vergleich zur Struktur des Dunkelzustands gibt es im Protein keine größeren Positionsänderungen [24].

Zur weiteren Charakterisierung von Dunkel- bzw. Signalzustand von LOV1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* sind in Abbildung 1.6 die entsprechenden Absorptionsspektren dargestellt. Diese wurden aus [23] entnommen. Kottke berechnete das Spektrum von LOV1-390 mit Hilfe der Singulärwertzerlegung aus einer Sequenz von Spektren, die er nach Belichten einer Probe mit Hilfe eines Diodenzeilenspektrometers aufgenommen hatte.

### 1.3.3 Der Mechanismus der Photoadduktbildung

Im Photozyklus der LOV-Domänen wurden bisher zwei Intermediate identifiziert und charakterisiert, der Tripletzustand des Chromophors FMN und ein Addukt des FMN mit dem benachbarten Cystein. Für weitere Intermediate gibt es noch keine gesicherten spektroskopischen Befunde. Daher stellt sich die Frage,

nach welchem Mechanismus die Adduktbildung ausgehend vom Triplettzustand abläuft. Zu dieser Problemstellung wurden bisher drei verschiedene Lösungsansätze vorgeschlagen. Einerseits ein ionischer bzw. ein radikalischer Reaktionsmechanismus mit echten Intermediaten - Ion bzw. Radikal - , andererseits ein konzertierter Prozess - also eine Reaktion ohne definiertes Intermediat.

## Konzertierter Mechanismus

Im Jahre 2001 beschäftigen sich Crosson und Moffat erstmalig mit der Frage nach dem Mechanismus der Adduktbildung in einer LOV-Domäne [33]. Sie gehen dabei von der Forderung aus, dass ein geeignetes Modell insbesondere der Tatsache Rechnung tragen müsse, dass im Dunkeln keine Reaktion stattfinde, dass Licht-aktiviert jedoch ein Addukt gebildet würde. Der Argumentation der Autoren zufolge ist im Dunkelzustand der  $pK_a$ -Wert des in der Bindungstasche sitzenden Thiols so groß, dass wenig oder gar keine Adduktbildung erfolgt. Durch Absorption eines Photons allerdings verändert sich die Ladungsverteilung des Flavin-Rings. So zeigen PPP-Rechnungen von Song aus dem Jahre 1968 zum oxidierten Zustand des Isoalloxazins, dass die Ladung und damit die Basizität am Stickstoff N(1) abnimmt bei Anregung in den  $T_1$ -Zustand, während sie an N(5) zunimmt [34]. Daraus schließen Crosson und Moffat, dass die Lichtenregung die Abstraktion des Protons durch N(5) und den Angriff des entstehenden Thiolats auf den Kohlenstoff C(4a) begünstigt. Ein konzertierter Verlauf dieser beiden Prozesse vermeidet dabei die Ausbildung einer Ladung in der Bindungstasche, wie Abbildung 1.7 zu entnehmen ist.

Auch Fedorov *et al.* plädieren in ihrer auf den Kristallstrukturen von LOV1 basierenden theoretischen Studie aus 2003 für einen solchen simultanen Verlauf der Reaktionsschritte [24]. Ihrer Vorstellung nach bewegt sich das Thiol-Proton während der Lebensdauer des Triplettzustands zur N(5)-Position hin, während gleichzeitig die Orbitalüberlappung des Schwefels mit dem C(4a) zunimmt und das Addukt gebildet wird. Dem Licht schreiben sie in diesem Prozess die Rolle zu, den Orbitalüberlapp zwischen dem Thiol-H und N(5) zu ermöglichen und eine Zunahme der Basizität von N(5) zu gewährleisten.

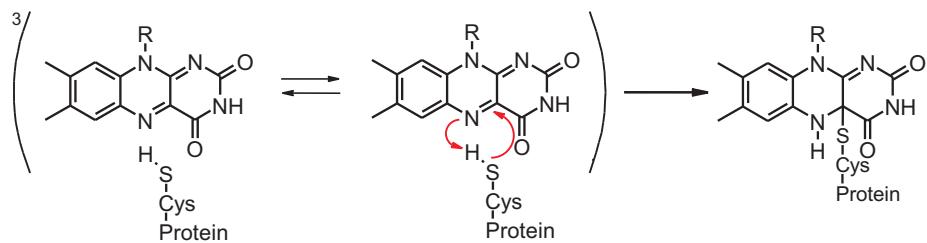


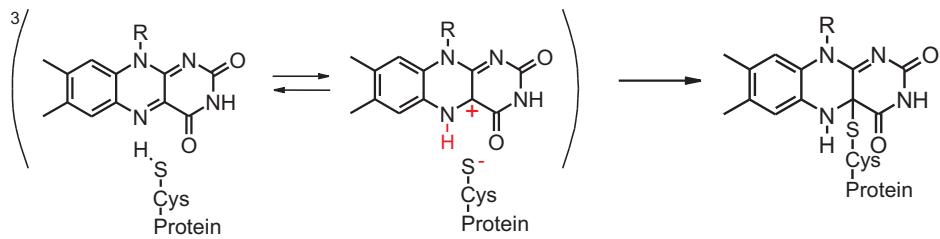
Abbildung 1.7: Konzertierte Mechanismus der Adduktbildung.

### Ionischer Mechanismus

In der ersten detaillierten spektroskopischen Studie zu einer LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phot1 aus dem Jahre 2001 postulieren die Autoren einen ionischen Mechanismus der Adduktbildung [28]. Sie gehen davon aus, dass das reaktive Cystein 57 bereits im Dunkelzustand deprotoniert vorliegt. Durch Anregung des FMN in den T-Zustand verändert sich seine Elektronenverteilung: Der N(5) erhält eine partiell negative Ladung, der C(4a) wird partiell positiv. Daher wird N(5) durch eine Protonen-übertragende Gruppe des Proteins protoniert, wodurch die N(5)-C(4a)-Doppelbindung in eine Einfachbindung übergeht, an C(4a) entsteht ein reaktives Carbokation. Diese positiv geladene Position wird vom Thiolat angegriffen, und es entsteht das Addukt. Auch in diesem Modell wird die starke Zunahme des  $pK_a$ -Wertes des N(5) durch die Lichtaktivierung als der “molekulare Schalter” der Reaktion interpretiert.

Spätere Untersuchungen stehen im Widerspruch zur genannten Studie und zeigen, dass das reaktive Cystein sowohl in LOV1 als auch in LOV2 im Dunkelszustand in seiner protonierten Form vorliegt (vgl. [26], [30], [31]).

Eine Studie aus dem Jahr 2003, in der zeitaufgelöste Absorptionspektroskopie betrieben wird, liefert Hinweise auf ein protoniertes FMN im Triplettzustand [32]. Die Autoren analysieren die Feinstruktur der langwelligen Absorptionsbande des Triplettzustands in LOV2 aus *A. capillus-veneris* Phy3. Durch einen Vergleich mit protoniertem und neutralem  $^3\text{FMN}$  in Wasser berechnen sie, dass ein Gemisch aus 60% protoniertem und 30% neutralem Triplettzustand im Protein vorliegt. Die übrigen 10% Absorption weisen sie einem Flavinradikal zu. Da sie von einer Quantenausbeute der Triplettbildung von 60% und der Adduktbildung von 30%



**Abbildung 1.8:** Ionischer Mechanismus der Adduktbildung über einen protonierten Triplettzustand des FMN.

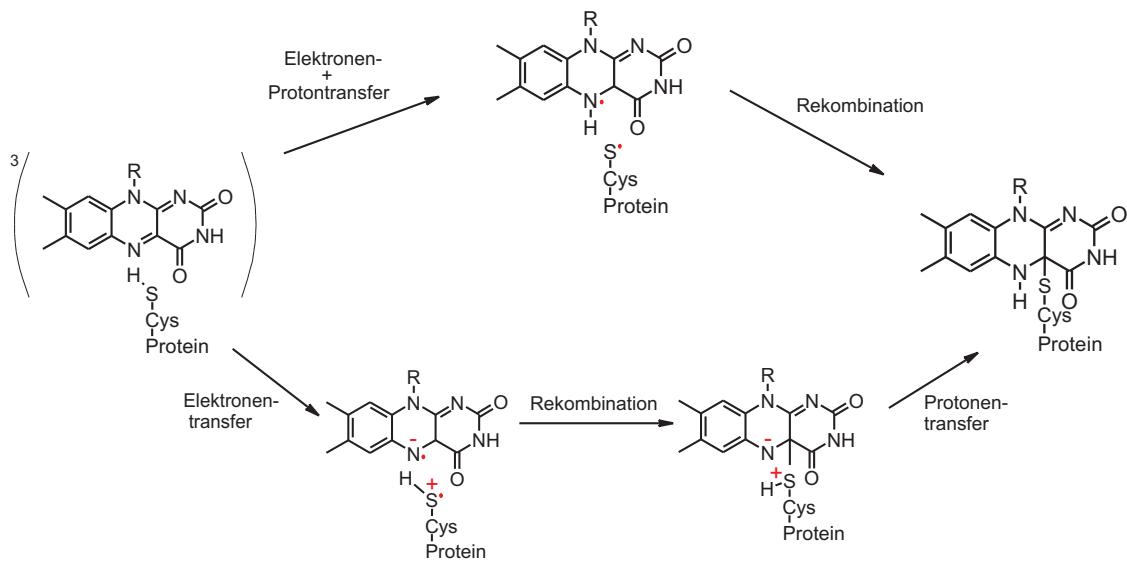
ausgehen, ist demnach der protonierte Zustand das reaktive Intermediat. Ein entsprechendes Reaktionsschema ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Die Protonierung des  $^3\text{FMN}$  erfolgt dabei an Position N(5). (vgl. [32], [35])

### Radikalischer Mechanismus

Bereits 1978 bzw. 1979 zeigten Heelis *et al.* durch Blitzlichtphotolyse von Flavin in Lösung, dass durch Photoreaktion mit einer Vielzahl von Substraten wie z.B. Aminosäuren zunächst ein Flavinradikal gebildet wird (vgl. [36], [37]). Dieses Radikal entsteht direkt aus dem Triplettzustand, und seine Bildung ist oftmals quantitativ. Heelis schließt aus seinen Untersuchungen, dass auch eine Adduktbildung generell über ein radikalisches Intermediat erfolgt, er charakterisiert die Addukte jedoch nicht näher [38].

Auch für die Photoreaktionen von LOV-Domänen wird 2003 durch Kay *et al.* ein radikalischer Mechanismus vorgeschlagen [39]. Demzufolge entsteht ein Neutralradikal durch einen Elektronentransfer vom reaktiven Cystein zum FMN, gefolgt von einem Protonentransfer. Das Addukt wird anschließend, nach *intersystem crossing* (ISC) vom Triplett- zum Grundzustand durch Rekombination der Radikale erzeugt, wie Abbildung 1.9 zeigt (oben).

In einer theoretischen *ab-initio*-Studie legen Neiß und Saalfrank ebenfalls im Jahre 2003 dar, dass basierend auf energetischen Gesichtspunkten tatsächlich ein radikalischer Reaktionsverlauf gegenüber einer ionischen Reaktion bevorzugt abläuft [40]. Den Autoren zufolge ist die Spindichte am Stickstoff N(5), dem Zielatom des Transfers, im Triplettzustand erhöht. Ihre Berechnungen ergeben, dass der günstigste Reaktionspfad über die direkte Übertragung eines Wasserstoffradikals



**Abbildung 1.9:** Radikalischer Mechanismus der Adduktbildung. Oben: Elektronen- und Protonentransfer in einem oder zwei Schritten, dann Rekombination der Radikale. Unten: Elektronentransfer, dann Rekombination der Radikale gefolgt von einem Protonentransfer.

verläuft und nicht, wie Kay *et al.* postulieren, über einen Elektronentransfer. Abbildung 1.9 (oben) beinhaltet auch diesen möglichen Verlauf der Reaktion.

Kottke *et al.* liefern in einer Untersuchung aus 2003 anhand eines Mutations-experiments weitere Hinweise auf einen radikalischen Reaktionsverlauf [41]. In einer C57M-Mutante der LOV1-Domäne aus *Chlamydomonas reinhardtii* entsteht nach Lichteinstrahlung eine Spezies, die die Autoren mittels Massenspektrometrie sowie Absorptionsspektroskopie als N(5)-alkyliertes Addukt identifizieren. Diese Verbindung geht in einer thermischen Reaktion über in ein N(5)-alkyliertes Neutralradikal, wie ein Absorptionsspektrum vermuten lässt. Bittl *et al.* bestätigen diese Annahme durch Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) und Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie (ENDOR) [42]. Speziell anhand der Analyse der Hyperfeinkopplung schließen sie, dass dieses Radikal an der N(5)-Position entweder eine CH<sub>2</sub>- oder eine CH-Gruppe trägt. Die Autoren beider Studien postulieren einen radikalischen Mechanismus, der sowohl die Reaktion in der Mutante als auch den wildtypischen Reaktionsverlauf erklären kann. Dabei treffen sie keine definitive Aussage darüber, ob Elektron und Proton nacheinander übergehen oder ob vielmehr direkt ein Wasserstoffatom übertragen

wird.

Speziell auch auf diesen Punkt geht ein Beitrag von Schleicher *et al.* ein, der im Jahre 2004 publiziert wurde [43]. Diese Gruppe belichtet LOV-Domänen bei einer Temperatur von 77 K und beobachtet im Falle der LOV2-Domäne aus *A. sativa* die Bildung einer Spezies mit einem im Vergleich zum bei Raumtemperatur entstandenen Photoaddukt um 15 nm rot-verschobenem Absorptionsmaximum. Sie interpretiert diese Beobachtung im Sinne eines sukzessiven Übergangs von Elektron und Proton vom reaktiven Cystein auf das FMN. In den Augen der Experimentatoren stellt diese Form mit rot-verschobenem UV-Spektrum ein bei derart tiefen Temperaturen eingefrorenes Zwitterion dar, das nach Elektronentransfer, ISC und Rekombination der resultierenden Radikale entsteht. Demnach ist der abschließende Schritt des Protonentransfers bei dieser Temperatur drastisch verlangsamt oder vollständig inhibiert. In Abbildung 1.9 ist dieser Reaktionsweg im unteren Teil dargestellt.

Sato *et al.* gehen 2005 speziell der Frage nach, in welcher Form der Tripletzustand des FMN vorliegt (vgl. [44], [45]). Die Autoren verwenden zu diesem Zweck die Schwingungsspektroskopie, die eine aussagekräftige Methode darstellt, wenn es darum geht, den Protonierungsgrad einer funktionellen Gruppe zu bestimmen. Aufgrund einer derart niedrigen Schwingungsfrequenz der SH-Funktion von 2537  $\text{cm}^{-1}$  plädieren sie für das Vorliegen einer  $\text{SH}^+$ -Gruppe und bekräftigen damit das Modell von Schleicher *et al.* [43].

In den folgenden Jahren wählen verschiedene Arbeitsgruppen einen theoretischen Ansatz zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus. So beschreiben Dittrich *et al.* 2005 basierend auf kombinierten QM/MM-Simulationen einer vollständigen Phot-LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* einen radikalischen Reaktionspfad, demzufolge ein Wasserstoffatom vom Cystein 57 auf das FMN übertragen wird [46]. Domratcheva *et al.* verwenden 2006 als Modellsystem Lumiflavin und Methylmerkaptan und schätzen elektronische Struktur und Energie der reaktiven Spezies mit Hilfe von CASSCF und MCQDPT2 quantenchemischen Methoden ab [47]. Ihrem Vorschlag zufolge wird ebenfalls durch einen konzertierten Elektronen- und Protonentransfer ein biradikalischer Komplex gebildet, der in das Addukt zerfällt. Zikihara *et al.* beschäftigen sich 2006 mit einer LOV-Domäne, die nicht aus einem Phot-Protein stammt, sondern aus dem FKF1-Protein (*flavin-binding Kelch*

*repeat F-box*) - einem Protein, das eine wichtige Rolle in der Photoregulierung des Blühens in *Arabidopsis* spielt [48]. Bei ihren Untersuchungen der Photoreaktion dieser LOV-Domäne mit Hilfe der Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie beobachten sie eine Spezies, die ein ähnliches Absorptionsspektrum aufweist wie Flavoproteine im anionischen Radikalzustand. Ausgehend von dieser Beobachtung formulieren die Experimentatoren für die FKF1-LOV-Domäne einen Mechanismus, der dem von Schleicher *et al.* [43] für Phot-LOV postulierten entspricht: Einem anfänglichen Elektronentransfer vom Cystein auf  $^3\text{FMN}$  folgt nach ISC und Radikalrekombination ein abschließender Protonentransfer.

Den aktuellsten Beitrag zur Diskussion um den Mechanismus der Adduktbildung liefert eine theoretische Studie von Zenichowski *et al.* aus dem Jahr 2007 [49]. Die Autoren berechnen auf einem DFT/B3LYP- und MCQDPT2-Level die Energien eines Modellreaktionspfads und bestimmen Spin-Bahn-Kopplungskonstanten zwischen  $S_0$  und  $T_1$ . Übereinstimmend mit den bereits zitierten theoretischen Arbeiten von Neiß *et al.* [40], Dittrich *et al.* [46] und Domratcheva *et al.* [47] schlagen die Autoren dieser Studie vor, dass vom reaktiven Cystein ein Wasserstoffatom auf  $^3\text{FMN}$  übertragen wird. Nach einem weiteren ISC erfolgt unter Rekombination der Radikale die Adduktbildung.

# Kapitel 2

## Fragestellung

Neben anderen Photorezeptoren ist es auch die Proteinfamilie der Phototropine, die Organismen die Fähigkeit verleiht, die Lichtverhältnisse ihrer Umgebung wahrzunehmen. Das Verständnis der Funktionsweise dieser natürlichen Sensoren ist im Hinblick auf die Entwicklung künstlicher Systeme von großem Interesse. Die photosensorische Einheit der Phototropine stellen die LOV-Domänen dar. In ihnen läuft - initiiert durch die Einstrahlung von Licht - eine Folge von photophysikalischen und photochemischen Reaktionen ab, die in einem Photozyklus zusammengefasst werden. Insbesondere reagiert der anfänglich gebildete Tripletzustand des an die LOV-Domäne gebundenen Chromophors FMN zu einem Photoprodukt weiter - einem Addukt aus FMN und einem benachbarten Cystein-Rest des Proteins. Der Bildungsmechanismus dieses Photoadduktes ist bislang nicht vollständig geklärt. In der wissenschaftlichen Literatur werden grundsätzlich drei verschiedene Reaktionspfade diskutiert: ein konzertierter, ein ionischer und ein radikalischer.

Die Zielsetzung vorliegender Dissertation war es, zur weiteren Aufklärung dieses Reaktionsmechanismus beizutragen. Zu diesem Zweck wurde ein Modellsystem des natürlichen sensorischen Apparats durch die gezielte Einführung von Punktmutationen in eine LOV-Domäne und den gleichzeitigen Zusatz von externen Reagenzien geschaffen. Durch Belichtungsexperimente mit diesem Modellsystem sollten speziell die Intermediate eines favorisierten radikalischen Reaktionsweges isoliert und charakterisiert werden.

Die in den Belichtungsexperimenten untersuchten Proteindomänen wurden heterolog mit Hilfe von *E.coli*-Bakterien exprimiert und durch Affinitätschromatographie isoliert. Die hierfür notwendige DNA der Domänen wurde zum Teil mit molekularbiologischen Techniken neu präpariert.

Die Charakterisierung der in den Belichtungsexperimenten erzeugten Intermediate erfolgte durch UV/Vis-Absorptionsspektroskopie, Massenspektrometrie und CD-Spektroskopie. Zur Auswertung der experimentell gemessenen Sequenzen von Absorptionsspektren wurde die Singulärwertzerlegung herangezogen.

# Kapitel 3

## Materialien und Methoden

### 3.1 Puffer und Lösungen

#### Puffer für die Affinitätschromatographie via Ni-NTA

- Säulenpuffer: 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, pH 8.0, 0.1 mM PMSF
- Waschpuffer: Säulenpuffer + 10 mM Imidazol, pH 8.0
- Elutionspuffer: Säulenpuffer + 0.5 M Imidazol, pH 8.0

#### Puffer für die Affinitätschromatographie via Amylose Resin

- Säulenpuffer/Waschpuffer: 20 mM Tris-Cl, 0.2 M NaCl, pH 7.5, 0.1 mM PMSF
- Elutionspuffer: Säulenpuffer + 10 mM Maltose, pH 7.5

#### Dialysepuffer

10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, pH 8.0, 0.1 mM PMSF

#### Ladepuffer (Agarose-Gel)

4 % Glycerin, 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylenzyanoblau

### Puffer für die SDS-PAGE

- 5×-SDS-Laupuffer: 9 g Tris, 43.2 g Glycin, 3 g SDS, ad 600 ml Wasser
- SDS-Probenpuffer: 2.0 ml 1M Tris/HCl, pH 6.8, 2.3 ml Glycerin (87 %), 1 g SDS, 154 g DTT, 5 mg Bromphenolblau, ad 10 ml Wasser
- Coomassie-Färbelösung: 0.1 % ( $\frac{w}{v}$ ) Coomassie® Brilliant Blue G250, 50 % ( $\frac{w}{v}$ ) Methanol, 10 % ( $\frac{w}{v}$ ) konz. Essigsäure
- Entfärbelösung I: 50 % ( $\frac{w}{v}$ ) Methanol, 10 % ( $\frac{w}{v}$ ) konz. Essigsäure
- Entfärbelösung II: 10 % ( $\frac{w}{v}$ ) Methanol, 7 % ( $\frac{w}{v}$ ) konz. Essigsäure

### STE-Puffer

STE-Puffer enthält die Bestandteile 1 M Tris/HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA und 4 M NaCl in folgenden Mengen:

	100 ml	500 ml
1 M Tris/HCl pH 8.0	1 ml	5 ml
0.5 M EDTA	200 $\mu$ l	1 ml
4 M NaCl	2.5 ml	12.5 ml

### TAE-Puffer

0.4 M Tris-Cl, 0.01 M EDTA-Na<sub>2</sub>-Salz, 0.2 M Essigsäure, pH 8.5  $\pm$  0.2

### Tfb I-Puffer

30 mM KOAc, 50 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 100 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (w/v) Glycerin, pH 5.8 (mit 0.2 M Essigsäure einstellen)

### Tfb II-Puffer

10 mM Na-MOPS pH 7.0, 10 mM KCl, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % (w/v) Glycerin

## 3.2 Nährmedien

### LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)

10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast-Extrakt und 10 g NaCl werden in 950 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Nachdem mit Hilfe von 5 N NaOH ein pH-Wert von 7.0 eingestellt wurde, wird die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wird das Gemisch zur Sterilisation für 30 min bei 120°C autoklaviert (Autoklavierstation Stiefenhofer, München, Deutschland).

Gegebenenfalls wird dem Nährmedium vor Gebrauch das Antibiotikum Ampicillin (Stammlösung: 100 mg/ml, steril filtriert (Millex HA 0.45  $\mu$ m, Millipore, Eschborn, Deutschland), aliquotiert und bei -20°C gelagert) mit einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugesetzt.

### LB-Platten

Sollen mit dem oben beschriebenen LB-Medium Kulturplatten gegossen werden, so müssen unmittelbar vor dem Autoklavieren 15 g Bakto-Agar pro Liter LB-Medium hinzugefügt werden. Nach Beendigung des Autoklaviervorgangs wird die Lösung vorsichtig geschwenkt, um den geschmolzenen Agar gleichmäßig im Medium zu verteilen. Wenn die Kulturplatten ein Antibiotikum enthalten sollen, dann darf dieses dem Medium erst nach Abkühlen auf 50°C zugegeben werden, da es hitzelabil ist. Das fertige Medium wird unter der Sterilbank in Petrischalen eines Durchmessers von 90 mm gegossen, wobei pro Schale 30 bis 35 ml Medium benötigt werden. Noch vor dem Festwerden des Mediums wird seine Oberfläche mit Hilfe eines Bunsenbrenners abgeflammt, um Luftblasen zu entfernen. Sobald die Platten fest sind, werden sie bei -4°C gelagert.

### SOB-Medium

20 g Bacto-Tryptone, 20 g Bacto-Yeast-Extrakt und 0.5 g NaCl werden in 950 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Nach vollständiger Auflösung aller Komponenten werden 10 ml einer 250 mM KCl-Lösung zugesetzt. Nachdem mit 5 N NaOH-Lösung ein pH-Wert von 7.0 eingestellt wurde, wird die Lösung auf 1 l aufgefüllt. Zur Sterilisation wird das Medium 30 min bei 120°C autoklaviert. Nach dem Erkalten werden 5 ml einer sterilen 2 M MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt.

### **SOC-Medium**

SOC-Medium enthält neben den Bestandteilen des SOB-Mediums zusätzlich 20 mM Glucose. Nach dem Autoklavieren des SOB-Mediums lässt man es mindestens bis auf 60°C abkühlen und gibt dann 20 ml einer sterilen 1 M Glucose-Lösung zu.

## **3.3 Chemikalien und Enzyme**

### **Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA**

- Bacto-Agar
- Bacto-Tryptone
- Bacto-Yeast-Extrakt

### **Fermentas GmbH, St.Leon, Deutschland**

- dNTP Mix, 2mM each
- *Eco*RI, 10 u/ $\mu$ l
- GeneRuler<sup>TM</sup> 50bp DNA Ladder, 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l
- *Hind*III, 10 u/ $\mu$ l
- T4 DNA Ligase, 5 u/ $\mu$ l

### **Fluka, Buchs, Deutschland**

- Maltose Monohydrat

### **Merck, Darmstadt, Deutschland**

- Ammoniumperoxodisulfat,  $\geq$  98 %, zur Analyse
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, zur Analyse
- 1,4-Dithiothreitol, für biochemische Zwecke

- Ethidiumbromid
- Essigsäure
- Glycerin, etwa 87 %, zur Analyse
- Glycin,  $\geq 99.7\%$ , für die Elektrophorese
- Isobutylalkohol, zur Analyse
- Isopropanol
- NaCl, zur Analyse
- Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, zur Analyse
- NiCl-Hexahydrat
- Salzsäure
- Triplex®II, zur Analyse (Ethylendinitrilotetraessigsäure) ACS

**New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland**

- Amylose Resin

**peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland**

- peqGold Protein-Marker I
- peqGold Protein-Marker II

**Promega, Madison, USA**

- *Pfu* DNA Polymerase, 3 u/ $\mu$ l

**Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland**

- Ni-NTA Superflow (Nitrilotriessigsäure)

**Roth, Karlsruhe, Deutschland**

- Agarose NEEO Ultra Qualität
- Bromphenolblau Natriumsalz, für die Elektrophorese
- Dialysierschläuche aus regenerierter Zellulose, ZelluTrans/Roth® 6.0, 10 mm, cut-off: > 10000 Da
- Ethanol,  $\geq$  99.8 %, zur Analyse
- Isopropylthiogalactosid (IPTG),  $\geq$  99 %, Dioxan-frei
- $\beta$ -Merkaptoethanol, 99 %, p.a.
- Phenylmethylsulfonylfluorid,  $\geq$  99 %, Protease Inhibitor
- Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid/ 0.8 % Bisacrylamid)

**Serva, Heidelberg, Deutschland**

- Ammoniumperoxodisulfat, zur Analyse
- Coomassie® Brilliant Blue G250 (C.I. 42655), rein
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

**Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland**

- Ampicillin Natriumsalz,  $\geq$  91 %
- Dialyse-Schlauch, Cellulose-Membran, Größe: 25 mm, cut-off: > 12000 Da
- Dimethylsulfid, > 99 %
- Gel Filtration Molecular Weight Markers 12400 to 200000 (MW-GF-200)
- Guanidiniumhydrochlorid,  $\geq$  99 %
- Imidazol,  $\geq$  99 %, ACS Reagenz
- Metanethiol
- Sodiumdodecylsulfat (SDS), 98.5 % GC

### USB Corporation, Cleveland, USA

- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, zur Analyse

## 3.4 Plasmide

Der vollständige cDNA-Klon (Gendatenbank accession No. AJ 416557) von *Chlamydomonas reinhardtii* Phot wurde bereits von Huang *et al.* isoliert und charakterisiert [22]. Das der Domänen LOV1 C57G zugrundeliegende Plasmid wurde von Tina Schiereis, Universität Regensburg, präpariert und zur Verfügung gestellt. Konkret wurde das Genfragment, das für die Aminosäuren 16-133 kodiert, durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und zwischen *Eco*RI- und *Hind*III-Schnittstellen (vgl. Abschnitt 3.5.3) des modifizierten Expressionsvektors His-p2x so eingebaut, dass die Proteindomäne zusätzlich 1 Methionin, einen His-Tag mit 12 Histidinen, 1 Glutamat und 1 Phenylalanin am N-terminalen Ende der Vektorsequenz besitzt. His-p2x entstand aus dem Vektor pMal-p2x (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) durch Entfernen des Maltosebindeproteins und Hinzufügen von 12 Histidinen.

Auch das für die Domäne LOV1 C57S kodierende Plasmid wurde von Tina Schiereis, Universität Regensburg, bereitgestellt. Das fragliche Genfragment wurde durch PCR amplifiziert und zwischen *Eco*RI- und *Hind*III-Schnittstellen des modifizierten Expressionsvektors HispMal so positioniert, dass die Proteindomäne ein Maltosebindeprotein, eine Schnittstelle für die Faktor Xa Protease, 16 Histidine, 1 Glutamat und 1 Phenylalanin am N-terminalen Ende der Vektorsequenz besitzt. Hisp-Mal wurde aus dem Vektor pMal-c2x (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) durch Hinzufügen von 10 Histidinen abgeleitet.

Ausgehend von dem LOV1 C57G-Plasmid wurden durch ortsgerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung - eine Methode, die in Kapitel 3.5.8 näher erläutert wird - Plasmide für die Doppelmutanten LOV1 C57G L101C, LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G hergestellt.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 Transformation von *E.coli*-Bakterien

Nimmt ein Bakterium DNA z.B. in Form eines Plasmids auf, so verändern sich in Abhängigkeit von den Genen, die auf diesem DNA-Molekül codiert werden, seine Eigenschaften, es wird transformiert. Allgemein bezeichnet der Begriff der Transformation die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Bakterien-, Pilz-, Tier- oder Pflanzenzellen. [50]

Einige Bakterienarten besitzen von Natur aus die Fähigkeit, DNA aufzunehmen. Man spricht dann von natürlicher Kompetenz der Bakterien. In der Genetik findet hauptsächlich der Stamm *Escherichia coli* (*E.coli*) Verwendung, der diese Eigenschaft nicht besitzt. Es ist allerdings möglich, kompetente *E.coli*-Bakterien künstlich durch eine physikalische und/oder chemische Behandlung zu erzeugen. Ein gängiges Verfahren stellt die Calciumchlorid-Methode dar, die in Abschnitt 3.6.8 näher erläutert wird. [50]

Bis heute ist nicht genau bekannt, warum diese  $CaCl_2$ -Vorbehandlung bewirkt, dass die Zellen mit größerer Effizienz DNA aufnehmen können. Sowohl die zu transformierende DNA als auch die Membran der *E.coli*-Zellen sind negativ geladen und stoßen einander somit ab. Möglicherweise lagern sich die  $Ca^{2+}$ -Ionen an DNA und Membran an und kompensieren so die negativen Ladungen, was zu einer besseren Anheftung der DNA an die Membran führt. Bei der eigentlichen Transformation dringt die DNA - ausgelöst durch eine kurze Temperaturerhöhung auf 42°C - in die Bakterienzelle ein. Man vermutet, dass dieser sogenannte Hitzeschock die Fluidität der Zellmembran erhöht, so dass die DNA in die Zelle gelangen kann. [51]

#### Durchführung

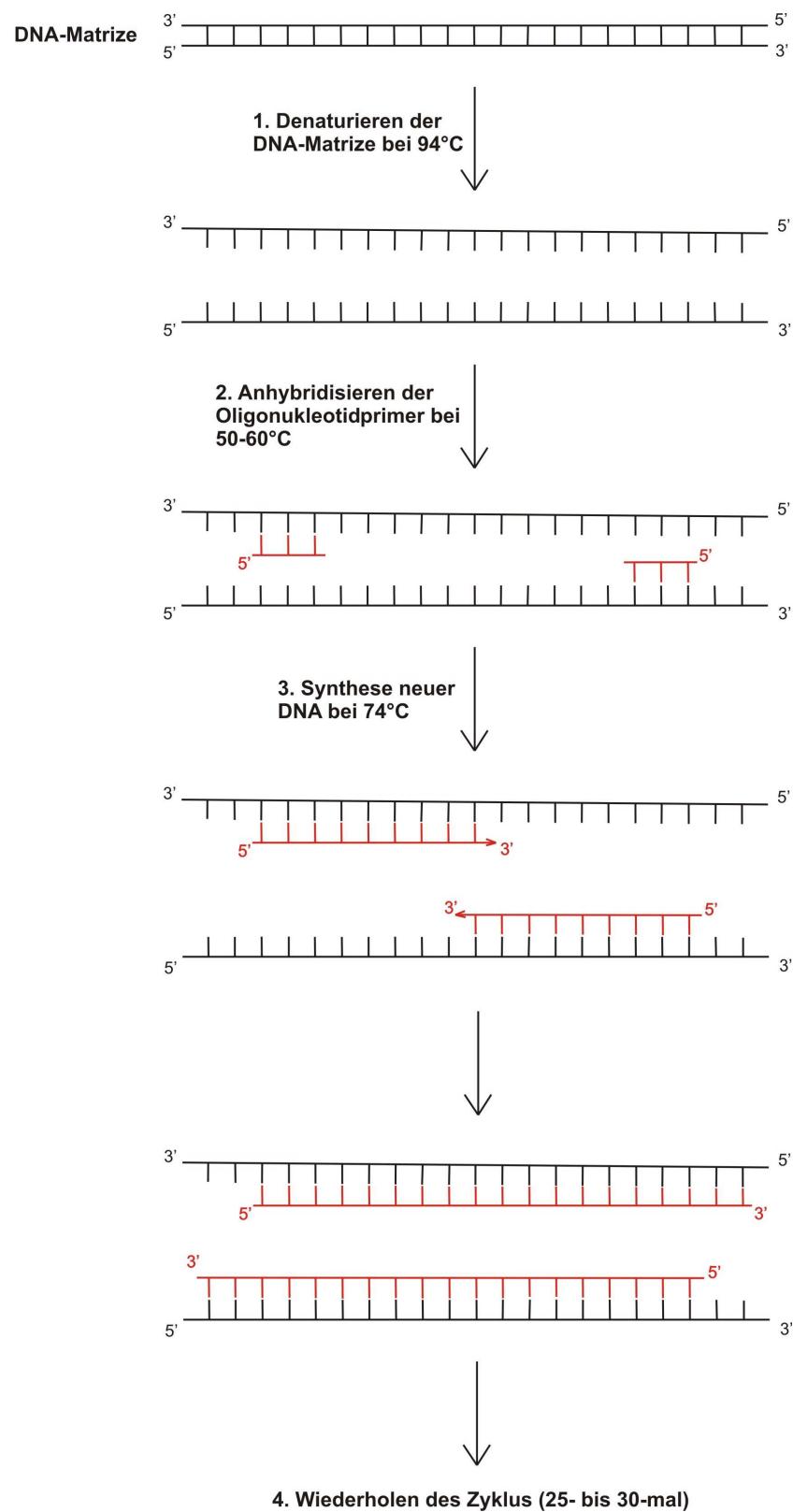
Die kompetenten Zellen (DH10B bzw. BL21) werden langsam auf Eis aufgetaut. 10 ng Plasmid-DNA bzw. der gesamte Ligationsansatz (siehe Abschnitt 3.5.6) werden mit 100  $\mu$ l Zelllösung gemischt. Das Gemisch wird mindestens 10, maximal 30 Minuten auf Eis gestellt. Dann wird für maximal 90 s auf 42°C erhitzt. Nach weiteren 2 Minuten auf Eis werden 500  $\mu$ l SOC-Medium (siehe Abschnitt 3.2) zugegeben. Die Lösung wird für 45 Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad

gestellt und anschließend 1 Minute lang zentrifugiert. Der Großteil des Überstands wird verworfen, im Rest werden die am Boden abgesetzten Zellen resuspendiert. Diese Suspension wird mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf einer LB-Amp-Platte (siehe Abschnitt 3.2) ausgestrichen. Die Platte wird bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In den Achtzigerjahren des 20. Jahrhunderts entwickelte der amerikanische Biochemiker Kary B. Mullis die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Diese Methode erlaubt es, definierte Nukleinsäureabschnitte ausgehend von winzigen Mengen an DNA zu vervielfältigen, wobei lediglich die Sequenzen an den Enden des zu amplifizierenden DNA-Stücks bekannt sein müssen. Man benötigt dazu nämlich sogenannte Primer, kurze Oligonukleotide, die aufgrund ihrer zu den Enden des interessierenden DNA-Bereichs komplementären Sequenz mit der DNA hybridisieren. Wie es der Name bereits andeutet, findet außerdem eine hitzestabile DNA-Polymerase Anwendung, wie z.B. die Polymerase I aus Bakterien der Art *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase). Des Weiteren müssen dem Reaktionsgemisch die vier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) zugesetzt werden. (vgl. [50], [51])

Abbildung 3.1 zeigt die grundlegenden Schritte eines PCR-Experiments: Im ersten Schritt wird das Gemisch auf 94°C erhitzt, damit die Wasserstoffbrückenbindungen, über die die beiden DNA-Einzelstränge zusammengehalten werden, aufgebrochen werden, der DNA-Doppelstrang soll also denaturieren. Im nächsten Schritt wird die Lösung auf 50 bis 60°C abgekühlt, wodurch die im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an den komplementären Stellen der Ausgangs-DNA (auch Template genannt) anhybridisieren (Annealing). Die genaue Temperatur sollte etwa 5°C unter der Schmelztemperatur des Hybrids aus Primer und DNA-Matrize liegen, die wiederum von der jeweiligen Länge der Primer bestimmt wird. Typischerweise sind diese aus 20 bis 30 monomeren Nukleotiden aufgebaut. Nun wird die Temperatur auf 74°C erhöht, da die im Beispiel genannte *Taq*-Polymerase bei dieser Temperatur ihre maximale Aktivität aufweist. Das Enzym bindet jeweils an den Komplex aus Primer und Ausgangs-DNA und synthetisiert einen neuen DNA-Strang, der zu der als Matrize dienenden DNA komplementär



**Abbildung 3.1:** Die grundlegenden Schritte der Polymerase-Kettenreaktion nach [50] (die DNA-Polymerase ist nicht dargestellt).

ist. Die Dauer des Polymerisationsschritts richtet sich nach der Länge des zu erzeugenden DNA-Stückes. Für Fragmente von bis zu 1 kb sind Polymerisationszeiten von 30 bis 60 s vonnöten. Nach dem Durchlauf dieser drei Schritte liegen statt der anfänglichen zwei DNA-Stränge jetzt vier vor.

Die Temperatur wird erneut auf 94°C erhöht, es beginnt ein zweiter Zyklus aus Denaturieren, Anhybridisieren und Synthese, an dessen Ende acht DNA-Stränge vorhanden sind. Wird der Zyklus 25- bis 30-mal wiederholt, so entstehen schließlich durch die exponentielle Zunahme der DNA-Menge über 50 Millionen Doppelstränge. (vgl. [50], [51])

### Durchführung

Für präparative Reaktionen wurde eine fehlerkorrigierende DNA-Polymerase (*Pfu* DNA Polymerase, Promega, Madison, USA) verwendet, während bei analytischen Ansätzen die Taq-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) Anwendung fand. Das jeweilige Reaktionsgemisch wurde mit Hilfe eines Thermocyclers der Reihe nach bei den verschiedenen Temperaturen des Kreislaufs inkubiert. In vorliegender Arbeit wurde das Gerät Mastercycler gradient der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) eingesetzt. Die ausgewählten Temperaturprogramme bzw. die Zusammensetzungen der Reaktionslösungen sind in den Kapiteln 3.5.8 und 3.5.10 beschrieben.

### 3.5.3 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten im Inneren eines DNA-Moleküls die Phosphodiesterbindungen zwischen zwei benachbarten Nukleotiden. Dabei ist bemerkenswert, dass diese molekularen Scheren die DNA nicht an beliebiger Stelle schneiden, sondern präzise und reproduzierbar an bestimmten Erkennungssequenzen. Diese Restriktionsstellen sind oftmals vier bzw. sechs, seltener acht bis zehn Basenpaare lang. Bei den meisten Erkennungssequenzen handelt es sich außerdem um sogenannte Palindrome: Der obere Strang liest sich von links nach rechts wie der untere von rechts nach links. Der Schnitt durch die DNA kann entweder glatt in der Mitte einer Restriktionsstelle oder versetzt erfolgen, je nachdem spricht man von glatten (*blunt ends*, z.B. *AluI*) oder klebrigen Enden (*sticky ends*, z.B.

*EcoRI*) (siehe dazu Abbildung 3.2 links oben). (vgl. [50], [52])

## Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme *EcoRI* (GAATTC, klebrig) und *HindIII* (AAGCTT, klebrig) der Firma Fermentas (St.Leon, Deutschland) verwendet. Bei präparativen Ansätzen wurden etwa 2.5  $\mu$ g DNA - Vektor oder PCR-Produkt - in einem Doppelverdau mit 20 U *EcoRI* und 30 U *HindIII* bei 37°C für zwei bis drei Stunden inkubiert. Hierfür geeignete Reaktionsbedingungen wurden mit Hilfe des Puffers Tango (Fermentas, 10-fach) eingestellt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Reinstwasser zu einem Gesamtvolumen von 60  $\mu$ l aufgefüllt. Bei einem analytischen Verdau wurden ca. 400 ng DNA mit 5 U *EcoRI* und 5 U *HindIII* analog zu obiger Beschreibung angesetzt. Das Gesamtvolumen betrug in diesem Fall 10  $\mu$ l.

Der Verdau wurde per Agarose-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.5.7) analysiert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden im Falle eines präparativen Verdaus mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und isoliert (vgl. Abschnitt 3.5.4).

### 3.5.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wird die entsprechende Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Da Lösungen chaotroper Salze Agarose auflösen, wird das DNA-Stück zunächst in einer Lösung eines solchen Salzes leicht erhitzt und gevortext. Die Anwesenheit einer hohen Konzentration eines chaotropen Salzes hat außerdem zur Folge, dass DNA an Silica-Material bindet. Daher kann die resultierende DNA-Lösung über ein mit einer Silica-Membran bestücktes Säulchen aufgereinigt werden. [53]

Die praktische Durchführung der Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract II-Kit von Macherey Nagel (Düren, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers.

### 3.5.5 Bestimmung von DNA-Reinheit und -Konzentration

Die Konzentration einer DNA-Lösung lässt sich mit Hilfe eines UV/Vis-Photometers ermitteln. Dazu wird die Absorption einer mit Reinstwasser 1:40-verdünnten Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Es gilt die Regel, dass bei doppelsträngiger DNA eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  entspricht. Bestimmt man darüberhinaus die OD bei einer Wellenlänge von 280 nm, so ist über das Verhältnis  $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$  die Reinheit der DNA-Lösung abzuschätzen: Eine proteinfreie Lösung sollte einen Quotienten von 1.8-2.0 aufweisen. (vgl. [53], [54])

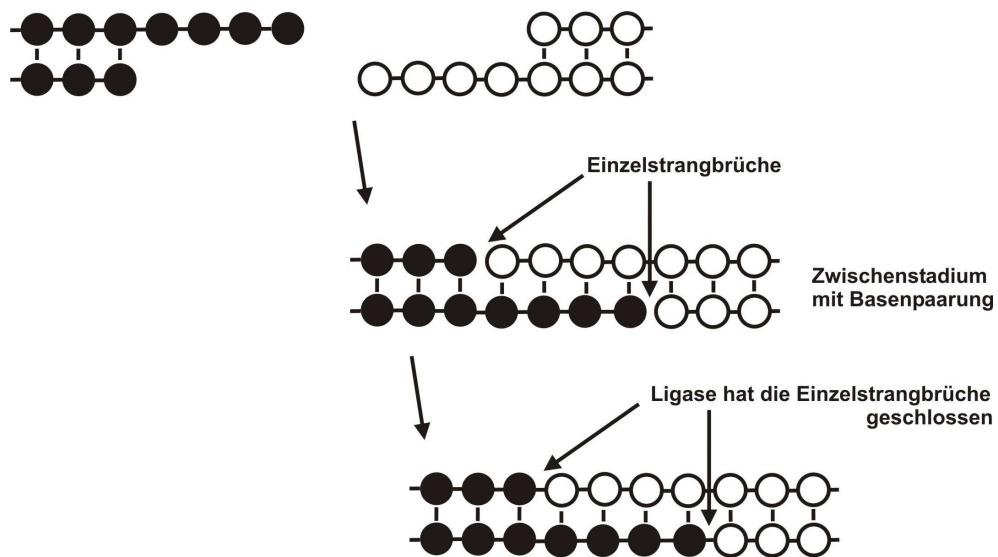
In vorliegender Arbeit wurde zur Messung der OD das Photometer GeneQuant II der Firma Pharmacia (München, Deutschland) verwendet.

