

Spektroskopische Charakterisierung von Blaulicht-induzierbaren Photorezeptoren

-

Perzeption und Nutzbarmachung von blauem Licht und UV-Strahlung

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

M.Sc. Julian Simon

aus Lüdinghausen / Nordrhein-Westfalen

Krefeld, März 2016

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2012 bis Februar 2016 am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim an der Ruhr unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Gärtner angefertigt.

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Koreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2016

*"If you're not failing every now and again,
it's a sign you're not doing anything very innovative."*

Woody Allen

Danksagungen

Zunächst einen herzlichen Dank an Prof. Dr. Wolfgang Gärtner für die wiederholte Gelegenheit, neben Bachelor- und Masterarbeit auch diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Darüber hinaus danke ich für seine konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen sowie die kritische Lektüre dieser Arbeit.

Diesbezüglich möchte ich meinen Dank auch an Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für seine Bereitschaft richten, Zweitkorrektor dieser Arbeit zu sein.

Ganz besonderen Dank an Dra. Virginia Helena Albarracín, für eine wunderbare Zusammenarbeit sowohl in den praktischen als auch in den theoretischen Phasen der Arbeit. Darüber hinaus auch für Hilfestellungen und Einführungen in administrative Herausforderungen des wissenschaftlichen Alltags.

Wieder in diesem Gemeinschaftslabor arbeiten zu können, war in vielerlei Hinsicht eine große Bereicherung. Deshalb auch einen Herzlichen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen, die mir stets mit Unterstützung und Hilfestellung zur Seite standen. Dieser Zusammenhalt in der Arbeitsgruppe ermöglichte fruchtbares Arbeiten und gute Ergebnisse. Ein besonderer Dank geht in diesem Zusammenhang an Dr. Kun Tang und Dr. Xiuling Xu, von denen ich viel hinzulernen konnte und die mir darüber hinaus eine vollkommen neue Herangehensweise an die praktischen Arbeiten ermöglichten und so das eigene Hinterfragen bestehender Abläufe und Protokolle möglich und erfolgreich machten.

非常感谢您的帮助！

Außerdem einen herzlichen Dank an alle Kolleginnen und Kollegen, die ich während meines zweimonatigen Argentinienaufenthaltes kennengelernt und von denen ich viel Unterstützung erfahren habe. Zunächst herzlichen Dank an Dra. María Eugenia Farías und Prof. Dr. Claudio D. Borsarelli für die Möglichkeit, in ihren Laboratorien arbeiten zu können. Darüber hinaus ein großes Dankeschön an Luciano Portero und Dra. Lorena Valle für die Hilfestellungen im Labor und auch im alltäglichen Bereich und nicht zuletzt auch für die Unternehmungen außerhalb der Arbeitszeiten.

Muchas gracias por la ayuda a la Argentina!

Ein Dank geht auch an die Max-Planck-Gesellschaft für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

Zu guter Letzt noch einen großen Dank an die Personen, die mir am Herzen liegen, meine Familie und Freunde. Für die moralische und auch materielle Unterstützung über die gesamte Zeit meiner Promotion, meines Studiums und auch für die Zeiten, die ihnen voranging.

Publikationsliste

Simon, J., A. Losi, K.-H. Zhao and W. Gärtner (2016, submitted) FRET in a Synthetic Flavin- and Bilin-binding Protein.

Albarracin, V. H., **J. Simon**, G. P. Pathak, L. Valle, T. Douki, J. Cadet, C. D. Borsarelli, M. E. Farias and W. Gärtner (2014) First characterisation of a CPD-class I photolyase from a UV-resistant extremophile isolated from High-Altitude Andean Lakes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 13, 739-750.

Mansurova, M., **J. Simon**, S. Salzmann, C. M. Marian and W. Gärtner (2013) Spectroscopic and Theoretical Study on Electronically Modified Chromophores in LOV Domains: 8-Bromo- and 8-Trifluoromethyl-Substituted Flavins. *ChemBioChem* 14, 645-654.

Mansurova, M., P. Scheercousse, **J. Simon**, M. Kluth and W. Gärtner (2011) Chromophore Exchange in the Blue Light-Sensitive Photoreceptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *ChemBioChem* 12, 641-646.

Abkürzungen

In der folgenden Liste sind alle wiederholt verwendeten Abkürzungen mit Ausnahme von gebräuchlichen SI Einheiten aufgeführt. Für DNA Basen und Aminosäuren wurden die standardisierten Ein- bzw. Dreibuchstabenabkürzungen verwendet (siehe hierzu Abschnitt 8).

AM	Luftmasse (air mass)
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
BLUF	sensor of blue-light using FAD domain
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)
ch	Kanal (channel)
Cmp	Chloramphenicol
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
Cry	Cryptochrom
Cry-DASH	Cry Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis, Human
CryPro	Cryptochrom aus Proteobakterien
C-terminal	Carboxy-terminal
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure, DNS)
DR	Dunkelreparation (darkrepair)
EcPHR	<i>E. coli</i> CPD-Photolyase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FPALM	fluorescence photoactivation localization microscopy
GAF	cGMP phosphodiesterase, adenylyl cyclase and FhIA Protein
HAAL	High Altitude Andean Lakes
HPLC	high performance liquid chromatography
HTH	helix- turn- helix DNA-binding domain
IEX	Ion Exchange Chromatography (Ionen Austausch Chromatographie)

IMAC	Immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IRF	Interner Responsefaktor
Kan	Kanamycin
LOV	light, oxygen, voltage (Domäne)
LOV390	LOV belichteter Signalzustand
LOV447	LOV Dunkelzustand
LOV660	LOV angeregter Triplettzustand
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MTHF	(6R,S)-5,10-Methenyl-5,6,7,8-tetrahydrofolylpolyglutamat
nph1	non-phototropic hypocotyls
npl1	non-phototropic hypocotyl like 1
N-terminal	Amino-terminal
ORF	open reading frame
PAC	photoactivated adenyl cyclase
PAS	per, arndt, sim Domäne
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEB	Phycoerythrobilin
PL	Photolyase
phot	phototropin
PR	Photoreparation (photorepair)
RF	Riboflavin
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RsCryB	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> Cryptochrom B
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEC	size exclusion chromatography (Größen-Ausschlusschromatographie)
T<>T	Thymidindimer
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEAA	Triethylammonium Acetat
Tc	Tetracyclin
tridest.	tridestilliert

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UVR-8	UV resistance locus 8
Ver3	<i>Acinetobacter</i> Bakterium isoliert aus Lake Verde 3 (Herkunftssee)
VIS	visible light (sichtbares Licht)
wt-YtvA	YtvA Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Spektrum der Sonnenstrahlung in verschiedenen Höhen der Atmosphäre [1].
AM: Luftmasse (engl.: „air mass“)..... 6
- Abb. 2: Jablonski Termschema für Moleküle nach Lichtanregung zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Rückkehrreaktionen in den energetischen Grundzustand. A: Absorption, F: Fluoreszenz, S_1 : S_1 Zustand des Moleküls, IC: interne Konversion, VR: vibronische Relaxation, ISC: Intersystem Crossing, T_1 : Triplettzustand, P: Phosphoreszenz [5]..... 7
- Abb. 3: Molekülstruktur von Chlorophyll a, b und c mit den entsprechenden Resten für X und Y [6]. 9
- Abb. 4: Molekülstruktur von Flavinmononukleotid (FMN, oben links), Phycocyanobilin [7] (PCB, oben rechts) und all-trans-Retinal (unten)..... 9
- Abb. 5: Molekülstruktur von PCB in Phytochrom mit kovalenter Bindung über C528. Die photochemische Reaktion (Isomerisierung zwischen dem C- und dem D-Ring) ist durch einen Pfeil dargestellt. 11
- Abb. 6: Absorptionsspektren der Zustände Pr (rot) und Pg (grün) der Slr1393 GAF3 Domäne inklusive der zugehörigen Fluoreszenzen des Pr (dunkelrot) und des Pg Zustandes (blau). Die Emissionsmaxima der Fluoreszenzspektren wurden bezüglich des Maximums der rotabsorbierenden Form normiert. Em: Emission 12
- Abb. 7: Kristallstruktur der 1393GAF3 Domäne im P_r Zustand mit PCB als Chromophor (unpublizierte Struktur aus der Arbeitsgruppe). 12
- Abb. 8: Wasserstoffbrücken zwischen den Homodimer-Untereinheiten von UVR8 [30]. Untereinheiten: grün und grau, saure Aminosäuren: rot, basische Aminosäuren: blau, Wasserstoffbrückenbindungen: gestrichelt schwarz. 14
- Abb. 9: Kristallstruktur eines Monomers des UV-B Photorezeptors UVR8 [17]. a) Seitenansicht mit und die sechs im Inneren angeordneten (blau) und die sieben Oberflächentryptophane (rot). b) entspricht (a), aber in Aufsicht, die Dimer-Interaktionsfläche betrachtend. c) Aufsicht auf den Proteinkern mit den inneren Tryptophanen. d) Aufsicht auf den Proteinkern mit hervorgehobener Interaktionsfläche und den dortigen Oberflächen-Tryptophanen (rot) und der dort lokalisierten Tryptophantriade (violett)..... 15

Abb. 10: Vergleich der Absorptionsspektren von freiem FMN (rot) und seiner in das Protein-eingebetteten Form (Dunkelzustand der LOV Domäne von YtvA) (blau).	16
Abb. 11: Schematische Darstellung des Photozyklus einer LOV Domäne. Das nicht-kovalent gebundene Flavin (LOV ₄₄₇) bildet durch Blaulicht-Anregung ein Triplett-Intermediat (LOV ₆₆₀), welches anschließend binnen Mikrosekunden in das Photoprodukt übergeht, in dem der Chromophor über eine C-S Bindung zu dem benachbarten Cystein kovalent gebunden vorliegt. Dieses Photoprodukt (LOV ₃₉₀) kehrt anschließend durch thermische Prozesse in den nicht-kovalent gebundenen Dunkelzustand zurück. Die Zeitspanne der thermischen Rückkehr kann sich je nach Protein von wenigen bis zu Stunden oder Tagen erstrecken.	17
Abb. 12: Kristallstruktur der LOV Domäne des Blaulichtrezeptors <i>YtvA</i> aus <i>Bacillus subtilis</i> mit seinem nicht-kovalent gebundenen FMN Cofaktor (PDB ID: 2PR5, Dunkelform und 2PR6, Photoprodukt. Letztere nicht dargestellt.) [46].....	18
Abb. 13: Flavinbindedomäne des Blaulichtrezeptors <i>YtvA</i> im Dunkelzustand inklusive Darstellung der zu mutierenden Aminosäuren F46 (magenta) und V28 (schwarz) [46].	19
Abb. 14: Wasserstoffbindungsnetzwerk in im dunklen (A) und belichteten Zustand (B) am Beispiel der Kristallstruktur der BLUF Domäne aus <i>Synechocystis</i> Slr1694 [71, 72]. Im unteren Bildteil ist die Struktur des Isoalloxazins dargestellt, welches die gemeinsame Kernstruktur der Flavine ist.	21
Abb. 15: Vergleich der beiden postulierten Funktionsmodelle der <i>RsAppA</i> BLUF Domäne durch Anderson und Kennis <i>et al.</i> (links) [76] bzw. Jung und Domratcheva <i>et al.</i> (rechts).	22
Abb. 16: BLUF Photozyklus entsprechend dem Postulat von Kennis und Anderson <i>et al.</i> [76]. Die kurzzeitige Rotation des Gln50 wird in Schritt C durch einen entsprechenden Kreispeil dargestellt.....	23
Abb. 17: Phylogenetischer Baum der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie [92] ...	25
Abb. 18: Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der verschiedenen Redoxzuständen von FAD [100].....	26
Abb. 19: Molekularstruktur der am häufigsten vorkommenden UV-induzierten DNA Photoprodukte: Cyclobutanpyrimidin-Dimer (T<>T, Mitte) aus zwei benachbarten Thymidinen (links) und Pyrimidin-Pyrimidin (6-4) Photoprodukt (T[6-4]T, rechts), hier dargestellt an Hand zweier benachbarten Thyminbasen. Diese Schäden	

können allerdings auch zwischen allen anderen Pyrimidinen wie T-T, T-C, C-T und C-C entstehen. Einzige Ausnahme ist hier das (6-4) Photoprodukt, welches nicht bei der Kombination C-T entstehen kann [114].	28
Abb. 20: Kristallstruktur einer CDP- (A) und 6-4 Photolyase (C) jeweils mit gebundenem, UV-geschädigtem Substrat. (B) und (D) zeigen im Detail die jeweiligen Positionen des FAD Moleküls bezüglich der Läsion mit ausgewählten funktionell als essentiell charakterisierten Aminosäuren [122].	30
Abb. 21: Reaktionszyklus der Photoreparatur eines Cyclobutanpyrimidin Dimers durch eine CPD Photolyase [124].	31
Abb. 22: Reaktionszyklus der Photoreparatur eines (6-4) Photoprodukts durch eine 6-4 Photolyase [126].	32
Abb. 23: Photozyklus von Bacteriorhodopsin [132].	34
Abb. 24: Modell für die Regulation des bop Genclusters [139].	35
Abb. 25: Homologiemodell der BatLOV Domäne mit eingebundenem FAD basierend auf der Sequenzähnlichkeit zu YtvA [147].	37
Abb. 26: Vereinfachtes Jablonski Termschema zur graphischen Einordnung des Förster Resonanzenergietransfers in die photoinduzierten Übergänge angeregter Systeme. Dargestellt werden hier die Absorption des Donors (blau), sowie die Fluoreszenz des Akzeptors (grün). Die nur in geringerem Maße stattfindende Fluoreszenz des Akzeptors (links, abwärts) sowie die Absorption des Donors (rechts, aufwärts) sind durch gestrichelte Pfeile dargestellt.	38
Abb. 27: Spektrale Überlappung eines Donor-Akzeptor Paares als Grundlage für FRET. Der Überlappungsbereich ist hier in grau dargestellt.	39
Abb. 28: Proteingrößenstandard SeeBlue Plus2 von Invitrogen für verschiedene Puffersysteme.	56
Abb. 29: Chromatogramm mit FAD Standard	60
Abb. 30: Chromatogramm mit MTHF Standard	60
Abb. 31: Graphische Darstellung des BLAST der Ver3Phr.	64
Abb. 32: Graphische Darstellung des BLAST der Ver3PL2.	64
Abb. 33: Strukturmodell von Ver3Phr unter Verwendung der EcPhr (PDB ID: 1dnp) als Vorlage. Die für CPD Klasse 1 Photolyasen typische Tryptophantriade ist oben links in blau dargestellt, die Kofaktoren FAD in türkis und MTHF in violett.	65

Abb. 34: Strukturmodell von Ver3PL2 mit <i>RsCryB</i> (PDB-ID: 3ZXS) als Vorlage. Der FAD Cofaktor ist in violett, das 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in türkis und der vermutete FeS-Cluster in gelb/orange (eingekreist).	66
Abb. 35: Ausschnitt der Absorptionsspektren des unbelichteten Zustandes von Ver3Phr (rot) und EcPhr (blau) mit 1 mM DTT; Inset: Gesamtspektrum.	67
Abb. 36: Belichtungskinetik (470 nm) von Ver3Phr in den angegebenen Intervallen; Inset: Gesamtspektrum	68
Abb. 37: Ausschnitt (300 – 500 nm) der Belichtungskinetik (365 nm) von Ver3Phr in den angegebenen Intervallen; Inset: Gesamtspektrum.	69
Abb. 38: Normierte Fluoreszenzspektren von Ver3Phr (rot), EcPhr (blau) und FAD in Lösung (gelb). Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) sind in durchgezogenen Linien angegeben, die Anregungsspektren ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) in gleichen Farben mit gestrichelten Linien.....	70
Abb. 39: Normierte Emissionsspektren von Ver3Phr (rot), EcPhr (gelb) und MTHF in Lösung (grün); $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$	70
Abb. 40: Emissionsspektrum (rot) ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) und Anregungsspektrum (blau) ($\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$) von Ver3Phr.....	71
Abb. 41: HPLC Chromatogramm der denaturierten Ver3Phr. FAD wurde bei einer Laufzeit von 4,9 min detektiert, Riboflavin (RF) bei 6,9 min.	72
Abb. 42: HPLC Chromatogramm der denaturierten EcPhr. FAD wurde bei einer Laufzeit von 4,9 min detektiert.....	72
Abb. 43: Verdünnungsreihe von $10^{-1} - 10^{-5}$ (von links nach rechts) des Kontrollstamms KY1056 nach 0 min (T_0 , Reihe eins und zwei) und 5 min UV-Bestrahlung (T_5 , Reihe drei und vier) unter Lichtausschluss.....	73
Abb. 44: Verdünnungsreihe von $10^{-1} - 10^{-5}$ (von links nach rechts) des Kontrollstamms KY1056 nach 5 min UV Bestrahlung und 120 min Photoreparatur unter Weißlicht (PR, oberen beiden Reihen), bzw. nur mit Dunkelreparatur (DR, unten)	74
Abb. 45: Qualitative Bestimmung des relativen Wachstums des Stammes KY1056 (links) und des Stammes KY1225 (rechts) nach den angegebenen Behandlungsschritten.....	74
Abb. 46: Qualitative Bestimmung des relativen Wachstums des Stammes KY1225 pREP4 pQE60Ver3Phr nach den angegebenen Behandlungsschritten.....	75

Abb. 47: Qualitative Bestimmung des relativen Wachstums des Stammes KY1225 pREP4 pQE60EcPhr nach den angegebenen Behandlungsschritten.	76
Abb. 48: Relative Überlebensrate nach ausschließlich 5 Minuten UVB Bestrahlung (UV ₅), und mit anschließenden 120 Minuten Belichtung mit weißem Licht und damit der Möglichkeit der Photoreparatur (PR) sowie abgedunkelter Vergleichsproben (DR).	77
Abb. 49: Anzahl der CPD Photoprodukte in den Photolyase exprimierenden Stämmen (Ver3Phr und EcPhr), im Vergleich mit den untransformierten Kontrollstämmen KY1225 (phr ⁻) und KY1056 (phr ⁺) nach 5 min UVB Bestrahlung (UV ₅). Die Anzahl der Läsionen wird pro 10 ⁶ Basen der extrahierten DNA angegeben.	78
Abb. 50: Relative Anzahl der verbleibenden Läsionen nach Photoreparatur (PR) und Dunkelreparatur (DR) in den jeweiligen transformierten Stämmen und Kontrollstämmen im Vergleich mit UV ₅	79
Abb. 51: Aufschlüsselung der in Abb. 50 dargestellten Photoreparatur (PR) nach Art der CPDs für Ver3Phr und EcPhr.	80
Abb. 52: Aufschlüsselung der in Abb. 50 dargestellten Dunkelreparatur (DR) nach Art der CPDs für Ver3Phr und EcPhr.	80
Abb. 53: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 470 nm in den angegebenen Intervallen ohne DTT. Die Spektren nach 5, 15, 30 und 60 min sind um einer besseren Übersichtlichkeit willen und aufgrund der geringeren Änderungen nicht aufgeführt; Inset: Differenzspektrum.	81
Abb. 54: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 470 nm in den angegebenen Intervallen und unter Zusatz von 50 mM DTT.	82
Abb. 55: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 470 nm in den angegebenen Intervallen und unter Zusatz von 150 mM DTT.	82
Abb. 56: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 365 nm in den angegebenen Intervallen ohne DTT.	83
Abb. 57: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 365 nm in den angegebenen Intervallen und unter Zusatz von 50 mM DTT.	83
Abb. 58: Absorptionsspektren von Ver3PL2 bei verschiedenen DTT-Konzentrationen.	84
Abb. 59: Normierte Fluoreszenzspektren von Ver3PL2. Das Emissionsspektrum ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$) von Ver3PL2 (rot) ist vergleichend mit dem Emissionsspektrum	

von FAD in Lösung (gelb) bei der gleichen Anregungswellenlänge dargestellt. Das Anregungsspektrum von Ver3PL2 ($\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) ist in blau dargestellt. ...	85
Abb. 60: Vergleich der Läsionen nach 5 Minuten UVB Bestrahlung der entsprechenden Stämme.	87
Abb. 61: Vergleich der überlebenden Zellen nach 5 Minuten UVB Behandlung (jeweils die oberen zwei Reihen) mit 120 Minuten im Dunkeln (jeweils die unteren beiden Reihen), von Ver3Phr-transferierten <i>E. coli</i> Zellen (links) und dem <i>Acinetobacter</i> sp- Ver3 Wildtyp (rechts).	88
Abb. 62: Aminosäuresequenz des synthetisch hergestellten LOV-GAF_C62S Fusionsproteins. Die Mutation C62S ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die LOV-Domäne (gelb) wird durch einen flexiblen Linker in random coil Struktur (grau) mit der GAF3 Domäne (türkis) verbunden.	90
Abb. 63: Graphische Darstellung der BLAST Analyse des LOV-GAF Fusionsprotein.	91
Abb. 64: Größenausschlussdiagramm des Fusionsproteins.....	91
Abb. 65: Absorptionsspektrum des LOV-GAF Fusionsproteins; gezeigt ist für die LOV Domäne der Dunkelzustand und für die GAF3 Domäne die Pr Form.....	92
Abb. 66: Belichtungskinetik des Fusionsproteins ($\lambda = 670 \text{ nm}$) für die Umwandlung der rot- in die grün-absorbierende Form. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Messungen beträgt jeweils 1 Sekunde.....	93
Abb. 67: Differenzspektren zu der in Abb. 66 dargestellten Belichtungskinetik.	94
Abb. 68: Belichtungskinetik des Fusionsproteins durch Bestrahlung mit ($\lambda = 530 \text{ nm}$) für die Umwandlung des Pg- in den Pr Zustand. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Messungen beträgt 1 Sekunde. Die absoluten Spektren werden links dargestellt, die Differenzspektren rechts.	94
Abb. 69: Emissionsspektren der einzelnen nativen Domänen. Links die LOV Domäne (rot) mit $\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$ und rechts die GAF3 Domäne in der rot-absorbierenden Form (blau) mit $\lambda_{ex} = 550 \text{ nm}$	95
Abb. 70: Emissionsspektren der isolierten GAF3 Domäne im Pr Zustand bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 375 nm bis 540 nm.....	96
Abb. 71: Emissionsspektren der isolierten GAF3 Domäne im Pg Zustand bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 375 nm bis 540 nm.....	97
Abb. 72: Emissionsspektren des Fusionsproteins bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 470 nm bis 480 nm.	98