### 3.5.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Der Begriff Ligation bezeichnet die Verknüpfung von DNA-Fragmenten unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen mit Hilfe des Enzyms DNA-Ligase. Möchte man zwei Stücke mit glatten Enden miteinander verbinden, so verläuft diese Reaktion allerdings nicht sehr effizient. Wesentlich besser funktioniert es, zwei Fragmente mit klebrigen Enden mit einer Ligase zu vereinigen, wie in Abbildung 3.2 schematisch dargestellt ist. Passen nämlich die jeweils überstehenden Einzelstränge zueinander, dann können sie über Wasserstoffbrücken Basenpaarungen ausbilden, was in der Mitte von Abbildung 3.2 gezeigt ist. In diesem Fall kann das Enzym also auf eine relativ stabile und somit längerlebige Struktur einwirken als im Fall der glatten Enden. Wichtig ist zu erwähnen, dass diese durch die DNA-Ligase katalysierte Reaktion unter ATP-Verbrauch abläuft. (vgl. [50], [53])

#### Durchführung

Vektor und PCR-Produkt wurden mit *Eco*RI und *Hind*III geschnitten (siehe Abschnitt 3.5.3), aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.5.4) und anschließend in einem Molverhältnis Vektor/PCR-Produkt von 1:3 gemischt. Die Menge an Vektor betrug



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung der Ligation von zwei DNA-Molekülen mit klebrigen Enden nach [50] (die DNA-Ligase ist nicht gezeigt).

etwa 100-200 ng. Das Reaktionsgemisch wurde mit 5 U T4 DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon, Deutschland), 1  $\mu$ l Ligationspuffer (10-fach) und 1  $\mu$ l ATP-Lösung (10 mM) auf ein Gesamtvolumen von ca. 10  $\mu$ l aufgefüllt. Zur Ligation wurde der Ansatz über Nacht bei 10°C inkubiert. In der anschließenden Transformation wurde der gesamte Ligationsansatz eingesetzt (siehe Abschnitt 3.5.1).

### 3.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese stellt die einfachste und effektivste Methode dar, u. a. lineare, doppelsträngige DNA-Fragmente von 0.2 bis 20 kb Länge nach ihrer Größe aufzutrennen und die Stranglängen zu bestimmen. Diese Methode beruht darauf, dass geladene Teilchen im Gel aufgrund eines elektrischen Feldes wandern, und zwar umso schneller, je kleiner sie sind. Der Grund hierfür liegt in der Siebstruktur des Agarose-Gels, dessen Poren kleineren Fragmenten einen geringeren Widerstand bieten. Da die DNA aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladen ist, bewegt sie sich in der Gelmatrix zur positiv geladenen Anode hin. Anwendung findet diese Methode z.B bei der Auftrennung von DNA nach einer PCR oder nach einem Verdau mit Restriktionsenzymen. In vorliegender Arbeit wurden 0.8-, 1.5- und 2.0-prozentige (w/v) Gele eingesetzt. Dabei ist zu beachten,

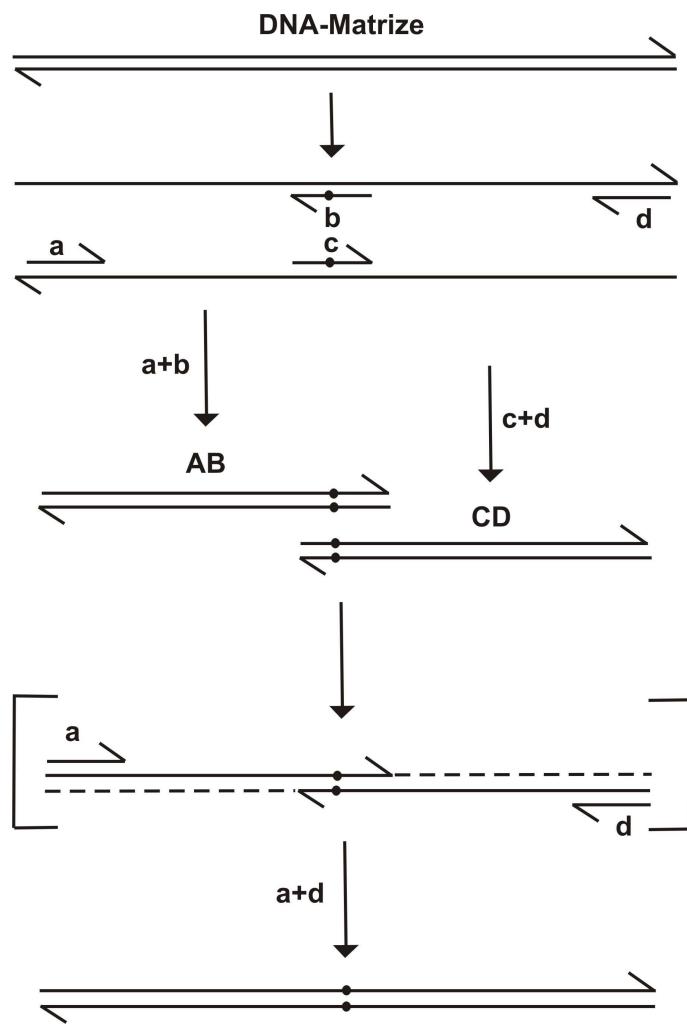
dass die Poren im Gel umso kleiner sind, je höher die Agarose konzentriert ist. Üblicherweise wird DNA in Agarose-Gelen mit Hilfe von Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck werden der bereits geschmolzenen Agarose einige Tropfen einer EtBr-Lösung zugegeben, so dass dessen Konzentration etwa  $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$  beträgt. Sind die DNA-Proben auf das fest gewordene Gel aufgetragen, interkalieren die EtBr-Moleküle zwischen die Basen der DNA-Moleküle. Der eingelagerte Farbstoff kann durch UV-Licht angeregt werden und emittiert Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Durch die Interkalation des EtBr in Nukleinsäuren nimmt seine Fluoreszenzintensität stark zu, so dass die Färbung der DNA auch in Gegenwart des freien EtBr im Gel deutlich sichtbar ist. (vgl. [53], [54])

### Durchführung

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden 0.8-, 1.5- und 2.0-prozentige (w/v) Agarose-Gele in TAE-Puffer mit  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  EtBr verwendet. DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (5-fach) gemischt und nach Auftragung auf das Gel mit einer maximalen Spannung von 140 V getrennt. Die DNA wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht, so dass ein Foto des Gels aufgenommen bzw. die fraglichen Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten werden konnten.

### 3.5.8 Ortsgerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung

Die ortsgerichtete Mutagenese durch Überhangverlängerung (*overlap extension PCR*) stellt eine gängige *in vitro*-Methode dar, um zielgerichtet ein bestimmtes Codon einer DNA-Sequenz zu verändern und damit die entsprechende Aminosäure auszutauschen. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von der Einführung einer Punktmutation. In Abbildung 3.3 sind die einzelnen Schritte einer solchen Mutagenese schematisch skizziert. Zunächst werden in zwei getrennten PCR entsprechend zwei Fragmente der DNA-Matrize amplifiziert. In jeder Reaktion wird ein flankierender Primer verwendet, der an jeweils ein Ende des DNA-Stranges anhybridisiert. In Abbildung 3.3 sind das die Primer a und d. Daneben wird jeweils ein interner Primer - in Abbildung 3.3 als Primer b und c bezeichnet - eingesetzt, der im Bereich der einzuführenden Mutation anbindet



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung einer ortsgerichteten Mutagenese durch Überhangverlängerung, modifiziert nach [55] und [56]. Primer werden mit kleinen Buchstaben benannt (a, b, c, d), DNA-Fragmente mit großen (AB, CD). Die Summen a+b, c+d bzw. a+d bezeichnen die jeweils mit diesen Primerpaaren durchgeführten PCR.

Komponente	PCR 1 (a+b)	PCR 2 (c+d)	PCR3 (a+d)
10-fach PCR-Puffer	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l
dNTP-Mix (2 mM)	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
Primer a (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	—	0.5 $\mu$ l
Primer b (100 pmol/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l	—	—
Primer c (100 pmol/ $\mu$ l)	—	0.5 $\mu$ l	—
Primer d (100 pmol/ $\mu$ l)	—	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
DNA-Matrix	20 ng	20 ng	20 ng
<i>Pfu</i> -Polymerase	3 U	3 U	3 U
$H_2O$	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l	ad 100 $\mu$ l

**Tabelle 3.1:** Reaktionsmischungen der PCR 1, 2 und 3.

und die nicht-passende Base enthält. Die Produkte AB bzw. CD dieser beiden PCR mit den Primerpaaren (a+b) bzw. (c+d) enthalten die gewünschte Mutation und überlappen im Bereich dieser Mutation. In einer dritten PCR werden beide Fragmente gemischt, denaturiert und wieder hybridisiert, so dass sich u. a. eine Heteroduplex bildet, deren 3'-Enden weiter aufgefüllt werden können. Durch den Überlapp kann dabei das eine Fragment als Primer für das andere wirken und umgekehrt. In Abbildung 3.3 ist diese Zwischenstufe in eckige Klammern gestellt, die gestrichelten Linien markieren die Bereiche, die ergänzt werden. Da bei der dritten Reaktion außerdem die äußeren Primer a und d zugesetzt werden, kann dieses aufgefüllte DNA-Fragment durch PCR vervielfältigt werden. (vgl. [57], [58])

## Durchführung

Bei den präparativen PCR dieses Abschnitts wurde stets die fehlerkorrigierende *Pfu*-Polymerase (Promega, Madison, USA) eingesetzt. Es wurden die in Tabelle 3.1 aufgeführten Reaktionsmischungen angesetzt. Das für die PCR 1 und 2 jeweils verwendete Temperaturprogramm ist in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Für den Annealing-Prozess wurden dabei die in der Tabelle aufgeführten fünf verschiedenen Temperaturen ausprobiert. Die Schritte 2 bis 4 wurden 32-mal wiederholt. Das Programm für die dritte PCR stimmt bis auf die Annealing-Temperatur mit

#	Dauer	Temperatur	Prozess
1	2 min	94°C	Initiale Denaturierung
2	15 s	94°C	Denaturierung
3	15 s	56.0, 58.1, 60.2, 62.2, 64.1°C	Annealing
4	40 s	72°C	Polymerisation
5	7 min	72°C	Abschließende Polymerisation

**Tabelle 3.2:** Temperaturprogramm für die PCR 1 und 2.

dem Programm aus Tabelle 3.2 überein. In diesem Fall wurde hierfür eine Temperatur von 64°C gewählt, die Schritte 2 bis 4 wurden 20-mal durchgefahren.

### 3.5.9 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA werden die geernteten *E.coli*-Zellen resuspendiert und mit Lysozym behandelt, um die Zellwand zu schwächen. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natronlauge (NaOH) wird die Zelle komplett lysiert. Die Natronlauge bewirkt außerdem, dass ein pH-Wert von 12.0 - 12.5 eingestellt wird, bei dem lineare DNA - also die in Stücke zerbrochene chromosomale DNA der Bakterien - denaturiert, nicht jedoch die überspiralisierten Plasmide. Neutralisiert man anschließend die Lösung, ballen sich die denaturierten Einzelstränge der Bakterien-DNA zu einer unlöslichen Masse zusammen, die wie auch die übrigen Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt werden kann. Da unter bestimmten Voraussetzungen auch Proteine und RNA unlöslich werden, wird auf diese Weise der Großteil der verunreinigenden Makromoleküle - chromosomale DNA, RNA, Proteine - beseitigt. Eine der Pufferlösungen enthält ferner das Enzym Ribonuklease, das noch vorhandene RNA-Moleküle zu den Ribonukleotidbausteinen abbaut. Dem Lysat wird darüberhinaus ein chaotropes Salz in hoher Konzentration zugesetzt, so dass die Plasmid-DNA an Silica bindet (vgl. Abschnitt 3.5.4). Daher kann die weitere Aufreinigung wieder über Zentrifugationssäulchen mit Silicamembranen erfolgen. (vgl. [50], [59])

Plasmid-DNA wurde aus 5 ml einer DH10B-Übernachtkultur mit Hilfe des

Nucleospin® Plasmid-Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) den Angaben des Herstellers folgend präpariert.

### 3.5.10 Kolonie-PCR

Bei einer Kolonie-PCR dienen nicht isolierte DNA-Moleküle als Template, sondern intakte Bakterienzellen, die nach einer Transformation mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers oder einer Pipettenspitze direkt von einer Kolonie auf einer LB-Amp-Platte in das Reaktionsgemisch übertragen werden. Durch fünfminütiges Erhitzen auf 94°C werden die Zellen lysiert, so dass u.a. die im Bakterium vorhandene Plasmid-DNA freigesetzt wird. Setzt man nun bei der eigentlichen PCR Primer zu, die ein mutmaßlich durch Ligation in ein Plasmid eingebautes verdautes PCR-Produkt - auch Insert genannt - flankieren (Primer a und d in Abbildung 3.3), so wird dieses Insert natürlich nur dann vervielfältigt, wenn es tatsächlich Teil des Plasmids ist. Durch eine anschließende Agarose-Gelelektrophorese ist zu analysieren, ob ein DNA-Stück mit der richtigen Größe vorliegt. Die Kolonie-PCR stellt somit eine einfache und schnelle Vorgehensweise dar, wenn man überprüfen möchte, ob bei einer bestimmten Bakterienkolonie ein Insert wie gewünscht in ein Plasmid eingebaut wurde. (vgl. [58], [60])

#### Durchführung

Bei der folgenden Darstellung wird davon ausgegangen, dass sich zehn Kolonien auf einer Platte ausgebildet haben. Im ersten Schritt wurden in zehn PCR-Tubes jeweils 30  $\mu$ l Reinstwasser vorgelegt. Die einzelnen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze angepickt und in einem kurzen Strich auf einer neuen Platte ausgestrichen. Außerdem wurde die Pipettenspitze in dem entsprechenden PCR-Tube mit Reinstwasser auf und ab bewegt, damit Bakterienzellen in das Wasser gelangten, damit dieses also angeimpft wurde. Die PCR-Tubes wurden für 5 Minuten im Thermocycler auf 94°C erhitzt. Dann wurden jedem Tube 20  $\mu$ l eines Master-Mixes zugesetzt. Diese Lösung enthielt die für die folgende PCR notwendigen Zutaten, die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 3.3 angegeben. Die nun gestartete PCR verlief nach den Parametern, die in Abschnitt 3.5.8 zur dritten PCR aufgelistet sind. Anstelle der dort beschriebenen 20 Zyklen wurden aller-

Komponente	PCR (a+d)
5-fach PCR-Puffer	100 $\mu$ l
dNTP-Mix (2 mM)	25 $\mu$ l
Primer a (100 pmol/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
Primer d (100 pmol/ $\mu$ l)	2.5 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 200 $\mu$ l

**Tabelle 3.3:** Master Mix für zehn Reaktionsansätze

dings 36 durchgefahren. Für diese analytischen PCR wurde die *Taq*-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet.

Nach einer abschließenden Agarose-Gelelektrophorese wurde nur ausgehend von solchen Kolonien in einer Präparation DNA isoliert, die nach Kolonie-PCR und Gelelektrophorese für positiv befunden wurden. Schließlich wurden die DNA-Proben zum Sequenzieren zur Firma Eurofins MWG Operon nach Martinsried geschickt.

## 3.6 Mikrobiologische und proteinbiochemische Methoden

### 3.6.1 Proteinexpression in *E.coli*-Bakterien

Ausgehend von einer Glycerin-Stammkultur (siehe Abschnitt 3.6.7) wurde ein Vereinzelungsausstrich der Bakterien auf einer LB-Agar-Platte (siehe Abschnitt 3.2) vorgenommen; die Platte wurde anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Um eine Selektivität des Mediums zu gewährleisten, wurde den Agar-Platten das Antibiotikum Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugesetzt. Alternativ zu dieser Vorgehensweise wurden kompetente Zellen (BL21) mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert (siehe Abschnitt 3.5.1) und auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden wiederum über Nacht bei 37°C bebrütet.

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine Einzelkolonie gepickt, und damit

wurden im Falle der 12-His-fusionierten Proteine 20 ml LB/Amp-Lösung (20 ml LB-Medium (siehe Abschnitt 3.2), 20  $\mu$ l steril filtrierte Ampicillin-Lösung einer Konzentration von 100 mg/ml) angeimpft. Diese Lösung wurde bei 30°C über Nacht mit 190 rpm geschüttelt (Vorkultur). Die Vorkultur bei solchen Proteinen, die mit einem Maltosebindeprotein (MBP) fusioniert waren, erfolgte analog zu dem beschriebenen Vorgehen, allerdings wurden dem Medium zusätzlich 200  $\mu$ l einer 20%-igen Glucose-Lösung zugegeben.

7 ml der Vorkultur wurden in 700 ml LB-Amp-Lösung übergeimpft. Diese Hauptkultur wurde bei 30°C im Dunkeln mit 190 rpm geschüttelt, bis die optische Dichte (OD) der Lösung bei einer Wellenlänge von 600 nm einen Wert zwischen 0.4 und 0.6 annahm. Dies war in der Regel nach 2 bis 3 h der Fall. Bei den MBP-fusionierten Proteinen enthielt das Gemisch wiederum zusätzlich 7 ml einer 20%-igen Glucose-Lösung. Die Gegenwart von Glucose sollte dafür sorgen, dass die Konzentration an Stärke abbauenden Enzymen gering gehalten wurde und somit verhindert wurde, dass das bei der folgenden Affinitätschromatographie verwendete Säulenmaterial hydrolysiert wurde. Bei passender OD<sub>600</sub> wurde die Kultur zunächst für 2 h unter Schütteln mit 190 rpm auf 18°C heruntergekühlt. Anschließend wurde die Genexpression durch Zugabe von 700  $\mu$ l einer Isopropylthiogalactosid (IPTG)-Lösung einer Konzentration von 200 mg/ml induziert. Zur ausreichenden Anreicherung des gewünschten Proteins wurde die Bakteriensuspension über Nacht bei 18°C mit 190 rpm im Dunkeln geschüttelt.

### 3.6.2 Ernten und Aufschließen von *E.coli*-Zellen und Präparation des Cytosols

Nach der Genexpression wurden die Bakterienzellen durch 10-minütige Zentrifugation mit 4000 g bei 4°C geerntet. Das Bakterienpellet wurde in 30 ml Säulenpuffer, dem 30  $\mu$ l einer Proteaseinhibitorlösung (Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF) einer Konzentration von 100 mmol/l zugesetzt wurden, resuspendiert und dann entweder bei 4°C eingefroren und gelagert oder, wenn es sofort weiterverarbeitet werden sollte, in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Einfrieren und anschließende schnelle Wiederauftauen sollte zur Zerstörung der Zellwände beitragen.

Um die Bakterienzellen vollständig aufzubrechen, wurden sie in einem 50 ml-Rosett-Beschallungsgefäß mit einer Mikrospitze für 20 min kontinuierlich unter Eiskühlung beschallt (Branson-Sonifier B15, G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd, Deutschland).

Nach Aufschluss der Zellen wurde die Suspension für 20 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed, Rotor: JA-25.50, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA). Der Rückstand enthielt nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer und sogenannte Einschlusskörper (*inclusion bodies*). Dabei handelt es sich um unlösliche, zusammengeballte Proteine, die nicht die korrekte Tertiärstruktur angenommen haben [50]. Der Überstand wurde für 1 h bei 45000 g und 4°C erneut zentrifugiert (Kontron Instruments TGA45Ultra centrifuge, Neufahrn, Deutschland). Die nun resultierende überstehende Lösung beinhaltete das Cytosol, das Pellet die Plasmamembranen. Die Lösung wurde anschließend filtriert (Rotilabo®-Spritzenfilter, 0.45 µm, Roth, Karlsruhe, Deutschland). Bei allen aufgeführten Arbeitsschritten wurde mit Hilfe von Alufolie dafür gesorgt, dass die das gewünschte, lichtempfindliche Protein enthaltende Lösung möglichst wenig Licht ausgesetzt war.

### 3.6.3 Aufreinigung der 12-His-fusionierten Proteine

Die Proteindomänen LOV1 C57G, LOV1 C57G L101C, LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G waren jeweils N-terminal mit 12 Histidin-Resten fusioniert und konnten deshalb über Ni-NTA-Säulen (**Nickel-nitrilotriacid**, Quiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt werden. Diese Form der Chromatographie wird auch als Metallchelatchromatographie oder *immobilized metal affinity chromatography* (IMAC) bezeichnet. In solchen Chromatographiesäulen sind Nitrilotriessigsäure-Moleküle über Spacer-Moleküle an eine Agarose-Matrix gebunden. Die NTA-Moleküle wiederum koordinieren als 4-zähnige Liganden Ni<sup>2+</sup>-Ionen. In nicht-beladenem Zustand füllen außerdem zwei H<sub>2</sub>O-Moleküle die Koordinationssphäre der Ni<sup>2+</sup>-Ionen auf. Werden auf die Säule 12-His-fusionierte Proteine aufgetragen, dann verdrängen zwei dieser Histidin-Reste die H<sub>2</sub>O-Moleküle und binden so an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen. Somit ist das Ziel-Protein über den His-Tag an die Säule geknüpft, während alle anderen Proteine und Verunreinigungen die Matrix ungehindert passieren können. Nachdem die

das Protein enthaltende Matrix mit reichlich Waschlösung gespült wurde, wird das Protein durch Zugabe von Imidazol, das das Protein ersetzt und stattdessen an die  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen bindet, eluiert.

### Durchführung

Die filtrierte Proteinlösung wurde auf eine mit Säulenpuffer (siehe Abschnitt 3.1) äquilierte Ni-NTA-Säule (Säulenvolumen 30 ml) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach Waschen der Säulenmatrix bei einer Flussrate von ebenfalls 1 ml/min mit 800 ml Waschpuffer, dem 800  $\mu\text{l}$  PMSF-Lösung (Konzentration 100 mmol/l) zugesetzt wurden, wurde das Ziel-Protein mit Elutionspuffer (siehe Abschnitt 3.1) von der Säule gespült. Dabei wurden in der Regel 15 Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. Dem Elutionspuffer wurden dementsprechend 45  $\mu\text{l}$  PMSF-Lösung (Konzentration 100 mmol/l) zugegeben. Der Verlauf der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.6.5) verfolgt. Auch beim Chromatographieren der Protein-Lösung wurde darauf geachtet, dass die Probe möglichst wenig Licht ausgesetzt war.

### 3.6.4 Aufreinigung der MBP-fusionierten Proteine

Die Proteindomäne LOV1 C57S war N-terminal mit einem Maltosebindeprotein (MBP) verbunden und konnte somit über eine Maltoseaffinitätssäule (Amylose Resin, New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) aufgereinigt werden. Im Falle dieser Art der Chromatographie wurde das Protein mit Hilfe einer Maltoselösung eluiert.

### Durchführung

Die filtrierte Proteinlösung wurde auf eine mit Säulenpuffer äquilierte Säule aufgetragen. Im Weiteren wurde analog zur Ni-NTA-Chromatographie verfahren. Insbesondere wurde der Verlauf der Säulenaufreinigung wieder mit der SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.6.5) kontrolliert.

### 3.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: SDS-PAGE

Geladene Moleküle wie Proteine oder Nukleinsäuren lassen sich elektrophoretisch auftrennen. Während DNA-Moleküle mit Hilfe von Agarose-Gelen (vgl. Abschnitt 3.5.7) isoliert werden, finden im Falle der Proteine Polyacrylamid-Gele Anwendung. Solche Gele entstehen durch die Polymerisation von Acrylamid und Quervernetzung durch *N, N'*-Methylenbisacrylamid. Hierbei handelt es sich um eine radikalische Polymerisation, die durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) initiiert wird. *N,N,N',N'*-Tetramethylenthylendiamin (TEMED) wirkt dabei als Katalysator. Durch Zugabe des anionischen Detergents Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die globuläre Struktur eines Proteins weitgehend denaturiert, und es erhält durch die Anlagerung der SDS-Moleküle eine negative Gesamtladung, die zur Masse des Proteins in etwa proportional ist. Disulfidbrücken eines Proteins werden darüber hinaus durch den Zusatz eines Reduktionsmittels wie Dithiothreitol (DTT) reduziert. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich damit nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der Elektrophorese wandert ein SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Pluspol. Dabei trennt der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix die Komplexe nach ihrem Molekulargewicht auf.

Die Trenneigenschaften werden weiter verbessert durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Trennsystems, das aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel besteht. Die eigentliche Trennung nach der Größe erfolgt im Trenngel, während die Proteine im kürzeren und größerporigen Sammelgel zu einer schmalen Bande zusammengedrängt werden. [61]

In vorliegender Arbeit wurden Polyacrylamidgele nach Laemmli [62] mit folgenden Abmessungen verwendet:

**Sammelgel:** b = 8.75 cm / h = 2.80 cm / t = 0.83 cm / V = 2.0 ml

**Trenngel:** b = 8.75 cm / h = 6.50 cm / t = 0.83 cm / V = 4.7 ml

Komponente	Sammelgel	Trenngel	
	4%-ig	12%-ig	15%-ig
$\text{H}_2\text{O}$	1.83 ml	2.10 ml	1.47 ml
1.5 M Tris/HCl/pH 8.8	—	1.50 ml	1.50 ml
0.5 M Tris/HCl/pH 6.8	0.75 ml	—	—
10% (w/v) SDS-Lösung	30 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$	60 $\mu\text{l}$
30% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29 : 1)	0.39 ml	2.40 ml	3.03 ml
TEMED	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$	3 $\mu\text{l}$
10%-ige (w/v) APS-Lösung	15 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	4 ml	8 ml	8 ml

**Tabelle 3.4:** Zusammensetzungen von Sammel- bzw. Trenngel.

## Durchführung

In Tabelle 3.4 sind die Zusammensetzungen von Sammel- bzw. Trenngel aufgelistet. Die Gele wurden in einem Gießstand des Perfect-Blue Gel Electrophoresis System Twin S (Peqlab, Erlangen, Deutschland) gegossen. Auch durchgeführt wurden die Elektrophoresen mit diesem System. In einer Vorbehandlung wurden die aus den Fraktionen der Affinitätssäulen gezogenen Proben - in der Regel je 5  $\mu\text{l}$  - mit jeweils 3  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer versetzt und für 3 Minuten bei 100°C zur Denaturierung der Proteine und Anlagerung des SDS erhitzt. Eine Elektrophorese wurde bei 150 - 200 V mit Laufpuffer gefahren und dauerte in etwa 1.5 h. Nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Gele in Coomassie Brilliant Blue 1 h lang unter Schwenken gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrunds wurden die Gele nacheinander jeweils für 1 h unter Schwenken in die Entfärblerlösungen I und II gelegt. Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation eingescannt.

### 3.6.6 Dialyse

Die Methode der Dialyse wird dazu verwendet, niedermolekulare Komponenten aus einer Lösung zu entfernen oder gegen andere Bestandteile auszutauschen. Sie wird z.B. zur Umpufferung von Proteinlösungen in Vorbereitung auf eine

Säulenchromatographie oder zur Entfernung bestimmter Substanzen nach einer solchen Chromatographie eingesetzt. Dieses Verfahren basiert auf der Verwendung semipermeabler Membranen, deren Poren von Proteinen nicht durchquert werden können, die aber von anorganischen Salzen oder anderen niedermolekularen Verbindungen durchdrungen werden können. Dabei legt der *cut off*-Bereich fest, Moleküle welcher Masse die Membran nur noch sehr eingeschränkt passieren können. In vorliegender Arbeit wurde ein Dialyseschlauch angewendet, der Moleküle ab einer Masse von ca. 12400 Da zurückhält.

## Durchführung

Vor Gebrauch wurden die Dialyseschläuche 15 Minuten lang ausgekocht. Ausgekochte und wieder abgekühlte Schläuche wurden in einer 25%-igen Ethanollösung bei 4°C gelagert.

Im Falle der 12-His-fusionierten Proteine wurden die aus der Ni-NTA-Chromatographie resultierenden Fraktionen bei 4°C im Dunkeln gegen 2-mal 2 l Dialysepuffer (siehe Abschnitt 3.1) dialysiert (Cellulose-Membran, Breite im flachen Zustand: 25 mm, *cut off*: > 12400 Da, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), um das Imidazol aus der Lösung zu entfernen. Die Dauer des Dialysevorgangs betrug dabei 4 h bzw. im Anschluss daran eine Nacht.

Die Fraktionen, die aus der Maltose-Affinitätschromatographie herrührten, wurden auch gegen 2-mal 2 l Dialysepuffer (siehe Abschnitt 3.1) bei 4°C im Dunkeln dialysiert, um die Maltose aus der Lösung herauszufiltern. Die Dialysedauer wurde analog zu vorherigem Abschnitt gewählt.

Nach der Dialyse wurden jeweils von allen Fraktionen UV/Vis-Spektren aufgenommen, um Konzentration und Qualität der Proben zu beurteilen. Fraktionen sehr niedriger Konzentration wurden mit Hilfe eines Zentrifugalfilters (Amicon Ultra-5 Zentrifugalfilter, MWCO 5000, Millipore Corporation, Bredford, USA) unter gleichbleibenden Pufferbedingungen aufkonzentriert. Die einzelnen Fraktionen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20°C gelagert.

### 3.6.7 Ansetzen von Glycerinkulturen

Bakterienzellen in Nährmedien und als Isolierausstrich sind nur begrenzt haltbar. Zum längeren Aufbewahren von Bakterienstämmen wurden daher hierfür besser geeignete Glycerinkulturen angelegt. Zu diesem Zweck wurden 828  $\mu$ l einer Übernachtkultur - BL21 oder DH10B - mit 172  $\mu$ l 87%-igen, sterilen Glycerins in einem 1.5 ml-Eppendorf-Gefäß gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kulturen werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und sind über mehrere Jahre haltbar.

### 3.6.8 Herstellung kompetenter Zellen

Wie in Abschnitt 3.5.1 bereits angesprochen wurden kompetente *E.coli*-Zellen im Rahmen vorliegender Arbeit mit Hilfe von Calciumchlorid hergestellt. Die Wirkungsweise dieser Methode ist bis heute nicht genau bekannt. Mutmaßlich lagern sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowohl an die Bakterienmembran als auch an die DNA an und neutralisieren deren negative Ladungen - sie heben also die gegenseitige Abstoßung auf. Dies könnte zur Folge haben, dass die DNA besser an die Membran anbinden kann. (vgl. [50], [51])

#### Durchführung

Zunächst wurden Bakterienzellen - BL21 oder DH10B - auf einer LB-Platte (siehe Abschnitt 3.2) ohne Antibiotikum ausgestrichen. Es ist darauf zu achten, dass auch in den folgenden Schritten kein Antibiotikum verwendet wurde. Die Platte wurde über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Eine Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt. Damit wurden 50 ml SOB-Medium (siehe Abschnitt 3.2) angeimpft. Diese Vorkultur wurde bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht mit 190 rpm geschüttelt. Als Hauptkultur wurden dann 200 ml SOB-Medium mit gerade soviel Millilitern der Vorkultur beimpft, dass die optische Dichte (OD) dieser Lösung bei einer Wellenlänge von 528 nm ca. 0.05 betrug. Diese Kultur wiederum wurde so lange bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit 190 rpm geschüttelt, bis die  $\text{OD}_{528}$  einen Wert zwischen 0.3 und 0.4 annahm. Die Zellen wurden für 7 Minuten mit 2400 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  abzentrifugiert (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed, Rotor: JA-25.50, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA). Das Pellet aus Bakterienzellen wurde in eiskaltem Puffer Tfb I (siehe Abschnitt 3.1) resuspendiert und dann für 10

Minuten (DH10B) bzw. 90 Minuten (BL21) auf Eis stehen gelassen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 5 Minuten mit 2000 rpm bei 4°C erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet vorsichtig in Eiswasser kreisend in 2 ml Tfb II-Puffer (siehe Abschnitt 3.1) resuspendiert. Die Bakterien-Suspension wurde in 110  $\mu$ l-Portionen auf PCR-Tubes verteilt, die ihrerseits mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Da die Bakterienzellen sehr empfindlich sind, ist zu berücksichtigen, dass bei allen Arbeitsschritten auf Eis gearbeitet werden muss. Durch eine Test-Transformation wurden die Zellen auf ihre Kompetenz hin untersucht. Die fertigen kompetenten Zellen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.9 Entgasen von Proteinlösungen

Üblicherweise werden Lösungen von Sauerstoff befreit, indem ein anderes Gas wie z.B. Argon hindurchgeleitet wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, abwechselnd die über einer Lösung stehende Gasatmosphäre abzusaugen und dann wieder Gas - z.B. Argon - darüberzuleiten. Durch mehrfaches Wiederholen dieser beiden Schritte lässt sich effektiv Sauerstoff entfernen. Im Falle der in vorliegender Arbeit untersuchten Proteinlösungen war jedoch keines dieser beiden Verfahren anwendbar, weil das Protein zum einen bei zu heftigem Durchblubbern eines Gases und zum anderen beim Absaugen des Gases allmählich ausflockte. Dies war auch an einer ausgeprägten Schaumbildung zu erkennen. Daher wurde alternativ das im Folgenden skizzierte Vorgehen entwickelt. Die Idee zu dieser speziellen Strategie des Entgasens von Proteinlösungen stammt von Dr. Gilbert Nöll.

Von der Glasbläserwerkstatt der Universität Regensburg wurde ein zwei Liter fassender Kolben gebaut, der seitlich einen Begasungshahn besaß. Der Schliff dieses Kolbens sollte einerseits ausreichend groß in seinem Durchmesser sein, damit es möglich war, bestimmte Handgriffe in seinem Inneren zu tätigen. Andererseits sollte er nicht zu breit sein, so dass im offenen Zustand nicht zuviel Sauerstoff von außen hineinströmte. Als Kompromiss wurde ein 60 mm - Schliff gewählt. Mit Hilfe dieses Kolbens konnten Proteinlösungen gegen Sauerstoff-freie Pufferlösungen (siehe Abschnitt 3.1) dialysiert und damit entgast werden, ohne dass die das Protein enthaltende Lösung an sich einer der oben beschriebenen schädlichen Prozeduren unterzogen werden musste.

Der Kolben wurde mit knapp zwei Litern einer Pufferlösung gefüllt, die bis auf

das jeweilige Protein alle Bestandteile enthielt, die auch die Proteinlösung aufwies. Das waren in der Regel NaCl (10 mM) und Na-Phosphat (10 mM) bei einem pH-Wert von 8.0 sowie 2 ml PMSF-Lösung einer Konzentration von 100 mmol/l. Durch ein Begasungsrohr wurde zunächst diese Dialyselösung von Sauerstoff befreit, indem für 30 Minuten Argon hindurchgeblubbert wurde. Die Proteinlösung wurde dann in das Dialysesystem Spectra/Por® DispoDialyzer® der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) gefüllt, das ein Fassungsvermögen von 1 ml hat und aus regenerierter Cellulose hergestellt ist. Dieser zylinderförmige (Durchmesser etwa 1.0 cm), ca. 8 cm lange Dialyseschlauch besitzt am oberen Ende einen Schraubverschluss, am unteren Ende ist ein kleines Gewicht eingelagert, so dass er aufrecht im Wasser steht. Mit Hilfe einer Einmalspritze und einer kurzen Einmalkanüle (Sterican®, Braun, Melsungen, Deutschland) wurde - innerhalb des Kolbenschliffes im Argon-Gegenstrom - durch mehrmaliges Spülen mit Argon die Luft des Gasraums über der sich im Dialyseschlauch befindlichen Proteinlösung gegen Argon ausgetauscht. Anschließend wurde der Dialyseschlauch - weiterhin im Inneren des Kolbens und somit im Bereich des ausströmenden Argons - mittels einer langen Pinzette in den Kolben gesetzt. Dann sollte der in der Proteinlösung enthaltene Sauerstoff durch Rühren der Dialyselösung bei 4°C im Dunkeln über Nacht aus der Proteinlösung heraus in die umgebende Dialyselösung diffundieren. Die nun von Sauerstoff befreite Proteinlösung wurde anschließend mit Hilfe einer Einmalspritze und einer langen Einmalkanüle (Sterican®, Braun, Melsungen, Deutschland), die ihrerseits zum Schutz der Dialyseschlauchmembran vor einem Durchstechen von einer Kunststoffhülle ummantelt war, aus dem Dialyseschlauch in eine Spektroskopie-Küvette überführt. Auch das Aufsaugen der Lösung in die Spritze erfolgte wiederum innerhalb des Kolbenschliffes, zudem wurde der Sauerstoff in der Spritze vorher durch 10-maliges Spülen mit Argon entfernt. Außerdem wurde die Küvette vor dem Einfüllen der Proteinlösung mit Argon geflutet. Während des Einspritzens und sobald die Lösung in die Küvette gefüllt war, wurde Argon durch die Küvette geleitet. Allerdings wurde stets vermieden, dass der Gasstrom direkt durch die Proteinlösung ging, da dann das Protein wieder auszuflocken drohte.

### 3.6.10 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Lösungen der LOV-Domänen wurden anhand der Extinktion der Bande bei 447 nm ( $\epsilon_{447} = 12500 \frac{l}{mol \cdot cm}$ , siehe dazu Abbildung 1.6) bestimmt. Dabei wird angenommen, dass kein freier Kofaktor FMN vorhanden ist.

## 3.7 Präparation der Methylmerkaptan-Lösung

Methylmerkaptan (MM) ist bei Raumtemperatur gasförmig. Im Falle eines Proteins ist es nicht ratsam, das Gas durch einfaches Durchleiten durch die entsprechende Lösung zuzusetzen, da das Protein dann auszuflocken droht. Es wurde daher zunächst eine separate Lösung von MM durch Durchblubbern des Gases hergestellt, die dann dem eigentlichen Reaktionsansatz zugegeben wurde.

Als Ausgangspunkt für die MM-Lösung wurde der bekannte Dialyse-Puffer aus Abschnitt 3.1 verwendet (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.8 mM PMSF, pH 8.0). Leitet man mit Hilfe einer Pasteur-Pipette und eines Schlauches für 10 Minuten MM durch den in einem Schlenck-Gefäß befindlichen Puffer, dann erhält man eine Lösung, die MM sowie sämtliche Bestandteile der verwendeten Protein-Lösungen enthält. Auf diese Weise vermeidet man, dass sich bei Zusatz der MM-Lösung zum Reaktionsansatz das Milieu der Protein-Domäne verändert, was zu einer Destabilisierung der Domäne führen könnte. Diese Möglichkeit sollte v.a. bei den Experimenten aus den Abschnitten 4.5.2 und 4.5.3 in Betracht gezogen werden. Eine so präparierte Lösung ist zunächst klar und nimmt nach längerer Zeit allmählich einen leichten Gelbton an. Sie wurde jeweils bis zu zwei Wochen nach dem Präparationszeitpunkt eingesetzt. Noch ältere Lösungen wurden nicht mehr verwendet, da sich herausstellte, dass diese nicht mehr in der gewünschten Weise reaktiv waren.

Sollte eine MM-Lösung speziell für ein anaerobes Experiment präpariert werden, dann wird in einem ersten Schritt Argon für etwa 15 Minuten durch den Dialyse-Puffer hindurchgeblubbert, um zunächst den darin gelösten Sauerstoff auszutreiben. Im Weiteren wird dann so verfahren, wie oben beschrieben wurde.

## 3.8 Analytische Methoden

### 3.8.1 UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden mit dem kommerziell erhältlichen Zwei-strahlphotometer Lambda 9 von Perkin Elmer (Waltham, USA) aufgenommen. Dabei wurde der interessierende Wellenlängenbereich mit einer Geschwindigkeit von  $480 \frac{nm}{min}$  durchfahren. Alternativ kam das Einstrahl-Diodenzeilen-Spektrometer Specord S100B von Analytik Jena (Jena, Deutschland) zum Einsatz. Die Integrationszeit wurde dabei in der Regel auf 100 ms eingestellt. In beiden Fällen wurde ein Küvettenhalter mit Durchflussthermostat (Thermomix 1460, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet, der erlaubte, die Temperatur während der Messung konstant bei 20°C zu halten.

### 3.8.2 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie wurde herangezogen, um Spezies hinsichtlich ihrer Chiralität zu untersuchen. CD-Spektren wurden bei Raumtemperatur mit dem Jasco J-710 CD/ORD-Spectropolarimeter von Jasco (Groß-Umstadt, Deutschland) mit Hilfe einer Quarzküvette einer Schichtdicke von 0.01 cm aufgenommen. Dabei wurde als Messgröße die molare Elliptizität  $\Theta$  in  $[\frac{\circ cm^2}{dmol}]$  ermittelt.

## 3.9 Belichtung der Proben

In vorliegender Arbeit sollte - vereinfacht ausgedrückt - die Reaktion einer LOV-Domäne auf den Einfall von blauem Licht untersucht werden. Als Lichtquelle wurden dabei zwei Hochleistungs-LED Luxeon® III Emitter Königsblau (Lumileds Lighting, San Jose, USA) eingesetzt, die senkrecht zum Abfragestrahl des Spektrographen (siehe Abschnitt 3.8.1) in einem Abstand von 1 cm zueinander direkt an der Küvette positioniert waren. Das Emissionsmaximum der LED liegt bei  $\lambda \approx 460$  nm, ihre spektrale Halbwertsbreite beträgt  $\Delta\lambda_{1/2} = 20$  nm.

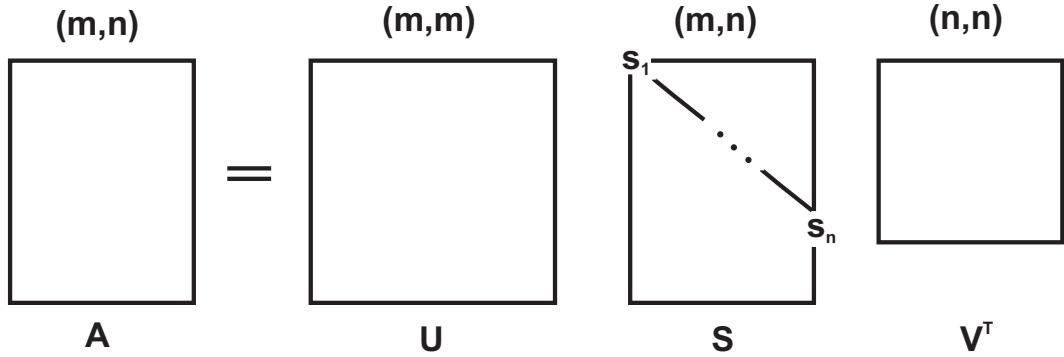


Abbildung 3.4: Matrizen der Singulärwertzerlegung für den Fall von  $m > n$  nach [69].

### 3.10 Singulärwertzerlegung (SVD)

Jede Matrix  $\mathbf{A} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  kann gemäß

$$\mathbf{A} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T \quad (3.1)$$

faktorisiert werden. Eine solche Faktorisierung ist unter dem Namen **Singulärwertzerlegung** (SVD = *singular value decomposition*) bekannt. Die Spalten von  $\mathbf{U}$  heißen **linke** und die von  $\mathbf{V}$  **rechte singuläre Vektoren**. Die Matrizen  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}$  sind orthogonal,  $\mathbf{S}$  ist eine Diagonalmatrix. Die Diagonalelemente von  $\mathbf{S} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  sind die **singulären Werte**, sie sind alle nicht-negativ und können stets abfallend angeordnet werden; es gilt also  $s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_p \geq 0$  mit  $p = \text{Min}\{m, n\}$ . Die Diagonalmatrix  $\mathbf{S}$  hat immer die gleiche Größe wie  $\mathbf{A}$ , nämlich  $(m, n)$ ;  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}$  sind immer quadratisch. Abbildung 3.4 skizziert die Formate der bei der Singulärwertzerlegung auftretenden Matrizen für den Fall  $m > n$  schematisch. [69]

Die inversen Matrizen zu den orthogonalen Matrizen  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}$  sind gegeben durch  $\mathbf{U}^T$  bzw.  $\mathbf{V}^T$ . Damit kann Gleichung 3.1 geschrieben werden als

$$\mathbf{A} \mathbf{V} = \mathbf{U} \mathbf{S}. \quad (3.2)$$

Daraus sind die Beziehungen

$$\mathbf{A} \mathbf{v}_i = s_i \mathbf{u}_i \quad \text{für } i = 1, 2, \dots, r \quad (3.3)$$

$\text{Lin}(\mathbf{u}_1, \mathbf{u}_2, \dots, \mathbf{u}_r) =$ Spaltenraum von $\mathbf{A}$
$\text{Lin}(\mathbf{v}_{r+1}, \mathbf{v}_{r+2}, \dots, \mathbf{v}_n) =$ Nullraum von $\mathbf{A}$
$\text{Lin}(\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_r) =$ Zeilenraum von $\mathbf{A}$
$\text{Lin}(\mathbf{u}_{r+1}, \mathbf{u}_{r+2}, \dots, \mathbf{u}_n) =$ Nullraum von $\mathbf{A}^T$

**Tabelle 3.5:** Zuordnung der einzelnen Linearen H\"ullen ( $\text{Lin}(\dots)$ , [70]) zu Spalten-, Zeilen- und Nullraum von  $\mathbf{A}$  bzw.  $\mathbf{A}^T$  nach [69].

und

$$\mathbf{A} \mathbf{v}_i = \mathbf{0} \quad \text{f\"ur } i = r+1, r+2, \dots, n \quad (3.4)$$

abzuleiten. Wird also  $\mathbf{A}$  mit einer Spalte von  $\mathbf{V}$  multipliziert, so ist der Bildvektor ein Vielfaches einer Spalte von  $\mathbf{U}$ . Die Vektoren  $\mathbf{v}_i$  liegen f\"ur  $i = r+1, r+2, \dots, n$  im Nullraum von  $\mathbf{A}$ . Analoge Beziehungen lassen sich f\"ur  $\mathbf{A}^T = \mathbf{V} \mathbf{S} \mathbf{U}^T$  formulieren. Daraus folgen die in Tabelle 3.5 aufgelisteten Zuordnungen. Diese wichtigen Beobachtungen zu den vier Fundamentalr\"aumen einer Matrix  $\mathbf{A}$  [70] sollen in nachfolgendem Satz 3.1 zusammengefasst werden. [69]

**Satz 3.1** Die Matrizen  $\mathbf{U} \in \mathbf{R}^{m \times m}$  und  $\mathbf{V} \in \mathbf{R}^{n \times n}$  der Singul\"arwertzerlegung  $\mathbf{A} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T$  enthalten orthonormale Basen der vier Fundamentalr\"aume.