Abb. 73: Emissionsspektren des Fusionsproteins bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 515 nm bis 560 nm.	98
Abb. 74: Emissionsspektren des Fusionsproteins ohne PCB (gelb) und mit in vivo assembliertem PCB (grün) inklusive Ausschnittsvergrößerung oben rechts. Beide wurden mit $\lambda_{ex} = 450$ nm angeregt.	99
Abb. 75: Vergleich der Fluoreszenz Emissionsspektren des Fusionsproteins von in vivo assembliertem PCB (grün) und der nativen GAF3 Domäne (blau), jeweils bei 450 nm angeregt. Vorausgehend wurde die Absorption bei 650 nm angeglichen, um eine identische Konzentration zu erhalten.	100
Abb. 76: Absorption der nativen LOV Domäne (blau) sowie der nativen GAF3 Domäne (rot). Die Emission des Fusionsprotein ($\lambda_{ex} = 450$ nm, gelb), normiert auf die Absorption der GAF Domäne, weist mit der Absorption eine Schnittfläche auf (orange), welche für den Resonanz Energietransfer essentiell ist.	101
Abb. 77: Fluoreszenzemissionsspektrum der LOV Domäne (gelb) sowie das Absorptionsspektrum der GAF Domäne in der Pg Form. Hellgelb hinterlegt ist die kongruente Fläche der beiden Spektren, welche für den Resonanz-Energietransfer essentiell ist.	102
Abb. 78: Überlagerung der nativen LOV Domäne (blau, 2pr5) mit der PAS Domäne aus Cph1 (weiß, 2vea). Die GAF Domäne aus Cph1 wird in violett dargestellt. Im rechten Bildteil sind die Chromophore FMN (links) und PCB (rechts) mit den jeweiligen Entfernungen in Ångström angegeben.	103
Abb. 79: Fluoreszenz Lebenszeitspektren von PCB-beladenem in vivo im Pr Zustand (rot), im Pg Zustand (grün) sowie des Fusionsproteins ohne Bilin (gelb).	104
Abb. 80: Graphische Darstellung der in Tab. 5 aufgeführten Mittelwerte.	Fehler!
Textmarke nicht definiert.	
Abb. 81: Graphische Darstellung der in Tab. 7 aufgeführten Mittelwerte.	105
Abb. 82: Absorptionsspektrum des Fusionsproteins mit in vivo assembliertem PEB.	106
Abb. 83: Vergleich der normierten Fluoreszenzemissionsspektren des Fusionsproteins ohne Bilinchromophor (gelb) mit in vivo assembliertem PEB (rot) und der separat vermessenen, nativen GAF3 Domäne mit in vivo assembliertem PEB (grün). $\lambda_{ex} = 360$ nm	107
Abb. 84: Vergleich der Emissionsintegrale der separat vermessenen, nativen GAF Domäne (blau) und des mit PCB in vivo assemblierten Fusionsproteins (grün)	

bei verschiedenen Anregungswellenlängen. In rot dargestellt, die Absorption der GAF3 Domäne bei den jeweiligen Wellenlängen.	111
Abb. 85: Vergleich der berechneten Entfernung der Chromophore (blau) und der Energietransfer-Effizienzen (rot) bei verschiedenen Anregungswellenlängen.	111
Abb. 86: Flavinbindedomäne des Blaulichtrezeptors YtvA im Dunkelzustand inklusive Darstellung der zu mutierenden Aminosäuren F46 (magenta) und V28 (schwarz).....	112
Abb. 87: Belichtungskinetik der Mutante F46A (470 nm) in den angegebenen Intervallen. Inset: Rückkehrkinetik bei einer beobachteten Messwellenlänge von 450 nm (oben rechts).	113
Abb. 88: Belichtungskinetik der Mutante F46Y (470 nm) in den angegebenen Intervallen. Inset: Rückkehrkinetik bei einer beobachteten Messwellenlänge von 450 nm (oben rechts).	114
Abb. 89: Belichtungskinetik der Mutante V28L mit 470 nm in den angegebenen Intervallen. Rückkehrkinetik mit einer beobachteten Messwellenlänge von 450 nm (oben rechts).	114
Abb. 90: Belichtungskinetik der Mutante V28I mit 470 nm in den angegebenen Intervallen.....	115
Abb. 91: Vergleich der Differenzspektren der Mutanten F46A, F46Y, V28L mit dem entsprechenden Differenzspektrum des Wildtyps.	116
Abb. 92: Fluoreszenzspektren der Mutante F46A. Dargestellt sind die Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) für den Dunkelzustand (rot) sowie das Anregungsspektrum (grün); $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$	117
Abb. 93: Fluoreszenzspektren der Mutante F46Y. Dargestellt sind die Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) für den Dunkelzustand (rot) sowie das Anregungsspektrum (grün); $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$	118
Abb. 94: Fluoreszenzspektren der Mutante V28I. Dargestellt ist das Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, blau) sowie das Anregungsspektrum mit einer Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, grün).	118
Abb. 95: Fluoreszenzspektren der Mutante V28L. Dargestellt sind die Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) für den Dunkelzustand (rot) sowie das Anregungsspektrum (grün); $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$	119
Abb. 96: Belichtungskinetik von NpBatLOV; Inset: Differenzspektren.	123

Abb. 97: Kinetik der thermischen Rückkehr von NpBatLOV aus dem belichteten Zustand in den Ausgangszustand.	124
Abb. 98: Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm, orange) und Anregungsspektrum ($\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, blau) von NpBatLOV.....	124
Abb. 99: Fluoreszenzlebenszeitspektren von NpBatLOV (rot) mit einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Detektionswellenlänge von 520 nm. Der Interne Responsefaktor ist in grün dargestellt.....	125
Abb. 100: BLAST Ergebnis des Bacterio-opsin Aktivatorproteins aus <i>Natronomonas pharaonis</i>	126

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	4
3. Einleitung	6
3.1. Die GAF3 Domäne von Slr1393 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	10
3.2. UV- und Blaulicht-Photorezeptoren	13
3.2.1. Der UV-B Photorezeptor UVR-8	14
3.2.2. LOV-Proteine	16
3.2.3. Phototropine	20
3.2.4. BLUF-Proteine	21
3.2.5. Cryptochrome	24
3.2.6. Photolyasen	27
3.2.7. Bacteriorhodopsine	33
3.2.8. Bacterio-Opsin Aktivator	35
3.3. Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET)	37
3.4. Stand der Technik	41
3.5. Zielsetzung	43
4. Material und Methoden	45
4.1. Material	45
4.1.1. Plasmide und Klone	45
4.1.2. Medien	48
4.1.3. Selektionsantibiotika	48
4.1.4. Puffer und Lösungen	48
4.1.5. Materialien	49
4.1.6. Geräte	50
4.2. Methoden	51
4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen nach der Calciumchlorid Methode	51
4.2.2. Herstellung von Glycerinkulturen	51
4.2.3. Gerichtete Mutagenese (Quickchange Methode)	51
4.2.4. Überexpression der Zielproteine	53
4.2.5. Aufreinigung des Proteins mittels FPLC	55
4.2.6. Reinigung der Proteine mittels Ionenaustausch-Chromatographie	55

4.2.7. SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese)....	56
4.2.8. Agarose-Gelelektrophorese.....	57
4.2.9. UV-Überlebens-Assay (qualitativ).....	57
4.2.10. UV-Überlebens-Assay (quantitativ)	58
4.2.11. Dimeranalyse mittels HPLC-ESI-MS/MS.....	59
4.2.12. Identifizierung von Photolyase-Cofaktoren mittels HPLC	59
4.2.13. UV/Vis-Spektroskopie.....	61
4.2.14. Bestimmung der Lebenszeit der thermischen Rückkehr in den Dunkelzustand.....	61
4.2.15. Fluoreszenzspektroskopie	62
4.2.16. Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung.....	63
5. Ergebnisse und Diskussion	64
5.1. Photolyasen und Cryptochrome	64
5.1.1. In silico Charakterisierung der Photolyasen Ver3Phr und Ver3PL2.....	64
5.1.2. UV/Vis Spektroskopie Ver3Phr.....	66
5.1.3. Fluoreszenzspektroskopie.....	69
5.1.4. Analyse der Cofaktoren von Ver3Phr und EcPhr mittels HPLC.....	71
5.1.5. Qualitative UV-Überlebens-Assays	73
5.1.6. Quantitative UV-Überlebens-Assays	76
5.1.7. Photoproduktanalyse mittels HPLC-ESI-MS/MS	78
5.1.8. Das Cryptochrom Ver3PL2.....	81
5.1.9. Diskussion: Photolyasen und Cryptochrome	85
5.2. LOV-GAF-Fusionsprotein.....	90
5.2.1. <i>In silico</i> Arbeiten	90
5.2.2. Spektroskopie.....	92
5.2.3. Charakterisierung des Energietransfers zwischen beiden Domänen	100
5.2.4. Fluoreszenz Lebenszeiten.....	103
5.2.5. Spektroskopische Charakterisierung von LOV-GAF PEB in vivo	106
5.2.6. Diskussion: FRET Eigenschaften des LOV-GAF Fusionsproteins.....	108
5.3. Charakterisierung neuartiger Mutationen in der LOV Domäne des Blaulichtphotorezeptors YtvA aus <i>Bacillus subtilis</i>	112
5.3.1. Spektroskopie.....	113
5.3.2. Fluoreszenzspektroskopie.....	116

5.3.3. Diskussion: Mutationen in der LOV Domäne von YtvA zur Modulation der Kinetiken.....	119
5.4. Bacterioopsin Aktivator	122
5.4.1. Expression der Domänen und Probleme	122
5.4.2. Spektroskopie.....	123
5.4.3. Diskussion: LOV Domäne des Bat Proteins aus <i>Natronomonas pharaonis</i>	126
6. Ausblick	127
7. Literaturverzeichnis	129
8. Aminosäuren-Einbuchstabencode	136
9. Curriculum vitae.....	137
10. Anhang.....	139

1. Zusammenfassung

In dieser Dissertation werden Blaulicht-sensitive Photorezeptoren bearbeitet, die als Chromophore Flavinderivate tragen. Beide Aspekte der Lichtabsorption, Informationsvermittlung und Energiegewinnung, werden an Hand einzelner Proteine untersucht. Als Beispiele dienen einerseits DNA-Schäden reparierende, Blaulicht-aktivierte Enzyme (Photolyasen) und zum anderen photosensorische Proteine vom LOV (light, oxygen, voltage) Typ.

Photolyasen sind lichtaktive Enzyme, die in der Lage sind, UV-induzierte Schäden in der DNA zu beheben. Besonders in großen Höhen und Habitaten mit extrem hohem UV-Index erfüllen sie wichtige Aufgaben. Die Identifizierung und Charakterisierung speziell solcher extremophilen Photolyasen mit ihrer im Vergleich zu mesophilen Photolyasen deutlich erhöhten Effizienz kann den Weg bereiten, neuartige Enzyme und Funktionsweisen zu entdecken und zur Anwendung zu bringen.

Einer der grundlegendsten Teile des Mechanismus von Photolyasen ist der Förster Resonanzenergie-Transfer (FRET) zwischen dem Antennenmolekül und dem Flavin-Adenin-Dinukleotid Cofaktor. Der Förster Resonanzenergieübertrag gehört neben seiner nativen Funktion in zellbiologischen Anwendungen bereits zu einer der effizientesten Möglichkeiten, Vorgänge innerhalb von Proteinen mit Abständen von wenigen Ångström zu untersuchen.

Daher wurde diese Dissertation in zwei hauptsächliche Teilbereiche unterteilt. Zum einen wurden eine Photolyase aus der Klasse I der CPD Enzyme (Ver3Phr) und ein Photolyase-ähnliches Protein (Ver3PL2) des extremophilen Stammes *Acinetobacter sp. Ver3* eingehend spektroskopisch und mikrobiell untersucht, um ihre Struktur, Funktionsweise und die Effizienz der Schutzmechanismen gegen lebensgefährliche UV-Strahlung eingehend zu charakterisieren und zu quantifizieren. Überlebensuntersuchungen nach intensiver UV-Bestrahlung dokumentierten die Spezialisierung von Ver3Phr auf lichtinduzierte Photoreparatur (PR). Außerdem wurde deutlich, dass der Wildtyp-Stamm *Acinetobacter sp. Ver3* trotz einer höheren Anzahl an DNA Läsionen dennoch besser überlebensfähig war als *E. coli* Zellen, die die Photolyase aus Ver3 heterolog exprimierten. Dies legt den Schluss nah, dass das

UV-Resistenz dieses Stammes aus vielen, bislang noch unbekanntem Enzymen und Mechanismen besteht. Diese Annahme wird auch durch Metagenomanalysen dieses und anderer kürzlich gefundener HAAL-Stämme (**H**igh **A**ltitude **A**ndean **L**akes) gestützt.

Des Weiteren wurde mit dem synthetisch hergestellten Fusionsprotein YLOV-1393GAF3 (bestehend aus der konstitutiv fluoreszierenden Mutante C62S in der LOV Domäne und einer Bilin-bindenden GAF Domäne) eine neuartige FRET-Paarung vorgestellt und eingehend spektroskopisch charakterisiert. Berechnungen anhand aufgenommener steady state Fluoreszenzspektren sowie der Fluoreszenz-Lebenszeiten ergaben bei diesem Fusionsprotein mit ca. 45 % beachtliche Effizienzen für den Energietransfer. Zudem bietet dieses FRET Paar dank der verwendeten photochromen 1393GAF3 Domäne den Vorteil, die Fluoreszenz-Emission durch Einstrahlung von Licht bestimmter Wellenlängen (530 nm: Pg → Pr; Pg: grünabsorbierender Zustand der GAF-Domäne, Pr: rotabsorbierender Zustand der GAF-Domäne) und (670 nm: Pr → Pg) völlig unproblematisch und in Sekundenschnelle in den jeweils anderen Zustand zu überführen. Daher bietet diese FRET Paarung die Möglichkeit, je nach Bedarf der Anwendung zwei verschiedene Detektionsbereiche einzusetzen.

Verknüpft mit der Darstellung und Untersuchung des FRET-Paares war eine detailliertere Untersuchung der Eigenschaften von LOV Domänen. Punktmutationen der LOV Domäne des bakteriellen Blaulichtrezeptors YtvA identifizierten die Aminosäuren Valin-28 und Phenylalanin-46 in direkter Nachbarschaft des N5 des Flavincofaktors sowie des Addukt-bildenden Cystein-62, die beide einen erheblichen Einfluss auf den Mechanismus der thermischen Rückkehr in den Grundzustand haben. Interessanterweise führten Veränderungen an diesen beiden Positionen zu gegenläufigen Resultaten bezüglich der thermischen Stabilität der LOV-Domänen Photoprodukte: Austausch an der Position F46 führten in allen Fällen zu einer Destabilisierung des Photoprodukts, während Austausch des Valins-28 das Photoprodukt stabilisierte. So zeigte die Mutante V28L eine deutliche Verlangsamung der Rückkehr in den Anfangszustand, die Mutation V28I verhinderte die thermische Rückkehr sogar vollständig.

Eine LOV-Domäne wurde in dieser Arbeit auch in Bacterio-Opsin-Aktivator (Bat) Proteinen aus Archaea identifiziert. Bat-Proteine regulieren lichtabhängig die Biosynthese von essentiellen Ionenpumpen. In Bat-Proteine aus zwei halophilen Archaea wurden modifizierte LOV-Domänen nachgewiesen. Das Bat Protein aus *Natronomonas pharaonis* (NpBatLOV) zeigt eine klassische LOV-Photochemie, während das orthologe Protein aus *Halobacterium salinarum* außer ultraschnellen Reaktionen im angeregten Zustand keine über längere Zeit messbaren Veränderungen zeigt, obwohl für diesen Organismus die Photochemie des Bat-Proteins als essentiell für die Biosynthese von Bacteriorhodopsin nachgewiesen wurde.

2. Abstract

Topics of this Ph.D. thesis are blue light-sensitive photoreceptors that carry Flavin derivatives as chromophores. Both aspects of light absorption, i.e., transmittance of information and utilization of energy, were investigated studying selected proteins. Examples for both research fields are photolyases, DNA-repairing, blue light-activated enzymes, and photosensory proteins of the class of LOV domain proteins (LOV, light, oxygen, voltage).

Photolyases are light-activated enzymes capable of repairing UV-mediated damage in DNA. These proteins fulfil important tasks especially at high altitudes and in habitats of extremely strong UV-index values. Identification and characterization of especially extremophile photolyases showing in comparison to their mesophile orthologues significantly improved efficiency, can open the door to the identification of novel enzymes and functional properties and to advance their application.

An essential component in photolyase mechanism is the Förster resonance energy transfer (FRET) between an antenna molecule and the Flavin-adenine-dinucleotide cofactor. Besides its naturally occurring function, Förster resonance energy transfer has already become one of the most efficient methods in cell-biological applications to follow physiological processes in living cells with an accuracy of few Angström. Accordingly, this Ph.D. thesis is organized into two major chapters. As one part, a class-I photolyase (Ver3Phr) belonging to CPD-enzymes and a photolyase-like protein (Ver3PL2) from the extremophile *Acinetobacter sp. Ver3* were studied in great detail. Both proteins were probed for their microbial potential to ensure survival via DNA repair. This part of the work addressed the structure, function, and efficiency for UV-protection of Ver3Phr and Ver3PL2. Survival tests in living cells after UV exposure documented the selectivity and high efficiency of Ver3Phr for light-induced 'photo-repair'. Additionally, it could be demonstrated that –despite receiving a larger number of DNA lesions - wild-type *Acinetobacter* cells survived to a larger extent than *E. coli* cells expressing the *Acinetobacter* photolyase. This allowed the conclusion that the UV resistome of this extremophile organism is composed of many, still unidentified enzymes and repair mechanisms. This statement is also supported by metagenome analyses of other recently discovered HAAL-bacterial strains (HAAL, High Altitude Andean Lakes).

Following studies on photolyases, the FRET process was investigated in greater detail employing a novel, non-naturally occurring fusion protein. This protein YLOV1393GAF3 represents a novel FRET couple, as it is composed of a constitutively fluorescent LOV domain (C62S mutation of YtvA from *Bacillus subtilis*) and a bilin-binding GAF domain. This synthetic protein has been characterized in full detail. Analysis of its fluorescence properties yielded an efficiency for energy transfer between both domains of 45%. As the GAF domain is photochromic between a red- and a green absorbing state, the resulting fluorescence can be easily switched between two emission ranges allowing for applications the use of two different detection ranges.

In relation to the studies performed on the novel FRET couple, the second part of this thesis presents a detailed analysis on the properties of LOV domains. Employing the well-characterized LOV domain of YtvA, site directed mutagenesis identified amino acids valine-28 and phenylalanine-46 as major regulatory elements for the thermal stability of the YtvA photoproduct. Both residues are positioned in close proximity to N5 of the Flavin chromophore and to the adduct-forming cysteine-62. Mutations at these two positions yielded counteracting effects: exchanges of phenylalanine-46 destabilized the thermal stability of the photoproduct (i.e., accelerated recovery of the parental state), whereas mutations at valine-28 tremendously stabilized the photoproduct, and a V28I mutation blocked completely recovery of the parental state, i.e., the photoproduct was formed irreversibly.

A LOV domain was also identified as component of the bacterio-opsin activator protein (bat) from Archaea. Bat proteins regulate in a light-dependent manner biosynthesis of ion pumps. LOV domains of bat proteins from two archaeal species (*Halobacterium salinarum* and *Natronomonas pharaonis*) were studied. The LOV domain from *N. pharaonis* behaved like a canonical LOV domain undergoing the cognate photochemistry and thermal recovery into the ground state, whereas the ortholog protein from *H. salinarum* showed only ultrafast excited state photophysics without any further absorption changes. This finding is even more interesting as for this protein a physiological role, i.e., regulation of bacterio-opsin biosynthesis is fully proven.

3. Einleitung

Sonnenlicht ist auf der Erdoberfläche nahezu allgegenwärtig. Weite Teile dieser Strahlung sind direkte oder indirekte Hauptenergiequelle für eine Vielzahl von Organismen. Allerdings sind besonders die kurzwelligen Bereiche schädlich und unter Umständen tödlich. Dies betrifft im Speziellen Strahlung aus dem Frequenzbereich des ultravioletten Lichtes, die in der Lage ist, das Erbgut, das heißt, die grundlegende Anleitung des Lebens nachhaltig zu schädigen. Ultraviolettes Licht wird, in seiner schädigenden Intensität aufsteigend, unterteilt in UV-A (380 – 315 nm), UV-B (315 – 280 nm) und UV-C (280 – 200 nm).

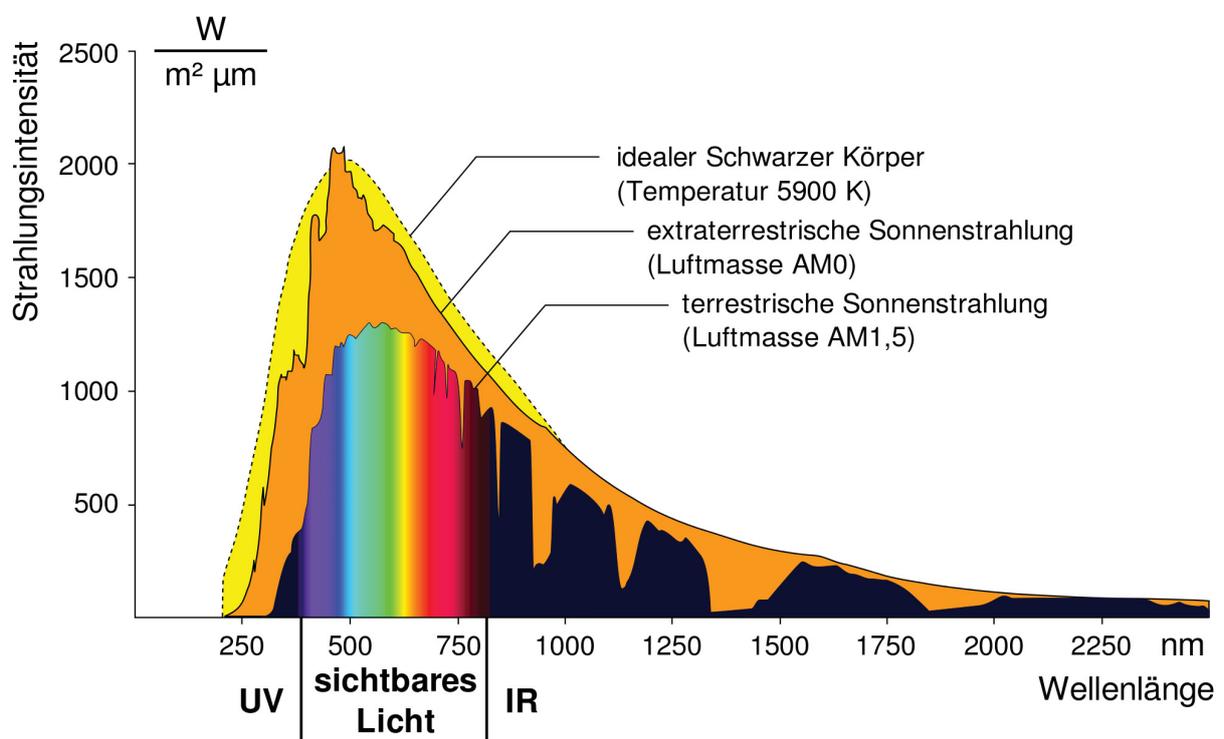


Abb. 1: Spektrum der Sonnenstrahlung in verschiedenen Höhen der Atmosphäre ¹. AM: Luftmasse (engl.: „air mass“)

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, handelt es sich bei Licht um eine elektromagnetische Welle, die je nach betrachteter Schichtdicke der Erdatmosphäre und abhängig von der Wellenlänge in der Strahlungsintensität variiert. Die Definition AM (Luftmasse) ist hier ein relatives Maß für die Länge der Strecke, die die Strahlung durch die Erdatmosphäre abhängig vom Winkel zur Senkrechten zurücklegt. So steht AM = 0 für Strahlung und Absorption senkrecht durch die Atmosphäre und AM = 1,5 für einen Einfallswinkel von 48° bezogen auf die Senkrechte ^{2, 3}. Im Umgangssprachlichen beziehen wir uns mit der Bezeichnung „Licht“ lediglich auf den ‚sichtbaren‘ Bereich, d.h., den Wellenlängenbereich zwischen der unsichtbaren UV- und der Infrarot-Strahlung (380 – 750 nm).

Phosphoreszenz. Letztere dauert wesentlich länger, da die dazu erforderliche Spinumkehr nur durch ein erneutes Intersystem Crossing oder durch Zuführung von Energie von einem anderen Teilchen möglich ist.

Die Entstehung von Mechanismen und Photorezeptoren, die auf die verschiedenen Wellenlängenbereiche des Lichtes adäquat reagieren konnten, um so mit Verhaltensänderungen reagieren zu können, war für Lebewesen zum Einen ein evolutiver Vorteil, zum Anderen sogar schlicht überlebensnotwendig. Die verschiedenen Wellenlängen können vielerlei Funktionen besitzen und Effekte auf Organismen haben. Sie beinhalten Informationen wie zum Beispiel über die Intensität der Strahlung, die Richtung, aus der das Licht kommt, oder aber die Rhythmik, in der es präsent bzw. abwesend ist. Darüber hinaus stellt das Licht eine Energiequelle dar, dessen Intensität je nach Wellenlänge variiert. Diese Energie wird von Photorezeptoren aufgenommen und in Stoffwechselkaskaden wie der Photosynthese in für das Lebewesen verwendbare Energie umgewandelt werden kann. Man unterscheidet also Photorezeptoren in sensorische Systeme auf der einen Seite, die die Information des Lichtes nutzen wie z.B. das LOV-Protein YtvA oder der UVB-Rezeptor UVR8 und Lichtenergie-nutzende Systeme auf der anderen Seite, wie z.B. die an der Photosynthese beteiligten Photosysteme oder Photolyasen. Des Weiteren kann diese Energie auch ganz direkt verwendet werden, um zum Beispiel Schäden in der DNA des Lebewesens zu beheben (die unter Umständen durch intensive UV-Strahlung erzeugt worden sind). Hier stellen enzymatisch wirkende Photorezeptoren das Bindeglied zwischen den Lichtverhältnissen in der Umwelt und dem Organismus dar.

Die unterschiedlichen Photorezeptortypen sind für verschiedene Wellenlängen optimiert, um die jeweiligen für den Organismus notwendigen Aufgaben zu erfüllen. Sie bestehen aus zwei Komponenten, zum Einen aus der lichtabsorbierenden Komponente, dem Chromophor (altgriechisch; χρώμα, chróma: "Farbe"; φερός, phorós: "tragend"), in der Regel ein mehr oder weniger komplexes organisches Molekül, zum Anderen aus der Proteinkomponente, in die der Chromophor eingebettet ist und mit der er nach Aktivierung wechselwirkt, um die photophysikalische Aktivität in eine biologische umzuwandeln. Beispiele für Chromophorklassen (Abb. 3, Abb. 4) wären Flavine (blau absorbierend) oder Retinal,

Biline oder Chlorophylle (die letzten beiden hauptsächlich rotabsorbierend). Hierbei sind die Chlorophylle im Allgemeinen energievermittelnde Chromophore, wohingegen sowohl Flavine, Biline als auch Retinal hauptsächlich sensorische Aufgaben erfüllen.

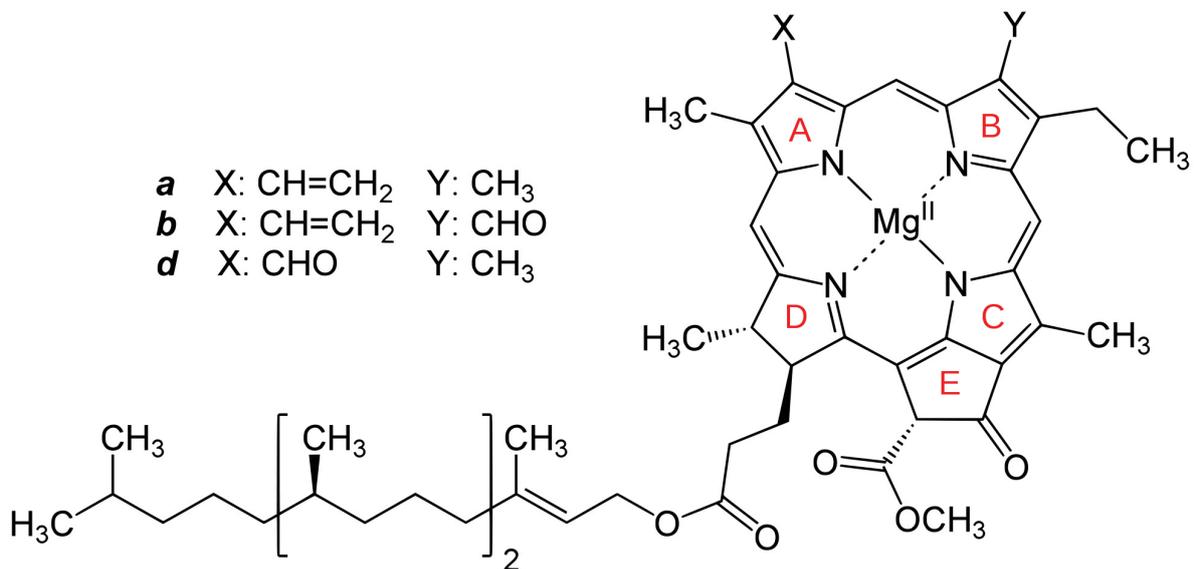


Abb. 3: Molekülstruktur von Chlorophyll a, b und c mit den entsprechenden Resten für X und Y ⁶.

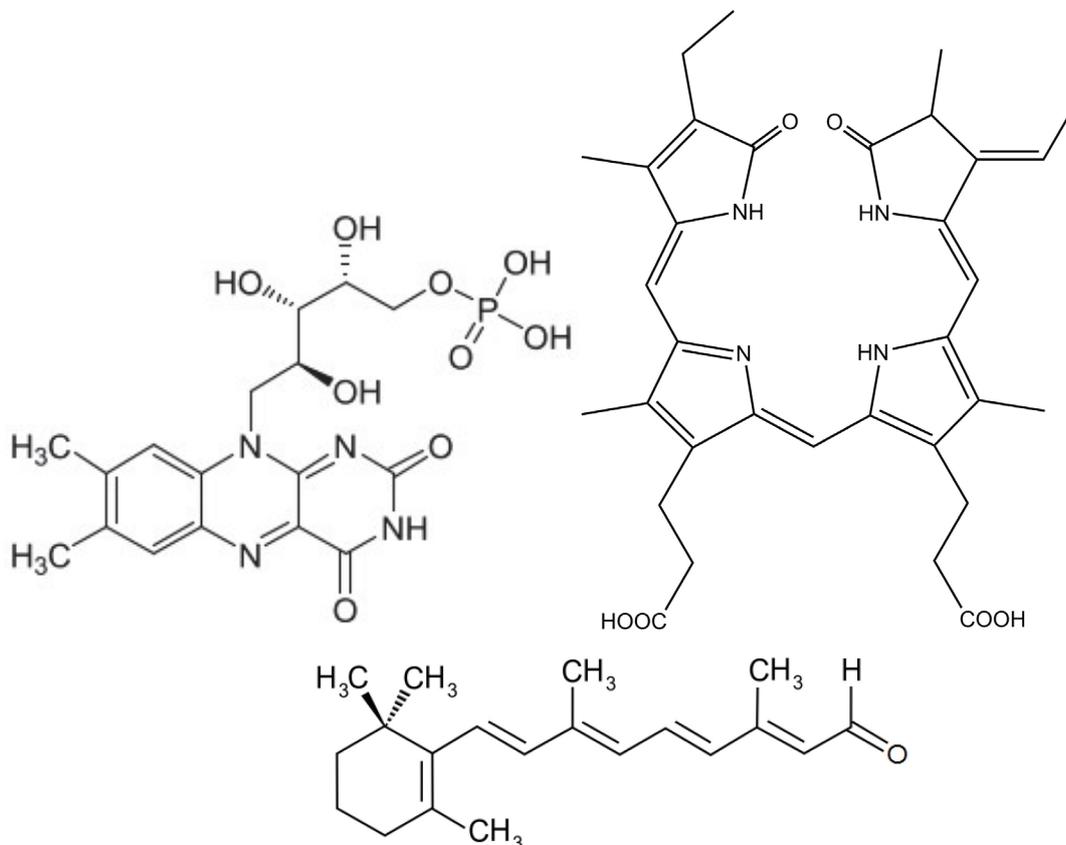


Abb. 4: Molekülstruktur von Flavinmononucleotid (FMN, oben links), Phycocyanobilin ⁷ (PCB, oben rechts) und all-trans-Retinal (unten).

Nunmehr vor fast 200 Jahren rückte der Effekt, den Licht auf lebende Organismen ausübt, das erste Mal in den Fokus der Wissenschaft. 1817 veröffentlichte

Sebastiano Poggioli seine Beobachtungen bezüglich des unterschiedlichen Effektes von rotem und violetterem Licht auf die Blätter von *Mimosa pudica*. Mit Hilfe eines Prismas gelang es ihm, die Blätter mit verschiedenen Farbbereichen zu belichten. Dabei stellte er fest, dass rotes Licht alleine für ein normales gesundes Wachstum nicht ausreichen schien und dass die Blätter sich außerdem schneller dem violetten als dem roten Licht zuwandten⁸. In den folgenden Jahrzehnten stieg die Anzahl der Publikationen immer rasanter an. Im Jahr 1959 setzten Butler *et al.* durch Ihre Entdeckung und Beschreibung von rotlichtsensitiven pflanzlichen Photorezeptoren den Startpunkt für eine extensive Forschung im Bereich der pflanzlichen Photorezeptoren⁹. In den Jahren 1930-1940 begann eine detaillierte Forschung an Sehpigmenten von Tieren und vom Menschen¹⁰, den Rhodopsinen, und etwa ab 1970 wurden die mikrobiellen Rhodopsine (zunächst Bacteriorhodopsin) entdeckt und intensiv untersucht¹¹.

Im Folgenden sollen einige der hier bearbeiteten Photorezeptoren detaillierter beschrieben werden.

3.1. Die GAF3 Domäne von Slr1393 aus *Synechocystis* sp. PCC6803

Neben den Phytochromen aus Pflanzen wurden verwandte Proteine auch in anderen Organismen, besonders in den ebenfalls photosynthetisch aktiven Cyanobakterien nachgewiesen. Als Beispiel sei hier *Synechocystis* sp. PCC6803 genannt. Es ist in der Lage, sowohl phototroph als auch heterotroph zu wachsen. *Synechocystis* weist ein Gen auf, das für ein kanonisches Phytochrom kodiert (Cph1), das den in Pflanzen vorkommenden Photorezeptoren vergleichbar ist. Das Protein weist für den photosensorischen Bereich eine ‚klassische‘ PAS-GAF-PHY Struktur auf (PAS: **P**er **A**rn **S**im, GAF = c**G**MP-spezifische Phosphodiesterase, **A**denylylcyclase und **F**hI**A**, PHY: **P**hytochrom; FhI**A**: **F**ormiat **H**ydrogen **L**yase **A**ktivator). Das Gen *slr1393* hingegen kodiert ein Cyanobacteriochrom (CBCR), dessen photosensorischer Bereich drei GAF Domänen aufweist. C-Terminal folgt eine PAS Domäne und eine Histidinkinasedomäne. Auf Grund ihrer photochemischen Eigenschaften können Cyanobacteriochrome dennoch in gewisser Weise als Phytochrom-Homologe in Cyanobakterien verstanden werden. Bemerkenswert ist, dass in Slr1393 ausschließlich die dritte GAF Domäne (GAF3) einen Phycocyanobilin-Chromophor

(PCB, Abb. 5) bindet und in der Lage ist, eine Photochemie ähnlich der der klassischen Phytochrome auszuführen¹². Der Chromophor ist über ein Cystein (Cys528) kovalent an das Protein gebunden (Abb. 5, Abb. 7)^{13, 14}.

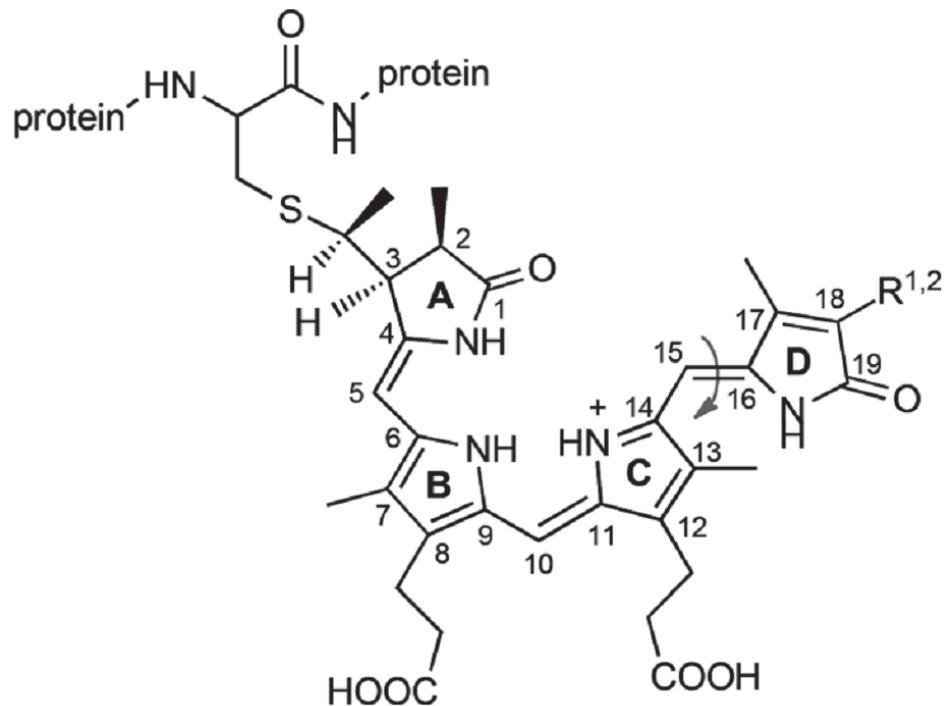


Abb. 5: Molekülstruktur von PCB in Phytochrom mit kovalenter Bindung über C528. Die photochemische Reaktion (Isomerisierung zwischen dem C- und dem D-Ring) ist durch einen Pfeil dargestellt.

Man findet auch in den CBCR-Proteinen Photochromie zwischen dem Anfangs- (Dunkel-)zustand und dem Photoprodukt, die im Fall von Slr1393g3 als P_r (rotabsorbierend) und P_g (grünabsorbierend) mit den jeweiligen Absorptionsmaxima $\lambda_r = 649 \text{ nm}$ und $\lambda_g = 536 \text{ nm}$ bezeichnet werden (Abb. 6). Beide Zustände sind durch Einstrahlung entsprechender Wellenlängen innerhalb von Sekunden vollständig ineinander überführbar. Dabei findet eine Isomerisierung des Chromophors statt, der in P_r in 15Z Konfiguration und im P_g Zustand als 15E Konfiguration vorliegt. Interessanterweise zeigen die photochemisch aktiven GAF-Domänen der Cyanobacteriochrome eine gut messbare Fluoreszenzausbeute von z.T. um zehn Prozent – im Gegensatz zu kanonischen Phytochromen, bei denen die Fluoreszenzausbeute bei ca. $\Phi = 10^{-4}$ liegt. Eine Anregung im Wellenlängenbereich der beiden Absorptionszustände ergibt jeweils eine Fluoreszenzemission mit den Maxima bei 670 nm und 615 nm (Abb. 6).