- (a) Die ersten  $r$  Spalten von  $\mathbf{V}$  bilden eine orthonormale Basis des Zeilenraums von  $\mathbf{A}$ .
- (b) Die verbleibenden  $n - r$  Spalten von  $\mathbf{V}$  bilden eine orthonormale Basis des Nullraums von  $\mathbf{A}$ .
- (c) Die ersten  $r$  Spalten von  $\mathbf{U}$  bilden eine orthonormale Basis des Spaltenraums von  $\mathbf{A}$ .
- (d) Die verbleibenden  $m - r$  Spalten bilden eine orthonormale Basis des Nullraums von  $\mathbf{A}^T$ .

Aus der Matrix  $\mathbf{S}$  bzw. den singul\"aren Werten kann der Rang der Matrix  $\mathbf{A}$  abgelesen werden, da gilt:

$$\text{Rang}(\mathbf{A}) = \text{Rang}(\mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T) = \text{Rang}(\mathbf{S}) = r, \quad (3.5)$$

wie der folgende Satz 3.2 zum Ausdruck bringt. [69]

**Satz 3.2** Die Anzahl  $r$  der von Null verschiedenen singulären Werte ist gleich dem Rang der Matrix  $\mathbf{A}$ .

Was die Zerlegung  $\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$  anbelangt, ist außerdem anzumerken, dass die Spalten der Matrix  $\mathbf{U} \in \mathbf{R}^{m \times m}$  Eigenvektoren von  $\mathbf{A}\mathbf{A}^T$  sind. Die Spalten von  $\mathbf{V} \in \mathbf{R}^{n \times n}$  wiederum sind Eigenvektoren von  $\mathbf{A}^T\mathbf{A}$ . Die singulären Werte von  $\mathbf{S}$  sind die positiven Quadratwurzeln der Eigenwerte von  $\mathbf{A}\mathbf{A}^T$  und  $\mathbf{A}^T\mathbf{A}$ . Dies lässt sich an folgender Gleichung

$$\mathbf{A}\mathbf{A}^T = (\mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T)(\mathbf{V}\mathbf{S}^T\mathbf{U}^T) = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{S}^T\mathbf{U}^T \quad (3.6)$$

ablesen. Analog gilt für  $\mathbf{A}^T\mathbf{A}$

$$\mathbf{A}^T\mathbf{A} = \mathbf{V}\mathbf{S}^T\mathbf{S}\mathbf{V}^T. \quad (3.7)$$

Diesen Sachverhalt hebt der folgende Satz 3.3 noch einmal hervor. [69]

**Satz 3.3** Ist  $\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$  eine Singulärwertzerlegung der Matrix  $\mathbf{A} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  und  $r$  der Rang der Matrix  $\mathbf{A}$ , dann gilt

- (a)  $\mathbf{V}^T(\mathbf{A}^T\mathbf{A})\mathbf{V} = \text{Diag}(s_1^2, s_2^2, \dots, s_r^2, 0, 0, \dots, 0) \in \mathbf{R}^{n \times n}$
- (b)  $\mathbf{U}^T(\mathbf{A}\mathbf{A}^T)\mathbf{U} = \text{Diag}(s_1^2, s_2^2, \dots, s_r^2, 0, 0, \dots, 0) \in \mathbf{R}^{m \times m}$ .

### Die reduzierte Singulärwertzerlegung

Die Erfahrung zeigt, dass es oftmals geschickter ist, mit einer modifizierten Form der Singulärwertzerlegung zu arbeiten. Dabei handelt es sich um die sogenannte **reduzierte Singulärwertzerlegung** oder die **Singulärwertzerlegung in kompakter Form**. Diese soll im Folgenden für die Matrix  $\mathbf{A} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  mit  $m > n$  hergeleitet werden.

Ist  $\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$  eine Singulärwertzerlegung der Matrix  $\mathbf{A}$  mit  $\mathbf{U} \in \mathbf{R}^{m \times m}$ ,  $\mathbf{S} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  und  $\mathbf{V} \in \mathbf{R}^{n \times n}$ , so kann diese äquivalent geschrieben werden als

$$\mathbf{A} = \mathbf{U} \begin{bmatrix} S_1 \\ 0 \end{bmatrix} \mathbf{V}^T \quad (3.8)$$

mit  $\mathbf{S}_1 \in \mathbf{R}^{n \times n}$  und der Nullmatrix  $\mathbf{0} \in \mathbf{R}^{(m-n) \times n}$ . Diese Darstellungsmöglichkeit der Singulärwertzerlegung ist eine direkte Folge der Struktur der Diagonalmatrix

**S.** Im nächsten Schritt wird die Matrix  $\mathbf{U}$  in die zwei Blockmatrizen  $\mathbf{U}_1$  und  $\mathbf{U}_2$  aufgespalten. Dabei sind die ersten  $n$  Spalten von  $\mathbf{U}$  die Spalten von  $\mathbf{U}_1$  und die verbleibenden  $m - n$  Spalten von  $\mathbf{U}$  die Spalten der Matrix  $\mathbf{U}_2$ . Daraus folgt  $\mathbf{U} = [\mathbf{U}_1 \ \mathbf{U}_2]$  mit  $\mathbf{U}_1 \in \mathbf{R}^{m \times n}$  und  $\mathbf{U}_2 \in \mathbf{R}^{m \times (m-n)}$ . Somit erhält man

$$\mathbf{A} = [\mathbf{U}_1 \mathbf{U}_2] \begin{bmatrix} \mathbf{S}_1 \\ 0 \end{bmatrix} \mathbf{V}^T = \mathbf{U}_1 \mathbf{S}_1 \mathbf{V}^T. \quad (3.9)$$

Bei Gleichung

$$\mathbf{A} = \mathbf{U}_1 \mathbf{S}_1 \mathbf{V}^T \quad (3.10)$$

handelt es sich nun um die genannte **reduzierte Singulärwertzerlegung von  $\mathbf{A}$** . Diese Art der Darstellung hat den Vorteil, dass die Matrizen  $\mathbf{U}_1$  und  $\mathbf{S}_1$  kleiner sind als  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{S}$ . [69]

### Die dyadische Form der Singulärwertzerlegung

Durch Ausmultiplizieren der drei Matrizen  $\mathbf{U}$ ,  $\mathbf{S}$  und  $\mathbf{V}$  erhält man die sogenannte **dyadische Form** der Singulärwertzerlegung:

$$\mathbf{A} = s_1 \mathbf{u}_1 \mathbf{v}_1^T + s_2 \mathbf{u}_2 \mathbf{v}_2^T + \dots + s_r \mathbf{u}_r \mathbf{v}_r^T. \quad (3.11)$$

Satz 3.4 hält diesen wichtigen Zusammenhang fest. [69]

**Satz 3.4 (Dyadische Form der Singulärwertzerlegung)** Ist  $\mathbf{A} \in \mathbf{R}^{m \times n}$  und sind  $s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_r > 0$  die  $r$  von Null verschiedenen singulären Werte von  $\mathbf{A}$ , dann gilt

$$\mathbf{A} = s_1 \mathbf{u}_1 \mathbf{v}_1^T + s_2 \mathbf{u}_2 \mathbf{v}_2^T + \dots + s_r \mathbf{u}_r \mathbf{v}_r^T,$$

wobei  $\mathbf{u}_i \in \mathbf{R}^m$  und  $\mathbf{v}_i \in \mathbf{R}^n$  die singulären Vektoren von  $\mathbf{A}$  sind.

Da Matrizen der Form  $\mathbf{v} \mathbf{w}^T$  aber gerade Matrizen vom Rang 1 sind, kann demnach jede Matrix  $\mathbf{A}$  als Summe (Linearkombination) von Rang-1-Matrizen geschrieben werden. Die singulären Werte  $s_i$  können dabei als Gewichtungsfaktoren der einzelnen Terme aufgefasst werden. Diese Darstellung hat eine wichtige Konsequenz für die praktische Anwendung: In der Praxis nämlich hat eine Matrix  $\mathbf{A}$  häufig viele “kleine” singuläre Werte. Vernachlässigt man nun diese ( $r - k$ ) kleinen

singulären Werte von  $\mathbf{A}$ , dann kann sie in einer Näherung durch die Matrix  $\mathbf{A}_k$

$$\mathbf{A}_k = s_1 \mathbf{u}_1 \mathbf{v}_1^T + s_2 \mathbf{u}_2 \mathbf{v}_2^T + \dots + s_k \mathbf{u}_k \mathbf{v}_k^T \quad (3.12)$$

formuliert werden.

In vorliegender Arbeit wurde der Verlauf von Reaktionen untersucht, indem UV/Vis-Absorptionsspektren als Funktion der Belichtungszeit aufgenommen wurden. Dadurch erhält man eine Messmatrix  $\mathbf{A}$ , deren Spalten Absorptionsspektren zu einem bestimmten Zeitpunkt darstellen, während in den Zeilen die Entwicklung der Extinktion mit der Zeit bei einer bestimmten Wellenlänge zu beobachten ist. Nimmt man an, dass das Lambert-Beer-Gesetz gilt, dann können die Daten auch geschrieben werden als Linearkombination von  $k$  Spektren  $F_s(\lambda)$  multipliziert mit einem Konzentrations-Zeit-Profil  $c_s(t)$  für jede Spezies  $s$ :

$$A(\lambda, t) = \sum_s^k F_s(\lambda) c_s(t). \quad (3.13)$$

Die Messungen werden bei diskreten Wellenlängen  $\{\lambda_i, i = 1 \dots m\}$  und zu diskreten Zeiten  $\{t_i, i = 1 \dots n\}$  durchgeführt. Damit können die Daten in einer  $m \times n$ -Matrix mit den Matrixelementen  $A_{ij} = A(\lambda_i, t_j)$  dargestellt werden. Gleichung 3.13 geht auf diese Weise über in die Matrix-Gleichung:

$$\mathbf{A} = \mathbf{F} \mathbf{C}^T \quad (3.14)$$

Dabei befinden sich in den Spalten der  $m \times k$ -Matrix  $\mathbf{F}$  die gesuchten Absorptionsspektren der individuellen Spezies. Die Spalten der  $n \times k$ -Matrix  $\mathbf{C}$  beinhalten die kinetische Gesetzmäßigkeit, nach der diese Spektren kombiniert werden müssen, d.h. die Konzentrations-Zeit-Profile der beteiligten Verbindungen.

Wenn  $\mathbf{A}$  durch Gleichung 3.14 exakt beschrieben wird, dann nimmt der Rang von  $\mathbf{A}$  den Wert  $k$  an, außer Spektren und/oder Konzentrations-Zeit-Profile sind linear abhängig. In realistischen Messungen erhält man eine Datenmatrix  $\mathbf{D}$ , die von  $\mathbf{A}$  dadurch abweicht, dass sie zusätzlich Rauschen  $\mathbf{R}$  enthält, d. h.  $\mathbf{D} = \mathbf{A} + \mathbf{R}$ . Unser Ziel besteht nun darin, die Anzahl der Komponenten  $k$ , ihre Spektren  $\mathbf{F}$  sowie ihre Konzentrations-Zeit-Profile  $\mathbf{C}$  aus einer solchen "verrauschten" Datenmatrix

$\mathbf{D}$  zu berechnen. Wie bereits eingangs erläutert wurde, zerlegt der mathematische Algorithmus der SVD eine Matrix  $\mathbf{D}$  in das Produkt:  $\mathbf{D} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$ .

Berechnet man nun zu einer solchen Messmatrix  $\mathbf{D}$  die Singulärwertzerlegung  $\mathbf{D} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$ , dann bilden, wie bereits erläutert wurde, die ersten  $r$  Spalten der Matrix  $\mathbf{U}$  eine Basis des Spaltenraums von  $\mathbf{D}$ , sie enthalten in diesem Fall die spektrale Information. Die ersten  $r$  Zeilen von  $\mathbf{V}$  stellen eine Basis des Zeilenraums von  $\mathbf{D}$  dar, in ihnen steckt die kinetische Information. In der Diagonalmatrix  $\mathbf{S}$  finden sich die bereits erwähnten Gewichtungsfaktoren. Die Messmatrix  $\mathbf{D}$  beinhaltet somit mehr Spektren, als für eine eindeutige Beschreibung des Systems nötig sind, die Matrix ist überbestimmt. Die  $n - r$  weiteren Spalten von  $\mathbf{U}$  bzw.  $\mathbf{V}$  weisen nur Rauschen auf und können abgetrennt werden.

Die erste Aufgabe besteht folglich darin, die Anzahl dieser signifikanten Komponenten zu bestimmen. Dieses Vorhaben ist gleichbedeutend damit, den effektiven Rang  $r$  der Matrix  $\mathbf{D}$  zu ermitteln und wurde in vorliegender Arbeit anhand folgender Vorgehensweise verfolgt. Mit den ersten  $l$  Vektoren der Matrizen  $\mathbf{U}$ ,  $\mathbf{S}$  und  $\mathbf{V}$  kann eine Rekonstruktion der Datenmatrix berechnet werden, die gegen die Originaldatenmatrix konvergiert, wenn  $l$  gegen  $n$  geht:

$$D_{ij}^{(l)} = \sum_s^l U_{is} s_s V_{sj}^T. \quad (3.15)$$

Für jede Belegung von  $l$  wird die Standardabweichung zwischen der Originaldatenmatrix und der aus  $l$  Komponenten rekonstruierten Matrix bestimmt nach:

$$\sigma^{(l)} = \left( \frac{\sum_{ij} (D_{ij} - D_{ij}^{(l)})^2}{m \cdot n} \right)^{1/2}. \quad (3.16)$$

Eine wichtige Eigenschaft der SVD ist, dass diese Rekonstruktion nach Gleichung 3.15 die bestmögliche  $l$ -Komponenten-Näherung der Originalmatrix in einem *least-squares*-Sinn ist - wenn, wie oben bereits angemerkt wurde, die Matrix dabei durch die ersten  $l$  Spektren und Konzentrationsprofile bei Anordnung dieser Vektoren nach der Größe der entsprechenden singulären Werte dargestellt wird. Das bedeutet also, dass die nach Gleichung 3.16 berechnete Standardabweichung in diesem Fall den kleinsten Wert annimmt (vgl. [71], [72]). Trägt man nun die Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  gegen die Zahl der Komponenten  $l$  auf, so liefert dieser

Graph ein Kriterium dafür, den effektiven Rang der Datenmatrix abzuschätzen: Mit zunehmendem  $l$  nämlich wird zur Rekonstruktion der Daten jeweils ein signifikanter Beitrag hinzugefügt, so dass  $\sigma^{(l)}$  um einen signifikanten Betrag abnimmt. Die erste Komponente, die nicht mehr zu einer Verbesserung von  $\sigma^{(l)}$  beiträgt, kann dann als Rauschen betrachtet werden. Die Anzahl  $l$  an Komponenten, die zur Darstellung der Daten benötigt werden, entspricht dem effektiven Rang der Datenmatrix und kann als Anzahl der signifikanten Komponenten interpretiert werden.

Im nächsten Schritt gilt es, die Absorptionsspektren der einzelnen Komponenten bzw. ihre Konzentrations-Zeit-Profile aus den Matrizen  $\mathbf{U}$  und  $\mathbf{V}$  zu rekonstruieren. Das dabei gewählte Vorgehen wird in den entsprechenden Abschnitten des Kapitels **Ergebnisse und Diskussion** eingehend erläutert. Zur Durchführung der SVD-Analyse wurde ein von Prof. Dr. B. Dick entwickeltes Programm verwendet [73].

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Präparation der Plasmid-DNA

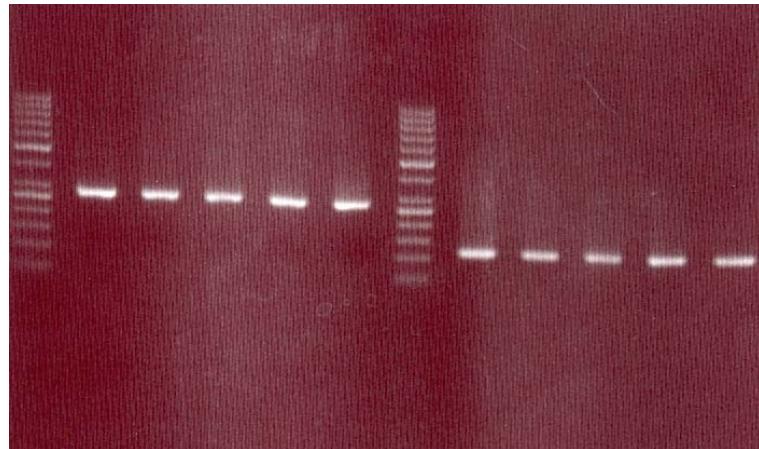
Sollen Proteine heterolog mit Hilfe des Prokaryoten *Escherichia coli* exprimiert werden, so müssen die jeweiligen Gene extrachromosomal auf sogenannten Plasmiden in die Zellen eingeführt werden. In vorliegender Dissertation sollten Beleuchtungsexperimente mit den Einfachmutanten LOV1 C57G und LOV1 C57S sowie erstmalig mit den Doppelmutanten LOV1 C57G L101C, LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G durchgeführt werden. Die für die Einfachmutanten kodierenden Plasmide wurden bereits von Tina Schiereis, Universität Regensburg, präpariert und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die den Doppelmutanten zugrundeliegenden Plasmide dagegen wurden nach der in Abschnitt 3.5.8 beschriebenen Methode der ortsgerichteten Mutagenese durch Überhangverlängerung ausgehend vom LOV1 C57G-Plasmid hergestellt.

#### Das Plasmid von LOV1 C57G L101C

Wie es die Bezeichnung der Mutante bereits zum Ausdruck bringt, sollte in dieser Mutagenese die an Position 101 befindliche Aminosäure Leucin gegen einen Cystein-Rest ausgetauscht werden. Auf der Ebene der DNA-Sequenz bedeutete dies, dass das Kodon CTC durch TGC ersetzt werden musste. Zu diesem Zweck wurden die in Tabelle 4.1 aufgeführten Oligonukleotide entworfen und durch die Firma Eurofins MWG Operon in Martinsried synthetisiert. Dabei entsprechen die Primer LOV1eco und LOV1rhind/1 den in Abschnitt 3.5.8 mit a und d bezeich-

**Tabelle 4.1:** In den einzelnen PCR verwendete Primer, deren Sequenzen, Schmelztemperaturen  $T_M$  und GC-Anteile.

Primer	Sequenz	$T_M$ / °C	GC-Anteil / %
LOV1eco	5' - AAA GAA TTC GCT GGC TTG CGG CAT ACT TTC - 3'	66.8	46.7
LOV1rhind/1	5' - AAA AAG CTT CGC CAG CGC CTT GCC CTC CGT - 3'	72.2	60.0
L60C-f	5' - GGT CGC TTC TGC CAA GGC GAG - 3'	65.7	66.7
L60C-r	5' - CTC GCC TTG GCA GAA GCG ACC - 3'	65.7	66.7
L101C-f	5' - GGA ACC TGT GCA CCG TCA CGC CC - 3'	69.6	69.6
L101C-r	5' - CGT GAC GGT GCA CAG GTT CCA AAA GG - 3'	68.0	57.7
C32S-f	5' - CCG GAC TCT CCG CTG GTC TAC GCC - 3'	71.3	70.8
C32S-r	5' - CCA GCG GAG AGT CCG GAA GCG TGG - 3'	72.8	72.0
F41Y-f	5' - GCG AGG GGT ACT ATG CCA TGA CTG G - 3'	67.9	60.0
F41Y-r	5' - GGC ATA GTA CCC CTC GCT GGC G - 3'	67.7	68.2



**Abbildung 4.1:** 2 %iges Agarose-Gel der PCR 1 bzw. 2; die Bahnen 1 und 7 enthalten den DNA-Marker GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas, St.Leon, Deutschland) mit Banden bei 50, 100, 150, 200, **250**, 300, 400, **500**, 600, 700, 800, 900, 1000 bp; in den Spuren 2 bis 6 befinden sich die Reaktionsansätze der PCR 1 angeordnet nach steigender Temperatur: 56.0, 58.1, 60.2, 62.2 und 64.1°C; die Spuren 8 bis 12 beinhalten die Reaktionsansätze der PCR 2 ebenfalls nach steigender Temperatur positioniert.

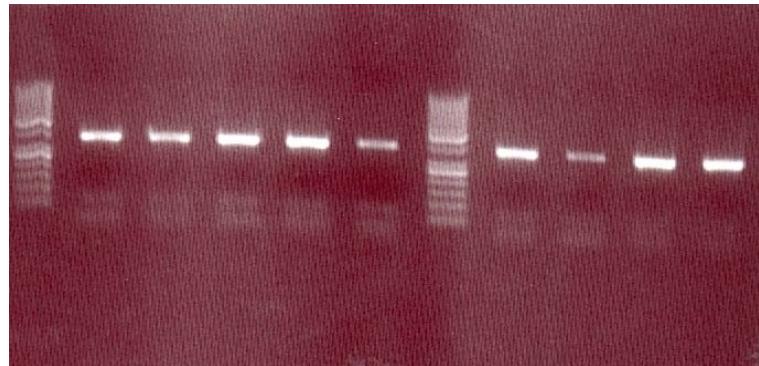
neten flankierenden Primern; L101C-f und L101C-r sind die dort mit b und c benannten internen Oligonukleotidprimer, die die nicht-passende(n) Base(n) enthalten.

In den ersten beiden PCR (PCR 1 bzw. (a+b) und PCR 2 bzw. (c+d) in Abschnitt 3.5.8) wurde nicht eine einzelne Temperatur für den Annealing-Prozess ausgewählt, sondern vielmehr fünf verschiedene Temperaturen: 56.0, 58.1, 60.2, 62.2 und 64.1°C. Auf diese Weise sollten optimale Bedingungen für das Anhybridisieren der Primer an die Ausgangs-DNA gefunden werden. Abbildung 4.1 zeigt die nach Beendigung der PCR mit Hilfe eines 2 %igen Agarose-Gels (Abschnitt 3.5.7)

zur Analyse aufgetrennten Reaktionsansätze. Darin enthalten die Spuren 1 und 7 jeweils einen Marker (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas), der durch Vergleich eine Bestimmung der Längen der einzelnen DNA-Fragmente zulässt. In den Spuren 2 - 6 bzw. 8 - 12 sind die Reaktionsansätze der PCR 1 bzw. PCR 2 nach aufsteigender Temperatur aufgetragen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Annealing-Prozess bei allen gewählten Temperaturen funktioniert haben muss, da in allen Bahnen eine Bande an der richtigen Position auszumachen ist: im

Falle der PCR 1 bei einer Länge von ca. 270 Basenpaaren, beim Ansatz der PCR 2 bei etwa 100 Basenpaaren. Es wurden jeweils alle 5 Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II-Kits (Abschnitt 3.5.4) isoliert.

Nach der PCR 3 (siehe Abschnitt 3.5.8) und einer weiteren Aufreinigung im Anschluss an ein Agarose-Gel (nicht gezeigt) sollte ein sogenanntes Insert vorliegen, das für LOV1 C57G kodierte und mutmaßlich zusätzlich an Position 101 eine Punktmutation enthielt. Den ersten beiden Einträgen aus Tabelle 4.1 ist weiterhin zu entnehmen, dass die flankierenden Primer LOV1eco und LOV1rhind/1 und somit auch das damit hergestellte Insert jeweils am 5'-Ende eine Schnittstelle besitzen, nämlich im Falle von LOV1eco *EcoRI* (GAATTC, klebrig) und in LOV1rhind/1 *HindIII* (AAGCTT, klebrig). Da darüber hinaus auch der Vektor, in den das Insert letztlich kloniert werden sollte, in seiner *multiple cloning site* eben diese Schnittstellen aufwies, konnte das Insert nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Abschnitt 3.5.3) in den ebenfalls damit geschnittenen Vektor His-p2x (siehe Abschnitt 3.4) mit Hilfe einer DNA-Ligase (siehe Abschnitt 3.5.6) eingebaut werden. Anschließend wurde der vollständige Ligationsansatz in DH10B-Zellen transformiert (siehe Abschnitt 3.5.1) und auf LB-Amp-Platten (siehe Abschnitt 3.2) ausplattiert. Waren nach einer Übernachtinkubation einzelne Kolonien gewachsen, dann wurden diese mit Hilfe einer Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 3.5.10) dahingehend getestet, ob die Bakterien den Vektor mit dem eingebauten DNA-Stück innehatten. In Abbildung 4.2 ist ein nach einer solchen Kolonie-PCR aufgenommenes 2 %iges Gel zu sehen. In den Spuren 1 und 7 wurden wiederum zum Vergleich DNA-Marker aufgetragen. Die Reaktionsansätze der Spuren 2 - 6 und 8 - 11 enthalten die fraglichen Bakterien. Die Tatsache, dass alle Bahnen auf einer Höhe von etwa 390 Basenpaaren eine Bande aufweisen, macht deutlich, dass alle Kolonien das gewünschte Insert enthielten. Von 2 ausgewählten Kolonien wurde die DNA isoliert (siehe Abschnitt 3.5.9) und durch die Firma Eurofins MWG Operon in Martinsried sequenziert. Auf diese Weise konnte abschließend sichergestellt werden, dass das Insert einerseits die gewünschte Punktmutation an Position 101 besaß und andererseits in seiner übrigen DNA-Sequenz mit LOV1 C57G übereinstimmte.



**Abbildung 4.2:** 2 %iges Agarose-Gel der Kolonie-PCR nach Transformation in DH10B; die Bahnen 1 und 7 enthalten den DNA-Marker GeneRuler<sup>TM</sup> 50bp DNA Ladder (Fermentas, St.Leon, Deutschland), die Lagen der Banden des Markers sind im Text zur Abbildung 4.1 angegeben; die Spuren 2 bis 6 und 8 bis 11 beinhalten die Reaktionsansätze mit den zu überprüfenden Bakterien.

### Die Plasmide der weiteren Doppelmutanten

Die Präparation der Plasmide der übrigen Doppelmutanten - LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G - folgte derselben prinzipiellen Vorgehensweise. Insbesondere wurden jeweils die in Tabelle 4.1 aufgelisteten Oligonukleotidprimer verwendet. Als flankierende Primer dienten also in allen Fällen LOV1eco und LOV1rhind/1.

## 4.2 Isolierung und Charakterisierung der Protein-Domänen

Viele Proteine - besonders solche mit sensorischen und regulierenden Aufgaben und Eigenschaften - liegen im jeweiligen Organismus nur in geringer Zahl pro Zelle vor. Möchte man in solchen Fällen Proteine in ausreichender Menge für spektroskopische Untersuchungen herstellen, muss man auf heterologe Expressionssysteme zurückgreifen, die eine Überexpression des entsprechenden Gens ermöglichen. Die heterologe Expression ist dann erfolgreich, wenn das Wirtssystem dem ursprünglichen Organismus ähnlich ist. Andernfalls können unterschiedliche Kodonnutzung verschiedener Organismen wie auch verschiedene Arten posttransla-

tionaler Modifizierungen Probleme bereiten. Das bekannteste und meist eingesetzte heterologe Expressionssystem ist das Bakterium *Escherichia coli*. Gerade aufgrund seiner einfachen Handhabung werden viele Proteine darin hergestellt. In vorliegender Arbeit wurden verschiedene Mutanten der LOV1-Domäne aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* in *E.coli* heterolog exprimiert. Zur Erleichterung der Aufreinigung der Proteine und zur Erhöhung ihrer Löslichkeit wurden die Proteine mit Tags versehen. Insbesondere fanden ein His-Tag, bestehend aus 12 Histidinen, und das Maltosebindeprotein (MBP) Anwendung. Im Einzelnen erfolgten Herstellung und Aufreinigung der den His-Tag enthaltende LOV1 C57G-Mutante nach einem von Tina Schiereis, Universität Regensburg, entwickelten Protokoll, das in 3.6 eingehend erläutert wurde. Auch Präparation und Isolierung der mit einem MBP fusionierten LOV1 C57S-Mutante folgten einer von Tina Schiereis ausgearbeiteten Vorschrift. In vorliegender Studie wurden außerdem die Doppelmutanten LOV1 C57G L101C, LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G untersucht. Die diesen Domänen zugrundeliegenden Plasmide wurden, wie im vorangehenden Abschnitt 4.1 beschrieben wurde, ausgehend von der LOV1 C57G-Mutante präpariert, sie waren somit allesamt mit einem His-Tag fusioniert. Zur Herstellung und Isolierung dieser erstmalig eingesetzten Doppelmutanten wurden die von Tina Schiereis für His-getagte Domänen erarbeiteten und eingangs bereits angesprochenen Parameter und Anleitungen herangezogen.

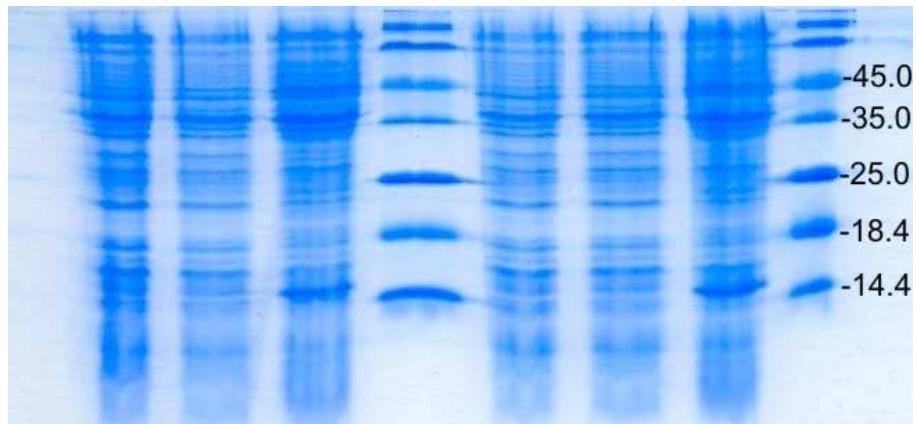
#### 4.2.1 Expressionsscreening

##### Expressionsscreening der Domäne LOV1 C57G L101C

Nachdem das der Doppelmutante LOV1 C57G L101C zugrundeliegende Plasmid zur Verfügung stand, galt es im nächsten Schritt zunächst, das fragliche Plasmid in BL21-Zellen zu transformieren (siehe Abschnitt 3.5.1) und mittels einer neu erlichen Kolonie-PCR (siehe Abschnitt 3.5.10) diejenigen Bakterienkolonien zu identifizieren, die tatsächlich das Insert enthielten. Mit diesen Kolonien konnte dann ein Expressionsscreening durchgeführt werden, anhand dessen in Erfahrung gebracht werden konnte, ob die Bakterien dieser Kolonien tatsächlich die gewünschte Proteindomäne in zufriedenstellendem Maße produzierten. Bei dieser

Methode wird anfangs eine 4 ml-Vorkultur über Nacht nach den Bedingungen aus Abschnitt 4.2.2 inkubiert. Nach Bestimmung der  $OD_{600}$  dieser Kultur wird eine 20 ml-Kultur mit gerade einer so großen Menge der Vorkultur angeimpft, dass deren  $OD_{600}$  einen Wert von 0.05 annimmt. Diese Kultur wird dann der in Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Expressions-Prozedur unterzogen. Dabei wird insbesondere nach Anwachsen der Kultur auf eine  $OD_{600}$  von 0.4 - 0.6 die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert. Um den Verlauf der Expression verfolgen zu können, werden an verschiedenen Stellen Proben gezogen, die später mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.6.5) untersucht werden. Konkret wurden 1 ml-Proben nach dem Anwachsen der Kulturen auf eine  $OD_{600}$  von 0.4 - 0.6, vor der IPTG-Zugabe - zwischen diesen beiden Zeitpunkten liegt ja eine zweistündige Phase des Abkühlens auf 18°C - und nach Beendigung der Expression genommen. Diese Proben wurden zentrifugiert, das Pellet wurde mit soviel STE-Puffer (siehe Abschnitt 3.1) aufgenommen, dass die resultierende Lösung eine  $OD_{600}$  von 20 hatte. Nach einem 5-minütigen Erhitzen der Proben auf 95°C wurden diese schließlich auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Abschnitt 3.6.5).

Abbildung 4.3 zeigt ein aus einem solchen Expressionscreening für die LOV1 C57G L101C-Domäne herrührendes 20 %iges SDS-Gel. In den Spuren 4 und 8 befindet sich ein Protein-Standard (peqGold Protein-Marker I, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), der durch Vergleich eine Bestimmung der Größe der auf dem Gel laufenden Proteine erlaubt. Die Banden dieses Standards entsprechen Massen von 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 und 14.4 kDa. Die Spuren 1 - 3 bzw. 5 - 7 gehören zu den beiden Kolonien 1 bzw. 2: Die jeweils erste Bahn dieser beiden 3er-Gruppierungen (also 1 bzw. 5) enthält die nach dem Anwachsen genommene Probe, die jeweils zweite Bahn die vor der IPTG-Zugabe gezogene Probe und die jeweils dritte Bahn die nach dem Ende der Expression extrahierte Probe. Vergleicht man die nach dem Ende der Expression gezogenen Proben (also 3 und 8) mit den vor der IPTG-Zugabe genommenen (also 2 und 7), dann ist ganz deutlich zu erkennen, dass nach der Expression eine zusätzliche Bande knapp über der 14.4 kDa-Bande des Markers auftaucht. Da das Apoprotein der LOV1 C57G-Mutante gerade eine Masse von 14851.77 Da besitzt [74], und der Chromophor FMN zusätzlich eine Masse von 456 Da aufweist, kann diese Bande der gewünschten Proteindomäne LOV1 C57G L101C zugeordnet werden.



**Abbildung 4.3:** 20 %iges SDS-Gel eines Expressionsscreenings mit LOV1 C57G L101C; in den Spuren 4 und 8 befindet sich der Standard peqGold Protein-Marker I mit den Massen 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4 und 14.4 kDa; Spur 1 - 3: Kolonie 1 (nach dem Anwachsen, vor der IPTG-Zugabe, nach der Expression); Spur 5 - 8: Kolonie 2 (nach dem Anwachsen, vor der IPTG-Zugabe, nach der Expression).

Man kann daher davon ausgehen, dass beide Bakterienkolonien das Zielprotein in ausreichendem Maße exprimieren. Daher wurden von beiden Kolonien Glycerinkulturen angelegt (siehe Abschnitt 3.6.7), auf die bei weiteren Expressionen der Domäne zurückgegriffen werden konnte.

### Expressionscreening der weiteren Doppelmutanten

Dieselbe Vorgehensweise wurde auf die übrigen Doppelmutanten angewendet. Dabei konnten im Falle der LOV1 F41Y C57G - und der LOV1 C32S C57G-Mutanten ebenfalls entsprechende Banden beobachtet werden, wenn auch weniger ausgeprägt. Lediglich bei der LOV1 C57G L60C-Mutante war keine deutlich hervortretende Bande auszumachen. Das weniger klare Ergebnis der letzteren drei Doppelmutanten kann darauf zurückgeführt werden, dass bei der Analyse dieser Testexpressionen jeweils ein 15 %iges SDS-Gel verwendet wurde, das im Vergleich zu dem bei der LOV1 C57G L101C-Mutante eingesetzten 20 %igen SDS-Gel den interessierenden Bereich niedriger Massen weniger deutlich auftrennt.

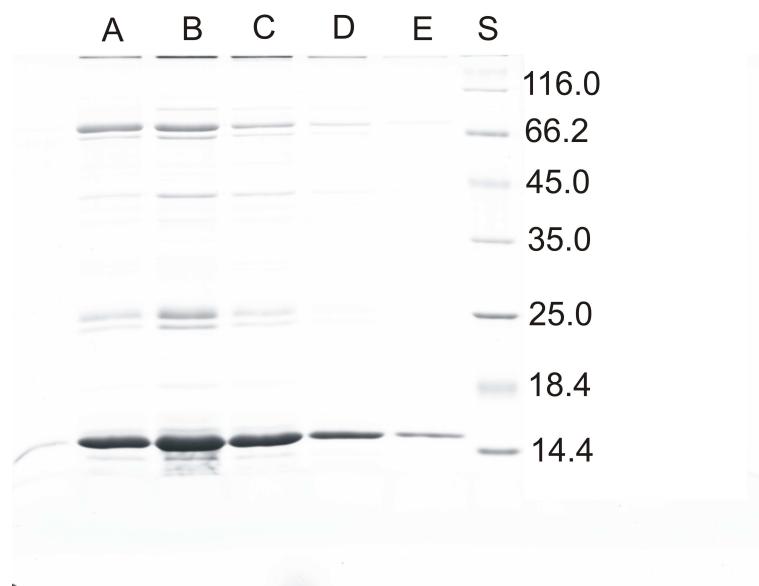
### 4.2.2 Expression

#### Expression von LOV1 C57G L101C

Nachdem per Expressionsscreening geeignete Klone bestimmt wurden, konnte die Doppelmutante LOV1 C57G L101C in größerem Maßstab nach dem in Abschnitt 3.6 beschriebenen Protokoll hergestellt werden.

In den BL21-Bakterienzellen wurde, sobald sie die logarithmische Wachstumsphase erreicht hatten, die Expression der Proteindomäne durch Zugabe von IPTG initiiert. Zur ausreichenden Anreicherung der Domäne wurde die Bakteriensuspension über Nacht bei 18°C inkubiert. Daraufhin wurden deutlich grünlich fluoreszierende Zellen geerntet, die bereits auf eine erfolgreiche Überproduktion der Domäne hindeuteten. Aus dem Lysieren der Zellen mittels Ultraschall und dem Abtrennen von Zellfragmenten durch Zentrifugation resultierte ein ausgeprägt grün gefärbtes Cytosol. Seine für eine LOV-Domäne typische Fluoreszenz ließ vermuten, dass das FMN bindende Zielprotein darin gelöst war. Wurde der Überstand anschließend auf eine Ni-NTA-Affinitätssäule aufgetragen, so nahm auch diese die charakteristische grün-gelbe Farbe an, wohingegen der Durchlauf nur noch schwach gelb gefärbt war. Aus dieser Beobachtung war zu schließen, dass die Domäne mit ihrem His-Tag in gewünschter Weise an die Ni-Ionen der Säule gebunden hat. Auch nach Waschen der Säule mit Waschpuffer blieb erwartungsgemäß die Farbe der Säule erhalten. Nun konnte die Protein-Domäne mit Elutionspuffer von der Säule gespült werden. Dabei wurden 3 ml-Fraktionen geschnitten, die - erkennbar an ihrer Fluoreszenz - das Zielprotein enthalten sollten.

Zur Identifizierung der Domäne wurden im nächsten Schritt Proben der einzelnen Fraktionen auf ein 15 %iges SDS-Gel (siehe Abschnitt 3.6.5) aufgetragen. Abbildung 4.4 zeigt das resultierende Gel. In Spur S befindet sich der bereits aus dem vorangehenden Abschnitt bekannte Protein-Standard (peqGold Protein-Marker I, peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland); insbesondere seine Bande niedrigster Masse entspricht einer Masse von 14.4 kDa. In den übrigen Bahnen A bis E erscheinen die aufgetrennten Proben der einzelnen Protein-Fraktionen. An der jeweils unterschiedlich stark ausgeprägten Bande knapp über der 14.4 kDa-Bande des Standards ist zu erkennen, dass alle Fraktionen ein Protein der gewünschten Größe enthalten sollten. Die in den einzelnen Spuren auszu-



**Abbildung 4.4:** 15 %iges SDS-Gel nach der Expression und Isolierung von LOV1 L101C mittels Affinitätschromatografie: Die Spuren A bis E enthalten die einzelnen Protein-Fraktionen, in S befindet sich der Protein-Standard *peqGold Protein-Marker I*, der Proteine der Massen 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 kDa beinhaltet.

machenden zusätzlichen Banden legen nahe, dass die Proteinlösung auch nach der Affinitätschromatografie durchaus noch verunreinigende Fremdproteine höherer molekularer Massen enthält. Auf eine weitere Aufreinigung wurde allerdings verzichtet, da die Qualität der Proben für die durchzuführenden spektroskopischen Messungen ausreichend erschien.

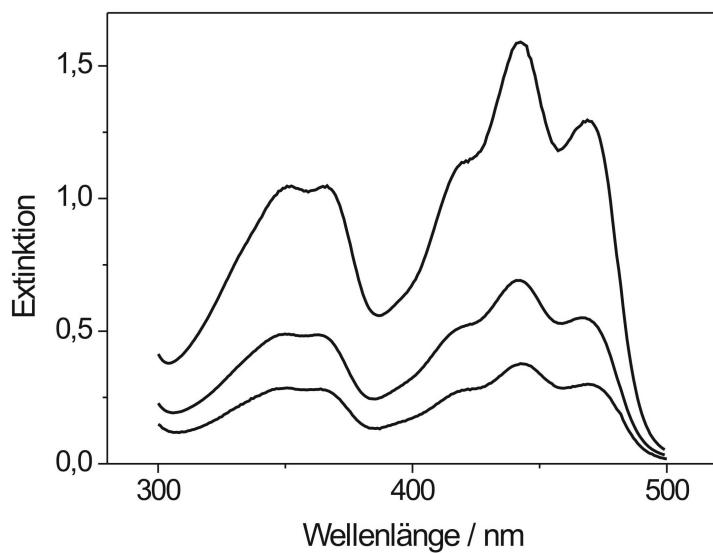
### Expression der weiteren Doppelmutanten

Zur Expression der weiteren Mutanten LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G wurde nach derselben Strategie verfahren. Was die Farbe von Cytosol, beladener Affinitätssäule, Durchlauf und geschnittener Protein-Fraktionen angeht, waren ähnliche Beobachtungen, wie sie im vorangehenden Abschnitt geschildert wurden, festzustellen. Insbesondere die Identifizierung der Domänen mit Hilfe eines SDS-Gels ergab zum einen jeweils eine Bande knapp über der 14.4 kDa-Bande des Markers, die auf das Vorhandensein des Zielproteins hindeutete, und zum anderen mehrere Banden höherer Masse, die die Anwesenheit verunreinigender Fremdproteine nahelegten.