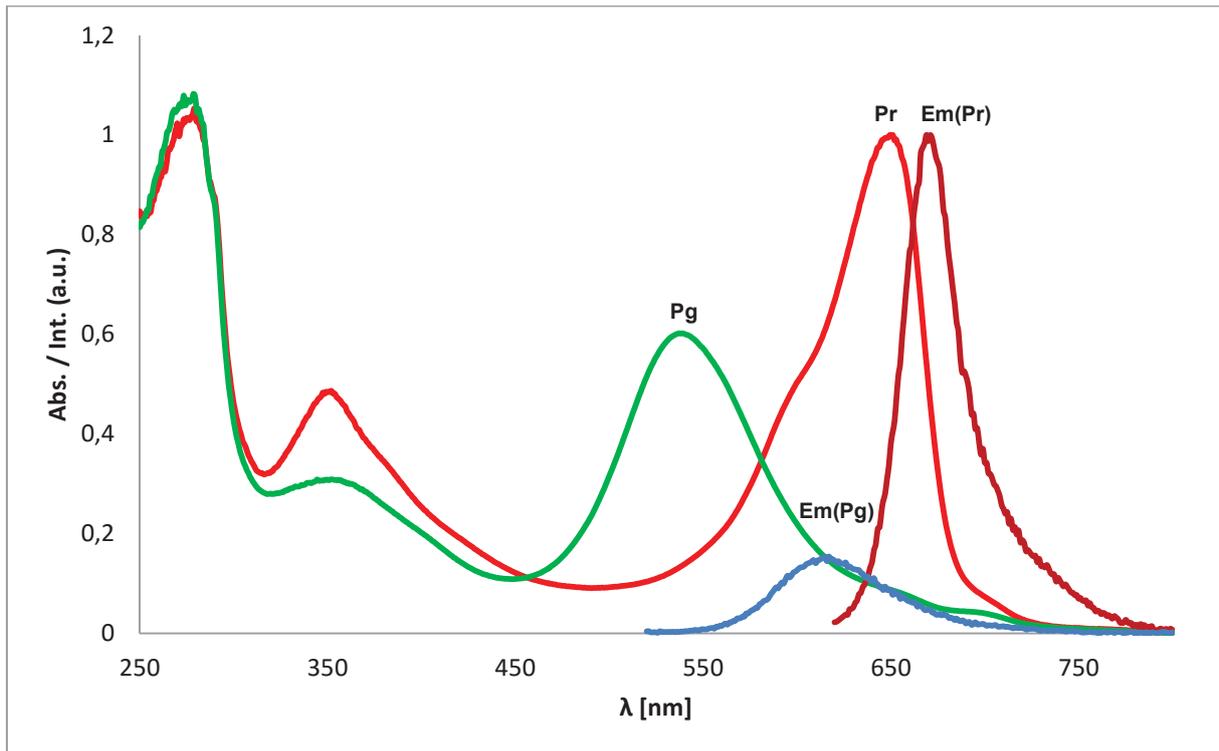


Abb. 6: Absorptionsspektren der Zustände Pr (rot) und Pg (grün) der Slr1393 GAF3 Domäne inklusive der zugehörigen Fluoreszenzen des Pr (dunkelrot) und des Pg Zustandes (blau). Die Emissionsmaxima der Fluoreszenzspektren wurden bezüglich des Maximums der rotabsorbierenden Form normiert. Em: Emission

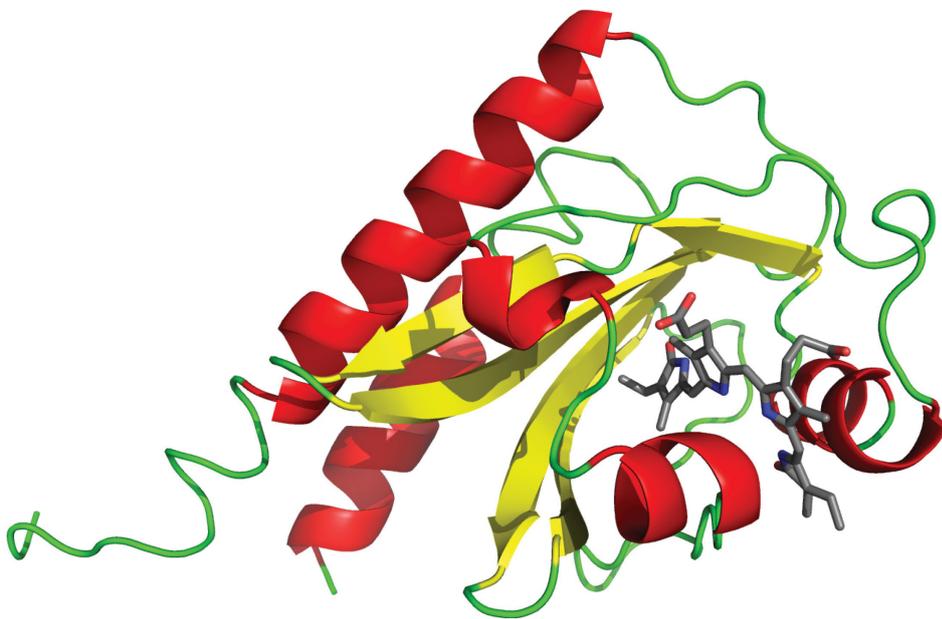


Abb. 7: Kristallstruktur der 1393GAF3 Domäne im Pr Zustand mit PCB als Chromophor (unpublizierte Struktur aus der Arbeitsgruppe).

3.2. UV- und Blaulicht-Photorezeptoren

Blaulichtaktivierte Photorezeptoren bilden eine Untergruppe der Photorezeptoren, die aufgrund ihrer Chromophore hauptsächlich Licht im Wellenlängenbereich von 350 – 500 nm absorbieren. Dieser Absorptionsbereich schließt neben dem blauen Wellenlängenbereich von 430 – 490 nm ebenfalls den violetten von 380 – 430 nm und Teile der UV-A Strahlung ein, die sich von 315 – 380 nm erstreckt. Diese Gruppe von Photorezeptoren wird nun wiederum in weitere Subklassen eingeteilt. Dies geschieht vornehmlich aufgrund von Sequenzhomologien und -mustern, der Art der lichtinduzierten Reaktionen sowie aufgrund der jeweiligen spezifischen Funktion. Dieser Wellenlängenbereich trägt eine spezielle Besonderheit, da die blauen und grünen Spektralbereiche mit Abstand am tiefsten in eine klare Wassersäule einzudringen vermögen¹⁵. Allerdings besteht gerade auch in diesem Spektralbereich die Gefahr der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff und anderen reaktiven Sauerstoffspezies. Sie werden vornehmlich durch UV-Licht erzeugt, können aber auch durch sogenannte endogene Photosensibilisatoren (photosensitizers) wie zum Beispiel Porphyrine und freie Flavine entstehen, die über ihre jeweils starken Soret-Banden hohe Triplett-Ausbeuten zeigen und so die schädlichen Sauerstoffspezies erzeugen. Entsprechend dieser physikalischen Eigenschaft war es im Laufe der Evolution für Organismen nötig, schädlichen Lichtintensitäten und Spektralbereichen auszuweichen und/oder Mechanismen zur Vermeidung photoinduzierter Schäden zu etablieren^{16, 17}. Diese verschiedenen Aufgaben werden in diesem Wellenlängenbereich von zurzeit fünf bekannten Familien von Blaulicht-sensitiven Photorezeptoren übernommen: Den Cryptochromen, Phototropinen und Proteinen, die als ZTL/FKF1/LKP2 klassifiziert werden^{18, 19}, sowie den BLUF- (*blue light sensing utilizing FAD*) Proteinen²⁰ und Xanthopsinen²¹. Für den UV Bereich des Lichtspektrums kann noch der UV-B Photorezeptor UVR-8 in diese Aufstellung mit aufgenommen werden. Neben dem kürzerwelligen Absorptionsbereich besitzen Angehörige dieser UV-B sensitiven Proteinfamilie noch das Alleinstellungsmerkmal, dass sie keinen endogenen Chromophor binden, sondern dass Tryptophanseitenketten für die Absorptionscharakteristika sorgen^{22, 23}.

3.2.1. Der UV-B Photorezeptor UVR-8

Der ultraviolette Wellenlängenbereich bedarf aufgrund seines hohen Gefahrenpotentials für lebende Organismen und der Schädigung von biologischen Komponenten, die wie im Falle der DNA bis zum Zelltod und des gesamten Organismus führen können, besonderer Vorsichtsmaßnahmen^{24, 25}. Durch die Atmosphäre, im Speziellen durch die Ozonschicht, wird auf Höhe des Meeresspiegels und in geringen Höhen darüber der größte Anteil der schädlichen UV Strahlung gefiltert²⁶. In größeren Höhen werden aufgrund der geringen Filterung durch die Atmosphäre weitere Schutz- und Reparaturmaßnahmen notwendig, wie sie zum Beispiel in Kapitel 3.2.6 (Photolyasen) näher beschrieben werden^{27, 28}. Aber auch die Absorption der UV Strahlung in Nähe des Meeresspiegels ist nicht vollständig und verlangt nach diversen Überlebensmechanismen. Diesen Photorezeptor, der den Schutz gegen UV-B Strahlung reguliert, entdeckten Kliebenstein und Kollegen im Jahr 2002 in *Arabidopsis thaliana*²⁹. Durch eine Mutation des *UV resistance locus 8-1 (uvr8-1)* wurde die UV Sensitivität der Pflanzen stark erhöht. Verantwortlich für die UV-B Signaltransduktion und die Initiation des Schutzes ist der auf diesem *locus* kodierte Photorezeptor UVR8. Hierbei handelt es sich um ein im Grundzustand homodimeres Protein, welches keinen organischen Cofaktor als Chromophor bindet (Abb. 8).

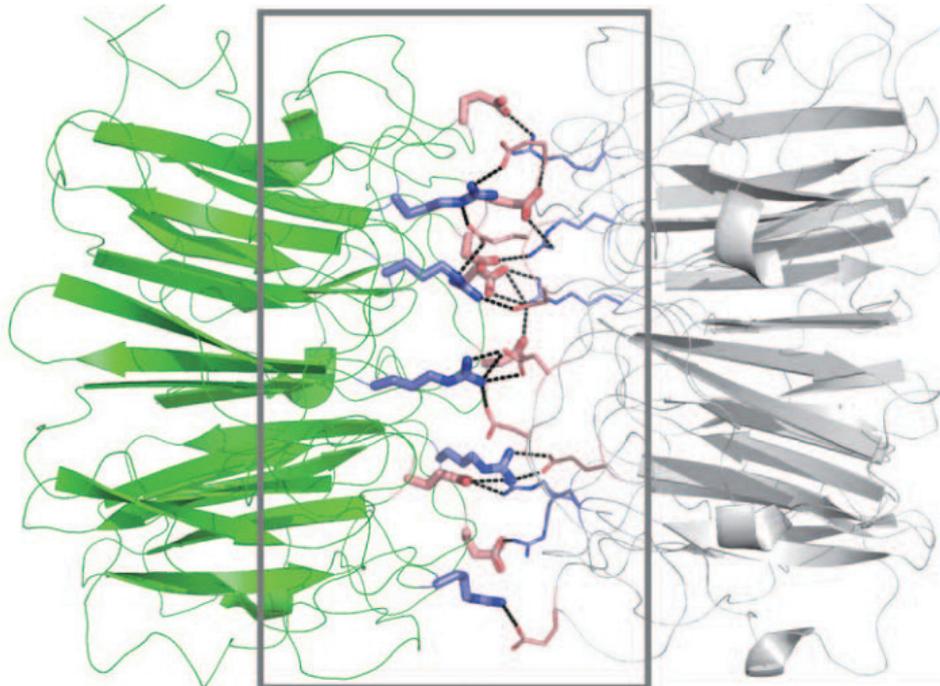


Abb. 8: Wasserstoffbrücken zwischen den Homodimer-Untereinheiten von UVR8³⁰. Untereinheiten: grün und grau, saure Aminosäuren: rot, basische Aminosäuren: blau, Wasserstoffbrückenbindungen: gestrichelt schwarz.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Tryptophanseitenketten des Proteins für die Absorption der UV-B Strahlung verantwortlich sind. UVR8 verfügt über 13 Tryptophane, von denen sechs gleichmäßig verteilt im Inneren des Proteins liegen und sieben an der Oberfläche eingebunden sind (Abb. 9). Vier dieser Oberflächen-Tryptophane, W94, W233, W285, W337, bilden eine sogenannte „Absorptionspyramide“ und sind von besonderer Bedeutung für die Photoreaktion. Untersuchungen zeigten, dass besonders W233 und W285 eine wichtige Rolle zukommt^{23, 30-32}.

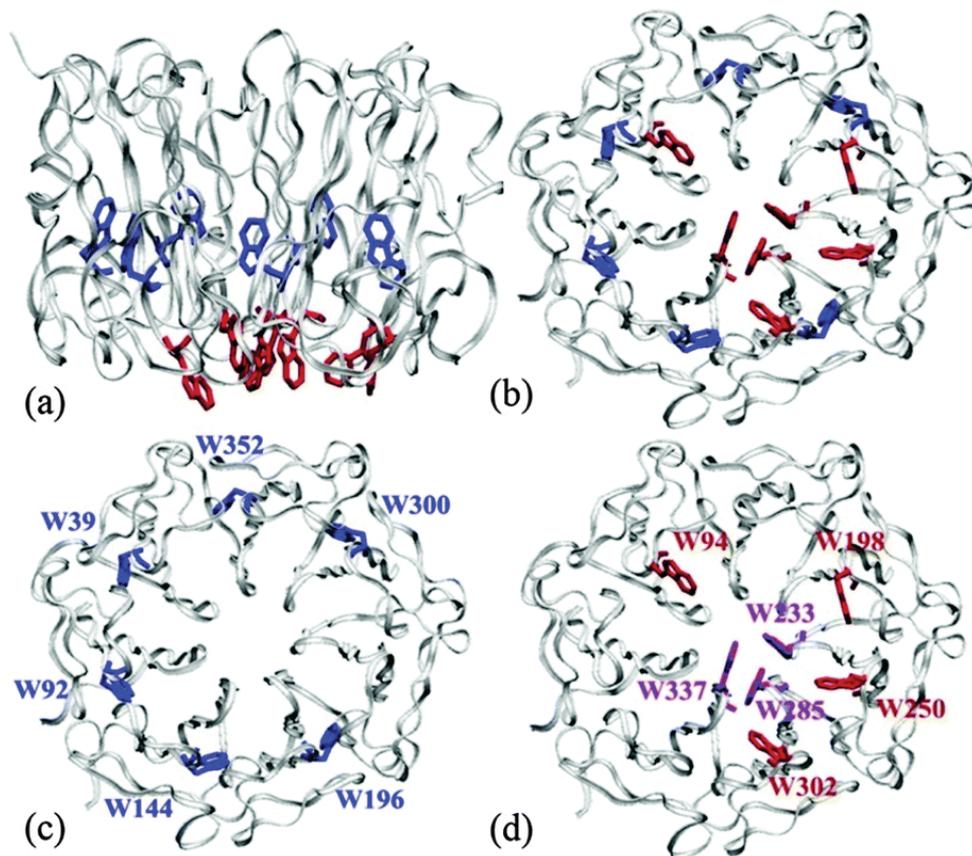


Abb. 9: Kristallstruktur eines Monomers des UV-B Photorezeptors UVR8 [17]. a) Seitenansicht mit und die sechs im Inneren angeordneten (blau) und die sieben Oberflächentryptophane (rot). b) entspricht (a), aber in Aufsicht, die Dimer-Interaktionsfläche betrachtend. c) Aufsicht auf den Proteinkern mit den inneren Tryptophanen. d) Aufsicht auf den Proteinkern mit hervorgehobener Interaktionsfläche und den dortigen Oberflächen-Tryptophanen (rot) und der dort lokalisierten Tryptophantriade (violett).

Durch Absorption von UV-B Strahlung werden die Tryptophane angeregt und reduzieren die Kationen- π Interaktionen an der Dimerisierungsfläche, was zur Unterbrechung der Wasserstoffbrückenbindungen und damit zum Zerfall des Dimers führt^{33, 34}. Als Monomer akkumuliert UVR8 im Nukleus, wo es die Genexpression moduliert, was eine erhöhte Expression von Schutz- und Reparatursmechanismen zur Folge hat^{35, 36}.

3.2.2. LOV-Proteine

Diese Klasse von light, oxygen, voltage (LOV) Proteinen ist in vielen verschiedenen Bereichen des Lebens hoch konserviert. So finden sie sich zum Beispiel in Bakterien, Archaeen, Pflanzen und Pilzen ³⁷. Zunächst wurden LOV Domänen in pflanzlichen Blaulichtrezeptoren gefunden, den sogenannten Phototropinen (*PhotLOV*) ³⁸. Anfang der Zweitausender Jahre wurde dann mit *YtvA*, einem prokaryotischen Blaulichtsensitiven Photorezeptor aus der Stresskaskade von *Bacillus subtilis*, der erste bakterielle Photorezeptor mit LOV Domäne gefunden und charakterisiert ³⁹⁻⁴¹. LOV Proteine präsentieren eine Unterfamilie der Superfamilie der PAS-Domänenproteine (PAS, PER-ARNT-SIM) ⁴². Die LOV-Domänenproteine zeichnen sich zum einen durch ein als Chromophor nicht kovalent gebundenes Flavinderivat sowie durch ihren blaulichtabhängigen Photozyklus aus, der über ein Triplett-Intermediat des Flavins in ein Cysteinyl-C4(a) Addukt übergeht ⁴³.

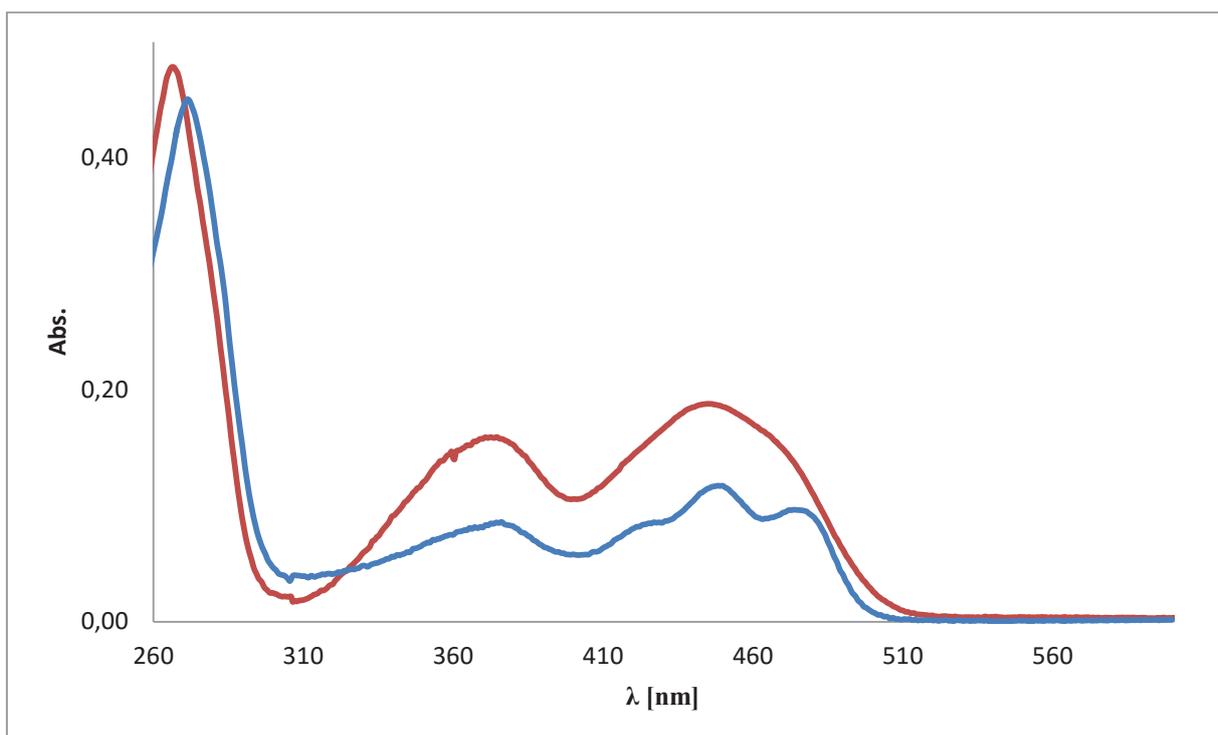


Abb. 10: Vergleich der Absorptionsspektren von freiem FMN (rot) und seiner in das Protein-eingebetteten Form (Dunkelzustand der LOV Domäne von YtvA) (blau).

Die Unterschiede der Spektren von im Protein befindlichem und freiem FMN in Lösung (Abb. 10) begründen sich aus der Struktur des Isoalloxazin-Ringsystems der flavinoiden Chromophore. Diese haben aufgrund eben dieser Strukturen nur eine sehr geringe Beweglichkeit und wenige Freiheitsgrade. Ist das Flavin nun in das Protein integriert, so wandelt sich aufgrund der räumlichen Einbindung das Maximum bei 450 nm zu der charakteristischen dreigipfligen Form des Dunkelspektrums, da es

nun nicht mehr so frei schwingen kann wie zB. in wässriger Lösung. So entstehen drei verschiedene Energieniveaus im S_1 -Zustand, die sich in den zwei zusätzlichen Gipfeln des Maximums um 450 nm zeigen. Belichtet man das Protein nun mit blauem Licht, so bindet das konservierte Cys62 kovalent an den Chromophor (Abb. 11). Hierbei lagern sich die Elektronen der Doppelbindung zwischen C(4a) und N(5) so um, dass das Wasserstoffatom der Cystein-Seitenkette an den Stickstoff bindet und der Schwefel die Thioetherbindung zu C(4a) ausbilden kann^{44, 45}. Diese Auflösung der Doppelbindung hat zur Folge, dass das Absorptionsmaximum von 447 nm hypsochrom auf 390 nm verschoben wird.

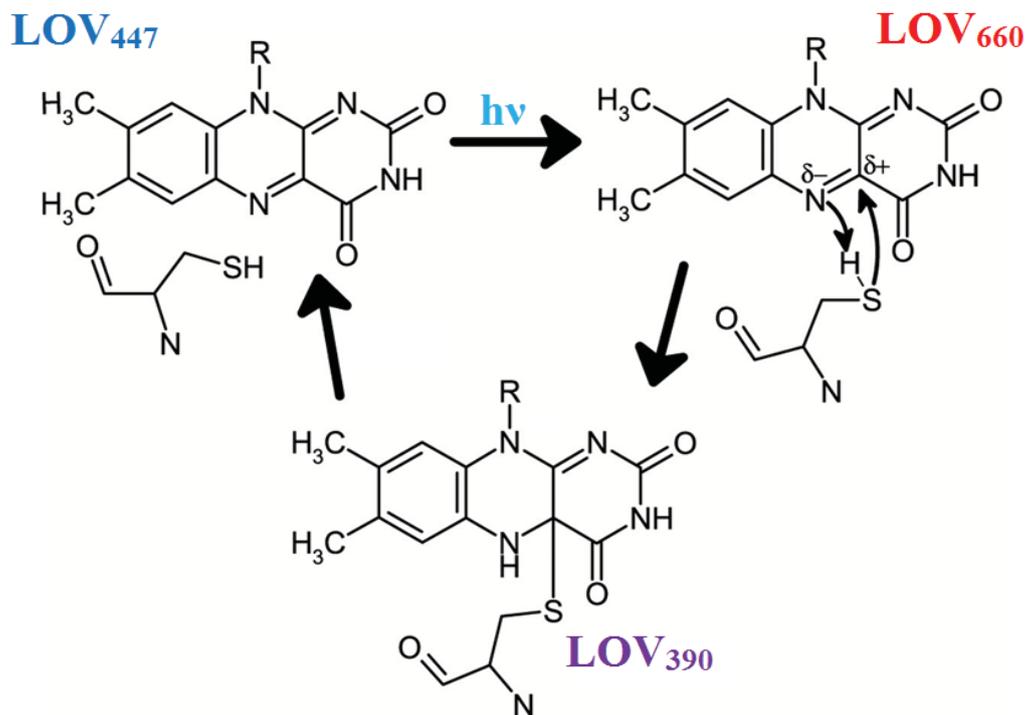


Abb. 11: Schematische Darstellung des Photozyklus einer LOV Domäne. Das nicht-kovalent gebundene Flavin (LOV₄₄₇) bildet durch Blaulicht-Anregung ein Triplett-Intermediat (LOV₆₆₀), welches anschließend binnen Mikrosekunden in das Photoprodukt übergeht, in dem der Chromophor über eine C-S Bindung zu dem benachbarten Cystein kovalent gebunden vorliegt. Dieses Photoprodukt (LOV₃₉₀) kehrt anschließend durch thermische Prozesse in den nicht-kovalent gebundenen Dunkelzustand zurück. Die Zeitspanne der thermischen Rückkehr kann sich je nach Protein von wenigen bis zu Stunden oder Tagen erstrecken.

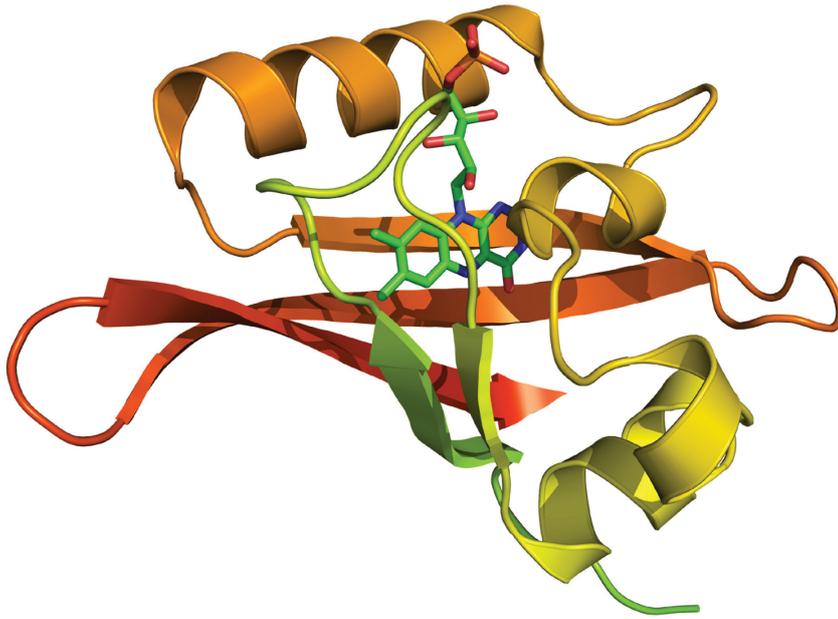


Abb. 12: Kristallstruktur der LOV Domäne des Blaulichtrezeptors *YtvA* aus *Bacillus subtilis* mit seinem nicht-kovalent gebundenen FMN Cofaktor (PDB ID: 2PR5, Dunkelform und 2PR6, Photoprodukt. Letztere nicht dargestellt.)⁴⁶

Die LOV-Domänen weisen, wie alle PAS Domänen, eine konservierte Faltung auf, bestehend aus fünf antiparallelen β -Faltblättern ($A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$ und $I\beta$) sowie vier verbindenden α -Helices ($C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$ und $F\alpha$, Abb. 12)⁴⁷. Das konservierte Cystein, welches im Verlauf des Photozyklus die kovalente Bindung zu dem Flavin eingeht, liegt hier auf der Helix $E\alpha$, eingebettet in ein hochkonserviertes Sequenzmuster GRNCRFLQ¹⁹. Dieses Sequenzmotiv, bzw. die sie kodierende DNA-Sequenz bildet die zuverlässigste Möglichkeit bislang unbekannte LOV Domänen in Genomen verschiedenster Organismen zu finden⁴⁸. So ergaben Analysen von Genom- und Metagenomdatenbanken von verschiedensten Habitaten, dass ca. 10-15% der untersuchten prokaryotischen Genome über einen Photorezeptor mit LOV Domäne verfügen⁴⁹. Derartige Sequenzanalysen können dann noch durch die Untersuchung der Aminosäuren eingegrenzt und verfeinert werden, die in bekannten LOV Domänen klassischerweise über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Flavinchromophor interagieren⁵⁰.

LOV Domänen wie beispielsweise die in dem bakteriellen Blaulichtrezeptor *YtvA* vorhandene sind von so großem wissenschaftlichen Interesse, da sie leicht zu handhaben sind und eine durch Lichteinstrahlung kontrollierbare Fluoreszenz besitzen. So besitzen LOV Domänen im unbelichteten Dunkelzustand eine klassische Flavinemission, welche sie durch Belichtung mit blauem Licht beim

Übergang in den Photoprodukt-Zustand verlieren Diese Eigenschaft macht sie zu sehr geeigneten Molekülen für die hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, bzw. spezifisch für die Fluoreszenz Photoaktivierte Lokalisierungsmikroskopie (fluorescence photo-activation localization microscopy, FPALM) ⁵¹. Um Techniken wie diese zu optimieren oder neue Aufgabenbereiche zu eröffnen, besteht die Möglichkeit, die Eigenschaften des Photozyklusses zu modulieren. Dieser beruht auf einer gegenseitigen Interaktion verschiedener Aminosäuren in der Flavin-Bindedomäne und der Art des Chromophors selbst. Modifiziert man nun verschiedene Aminosäuren, die mit dem Chromophor interagieren oder aber verschiedene funktionelle Gruppen des Flavins, so hat dies großen Einfluss auf die Art und die Eigenschaften des Photozyklus und damit auch auf die thermische Rückkehr in den Ausgangszustand ^{50, 52}. Teil dieser Arbeit war es deshalb auch, den Photozyklus von YtvA durch Mutation der Aminosäuren Phenylalanin (F46) und Valin (V28) zu modulieren, da diese mit dem Isoalloxazinsystem des Chromophors in der Flavinbindedomäne interagieren (siehe Abb. 13).

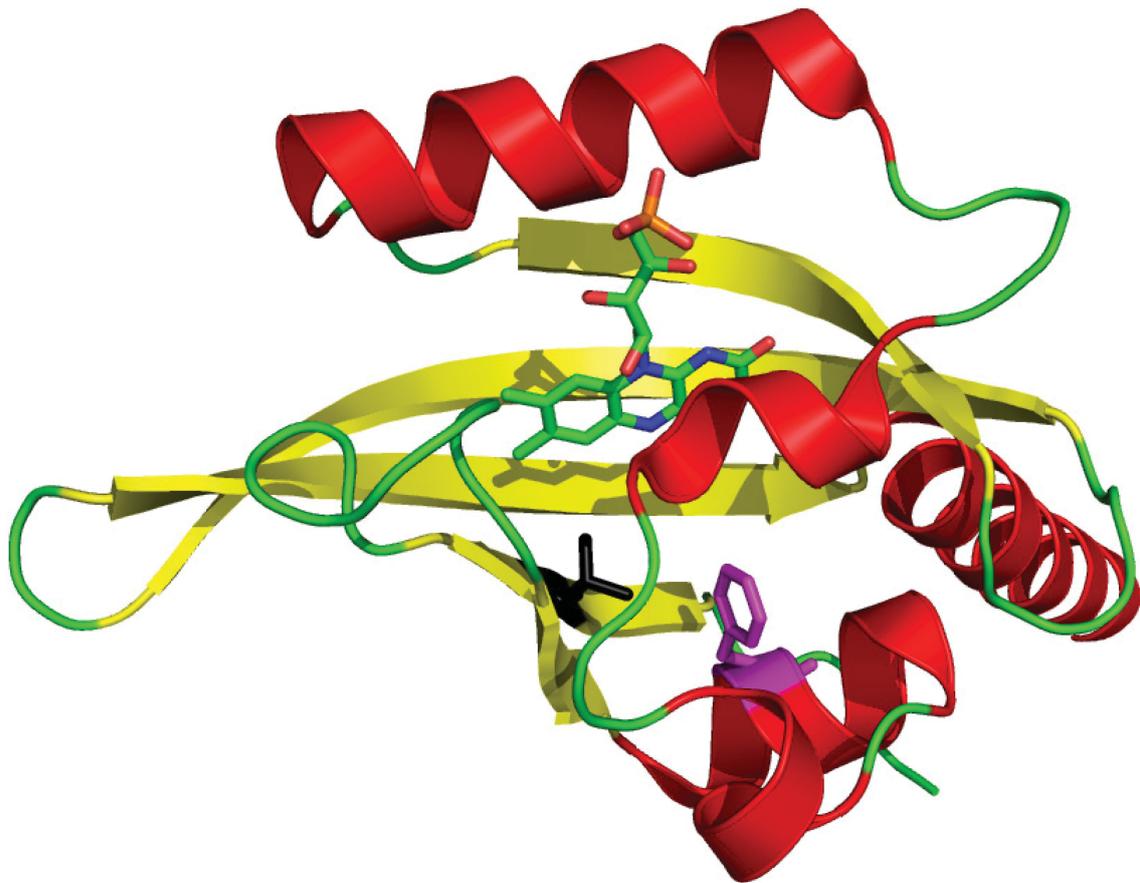


Abb. 13: Flavinbindedomäne des Blaulichtrezeptors YtvA im Dunkelzustand inklusive Darstellung der zu mutierenden Aminosäuren F46 (magenta) und V28 (schwarz) ⁴⁶.

3.2.3. Phototropine

Phototropine (phot) gehören ihrer Photochemie nach ebenso zu den soeben diskutierten LOV-Domänenproteinen. Sie sind blaulichtinduzierbare Kinasen in Pflanzen, in denen sie lebensnotwendige Reaktionen steuern, unter anderem den für diese Proteinfamilie namensgebenden Phototropismus⁵³. 1997 entdeckten Huala *et al.* das *nph1* genannte (nonphototrophic hypocotyl 1) Protein in *Arabidopsis*⁵⁴. Ein Jahr später bestätigten Christie *et al.* die angenommenen Eigenschaften eines Flavin bindenden Photorezeptors, der essentiell für den Phototropismus ist⁵⁵. Kurz darauf charakterisierten Kagawa *et al.* mit *npl1* (*nph*-like 1) einen zu *nph1* homologen Photorezeptor, der allerdings nicht den Phototropismus reguliert, sondern die Relokalisation von Chloroplasten in Abhängigkeit der Lichtintensität steuert^{56, 57}. Daher wurden *nph1* und *npl1* jeweils mit *phot1* und *phot2* benannt⁵⁸. Darüber hinaus zeigten Kinoshita *et al.* später auch die Phototropin-abhängige Regulation der Stomataöffnung⁵⁹.

Phototropine besitzen klassischerweise eine C-terminale Serin-Threonin-Kinase Domäne sowie zwei N-terminale LOV Domänen⁶⁰. Die N-terminalen Photosensordomänen sind durch einen kurzen helicalen α -Linker mit der Kinasedomäne verbunden⁵³. Auch wenn LOV 1 und LOV2 untereinander eine hohe Sequenzhomologie aufweisen⁵⁴, besitzen sie doch unterschiedliche Funktionen⁶⁰⁻⁶². So reguliert LOV2 vornehmlich die Aktivität der Kinasedomäne, indem es nach der Anregung autophosphoryliert wird und durch Konformationsänderungen das Signal an eine C-terminal gelegene sog. α Helix weiterleitet. Im Dunkelzustand ist diese Helix an die β -Faltblattstruktur von LOV2 angelagert. Durch die Entkopplung der hochkonservierten α Helix wird dann die C-terminale Serin/Threonin Kinase aktiviert⁴⁸. LOV1 hingegen steuert und reguliert sowohl die Dimerbildung als auch die Photoaktivität von LOV2⁶³⁻⁶⁷. Da es sich sowohl bei LOV1 als auch bei LOV2 um klassische LOV Domänen handelt und sie die typischen Merkmale einer solchen besitzen, teilt man auch sie den Photorezeptoren der PAS Superfamilie zu⁵⁸. Als solche verlaufen die Photozyklen identisch wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Unter den Blaulichtrezeptoren nehmen Phototropine allerdings eine gewisse Sonderstellung ein, da sie als einzige zwei Flavin-bindende LOV Domänen in Tandemanordnung besitzen⁶⁰.

3.2.4. BLUF-Proteine

Die Abkürzung BLUF steht für *blue light sensing utilizing FAD*. Hierbei handelt es sich neben den LOV Domänen und Cryptochromen (s.u.) um die dritte Klasse von Proteinen, die ein Flavinderivat als Chromophor verwenden. Im Unterschied zu den beiden vorher diskutierten Flavin-enthaltenden Photorezeptoren wurden die BLUF Domänen erst vor relativ kurzer Zeit entdeckt und gerieten dann verstärkt in den wissenschaftlichen Fokus. Gomelsky *et al.* fanden im Jahr 2002 nach umfangreicher Genomanalyse die erste BLUF Domäne in dem blaulicht- und redoxsensitiven AppA Protein aus *Rhodobacter sphaeroides* ⁶⁸. Die Strukturen von BLUF und LOV Domänen sind einander sehr ähnlich und umfassen in der Regel ca. 100 – 110 Aminosäuren die im allgemeinen dem Strukturmotiv $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4\beta 5$ folgen ⁶⁹. In dieses α/β Motiv ist der FAD Chromophor nicht kovalent eingebunden und wird über Wasserstoffbrückenbindungen eng fixiert ⁷⁰. Der Photozyklus der BLUF-Domänen führt hierbei, im Gegensatz zu LOV Domänen nicht zu einer kovalenten Bindung des Chromophors zu der Seitenkette einer Aminosäure sondern lediglich zu einer Umlagerung des Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerkes (Abb. 14) ^{71, 72}.

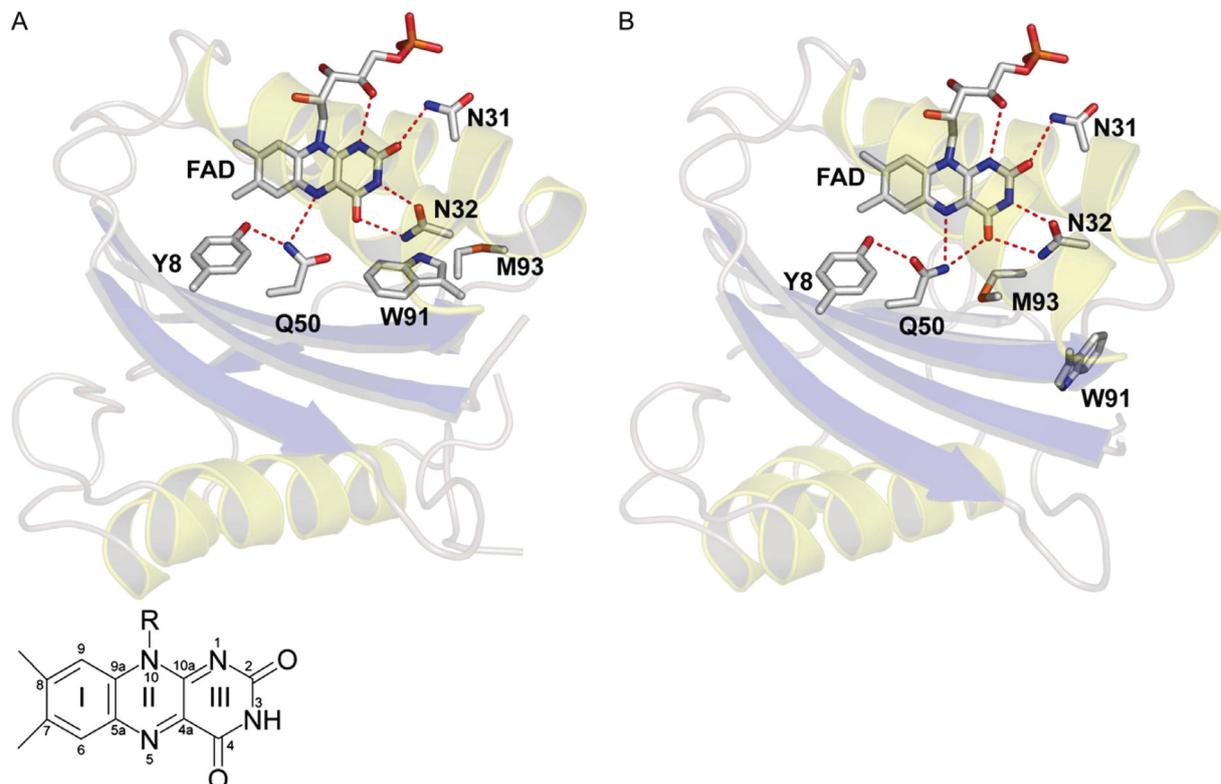


Abb. 14: Wasserstoffbindungsnetzwerk im dunklen (A) und belichteten Zustand (B) am Beispiel der Kristallstruktur der BLUF Domäne aus *Synechocystis* Slr1694 ^{71, 72}. Im unteren Bildteil ist die Struktur des Isoalloxazins dargestellt, welches die gemeinsame Kernstruktur der Flavine ist.