### 4.2.3 Charakterisierung der Doppelmutanten durch UV/Vis-Spektroskopie

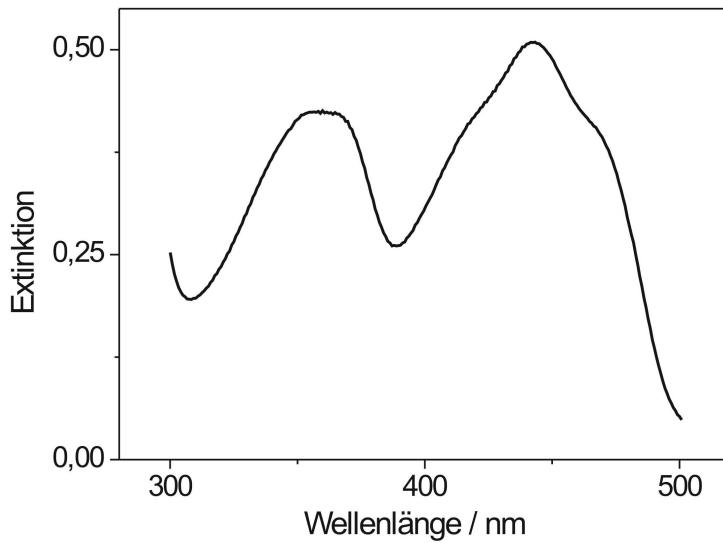
Die Einführung von Mutationen in Photorezeptoren ist ein wertvolles Mittel, um mechanistische Vorstellungen zur Photoreaktion zu bekommen und zu überprüfen. Dabei ist wichtig, dass sich die Mutanten nur gezielt in einzelnen Eigenschaften vom Wildtyp unterscheiden, wie z.B in ihrer Reaktionskinetik oder der Anzahl der gebildeten Intermediate. Weichen Mutanten allerdings schon in ihrem Absorptionsverhalten grundlegend von dem des Wildtyps ab, dann stellen sie kein geeignetes Vergleichssystem mehr dar. Daher ist es angezeigt, zunächst die Absorptionsspektren neu eingeführter Mutanten zu kontrollieren. Diese Methode gibt außerdem Auskunft hinsichtlich der Integrität eines Photorezeptors, also in der Frage, ob überhaupt ein Chromophor in das Protein eingebaut wurde. Schließlich kann auf diese Weise über den Extinktionskoeffizienten des Protein-gebundenen Chromophors (siehe Abschnitt 3.6.10) die Konzentration der Proteinlösungen ermittelt werden, was in vorliegendem Fall für die Gestaltung der folgenden Belichtungsexperimente von Bedeutung war.

In Abbildung 4.5 sind im Wellenlängenbereich von 300 bis 500 nm die Absorptionspektren der LOV1 C57G L101C- (Spektrum mittlerer Extinktion) sowie der LOV1 C32S C57G-Mutante (Spektrum niedrigster Extinktion) dargestellt. Zum Vergleich ist außerdem das Spektrum des Wildtyps der LOV1-Domäne abgebildet (Spektrum höchster Extinktion). Es ist festzustellen, dass die hier eingeführten Mutationen keine Auswirkung auf das Absorptionsverhalten der jeweiligen Domäne haben. So stimmen zum einen die Banden im blauen Spektralbereich in Gestalt und Lage mit dem wildtypischen Vergleichsspektrum überein; speziell das Hauptmaximum befindet sich bei einer Wellenlänge von 447 nm. Die geringfügigen Unterschiede im Höhenverhältnis der beiden Nebenmaxima sind durch die Art der Darstellung bedingt. Zum anderen ist aber auch im nahen UV-Bereich eine Übereinstimmung von Wildtyp und Mutanten zu beobachten: Alle drei Spektren lassen gleichermaßen eine Feinstruktur in der 350 nm-Bande erkennen. An dieser Stelle ist außerdem anzumerken, dass auch das Spektrum der Einfachmutante LOV1 C57G, das hier nicht gezeigt ist, in Position und Struktur der Banden dem des Wildtyps gleichkommt.



**Abbildung 4.5:** Absorptionsspektren von LOV1 Wildtyp (Spektrum größter Extinktion), LOV1 C57G L101C (Spektrum mittlerer Extinktion) sowie LOV1 C32S C57G (Spektrum niedrigster Extinktion).

Das Absorptionsspektrum der LOV1 F41Y C57G-Doppelmutante wiederum ist Abbildung 4.6 zu entnehmen. Im Gegensatz zu den Spektren aus Abbildung 4.5 weist dieses sowohl in der “blauen” Bande als auch in derjenigen des nahen UV-Bereichs keine ausgeprägte Feinstruktur auf. Vielmehr ist statt der in Abbildung 4.5 noch dreigeteilten Absorptionsbande bei ca. 450 nm in vorliegendem Fall ein einzelnes Maximum mit nur leicht angedeuteten Schultern auszumachen. Diese Beobachtung kann darauf zurückgeführt werden, dass die Lösung neben dem Protein-gebundenen FMN auch freien Kofaktor enthält, so dass dem strukturierten Spektrum des an die Protein-Domäne gebundenen FMN die strukturlosen Banden des frei in der Lösung schwimmenden Chromophors überlagert sind. Im Fall dieser Mutante ist es also wohl nicht gelungen, ausschließlich die intakte, das Flavin spezifisch bindende Protein-Domäne zu isolieren, sondern auch denaturierte, die den Kofaktor scheinbar freigegeben hat. Da dieses ungebunden anmutende FMN aber im Zuge der Affinitätschromatografie nicht abgetrennt wurde, muss es weiterhin unspezifisch an denaturierte oder regulär gefaltete Domänen gebunden sein. Somit wirkt sich die Proteinumgebung nicht mehr auf das Absorptionsverhalten des Flavins aus; sie verhindert aber, dass es ungehindert durch die Säule



**Abbildung 4.6:** Absorptionsspektrum der Doppelmutante LOV1 F41Y C57G.

wandert.

Im Falle von LOV1 C57G L60C wurde auf die Darstellung eines Absorptionsspektrums verzichtet, da von dieser Doppelmutante kein Spektrum zu erhalten war, das auf die Anwesenheit des Chromophors FMN - spezifisch oder unspezifisch gebunden - hingedeutet hätte. Während also das SDS-Gel aus dem vorangehenden Abschnitt 4.2.2 noch das Vorhandensein eines Proteins der gewünschten Größe belegt und somit eine erfolgreiche Expression vermuten lässt, schließen die resultierenden Absorptionsspektren dies aus.

Für Belichtungsexperimente geeignet waren den geschilderten Ergebnissen zufolge also nur die beiden Mutanten LOV1 C57G L101C sowie LOV1 C32S C57G. Ungeklärt bleibt an dieser Stelle die Frage, ob die beiden mutierten LOV-Domänen LOV1 F41Y C57G und LOV1 C57G L60C durch eine weitere Optimierung der Parameter der Expression und der Aufreinigung intakt isoliert werden könnten oder ob dies aufgrund der anvisierten Mutationen grundsätzlich nicht möglich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wären eingehendere Untersuchungen vonnöten, die hier nicht durchgeführt werden.

## Diskussion

Die Absorptionsbande bei 350 nm gilt in der Literatur als empfindlicher Indikator für die lokale Umgebung des Chromophors. So zeigen LOV1-Domänen aus *C. reinhardtii* [23], *A. sativa* [75] und *A. thaliana* [76] einen Verlauf mit zwei Maxima um 350 nm. Damit im Einklang stehen die Beobachtungen in vorliegender Studie zu den Doppelmutanten LOV1 C57G L101C und LOV1 C32S C57G, die beide gleichermaßen eine Doppelhöckerstruktur aufweisen. LOV2-Domänen aus *A. sativa* [75], *A. capillus-veneris* [32] und *A. thaliana* [76] dagegen besitzen eine dem freien FMN ähnliche Struktur mit einem einzelnen Maximum um 380 nm. Mutiert man allerdings das reaktive Cystein in *A. sativa* LOV2 zu Serin oder Alanin, dann erhält man ebenfalls den bereits genannten Verlauf mit zwei Maxima [28]. Diese Erscheinung ist überraschend, da beim Übergang vom Wildtyp zur Serin-Mutante lediglich ein Schwefel-Atom gegen einen Sauerstoff ausgetauscht wird. Einige Mutationen führen sogar dazu, dass der Chromophor FMN nicht oder nur noch in geringen Mengen gebunden wird. Dies ist z.B. beim Austausch des Cystein 57 gegen ein Tyrosin der Fall; es ist nachzuvollziehen, wenn man bedenkt, dass der Tyrosin-Rest viel mehr Platz beansprucht als das Cystein.

## 4.3 Photoreduktion mit EDTA - Etablierung des Belichtungsexperiments

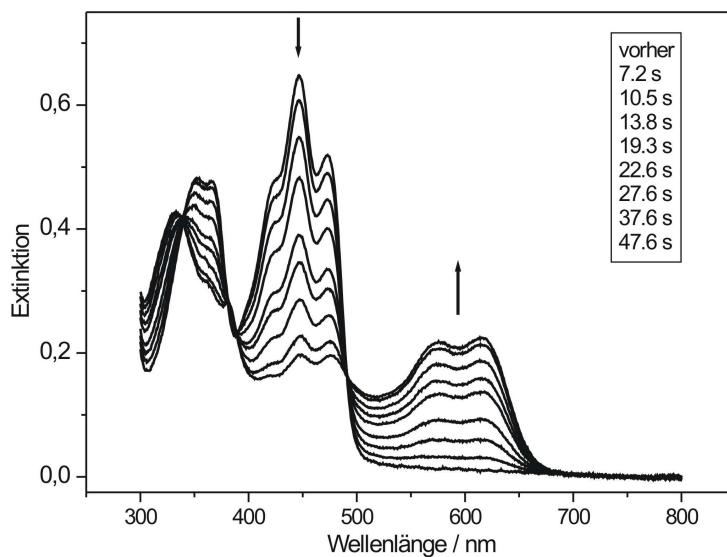
Flavoproteine können durch eine Reihe von Reduktionsmitteln in das Radikal oder das Dihydroflavin umgewandelt werden. Beispiele hierfür sind Dithionit, Borhydrid oder Wasserstoff [77]. Sollen die entsprechenden Lösungen allerdings spektroskopisch untersucht werden, dann sind diese Reduktionsmittel zumeist ungeeignet, da die Reagenzien oder zusätzlich benötigte Redoxvermittler und Katalysatoren im spektralen Bereich unter 350 nm absorbieren oder sogar mit Flavin zu Addukten reagieren. Eine elegante Alternative stellt die Photoreduktion dar, bei der die Reaktivität des angeregten Flavins ausgenutzt wird. Das Flavin im Triplet-Zustand ist nämlich in der Lage, Elektronen von externen Donoren zu abstrahieren. Seit langem etabliert ist die Photoreduktion in Gegenwart von EDTA [15]. Bereits 2003 wendeten Kottke *et al.* dieses Verfahren erstma-

lig auf eine LOV-Domäne aus *C. reinhardtii* an und erzeugten so das neutrale Semichinonradikal der LOV1-Domäne [41]. Dabei setzten sie jedoch nicht den Wildtyp der Domäne ein, da darin in Konkurrenz zur Photoreduktion die sehr schnelle Adduktbildung stattfindet. Stattdessen zogen sie die C57S-Mutante der LOV1-Domäne heran, in der die Adduktbildung durch den Austausch des reaktiven Cystein gegen ein Serin unterbunden ist.

In vorliegender Studie wurde auf diese Standardreaktion zurückgegriffen, um in einem ersten Schritt Gestaltung, Durchführung und Auswertung eines Belichtungsexperiments zu etablieren. Kottke *et al.* belichteten die Protein-Domäne mit Hilfe einer 100 W Wolframlampe und eines 435 nm Kantenfilters in minutenlangen Paketen. Dazwischen nahmen sie im Wellenlängenbereich von 300 bis 800 nm Absorptionsspektren des Reaktionsgemisches auf und verfolgten so die Ausbildung der Radikal-Spezies. In Abwandlung dieser Vorgehensweise wurden nun als Lichtquelle zwei senkrecht zum Abfrage-Lichtstrahl angeordnete Hochleistungs-LED verwendet. Aufgrund der weit höheren Strahlungsleistung dieser Leuchtdioden musste in unserem Fall nur noch in Portionen von Sekunden angeregt werden. Zwischen den Anregungs-Blitzen wurden übereinstimmend mit der Vorgehensweise von Kottke *et al.* zur Beobachtung des Reaktionsfortschritts UV/Vis-Spektren aufgezeichnet. Da außerdem in Abwesenheit von Sauerstoff experimentiert wurde, konnte das entstehende Radikal auf die Dauer der zeitlichen Zwischenräume der Blitze hin gesehen als stabil angenommen werden. Somit sollte in diesen Unterbrechungen der Belichtung ein stabiler und konstanter Zustand vorherrschen. Folglich erlaubte diese Strategie - wie bei Kottke *et al.* - die Aufnahme einer aus einer Vielzahl von Spektren bestehenden Sequenz als Funktion der Belichtungszeit. Abweichend von den angeführten Experimentatoren wurde in vorliegendem Fall nicht die C57S-Mutante der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* eingesetzt, sondern die C57G-Mutante, in der an die Stelle des Cysteins die kleinstmögliche Aminosäure Glycin tritt.

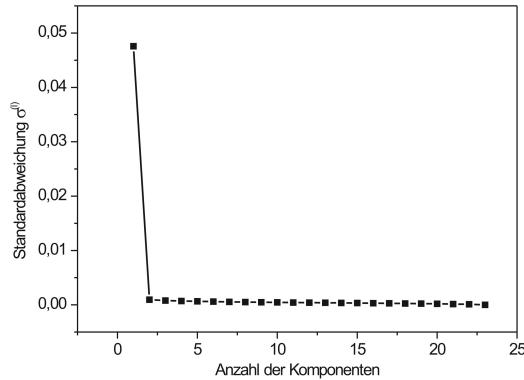
### 4.3.1 Das Experiment

Die Proteindomäne LOV1 C57G war in einem 10 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8.0 gelöst, der zusätzlich 10 mM NaCl und 0.1 mM PMSF enthielt. Der Ansatz wurde nach der in Abschnitt 3.6.9 dargelegten Protein-schonenden



**Abbildung 4.7:** Sequenz der Absorptionsspektren aus dem Belichtungsexperiment mit EDTA als externen Donor (es sind nicht alle Spektren der gemessenen Reihe dargestellt); die Pfeile zeigen die Entwicklungsrichtung der Spektren an; im Kasten sind die entsprechenden Belichtungszeiten aufgeführt.

Methode von Sauerstoff befreit. Das Reduktionsmittel EDTA wurde - ebenfalls zuvor entgast - mit einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt (Stammlösung 100 mM in Dialysepuffer). Während des Experiments wurde Argon über die in einer Quarzküvette befindliche Proteinlösung geleitet; die Temperatur in der Küvette wurde mit Hilfe eines Wasser-Thermostaten konstant bei 20°C gehalten. Die Proteinlösung wurde mit den beiden Hochleistungs-LED in Belichtungsschritten von 1.1 bzw. 5 s angeregt. Nach jedem Blitz wurde jeweils ein UV/Vis-Spektrum im Wellenlängenbereich von 300 bis 800 nm gemessen. Abbildung 4.7 zeigt eine aus einem solchen Experiment resultierende Sequenz von Absorptionsspektren. Das vor Beginn der Belichtung aufgenommene Spektrum entspricht dem in Abbildung 1.6 dargestellten Spektrum des Dunkelzustands LOV1-447. Bereits nach einer Belichtungsdauer von 7.2 s beginnt dieser spektrale Verlauf sich zu verändern. Mit zunehmender Belichtungszeit bildet sich - angezeigt durch einen Pfeil - eine Absorptionsbande mit Maxima bei 570 und 610 nm heraus, die dem in Abschnitt 1.2 angesprochenen Neutralradikal des Flavoproteins zugeordnet werden kann [15]. Gleichzeitig nimmt die charakteristische Bande des oxidierten Fla-



**Abbildung 4.8:** Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  der unter Verwendung einer steigenden Anzahl an Komponenten rekonstruierten Datenmatrix von den experimentell ermittelten Messdaten.

vin um 450 nm immer mehr ab. Da die Radikalbildung nach 47.6 s abgeschlossen ist, wurde die Belichtung beendet. Das Einleiten von Luft in die Lösung führte zu einer vollständigen Regenerierung der Absorption des unbelichteten Zustands. Die Spektren-Sequenz zeigt vier isosbestische Punkte bei 491, 389, 381 und 339 nm, woraus geschlossen werden kann, dass das Reaktionsgemisch tatsächlich nur die beiden genannten Spezies enthält. Das geschilderte Experiment nimmt also eine zu der von Kottke *et al.* berichteten Untersuchung analoge Entwicklung und bestätigt damit die in der Literatur bereits seit langem bekannte Photoreduktion von Flavoproteinen durch EDTA.

### 4.3.2 Der formale Weg der Auswertung

Die in Abbildung 4.7 dargestellten, als Funktion der Belichtungszeit gemessenen Absorptionsspektren bilden eine Messmatrix  $\mathbf{D}$ . Diese kann nach der in Abschnitt 3.4 beschriebenen Methode der Singulärwertzerlegung (SVD) einer eingehenderen Analyse unterzogen werden. Nach Berechnung der SVD der Matrix  $\mathbf{D}$  gilt es im nächsten Schritt durch Auftragung der Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  aus Gleichung 3.16 gegen die Anzahl der zur Rekonstruktion der Daten verwendeten Komponenten die Zahl der signifikanten Komponenten zu ermitteln. Diese Zahl der zur Darstellung der Datenmatrix notwendigen Komponenten wird als Anzahl der spektralen Komponenten aufgefasst. In Abbildung 4.8 ist eine solche Auftragung für das vorliegende Beispiel dargestellt. Man erkennt, dass die Standardabwei-

chung  $\sigma^{(l)}$  mit der dritten und allen folgenden Komponenten nur noch geringfügig abnimmt. Demnach tragen nur zwei Komponenten relevante Information zur Rekonstruktion bei, während die anderen Komponenten nur Rauschen enthalten. Diese Vorgehensweise bestätigt also, dass - wie bereits aus dem Vorhandensein isosbestischer Punkte geschlossen wurde - im Reaktionsgemisch zwei Spezies zu den gemessenen Spektren beitragen.

Die Hauptaufgabe der Analyse besteht nun darin, die Absorptionsspektren und Konzentrations-Zeit-Profile der einzelnen Verbindungen zu ermitteln. Für eine gegebene Zahl  $k$  von Komponenten kann ein Satz von Spektren und Konzentrations-Zeit-Profilen definiert werden durch:

$$\mathbf{F} = \mathbf{U}\mathbf{X} \quad (4.1)$$

sowie durch:

$$\mathbf{C}^T = \mathbf{X}^{-1} \mathbf{S}^{(k)} \mathbf{V}^T. \quad (4.2)$$

Dabei steht  $\mathbf{S}^{(k)}$  für die Matrix  $\mathbf{S}$ , in der alle Diagonalelemente  $s_s$  mit  $s > k$  gleich Null gesetzt wurden;  $\mathbf{X}$  ist eine nicht-singuläre  $k \times k$ -Matrix. Das Produkt dieser Spektren und Konzentrations-Zeit-Profile ergibt den bei einer gegebenen Anzahl von Komponenten bestmöglichen Fit, d.h.  $\mathbf{F}\mathbf{C}^T = \mathbf{D}^{(k)}$ . Offensichtlich hängt dieser Fit nicht von der Wahl der Matrixelemente von  $\mathbf{X}$  ab, für die folglich Bedingungen auferlegt werden müssen.

Im Weiteren wird speziell der in diesem Abschnitt interessierende Fall von zwei Komponenten (also  $k = 2$ ) behandelt, also gilt für  $\mathbf{D} = \mathbf{U}\mathbf{X}\mathbf{X}^{-1}\mathbf{S}^{(2)}\mathbf{V}^T$ :

$$\mathbf{D}^{(2)} = (\mathbf{u}_1 \ \mathbf{u}_2) \begin{pmatrix} X_{11} & X_{21} \\ X_{12} & X_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} X_{22} & -X_{21} \\ -X_{12} & X_{11} \end{pmatrix} \frac{1}{X_{11}X_{22} - X_{12}X_{21}} \begin{pmatrix} S_1 \mathbf{v}_1^T \\ S_2 \mathbf{v}_2^T \end{pmatrix} \quad (4.3)$$

Da außerdem zu Beginn des vorliegenden Experiments nur eine Komponente, nämlich der Dunkelzustand LOV1-447 vorliegt, kann für die erste Spalte der Datenmatrix geschrieben werden:

$$\mathbf{d}_1^{(2)} = \mathbf{u}_1 S_1 V_{11}^T + \mathbf{u}_2 S_2 V_{21}^T. \quad (4.4)$$

Weiterhin gilt:

$$\mathbf{f}_1 = \mathbf{u}_1 X_{11} + \mathbf{u}_2 X_{21}. \quad (4.5)$$

Vergleicht man die Koeffizienten vor  $\mathbf{u}_1$  bzw.  $\mathbf{u}_2$  in den beiden Gleichungen 4.4 und 4.5, so ergeben sich die Beziehungen:

$$X_{11} = S_1 V_{11}^T \quad (4.6)$$

sowie

$$X_{21} = S_2 V_{21}^T. \quad (4.7)$$

Für den allgemeinen Fall von  $k$  Komponenten führt besagte Voraussetzung, dass zu Beginn des Experiments nur eine einzige Verbindung vorhanden ist, auf die Beziehungen:

$$\mathbf{d}_1^{(k)} = \sum_s^k \mathbf{u}_s s_s V_{s1}^T = \mathbf{s}_1 = \sum_s^k \mathbf{u}_s X_{s1}, \quad (4.8)$$

woraus man durch Koeffizientenvergleich ableiten kann, dass:

$$X_{s1} = s_s V_{s1}^T. \quad (4.9)$$

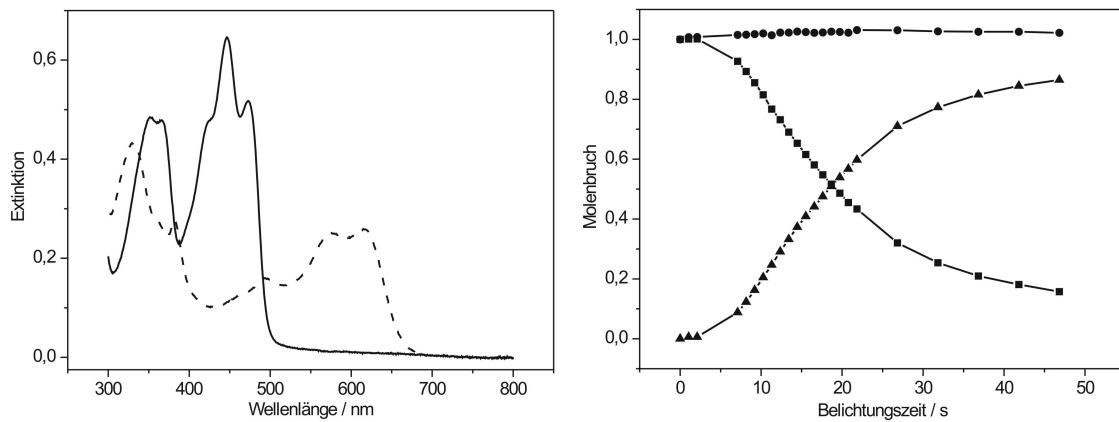
Nun wieder zurück zum speziellen Fall  $k = 2$ : Zur Bestimmung der weiteren Matrixelemente von  $\mathbf{X}$  wird die Information ausgenutzt, dass ein isosbestischer Punkt vorliegt und zwar an der Stelle  $\lambda_j$ . Daraus folgt  $F_{j1} = F_{j2}$ . Dies führt zu:

$$X_{11} U_{j1} + X_{21} U_{j2} = X_{12} U_{j1} + X_{22} U_{j2}. \quad (4.10)$$

Daraus ergibt sich für  $X_{22}$ :

$$X_{22} = X_{21} + (X_{11} - X_{12}) \frac{U_{j1}}{U_{j2}}. \quad (4.11)$$

Da im vorliegenden Experiment, in dem das Semiquinonradikal aus dem oxidierten FMN entsteht, keine vierte Bedingung formuliert werden kann, ist das



**Abbildung 4.9:** links: Aus der skizzierten SVD-Analyse resultierende Absorptionspektren des Dunkelzustands LOV1-447 (durchgezogene Linie) bzw. des Semichinonradikals (gestrichelte Linie); rechts: Die entsprechenden Konzentrations-Zeit-Profile von LOV1-447 (Vierecke) bzw. des Radikals (Dreiecke); mit Kreisen ist der Verlauf der Summe der beiden Molenbrüche dargestellt.

Verhältnis  $\frac{X_{12}}{X_{22}}$  unbestimmt. Daher wird es in einer Abschätzung so gewählt, dass ein charakteristischer Peak von Spezies 1 im Spektrum von Spezies 2 nicht mehr auszumachen ist. Im konkreten Fall soll die typische Flavin-Bande um 447 nm im Spektrum der zweiten Verbindung nicht mehr zu beobachten sein. Wenn man die skizzierte Vorgehensweise auf das in diesem Abschnitt diskutierte Beispiel anwendet und dabei den isosbestischen Punkt bei einer Wellenlänge von 491 nm wählt, dann erhält man die in Abbildung 4.9 links dargestellten Absorptionsspektren sowie die rechts zu erkennenden Konzentrations-Zeit-Profile.

Das geschilderte Prozedere ist natürlich äquivalent zu folgendem einfachen Vorgehen: Aufgrund der Bedingung, dass zu Beginn des Experiments nur das oxidierte Flavin vorliegt, ist das erste aufgenommene Spektrum eben gleich dem Spektrum dieser Spezies. Das Spektrum der zweiten Spezies, des Radikals, erhält man dann, indem man vom zuletzt gemessenen Spektrum gerade soviel des ersten Spektrums abzieht, dass die charakteristische Flavin-Bande um 447 nm darin verschwindet. Da die Photoreduktion nicht vollständig abreagiert, sollte das letzte Spektrum ja immer noch Reste des oxidierten Flavins enthalten. Allerdings wurde bereits an dieser Stelle der formale Weg der Auswertung dargelegt, um im Weiteren darauf zurückgreifen zu können und auf diese Weise Beziehungen zwischen den verschie-

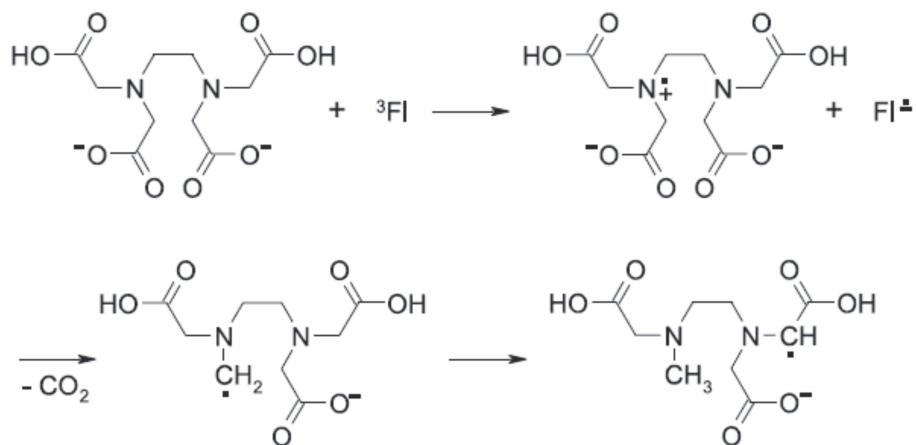
denen Experimenten herzustellen.

### 4.3.3 Diskussion

Wie bereits Kottke *et al.* für den Fall der Photoreduktion einer C57S-Mutante der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* mit EDTA berichtet haben [41], wurde auch in vorliegender Studie bei Durchführung des entsprechenden Experiments mit der C57G-Mutante der gleichen LOV-Domäne die Ausbildung eines neutralen Semiquinonradikals beobachtet. Die Messung zeigt somit, dass die LOV1-Domäne zu der Gruppe von Flavoproteinen gehört, bei der das Neutralradikal gegenüber der anionischen Form bevorzugt gebildet wird [15]. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass ungeladene Zustände in der unpolaren Bindungstasche dieser Protein-Domäne besser stabilisiert werden.

Auch Kay *et al.* führten ähnliche Belichtungsexperimente mit einer C450A-Mutante der LOV2-Domäne aus *A. sativa* Phototropin durch [39]. Im Unterschied zum aktuellen Experiment stellten sie die Bildung der neutralen Radikalform aber auch in Abwesenheit des Donors EDTA fest. Die Autoren erklären diesen Vorgang über eine Protein-interne Elektronenübertragung durch eine nicht-identifizierte, redoxaktive Aminosäure. Als Kandidaten hierfür führen sie die Aminosäuren Tryptophan, Histidin und Tyrosin an.

Was den Mechanismus der Photoreduktion von Flavoproteinen durch den externen Donor EDTA angeht, postuliert eine Studie aus dem Jahre 1978, dass zunächst freies Flavin in der Lösung durch EDTA zum Dihydroflavin reduziert wird. Dieses wiederum, so die Autoren, reduziert in einer anschließenden Dunkelreaktion das Protein-gebundene FMN [78]. Das freie FMN übernimmt also mutmaßlich die Rolle eines Redox-Mediators. Voraussetzung für diesen Verlauf der Reaktion ist die Anwesenheit von freiem FMN in Lösung. Da der Chromophor in LOV-Domänen nicht-kovalent gebunden ist, ist anzunehmen, dass selbst bei hoher Bindungsaffinität zum Protein einige Flavin-Moleküle für die Katalyse zur Verfügung stehen sollten. Auf den genauen Mechanismus der Photoreduktion von freiem Flavin in Gegenwart von EDTA soll anhand von Abbildung 4.10 eingegangen werden (vgl. [38], [79]). Die wesentliche Eigenschaft des EDTA, die es ihm ermöglicht, das Flavin zu photoreduzieren, ist die Umlagerung des primär entstandenen EDTA-Radikals. Nach der Elektronenübertragung auf das aus An-



**Abbildung 4.10:** Zerfall und Umlagerung des EDTA-Radikals nach Elektronenübertragung auf das Flavin.

regung in den Singulett-Zustand und nachfolgendem *intersystem crossing* hervorgegangene <sup>3</sup>Flavin bildet sich Kohlendioxid und ein weiteres Radikal, das nun erneut ein oxidiertes <sup>3</sup>Flavin reduzieren kann. Somit wird eine Rückübertragung des Elektrons vom radikalischen Flavin im elektronischen Grundzustand auf das EDTA verhindert. Die Flavinradikale disproportionieren dann zum reduzierten und oxidierten Zustand.

Basierend auf einer aktuellen Untersuchung aus dem Jahre 2007 allerdings bezweifeln wir zumindest, was LOV-Domänen anbelangt, dass eine solche oben beschriebene Interflavin-Redoxreaktion zwischen freiem und Protein-gebundenem FMN der bevorzugte Weg des Elektronen-Transfers ist, dass also freies FMN als Redox-Vermittler agiert [80]. Wir halten es stattdessen für möglich, dass in LOV-Domänen EDTA selbst dem gebundenen FMN nahe genug kommt, so dass es direkt ein Elektron übertragen kann. Es ist aber auch denkbar, dass eine Aminosäure des Proteins am Reaktionspfad des Elektronen-Transfers beteiligt ist.

Neben dem Elektron muss zur Bildung eines Neutralradikals auch ein Proton auf das FMN übertragen werden. Dieses muss allerdings nicht vom Protein stammen, sondern kann auch aus der Lösung kommen, da die Bindungstasche prinzipiell für Protonen zugänglich ist. So wurde durch IR-Spektroskopie gezeigt, dass in D<sub>2</sub>O das Cystein 57-Thiol-Proton der LOV1-Domäne gegen Deuterium ausgetauscht

wird [31].

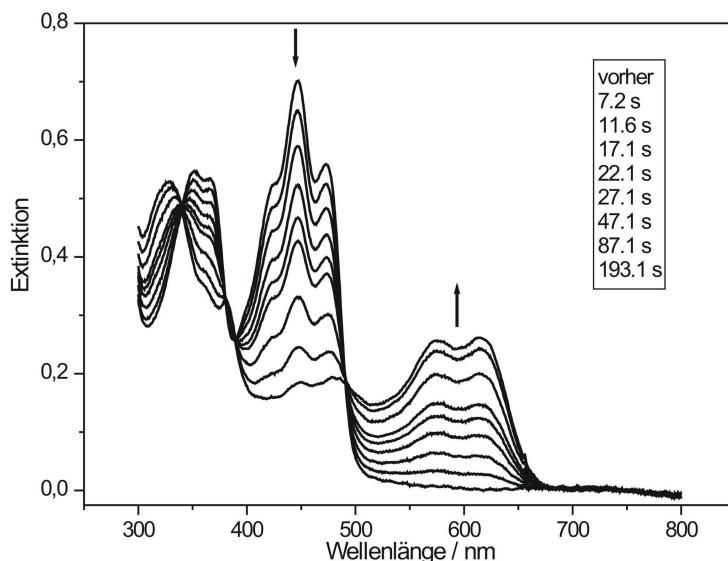
## 4.4 Thiole in der Rolle des reaktiven Cysteins

Das eigentliche Ziel vorliegender Studie bestand darin, einen weiteren Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Adduktbildung in LOV-Domänen zu leisten. Zu diesem Zweck wurde ein Modellsystem des sensorischen Apparats der wildtypischen Protein-Domäne erzeugt, indem das reaktive Cystein 57 durch eine gezielt eingeführte Punktmutation gegen die Aminosäure Glycin ausgetauscht wurde. Dadurch wurde zum einen erreicht, dass in Abwesenheit der Thiolfunktion des Cysteins die natürliche Photoadduktbildung nicht ablaufen konnte. Zum anderen wurde durch die Wahl der Aminosäure Glycin dafür gesorgt, dass der verfügbare Innenraum der Proteinbindungstasche sein maximales Volumen annahm, da es sich bei dieser Aminosäure um die kleinstmögliche aller nativen Proteinbausteine handelt. Des Weiteren musste dem Reaktionsgemisch natürlich ein externer Reaktionspartner hinzugefügt werden, der die Rolle des Cysteins 57 übernehmen sollte. Nachdem im vorangehenden Kapitel ein erstes Vorexperiment mit dem bekannten Elektronen-Donor EDTA beschrieben wurde, sollte nun - um den natürlichen Verhältnissen der Protein-Domäne näher zu kommen - ein Molekül mit einer Thiolfunktion eingesetzt werden. Guo führte bereits 2005 ähnliche Experimente mit der C57S-Mutante und Etanthon (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-SH) bzw.  $\beta$ -Merkaptoethanol (HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH) als externe Reagenzien durch [81]. Anknüpfend daran wurde im nächsten Schritt der aktuellen Untersuchung die bifunktionale Verbindung  $\beta$ -Merkaptoethanol ( $\beta$ -ME) ausgewählt.

### 4.4.1 $\beta$ -Merkaptoethanol

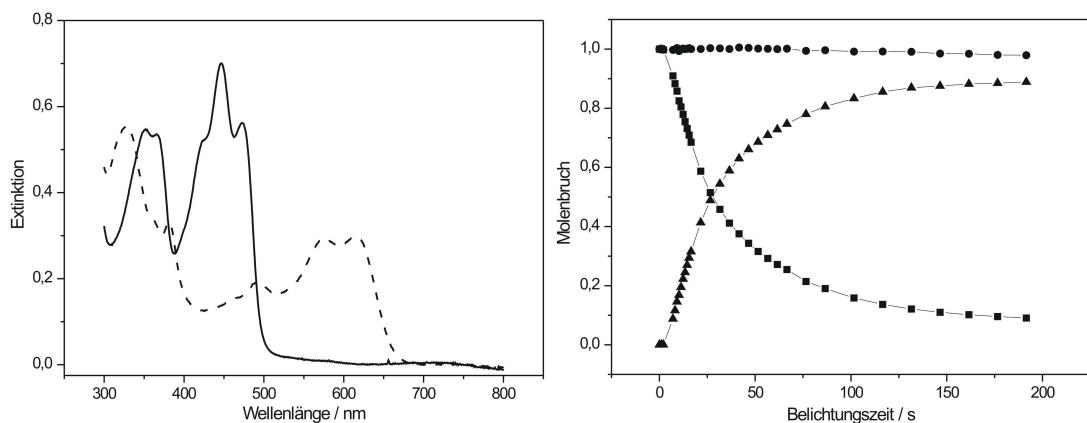
#### Das Experiment

Die in dem bekannten Dialysepuffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) gelöste LOV1 C57G-Domäne wurde nach der Methode aus Abschnitt 3.6.9 von Sauerstoff befreit; durch Darüberleiten eines Argonstroms während der Durchführung des Experiments wurde auch im Weiteren ein Eindringen dieses Gases verhindert. Die Temperatur des Reaktionsgemisches betrug



**Abbildung 4.11:** Sequenz der Absorptionsspektren aus dem Belichtungsexperiment mit  $\beta$ -ME als externen Donor (es sind nicht alle Spektren der gemessenen Reihe dargestellt); die Pfeile zeigen die Entwicklungsrichtung der Spektren an; im Kasten sind die entsprechenden Belichtungszeiten aufgeführt.

konstant 20°C. Der Reaktionspartner  $\beta$ -ME wurde mit einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt. Die Erhöhung der Konzentration um einen Faktor 10 verglichen mit vorangehendem Experiment ist dadurch bedingt, dass bereits bei dieser höheren Konzentration der flüssigen Verbindung  $\beta$ -ME lediglich eine Menge in der Größenordnung von wenigen Mikrolitern zugegeben werden musste. Bei einer weiteren Reduzierung wäre das dann notwendige Volumen nicht mehr handhabbar gewesen. In Übereinstimmung zum EDTA-Experiment wurde die Lösung in Schritten von 1.1, 5, 10 bzw. 15 s belichtet. Abbildung 4.11 zeigt einen Teil der in den Zwischenräumen der Belichtung gemessenen UV/Vis-Spektren. Wie auch im ersten Experiment mit EDTA tritt bereits mit den ersten Belichtungsschritten eine Veränderung des Absorptionsspektrums ein: Die typische Flavin-Bande um 447 nm beginnt abzunehmen, während sich bei 570 bzw. 610 nm zwei Absorptionsmaxima andeuten. Die weitere Entwicklung der Spektren wird wiederum durch Pfeile angedeutet. Nach 193,1 s ist die Radikalbildung abgeschlossen, die Belichtung wird eingestellt. Leitet man dann Luft über das Reaktionsgemisch, so resultiert daraus eine vollständige Regenerierung des Absorptionsverhaltens

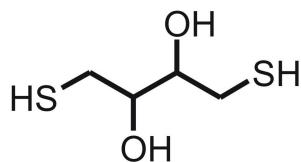


**Abbildung 4.12:** links: Aus der SVD-Analyse resultierende Absorptionsspektren des Dunkelzustands LOV1-447 (durchgezogene Linie) bzw. des Semichinonradikals (gestrichelte Linie); rechts: Die entsprechenden Konzentrations-Zeit-Profile von LOV1-447 (Vierecke) bzw. des Radikals (Dreiecke); mit Kreisen ist der Verlauf der Summe der beiden Molenbrüche dargestellt.

des Dunkelzustands; die Reaktion ist also völlig reversibel. Man erkennt deutlich, dass auch diese Spektren-Sequenz vier scharfe isosbestische Punkte bei 491, 390, 380 und 341 nm aufweist. Diese erste oberflächliche Betrachtung des Experiments legt also den Schluss nahe, dass  $\beta$ -ME mutmaßlich wie EDTA nach Anregung des FMN in den Triplet-Zustand ein Elektron sowie ein Proton auf den Chromophor überträgt. Das Proton kann allerdings auch vom Protein oder aus der umgebenden Lösung stammen; dahingehend liefert unser Experiment keine Aussage. Auch im Falle dieses Reagenzes entsteht nach Belichtung das neutrale Semiquinonradikal. Betrachtet man die bifunktionale Verbindung  $\beta$ -ME, so muss angenommen werden, dass dem Schwefel der Thiolfunktion die Rolle des Elektronendonors zuzuordnen ist, da dieses Element weit weniger elektronegativ ist als der Sauerstoff der benachbarten OH-Funktion.

### Die Auswertung

Die Auswertung der Messdaten wurde analog zum im vorangehenden Kapitel 4.3.2 skizzierten Vorgehen durchgeführt. Die Auftragung der Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  der durch  $l$  Komponenten rekonstruierten Datenmatrix von der experimentell ermittelten Matrix (nicht gezeigt) bestätigt in Übereinstimmung mit dem Vorhandensein isosbestischer Punkte, dass nur zwei verschiedene Spezies zu den gemes-



**Abbildung 4.13:** Strukturformel von Dithiothreitol (DTT).

nen Spektren beitragen. Die Berechnung von Spektren und Konzentrations-Zeit-Profilen der einzelnen Verbindungen führt zu den in Abbildung 4.12 dargestellten Kurven und bestätigt somit die zunächst angestellten Vermutungen.

#### 4.4.2 Dithiothreitol (DTT)

Das im vorangehenden Abschnitt 4.4.1 beschriebene Belichtungsexperiment mit dem externen Elektronendonator  $\beta$ -ME hat aufgezeigt, dass aliphatische Merkaptane grundsätzlich dazu in der Lage sind, LOV-Domänen in derselben Weise wie EDTA zu photoreduzieren, also Elektronen auf im Triplettzustand befindliches FMN zu übertragen. Dieses Geschehen impliziert, dass das Molekül  $\beta$ -ME ( $\text{HO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ ) sich dem in der Bindungstasche der Domäne sitzenden Chromophor bis zu einem solchen Abstand nähern kann, dass ein Elektronen-Transfer möglich ist. Damit drängt sich die Frage auf, ob dieser Transfer verhindert wird, wenn man ein Thiol mit einem größeren aliphatischen Rest verwendet, so dass das Molekül mutmaßlich nicht mehr weit genug in die Bindungstasche eindringen kann. Um eben dieser Frage nachzugehen, wurde im nächsten Schritt dieser Studie auf das voluminösere Merkaptan Dithiothreitol (DTT) als Donor zurückgegriffen. Wie Abbildung 4.13 zu entnehmen ist, entspricht diese Verbindung zwei miteinander verknüpften  $\beta$ -ME-Molekülen; sie findet oftmals Anwendung in der Mikrobiologie: Hier wird sie speziell bei der Präparation von SDS-Gelen zur Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen zugesetzt.

Die experimentellen Bedingungen wurden auch in diesem Fall analog zu Abschnitt 4.3.1 eingestellt: Das Protein lag in dem bekannten Dialysepuffer vor (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0), Entfernung und Fernhalten von Sauerstoff erfolgten nach den beschriebenen Methoden, die Temperatur wurde bei 20°C gehalten. Das Merkaptan wurde wie zuvor das EDTA ausgehend von einer

100 mM Stammlösung (in Dialysepuffer) mit einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Belichtet wurde mit den beiden Hochleistungs-LED in Schritten von 1.1 bzw. 5 s.

Entgegen der eingangs geäußerten Vermutung, DTT könnte zu groß sein, als dass es sich dem FMN für einen Elektronen-Transfer nahe genug nähern könnte, weist die Sequenz der im Wellenlängenbereich von 300 bis 800 nm gemessenen UV/Vis-Spektren (nicht gezeigt) eine zu den Abbildungen 4.7 und 4.11 äquivalente Entwicklung auf: Die Bande des oxidierten Flavins nimmt ab, stattdessen wachsen bei 570 und 610 nm zwei Maxima heraus. Nach etwa 53 s ist die Radikalbildung abgeschlossen, die Belichtung wird abgebrochen. Bei Luftzutritt bildet sich das Ausgangsspektrum des Dunkelzustands zurück, die Reaktion ist reversibel. Auch was die isosbestischen Punkte anbelangt, ist eine Übereinstimmung festzustellen. So finden sich erneut vier solcher Punkte bei 487, 387, 378 und 337 nm. Im Einklang mit dieser eher oberflächlichen Betrachtungsweise der Messergebnisse liefert auch ihre eingehende Analyse ausgehend von dem beschriebenen SVD-Algorithmus das Resultat, dass zwei Spezies im Reaktionsgemisch enthalten sind: Das oxidierte FMN wird anscheinend, sobald es im Triplettzustand ist, durch DTT zum Semiquinonradikal reduziert. Insbesondere nimmt das Spektrum der entstehenden Spezies, also des Radikals, einen ähnlichen Verlauf wie die in den Abbildungen 4.9 sowie 4.12 dargestellten UV/Vis-Spektren.

#### 4.4.3 Diskussion

Im Jahre 2005 belichtete Guo - in Abwandlung des von Kottke *et al.* bereits 2003 durchgeführten Photoreduktionsexperiments einer LOV1-Domäne in Gegenwart von EDTA [41] - die C57G-Mutante der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* bei Anwesenheit der Merkaptane Ethanethiol und  $\beta$ -ME [81]. Dabei setzte sie das Reaktionsgemisch einem einzelnen Belichtungsschritt mit zwei LED desselben Typs, wie sie in der aktuellen Studie verwendet wurden, aus und nahm danach ein einzelnes UV/Vis-Spektrum auf, das die Ausbildung eines neutralen Semiquinonradikals nahelegt. Die Dauer des Lichtblitzes sowie die Konzentration der Reduktionsmittel wurden in dieser Arbeit nicht angegeben, so dass diesbezüglich kein Vergleich mit vorliegender Untersuchung angestellt werden kann.

In unserer Studie wurden diese Belichtungsexperimente von Guo wieder aufgegrif-

fen und in der in Abschnitt 4.3 geschilderten Art und Weise zu einer Sequenz von Belichtungsschritten mit einer Reihe von Absorptionsspektren als Funktion der Belichtungszeit ausgebaut. Dabei konnte unter genau spezifizierten Reaktionsbedingungen wie z.B. Belichtungsdauer oder Konzentration des externen Donors gezeigt werden, dass aliphatische Merkaptane wie  $\beta$ -ME - also Spezies mit einer funktionelle Gruppe, wie sie auch in der Aminosäure Cystein zu finden ist - genau so wie EDTA dazu in der Lage sind, Elektronen auf den in den Triplet-Zustand angeregten Chromophor FMN zu übertragen, diesen also zu photoreduzieren. Im Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob auch ein voluminöseres Merkaptan wie DTT ein Elektron übertragen kann oder ob es aufgrund seines im Vergleich zu  $\beta$ -ME doppelt so großen Volumens aus der Bindungstasche ausgeschlossen ist. Das entsprechende Experiment zeigt, dass auch DTT noch nahe genug für diese Reaktion an den Chromophor herankommt. Ungeklärt bleibt an dieser Stelle die Frage, ob man den Elektronen-Transfer verhindern kann, wenn man das Merkaptan nur groß genug wählt.

Zum Abschluss dieser Versuchsreihe wäre ein quantitativer Vergleich der verschiedenen Photoreduktionen von Interesse, bei dem die einzelnen Elektronen-Donoren aufgrund der jeweils für einen bestimmten Reaktionsfortschritt notwendigen Belichtungsdauer einer Einordnung unterzogen werden könnten. Eine solche Reihung lassen die vorhandenen Messergebnisse allerdings nicht zu, da die Parameter Protein- sowie Donor-Konzentration nicht einheitlich gewählt werden konnten.

## 4.5 Das kleinstmögliche Merkaptan als Donor: Methylmerkaptan

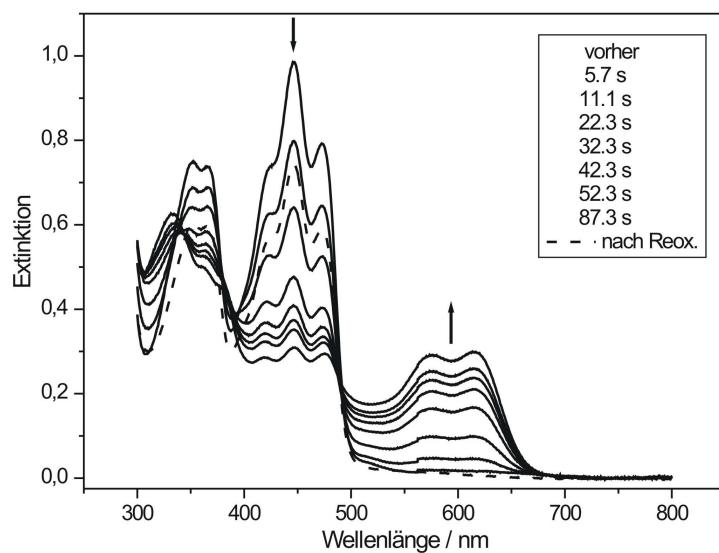
In Kapitel 4.4.2 wurde untersucht, welche Veränderung eintritt, wenn man das Volumen des externen Donors bei fraglichem Belichtungsexperiment verdoppelt, wenn man also  $\beta$ -ME durch DTT ersetzt. Nun soll die andere Seite des Spektrums betrachtet werden, nun soll ausprobiert werden, was passiert, wenn man das Volumen der von außen zugesetzten Reagenz minimiert. Die Verbindung der Wahl im nächsten Belichtungsexperiment ist somit Methylmerkaptan (MM), dessen aliphatischer Rest lediglich aus einer Methylgruppe  $\text{CH}_3^-$  besteht. Mit der Verkleinerung des organischen Restes tritt allerdings eine zusätzliche Schwierigkeit

auf, was die Durchführung des Experiments angeht: die Substanz MM ist nämlich gasförmig. Daher musste zunächst ein gangbarer Weg gefunden werden, wie diese Spezies zugesetzt werden konnte. Einfaches Durchleiten des Gases durch die Protein-Lösung kam nicht in Frage aufgrund des in Abschnitt 3.6.9 angesprochenen dadurch verursachten Ausflockens der Protein-Domäne. Diese Komplikation konnte jedoch umgangen werden, indem zunächst nach der in Abschnitt 3.7 beschriebenen Methode durch eine Lösung, die alle Bestandteile der Protein-Lösung außer der eigentlichen Protein-Domäne enthielt, also durch den bereits bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) MM durchgeleitet wurde. Auf diese Weise wurde bei Zusatz dieser resultierenden MM-Lösung zum Reaktionsgemisch das Milieu der Protein-Domäne nicht verändert, so dass eine Destabilisierung der Domäne verhindert werden konnte. Als Protein-Domäne wurde weiterhin die C57G-Mutante verwendet, bei der ja der zugängliche Raum in der Bindungstasche maximal sein sollte.

#### 4.5.1 Methylmerkaptan in “kleiner” Konzentration - an-aerob

##### Das Experiment

In einem ersten Experiment wurde der im bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) vorliegenden Protein-Domäne LOV1 C57G bei einem Eigenvolumen von etwa 300  $\mu$ l eine Menge von 3  $\mu$ l der MM-Lösung zugegeben. Die Konzentration an MM war dabei nicht bekannt, da ja die Konzentration von MM in der Stammlösung nicht ermittelt werden konnte. Außerdem wurde nach dem bekannten Vorgehen Sauerstoff-frei gearbeitet. Ebenso wurde die Temperatur wiederum bei 20°C gehalten. Die Belichtung des Reaktionsgemisches erfolgte in Schritten von 1.1 bzw. 5 s. Abbildung 4.14 zeigt die Sequenz der dazwischen aufgenommenen Absorptionsspektren. Bereits nach einer Belichtungszeit von etwa 6 s verändert sich der spektrale Verlauf: Wie auch in den Experimenten mit EDTA und  $\beta$ -ME wird die Bande bei 447 nm kleiner, wohingegen bei 570 bzw. 610 nm zwei Maxima auftauchen. Als wichtiger Unterschied zu den genannten Versuchen ist allerdings festzustellen, dass diese Spektrenfolge keine isosbestischen Punkte aufweist. Des Weiteren bildet sich nach

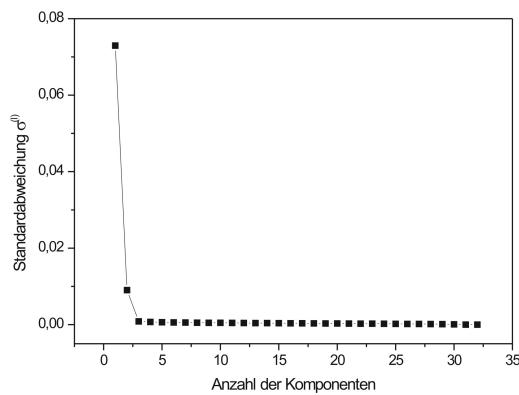


**Abbildung 4.14:** Sequenz der Absorptionsspektren aus dem Belichtungsexperiment mit MM als externem Donor bei geringer Konzentration an MM und unter anaeroben Bedingungen (es sind nicht alle Spektren der gemessenen Reihe dargestellt); die Pfeile zeigen die Entwicklungsrichtung der Spektren an; im Kasten sind die entsprechenden Belichtungszeiten aufgeführt; speziell das gestrichelt dargestellte Spektrum wurde nach Belüften der Probe am Ende des Experiments gemessen.

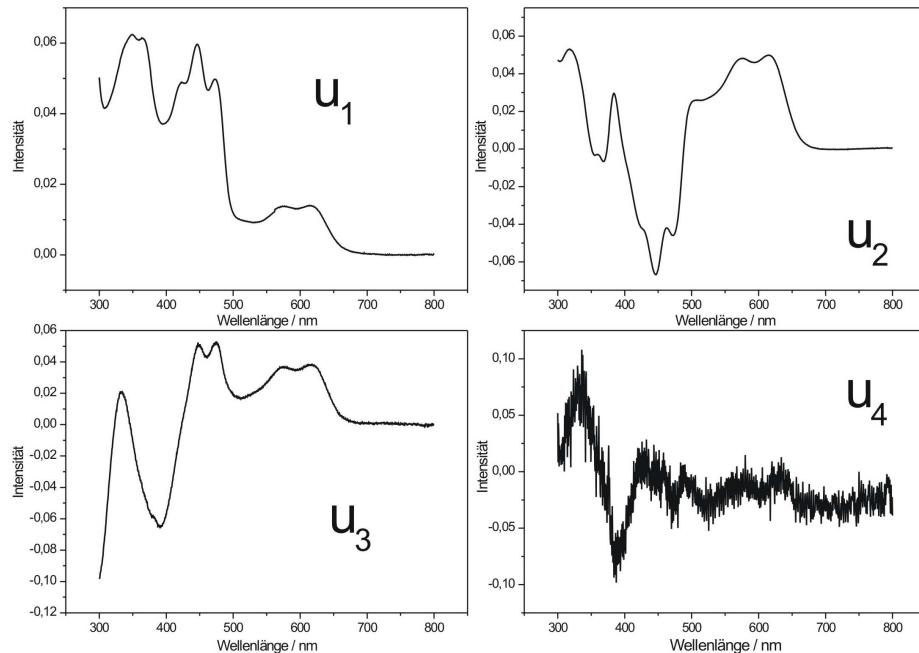
Beendigung der Belichtung nach etwa 87 s bei Belüftung das Ausgangsspektrum des oxidierten FMN nicht mehr vollständig zurück, die Reaktion ist teilweise irreversibel - erkennbar an dem in Abbildung 4.14 gestrichelt dargestellten Spektrum.

### Die Auswertung

Zur Aufklärung dieses Reaktionsgeschehens wurde zunächst eine SVD der Datenmatrix  $\mathbf{D}$  durchgeführt; Abbildung 4.15 ist die entsprechende Auftragung der bereits erläuterten Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  gegen die Anzahl der zugrundeliegenden Komponenten zu entnehmen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich  $\sigma^{(l)}$  in diesem Fall erst ab der vierten und allen folgenden Komponenten nur noch geringfügig verändert. Daraus kann man schließen, dass im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten mit EDTA,  $\beta$ -ME und DTT nun drei Spezies im Reaktionsgemisch vorliegen, die zu den Spektren beitragen.



**Abbildung 4.15:** Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  der unter Verwendung einer steigenden Anzahl an Komponenten rekonstruierten Datenmatrix von den experimentell ermittelten Messdaten für das vorliegende MM-Experiment.



**Abbildung 4.16:** Die ersten vier aus der SVD resultierenden Spaltenvektoren  $\mathbf{u}_i$  des Wellenlängenraums.

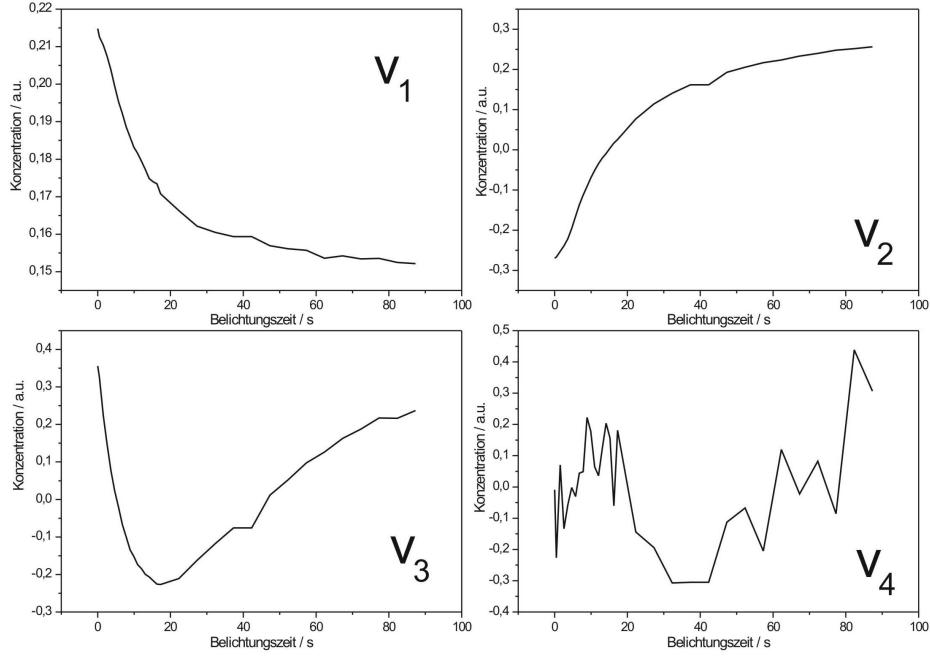


Abbildung 4.17: Die ersten vier aus der SVD resultierenden Zeilenvektoren  $\mathbf{v}_i$  des Zeitraums.

In Abbildung 4.16 sind die ersten vier aus der SVD  $\mathbf{D} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$  resultierenden Spaltenvektoren  $\mathbf{u}_i$  dargestellt, die eine orthogonale Basis im Wellenlängenraum bilden. Abbildung 4.17 enthält die entsprechenden Zeilenvektoren  $\mathbf{v}_i$ , die als orthogonale Basis im Zeitraum fungieren. Die Gewichte  $S_i$  ordnen diese Beiträge nach abnehmender Relevanz für die Rekonstruktion der Daten:  $S_1 = 56.37329$ ,  $S_2 = 12.96057$ ,  $S_3 = 1.60624$ .

Formuliert man nun - entsprechend Gleichung 4.3 für den Fall  $k = 2$  - die Gleichungen 4.1 und 4.2 für  $k = 3$  Komponenten, so erhält man:

$$\mathbf{F} = (\mathbf{f}_1 \mathbf{f}_2 \mathbf{f}_3) = (\mathbf{u}_1 \mathbf{u}_2 \mathbf{u}_3) \begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & X_{13} \\ X_{21} & X_{22} & X_{23} \\ X_{31} & X_{32} & X_{33} \end{pmatrix} \quad (4.12)$$

für die Spektren  $\mathbf{f}_i$  als Linearkombination der Basisvektoren  $\mathbf{u}_i$  sowie

$$\mathbf{C}^T = \begin{pmatrix} \mathbf{c}_1 \\ \mathbf{c}_2 \\ \mathbf{c}_3 \end{pmatrix} = \mathbf{X}^{-1} \begin{pmatrix} S_1 & 0 & 0 \\ 0 & S_2 & 0 \\ 0 & 0 & S_3 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \mathbf{v}_1 \\ \mathbf{v}_2 \\ \mathbf{v}_3 \end{pmatrix} \quad (4.13)$$

für die Konzentrations-Zeit-Profile  $\mathbf{c}_i$  als Linearkombination der Basisvektoren  $\mathbf{v}_i$ .

Zur Rekonstruktion der Spektren, also zur Bestimmung der neun Matrixelemente  $X_{ij}$  werden folgende Informationen verwendet:

- Das erste gemessene Spektrum ist das Spektrum des Dunkelzustands LOV1-447.
- Es liegt wieder die neutrale Radikalform vor; die Banden um 600 nm werden ausschließlich durch dieses Radikal verursacht.
- Die dritte unbekannte Spezies absorbiert nur im UV-Bereich.
- Alle drei Spezies sollen möglichst keine gemeinsamen Banden haben.

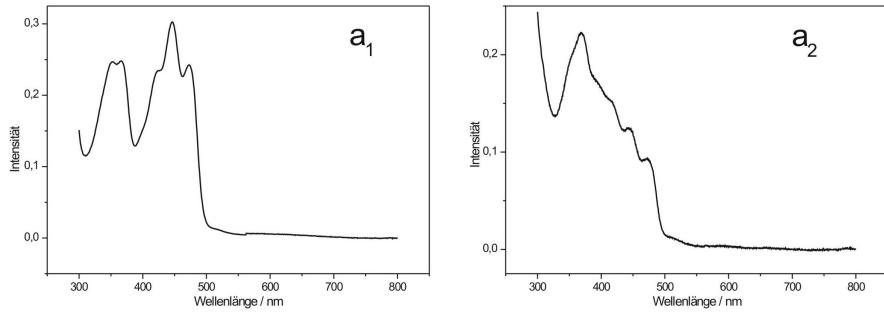
Aus Bedingung 2 folgt, dass quasi in einem Gauss-Eliminationsverfahren für die Lösung linearer Gleichungssysteme aus den Vektoren  $\mathbf{u}_i$  zwei Linearkombinationen gebildet werden können, die keine Bande bei 600 nm haben. Diese Linearkombinationen enthalten somit keinen Beitrag mehr vom Radikal, sie bilden also eine Basis für die beiden anderen Spezies. Durch Variation der Koeffizienten und Inaugenscheinnahme der resultierenden Spektren findet man die beiden Lösungen:

$$\mathbf{a}_1 = 3.95 \cdot \mathbf{u}_1 + \mathbf{u}_2 \quad (4.14)$$

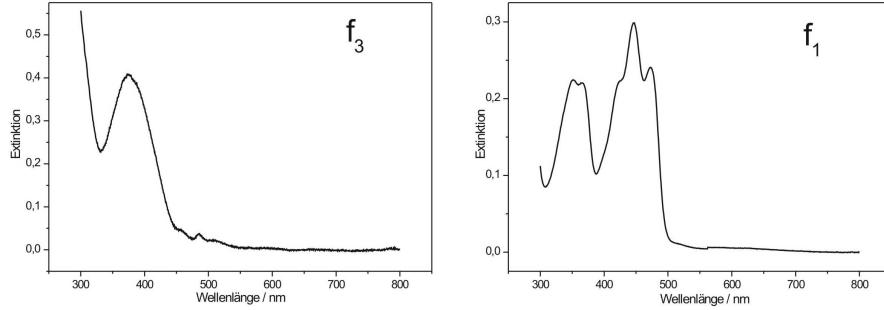
und

$$\mathbf{a}_2 = 2.90 \cdot \mathbf{u}_1 + \mathbf{u}_3, \quad (4.15)$$

die in Abbildung 4.18 dargestellt sind. Diese Spektren müssen nun so linear kombiniert werden, dass die beiden Ergebnisse jeweils möglichst wenige Banden und möglichst auch keine Banden gemeinsam haben. Außerdem sollte eines der beiden Ergebnisse praktisch identisch mit dem Spektrum von oxidiertem FMN sein. Das Spektrum  $\mathbf{a}_1$  sieht ihm schon recht ähnlich, die UV-Banden haben jedoch etwas zu hohe Intensität. Zunächst wird versucht, die beiden Spektren so zu kombinieren, dass die bekannten Banden des FMN herausfallen. Das Ergebnis  $\mathbf{f}_3$  hat nur noch einen Peak bei ca. 375 nm, wie Abbildung 4.19 zu entnehmen ist. Das Spektrum  $\mathbf{a}_1$  sollte also eine Linearkombination von FMN und diesem Spektrum



**Abbildung 4.18:** Durch Linearkombination der Vektoren  $\mathbf{u}_i$  nach den Gleichungen 4.14 und 4.15 erhaltene Spektren  $\mathbf{a}_1$  und  $\mathbf{a}_2$ .



**Abbildung 4.19:** Nach Gleichung 4.16 und 4.17 berechnete Spektre  $\mathbf{f}_3$  und  $\mathbf{f}_1$ .

$\mathbf{f}_3$  sein. Folglich wird von  $\mathbf{a}_1$  soviel  $\mathbf{f}_3$  abgezogen, dass die UV-Banden etwa die Intensität der Schulter bei 425 nm haben. Das Ergebnis lautet:

$$\mathbf{f}_3 = 2.90 \cdot \mathbf{a}_2 - \mathbf{a}_1 \quad (4.16)$$

und

$$\mathbf{f}_1 = \mathbf{a}_1 - 0.07 \cdot \mathbf{f}_3. \quad (4.17)$$

Im letzten Schritt der Rekonstruktion werden aus dem Spektrum  $\mathbf{u}_1$  durch Subtraktion von  $\mathbf{f}_1$  und  $\mathbf{f}_3$  deren Banden entfernt, so dass das Spektrum des Radikals übrig bleibt:

$$\mathbf{f}_2 = \mathbf{u}_1 - 0.18 \cdot \mathbf{f}_1 - 0.03 \cdot \mathbf{f}_3. \quad (4.18)$$

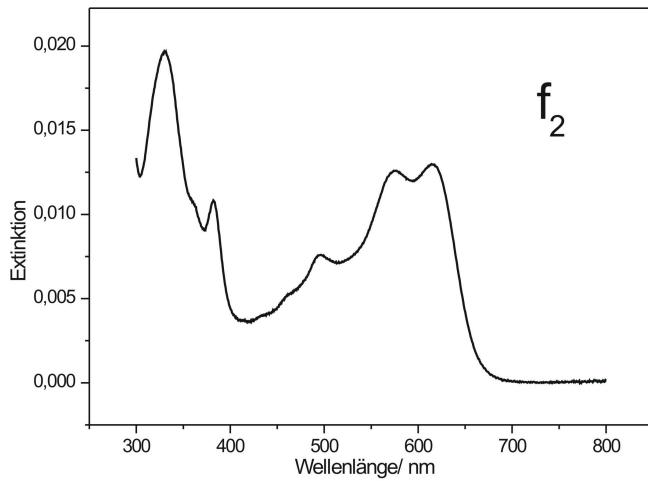


Abbildung 4.20: Nach Gleichung 4.18 berechnetes Spektrum  $\mathbf{f}_2$ .

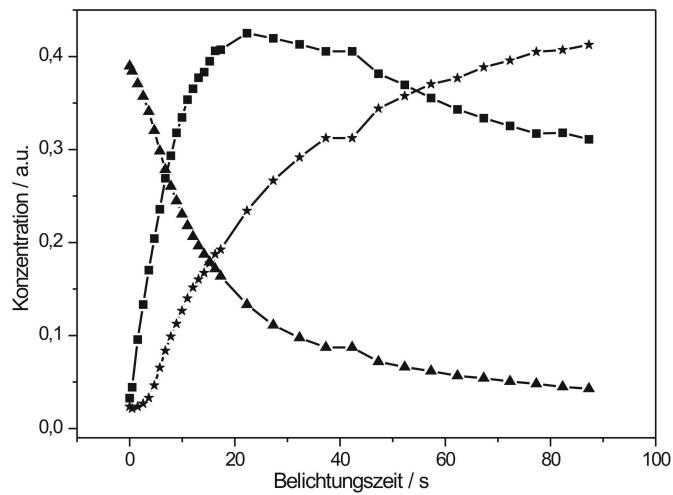
Abbildung 4.20 zeigt das resultierende Spektrum  $\mathbf{f}_2$ . Damit kann nun die Matrix  $\mathbf{X}$  aufgestellt werden; sie hat die Matrixelemente:

$$\begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & X_{13} \\ X_{21} & X_{22} & X_{23} \\ X_{31} & X_{32} & X_{33} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 3.6378 & 0.2114 & 4.46 \\ 1.07 & -0.1626 & -1.0 \\ -0.202 & -0.0505 & 2.9 \end{pmatrix}. \quad (4.19)$$

Die Inverse  $\mathbf{X}^{-1}$  davon lautet:

$$\begin{pmatrix} X_{11} & X_{12} & X_{13} \\ X_{21} & X_{22} & X_{23} \\ X_{31} & X_{32} & X_{33} \end{pmatrix}^{-1} = \begin{pmatrix} 0.18 & 0.289 & -0.1772 \\ 1.0 & -3.95 & -2.9 \\ 0.03 & -0.0485 & 0.282 \end{pmatrix}. \quad (4.20)$$

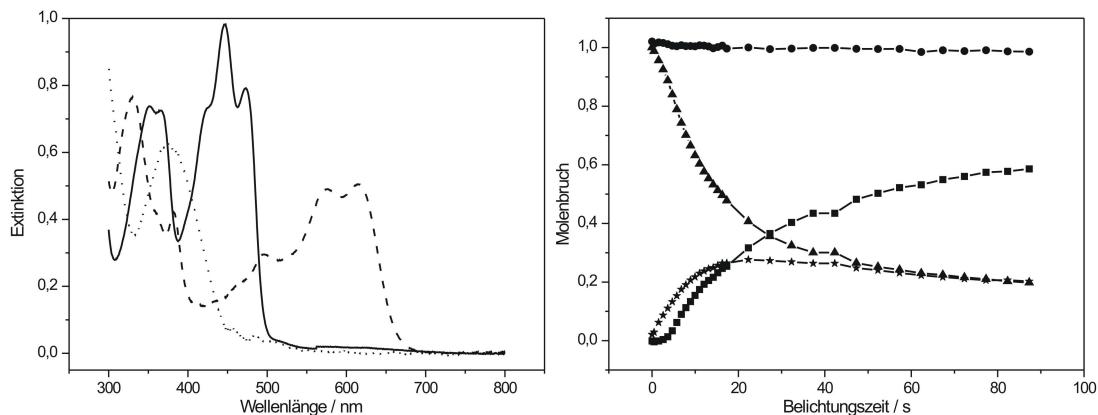
Daraus wurden die Konzentrations-Zeit-Profile aus Abbildung 4.21 gewonnen. Ebenso wie die Spektren sind diese Kurven aus Abbildung 4.21 noch nicht in den gleichen Einheiten. Die Rekonstruktion wird nämlich nicht beeinflusst, wenn ein Spektrum mit einem Faktor multipliziert und das entsprechende Konzentrations-Zeit-Profil durch denselben Faktor dividiert wird. Um die Kurven in dieselben Einheiten zu transformieren, wird zusätzliche Information benötigt. Zunächst wird das Spektrum  $\mathbf{f}_1$  ( $\text{FMN}_{ox}$ ) so skaliert, dass die Konzentration zu Beginn gleich 1 ist. Dann können die Konzentrationen als Molenbrüche interpretiert wer-



**Abbildung 4.21:** Anhand der inversen Matrix  $\mathbf{X}^{-1}$  gewonnene Konzentrations-Zeit-Profile von  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  (Dreiecke), des Radikals (Vierecke) und der Spezies drei (Sterne).

den. Als zweites wird  $\mathbf{f}_2$  so skaliert, dass  $\mathbf{f}_1$  und  $\mathbf{f}_2$  bei 489.5 nm ihren isosbestischen Punkt haben, der aus den Experimenten mit  $\beta$ -ME und DTT bekannt ist. Die dritte Spezies absorbiert an diesem Punkt nicht, sie kann also den isosbestischen Punkt nicht verschieben. Durch diese Skalierung ist auch der Molenbruch  $\mathbf{c}_2$  festgelegt. Schließlich wird versucht,  $\mathbf{c}_3$  so zu skalieren, dass die Summe  $\mathbf{c}_1 + \mathbf{c}_2 + \mathbf{c}_3$  für alle Zeiten gleich 1 ist. Dies gelingt tatsächlich, und damit ist auch die relative Intensität von  $\mathbf{f}_3$  festgelegt. Die Endergebnisse für die Spektren sowie für die Konzentrations-Zeit-Profile sind in Abbildung 4.22 dargestellt.

Die Auswertung der Daten ergibt also, dass bei Belichtung der C57G-Mutante im Beisein von MM neben dem neutralen Radikal eine weitere Spezies entsteht, die eine einzelne breite Bande bei 375 nm besitzt. Dieser spektrale Verlauf stimmt bis auf eine Blauverschiebung von 15 nm mit dem Spektrum des Cystein-Addukts überein, das in der Photoreaktion des Wildtyps gebildet wird und das ja gerade, wie Abbildung 1.6 zu entnehmen ist, bei 390 nm eine einzelne Absorptionsbande besitzt. Daher liegt es nahe, diese dritte Spezies als entsprechendes MM-Addukt, also als Addukt zwischen dem von außen zugesetzten MM und dem C(4a)-Atom des FMN der C57G-Mutante zu interpretieren. Diese Zuordnung impliziert, dass das deutlich kleinere Molekül MM - im Gegensatz zu den voluminöseren  $\beta$ -ME und DTT - so weit in die Bindungstasche der Protein-Domäne vordringen kann,



**Abbildung 4.22:** links: Rekonstruierte Spektren von FMN<sub>ox</sub> (durchgezogene Linie), des Radikals (gestrichelte Linie) und der dritten Spezies (gepunktete Linie); rechts: Konzentrations-Zeit-Profil des FMN<sub>ox</sub> (Dreiecke), des Radikals (Vierecke) und der dritten Spezies (Sterne); die Summe der drei Molenbrüche ist mit Kreisen dargestellt.

dass es nicht nur in der Lage ist, ein Elektron zu übertragen, sondern auch eine kovalente Bindung mit dem Chromophor FMN ausbilden kann. Das Experiment ergibt außerdem, dass dieses Addukt im Gegensatz zum Radikal nicht Sauerstoffempfindlich ist. Wie bereits erwähnt wurde, ist die Reaktion nämlich bei Zutritt von O<sub>2</sub> teilweise irreversibel.

Der Verlauf der Molenbrüche in Abbildung 4.22/rechts zeigt an, dass das Addukt rasch gebildet wird, dann nahezu konstant bleibt und schließlich langsam wieder zerfällt. Das Radikal dagegen entsteht mit einer deutlich zu erkennenden Verzögerung. Die Tatsache, dass das Addukt nur zu einem Anteil von etwa 25 % gebildet wurde, könnte in dem Sinne gedeutet werden, dass in einer bestimmten Fraktion der LOV-Domäne ein MM-Molekül im aktiven Zentrum sitzt und bei Belichtung mit dem Chromophor zum Addukt reagiert. Der andere Teil der LOV-Domänen besitzt kein MM in der Bindungstasche, wird aber von MM aus der näheren Umgebung zum Radikal reduziert. An dieser Stelle kann die These formuliert werden, dass zunächst in allen LOV-Domänen - also solchen, die in der Bindungstasche ein MM haben, und solchen, bei denen sich ein MM lediglich in der Nähe befindet - ein Elektron und ein Proton übertragen wird und dass dann - ausschließlich in den Domänen, die ein MM im aktiven Zentrum haben - die entstandenen Radikale zum Addukt rekombinieren, dass also das Radikal eine Zwischenstufe auf dem

Weg zum Addukt ist. Die Domänen, die durch MM aus der näheren Umgebung zum Radikal reduziert wurden, könnten nicht zum Addukt weiterreagieren, da der radikalische Reaktionspartner  $\text{CH}_3\text{S}\cdot$  ja zu weit entfernt ist. Diese Radikale wären also im Sinne dieser Weiterreaktion inaktiv und wären somit - wie auch in den  $\beta$ -ME-, DTT- und EDTA-Reaktionen - weiterhin stabil. Dieser Deutungsversuch erklärt aber nicht, warum das Radikal erst mit Verzögerung entsteht. In einem alternativen Erklärungsansatz kann man postulieren, dass Radikal und Addukt in zwei unabhängigen Parallelreaktionen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit entstehen. Dies würde auch die verzögerte Ausbildung des Radikals verständlich machen.

In einer völlig anderen These kann man auch annehmen, dass gerade diese Verzögerung der Radikalbildung ein Beleg dafür ist, dass das Addukt über die Zwischenstufe Radikal entsteht. Zunächst gebildetes Radikal könnte nämlich durch die sofort einsetzende Adduktbildung wieder verbraucht werden, so dass das Radikal erst zeitlich verzögert stabil ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass im Gegensatz zu vorliegendem Experiment im Falle der  $\beta$ -ME-Reaktion, bei der ja kein Addukt gebildet werden konnte, die Radikalbildung sofort beginnt, wie Abbildung 4.12 zu entnehmen ist. Allerdings bleibt im Rahmen dieser Deutung ungeklärt, warum nur ein Teil der vorhandenen LOV-Domänen - laut Abbildung 4.22 etwa 25 % - zum Addukt reagiert.

### Modifikationen des Experiments

Um weitere Klarheit in die Interpretation des geschilderten Experiments zu bringen, sollte im Weiteren ausgetestet werden, unter welchen Bedingungen die Ausbeute an Addukt vergrößert werden könnte. In einem ersten Ansatz wurde dazu übergegangen, das Reaktionsgemisch nun in Anwesenheit von Sauerstoff bei ansonsten gleichen Bedingungen wie in obigem Experiment zu belichten. Dahinter steckte die durch die teilweise Irreversibilität der Reaktion gestützte Annahme, dass das Addukt im Gegensatz zum Radikal nicht Sauerstoff-empfindlich ist. Dann könnten die zunächst gebildeten, im Sinne obiger Erklärungen für die Adduktbildung inaktiven Radikale vom Sauerstoff zum Dunkelzustand zurückoxidiert werden und könnten dann ihrerseits MM aufnehmen und zum Addukt abreagieren. Unter diesen Bedingungen wären LOV-Domänen, die zuerst zum

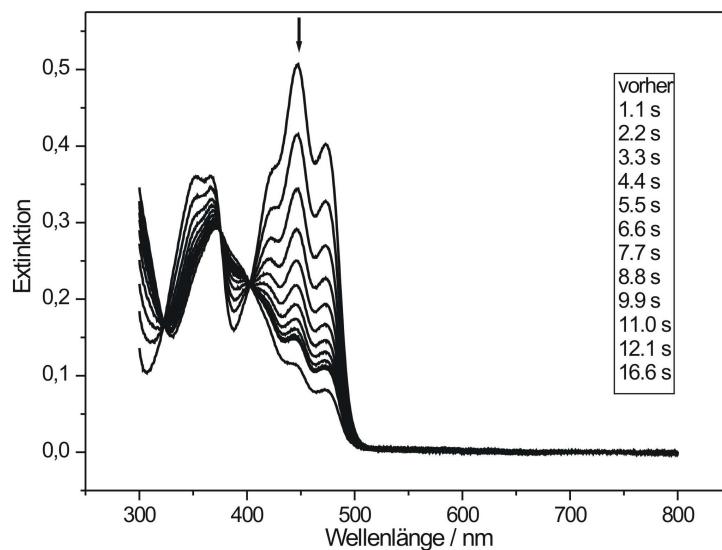
Radikal reagieren, nicht “für alle Zeiten” von der Adduktbildung ausgeschlossen. Ein entsprechendes Experiment lieferte allerdings keine wesentliche Verbesserung, was die Addukt-Ausbeute anbelangt. Erwartungsgemäß wurde die Flavin-Bande um 447 nm mit zunehmender Belichtungszeit etwas kleiner, ohne dass gleichzeitig die Radikalbande herauswuchs. Dies deutet daraufhin, dass wiederum in relativ kleiner Ausbeute Addukt entstand, während die Radikalbildung erfolgreich unterdrückt wurde. Erst nach sehr langer Belichtung waren Anzeichen einer Radikalbande zu beobachten, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass zu diesem Zeitpunkt der im Reaktionsgemisch gelöste Sauerstoff verbraucht war.

In einem nächsten Versuch wurde - erneut unter aeroben Bedingungen - ausprobiert, die Ausbeute zu erhöhen, indem das Reaktionsgemisch vor dem eigentlichen Experiment in abgedecktem Zustand über Nacht inkubiert wurde. Auf diese Weise sollte, so die Überlegung, den MM-Molekülen ausreichend Zeit gegeben werden, in die Domänen hineinzudiffundieren. Doch auch diese Modifikation ergab nur das im vorangehenden Absatz geschilderte Ergebnis.

#### 4.5.2 Methylmerkaptan in “großer” Konzentration - aerob

##### Das Experiment

Bei allen bisherigen MM-Experimenten wurden zu einer Protein-Lösung von 300  $\mu\text{l}$  3  $\mu\text{l}$  der nach Abschnitt 3.7 präparierten MM-Lösung zugegeben. Da in allen Versuchen nur eine Ausbeute an Addukt von etwa 25 % erzielt werden konnte, sollte im nächsten Schritt der Parameter der MM-Konzentration drastisch erhöht werden. Immerhin war denkbar, dass diese Konzentration der begrenzende Faktor sein könnte. Daher wurden die MM-Lösung und die Protein-Lösung nun im Verhältnis 2 : 1 gemischt: In der Regel wurden 150  $\mu\text{l}$  der Domäne mit 300  $\mu\text{l}$  der MM-Lösung versetzt. Um im eigentlichen Experiment weiterhin eine ausreichende Extinktion der LOV-Domäne gewährleisten zu können, musste jeweils von einer relativ hochkonzentrierten Protein-Lösung - einer  $\text{OD}_{447}$  von etwa 1.5 - ausgegangen werden. Außerdem wurde bei diesem Experiment aus den oben angestellten Überlegungen heraus wiederum in Anwesenheit von Luftsauerstoff gearbeitet. Die Temperatur wurde erneut bei 20°C gehalten. Die Belichtung der



**Abbildung 4.23:** Sequenz der Absorptionsspektren aus dem Belichtungsexperiment mit MM als externem Donor bei großer Konzentration an MM und unter aeroben Bedingungen; der Pfeil zeigt die Entwicklungsrichtung der Spektren an; im Kasten sind die entsprechenden Belichtungszeiten aufgeführt.

Probe erfolgte in Schritten von 1.1 bzw. 5 s. Die Sequenz der aufgenommenen Absorptionsspektren ist in Abbildung 4.23 dargestellt. Bereits mit dem ersten Belichtungsschritt von 1.1 s ist eine deutliche Abnahme der Flavin-Bande bei 447 nm zu beobachten. Bei weiterer Einstrahlung von blauem Licht wird die Bande immer kleiner, bis ihre charakteristische Form in der rechten Flanke der nun entstandenen 375 nm-Bande des Addukts schließlich nur noch andeutungsweise zu erkennen ist. Erwartungsgemäß ist in dieser Phase des Experiments um 600 nm keine Radikalbande auszumachen; erst nach sehr langer Belichtung, nachdem die Adduktbildung bereits abgeschlossen ist, taucht dort die Andeutung einer Bande auf (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung verläuft die Reaktion über drei scharfe isosbestische Punkte bei 403, 376 und 324 nm. Folglich liegen, wie beabsichtigt, lediglich das oxidierte FMN und das Photoaddukt aus FMN und MM vor.

## Die Auswertung

Im Rahmen der bekannten SVD-Analyse wird zunächst die Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  gegen die Zahl der bei der Rekonstruktion der Daten verwendeten Komponenten aufgetragen (nicht gezeigt). Dabei wird deutlich die auf dem Vorhandensein isosbestischer Punkte basierende Annahme bestätigt, dass das Reaktionsgemisch zwei Komponenten enthält, die zu den gemessenen Spektren beitragen. Es liegt also der bereits in Abschnitt 4.3.2 behandelte Fall von  $k = 2$  Komponenten vor. Es gilt folglich, die in Gleichung 4.3 auftretenden vier Matrixelemente  $X_{ij}$  der Matrix  $\mathbf{X}$  zu ermitteln, was gleichbedeutend damit ist, die Spektren  $\mathbf{f}_i$  als Linearkombination der beiden Basisvektoren  $\mathbf{u}_i$  bzw. die Konzentrations-Zeit-Profile  $\mathbf{c}_i$  als Linearkombination der Basisvektoren  $\mathbf{v}_i$  darzustellen. Wie im Fall des EDTA-Experiments aus Kapitel 4.3.2 liefert die Bedingung, dass zu Beginn des Experiments nur LOV1-447 vorliegt, die ersten beiden Koeffizienten nach den Gleichungen 4.6 und 4.7. Das Vorhandensein isosbestischer Punkte stellt eine weitere Information dar, die zu Gleichung 4.11 führt. Im Gegensatz zum EDTA-Belichtungsexperiment, bei dem das neutrale Radikal aus dem oxidierten FMN entsteht, kann im vorliegenden Fall der Adduktbildung aus FMN und MM nun eine vierte Bedingung formuliert werden: Das Spektrum der zweiten Komponente nimmt an einer Stelle  $\lambda_k$  den Wert Null an, an der das Spektrum der ersten Komponente, also des oxidierten FMN ungleich Null ist. Man kann also ansetzen:

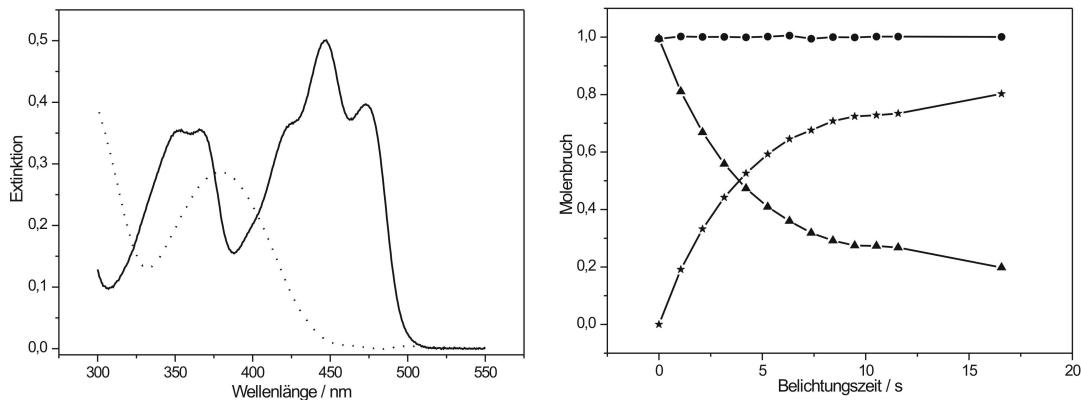
$$F_{k2} = U_{k1}X_{12} + U_{k2}X_{22} = 0. \quad (4.21)$$

Aus den Gleichungen 4.11 und 4.21 ergibt sich dann:

$$X_{12} = \frac{U_{k2} \cdot (X_{21}U_{j2} + X_{11}U_{j1})}{U_{k2}U_{j1} - U_{j2}U_{k1}} \quad (4.22)$$

sowie

$$X_{22} = -\frac{U_{k1}X_{12}}{U_{k2}}. \quad (4.23)$$



**Abbildung 4.24:** links: Rekonstruierte Spektren von FMN<sub>ox</sub> (durchgezogene Linie) und des Adduktes (gepunktete Linie); rechts: Konzentrations-Zeit-Profile des FMN<sub>ox</sub> (Dreiecke) und des Adduktes (Sterne); die Summe der zwei Molenbrüche ist mit Kreisen dargestellt.

Damit können die Matrixelemente  $X_{ij}$  zusammengefasst werden:

$$X_{11} = S_1 V_{11}^T \quad (4.24)$$

$$X_{12} = \frac{X_{21} + aX_{11}}{a - b} \quad (4.25)$$

$$X_{21} = S_2 V_{21}^T \quad (4.26)$$

$$X_{22} = -bX_{12} \quad (4.27)$$

mit  $a = \frac{U_{j1}}{U_{j2}}$  sowie  $b = \frac{U_{k1}}{U_{k2}}$ . Die vierte Bedingung führt somit zu einer eindeutigen Lösung aller Matrixelemente von  $\mathbf{X}$ . Wendet man nun die geschilderte Vorgehensweise auf das konkrete Beispiel an und wählt dabei den isosbestischen Punkt an der Stelle  $\lambda_j = 403$  nm und als ‘Nullstelle’ des zweiten Spektrums die Position  $\lambda_k = 485$  nm, dann erhält man die in Abbildung 4.24 dargestellten Absorptionsspektren (links) und Konzentration-Zeit-Profile (rechts).

Der Ausgang dieses Experiments bestätigt die zu Beginn dieses Abschnitts angestellte Vermutung, dass die Konzentration an MM-Molekülen der begrenzende Faktor der Adduktbildung war. Bei dieser drastisch erhöhten Konzentration an MM sollten also tatsächlich viel mehr LOV-Domänen ein MM-Molekül in ihrer Bindungstasche aufgenommen haben. Dies widerspricht der ganz am Ende von

Abschnitt 4.5.1 geäußerten These, dass die Verzögerung der Radikalbildung ein Indiz dafür sein könnte, dass die Adduktbildung über die Zwischenstufe Radikal verläuft. Wenn nämlich im ersten MM-Experiment nur ein kleiner Teil der LOV-Domänen MM-Moleküle aufgenommen hat - was ja jetzt belegt ist - , kann nicht zunächst alles Radikal für die Adduktbildung verbraucht werden.

Dieses vorliegende MM-Experiment verifiziert außerdem die These, dass die Anwesenheit von Luftsauerstoff der Adduktbildung zuträglich ist, da er die Ausbildung von Radikalen in Domänen, die kein MM-Molekül in ihrer Bindungstasche besitzen, rückgängig macht. Folglich können diese anfangs "leeren" Domänen doch noch ein MM-Molekül aufnehmen und zum Addukt abreagieren. Die Radikalbildung stellt somit keine "Sackgasse" mehr auf dem Weg zur Adduktbildung dar.

Für die für die eigentliche Zielsetzung der vorliegenden Arbeit zentrale These, dass das Radikal eine Zwischenstufe der Adduktbildung ist, liefert dieses Experiment allerdings keine weiteren Argumente. Es ist also auch zu diesem Zeitpunkt nicht zu unterscheiden zwischen den beiden am Ende von Abschnitt 4.5.1 formulierten Möglichkeiten einer konsekutiven Reaktion vom oxidierten FMN über das Radikal zum Addukt einerseits und zweier unabhängiger Parallelreaktionen - Radikal- und Adduktbildung - andererseits.