Eine besondere Bedeutung kommt in diesem Photozyklus den hochkonservierten Aminosäuren Tyrosin, Asparagin und Glutamin zu (in Slr1694 aus *Synechocystis*:

Tyr8, Gln50, Asn32; *RsAppA*: Tyr21, Gln63, Asn45)^{20, 72}. Ebenfalls von großem Interesse ist das konservierte Tryptophan (*Slr1694*: Trp91; *RsAppA*: Trp104). Dieses Tryptophan in relativer Nähe zum Flavin Chromophor ist Gegenstand einer über Jahre andauernden Kontroverse bezüglich der Kristallstruktur von *RsAppA* zwischen einerseits Anderson *et al.* und Kennis *et al.* und andererseits Domratcheva *et al.* und Jung *et al.* Während Anderson und Kennis, basierend auf schneller zeitaufgelöster UV/Vis- und IR-Spektroskopie vorschlagen, dass die Seitenkette des Trp104 im Kristall nach Innen in Richtung des Chromophors zeigt (Abb. 15, links)^{20, 71, 72}, postulieren Domratcheva und Jung, basierend auf *in silico* Berechnungen und NMR Spektren, dass die Seitenkette in der unbelichteten Struktur nach Außen vom Chromophor weggerichtet ist, während diesen Platz dann Met106 einnimmt (Abb. 15, rechts)⁷³⁻⁷⁵.

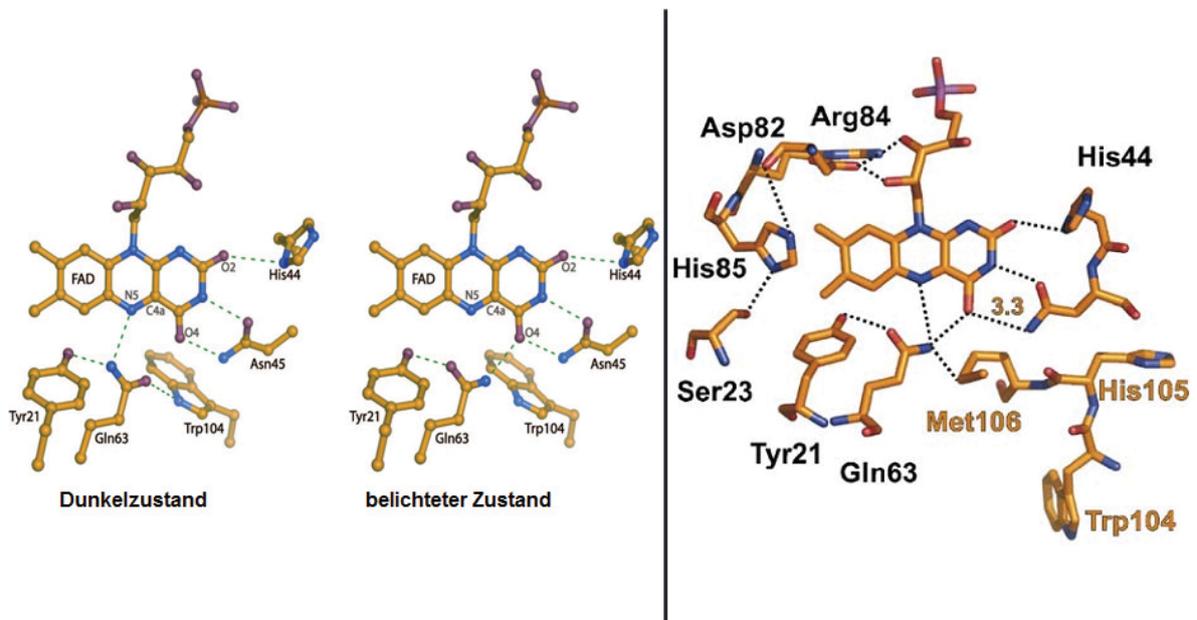


Abb. 15: Vergleich der beiden postulierten Funktionsmodelle der *RsAppA* BLUF Domäne durch Anderson und Kennis *et al.* (links)⁷⁶ bzw. Jung und Domratcheva *et al.* (rechts)⁷³.

Diese Kontroverse über die Kristallstruktur setzt sich dann auch in der Frage fort, wie der Photozyklus im Detail abläuft. Anderson *et al.* gehen hier davon aus, dass das Flavin, nachdem die Domäne durch blaues Licht angeregt wurde, nach Elektronen- und nachfolgender Protonenübertragung (Protonengekoppelter Elektronentransfer, PCET)⁷⁷ über das anionische in das neutrale Semiquinon übergeht. An diesem Prozess ist aufgrund der Kristallstruktur wahrscheinlich Tyr8 in *Slr1694* (Tyr21 in *RsAppA*) beteiligt^{78, 79}. Ein solcher Vorgang wurde unlängst auch bei anderen Flavinbindenden Enzymen festgestellt^{80, 81}. Aus diesem Semiquinon entsteht anschließend der belichtete Zustand mit rotverschobener Absorption. Dieses Photoprodukt ist nur

im Licht stabil und zerfällt dann über thermische Rückreaktionen in den Grundzustand ⁷⁶.

Während des Übergangs in den belichteten Zustand findet laut Anderson *et al.* eine Umorientierung der Seitenkette des zentralen Glutamins statt, nachdem durch den Protonen-gekoppelten Elektronentransfer die Wasserstoffbrücken von dort zum zuvor reduzierten FAD aufgebrochen wurden und nun neu geknüpft werden. Das vom neutralen in den anionischen Übergangszustand übergehende FAD ermöglicht die Rotation der Glutaminseitenkette, sodass sich ebenfalls das Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerk des Glutamins ändert und nun Wasserstoffbindungen zum C4=O und N5 des FAD aufgebaut werden ⁸². Dieser Zustand geht dann nach einigen Picosekunden in den belichteten Zustand über, der durch Wasserstoffbrückenbindungen vom Tyrosin zu der Carbonylgruppe des Glutamins stabilisiert wird (Abb. 16) ^{76, 83, 84}. Durch lichtinduzierte FTIR Differenzspektroskopie in Kombination mit Isotopen-Markierungen konnte gezeigt werden, dass vor allem das Protein eine konformelle Änderung durchläuft, das FAD hingegen kaum ⁸⁵⁻⁸⁷.

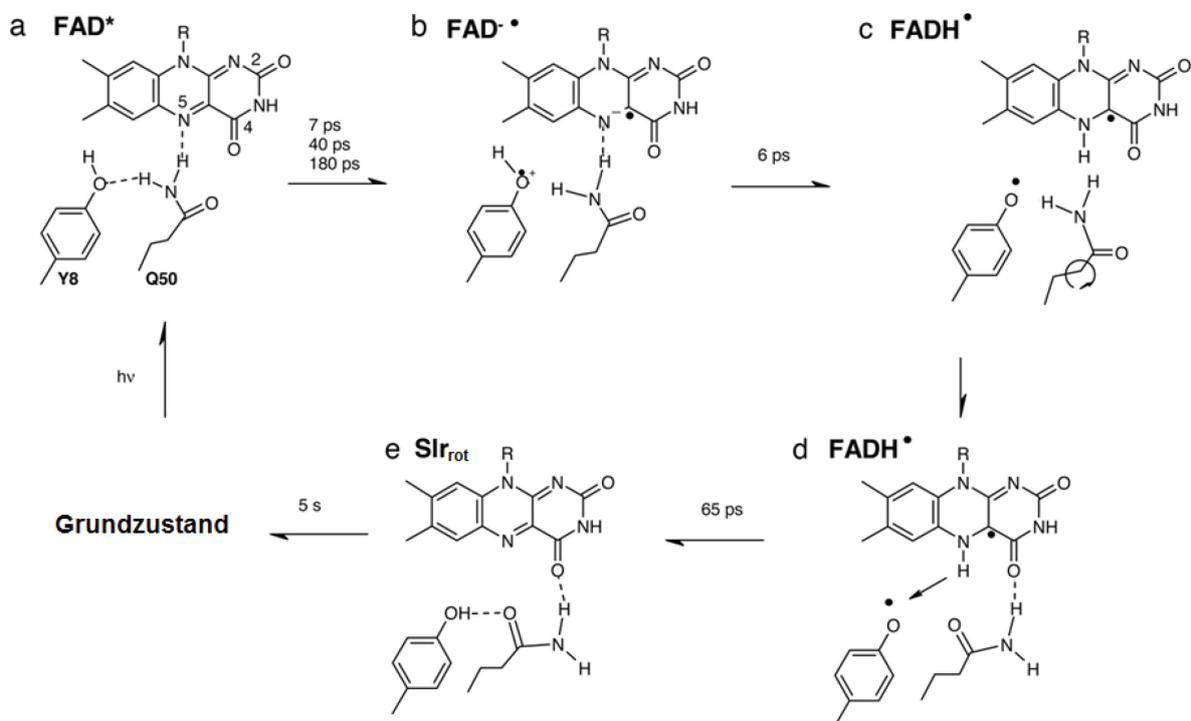


Abb. 16: BLUF Photozyklus entsprechend dem Postulat von Kennis *et al.* ⁷⁶. Die kurzzeitige Rotation des Gln50 wird in Schritt C durch einen entsprechenden Kreispfeil dargestellt.

Domratcheva *et al.* stellen, basierend auf *in silico* Berechnungen die Hypothese auf, dass es sich im belichteten Zustand bei der zweiten Spezies des Glutamins nicht um

ein Glutamin mit rotierter Seitenkette handelt, sondern lediglich um eine tautomere Form und damit um eine Subpopulation des Dunkelzustandes^{75, 88}. Jedoch stellen sich die Hypothesen von Anderson und Kennis *et al.* bislang noch am plausibelsten dar. Domratcheva *et al.* stützen sich sehr auf Ihre *in silico* Modelle und die aus QM/MM (Quantenmechanischen/ Molekülmechanischen) Modellen berechneten Abstände der jeweiligen Seitenketten und des Chromophors. Darüber hinaus weisen Kruse *et al.* auf die Ungenauigkeiten des von Domratcheva verwendeten Algorithmus (B3LYP/6-31G**) hin, der sowohl die London Kräften außer Acht lässt als auch einen Basissatz-Superpositionsfehler zeigt⁸⁹. Kruse *et al.* schlagen daher vor, den verbesserten B3LYP-gCP-D3/6-31G* Algorithmus zu verwenden, der genau diese beiden Fehlerquellen behebt.

3.2.5. Cryptochrome

1997 stellten Ahmad und Cashmore fest, dass durch Mutationen des Genlocus HY4 in *Arabidopsis thaliana* die betroffenen Pflanzen während des blaulichtabhängigen Hypokotylwachstums nicht mehr in der Lage waren, speziell blaues Licht zu detektieren⁹⁰. Durch Analyse des HY4 Gens bzw. Genprodukts zeigte sich eine signifikante Homologie zu DNA Photolyasen, so dass das dort kodierte Protein als Flavin-Photorezeptor charakterisiert und später als Cryptochrom-1 (Cry1) benannt wurde. Cryptochrome gehören also zur Superfamilie der Cryptochrome/Photolyasen. Proteine dieser Familie sind weit verbreitet und in vielen Bakterien und Eukaryoten zu finden, Photolyasen finden sich darüber hinaus auch in Prokaryoten und Archaeen. Anfang der Zweitausender Jahre wurde mit den sogenannten CryPro eine neue Klasse von Cryptochromen in Proteobakterien entdeckt. Allgemein wird angenommen, dass sich die Cryptochrome aus den Photolyasen entwickelt haben und neben dem UV-Schutz auch weitere Aufgaben übernahmen⁹¹. Der dennoch hohe Verwandtschaftsgrad wird durch Sequenzvergleiche deutlich sichtbar (Abb. 17).

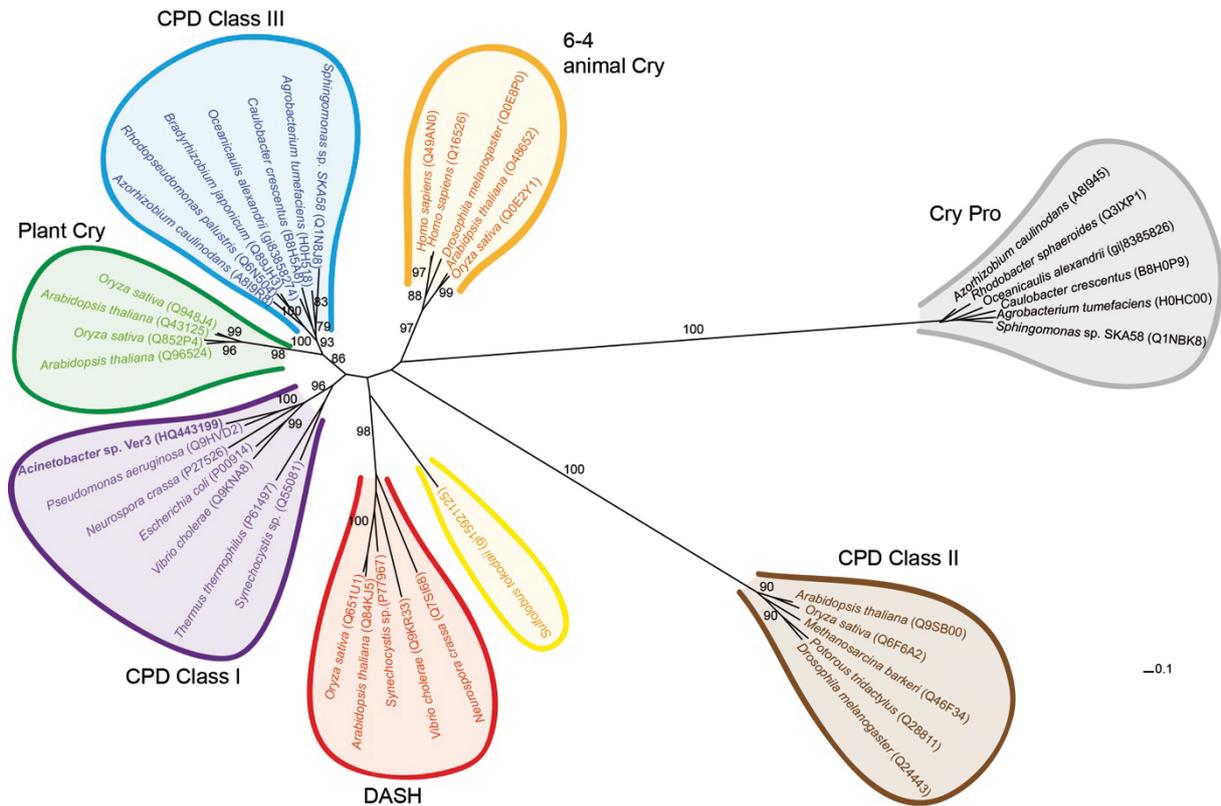


Abb. 17: Phylogenetischer Baum der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie ⁹².

Bei Cryptochromen handelt es sich, genau wie bei Photolyasen, um Flavoproteine, die in der Regel zwei Chromophore besitzen. Zum einen ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und darüber hinaus ein Pterin/Lumazin oder ein modifiziertes Flavin als Antennencofaktor ^{93, 94}. Darüber hinaus wurde kürzlich in dem Cryptochrom *RsCryPro* aus *Rhodobacter sphaeroides* ein [4Fe-4S] Eisen-Schwefel Cluster als zusätzlicher Cofaktor entdeckt ⁹⁵. Mit diesen Cofaktoren sind Cryptochrome in der Lage, je nach Kombination Wellenlängenbereiche vom UV-B bis hin zum blauen Bereich zu nutzen. Trotz ihrer hohen Sequenzhomologie zu Photolyasen, speziell CPD Photolyasen (s.u.), besitzen Cryptochrome keine DNA-Reparaturfunktion, sondern fungieren vornehmlich als Transkriptionsfaktor für regulatorische Funktionen im zirkadianen Rhythmus von Pflanzen und Tieren sowie in der Photomorphogenese der Pflanzen ^{96, 97}. Darüber hinaus werden sie als Magnetorezeptor zum Beispiel in Insekten oder Zugvögeln vorgeschlagen ⁹⁸. Eine Ausnahme bilden hier Cry-DASH Proteine (DASH = **D**rosophila **A**rabidopsis **S**ynechocystis **H**uman), da sie sowohl den Cryptochromen zugehörig sind als auch CPD Läsionen spalten können ⁹⁹.

Cryptochrome sind im Allgemeinen in zwei Domänen aufgeteilt, eine N-terminale PHR Domäne (Photolyasehomologe Region) und eine C-terminale Cryptochromspezifische Domäne (CCE, **C**ryptochrome **C**-terminal **E**xtension). Weiterhin lässt sich die PHR Domäne in eine α/β Domäne, in der der Pterincofaktor lokalisiert ist und eine helicale Domäne aufteilen, in der das FAD nicht kovalent gebunden ist,⁹⁶. FAD ist in der Lage einen breiten Spektralbereich zu absorbieren, welcher hauptsächlich im blauen und nahen UV-Bereich liegt. Da FAD in der Lage ist, zwei Elektronen aufzunehmen, existiert es in drei verschiedenen Redox Zuständen, oxidiert (FAD), semireduziert (anionisch radikales $\text{FAD}^{\bullet-}$ oder neutrales radikales FADH^{\bullet}) sowie im vollständig reduzierten Zustand (FADH^- oder FADH_2 , Abb. 18).

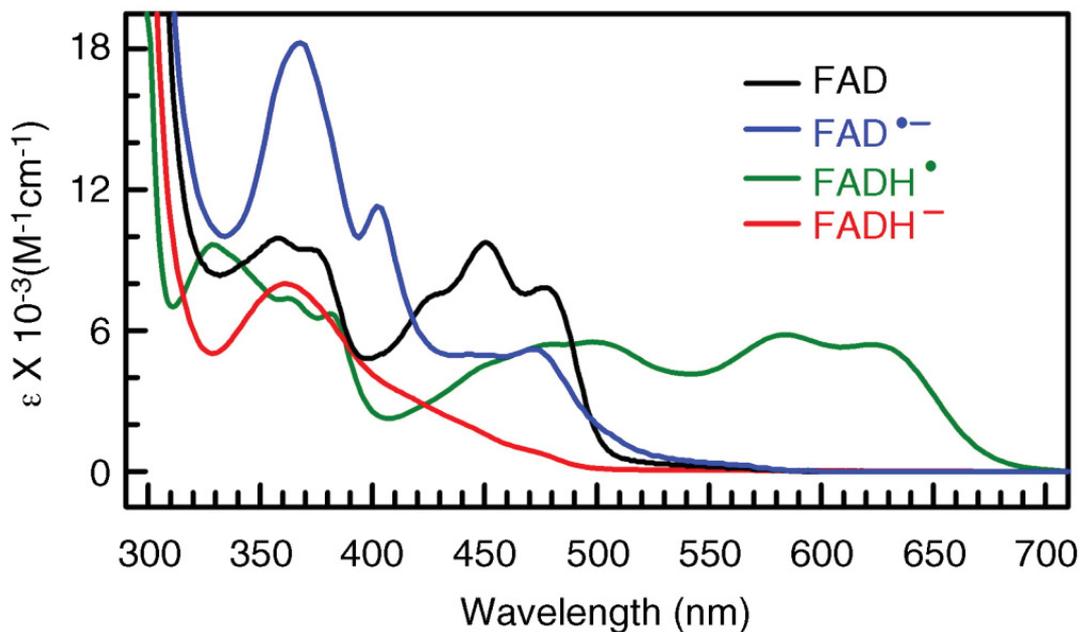


Abb. 18: Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der verschiedenen Redoxzuständen von FAD¹⁰⁰.

Von diesen Redox Zuständen absorbieren der oxidierte Zustand und das anionische Semiquinonradikal am effizientesten blaues Licht im Bereich 400 – 500 nm, so dass angenommen wird, dass das oxidierte Flavin den Grundzustand in AtCry darstellt¹⁰¹.¹⁰² Durch Lichtabsorption wird das Flavin dann reduziert und kann über das neutrale Semiquinonradikal FADH^{\bullet} bis zum voll reduzierten FADH_2 oder FADH^- überführt werden^{102, 103}.

3.2.6. Photolyasen

In die gleiche Proteinklasse wie die Cryptochrome fallen phylogenetisch auch die Photolyasen. Sie zeigen allerdings eine vollständig andere lichtinduzierte Funktion, indem sie Blaulicht-induziert Strahlenschäden in der DNA reparieren. Der Schutz vor ultravioletter Strahlung ist für Lebewesen und speziell für einzellige Organismen von größter Bedeutung. Da Proteine bei 280 nm und DNA sowie RNA bei 260 nm absorbieren, können diese beiden Klassen von Biomolekülen durch UV-Strahlung schwerwiegend geschädigt werden. Können Mikroorganismen diese Schäden nicht reparieren, so bedeutet dies in vielen Fällen den Zelltod^{104, 105}. Neben den Reparaturmechanismen der Photolyasen gibt es noch die etwas rudimentäreren Mechanismen der Exzisionsreparatur. Dieser Prozess bedarf der enzymatischen Erkennung des schadhafte DNA Segmentes und dessen Entfernung. Anschließend wird die entfernte Region anhand des intakten komplementären Stranges neu synthetisiert und wieder in den fortlaufenden Strang ligiert¹⁰⁶. Bei der Basenexzisionsreparatur (BER: base excision repair) werden Fehler, häufig in Form oxidierter, alkylierter oder deaminierter Basen, durch spezifische DNA-Glykosylasen erkannt und entfernt^{107, 108}. Eine Endonuklease fügt dann anschließend einen Einzelstrangbruch im Zucker-Phosphat-Rückgrat ein, so dass eine Polymerase komplementär zum intakten Strang die entfernte Base ersetzen kann. Unterschieden werden hier die „short patch repair“, bei der nur einzelne Basen ausgetauscht werden und die „long patch repair“, bei der bis zu 20 Basen ersetzt werden. Darüber hinaus ist noch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER: nucleotide excision repair) beschrieben, bei der sogenannte „bulky lesions“ (Buckel im DNA Molekül) erkannt und entfernt werden. Dabei kann es sich sowohl um CPDs (**C**yclobutan **P**irimidin **D**imer) als auch um 6-4PP (6-4 Photoschaden) handeln. Dabei wird zunächst ein bis zu 25 – 30 Basen langer Abschnitt der DNA, in dem eine Läsion vorliegt, entfernt. Anschließend wird ebenfalls der Strang passend zum komplementären Strang neu synthetisiert und eventuell vorhandene Strangbrüche ligiert¹⁰⁹. Am häufigsten treten dabei in der DNA sogenannte Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) auf, so dass es für Polymerasen unmöglich wird, die DNA weiter abzulesen.

Im Jahr 1949 wurden von Kelner *et al.* die ersten Photoreparaturvorgänge beobachtet und beschrieben. Die Beobachtung, dass nach Strahlenschädigung die höchsten Überlebensraten in den Proben zu verzeichnen waren, die dem durch ein

Fenster einfallendes Tageslicht am meisten ausgesetzt waren, führte Kelner schon damals zu der Annahme, dass Licht bei der Erholung von UV-Schäden eine essentielle Rolle spielen muss¹¹⁰⁻¹¹². Im Jahr 1958 postulierten Rupert *et al.*, dass aufgrund der Temperaturabhängigkeit und der Aktivierungsenergie für die Photoreparatur ein enzymatisch kontrolliertes System zugrunde liegen musste¹¹³. Dies setzte den Startpunkt einer immer stärker wachsenden Forschung im Bereich der DNA-Reparatur. Im Verlauf dieser Forschung wurden die Schäden, die hoch-energetische Strahlung in DNA verursachen kann, näher spezifiziert und kategorisiert. Wie erwähnt, sind die am häufigsten vorkommenden Schäden die zwischen Pyrimidinen entstehenden Cyclobutanpyrimidindimere (T<>T) und die Pyrimidin-Pyrimidin (6-4) Photoprodukte (Abb. 19).

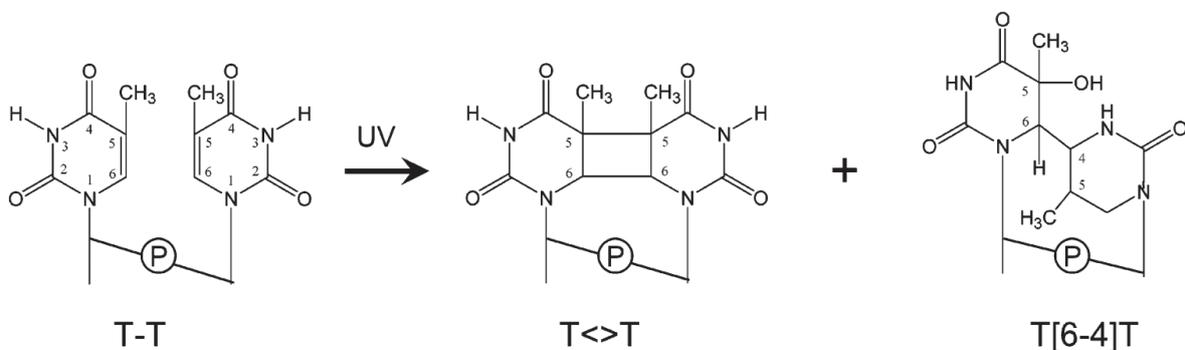


Abb. 19: Molekularstruktur der am häufigsten vorkommenden UV-induzierten DNA Photoprodukte: Cyclobutanpyrimidin-Dimer (T<>T, Mitte) aus zwei benachbarten Thymidinen (links) und Pyrimidin-Pyrimidin (6-4) Photoprodukt (T[6-4]T, rechts), hier dargestellt an Hand zweier benachbarten Thyminbasen. Diese Schäden können allerdings auch zwischen allen anderen Pyrimidinen wie T-T, T-C, C-T und C-C entstehen. Einzige Ausnahme ist hier das (6-4) Photoprodukt, welches nicht bei der Kombination C-T entstehen kann¹¹⁴.

Die für die Photoreparatur identifizierten Enzyme werden als Photolyasen bezeichnet. Sie sind flavinhaltige Photorezeptoren, die in der Lage sind, an diese CPDs zu binden. Mit Hilfe eines Antennen- und eines semi-reduzierten FAD-Cofaktors absorbieren sie ultraviolettes und blaues Licht, wodurch der FAD-Cofaktor in die Lage kommt, ein Elektron von einem externen Redoxpartner zu rekrutieren. Zunächst wird die Energie von dem Antennencofaktor auf das Flavin übertragen. Dies geschieht durch den von Förster beschriebenen Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET), vermittelt durch eine in der Photolyase lokalisierte Tryptophantriade. Nachdem das Flavin in den angeregten Semiquinon-Zustand übergegangen ist, entzieht es dem nächstgelegenen Tryptophan (Trp382, die Zählweise folgt der Photolyase aus *E. coli*, EcPhr) ein Elektron, so dass eine dadurch induzierte Elektronentransferkaskade in Gang gesetzt wird. Die positive Ladung wird nun spontan von Tryptophan zu Tryptophan weitergereicht (Trp382 > Trp359 >

Trp306, die Zählweise folgt der Photolyase aus *E. coli*, EcPhr). Das schlussendlich positiv geladene Trp306⁺ Radikal stabilisiert nun im Anschluss das anionische Flavin¹¹⁵. Das so aktivierte FAD Molekül, das in der Nähe der DNA-Bindedomäne lokalisiert ist, kann so das erhaltene Elektron in das Pyrimidindimer einspeisen und dadurch das Cyclobutyl-Dimer trennen und die DNA wieder in ihren Ursprungszustand zurückzusetzen. Das Elektron wird nach erfolgter Ringspaltung wieder auf das FAD zurückübertragen.

Unterteilt werden diese lichtgetriebenen Enzyme zunächst nach ihrer Substratspezifität in CPD-Photolyasen, die Cyclobutan-Pyrimidindimere spalten können und in (6-4)-Photolyasen, die (6-4)PP-Schäden beheben können, CPD-Photolyasen werden weiterhin aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie in Klasse I und Klasse II unterteilt. Klasse I-Photolyasen kommen vor allem in Mikroorganismen vor, wohingegen (6-4)-Photolyasen in höheren Organismen vorkommen¹¹⁶.

Eine der am genauesten charakterisierten Photolyasen ist EcPhr aus *Escherichia coli*. Hierbei handelt es sich um ein ca. 53 kDa großes und aus 472 Aminosäuren bestehendes monomeres Protein¹¹⁷. EcPhr gehört zu den Photolyasen der CPD Klasse I und besitzt zwei nicht-kovalent gebundene Cofaktoren: ein FAD, das bei der Reparatur der beschädigten DNA eine direkte Rolle spielt, und zum Anderen den Antennen-Cofaktor 5,10-Methylentetrahydrofolat (MTHF) mit dem Absorptionsmaximum bei 360 nm^{118, 119}, der dazu dient, den Absorptionsbereich für das zur Reparatur benötigte Licht zu vergrößern. Im Weiteren ist der zweite Cofaktor allerdings nicht maßgeblich an der katalytischen Funktion der Photolyase beteiligt¹¹⁷. EcPhr besitzt fünf β -Faltblattstränge, zwanzig α -Helices, sowie fünf 3_{10} -Helices. Die Tertiärstruktur ist auch hier in eine α/β -Domäne (Aminosäuren 1 - 131) und eine helikale Domäne unterteilt (204 - 469). Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich eine Linkerregion (132 - 203). Die α/β -Domäne weist eine für Dinukleotid-bindende Domänen typische Strukturen auf und beinhaltet darüber hinaus die MTHF-Bindedomäne^{118, 120}. Die helikale Domäne beherbergt die FAD-Bindestelle sowie einen polaren „Tunnel“, der von der Oberfläche des Proteins zu dem FAD-Molekül führt und somit das aktive Zentrum darstellt. Durch Anregung erfährt dieses polare Zentrum eine Reihe von lokalen Relaxationen, beginnend im Bereich einiger

Femtosekunden bis hin zu einer Nanosekunde. Diese Dynamik ist essentiell für eine optimale Erkennung der DNA Schäden und der Minimierung der Aktivierungsenergie¹²¹⁻¹²³. Das FAD-Molekül selbst wird über Wasserstoffbrückenbindungen in der Proteintasche gehalten. Hierbei haben Mutationen besonders an der Stelle Asn378 (Positionsangabe bezogen auf das Enzym aus *E. coli*, siehe Abb. 20 B) ergeben, dass besonders diese Aminosäure sehr wichtig sowohl zur Stabilisierung des FAD-Cofaktors als auch für die Katalyse ist¹¹⁷.

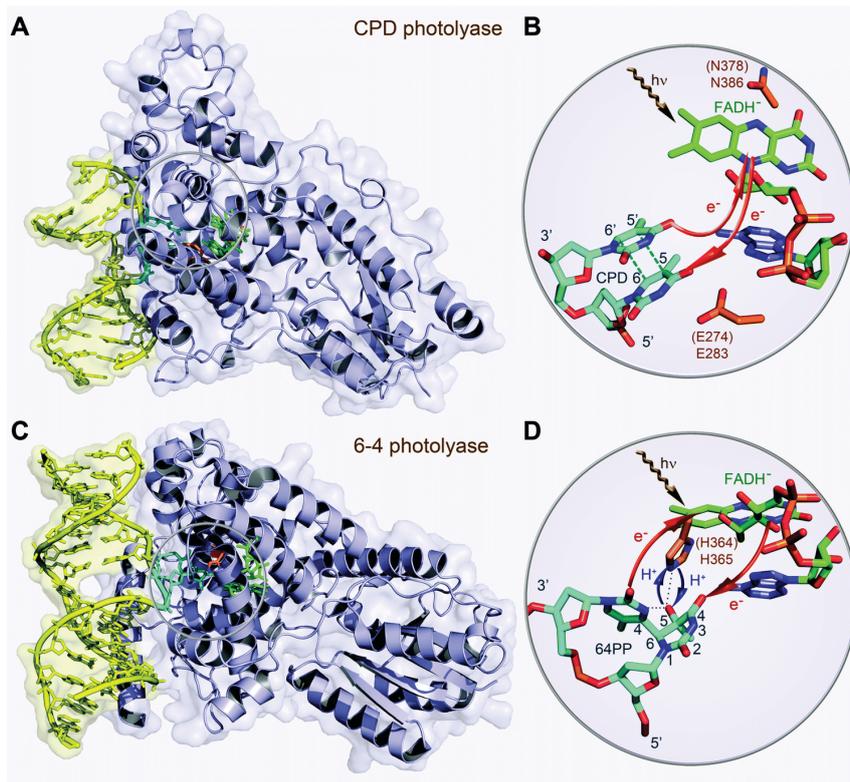


Abb. 20: Kristallstruktur einer CPD- (A) und 6-4 Photolyase (C) jeweils mit gebundenem, UV-geschädigtem Substrat. (B) und (D) zeigen im Detail die jeweiligen Positionen des FAD Moleküls bezüglich der Läsion mit ausgewählten funktionell als essentiell charakterisierten Aminosäuren¹²².

Für die beiden am häufigsten auftretenden Schäden, die Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) und die Pyrimidin-Pyrimidin (6-4) Photoprodukte ((6-4)PP) besitzen die entsprechenden substratspezifischen Photolyasen zwei grundlegend ähnliche cyclische Reparaturmechanismen, die sich jedoch in kleinen Einzelheiten unterscheiden (vgl. Abb. 21 und Abb. 22). Im Grund- (bzw. inaktiven) Zustand befindet sich der FAD-Cofaktor in der Regel in der negativ geladenen bzw. der ungeladenen Semichinonform. Diese wird durch die Absorption von blauem Licht in die vollständig reduzierte Form überführt. Bindet also nun die Photolyase an eine vorhandene Pyrimidin-Dimeren-Struktur, wird als erster Schritt der betroffene DNA-Strang aus der Doppelhelix herausgezogen und in das aktive Zentrum der Photolyase eingelagert¹²².

Das zur Reparatur „verwendete“ Licht (300 – 500 nm) besitzt nicht genug Energie, um die Läsionen in der DNA direkt zu spalten, da diese im Wellenlängenbereich länger als 250 nm nicht ausreichend absorbieren. Daher kommt es bei der Reparatur nicht zu einem direkten Energietransfer, sondern zur Übertragung eines einzelnen Elektrons vom Flavinchromophor der Photolyase zum CPD ¹¹⁴. Ob das Elektron vom Adeninrest oder dem Isoalloxazinsystem auf die Läsion übertragen wird, ist noch Grundlage einer andauernden Debatte. Vieles spricht laut Liu *et al.* jedoch für einen Elektronentransfer durch den Adeninrest auf das 5'-C der Läsion ¹²². Diese Elektronenabgabe geschieht nur, nachdem der Flavinchromophor durch blaues Licht direkt oder durch Energietransfer vom Antennencofaktors indirekt in den angeregten Zustand gebracht wird. Nachdem das Elektron auf das CPD übertragen wurde, werden die beiden basenverbindenden Bindungen des Cyclobutanrings im Dimer eine nach der anderen innerhalb von Picosekunden aufgebrochen. Kurz darauf kehrt das Elektron von dem nun negativ geladenen Pyrimidin zum FAD der Photolyase zurück und schließt damit den Reparaturzyklus ab ^{124, 125}. Es kann allerdings mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch zu einer Elektronen-Rückführung kommen, so dass keine Reparatur zustande kommt (mittlerer Reaktionsweg in Abb. 21).

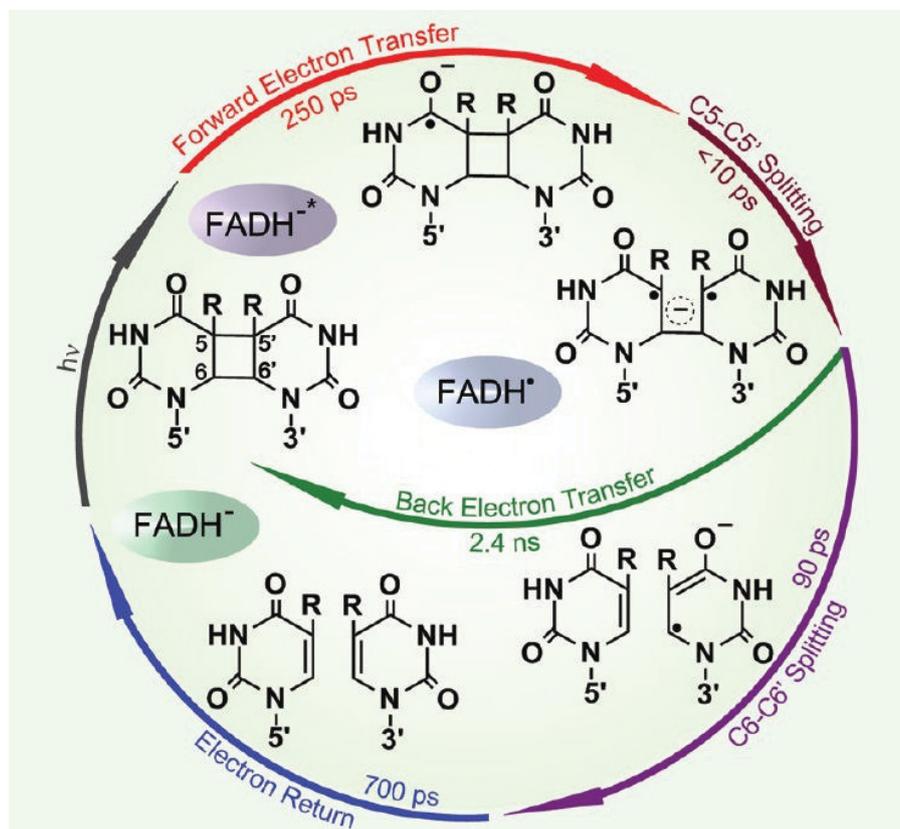


Abb. 21: Reaktionszyklus der Photoreparatur eines Cyclobutanpyrimidin Dimers durch eine CPD Photolyase ¹²⁴.

Für die Reparatur eines (6-4) Photoprodukts wurde ein ähnliches Modell vorgeschlagen (Abb. 22).^{126, 127} Dieses Modell wurde an Hand der Reaktion der (6-4) Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* aufgestellt. Auch hier wird zunächst ein einzelnes Elektron von dem negativ geladenen FAD auf das (6-4) Photoprodukt (6-4PP) übertragen, gefolgt von einem Protonentransfer von einem Histidin im aktiven Zentrum (His364 in 6-4PP aus *A. thaliana*) der Photolyase (Struktur II). Dieser Schritt steht in Konkurrenz mit einer Rückreaktion und besitzt eine Reparaturausbeute von 0,1, d.h., (6-4) Photolyasen weisen eine relativ geringe Reparatureffizienz auf. Nach Einführung eines ‚externen‘ Protons folgt ein intramolekularer Protonentransfer von der Hydroxylgruppe des C5 der 5' Base zum N3 der 3' Base. Dies führt zu einem Übergangs-Zwitterion (Struktur III), welches nun einen radikalischen Angriff des zentralen Sauerstoffatoms auf die C4 Position der 3' Base durchführt, so dass es zu einer vorübergehenden Oxetanstruktur kommt. Nach der Auflösung dieser Oxetanstruktur geschieht innerhalb von Nanosekunden ein Protonen- sowie Elektronenrücktransfer^{125, 126}.

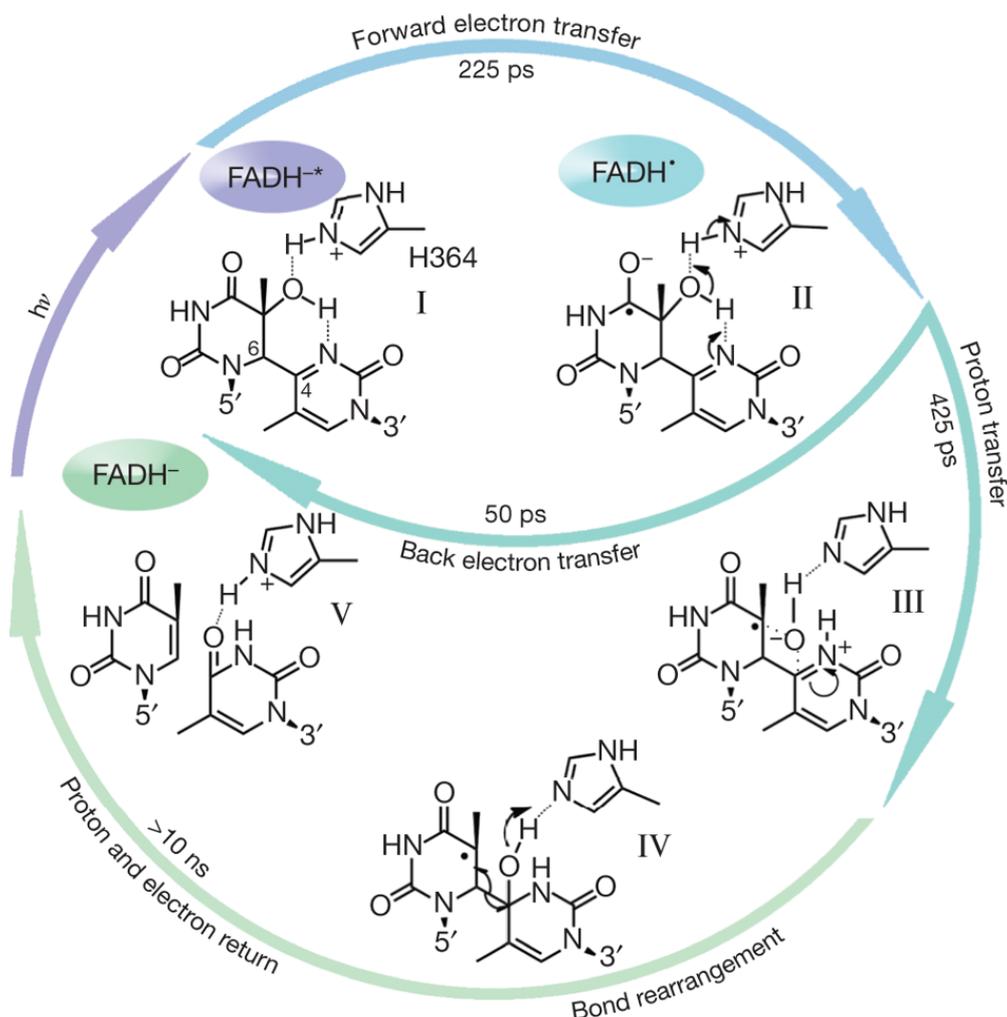


Abb. 22: Reaktionszyklus der Photoreparatur eines (6-4) Photoprodukts durch eine 6-4 Photolyase¹²⁶.