### 4.5.3 Methylmerkaptan in "großer" Konzentration - anaerob

Aus dem in vorangehendem Kapitel 4.5.2 beschriebenen Experiment folgt, dass es ein Gleichgewicht geben muss zwischen solchen LOV-Domänen, die ein MM-Molekül in ihrer Bindungstasche haben, und solchen, die "leer" sind. Eben dieses Gleichgewicht soll in vorliegendem Kapitel näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wird eine C57G-Lösung, der MM in der erprobten "großen" Konzentration zugesetzt wurde, unter anaeroben Bedingungen, also in Abwesenheit von Sauerstoff belichtet. Das daraus resultierende Produkt-Spektrum sollte Auskunft geben über das genannte Gleichgewicht. Entsteht nämlich analog zum soeben geschilderten aeroben MM-Experiment das Photoaddukt in großer Ausbeute, dann ist anzunehmen, dass sich unmittelbar nach Zugabe einer großen Menge an MM ein

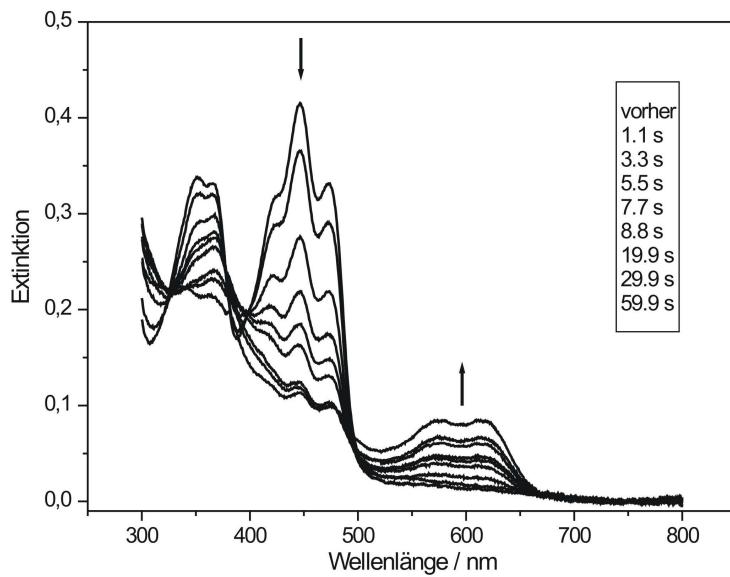
Gleichgewicht einstellt, das weit auf der Seite der mit MM “gefüllten” Domänen liegt. Wird dagegen das Addukt in deutlich kleinerem Maße gebildet, dann kann man daraus schlussfolgern, dass es sich bei diesem Gleichgewicht um ein dynamisches Gleichgewicht handelt, in dem zunächst nur eine bestimmte kleinere Menge an “gefüllten” Domänen vorliegt, in dem aber bei Verbrauch von “gefüllten” Domänen durch die Adduktbildung neue “gefüllte” Domänen nachgebildet werden.

## Das Experiment

Das nun anstehende Experiment stimmte demzufolge in den Parametern MM-Konzentration, Temperatur und Dauer der Belichtungsschritte mit dem in Kapitel 4.5.2 geschilderten überein, es wich nur in der Hinsicht ab, dass nun durch die beschriebenen Methoden des Protein-Entgasens und des Dariüberleitens eines Argon-Stroms dafür gesorgt wurde, dass die Reaktion in Abwesenheit von Sauerstoff ablief. Abbildung 4.25 zeigt die zwischen den Belichtungsschritten gemessenen Absorptionsspektren. Wiederum ändert sich das spektrale Verhalten der Reaktionslösung mit den ersten Lichtblitzen: Die Bande um 447 nm wird deutlich kleiner, im Bereich um 600 nm wachsen offensichtlich sofort die Radikalbanden heraus. Die Größe, die diese Maxima schließlich erreichen, lässt bereits erahnen, dass das Radikal in beträchtlichem Maße entsteht. Wie erwartet, weist diese Spektren-Sequenz im Gegensatz zum entsprechenden aeroben MM-Experiment keine isosbestischen Punkte auf. Es sollten ja drei Spezies vorliegen:  $\text{FMN}_{ox}$ , Radikal und Addukt.

## Die Auswertung

Die Auftragung der Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  gegen die zugrundeliegenden Komponenten (nicht gezeigt) ergibt erwartungsgemäß, dass drei Komponenten im Reaktionsgemisch enthalten sind. Was die Rekonstruktion der Spektren und der Konzentrations-Zeit-Profile angeht, liegt folglich wieder der bereits in Kapitel 4.5.1 aufgetretene Fall von  $k = 3$  vor. Da zum jetzigen Zeitpunkt die Absorptionsspektren von  $\text{FMN}_{ox}$ , Radikal und Addukt aus mehreren vorangegangenen Messungen gut bekannt sind, kann nun ein im Vergleich zu Abschnitt 4.5.1 einfacheres Vorgehen gewählt werden. Zunächst werden die drei bekannten Spektren



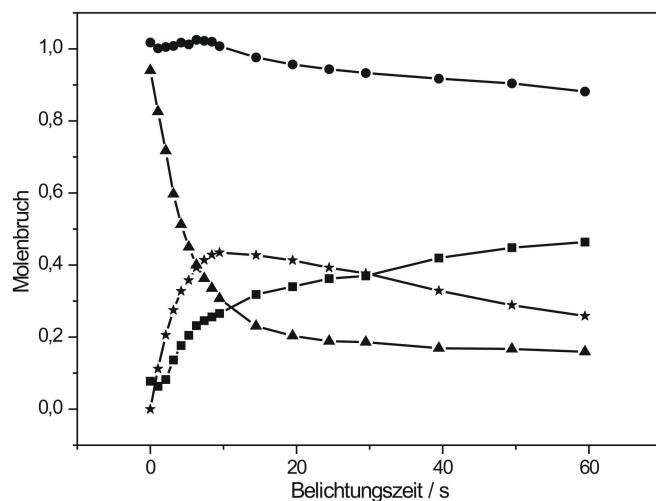
**Abbildung 4.25:** Sequenz der Absorptionsspektren aus dem Belichtungsexperiment mit MM als externem Donor bei großer Konzentration an MM und unter anaeroben Bedingungen; die Pfeile zeigen die Entwicklungsrichtung der Spektren an; im Kasten sind die entsprechenden Belichtungszeiten aufgeführt.

über die Information, dass an bestimmten Stellen isobestische Punkte vorliegen, zueinander skaliert:

- $\text{FMN}_{ox}$  und das Radikal haben u.a. bei 491 nm einen solchen Punkt.
- $\text{FMN}_{ox}$  und das Addukt haben u.a. bei 403 nm einen isobestischen Punkt.

Da jetzt also sowohl die Spektren  $\mathbf{f}_i$  als auch die aus der SVD resultierenden Basisvektoren  $\mathbf{u}_i$  bekannt sind, können daraus die neun Matrixelemente der Matrix  $\mathbf{X}$  berechnet werden. Über die Inverse  $\mathbf{X}^{-1}$  der Matrix  $\mathbf{X}$ , die Gewichtungsfaktoren  $S_i$  und die Basisvektoren  $\mathbf{v}_i$  des Zeitraums werden dann nach Gleichung 4.13 die Konzentrations-Zeit-Profile der drei Spezies ermittelt. Abbildung 4.26 sind die anhand der skizzierten Strategie bestimmten Kurvenverläufe zu entnehmen.

Laut der in Abbildung 4.26 mit Sternen dargestellten Kurve steigt die Konzentration an Addukt schnell bis auf einen Wert von etwas über 40 % an und zerfällt dann wieder langsam. Das Radikal entsteht in einer langsameren Reaktion, und sein Anteil erreicht zum Ende der Belichtung ebenfalls einen Wert über 40 %.



**Abbildung 4.26:** Aus der Rekonstruktion gewonnene Konzentrations-Zeit-Profile des  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  (Dreiecke), des Radikals (Vierecke) und des Addukts (Sterne); die Summe der drei Molenbrüche ist mit Kreisen dargestellt.

Somit nimmt also die Ausbeute an Addukt beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen stark ab. Daher handelt es sich bei dieser Reaktion, wie am Beginn dieses Kapitels bereits diskutiert wurde, um ein dynamisches Gleichgewicht, in dem “gefüllte” Domänen nach und nach bei Verbrauch durch die Adduktbildung nachgebildet werden. Das Gleichgewicht liegt also nicht gleich nach der Zugabe der MM-Lösung ganz auf der Seite der gefüllten LOV-Domänen.

#### 4.5.4 Das Photoaddukt und die Massenspektrometrie

Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurde das mutmaßliche Photoaddukt aus MM und dem C(4a)-Atom des Protein-gebundenen FMN über sein Absorptionsverhalten identifiziert: Die fragliche Spezies besitzt eine einzelne breite Bande bei 375 nm, die bis auf eine Blauverschiebung von 15 nm mit dem UV/Vis-Spektrum des im Photozyklus des Wildtyps gebildeten Photoaddukts übereinstimmt. Dieses weist ein breites Maximum bei 390 nm auf. Da sich in der C57G-Mutante Dunkelzustand und Addukt-Zustand darin unterscheiden, dass in dem einen lediglich der Chromophor FMN als prosthetische Gruppe vorliegt, während im anderen ein über eine kovalente Bindung verknüpftes Addukt aus FMN und MM gebunden ist, bot es sich an, die Massenspektrometrie zu nutzen, um einen weiteren Nach-

weis für die Identität des im Modellsystem C57G-Mutante/MM künstlich erzeugten Photoaddukts zu schaffen. Nach den von Kottke geschilderten Erfahrungen bei ähnlichen Experimenten mit einer C57M-Mutante der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* [23] ist nämlich zu erwarten, dass das Protein unter den Messbedingungen der Massenspektrometrie denaturiert, so dass der nicht-kovalent gebundene Chromophor FMN aus dem Protein herausgelöst wird. Das Spektrum des Dunkelzustands sollte also wie bei Kottke ein intensives Signal bei 14963 Da zeigen, der Masse des Apoproteins. Daneben sollte noch bei 456 Da das Signal des Chromophors FMN auftauchen. Belichtet man nun die Probe C57G/MM vor der Aufnahme des Massenspektrums, dann sollte neben dem Signal des Apoproteins ein um 48 Da - was gerade der Masse des MM entspricht - gegenüber dem Signal des FMN verschobener Peak bei 504 Da zu beobachten sein. In diesem Fall sollten ja, wie bereits formuliert wurde, FMN und MM kovalent aneinander gebunden sein.

Da aufgrund von zu erwartenden Artefakten eine direkte Messung der Probe in Gegenwart der Phosphat-Ionen des Standard-Dialyse-Puffers (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) nicht möglich war, wurde die Protein-Lösung vor der MS-Untersuchung gegen einen Puffer dialysiert, der Ammoniumacetat in den Konzentrationen von 25 mM, 10 mM bzw. 5 mM bei einem pH-Wert von 6.45 enthielt. Die Dialyse erfolgte in zwei Schritten zu 4 bzw. 15 Stunden bei Raumtemperatur. Durch die Erhöhung der Temperatur verglichen mit dem standardmäßigen Dialyse-Prozedere sollte ein zu erwartendes Ausflocken der Protein-Domäne verhindert werden. Allerdings fiel trotz dieser Vorsichtsmaßnahme immer ein Teil der Protein-Domäne als gelber Niederschlag aus, der dann durch Zentrifugieren der Probe abgetrennt wurde. Unmittelbar vor der MS-Messung wurde das Photoaddukt exakt nach dem in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Vorgehen in großer Ausbeute hergestellt. Die erfolgte Umsetzung wurde stets durch die Aufnahme von Absorptionsspektren kontrolliert.

In einem ersten Versuch wurden LC-MS-Messungen durchgeführt, d. h. das Reaktionsgemisch passierte zunächst eine HPLC-Säule (C4-Säule, 50×2, 1mm Vy-dac214TP, 5  $\mu$ m), bevor es in ein daran gekoppeltes Massenspektrometer (SSQ 7000, Finnigan MAT) eindrang. Dabei wurde von Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen an Ammoniumacetat ausgegangen, die bereits im vorangehen-

den Absatz bei der Beschreibung der Dialyse angeführt wurden. Da nämlich einerseits zur Stabilisierung der Protein-Domäne eine größere Salzkonzentration nötig war, aber andererseits die Lösung beim Einspritzen in die HPLC-Säule das Salz nur in geringerer Konzentration enthalten durfte, musste eine Kompromiss gefunden werden, was diesen Parameter anbelangt. In allen durchgeführten Experimenten - sowohl mit unbelichteten als auch zuvor belichteten Proben - konnte neben dem Peak der Protein-Domäne lediglich das Signal des Chromophors FMN beobachtet werden. Das Signal des Addukts aus FMN und MM konnte dagegen in keinem Fall ausgemacht werden. Eine Erklärung für das Ausbleiben dieses Signals liegt in der Instabilität des Addukts außerhalb der Protein-Domäne. Wie sich zu einem späteren Zeitpunkt herausstellte, was im Kapitel 4.5.7 noch geschildert werden wird, zerfällt das Addukt, sobald es die Domäne verlässt. Man konnte also - was zum Zeitpunkt dieses Experiments noch nicht klar war - gar nicht erwarten, dass diese Spezies, nachdem sie über mehrere Minuten hinweg die HPLC-Säule passiert hatte, im daran angeschlossenen Massenspektrometer zu sehen sein würde.

In einem weiteren Versuch sollte die Struktur des Addukts mit Hilfe der Elektrospray-Methode (ESI) nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall wurde die Probe nach Dialyse gegen den Ammoniumacetat-Puffer unmittelbar vor der eigentlichen MS-Messung nach dem Prozedere aus Abschnitt 4.5.2 präpariert. Doch auch dieser Nachweis konnte nicht geführt werden, da die resultierenden Massenspektren nicht das für die verschiedenen Ionisierungszustände der Protein-Domäne typische Erscheinungsbild aufwiesen, so dass eine Dekonvolution überhaupt nicht möglich war. Diese Komplikation ist wohl darauf zurückzuführen, dass die LOV-Domänen sehr stark dazu neigen zu aggregieren. Dieses Verhalten wurde anscheinend durch den notwendigen Vorgang des Umpufferns in den Ammoniumacetat-Puffer noch verstärkt, was ja am teilweisen Ausflocken der Domäne zu erkennen war.

Somit muss als Fazit dieses Kapitels festgehalten werden, dass es nicht gelang, anhand der Massenspektrometrie einen weiteren Nachweis für die Struktur des Photoaddukts zu erbringen. Schwierigkeiten bei der Probenvorbereitung verhinderten einen korrekten Ablauf des MS-Experiments.

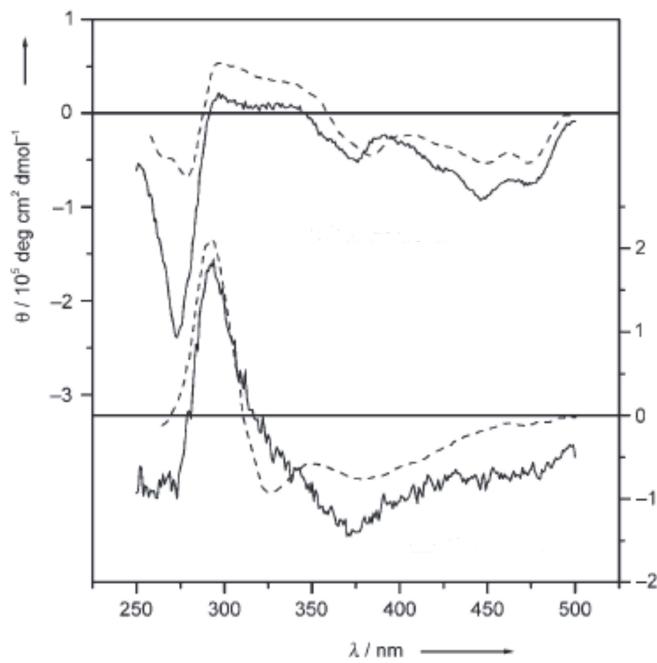
#### 4.5.5 Das Photoaddukt und die CD-Spektroskopie

Neben der Absorptionsspektroskopie sollte eine weitere Messmethode gefunden werden, anhand derer die Identität des Photoaddukts nachgewiesen werden konnte. Nachdem sich die Massenspektrometrie nicht als geeignetes Mittel herausgestellt hatte, sollte als nächstes auf die Methode der CD-Spektroskopie zurückgegriffen werden.

Im ersten Schritt des Experiments wurde mit Hilfe des Spektropolarimeters JAS-CO J710 in einer Quarzküvette einer Schichtdicke von 0.01 cm bei Raumtemperatur ein CD-Spektrum von der unbelichteten Domäne LOV1 C57G aufgenommen, also vom Dunkelzustand LOV1-447. Dabei lag die Protein-Domäne in dem bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) vor. Im nächsten Schritt wurde exakt nach der in Kapitel 4.5.2 beschriebenen Vorgehensweise eine Lösung der zu untersuchenden Spezies, also des fraglichen Addukts hergestellt. Zur Kontrolle von Ablauf und Ende des Belichtungsvorgangs wurden wiederum begleitend Absorptionsspektren gemessen. Unmittelbar im Anschluss an die Präparation wurde dann ein CD-Spektrum dieses belichteten Reaktionsgemisches ermittelt.

In Abbildung 4.27 sind die resultierenden Spektren von Dunkelzustand bzw. belichtetem Zustand oben (linke Skala) bzw. unten (rechte Skala) mit durchgezogenen Linien dargestellt. Zum Vergleich sind von Corchnoy *et al.* publizierte Spektren einer wildtypischen LOV2-Domäne aus Phototropin 1 aus Hafer im Dunkelzustand und im Zustand des Photoaddukts in gestrichelter Linie hinzugefügt [82]. Trotz des schlechteren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der aus der aktuellen Studie stammenden CD-Spektren ist eindeutig zu erkennen, dass die Spektren des Modellsystems LOV1 C57G/MM einen sehr ähnlichen Verlauf nehmen wie die des natürlichen Systems LOV2 wt. Das Hauptaugenmerk ist dabei auf den belichteten Zustand zu richten: Verglichen mit dem Dunkelzustand verändern sich die beiden Spektren von Modellsystem bzw. natürlichem sensorischen Apparat in gleicher Weise, was als klarer Hinweis auf das Vorliegen ähnlicher Strukturen zu werten ist. Insbesondere der negative Peak bei 370 nm deutet darauf hin, dass die entsprechende Spezies chiral ist. Da aber sowohl das Flavin als auch MM achirale Verbindungen sind, würde eine Reaktion in freier Lösung - im Gegensatz zu vorliegendem Fall - zu einem nicht-chiralen Produkt führen.

Corchnoy *et al.* sprechen in diesem Zusammenhang in ihrer Publikation davon, dass die im CD-Spektrum im sichtbaren Bereich und im nahen UV-Bereich durch die Belichtung der LOV2-Domäne ausgelösten Veränderungen konsistent sind



**Abbildung 4.27:** CD-Spektren des Systems LOV1 C57G + MM (durchgezogene Linie) und von LOV2 wt (gestrichelte Linie, modifiziert nach [82]) vor (linke Skala) und nach (rechte Skala) der Belichtung.

mit dem Verschwinden einer 450 nm-Spezies und dem Entstehen einer 390 nm-Spezies. Speziell die große positive Bande bei 290 nm ordnen sie dem am C(4a)-Atom des Chromophors FMN neu entstandenen chiralen Zentrum zu [82].

Konnten also nach dem vorangehenden Kapitel 4.5.4 zur massenspektrometrischen Untersuchung des Photoaddukts noch keine neuen überzeugenden Argumente für die Existenz der fraglichen Spezies angeführt werden, so spricht die vorgestellte Charakterisierung anhand der CD-Spektroskopie nun ganz deutlich für die postulierte Struktur des belichteten Zustands im System LOV1 C57G/MM.

#### 4.5.6 Stabilität des Photoaddukts

Kottke berichtet in seiner ausführlichen Studie zur LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* aus dem Jahre 2003, in der er den Einfluss der Struktur des Apoproteins wie auch der Bedingungen in der die Domäne umgebenden Lösung auf die thermisch aktivierte Rückreaktion zum Dunkelzustand im Detail untersucht, dass besagte Rückkehr zum LOV1-447-Zustand in dieser Domäne auf einer Zeitskala von einigen Minuten abläuft [23]: Speziell unter Standardbedingungen bei 20°C mit pH 8.0 und einer 10 mM NaCl-Konzentration zeigt LOV1 einen monoexponentiellen Verlauf der Rückreaktion mit einer Zeitkonstante von 200 s. Ausgehend von der Struktur des belichteten Zustands LOV1-390 und von den von ihm durchgeführten pH-abhängigen Messungen zur Rückreaktion postuliert dieser Autor, dass sich im Addukt eine Schleife aus FMN, der Aminosäure Arginin 58 und dem reaktiven Cystein 57 bildet, die möglicherweise einen Zug auf die neu entstandene Bindung zwischen FMN und dem Cystein 57 ausübt. Es ist nun denkbar, so Kottke, dass die Stärke dieses Zuges - die u.a. vom pH-Wert der Lösung abhängt - die Geschwindigkeit der Rückreaktion beeinflusst, dass also eine Entlastung der Bindung eine langsamere Rückreaktion bedingt. Im vorliegenden Fall des Photoaddukts aus FMN und MM ist der von außen zugesetzte Reaktant MM überhaupt nicht mit dem Apoprotein verbunden. Es drängt sich daher die Frage auf, wie sich dieser Umstand auf die Stabilität des künstlichen Addukts auswirkt, ob es etwa in Abwesenheit einer einen solchen Zug bewirkenden Schleife über einen längeren Zeitraum hin stabil ist. Um dieser Frage weiter auf den Grund zu gehen, soll in diesem Kapitel die Langzeitstabilität des Photoaddukts aus FMN und MM untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst wiederum exakt nach der Vorschrift aus Abschnitt 4.5.2 unter aeroben Bedingungen das Addukt in großer Ausbeute hergestellt. Die Protein-Domäne befand sich dabei in dem bereits mehrfach genannten üblichen Dialyse-Puffer: 10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0. Kontrolle von Fortschritt und Ende dieser durch das Einstrahlen von blauem Licht ausgelösten Photoreaktion wurde erneut durch die begleitende Aufnahme von UV/Vis-Spektren gewährleistet. Nach dem Ende der Belichtung wurden dann zur Überwachung der weiteren Entwicklung dieses Reaktionsgemisches in unterschiedlichen Zeitabständen ebenfalls Absorptionsspektren gemessen. Auch

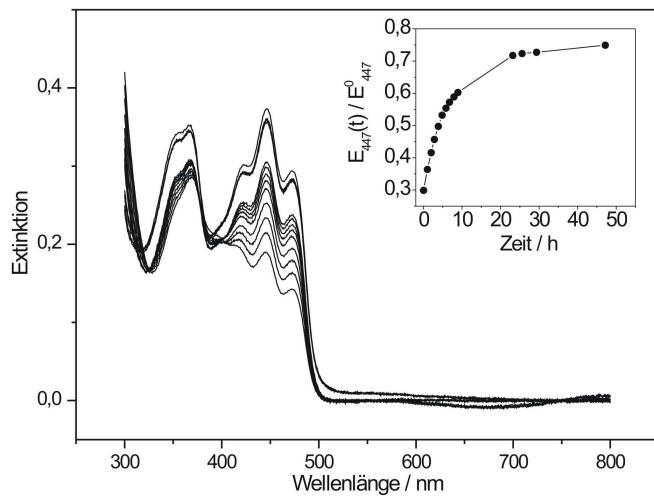
in dieser Phase des Experiments wurde die Probe weiterhin bei 20°C gehalten. Um eine unkontrollierte Einstrahlung von Umgebungs-Licht auf die Probe zu vermeiden, wurde diese außerdem durch ein schwarzes Tuch abgedeckt.

Abbildung 4.28 zeigt die während der Wartezeit im Laufe von Stunden in verschiedenen zeitlichen Abständen erhaltenen Absorptionsspektren der Reaktionslösung. Man sieht, dass die typische Bande von LOV1-447 allmählich wieder herauswächst. Die Tatsache, dass diese Spektren-Sequenz keine isosbestischen Punkte aufweist, legt nahe, dass das Gemisch nicht nur zwei Spezies - Addukt und Dunkelzustand - enthält, sondern dass darüber hinaus ein weiteres Zerfallsprodukt entsteht. Im Inset von Abbildung 4.28 ist explizit die zeitliche Entwicklung des Quotienten  $\frac{E_{447}(t)}{E_{447}^0}$  dargestellt, also des Verhältnisses der Extinktion bei einer Wellenlänge von 447 nm - der charakteristischen Bande des Dunkelzustands LOV1-447 - zum Zeitpunkt  $t$  zur Extinktion bei dieser Wellenlänge zum Zeitpunkt  $t_0$ . Dabei bezeichnet  $t_0$  die Ausgangssituation des Experiments, also den Zeitpunkt vor Beginn der Belichtung. Nach etwa 10 Stunden erreicht die Extinktion bei dieser Wellenlänge ausgehend von 30 % zum Ende der Belichtung bzw. zum Beginn der Wartezeit wieder einen Anteil von 60 % der Ausgangs-Extinktion. Am Ende der untersuchten Wartezeit, nach ca. 50 Stunden, sind 70 bis 80 % der ursprünglich im Dunkelzustand vorliegenden LOV-Domänen zurückgebildet.

Das geschilderte Experiment bestätigt somit die zu Beginn dieses Kapitels angestellte Vermutung, dass das unnatürliche Addukt ohne die genannte Schleife im Gegensatz zum Addukt des Wildtyps länger lebt und erst im Laufe von einigen Stunden zerfällt. Es ist an dieser Stelle wichtig zu betonen, dass diese Langzeitstabilität unter der Bedingung beobachtet wurde, dass das Addukt in einem intakten Protein-Käfig vorliegt. Die Frage, wie es um die Stabilität dieses Photoproducts bestellt ist, sobald die Protein-Hülle entfernt wird, soll Gegenstand des folgenden Kapitels sein.

#### 4.5.7 Denaturieren der LOV-Domäne

In den Kapiteln 4.5.4 und 4.5.5 wurden die Bestrebungen beschrieben, die Struktur des Photoaddukts aus FMN und MM mit Hilfe der Methoden der Massenspektrometrie und der CD-Spektroskopie nachzuweisen und somit die aus der UV/Vis-Spektroskopie herrührende Annahme zu bestätigen, dass es sich um ei-



**Abbildung 4.28:** Sequenz der nach dem Ende der Belichtung im Laufe von Stunden in unterschiedlichen zeitlichen Abständen aufgenommenen UV/Vis-Spektren; Inset: Auftragung des Quotienten  $\frac{E_{447}(t)}{E_{447}^0}$  gegen die Wartezeit.

ne kovalente Verbindung aus dem Chromophor FMN und der niedermolekularen Substanz MM handelt. Dabei wurde von der im intakten Protein-Käfig befindlichen Spezies ausgegangen. Eine alternative Vorgehensweise besteht darin, zunächst die Protein-Hülle durch Denaturieren zu entfernen, um dann die “nackte” Spezies charakterisieren zu können. Diese Strategie würde natürlich gleichzeitig und zuallererst Auskunft in der Frage geben, ob das Strukturelement - ein Schwefel-Atom mit einem aliphatischen Rest gebunden an das C(4a)-Atom des Flavins und ein Wasserstoff-Atom am N(5)-Atom - in wässriger Lösung überhaupt stabil ist. Anlass zum Zweifel gibt die Tatsache, dass in der wissenschaftlichen Literatur nach unserem Dafürhalten bislang kein Beleg für eine stabile Verbindung solchen Typs ausfindig gemacht werden konnte.

Ausgangspunkt der im Folgenden präsentierten Experimente war jeweils eine nach dem Rezept von Kapitel 4.5.2 unter aeroben Bedingungen hergestellte Photoaddukt-Lösung. Methode der Wahl zur Kontrolle von Ablauf und Ende dieser Photoreaktion war erneut die UV/Vis-Spektroskopie. In einem ersten Versuch wurde das gebräuchliche Verfahren angewendet, die das Addukt umgebende Protein-Struktur mit Hilfe von Ethanol zu zerstören. Dazu wurden zu 500  $\mu$ l der Addukt-Lösung - die ursprüngliche Lösung des Dunkelzustands hatte eine

OD<sub>447</sub> von etwa 0.9 - 900  $\mu$ l EtOH p.a. zugesetzt, das resultierende Gemisch wurde anschließend für eine Minute auf 95°C erhitzt. Dabei nahm die zunächst beinahe farblose Addukt-Lösung sogleich wieder eine stark gelbe Färbung an. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurde zur Abtrennung der denaturierten Protein-Domäne für 20 Minuten bei 23000 g zentrifugiert, woraufhin die überstehende Lösung zum Aufkonzentrieren mit Hilfe einer Speed Vac eingeengt wurde. Nun konnte zur Feststellung des Reaktionsergebnisses ein Absorptionsspektrum im bekannten Wellenlängenbereich aufgenommen werden. Dieses zeigte lediglich den durch die Anwesenheit von freiem Kofaktor "ausgewaschenen", für den Dunkelzustand LOV1-447 typischen Verlauf. Die eingeschlagene Strategie lieferte also kein freies Addukt, ja sie führte nicht einmal zu einer vollständigen Denaturierung der Protein-Domäne.

In einem weiteren Schritt wurde als effektiveres Reagenz zur Denaturierung von Proteinen das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) ausgewählt. Zu 1.2 ml einer ausgehend von einer LOV1 C57G-Lösung einer OD<sub>447</sub> von ca. 0.5 hergestellten Addukt-Lösung wurde so viel einer 10 %igen SDS-Lösung zugegeben, dass das Detergens in einer Endkonzentration von 1 % vorlag. Zur Unterstützung des Denaturierungs-Prozesses wurde das Gemisch außerdem mehrmals gevortext. Anschließend wurde der Ansatz in einem Centricon für knapp 10 Minuten zentrifugiert, um das zerstörte Protein abzutrennen. Eine Analyse von Retentat und Filtrat mittels UV/Vis-Spektroskopie ergab, dass im Retentat neben ausgefallenem Protein ebenfalls noch intakte Domänen vorlagen, im Filtrat war lediglich das Spektrum des freien Chromophors FMN auszumachen.

Im dritten Versuch wurde das gängige Reagenz Guanidiniumhydrochlorid eingesetzt, das als chaotropes Salz die Protein-Hülle denaturieren sollte. Zunächst wurde das spektrale Verhalten einer 7 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung dagehend kontrolliert, ob diese Spezies im interessierenden spektralen Bereich ihrerseits absorbiert. Da dies nicht der Fall war, wurden 300  $\mu$ l einer Addukt-Lösung - mit einer Ausgangs-OD<sub>447</sub> von etwa 1.2 - zu 1.8 ml einer vorgelegten 7 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung gegeben, so dass die Endkonzentration des Salzes 6 M betrug. Nun konnte mit Hilfe der UV/Vis-Spektroskopie der Prozess des Denaturierens beobachtet werden: Aber auch in diesem Fall war lediglich das typische spektrale Verhalten des freien FMN zu erkennen.

Alle geschilderten Experimente legen somit nahe, dass diese Addukt-Struktur zerfällt, sobald der Protein-Käfig entfernt wird. Dieses Phänomen wurde bereits in Kapitel 4.5.4, das die MS-Untersuchung des Addukts behandelte, angesprochen. Es stimmt mit dem - wie ebenfalls bereits erwähnt wurde - aus der Recherche in der Literatur zu gewinnenden Eindruck überein, dass dieser Struktur-Typ in freier Lösung nicht stabil ist. Zwar sind drei Publikationen zu finden, die über eine Bindung zwischen Schwefel und dem C(4a)-Atom eines Flavins berichten, aber in keinem Fall konnte eine exakt mit der von uns betrachteten Struktur übereinstimmende Verbindung zweifelsfrei charakterisiert werden (vgl. [83], [84], [85]). So postulieren Cashman und Liu ein intramolekulares Thiol-Additions-Produkt der N-3-Alkyl-Merkaptan-Seitenkette von 8-Cyano-N-3-(mercaptoalkyl)-10-methylisoalloxazin oder von N-3-(mercaptoalkyl)-10-phenylisoalloxazin an die C(4a)-Position des Isoalloxazins als isolierbares Intermediat. Dies führten sie auf die Beobachtung zurück, dass die für den Flavin-Chromophor typischen Absorptionsbanden in einer unimolekularen thermischen Reaktion mit Basen-Katalyse verschwinden. Das Produkt wurde isoliert und zeigt in einem *liquid ion secondary mass*-Spektrum dieselbe Masse wie der Reaktant. Leider werden weder das Absorptionsspektrum noch andere spektrale Eigenschaften des Produkts aufgeführt. Wenn die Zuordnung korrekt ist, kann die größere Stabilität dieser Spezies verglichen mit der von uns untersuchten Struktur durch die Tatsache erklärt werden, dass diese Reaktion intramolekular ist im Gegensatz zur bimolekularen Reaktion der vorliegenden Studie. Ein Zerfall der von uns betrachteten Verbindung führt daher zu einer wesentlich größeren Entropie-Zunahme [83].

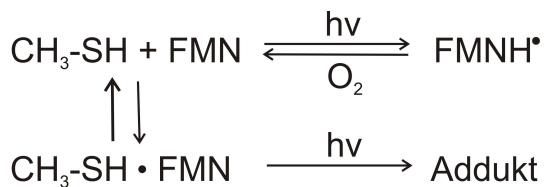
Eine weitere Verbindung mit ähnlichen Strukturelementen wurde von Ball und Bruice vorgeschlagen, die berichten, dass  $\beta$ -Merkaptoethanol an die C(4a)-Position eines N-5-ethyl-N-3-methyl-Lumiflavin-Kations addiert. Dieser Reaktionsverlauf wurde aus der Reaktionskinetik des Reaktanten geschlussfolgert, die mit zunehmender  $\beta$ -ME-Konzentration beschleunigt wird. Das postulierte Produkt wurde weder isoliert noch spektroskopisch identifiziert. Es weicht von dem von uns studierten Struktur-Typ dadurch ab, dass ein Alkyl-Substituent an der N(5)-Position gebunden ist. Dies könnte der Verbindung eine gewisse Stabilität verleihen, allerdings werden keine Angaben dahingehend gemacht [84]. Ein dritter Bericht zu der fraglichen Struktur-Einheit geht auf Knappe und

Hemmerich zurück, die durch IR-, NMR- und UV-Spektroskopie zeigen, dass ein Schwefel der Dithiodiessigsäure nach einer Fragmentierung an die C(4a)-Position von N-3-Benzylumiflavin addiert. Das resultierende N-3-Benzyl-C-4a-carboxymethylthiolumiflavin weicht von der zu Beginn dieses Kapitels definierten Struktur dadurch ab, dass kein rein aliphatischer Rest an den Schwefel gebunden ist, sondern der  $\alpha$ -Kohlenstoff einer Carboxy-Gruppe. Dieser sollte positiv polariert sein aufgrund des benachbarten Carboxy-Kohlenstoffs, was die Stabilität der Verbindung erhöhen könnte [85]. Es muss allerdings angeführt werden, dass der Vorschlag dieses Thioaddukts später von Eberlein und Powell in Frage gestellt wurde, die dieselben Experimente durchführten. Sie identifizierten das Produkt im Gegensatz zu Knappe und Hemmerich als Verbindung, in der ein Kohlenstoff-Atom an die C(4a)-Position des Flavins gebunden ist [86].

Es ist daher anzunehmen, dass in vorliegender Studie der Protein-Hülle die Funktion zukommt, die Stabilität des Photoaddukts aufrecht zu erhalten. In genauem Widerspruch dazu steht allerdings eine theoretische Studie aus dem Jahre 2006: Domratcheva *et al.* stellen darin zwar fest, dass die Bildung des S-C(4a)-Addukts in LOV durch die von der Proteinumgebung vorgegebene räumliche Anordnung des Isoalloxazin-Thiol-Komplexes ermöglicht wird. Im Weiteren führen sie aber aus, dass ein kovalentes S-C(4a)-Addukt aus Lumiflavin und MM stabil sein sollte, und dass der Zerfall eines solchen Addukts in LOV ebenfalls durch die Proteinumgebung ausgelöst wird [47].

#### 4.5.8 Diskussion

In vorliegendem Kapitel konnte tatsächlich aufgezeigt werden, dass ein Merkaptan mit einem so kleinen aliphatischen Rest wie MM weit genug in die Bindungstasche der LOV-Domäne vordringen kann, dass es eine kovalente Bindung zum Chromophor FMN ausbilden kann. Die Identifizierung der fraglichen Spezies gelang anhand der UV/Vis- sowie der CD-Spektroskopie, massenspektrometrisch konnten dagegen keine Argumente für die vorgeschlagene Struktur ermittelt werden. Eine Langzeitstudie zur Stabilität dieses unnatürlichen Addukts machte deutlich, dass es - im Gegensatz zum innerhalb von Minuten zerfallenden Addukt des Wildtyps - über Stunden hin stabil ist. Entfernt man allerdings den umgebenden Protein-Käfig, dann reagiert es sofort zurück zu den Ausgangsverbindungen.



**Abbildung 4.29:** Zusammenfassendes Schema zur Reaktion von FMN mit MM; der Punkt zwischen  $\text{CH}_3$  und FMN symbolisiert den Komplex aus dem Protein-gebundenen FMN und dem MM;  $\text{FMNH}^\bullet$  steht für das neutrale Semiquinonradikal.

Die Experimente ergaben zudem, dass eine Belichtung von LOV in Gegenwart von MM zu zwei Produkt-Spezies führt: Neben dem Addukt entsteht auch das neutrale Semiquinonradikal. Daher ist anzunehmen, dass ein Gleichgewicht existiert zwischen solchen Domänen, die ein MM-Molekül in ihrer Bindungstasche haben, und solchen, die - vereinfacht ausgedrückt - “leer” sind. In Abbilung 4.29, in der dieser Zusammenhang veranschaulicht wird, soll der somit vorliegende Komplex aus FMN und MM durch einen Punkt symbolisiert werden. Domänen mit MM in der Bindungstasche reagieren bei Belichtung zum Addukt, die “leeren” Domänen dagegen werden durch MM aus der näheren Umgebung zum Radikal reduziert. Diese Reaktion ist im Beisein von Sauerstoff reversibel, so dass einmal gebildete Radikale nach Rückoxidation zum Dunkelzustand doch noch ein MM-Molekül aufnehmen können und zum Addukt abreagieren können. Fragliches Gleichgewicht liegt nach der Zugabe einer großen Menge MM nicht sofort weit auf der Seite des Komplexes, sondern bei Verbrauch von “gefüllten” Domänen durch die Addukt-Bildung wird der Komplex allmählich nachgebildet. Dies erklärt den Unterschied zwischen aerober und anaerober Reaktionsführung.

Wie eingangs festgestellt wurde, sind die zwei Spezies Radikal und Addukt zu beobachten. Für die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit nach dem Bildungsmechanismus der Adduktbildung im Wildtyp ist nun gerade die Frage von Bedeutung, ob diese beiden Spezies in zwei unabhängigen Parallelreaktionen gebildet werden oder ob das Radikal ein Intermediat auf dem Weg zum Addukt ist. Letztere Alternative würde nämlich nahelegen, dass auch die Adduktbildung im Photozyklus der wildtypischen Domäne über eine radikalische Zwischenstufe abläuft. Allerdings kann basierend auf den vorhandenen Messdaten keine definitive Unterscheidung dahingehend getroffen werden.

## 4.6 Belichtung von LOV1 C57G in Gegenwart von Dimethylsulfid

In der ersten detaillierten Studie zum Photozyklus der LOV1-Domäne des Photoproteins aus *C. reinhardtii* aus dem Jahr 2003 wollte Kottke einen Weg finden, den an sich instabilen Signalzustand LOV1-390 eingehender zu charakterisieren. Gelang es dabei durch die Einführung einer bestimmten Punktmutation diesen Addukt-Zustand zu stabilisieren, wäre es durch dieses “Einfrieren” des Signalzustands des Photorezeptors außerdem möglich, die Aufklärung der Signalweiterleitung voranzutreiben. Geleitet von diesen Überlegungen setzte Kottke eine Mutante der LOV1-Domäne ein, in der das reaktive Cystein 57 durch ein Methionin ersetzt wurde, in der also an die Stelle der SH-Funktion des Cysteins eine S-CH<sub>3</sub>-Funktion im Methionin trat. Darin sollte, so Kottke, in einer dem Wildtyp entsprechenden Photoreaktion ein an der N(5)-Position methyliertes Addukt gebildet werden, das mutmaßlich eine höhere Stabilität aufweisen sollte. Eine basenkatalysierte Abstraktion des N(5)-Protons wäre dann nämlich nicht mehr möglich und eine homolytische Spaltung der N(5)-CH<sub>3</sub>-Bindung würde eine sehr hohe Aktivierungsenergie besitzen. Tatsächlich beobachtete Kottke aber im Zuge seiner Experimente zunächst die Ausbildung eines N(5)-alkylierten Photoaddukts mit planarer Geometrie: Die ursprünglich terminale CH<sub>3</sub>-Funktion des Methioninrests, die auch weiterhin am Schwefel des Methionins hängt, ist darin mit dem N(5)-Stickstoff verknüpft, an der N(1)-Position ist ein Wasserstoff-Atom gebunden. Diese Spezies reagiert dann in einer thermischen Folgereaktion weiter zu einem N(5)-alkylierten Radikal [23].

Das System LOV1 C57G/MM kann nach den bisherigen Ausführungen als Modell der wildtypischen LOV1-Domäne betrachtet werden, in dem bei Belichtung eine analoge Reaktion abläuft. Angeregt durch die zu Beginn dieses Abschnitts geschilderten Überlegungen und Experimente von Kottke [23] stellt sich nun die interessante Frage, welche Reaktion abläuft, wenn man - als Modell der LOV1 C57M-Mutante von Kottke - der LOV1 C57G-Mutante als Reaktionspartner Dimethylsulfid (H<sub>3</sub>C-S-CH<sub>3</sub>) anstatt MM (H<sub>3</sub>C-S-H) zusetzt.

## Das Experiment

Analog zum Experiment von Kottke wurde im Folgenden unter aeroben Bedingungen, also in Anwesenheit von Luftsauerstoff gearbeitet. Die LOV1 C57G-Mutante lag wiederum im bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) vor. Von der unter Standardbedingungen flüssigen Substanz Dimethylsulfid wurden zu einem Volumen von 300  $\mu$ l Protein-Lösung 2.2  $\mu$ l zugegeben, was einer Endkonzentration an Dimethylsulfid von 100 mM entspricht. Die Temperatur während des Experiments wurde bei 20°C gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde in Schritten von 1.1 bzw 5 s mit blauem Licht bestrahlt, dazwischen wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen (nicht gezeigt). Nach den ersten Belichtungsschritten verändert sich der spektrale Verlauf überhaupt nicht. Erst nach einer Belichtungsdauer von etwa 10 s wird allmählich die typische Flavin-Bande um 447 nm etwas kleiner. Gleichzeitig deuten sich bei 570 und 610 nm die beiden für das neutrale Semiquinonradikal charakteristischen Absorptionsbanden an und werden langsam intensiver. Die Sequenz der Spektren weist außerdem sehr scharfe isosbestische Punkte bei 493, 391, 381 und 336 nm auf. Diese Beobachtungen legen nahe, dass auch im Falle der Reagenz Dimethylsulfid das oxidierte FMN unter dem stabilisierenden Einfluss der Protein-Hülle zur Radikalform reduziert wird, dass also der externe Donor ein Elektron auf  $^3$ FMN überträgt. Die genaue Quelle des Protons ist wie im Falle von EDTA.  $\beta$ -ME und DTT nicht bekannt; potentielle Kandidaten sind das Protein, die wässrige Umgebung und die Reagenz selbst. Der scheinbare Widerspruch, dass einerseits das Radikal stabil sein soll und dass andererseits vorliegende Reaktion im Beisein von Sauerstoff abläuft, ist mit der Annahme aufzulösen, dass zum Zeitpunkt des Auftauchens des Radikals bereits aller im Reaktionsgemisch gelöste Sauerstoff verbraucht war. Dafür spricht auch, dass die Veränderungen des spektralen Verlaufs nur sehr langsam einsetzen, dass also das Radikal erst relativ spät gebildet wird.

Das System LOV1 C57G/Dimethylsulfid zeigt also kein zur LOV1 C57M-Mutante von Kottke [23] analoges Reaktionsverhalten. Es ist somit anzunehmen, dass auch diese Substanz - wohl aufgrund ihrer Größe - nicht tief genug zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Chromophor FMN in die Bindungstasche vordringen kann, sie überträgt aus größerer Entfernung ein Elektron.

## 4.7 Belichtung von LOV1 C57S in Gegenwart von Methylmerkaptan

In den bislang beschriebenen Experimenten wurde jeweils die C57G-Mutante der LOV1-Domäne des Phot-Proteins aus *C. reinhardtii* verwendet. Dahinter steckte die Annahme, dass der zugängliche Raum in der Bindungstasche der Domäne dadurch maximiert wird, weil Glycin ja die kleinst mögliche der 20 nativen Aminosäuren ist. Wählt man außerdem als externen Donor das kleinst mögliche Thiol MM, so vermag dieses, zum Chromophor FMN vorzudringen und eine kovalente Bindung zu ihm auszubilden. Größeren Thiolen wie etwa  $\beta$ -ME dagegen bleibt ein solcher Zugang verwehrt, sie können lediglich ein Elektron übertragen. Aus diesen Beobachtungen wurde die naheliegende These abgeleitet, dass das Volumen der externen Reagenzien darüber entscheidet, welche Reaktion abläuft. Um diese These einer weiteren Prüfung zu unterziehen, wurde nun das System LOV1 C57S/MM mit blauem Licht bestrahlt. Auf der einen Seite wurde also das kleine MM beibehalten, auf der anderen Seite wurde aber das im Vergleich zur Aminosäure Glycin mit einer  $-\text{CH}_2\text{-OH}$ -Seitenkette sterisch anspruchsvollere Serin eingesetzt.

### Das Experiment

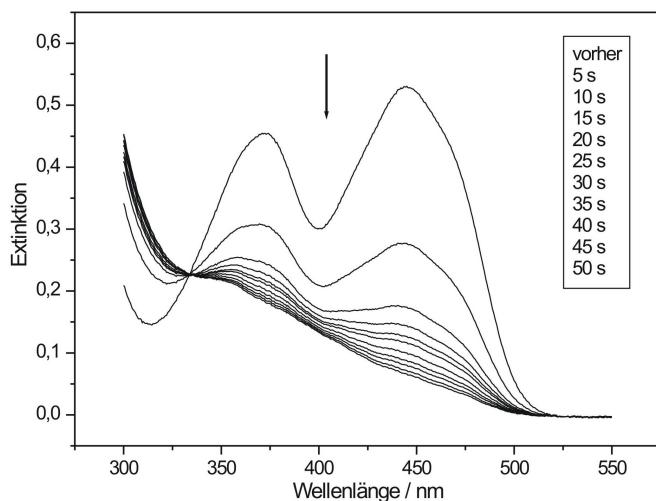
Wie die Glycin-Mutante der LOV1-Domäne lag auch die Serin-Mutante in dem üblichen Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) vor. Das Reagenz MM wurde wie bei dem in Abschnitt 4.5.2 beschriebenen Experiment in "großer" Konzentration zugesetzt. Außerdem wurde, um die Bedingungen für eine mögliche Adduktbildung zu optimieren, in Anwesenheit von Sauerstoff gearbeitet. Die Temperatur während des Experiments betrug erneut 20°C. Die Belichtung erfolgte in Schritten von 1.1 sowie 5 s. Dazwischen wurden zur Beobachtung des Reaktionsverlaufs UV/Vis-Spektren aufgenommen (nicht gezeigt). In den ersten - in 1.1-Paketen eingestrahlten - etwa 10 s Belichtung bleibt das spektrale Verhalten der Domäne unverändert. Dann allerdings treten die typischen Veränderungen auf, die bislang immer bei einer Ausbildung des neutralen Semiquinonradikals wahrzunehmen waren: Die Flavin-Bande bei 447 nm wird kleiner, gleichzeitig tauchen bei 570 und 610 nm zwei Absorptions-

banden auf. Zudem verläuft die Reaktion über scharfe isosbestische Punkte bei 493, 391, 381 und 336 nm. Die Tatsache, dass die Radikalform stabil ist, obwohl nicht explizit unter aeroben Bedingungen gearbeitet wurde, legt wie im Experiment des vorangehenden Kapitels 4.6 nahe, dass der im Reaktionsgemisch gelöste Sauerstoff in der ersten Phase des Experiments verbraucht wurde. Auch was die Dauer dieser aeroben Anfangsphasen betrifft, stimmen die beiden Experimente aus 4.6 und 4.7 überein. Dies kann jedoch genau genommen nicht als Indiz für einen ähnlichen Zeit-Dauern beanspruchenden Verbrauch des Sauerstoffs gewertet werden, da die Parameter Protein-Konzentration und Donor-Konzentration in den beiden Versuchen nicht übereinstimmten. Zudem laufen hier zwei zwar äquivalente Reaktionen in zwei, aber verschiedenen Systemen - C57G/Dimethylsulfid bzw. C57S/MM - ab, die somit auch verschiedene Quantenausbeuten aufweisen sollten.

Der Verlauf dieses Experiments zeigt somit, dass die Adduktbildung nicht mehr vonstatten gehen kann, wenn der "freie" Raum in der Bindungstasche der Domäne durch den Übergang zur Serin-Mutante verkleinert wird. Es kann folglich als Bestätigung der These angesehen werden, dass das verfügbare Volumen in der Protein-Tasche und die Raumbeanspruchung der externen Reagenz die Richtung der Reaktion beeinflussende Faktoren sind. Daneben kann allerdings auch die Polarität der Serin-Seitenkette mit ihrer OH-Funktion eine Rolle spielen.

## 4.8 Belichtung von freiem FMN in Gegenwart von Methylmerkaptan

In Abschnitt 4.5.7 wurde versucht, die das unnatürliche Photoaddukt aus FMN und MM umgebende Protein-Hülle durch Denaturieren zu entfernen. Dabei stellte sich heraus, dass besagte Spezies zerfällt, sobald der Protein-Käfig entfernt wird. Nun sollte ausgetestet werden, welche Reaktion abläuft, wenn freies FMN in wässriger Lösung in Gegenwart des Thiols MM belichtet wird.



**Abbildung 4.30:** Sequenz der Absorptionsspektren aus dem Belichtungsexperiment mit freiem FMN in wässriger Lösung und MM als externem Donor bei “großer” Konzentration an MM und unter aeroben Bedingungen; der Pfeil zeigt die Entwicklungsrichtung der Spektren an; im Kasten sind die entsprechenden Belichtungszeiten aufgeführt.

## Das Experiment

Um zum entsprechenden Experiment mit der G-Mutante der LOV1-Domäne aus Kapitel 4.5.2 äquivalente Reaktionsbedingungen zu schaffen, wurde das Flavin nicht in reinem Wasser gelöst, sondern im bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0). Außerdem wurden für den Chromophor und den Donor annähernd die gleichen Konzentrationen wie in diesem LOV-Experiment gewählt: Vom Flavin FMN wurde eine Stammlösung mit einer OD<sub>447</sub> von ca. 1.5 hergestellt, die MM-Lösung wurde nach der Vorschrift aus Abschnitt 3.7 präpariert. Die beiden Lösungen wurden in einem Verhältnis MM-Lösung zu FMN-Lösung von 2:1 gemischt, so dass die OD<sub>447</sub> des resultierenden Reaktionsgemisches etwa 0.5 betrug. Die Temperatur des Ansatzes wurde wieder bei 20°C gehalten. Ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Versuch mit der Protein-Domäne wurde die Reaktionsführung aerob gestaltet. Die Belichtung erfolgte in Schritten von 5s, dazwischen wurden UV/Vis-Spektren zur Beobachtung des Reaktionsgeschehens aufgenommen.

In Abbildung 4.30 ist die erhaltene Sequenz von UV/Vis-Spektren dargestellt. Am Ausgangsspektrum sind zunächst die für FMN in freier Lösung so typischen

breiten Absorptionsbanden ohne Feinstruktur zu erkennen. Diese werden sogleich mit dem ersten Belichtungsschritt von 5 s deutlich kleiner. Die Entwicklung geht mit zunehmender Belichtungszeit schließlich so weit, dass die Flavin-Banden nahezu komplett verschwinden, stattdessen bildet sich eine Bande bei etwa 340 nm heraus. Die Spektren-Sequenz zeigt außerdem einen sehr scharfen isosbestischen Punkt bei 334 nm. Eine erste oberflächliche Betrachtung des Messergebnisses lässt somit vermuten, dass zwei Spezies zu den Spektren beitragen, dass also das oxidierte FMN zu einem einzelnen Produkt abreagiert. Die Gestalt des letzten Spektrums legt nahe, dass es sich dabei um das in Abschnitt 1.2 bereits vorgestellte Dihydroflavin oder Flavohydrochinon handelt. Da diese zweifach reduzierte Form des FMN in Anwesenheit von Sauerstoff bekanntermaßen nicht stabil ist, muss auch für dieses Experiment angenommen werden, dass der gelöste Sauerstoff beim Auftreten der zweifach reduzierten Spezies schon abreagiert hat. Dafür spricht auch, dass man, wenn man das Reaktionsgemisch schüttelt, sofort das Ausgangsspektrum von  $\text{FMN}_{ox}$  zurückbekommt.

Song *et al.* berichten in einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2007 über ihre Belichtungsexperimente mit freiem FMN in wässriger Lösung [87]. Dabei bestrahlten sie das freie Flavin ohne Zusatz externer Reagenzien im Beisein von Sauerstoff und beobachteten mit Verzögerung das Auftreten einer permanenten Absorption von reduziertem Flavin  $\text{FMNH}^-$ . Den Erklärungen vorliegender Studie entsprechend nehmen die Autoren an, dass in dieser ersten Phase der im Reaktionsgemisch gelöste Sauerstoff (ca.  $2.8 \times 10^{-4} \frac{\text{mol}}{\text{dm}^3}$  bei Raumtemperatur [88]) verbraucht wird. Dies erklären sie sich damit, dass durch Lichtanregung und anschließendes *intersystem crossing*  $^3\text{FMN}$  ( $\text{FMN} + h\nu \rightarrow ^1\text{FMN}$ ,  $^1\text{FMN} \rightarrow ^3\text{FMN}$ ) gebildet wird. Die Kollision von  $^3\text{FMN}$  mit Sauerstoff im Grundzustand - also Sauerstoff im Triplett-Zustand ( $^3\text{O}_2$ ) - verursacht die Ausbildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Der reaktive Singulett-Sauerstoff wiederum wird entweder bei der Zersetzung von FMN verbraucht oder durch Reaktion mit dem Lösungsmittel ( $^1\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2$ ). Die Autoren dieser Studie belichteten freies FMN in wässriger Lösung, außerdem unter aeroben Bedingungen in Anwesenheit von DTT. Auch in diesem Fall war das Einsetzen der Photoreduktion und somit die Ausbildung von  $\text{FMNH}^-$  zeitlich leicht verzögert, was die Experimentatoren erneut dem anfänglichen Verbrauch des Sauerstoffs zuschreiben. Ist diesem Fall verschwindet der

gebildete Singulett-Sauerstoff neben den bereits genannten Zerfallskanälen, außerdem durch die Reaktion mit DTT. Da dieses Reagenz in einer um etwa den Faktor 40 größeren Konzentration (10 mM) als der Sauerstoff vorliegt, kann die eigentliche Photoreaktion trotzdem fast so effektiv ablaufen wie unter anaeroben Bedingungen.

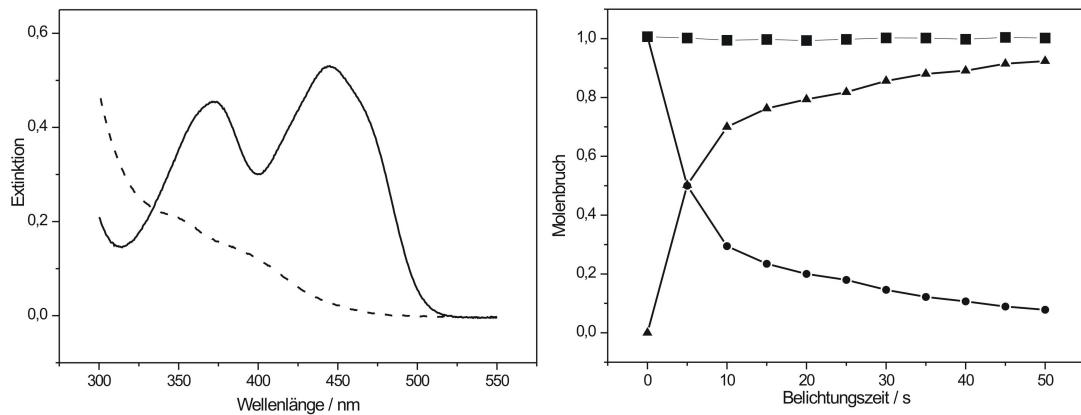
Für das vorliegende Experiment ist keine entsprechende Abschätzung der Konzentrationsverhältnisse möglich, da die Konzentration des MM unbekannt ist. Allerdings ist aufgrund der Effektivität der Reaktion anzunehmen, dass auch in diesem Fall das Reduktionsmittel MM in viel größerer Konzentration als der Sauerstoff vorliegt.

Im Falle dieser Experimente mit freiem Flavin FMN kommt außerdem noch folgender Pfad für den anfänglichen Verbrauch des gelösten Sauerstoffs in Frage: Der Sauerstoff wird wohl einmal gebildetes Hydrochinon  $\text{FMNH}^-$  zurückoxidieren zum oxidierten FMN.

Auch bei den in den Kapiteln 4.6 und 4.7 besprochenen Experimenten wurde postuliert, dass in der Anfangsphase zunächst der im Reaktionsgemisch gelöste Sauerstoff verbraucht wird. Vor allem Dimethylsulfid liegt mit 100 mM in deutlichem Überschuss gegenüber dem Sauerstoff vor, so dass die anfängliche Reaktion dieser Substanz mit auftretendem Singulett-Sauerstoff die Effektivität der folgenden Reaktion mit dem Protein-gebundenem FMN nicht beeinträchtigen sollte. Was die Verhältnisse in der Reaktion von LOV1 C57S mit MM anbetrifft, kann wiederum aufgrund der Effektivität der Reaktion nur vermutet werden, dass auch MM in großem Überschuss vorliegt. Als zusätzlicher Zerfallskanal des gelösten Sauerstoffs muss im Falle dieser Protein-gebundenen Flavine in Betracht gezogen werden, dass Sauerstoff durch die Reoxidation von gebildeten Semiquinonradikalen verbraucht wird.

## Die Auswertung

Die im Rahmen der SVD-Analyse zuerst betrachtete Auftragung der Standardabweichung  $\sigma^{(l)}$  gegen die Zahl der zugrundeliegenden Komponenten (nicht gezeigt) ergibt erwartungsgemäß, dass zwei Spezies vorliegen sollten. Es gilt folglich, die vier Matrixelemente aus Gleichung 4.3 zu bestimmen. Dabei können, wie in Abschnitt 4.5.2 bereits erläutert wurde, die folgenden Informationen verwendet



**Abbildung 4.31:** links: Rekonstruierte Spektren von  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  (durchgezogene Linie) und  $\text{FMNH}^-$  (gestrichelte Linie); rechts: Konzentrations-Zeit-Profile des  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  (Kreise) und des  $\text{FMNH}^-$  (Dreiecke); die Summe der zwei Molenbrüche ist mit Vierecken dargestellt.

werden:

- Zu Beginn des Experiments liegt nur die Spezies  $\text{FMN}_{\text{ox}}$  vor.
- Bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 334 nm ist ein isosbestischer Punkt zu erkennen.
- Das Spektrum der zweiten Komponente nimmt an der Stelle  $\lambda_k = 485$  nm den Wert Null an, an der das Spektrum der ersten Komponente ungleich Null ist.

Wendet man die in Kapitel 4.5.2 hergeleiteten Formeln auf vorliegenden Fall an, dann erhält man die in Abbildung 4.31/links gezeigten Absorptionspektren sowie die rechts dargestellten Konzentrations-Zeit-Profile. Bei dem mit gestrichelter Linie gezeichneten Spektrum handelt es sich offensichtlich - wie bereits im vorangehenden Absatz vermutet wurde - um das Spektrum des zweifach reduzierten Flavins  $\text{FMNH}_2$  [16], das bei pH 8.0 wohl in der anionischen Form vorliegt.

Die Belichtung von freiem FMN in wässriger Lösung in Anwesenheit von MM ergibt also das nach der Lektüre von Kapitel 4.5.7 nicht ganz unerwartete Resultat, dass ohne Protein-Hülle kein Photoaddukt aus FMN und MM entsteht. MM wirkt in dieser Reaktion lediglich als Reduktionsmittel. Der LOV-Domäne kommt in der Reaktion von Kapitel 4.5.2 somit nicht nur die Rolle zu, das Photoaddukt vor dem Zerfall zu schützen, sondern sie lenkt die Reaktion überhaupt erst in diese Richtung der Adduktbildung.

## 4.9 Die Mutante LOV1 C57G L101C: Belichtung ohne externen Donor

Die vorgestellten MM-Experimente wurden in dem Sinne gedeutet, dass MM, wenn es in der Bindungstasche der C57G-Mutante der LOV1-Domäne sitzt, bei Belichtung eine kovalente Bindung zum Chromophor FMN ausbildet. Ist es dagegen weiter entfernt vom FMN, mutmaßlich außerhalb der Bindungstasche, so unsere Interpretation, dann agiert es lediglich als Elektronen-Donor und überträgt ein Elektron auf das Flavin. Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte im nächsten Experiment vorliegender Studie durch die gezielte Einführung von Punktmutationen eine Modell-LOV-Domäne geschaffen werden, in der zum einen wie in den bisherigen Experimenten der eigentliche Reaktant, das Cystein 57, ausgetauscht ist gegen Glycin, das ja keine funktionelle Gruppe in der Seitenkette hat und somit bei Belichtung unreaktiv ist. Zum anderen sollte an einer gezielt ausgewählten Stelle eine weitere Aminosäure ihrerseits durch ein Cystein ersetzt werden. Dieses neu eingeführte Cystein sollte so positioniert sein, dass es zwar ausreichend nahe am Kofaktor FMN sitzt, um ein Elektron zu übertragen, dass es aber keine kovalente Bindung ausbilden kann. Es sollte folglich als Bestandteil der Protein-Domäne die Rolle des externen Donors übernehmen. Auf diese Weise sollte ein Modell der LOV-Domäne entstehen, in dem die Photoadduktbildung lediglich bis zum - von uns postulierten - Intermediat Radikal ablaufen kann und dann "eingefroren" wird.

Bekanntermaßen gibt es in dem Protein Photolyase eine Kette von Tryptophanen, längs der Elektronen übertragen werden. Der Abstand zwischen den einzelnen Zentren in dieser Elektronen-Transfer-Kette beträgt etwa 7 Å [89]. Diese Distanz wurde bei der Wahl einer geeigneten Aminosäure als Maßstab angesetzt: Das "neue" Cystein sollte nicht weiter entfernt sein als diese 7 Å. Ein weiterer Punkt, der bei Bestimmung einer passenden Aminosäure eine Rolle spielte, war die Tatsache, dass die auszutauschende Aminosäure und das Cystein nicht zu unterschiedlich sein durften, was Art und Größe ihrer Seitenkette betraf. Ansonsten nämlich lief man Gefahr, dass die Protein-Domäne nach der Expression nicht korrekt gefaltet wurde. Geleitet von diesen Überlegungen fiel die Wahl schließlich auf die Aminosäure mit der Nummer 101, ein Leucin mit einer -CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-

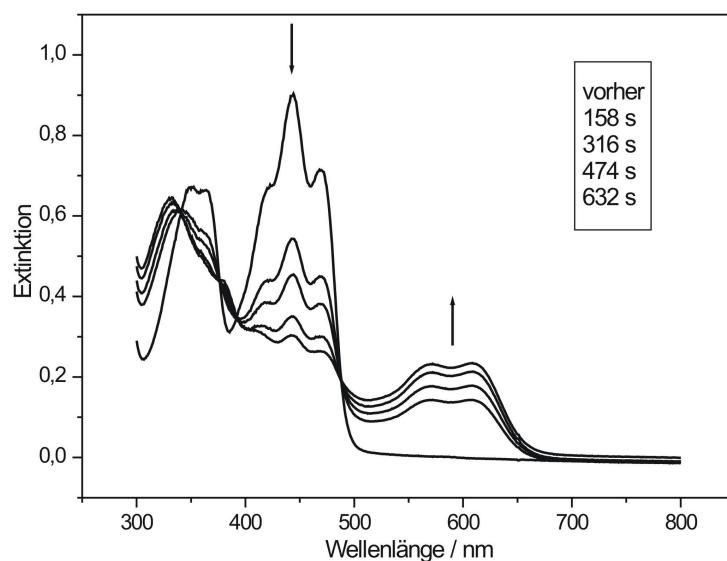
Seitenkette. Tritt ein Cystein mit seiner -CH<sub>2</sub>-SH-Seitenkette an die Stelle dieses Leucins, dann ist seine Thiolfunktion etwa 5 Å vom C(4a)-Atom des Chromophors FMN entfernt.

### Ein Vorexperiment mit LOV1 C57G

Kay *et al.* berichten in ihrer Studie aus dem Jahr 2003, dass die C450A-Mutante einer LOV2-Domäne von Phot1 aus *A. sativa* bei Belichtung in das neutrale Semiquinonradikal übergeht, ohne dass ein externer Elektronen-Donor anwesend ist. Sie erklären dies über eine Protein-interne Reduktion durch eine nicht-identifizierte, redoxaktive Aminosäure, vermutlich ein Tryptophan, Histidin oder Tyrosin [39]. Da auch die in vorliegender Studie eingesetzte LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* zwei Histidine, ein Tryptophan und vier Tyrosine besitzt, sollte zunächst in einem Vorexperiment untersucht werden, ob auch hier eine Protein-interne Reduktion abläuft.

Eine Lösung der LOV1 C57G-Domäne in dem bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) wurde zunächst nach der in Kapitel 3.6.9 beschriebenen Methode von Sauerstoff befreit. Durch Darüberleiten eines Argon-Stroms während des eigentlichen Experiments wurde ein neuerliches Eindringen von Sauerstoff verhindert. Die Temperatur wurde konstant bei 20°C gehalten. Die Belichtung der Probe erfolgte in Schritten von 1.1 s; da zwischen wurden wie üblich UV/Vis-Spektren aufgenommen. In Abbildung 4.32 sind die nach Belichtungszeiten von 158, 316, 474 und 632 s erhaltenen Spektren dargestellt. Man erkennt deutlich, dass auch diese Mutante der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* ohne Beisein eines externen Elektronen-Donors bei Belichten zum neutralen Semiquinonradikal reduziert wird - wenn dafür auch verglichen mit den bisherigen Experimenten extrem lange Belichtungszeiten notwendig sind. Die Spektren-Sequenz weist bei 489, 391, 377 und 340 nm isosbestische Punkte auf, so dass angenommen werden kann, dass trotz der langen Belichtungszeit keine weiteren Reaktionsprodukte entstanden sind. Allerdings erreicht das nach Belüften der Probe gemessene Spektrum (nicht gezeigt) nicht mehr ganz die Intensität des Ausgangspektrums, was bedeutet, dass die Reaktion einen gewissen irreversiblen Anteil hat.

Auch Song *et al.* untersuchten eine Mutante der LOV1-Domäne des Phototropins



**Abbildung 4.32:** Vor Beginn der Belichtung bzw. nach den im Kasten angegebenen Belichtungszeiten aufgenommene Absorptionsspektren bei Belichtung der LOV1 C57G-Mutante ohne externen Donor. Die Pfeile zeigen die Entwicklungsrichtung der Spektren an.

aus *C. reinhardtii*, in der das reaktive Cystein gegen ein Serin ausgetauscht war (LOV1 C57S). Diese Protein-Domäne wurde als Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein exprimiert. Die Experimentatoren belichteten LOV1 C57S ohne Zusatz eines externen Donors mit Hilfe einer 250 W-Quecksilber-Lampe und eines Interferenzfilters. Dabei beobachteten sie nach etwa 3 Minuten Belichtungszeit das Ausbilden einer Absorptionsbande bei 500 bis 660 nm. Sie interpretieren dies als das Auftreten des neutralen Semiquinonradikals  $\text{FMNH}\cdot$ . Nach einer Belichtungsdauer von 10 Minuten erreichte die Absorption in diesem Bereich ihren Maximalwert. Es ist noch wichtig anzumerken, dass in dieser Studie nicht unter Sauerstoffausschluss, also aerob gearbeitet wurde. Die Tatsache, dass trotzdem die Absorptionsbanden des Radikals zu beobachten waren, erklären sie damit, dass die Domäne nicht ausreichend durchlässig für Sauerstoff ist und dass somit das Radikal nicht sofort reoxidiert wird. Dariüber hinaus bestrahlten diese Autoren noch die LOV1 C57G-Mutante, die wie in vorliegender Studie mit einem His-Tag fusioniert war, mit blauem Licht. Bei moderaterer Anregungsintensität stellten sie keine Radikalbildung fest, was sie darauf zurückführen, dass diese Domäne durchlässiger für Sauerstoff ist, so dass einmal gebildetes Radikal sofort

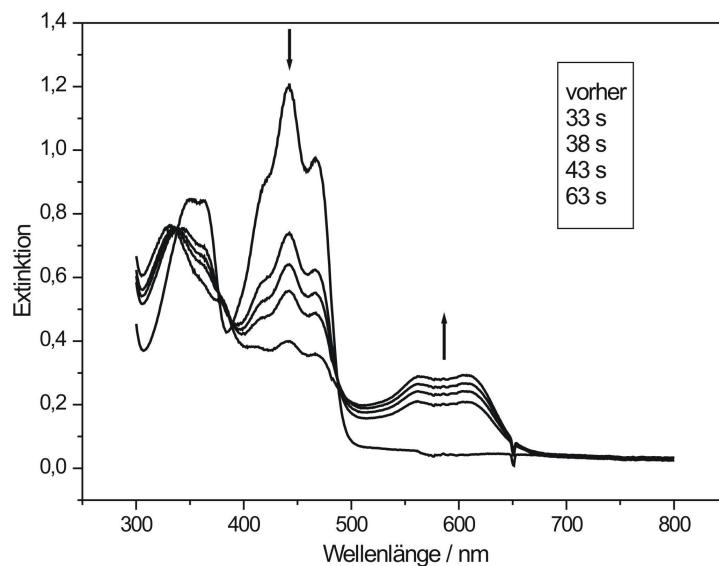
wieder reoxidiert wird. Erhöhten sie wiederum die Lichtintensität, so konnten sie lediglich die Denaturierung der LOV-Domäne diagnostizieren. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnten also Song *et al.* im Falle von LOV1 C57G ohne Zusatz externer Donoren keine Radikale ausmachen. Es soll an dieser Stelle allerdings noch einmal darauf hingewiesen werden, dass sie im Unterschied zu unseren Experimenten nicht Sauerstoff-frei arbeiteten. [90]

### **Belichten von LOV1 C57G L101C**

Nach diesen die Ausgangssituation klärenden Vormessungen wurde nun im eigentlichen Experiment die ebenfalls im bekannten Dialyse-Puffer (10 mM Na-Phosphat, 10 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, pH 8.0) gelöste LOV1 C57G L101C-Mutante mit blauem Licht ohne Beisein von externen Donoren bestrahlt werden. Wie im Versuch des vorangehenden Absatzes wurde der Reaktionsansatz zunächst von Sauerstoff befreit und dann Sauerstoff-frei gehalten. Die Temperatur während der Messung betrug wiederum 20°C. Die Belichtungszeit war in 1.1- bzw. 5 s-Schritte unterteilt; die in den Zwischenräumen, nach Belichtungszeiten von 33, 38, 43 und 63 s aufgenommenen Absorptionsspektren sind in Abbildung 4.33 gezeigt. Wie zu erwarten war, wird auch im Fall dieser Mutante - die ja einen Cystein-Rest in der Nähe des Kofaktors FMN besitzt - bei Belichtung das neutrale Semiquinonradikal gebildet. Auch diese Reaktion verläuft über isosbestische Punkte bei 491, 390, 380 und 338 nm, was vermuten lässt, dass keine Beiprodukte entstanden sind. Lässt man nach dem Ende der Belichtung Sauerstoff in die Reaktionslösung eindringen, dann bildet sich die typische Bande des Flavins bei 447 nm zurück, die Radikal-Banden um 600 nm verschwinden. Jedoch erreicht dieses zuletzt gemessene Spektrum nicht ganz die ursprüngliche Intensität, so dass auch hier ein irreversibler Anteil angenommen werden muss.

### **Der Vergleich**

Möchte man nun das Belichtungsexperiment mit LOV1 C57G L101C hinsichtlich der zu Beginn dieses Abschnitts angestellten Überlegungen interpretieren, so müssen die Belichtungszeiten der beiden Experimente - mit C57G einerseits und C57G L101C andererseits - verglichen werden. Zu diesem Zweck sind in Abbildung 4.34 die in den beiden Experimenten jeweils noch vorhandenen prozentu-



**Abbildung 4.33:** Vor Beginn der Belichtung bzw. nach den im Kasten angegebenen Belichtungszeiten aufgenommene Absorptionsspektren bei Belichtung der LOV1 C57G L101C -Mutante ohne externen Donor. Die Pfeile zeigen die Entwicklungsrichtung der Spektren an.

ellen Anteile der Extinktion bei einer Wellenlänge von 443 nm gegen die bereits angewendeten Belichtungszeiten aufgetragen. Es ist also der Quotient  $\frac{E_{443}(t)}{E_{443}^0}$  als Funktion der Belichtungszeit dargestellt. Während im Falle der Doppelmutante die Extinktion  $E_{443}$  schon nach einer Belichtungszeit von 33 s auf einen Anteil von 60 % an der Ausgangsextinktion abgesunken ist, ist für eine entsprechende Abnahme bei LOV1 C57G eine Belichtungszeit von 158 s nötig. Am Ende des Experiments liegen bei LOV1 C57G L101C nach 63 s Belichtung noch 34 % der Ursprungsextinktion vor. Bei der Einfachmutante LOV1 C57G dagegen war eine Belichtungszeit von 632 s vonnöten, um einen ähnlichen Zustand zu erreichen.

Dieser Vergleich zeigt ganz deutlich auf, dass die Protein-interne Reduktion des Kofaktors FMN durch die Einführung der Aminosäure Cystein an Position 101 erheblich beschleunigt wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass dem Cystein 101 die Rolle einer redoxaktiven Aminosäure zukommt, die ein Elektron auf das Flavin überträgt. Dieses Experiment beweist also, dass Cystein mit der aliphatischen Thiolfunktion in der Seitenkette bei Belichtung bereits bei einem Abstand von etwa 5 Å dazu in der Lage ist, in einer raschen Reaktion ein Elektron an das im Triplettzustand befindliche FMN abzugeben. Im Hinblick auf den

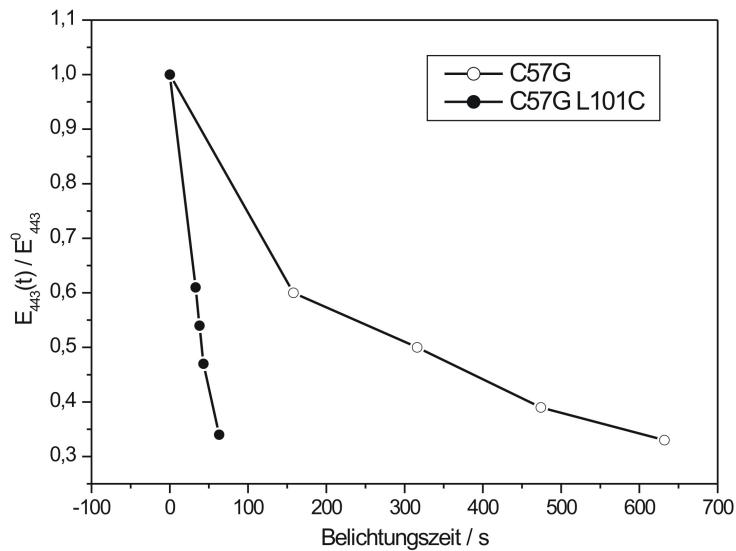


Abbildung 4.34: Der Quotient  $\frac{E_{443}(t)}{E_{443}^0}$  aufgetragen gegen die angewendete Belichtungszeit.

Reaktionsmechanismus der Adduktbildung im Wildtyp - der ja im Fokus dieser Arbeit steht - bedeutet dies, dass ein solcher Elektronen-Transfer erst recht und noch leichter vonstatten gehen sollte, wenn das Cystein noch näher am FMN ist. Es ist somit also durchaus plausibel, dass auch das Cystein 57 im Wildtyp ein Elektron auf den Triplett-Chromophor  $^3\text{FMN}$  überträgt. Die daraus resultierenden Radikale würden dann zum Addukt rekombinieren. Man kann allerdings basierend auf diesen Messungen nicht ausschließen, dass ein konzertierter Bildungsmechanismus bei dieser großen Nähe nicht noch schneller ablaufen würde. Das vorliegende Experiment stellt damit einen weiteren Hinweis auf einen radikalischen Mechanismus dar, es ist aber kein definitiver Beweis.

## 4.10 Zusammenfassende Diskussion

Der Signalzustand, der in LOV-Domänen auf die Einstrahlung von blauem Licht hin gebildet wird, wurde als kovalentes Addukt zwischen dem C(4a) des Kofaktors FMN und dem Schwefelatom des reaktiven Cysteins 57 identifiziert. Es ist allgemein akzeptiert, dass der Triplett-Zustand des FMN ein Intermediat auf dem Weg zum Addukt ist, der weitere Reaktionspfad zwischen Triplett-Zustand und

Addukt ist allerdings bislang nicht überzeugend aufgeklärt. Diese photochemische Reaktion beinhaltet die Schritte:

- Bruch der S-H-Bindung im Cystein
- Ausbildung der neuen Bindungen: S-C(4a) sowie N(5)-H
- *intersystem crossing* vom Singulett- zum Triplett-Zustand.

Angesichts der Komplexität dieser Photoreaktion erscheint ein konzertierter Mechanismus, demzufolge alle Schritte simultan ablaufen (vgl. [24], [33]), als eher unwahrscheinlich. Völlig offen bleibt bei diesem Vorschlag die Frage, wie das System durch *intersystem crossing* in den Singulett-Grundzustand zurückkehrt.

Als weitere Möglichkeit wurde ein ionischer Mechanismus (vgl. [28], [32]) vorgeschlagen, wonach sich im Triplett-Zustand die  $pK_a$ -Werte der Thiolfunktion des Schwefels bzw. der N(5)-H-Gruppe des FMN so verändern, dass der Thiol-Schwefel sein Proton auf den Stickstoff N(5) überträgt. Dann greift, so die Annahme, der Thiolat-Schwefel den nun positiv geladenen N(5) nukleophil an. Auch in diesem Fall ist fraglich, wann das System in den Singulett-Zustand übergeht. Geschieht dieser Übergang vor dem nukleophilen Angriff, so müsste der dann folgende Angriff schneller verlaufen als die Säure-Base-Reaktion zwischen protoniertem Stickstoff N(5) und dem Thiolat-Schwefel. Die  $pK_a$ -Werte von Thiolen liegen ja um 8 und der des FMN N(5) im Grundzustand in Wasser bei etwa 0, so dass erwartungsgemäß im Grundzustand der Schwefel protoniert vorliegt und der Stickstoff N(5) unprotoniert. Würde das System wiederum nach dem nukleophilen Angriff in den Singulett-Zustand zurückkehren, dann müsste sich das Addukt folglich im Triplett-Zustand bilden. Dies ist allerdings unwahrscheinlich, da der Triplett-Zustand des Addukts energetisch höher liegen sollte als der der getrennten Spezies.

Als dritte Alternative wurde ein über radikalische Intermediate verlaufender Mechanismus formuliert (vgl. [39], [40], [26], [42], [43], [44], [46], [48] [49], [47]). Dabei ist zum einen denkbar, dass sich zuerst entweder durch den Transfer eines Wasserstoffatoms oder durch sukzessiven Elektronen- und Protonen-Transfer das neutrale Semiquinonradikal bildet. Durch Radikal-Rekombination könnte dann das Addukt entstehen. Zum anderen wird diskutiert, dass zunächst aus einem

reinen Elektronen-Transfer ein Paar geladener Radikale hervorgeht, das dann zu einem zweifach geladenen Addukt rekombinieren könnte. Aus einem abschließenden Protonen-Transfer würde das ungeladene Addukt resultieren. Wichtig ist, dass im Falle dieser radikalischen Intermediate der notwendige Schritt des *inter-system crossing* vom Triplett- zum Grundzustand während der Lebensdauer der Radikale erfolgen könnte.

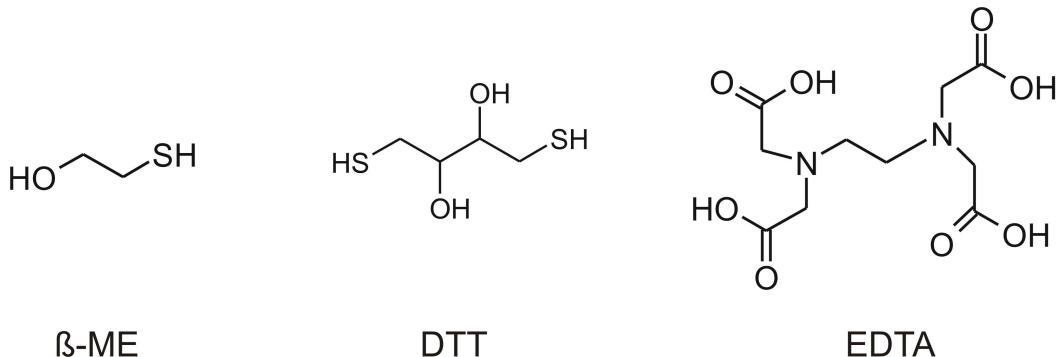
Ziel vorliegender Studie war es, einen neuerlichen Beitrag zur Aufklärung dieses Mechanismus zu liefern. Dabei sollten in Belichtungsexperimenten mit einem von uns konzipierten Modellsystem speziell die Intermediate des von uns favorisierten radikalischen Reaktionsweges isoliert und charakterisiert werden. Im folgenden abschließenden Kapitel sollen nun die Rückschlüsse diskutiert werden, die die geschilderten Experimente und ihre Analysen v.a. im Hinblick auf den besagten Mechanismus der Photoadduktbildung in LOV-Domänen zulassen.

Ausgangspunkt der Argumentation ist das Belichtungsexperiment der LOV-Domäne mit EDTA, einem in der Literatur seit langem bekannten Reduktionsmittel von Flavoproteinen [15]. In Übereinstimmung mit einem früheren Experiment von Kottke *et al.* [41] wurde dabei die Übertragung eines Elektrons sowie eines Protons auf das in den Triplett-Zustand angeregte FMN beobachtet, also die Photoreduktion der LOV-Domäne zum neutralen Semiquinonradikal. Wird dieselbe LOV-Domäne dagegen einer chemischen Reduktion durch das Agens Natrium-Dithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) unterzogen, so entsteht in einem Zwei-Elektronen-Transfer das Anion des vollständig reduzierten Hydrochinons  $\text{FMNH}^-$ . Im Einzelnen beschreiben wir die von uns beobachtete Reaktion als Zwei-Elektronen-Ein-Proton-Reaktion, in der sich an den Transfer des ersten Elektrons unmittelbar eine Protonierung und dann der Übertrag eines zweiten Elektrons anschließt [80]. Photochemische und chemische Reduktion der C57G-Mutante von LOV1 führen somit zwei unterschiedlichen Mechanismen folgend zu zwei verschiedenen Reaktionsprodukten. Was den Mechanismus der photochemischen Reduktion anbelangt, wurde bisher basierend auf einer Studie aus dem Jahr 1978 angenommen, dass zunächst freies Flavin in Lösung durch EDTA zum Hydroflavin  $\text{FMNH}_2$  durchreduziert wird, und dass dieses dann in einer Dunkelreaktion das Protein-gebundene FMN zum Semiquinonradikal  $\text{FMNH}\cdot$  reduziert [78]. In unserer aktuellen Studie aus dem Jahr 2007 zweifeln wir jedoch diese Interflavin-Redoxreaktion zwischen

freiem und Protein-gebundenem FMN als bevorzugten Elektronen-Transfer-Weg zumindest für den Fall der LOV-Domänen an. Wir halten es für wahrscheinlicher, dass in dieser Art von Flavoproteinen das EDTA-Molekül dem Protein-gebundenem Flavin nahe genug kommt, um direkt ein Elektron auf das in den Triplet-Zustand angeregte FMN übertragen zu können [80].

Im nächsten Schritt der vorliegenden Studie wurde der Donor EDTA durch aliphatische Merkaptane ersetzt, schließlich besitzt das in der Photoreaktion des Wildtyps involvierte Cystein 57 an seiner Seitenkette eine -CH<sub>2</sub>-SH-Gruppe. Bringt man diese Art von Molekülen mit der C57G-Mutante der LOV1-Domäne zur Reaktion, dann schafft man somit ein den natürlichen Verhältnissen näher kommendes Modell. Wie bereits Guo in einem zwar einfacheren, aber doch äquivalenten Experiment aus dem Jahre 2005 zeigte [81], stellt diese Klasse der aliphatischen Merkaptane grundsätzlich ausreichend starke Reduktionsmittel dar, um in ähnlicher Weise wie EDTA ein Elektron auf das <sup>3</sup>FMN übertragen zu können.

Verwendet man dabei speziell die naheliegenden, da in proteinbiochemischen Laboren oft eingesetzten Merkaptane  $\beta$ -Merkaptoethanol ( $\beta$ -ME) oder Dithiothreitol (DTT), so stellt man fest, dass diese Reagenzien beide gleichermaßen zum Kofaktor FMN weit genug vordringen können, um ein Elektron an ihn abzugeben. Man erreicht somit auch beim Übergang zu dem deutlich voluminöseren, da aus zwei  $\beta$ -ME-Einheiten aufgebauten DTT nicht, dass es aufgrund von zu großem sterischen Anspruch gänzlich aus der Bindungstasche ausgeschlossen ist, dass also kein Elektronen-Transfer mehr möglich ist. Hat man dabei die oben zitierte Publikation von Nöll *et al.* im Hinterkopf, so ist dies auch zu erwarten, da diese Autoren ja postulieren, dass auch das nochmal deutlich größere EDTA direkt ein Elektron auf den Kofaktor FMN überträgt [80]. In Abbildung 4.35 sind die Strukturformeln der einzelnen Moleküle dargestellt, um einen Vergleich ihrer jeweiligen Größen zu ermöglichen. An dieser Stelle bleibt die Frage offen, ob der Transfer eines Elektrons gänzlich unterbunden werden kann, wenn der organische Rest des Merkaptans nur groß genug gewählt wird. Betrachtet man dies jedoch im Lichte der soeben erwähnten Argumentation von Nöll *et al.* [80], dann müsste dieser Rest schon recht groß ausfallen. Dann wiederum wäre die Anwesenheit zusätzlicher polarer funktioneller Gruppen vonnöten, da anzunehmen ist, dass eine Verbindung mit der SH-Funktion als einzige partiell geladene Gruppe nicht



**Abbildung 4.35:** Strukturformeln von  $\beta$ -Merkaptoethanol ( $\beta$ -ME), Dithiothreitol (DTT) und EDTA (*ethylene-diamine-tetraacetic-acid*).

in Wasser löslich ist.

Möchte man nun in die andere Richtung des Spektrums an möglichen Merkaptanen gehen, möchte man also den organischen Rest minimieren, dann gelangt man schließlich zu Methylmerkaptan (MM), in dem lediglich eine  $\text{CH}_3$ -Gruppe an die Thiolfunktion gebunden ist. Durch Belichten der C57G-Mutante der LOV1-Domäne aus *C. reinhardtii* in Gegenwart dieses aliphatischen Merkaptans MM, konnte in vorliegender Studie erstmalig aufgezeigt werden, dass dieses sehr kleine Molekül nicht nur dazu in der Lage ist, ein Elektron an den Kofaktor FMN abzugeben, sondern dass es außerdem weit genug in die Bindungstasche der Domäne vordringt, dass es eine kovalente Bindung zum FMN ausbilden kann. Die Identifizierung dieses dem Signalzustand der wildtypischen LOV1-Domäne analogen Addukts aus FMN und MM gelang mit Hilfe der UV/Vis- sowie der CD-Spektroskopie.

In diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung von Alexandre *et al.* aus dem Jahre 2007 von großem Interesse [91], in der berichtet wird, dass die thermische Rückreaktion zum Dunkelzustand in der wildtypischen LOV2-Domäne aus *A. sativa* durch Imidazol katalysiert wird. Im ersten Schritt des von diesen Autoren postulierten ionischen Reaktionsmechanismus greift das einsame Elektronenpaar des Stickstoff-Atoms des Imidazols das Proton des Stickstoffs N(5) des FMN an und bindet es, so dass ein positiv geladenes Imidazol  $\text{ImH}_2^+$  entsteht. Dann bilden die frei gewordenen Elektronen aus der ursprünglichen N(5)-H-Bindung eine Doppelbindung zwischen N(5) und C(4a) des FMN aus, was in einem Bruch der

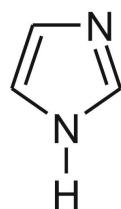
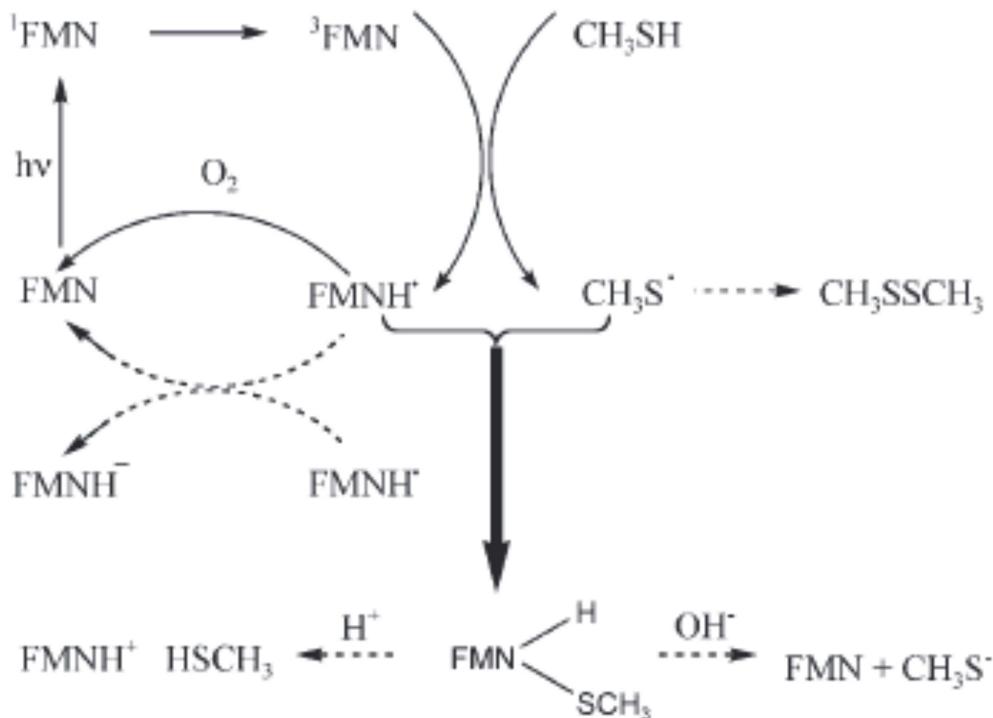


Abbildung 4.36: Strukturformel von Imidazol.

C(4a)-S-Bindung und der Ausbildung eines Thiolat-Anions resultiert. Schließlich wird dieses Cystein-Anion vom positiv geladenen Imidazol  $\text{ImH}_2^+$  protoniert, wodurch das nicht-kovalent gebundene FMN und das Imidazol regeneriert werden. Diesem Mechanismus liegt also explizit die Annahme zugrunde, dass ein Imidazol-Molekül so tief in die Bindungstasche der LOV-Domäne einzudringen vermag, dass es das N(5)-Proton des FMN abstrahieren kann. Diese Vorstellung ist allerdings nur schwerlich mit der weiter oben angestellten Vermutung zu vereinbaren, dass bereits das Molekül  $\beta$ -ME sterisch zu anspruchsvoll ist, als dass es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem C(4a)-Kohlenstoff des FMN in die Bindungstasche vordringen könnte. Die Abbildungen 4.35 und 4.36 sollen anhand der jeweiligen Strukturformeln einen Eindruck von den Größenverhältnissen dieser beiden Spezies vermitteln und auf diese Weise den Widerspruch verdeutlichen. Man könnte ins Feld führen, dass  $\beta$ -ME neben der Thiolfunktion als weitere funktionelle Gruppe die sehr polare OH-Funktion besitzt, die in Wechselwirkung mit Teilen der Protein-Domäne treten und somit ein ausreichend tiefes Eindringen verhindern könnte. Allerdings weist auch der Fünfring des Imidazols zwei Heteroatome auf, darunter die NH-Funktion, die sterisch nicht minder anspruchsvoll sein sollte. Zudem beobachtete auch Guo in einem ähnlichen, jedoch stark vereinfachten Experiment mit Etanthon (CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-SH) als externe Reagenz - die also die fragliche OH-Funktion nicht enthält - lediglich die Ausbildung eines Semiquinonradikals [81]. Abgesehen von der Frage der funktionellen Gruppen sollte eine cyclische und damit wohl eher scheibenförmige Verbindung generell ein größeres Volumen in Anspruch nehmen als ein lineares und somit gestrecktes Molekül.

Die im Einzelnen im Falle der Reagenz MM registrierten Beobachtungen können



**Abbildung 4.37:** Der Mechanismus der Photoreduktion von FMN mit MM: Gestrichelte Pfeile stellen Reaktionen außerhalb des Proteins dar, der dicke Pfeil steht für die durch die Protein-Hülle gelenkte Reaktion.

in dem in Abbildung 4.37 dargestellten Reaktionsmechanismus zusammengefasst werden. Durch Belichten mit Licht einer Wellenlänge von etwa 460 nm wird das FMN in den ersten angeregten Singulett-Zustand überführt, der durch *intersystem crossing* innerhalb von Nanosekunden in den niedrigsten Triplet-Zustand übergeht [26]. Die reaktive Triplet-Spezies <sup>3</sup>FMN abstrahiert ein Wasserstoffatom von MM ( $\text{CH}_3\text{-SH}$ ), was zu den Produkten  $\text{CH}_3\text{S}^\cdot$  und  $\text{FMNH}^\cdot$  führt. Diese Reaktion kann auch in zwei separaten Schritten ablaufen, nämlich der Sequenz aus einem Elektronen- und einem Protonen-Transfer. Innerhalb des Proteins muss das Proton nicht von der Spezies  $\text{CH}_3\text{SH}^\cdot$  herrühren, sondern kann auch von einer Aminosäure stammen. Für einen primären Elektronen-Transfer anstelle der Abstraktion eines Wasserstoffatoms spricht die Tatsache, dass eine Adduktbildung in der C57M-Mutante abläuft [41], nicht aber in der C57S-Mutante [41]. Diese unterschiedliche Reaktivität von  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  (C57S) einerseits und  $\text{S}-\text{CH}_3$

(C57M) bzw. -CH<sub>3</sub>-SH (Wildtyp) andererseits ist eben nachzuvollziehen, wenn man von einem primären Elektronen-Transfer ausgeht. Dann nämlich lässt sich die erhöhte Aktivierungsenergie für den Fall des Serins damit erklären, dass die Ionisierungsenergie des Serins viel höher ist als die des Cysteins oder des Methionins.

Die beiden Radikale CH<sub>3</sub>S· und FMNH· müssen innerhalb der Domäne nicht in unmittelbarer Nähe zueinander gebildet werden. Folglich müssen neben der Adduktbildung durch Rekombination dieser Radikale andere Reaktionen in Betracht gezogen werden. Zwei CH<sub>3</sub>S·-Radikale können rekombinieren und zum stabilen Disulfid CH<sub>3</sub>-S-S-CH<sub>3</sub> abreagieren. In Sauerstoff-haltiger Lösung wird FMNH· rasch durch molekularen Sauerstoff zum FMN zurückoxidiert. Außerhalb des Proteins können zwei FMNH·-Radikale disproportionieren zum FMN und der vollständig reduzierten Hydroquinonform, die bei pH 8.0 in der deprotonierten Form FMNH<sup>-</sup> vorliegen sollte. Eine solche Disproportionierung ist allerdings innerhalb des Proteins nicht möglich aufgrund der sterischen Zwänge, die durch die Protein-Umgebung auferlegt werden. Wenn folglich in der unmittelbaren Nähe eines FMNH·-Radikals keine CH<sub>3</sub>S·-Spezies verfügbar ist, wird sich letztere Verbindung als Nebenprodukt anhäufen. Dies wird tatsächlich entweder nach sehr langer Belichtung beobachtet, sobald aller Sauerstoff verbraucht wurde, oder sofort, wenn in Sauerstoff-freier Lösung experimentiert wird. Treffen sich dagegen die zwei Radikale CH<sub>3</sub>S· und FMNH·, so kann das Addukt gebildet werden. Diese erst durch die Protein-Umgebung ermöglichte Reaktion wird in Abbildung 4.37 durch den großen Pfeil symbolisiert. Eine Protonierung des Addukts am Schwefelatom resultiert in einem spontanen Zerfall ohne Barriere in CH<sub>3</sub>-SH und FMNH<sup>+</sup>, wie entsprechende *ab initio*-Rechnungen auf einem RHF- und DFT-B3LYP-Niveau mit einem 6-31G\*\*-Basissatz ergeben. Eine Deprotonierung des Addukts an N(5) führt solchen Berechnungen zufolge zu einer Zersetzung ohne Barriere in FMN und das Thiolat-Anion CH<sub>3</sub>-S<sup>-</sup>. Die zitierten Berechnungen wurden von Herrn Prof. Dr. B. Dick mit dem Programm GAMESS [92] durchgeführt.

Wichtig ist an dieser Stelle noch einmal zu betonen, dass die Protein-Hülle zum einen die Adduktbildung zwischen FMN und MM überhaupt erst ermöglicht, dass sie also die Reaktion in diese Richtung lenkt. Zum anderen kommt der Protein-

Umgebung die Funktion zu, das einmal gebildete Photoaddukt zu stabilisieren: Entfernt man die Domäne, zerfällt es sofort.

Was bedeuten diese Beobachtungen nun für den im Fokus dieser Arbeit stehenden Mechanismus der Photoadduktbildung in LOV-Domänen? Offensichtlich überträgt das aliphatische Merkaptan  $\text{CH}_3\text{-SH}$  bei größerer Entfernung zum Kofaktor FMN ein Elektron auf ihn unter Ausbildung des neutralen Semiquinonradikals  $\text{FMNH}\cdot$ . Ist es nahe genug am Chromophor, bildet es das bekannte Addukt mit einer echten kovalenten Bindung zwischen seinem Schwefel und dem C(4a) des FMN aus. Die entscheidende Frage an dieser Stelle lautet also: Ist das Radikal tatsächlich ein Intermediat auf dem Weg zum Addukt oder wird es vielmehr in einer unabhängigen Parallelreaktion gebildet? Gestützt auf die oben geschilderten Erkenntnisse dieser Arbeit kann man es als durchaus plausibel bezeichnen, dass der fragliche Elektronen-Transfer, da er doch schon bei weiterer Entfernung abläuft, bei größerer Nähe erst recht und noch schneller vonstatten gehen und so der Adduktbildung vorausgehen sollte. Man kann aber eben nicht ausschließen, dass bei dieser Nähe der Reaktionspartner ein anderer Mechanismus - speziell der konzertierte - noch rascher ablaufen könnte. Somit stellt die skizzierte Argumentationskette einen weiteren Hinweis, aber keinen definitiven Beweis für einen radikalischen Mechanismus dar. Damit erscheint auch für die Cystein-Adduktbildung in der wildtypischen LOV-Domäne der radikalische Reaktionspfad als sehr wahrscheinlich, er ist aber nicht bewiesen.

Eine alternative Annäherung an diese Fragestellung erlaubte der erstmalige Einsatz der in dieser Arbeit neu präparierten Doppelmutante LOV1 C57G L101C. Durch den Vergleich der Belichtung der Einfachmutante LOV1 C57G ohne externe Donoren auf der einen Seite und der Doppelmutante LOV1 C57G L101C ebenfalls ohne von außen zugesetzte Reagenz auf der anderen Seite konnte eindeutig aufgezeigt werden, dass der in der Doppelmutante neu eingeführte Cystein-Rest 101 bei Belichtung als redoxaktive Aminosäure fungiert und ein Elektron auf den Kofaktor FMN überträgt. Eine Adduktbildung analog zum Wildtyp bleibt dagegen aus, da die besagte Aminosäure dafür zu weit vom Reaktionspartner FMN entfernt ist. Dieses Experiment lässt es folglich wiederum als sehr plausibel erscheinen, dass dieser Elektronen-Transfer bei größerer Nähe - die ja im Falle des Cysteins 57 im Wildtyp gegeben ist - erst recht und noch schneller ablaufen und

so der Adduktbildung vorangehen sollte. Es liefert allerdings keine weitere oder gar definitive Aufklärung in der bereits am Ende obiger Argumentation offen gebliebenen Frage, ob bei dieser Nähe nicht ein anderer Reaktionsmechanismus noch rascher vonstatten geht. Diese Frage kann also auch am Ende vorliegender Studie nicht beantwortet werden.

Als Fazit aus den geschilderten Experimenten und Überlegungen postulieren wir somit, dass die Photoadduktbildung im Wildtyp der LOV-Domäne über denselben radikalischen Mechanismus verläuft wie in dem System LOV1 C57G/MM. Eine explizite Unterscheidung zwischen den dabei denkbaren Wegen - simultaner Übertrag eines Wasserstoffatoms bzw. sukzessiver Elektronen- und Protonen-Transfer bzw. primärer reiner Elektronen-Transfer, Rekombination der Radikale, abschließender Protonen-Transfer - ist basierend auf unseren Experimenten nicht möglich.

# Zusammenfassung

Viele Organismen benutzen Phototropine (Phot-Proteine) als Blaulicht-Photorezeptoren, um auf die Lichtverhältnisse ihrer Umgebung zu reagieren. Diese Proteine bestehen aus zwei LOV-Domänen (*light, oxygen, voltage*) und einer Serin/Threonin-Kinase-Domäne. Jede LOV-Domäne bindet nicht-kovalent ein Molekül Flavinmononukleotid (FMN) als Chromophor. Nach Absorption eines Photons ( $\lambda < 470$  nm) wird ein Signalzustand gebildet, der als kovalentes Addukt des FMN an eine Cystein-Seitenkette identifiziert wurde. Dabei tritt der Triplet-Zustand  $^3\text{FMN}$  als Intermediat auf. Dieser Übergang vom Triplet-Zustand zum Addukt ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, neben einem konzertierten und einem ionischen Reaktionsmechanismus wird insbesondere ein radikalischer Reaktionspfad diskutiert.

Zielsetzung vorliegender Arbeit war es, einen neuen Beitrag zur Aufklärung dieses Mechanismus der Photoadduktbildung in LOV-Domänen zu liefern. Zu diesem Zweck wurde als Modellsystem für den natürlichen sensorischen Apparat die C57G-Mutante der LOV1-Domäne des Phot-Proteins aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, in der aufgrund des Austausches des reaktiven Cysteins 57 gegen Glycin die natürliche Photoreaktion unterbunden ist, in Gegenwart von externen Reagenzien, die die Rolle des Cysteins 57 übernehmen sollten, belichtet. Auf diese Weise sollten speziell die Intermediate des von uns favorisierten radikalischen Mechanismus isoliert und charakterisiert werden.

Zu Beginn der Studie wurde die LOV1-Domäne unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart der externen Reagenz EDTA mit blauem Licht bestrahlt. Auf diese in der Literatur seit langem bekannte Photoreduktion eines Flavoproteins durch EDTA wurde zurückgegriffen, um zunächst Gestaltung, Durchführung und

Auswertung des die Grundlage dieser Arbeit bildenden Belichtungsexperiments zu etablieren. Das entsprechende Experiment mit einer EDTA-Konzentration von 10 mM ergab, dass die LOV1-Domäne bei einer Gesamtbelichtungsdauer von 47.6 s durch EDTA zum neutralen Semiquinonradikal reduziert wird. Der Elektronen-Donor EDTA überträgt ein Elektron auf den im Triplet-Zustand befindlichen Chromophor  $^3\text{FMN}$ , das Proton kann vom EDTA, vom Protein oder aus der wässrigen Umgebung herrühren.

Um den natürlichen Verhältnissen der LOV-Domäne näher zu kommen, wurde im zweiten Schritt das aliphatische Merkaptan  $\beta$ -Merkaptoethanol ( $\beta$ -ME) als externes Reagenz eingesetzt. Die Seitenkette des reaktiven Cysteins 57 besitzt ja eine solche aliphatische Thiolfunktion  $-\text{CH}_2\text{-SH}$ . Die Kombination C57G/ $\beta$ -ME zeigte bei einer Gesamtbelichtungszeit von 193.1 s, dass auch dieses aliphatische Merkaptan dazu in der Lage ist, die LOV1-Domäne zum neutralen Semiquinonradikal zu photoreduzieren. Analog zum EDTA, so nehmen wir an, gibt der Thiol-Schwefel des  $\beta$ -ME ein Elektron an  $^3\text{FMN}$  ab, die genaue Quelle des Protons ist nicht bekannt.

Auch bei Verwendung des aus zwei  $\beta$ -ME-Einheiten aufgebauten Dithiothreitol (DTT) als externe Reagenz wurde bei einer Belichtungszeit von 53 s die Ausbildung des neutralen Semiquinonradikals beobachtet. Der Übergang zu diesem voluminöseren Merkaptan bewirkte also nicht, dass die Spezies aus sterischen Gründen so weit von der Bindungstasche ferngehalten wird, dass sie kein Elektron mehr übertragen kann. An dieser Stelle bleibt die Frage offen, ob dieser Effekt erreicht werden kann, wenn man das Merkaptan nur groß genug wählt.

Geht man dagegen in die entgegengesetzte Richtung, minimiert man also die Größe des Merkaptans, indem man das lediglich eine  $\text{CH}_3$ -Gruppe besitzende Methylmerkaptan (MM) verwendet, so tritt sehr wohl eine Veränderung im Reaktionsgeschehen ein: MM dringt, so unsere Interpretation, weit genug zum Chromophor FMN vor, um eine kovalente Bindung seines Schwefels an den Kohlenstoff C(4a) auszubilden. Bei Zusatz von MM zu LOV1 bildet sich ein Gleichgewicht aus zwischen solchen Domänen, die ein Molekül MM in ihre Bindungstasche aufgenommen haben, und solchen, deren Bindungstasche "leer" ist. Belichtet man nun das System C57G/MM, dann reagieren die "gefüll-

ten” Domänen mit “ihrem” MM-Molekül zum Addukt, während die “leeren” Domänen durch MM aus der näheren Umgebung zum neutralen Semiquinonradikal reduziert werden. In Gegenwart von Sauerstoff ist das Radikal nicht stabil, dann ist diese Reaktion also reversibel. Daher kann bei aerober Belichtung, ausschließlich und in großer Menge Addukt gebildet werden, da ja zunächst gebildetes Radikal wieder reoxidiert werden kann, und die entsprechenden Domänen dann ihrerseits MM aufnehmen und zum Addukt abreagieren können. Bei anaerober Reaktionsführung dagegen sind einmal gebildete Radikale stabil und somit von der Adduktbildung ausgeschlossen, man erhält somit neben dem Addukt etwa in gleicher Menge das Radikal. Der Unterschied zwischen aerobem und anaerobem Experimentieren zeigt auf, dass es sich bei besagtem Gleichgewicht um ein dynamisches Gleichgewicht handelt: Es liegt also auch bei großem Überschuss nicht vollständig auf der Seite der “gefüllten” Domänen, sondern diese werden bei Verbrauch durch die Adduktbildung sukzessive nachgebildet. Die Belichtungsdauer bei den MM-Experimenten lag zwischen 20 und 90 s.

Die Identifizierung des fraglichen Photoaddukts aus FMN und MM gelang mit Hilfe der UV/Vis-Absorptions- sowie der CD-Spektroskopie. Ein massenspektrometrischer Nachweis war dagegen nicht möglich aufgrund der Instabilität des Addukts und der Aggregierungs-Neigung der LOV-Domäne. Eine Untersuchung der Langzeitstabilität des Protein-gebundenen Addukts ergab, dass das unnatürliche Addukt im Gegensatz zum Addukt des Wildtyps, das innerhalb von Minuten zerfällt, über mehrere Stunden hin stabil ist. Denaturierungs-Experimente mit dem MM-Photoaddukt deckten auf, dass das Addukt zerfällt, sobald man die schützende Protein-Hülle entfernt. Die Belichtung von freiem FMN in Gegenwart von MM offenbarte, dass das Addukt erst gar nicht gebildet wird ohne die umgebende LOV-Domäne. Dann nämlich entsteht in einer Redoxreaktion das vollständig reduzierte Hydrochinon. Der Protein-Hülle kommt somit sowohl die Aufgabe zu, die Reaktion in Richtung Addukt zu lenken als auch die Stabilität des Addukts zu gewährleisten.

Was den Mechanismus dieser Adduktbildung anbelangt, lautet ein plausibler Deutungsversuch, dass das MM, das ja offensichtlich aus größerer Entfernung ein Elektron auf den Chromophor FMN überträgt, dies erst recht und noch rascher tut, wenn es sich in der Bindungstasche in unmittelbarer Nähe des FMN befindet.

Die daraus resultierenden Radikale könnten dann zum Addukt rekombinieren. Dieser Argumentation folgend postulieren wir für den Bildungsmechanismus im Wildtyp einen analogen Verlauf über radikalische Intermediate. Dabei kann basierend auf unseren Experimenten nicht unterschieden werden zwischen den drei denkbaren Reaktionswegen: Direkter Transfer eines Wasserstoff-Atoms und Rekombination bzw. sukzessiver Elektronen- und Protonen-Transfer und Rekombination bzw. primärer Elektronen-Transfer, Rekombination und finaler Protonen-Transfer. Die geschilderten Experimente lassen einen radikalischen Reaktionsweg als wahrscheinlich erachten, beweisen ihn aber nicht definitiv. Es ist nämlich nicht auszuschließen, dass Addukt und Radikal in zwei unabhängigen Parallelreaktionen gebildet werden, dass also bei der großen Nähe von FMN und MM innerhalb der Bindungstasche ein anderer Mechanismus wie der konzertierte noch schneller abläuft.

Belichtungsexperimente mit den Systemen LOV1 C57G/Dimethylsulfid sowie LOV1 C57S/Methylmerkaptan ergaben in beiden Fällen, dass das Flavoprotein jeweils durch den externen Donor zum neutralen Semiquinonradikal reduziert wird. Das externe Reagenz kommt also in beiden Systemen nahe genug heran, um ein Elektron zu übertragen, dringt aber nicht tief genug vor, um eine kovalente Bindung zum Chromophor FMN auszubilden.

Erstmalig wurde in vorliegender Arbeit die Doppelmutante LOV1 C57G L101C eingesetzt, in der neben der schon vorgestellten Aminosäure Glycin 57 an Position 101 ein zusätzliches Cystein eingebaut ist. Dieser Proteinbaustein ist so positioniert, dass er einerseits nahe genug am FMN ist, um ein Elektron übertragen zu können, dass er aber andererseits kein Addukt bilden kann. Bei Belichtung dieser Mutante ohne externen Donor war festzustellen, dass das neu eingeführte Cystein tatsächlich als redoxaktive Aminosäure ein Elektron auf das FMN überträgt. Auch diese Reaktion kann als Hinweis auf einen radikalischen Bildungsmechanismus im System C57G/MM sowie im Wildtyp gewertet werden, da man sie in dem Sinne interpretieren kann, dass in dieser Doppelmutante die Adduktbildung auf der Stufe des Radikals „eingefroren“ wurde. Ein Elektronen-Transfer sollte ja bei der größeren Nähe des Cysteins 57 im Wildtyp erst recht und noch schneller vonstatten gehen. Allerdings liefert auch dieses Experiment keine definitive Auskunft in der Frage, ob ein alternativer Reaktionspfad bei der

großen Nähe von FMN und Cystein in der Bindungstasche nicht noch schneller abläuft.

Die für die Doppelmutanten LOV1 C57G L101C, LOV1 C57G L60C, LOV1 C32S C57G und LOV1 F41Y C57G kodierende Plasmide wurde im Rahmen vorliegender Arbeit ausgehend von dem der C57G-Mutante zugrundeliegenden Plasmid durch die Methode der ortsgerichteten Mutagenese durch Überhangverlängerung präpariert. Das Vorliegen der richtigen Nukleinsäure-Sequenzen wurde mit Hilfe einer Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon in Martinsried nachgewiesen. Zur Expression der Doppelmutanten in *E. coli* und Isolierung mittels Affinitätschromatographie wurde ein von Tina Schiereis ursprünglich für LOV1 C57G entwickeltes Protokoll angewendet. Dabei zeigt sich, dass im Falle der Mutanten LOV C57 G L101C und LOV1 C32S C57G intakte Protein-Domänen isoliert werden konnten, während bei LOV1 F41Y C57G ein Gemisch aus korrekten Domänen mit solchen Domänen festgestellt wurde, die den Chromophor FMN unspezifisch gebunden haben. Was LOV1 C57G L60C anbelangt, konnte zwar mittels SDS-PAGE das Vorliegen eines Proteins passender Größe nachgewiesen werden, aber die UV/Vis-Spektroskopie ergab keinen Hinweis auf einen richtig gebundenen Chromophor. Hinsichtlich der zuletzt genannten Mutanten bleibt die Frage offen, ob sie generell aufgrund der anvisierten Mutationen nicht korrekt exprimiert werden können oder ob man lediglich die Bedingungen optimieren müsste.

# Literaturverzeichnis

- [1] L. Stryer. *Biochemistry*. Freeman, New York (1995).
- [2] C. Fankhauser. The phytochromes, a family of red/ far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11453–11456 (2001).
- [3] A. R. Cashmore, J. A. Jarillo, Y. Wu und D. Liu. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, **284**, 760–765 (1999).
- [4] M. Gomelsky und G. Klug. BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 497–500 (2002).
- [5] E. Huala, P. W. Oeller, I. S. Liscum, E. Han, E. Larsen und W. R. Briggs. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, **278**, 2120–2123 (1997).
- [6] J.M. Christie, P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. A. Raibekas, E. Liscum und W. R. Briggs. Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, **282**, 1698–1701 (1998).
- [7] W. R. Briggs, C.F. Beck, A. R. Cashmore, J. M. Christie, J. Hughes, J. A. Jarillo, T. Kagawa, H. Kanegae, E. Liscum, A. Nagatani, K. Okada, M. Salomon, W. Rüdiger, T. Sakai, M. Takano, M. Wada und J. C. Watson. The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell*, **13**, 993–997 (2001).
- [8] J. M. Christie, M. Salomon, K. Nozue, M. Wada und W. R. Briggs. LOV (light, oxygen or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototrop-

- pin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8779–8783 (1999).
- [9] T. Kinoshita, M. Doi, N. Suetsugu, T. Kagawa, M. Wada und K.-I. Shimizaki. Phot1 and Phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, **414**, 656–660 (2001).
- [10] T. Sakai, T. Kagawa, M. Kasahara, T. E. Swartz, J. M. Christie, W. R. Briggs, M. Wada und K. Okada. Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6969–6974 (2001).
- [11] J. A. Jarillo, H. Gabrys, J. Capel, J. M. Alonso, J. R. Ecker und A. R. Cashmore. Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature*, **410**, 952–954 (2001).
- [12] W. R. Briggs und J. M. Christie. Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.*, **7**, 1360–1385 (2002).
- [13] K. Sakamoto und W. R. Briggs. Cellular and subcellular localization of Phototropin 1. *Plant Cell*, **14**, 1723–1735 (2002).
- [14] W. R. Briggs und J. L. Spudich. *Handbook of Photosensory Receptors*. VCH-Wiley, Weinheim (2005).
- [15] V. Massey und G. Palmer. On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. A new method for quantitative production of flavoprotein semiquinones. *Biochemistry*, **5**, 3181–3189 (1966).
- [16] S. Ghisla. Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins. *Biochemistry*, **13**, 589–597 (1974).
- [17] J. Bidwell, J. Thomas und J. Stuehr. Thermodynamic and kinetic study of the interactions of Ni(II) with FMN and FAD. *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 820–825 (1986).
- [18] G. Weber und F. W. J. Teale. Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions. *Trans. Faraday Soc.*, **53**, 646–655 (1957).

- [19] P. Drössler, W. Holzer, A. Penzkofer und P. Hegeman. ph dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution. *Chem. Phys.*, **282**, 429–439 (2002).
- [20] P. F. Heelis. The photophysical and photochemical properties of flavins (isoalloxazins). *Chem. Soc. Rev.*, **11**, 15–39 (1982).
- [21] S. K. Hanks und T. Hunter. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.*, **9**, 576–596 (1995).
- [22] K. Huang, T. Merkle und C. F. Beck. Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* gene that encodes a putative blue-light photoreceptor of the Phototropin family. *Physiol. Plant*, **115**, 613–622 (2002).
- [23] T. Kottke. *Spektroskopische Aufklärung des Photozyklus der LOV1-Domäne eines Phot-Blaulichtrezeptors*, *Dissertation*. Universität, Regensburg (2003).
- [24] R. Fedorov, I. Schlichting, E. Hartmann, T. Domratcheva, M. Fuhrmann und P. Hegemann. Crystal structures and molecular mechanism of a light induced signaling switch. *Biophys. J.*, **84**, 2474–2482 (2003).
- [25] J. L. Palmer, T. W. Short, S. Gallagher und W. R. Briggs. Blue light-induced phosphorylation of a plasma membrane-associated protein in *Zea mays* L. *Plant Physiol.*, **102**, 1211–1218 (1993).
- [26] T. Kottke, J. Heberle, B. Dick und P. Hegemann. Phot-LOV1: Photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys. J.*, **84**, 1192–1201 (2003).
- [27] M. Salomon, W. Eisenreich, H. Dürr, E. Schleicher, E. Knieb, V. Massey, R. Wolfhart, F. Müller, A. Bacher und G. Richter. An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12357–12361 (2001).
- [28] T. E. Swartz, S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs und R. A. Bogomolni. The photocycle of a flavin-binding domain of

- the blue light photoreceptor Phototropin. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36493–36500 (2001).
- [29] W. Holzer, A. Penzkofer, M. Fuhrmann und P. Hegemann. Spectroscopic characterization of flavin mononucleotid bound to the LOV1 domain of Phot1 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photochem. Photobiol.*, **75**, 479–487 (2002).
- [30] T. Iwata, S. Tokutomi und H. Kandori. Photoreaction of the cysteine S-H group in the LOV2 domain of *Adiantum*. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11840–11841 (2002).
- [31] K. Ataka, P. Hegemann und J. Heberle. Vibrational spectroscopy of an algal Phot1-LOV1 domain probes the molecular changes associated with blue-light reception. *Biophys. J.*, **84**, 466–474 (2003).
- [32] J. Kennis, S. Crosson, M. Gauden, I. H. van Stokkum, K. Moffat und R. van Grondelle. Primary reactions of the LOV2 domain of Phototropin, a plant blue-light photoreceptor. *Biochemistry*, **42**, 3385–3392 (2003).
- [33] S. Crosson und Moffat K. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2995–3000 (2001).
- [34] P.-S. Song. On the basicity of the excited state of flavins. *Photochem. Photobiol.*, **7**, 311–313 (1968).
- [35] S. Crosson, S. Rajagopal und K. Moffat. The LOV domain family: Photore sponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry*, **42**, 2–10 (2003).
- [36] P. F. Heelis, B. J. Parsons, G. O. Phillips und J. F. McKellar. A laser flash photolysis study of the nature of flavin mononucleotide triplet states and the reactions of the neutral form with amino acids. *Photochem. Photobiol.*, **28**, 169–173 (1978).

- [37] P. F. Heelis, B. J. Parsons, G. O. Phillips und J. F. McKellar. The photo-reduction of flavins by amino acids and EDTA. *Photochem. Photobiol.*, **30**, 343–347 (1978).
- [38] P. F. Heelis. *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes* (Müller, F., Ed.). CRC Press, Boca Raton, FL (1991).
- [39] C. W. M. Kay, E. Schleicher, A. Kuppig, H. Hofner, W. Rüdiger, M. Schleicher, M. Fischer, A. Bacher, S. Weber und G. Richter. Blue light perception in plants. Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450M mutant of Phototropin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10973–10982 (2003).
- [40] C. Neiss und P. Saalfrank. *Ab initio* quantum chemical investigation of the first steps of the photocycle of Phototropin: a model study. *Photochem. Photobiol.*, **77**, 101–109 (2003).
- [41] T. Kottke, B. Dick, R. Fedorov, I. Schlichting, R. Deutzmann und P. Hegemann. Irreversible photoreduction of flavin in a mutated Phot-LOV1 domain. *Biochemistry*, **42**, 9854–9862 (2003).
- [42] R. Bittl, C. W. M. Kay, S. Weber und P. Hegemann. Characterization of a flavin radical product in a C57M mutant of a LOV1 domain by Electron Paramagnetic Resonance. *Biochemistry*, **42**, 8506–8512 (2003).
- [43] E. Schleicher, R. M. Kowalczyk, C. W. M. Kay, P. Hegemann, A. Bacher, M. Fischer, R. Bittl, G. Richter und S. Weber. On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light receptor Phototropin. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 11067–11076 (2004).
- [44] Y. Sato, T. Iwata, S. Tokutomi und H. Kandori. Reactive cysteine is protonated in the triplet excited state of the LOV2 domain in *Adiantum* Phytochrome. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1088–1089 (2005).
- [45] T. Iwata und H. Kandori. Photochemistry in Phototropin, a blue light sensor protein in plants. *J. Chin. Chem. Soc.*, **53**, 67–73 (2006).

- [46] M. Dittrich, P. L. Freddolino und K. Schulten. When light falls in LOV: A quantum mechanical/molecular mechanical study of photoexcitation in Phot-LOV1 of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 13006–13013 (2005).
- [47] T. Domratcheva, R. Fedorov und I. Schlichting. Analysis of the primary photocycle reactions occurring in the Light, Oxygen, and Voltage blue-light receptor by multiconfigurational Quantum-Chemical Methods. *J. Chem. Theory Comput.*, **2**, 1565–1574 (2006).
- [48] K. Zikihara, T. Iwata, D. Mtsuaka, H. Kandori, T. Todo und S. Tokutomi. Photoreaction cycle of the Light, Oxygen, and Voltage Domain in FKF1 determined by low-temperature absorption spectroscopy. *Biochemistry*, **45**, 10828–10837 (2006).
- [49] K. Zenichowski, M. Gothe und P. Saalfrank. Exciting flavins: Absorption spectra and spin-orbit coupling in light-oxygen-voltage LOV domains. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **190**, 290–300 (2007).
- [50] T.A. Brown. *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, dritte Auflage (2002).
- [51] U. Kück. *Praktikum der Molekulargenetik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2005).
- [52] R. Knippers. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, achte Auflage (2001).
- [53] C. Mülhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, vierte Auflage (2003).
- [54] F. Lottspeich. *Bioanalytik*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1998).
- [55] M.K. Trower. *In Vitro Mutagenesis Protocols*. Humana Press (1996).
- [56] M. Jansohn. *Gentechnische Methoden*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, vierte Auflage (2007).

- [57] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K Pullen und L.R. Pease. Site-directed mutagenesis by overlap extension using polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51–59 (1989).
- [58] J. Sambrook und D.W. Russel. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, dritte Auflage (2001).
- [59] H.C. Birnboim und J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Research*, **7**, 1513–1523 (1979).
- [60] D. Güssow und T. Clackson. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, **17**, 4000 (1989).
- [61] H. Rehm. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, vierte Auflage (2002).
- [62] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685 (1970).
- [63] H.-J. Galla. *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1988).
- [64] H.G.O. Becker. *Einführung in die Photochemie*. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, dritte Auflage (1991).
- [65] M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh. *Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie*. Thieme, Stuttgart, New York, sechste Auflage (2002).
- [66] K. Nakanishi, N. Berova und R.W. Woody. *Circular Dichroism: principles and applications*. VCH-Wiley, Weinheim, New York (1994).
- [67] G. Snatzke. Chiroptische Methoden in der Stereochemie, Teil I. *Chemie in unserer Zeit*, **3**, 78–87 (1981).
- [68] W. Schmidt. *Optische Spektroskopie*. VCH-Miley, Weinheim, New York (1994).

- [69] G. Gramlich. *Anwendungen der Linearen Algebra mit MATLAB®*. Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München, Wien (2004).
- [70] G. Gramlich. *Lineare Algebra - Eine Einführung für Ingenieure*. Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München, Wien (2003).
- [71] G. Golub und C. VanLoan. *Matrix Computations*. John Hopkins Univ. Press, Baltimore, Maryland (1983).
- [72] E. R. Henry und J. Hofrichter. Singular Value Decomposition: Application to analysis of experimental data. *Methods Enzymol.*, **210**, 129–192 (1992).
- [73] B. Dick. *BDFA18.for, Programm zur Faktorenanalyse*. Universität Regensburg (2002).
- [74] R.-J. Kutta. *Untersuchung zur lichtinduzierten Interaktion von LOV-Domänen*, Diplomarbeit. Universität, Regensburg (2006).
- [75] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert und W. R. Briggs. Photochemical und mutational analysis of the FMN-Binding Domains oft the plant blue light receptor. *Biochemistry*, **39**, 9401–9410 (2000).
- [76] M. Kasahara, T. E. Swartz, M. A. Olney, A. Onodera, N. Mochizuki, H. Fukuzawa, E. Asamizu, S. Tabata, H. Kanegae, M. Takano, J. M. Christie, A. Nagatani und W. R. Briggs. Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the Phototropins from *Arabidopsis*, rice and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, **129**, 762–773 (2002).
- [77] S. Ghisla. Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins. *Methods Enzymol.*, **66**, 360–373 (1980).
- [78] V. Massey, M. Stankovich und P. Hemmerich. Light-mediated reduction of flavoproteins with flavins as catalysts. *Biochemistry*, **17**, 1–8 (1978).
- [79] R. Traber, H. E. A. Kramer und P. Hemmerich. Mechanism of light-induced reduction of biological redox centers by amino acids. A flash photolysis study of flavin photoreduction by EDTA and nitrilotriacetate. *Biochemistry*, **21**, 1687–1693 (1982).

- [80] G. Nöll, G. Hauska, P. Hegemann, K. Lanzl, T. Nöll, M. von Sanden-Flohe und B. Dick. Redox properties of LOV Domains: Chemical versus photochemical reduction, and influence on the photocycle. *ChemBioChem*, **8**, 2256–2264 (2007).
- [81] H. Guo. *Spectroscopic study on the photocycle of the LOV2 Domain from Chlamydomonas reinhardtii and its interaction with LOV1*, Dissertation. Universität, Regensburg (2005).
- [82] S. B. Corchnoy, T. Swartz, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs und R. A. Bogomolni. Intramolecular proton transfers and structural changes during the photocycle of the LOV2 Domain of Phototropin 1. *J. Biol. Chem.*, **278**, 724–731 (2003).
- [83] J. R. Cashman und Y. Liu. Electron-deficient isoalloxazines: Model systems for disulfide prodrug formation. *J. Med. Chem.*, **34**, 2049–2055 (1991).
- [84] S. Ball und T. C. Bruice. The chemistry of 1-Carba-1-deaza- $N^5$ -ethyl- $N^3$ -methylillumiflavins. Influence of  $N^1$  upon the reactivity of flavin 4a-hydroperoxides. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5494–5503 (1981).
- [85] W.-R. Knappe und P. Hemmerich. Covalent intermediates in flavin-sensitized photodehydrogenation and photodecarboxylation. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **11**, 2037–2057 (1984).
- [86] G. A. Eberlein und M. F. Powell. Photochemistry of flavins with sulfur-activated carboxylic acids: Identification and reactions of the photoproducts. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 3309–3317 (1984).
- [87] S.-H. Song, B. Dick und A. Penzkofer. Photo-induced reduction of flavin mononucleotide in aqueous solutions. *Chem. Phys.*, **332**, 55–65 (2007).
- [88] S. L. Murov, I. Carmichael und G. L. Hug. *Handbook of Photochemistry*, second ed.. Dekker, New York (1993).
- [89] C. L. Partch und A. Sancar. Photochemistry and photobiology of cryptochromes blue-light photopigments: The search for a photocycle. *Photochem. Photobiol.*, **81**, 1291–1304 (2005).

- [90] S.-H. Song, B. Dick, A. Penzkofer und P. Hegemann. Photo-reduction of flavin mononucleotide to semiquinone form in LOV domain mutants of blue-light receptor phot from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Photochem. Photobiol. B*, **87**, 37–48 (2007).
- [91] M. T. A. Alexandre, J. C. Arents, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf und J. T. M. Kennis. A base-catalyzed mechanism for dark state recovery in the *Avena sativa* Phototropin LOV2 Domain. *Biochemistry*, **46**, 3129–3137 (2007).
- [92] A. A. Granovsky. *PC GAMESS version 7.0*. <http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html>.

## Anhang A Abkürzungen und Trivialnamen

AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. capillus-veneris</i>	<i>Adiantum capillus-veneris</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. sativa</i>	<i>Avenis sativa</i>
a. u.	willkürliche Einheiten ( <i>arbitrary units</i> )
BLUF	Blue light sensing using FAD
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CD-Spektroskopie	Circulardichroismus-Spektroskopie
cDNA	complimentary Desoxyribonucleic acid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ENDOR	Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavinadenindinukleotid
FKF1	Flavin-binding, Kelch repeat, F-box protein
FMN	Flavinmononukleotid
<i>HindIII</i>	<i>Haemophilus influenzae R<sub>d</sub></i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatographie</i>
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ISC	<i>Intersystem crossing</i>
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LED	<i>Light emitting diode</i>
LOV	Light, Oxygen or Voltage
MBP	Maltosebindeprotein
NTA	Nitrilotriacid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrulamid-Gelektrophorese
PAS	PER/ARNT/SIM-Proteine

Phot1	Phototropin 1
Phot2	Phototropin 2
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB	Super optimal broth
SOC	= SOB + Glucose
SVD	Singular value decomposition
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
UV-A	Ultraviolett-A
wt	Wildtyp

## Anhang B Symbole

$D_{ij}$	Matrixelemente
R	Organischer Rest
S	Singulettzustand
T	Tripletzustand
V	Volumen
$a, b, c$	Primer
<b>a, b, c</b>	Vektoren
<b>A, B, C</b>	Matrizen
b	Breite
c	Konzentration
h	Plancksches Wirkungsquantum
h	Höhe
t	Tiefe
t	Zeit
$\Theta$	molare Elliptizität
$\lambda$	Wellenlänge
$\nu$	Frequenz
$\sigma$	Standardabweichung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2005 bis März 2009 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Dick am Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg.

## **ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Alle aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, Juli 2009

---

# **Danke!!!**

Und zum Schluss möchte ich nicht versäumen, mich bei all jenen zu bedanken, die mich in irgendeiner Weise unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Bernhard Dick für die Bereitstellung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung, die uneingeschränkte Unterstützung und die große Mithilfe bei der Auswertung der Daten.

Frau Prof. Dr. Claudia Steinem danke ich dafür, dass sie den langen und beschwerlichen Weg von Göttingen nach Regensburg auf sich nimmt, um meinen Zweitprüfer zu machen.

Besonders danke ich Herrn Dr. Gilbert Nöll und Frau Dr. Tanja Nöll dafür, dass sie mich v. a. in der Anfangsphase meiner Arbeit durch ihre große Erfahrung fachlich und moralisch unterstützt haben.

Norbert Eichner vom Lehrstuhl Prof. Dr. Sumper danke ich ganz herzlich dafür, dass er mich in die mir bis dahin unbekannte Welt der Bakterien und Plasmide eingeführt hat, dass er mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und für all meine Probleme eine Lösung parat hatte. Auch Gerhard Lehmann vom Lehrstuhl Prof. Dr. Sumper möchte ich an dieser Stelle für seine guten Ideen danken.

Edi Hochmuth aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Deutzmann gilt mein großer Dank dafür, dass er mit viel Ausdauer, Engagement und Geduld versucht hat, brauchbare Massenspektren von “meinem” Protein aufzunehmen.

Nicht vergessen darf ich auch Tina Schiereis vom Lehrstuhl Prof. Dr. med. Tamm, die immer ein offenes Ohr für meine biologischen Fragen und Probleme hatte. Danke!

Auch Tilo Mathes vom Lehrstuhl Prof. Dr. Hegemann der HU Berlin durfte ich einige Male beim Präparieren von Proteinen über die Schulter schauen. Danke!

Bei allen Mitgliedern des Lehrstuhls Prof. Dr. Dick - Anja Stromeck-Faderl, Andy Schmaunz, Andy Wenge, Roger-Jan Kutta, Dominik Pentlehner, Dr. Thomas Langenbacher, Dr. Uwe Kensy, PD Dr. Alkwin Slenczka, PD Dr. Stephan Bäurle, Frau G. Alder, Frau U. Berg, Frau M. Müller, Frau B. Höing, Frau M. von Sanden-Flohe, Herrn K. Ziereis - möchte ich mich für das sehr angenehme Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs *sensory photoreceptors in natural and artificial systems*.

Ein besonders herzlicher Dank geht natürlich an meine Eltern, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte. Ich darf aber auch meinen großen Bruder Thomas nicht vergessen, der mich in einer Phase der Orientierungslosigkeit auf die Idee gebracht hat, es mal mit der Chemie zu probieren.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Christian bedanken, der in den letzten Jahren nicht nur viel Geduld bewiesen hat. Danke! Außerdem hat er als mein persönlicher TEX-Berater zum ansprechenden Layout meiner Arbeit beigetragen!