3.2.7. Bacteriorhodopsine

Anfang der 1970er Jahre entdeckten Oesterhelt und Stoeckenius ein purpurfarbendes Rhodopsin-ähnliches Membranprotein in dem Archaeon *Halobacterium salinarum* welches Retinal (Vitamin-A Aldehyd) im Verhältnis 1:1 bindet und in Analogie zu tierischen Rhodopsinen Bacteriorhodopsin (BR) genannt wurde ¹¹. Kurz darauf charakterisierten sie die Funktion dieses Membranproteins als lichtinduzierbaren Protonentransporter ¹²⁸. Der durch den aktiven Transport entstehende Protonengradient kann dann von ATP-Synthasen zur Herstellung von ATP verwendet werden. Damit war eine neue, sehr vereinfachte Form der Photosynthese entdeckt, die sich deutlich von der bekannten Photosynthese von Pflanzen unterschied.

Der Bacterio-Opsin genannte Proteinanteil, welcher zusammen mit dem Chromophor Retinal das Bacteriorhodopsin bildet, ist ein Teil der Superfamilie der Rhodopsine, zu der auch die G-Protein-gekoppelten tierischen Rhodopsine gehören. Bei Bacteriorhodopsin handelt es um ein Transmembranprotein bestehend aus sieben α -Helices, die die Zellmembran überspannen (Molekulargewicht: 26 kDa) ^{10, 129}. Sie binden im Inneren des Membranbündels den Chromophor. In den hier diskutierten mikrobiellen Rhodopsinen (wie z.B. BR) liegt im Dunkelzustand der Chromophor in einem Gleichgewicht zwischen 13-*cis* und all-*trans* Form vor. Er ist über eine protonierte Schiffsche Base mit einem Lysin des Proteinteils verbunden.

Belichtung des BR führt zum Durchlaufen eines Photozyklus, in dem ein Proton nach außen geschleust und ein weiteres Proton aus dem Zellinneren aufgenommen wird (Abb. 23). Durch Absorption von Licht wird der BR Photozyklus gestartet, in dessen Verlauf die all-*trans* Form des Retinals in die 13-*cis* Form übergeht und deprotoniert wird. Das abgegebene Proton gelangt über eine Transportkette in das umgebende Medium. Diese deprotonierte 13-*cis* Form nimmt während einer Dunkel-Rückisomerisierung ein Proton aus dem Zellinneren auf und kehrt in die all-*trans* Form zurück ^{130, 131}.

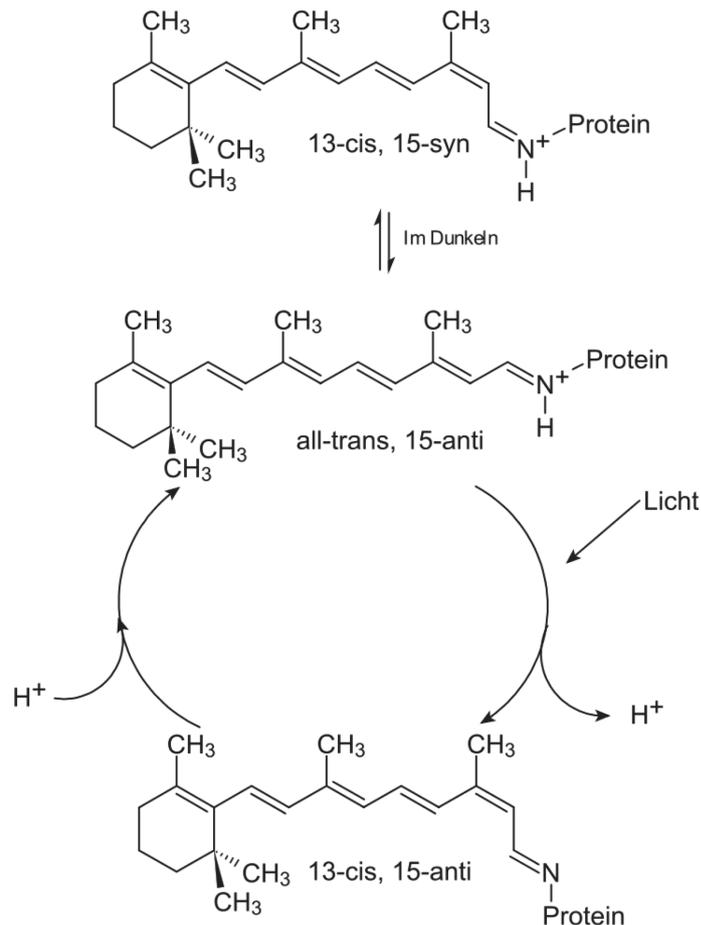


Abb. 23: Photozyklus von Bacteriorhodopsin ¹³².

Die Rhodopsine in Tieren sind in der Regel Proteine der Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren ^{130, 133-135}. Bezogen auf die Sequenz besitzen die beiden Familien der Rhodopsine fast keine Homologien, darüber hinaus binden die tierischen Rhodopsine das 11-*cis* Isomer des Retinals. Dennoch ist die hepta-helikale Tertiärstruktur, wie oben beschrieben, sowohl bei bakteriellen als auch tierischen Rhodopsinen zu finden. Aus diesem Grund und aufgrund der ähnlichen Funktion werden Bacteriorhodopsine und tierische Rhodopsine entsprechend in Typ I und Typ II Rhodopsine unterteilt. So führen Typ I-Proteine (Bacteriorhodopsine) in der Regel Funktionen wie Ionenpumpen, -Kanäle oder -Sensoren aus.

Typ II (tierische Rhodopsine) erfüllen hingegen komplexere Aufgaben, wie zum Beispiel als Teil des Sehapparates, dem Erfassen von Licht oder nicht-visuelle Vorgänge wie der circadianen Rhythmik, der Horizonterfassung oder saisonabhängiger Fortpflanzung. Dazu katalysieren sie, aktiviert durch Licht, hauptsächlich den Austausch von GDP durch GTP an der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Dieser Austausch führt zu einer Instabilität des G-Protein

Heterotrimers und schlussendlich zu einer Dissoziation der α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit. Diese Konformationsänderung hat über die Aktivierung einer Phosphodiesterase, die das Schließen eines Ionenkanals bewirkt, eine Signaltransduktion zur Folge. Die Inaktivierung des Komplexes wird durch eine intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit durchgeführt, welche unter Mithilfe von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) das gebundene GTP in GDP und P_i spalten ¹⁰. Nach dieser selbstregulierten Inaktivierung reassoziieren die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit wieder und stehen für erneute Aktivierung zur Verfügung ^{136, 137}.

3.2.8. Bacterio-Opsin Aktivator

Bezogen auf die soeben kurz dargestellte Gruppe der Rhodopsine wurde in dieser Arbeit auch ein Protein untersucht, das für die Biosynthese von Bacteriorhodopsin bedeutend ist. Die Expression des Bacteriorhodopsins (Kapitel 3.2.7) wird durch den sogenannten *bop* Gencluster reguliert. Dieser besteht aus mindestens drei Genen, *bop* (Bacterio Opsin), *brp* (Bacterio-Opsin ähnliches Protein, bacterio opsin related protein) und *bat* (Bacterio-Opsin Aktivator) ¹³⁸. Wachstumsuntersuchungen und Knock-out Mutanten legten nahe, dass die Expression dieses Genclusters maßgeblich vom Sauerstoffpartialdruck und der Lichtintensität abhängig ist, woraufhin Shand *et al.* einen Regulationsmechanismus wie in Abb. 24 postulierten ¹³⁹⁻¹⁴¹.

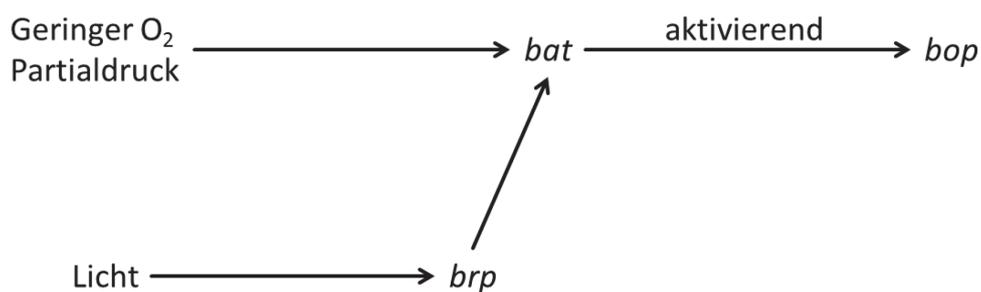


Abb. 24: Modell für die Regulation des *bop* Genclusters ¹³⁹.

Neben der Aktivierung des *bop* Genclusters fördert Bat durch Bindung an eine 15 bp lange Konsensus Sequenz (als „upstream activator sequenz“ UAS benannt) die Transkription des Gens *blp* („bacterio-opsin linked product gene“). Diese Region weist eine Sequenzidentität mit einem Abschnitt oberhalb („upstream“) des *bop* Gens auf, was ebenfalls darauf hinweist, dass Bat in beiden Fällen aktivierend wirkt ¹⁴².

Durch das Einfügen von DNA Fragmenten verschiedener Länge konnte nachgewiesen werden, dass in fast allen Fällen, in denen die Entfernung zwischen der UAS Region und dem *bop* Promotor vergrößert wurde, die Transkription um mehr als die Hälfte zurückging¹⁴³. Das Gen *blp* ist nachfolgend („down-stream“) an das *bat* Gens lokalisiert und wird konvergent mit diesem transkribiert wird, codiert Enzyme, die β -Carotin in Retinal umwandeln. Es ist allerdings nicht weiter in die Regulation des *bat* Gens involviert¹⁴³⁻¹⁴⁵. Sequenzanalysen des *bat* Genes ergaben, dass der dort kodierte Transkriptionsfaktor aus einer GAF Domäne, einem C-terminalen DNA-bindenden Helix-turn-Helix (HtH) Motiv und einer als PAS/PAC annotierten Domäne besteht¹⁴⁶. Für die GAF Domäne ist keine Chromophorbinding nachgewiesen. PAC Domänen sind in der Regel eng verknüpft mit PAS Domänen und bilden zusammen mit ihnen die tertiäre PAS Struktur aus. Die Unterscheidung in der Bezeichnung dieser beiden Domänen beruht auf den gravierenden Sequenzunterschieden in der Region, die die beiden Abschnitte verbindet (PAS PMID: IPR000014; PAC PMID: IPR001610)⁴². Im Falle der PAS/PAC Domäne des Bacterio-Opsin Aktivators (Bat) handelt es sich spezifischer um eine Flavin-bindende LOV-Domäne, so dass man postulieren könnte, dass die Bacterio-Opsin Biosynthese durch Blaulicht gesteuert wird. Untersuchungen am Bat Protein sind daher ebenfalls Teil dieser Dissertation. Dennoch weisen die ansonsten sehr homologen Bat-LOV Domänen einige bemerkenswerte Unterschiede in der Aminosäuresequenz zu kanonischen LOV-Domänen auf. So ist im Falle der Bat-LOV Domäne aus dem extrem halophilen Stamm *Halobacterium salinarum* das essentielle Cystein, welches in den kanonischen LOV Domänen die kovalente Bindung zum Flavin eingeht (*BsYtvA*: C62) durch ein Histidin ersetzt und anstelle des ebenfalls hochkonservierten Arginins (*BsYtvA*: R79), welches über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Phosphatrest des FMN-Chromophors interagiert, befindet sich ein Tryptophan. Darüber hinaus postulierten Möglich *et al.* kürzlich, dass die blaulichtinduzierte Aktivität der BatLOV Domäne trotz des fehlenden Cysteins für die Adduktbildung durch ein negativ geladenes Semiquinon ermöglicht wird. Diese Möglichkeit der Aktivierung wiesen sie darüber hinaus auch in anderen LOV Domänen nach, in denen das natürliche Cystein durch ein Alanin ersetzt war. Dieser Vorgang war in der BatLOV Domäne aus *Halobacterium salinarum* aufgrund von aromatischen Aminosäuren im direkten Umfeld des Flavincofaktors kaum auszumachen, konnte jedoch durch die Mutation dieser Aminosäuren deutlich sichtbar gemacht werden. Besonders Tyr163, Tyr247

und Trp172 haben eine besonders quenchende (auslöschende) Wirkung auf die Lebenszeit des angeregten Zustandes (vgl. Abb. 25, ¹⁴⁷). Nach Möglich *et al.* ist das N5 des Flavins essentiell für den Photozyklus in LOV Domänen ohne Cystein. Eine Protonierung des N5 führt zu einer Konformationsänderung des benachbarten konservierten Glutamins und damit zur Aktivierung der Domäne. Auch im Blaulichtrezeptor VVD lässt sich eine ähnliche Photochemie nach weisen, die dort zu einer Dimerisierung führt, wie von Möglich *et al.* nachgewiesen werden konnte ¹⁴⁷.

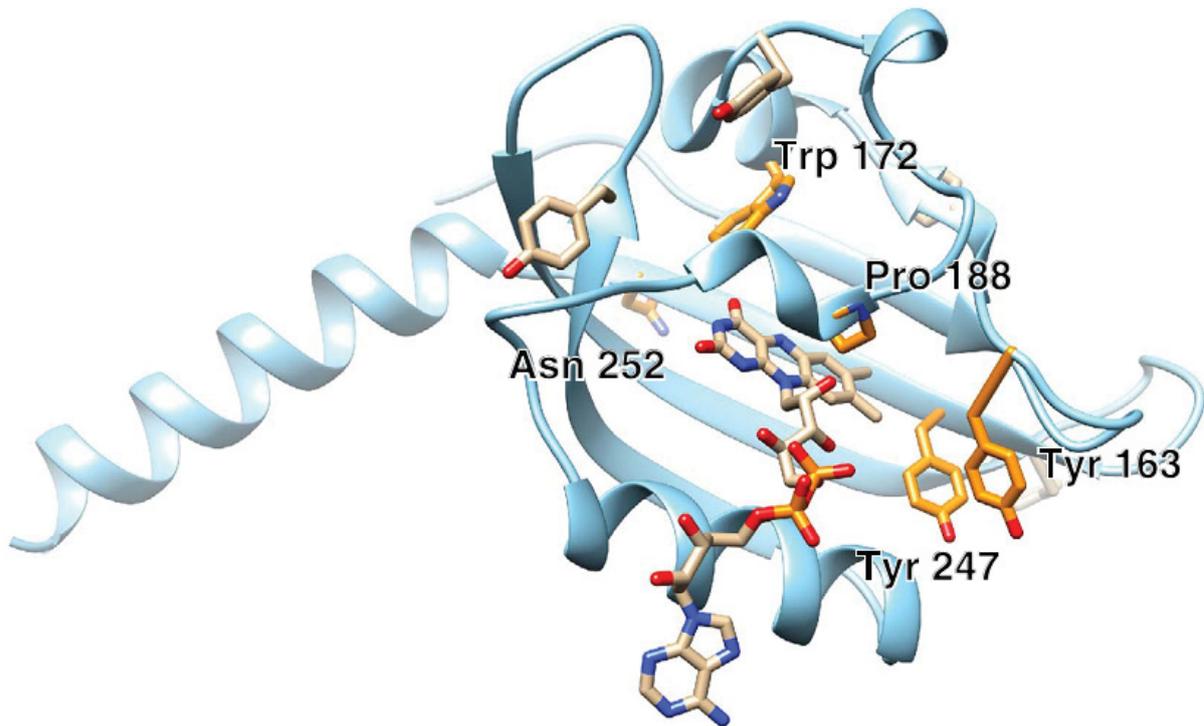


Abb. 25: Homologiemodell der BatLOV Domäne mit eingebundenem FAD basierend auf der Sequenzähnlichkeit zu YtvA ¹⁴⁷.

3.3. Fluoreszenz Resonanzenergietransfer (FRET)

Von besonderer Bedeutung für diese Dissertation sind Energie-Übertragungsreaktionen zwischen zwei Chromophor-tragenden Domänen wie z.B. in den Photolyasen und Cryptochromen. Diese Übergänge sind einerseits in einem einzelnen System alleine möglich, wie das Jablonski Termschema in Abb. 2 in Kapitel 3 veranschaulicht. Andererseits besteht auch die Möglichkeit des Energietransfers auf ein Akzeptorsystem. Diese Möglichkeit wird in Abb. 26 und Abb. 27 graphisch anschaulich dargestellt. Darüber hinaus werden in diesem Kapitel die

mathematischen Grundlagen erläutert, die es erlauben, diesen Energietransfer von einem Donor zu einem Akzeptor zu quantifizieren.

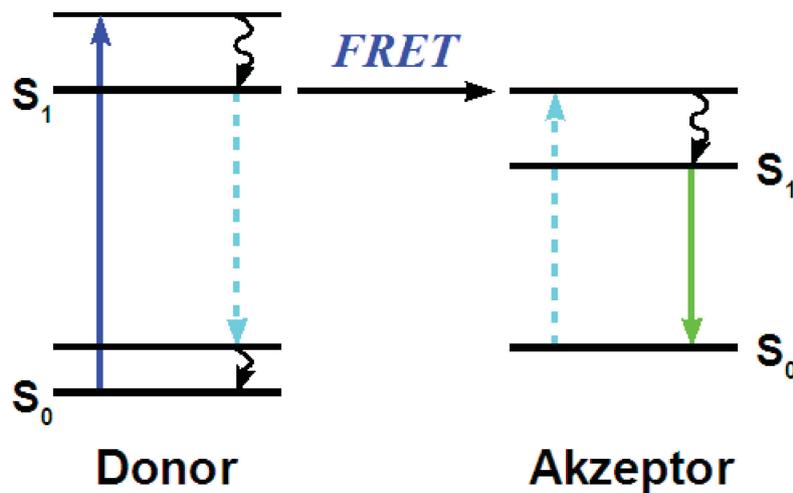


Abb. 26: Vereinfachtes Jablonski Termschema zur graphischen Einordnung des Förster Resonanzenergietransfers in die photoinduzierten Übergänge angeregter Systeme. Dargestellt werden hier die Absorption des Donors (blau), sowie die Fluoreszenz des Akzeptors (grün). Die nur in geringerem Maße stattfindende Fluoreszenz des Akzeptors (links, abwärts) sowie die Absorption des Donors (rechts, aufwärts) sind durch gestrichelte Pfeile dargestellt.

Diese Prozesse wurden hier in einem synthetisch hergestellten Protein untersucht, das zwei Chromophor-Bindestellen enthält. Eine besondere Form der Energieübertragung wird als FRET (Fluoreszenz- oder Förster Resonanz-Energietransfer) bezeichnet. FRET basiert auf der Absorption von Photonen durch Moleküle, die somit in den angeregten Zustand übergehen. Sind zwei chromophore Systeme in einem Molekül oder in engerer Nachbarschaft vorhanden, kann die absorbierte Energie auch durch einen Resonanz-Energietransfer (RET oder FRET) von einem Chromophorsystem an das andere weitergegeben werden. Bei dem Resonanz Energietransfer handelt es sich um einen strahlungslosen Transfer von Energie, welcher ausschließlich auf einer Dipol-Dipol Interaktion zwischen dem Donor und Akzeptor basiert. Voraussetzung für einen nachweisbaren Resonanzenergie-Transfer ist die Präsenz eines spektroskopisch passenden Donor-Akzeptor Paar ¹⁴⁸, d.h., die hierfür gültige Voraussetzung ist gegeben, wenn die Emission des Donors eine etwa 30-prozentige Überschneidung mit der Absorption des Akzeptors aufweist (Abb. 27) ¹⁴⁹.

Durch diese Abhängigkeit des Resonanzenergie-Transfers von der Entfernung zwischen Donor und Akzeptor bietet dieses physikalische Prinzip umfangreiche Möglichkeiten in Forschung, Medizin und Diagnostik, wo es bereits in vielen Feldern

Anwendung findet, wie zum Beispiel in der Abstandsbestimmung zwischen Proteinen oder bei der Beobachtung der Interaktion von Substraten mit Enzymen oder anderen Molekülen.

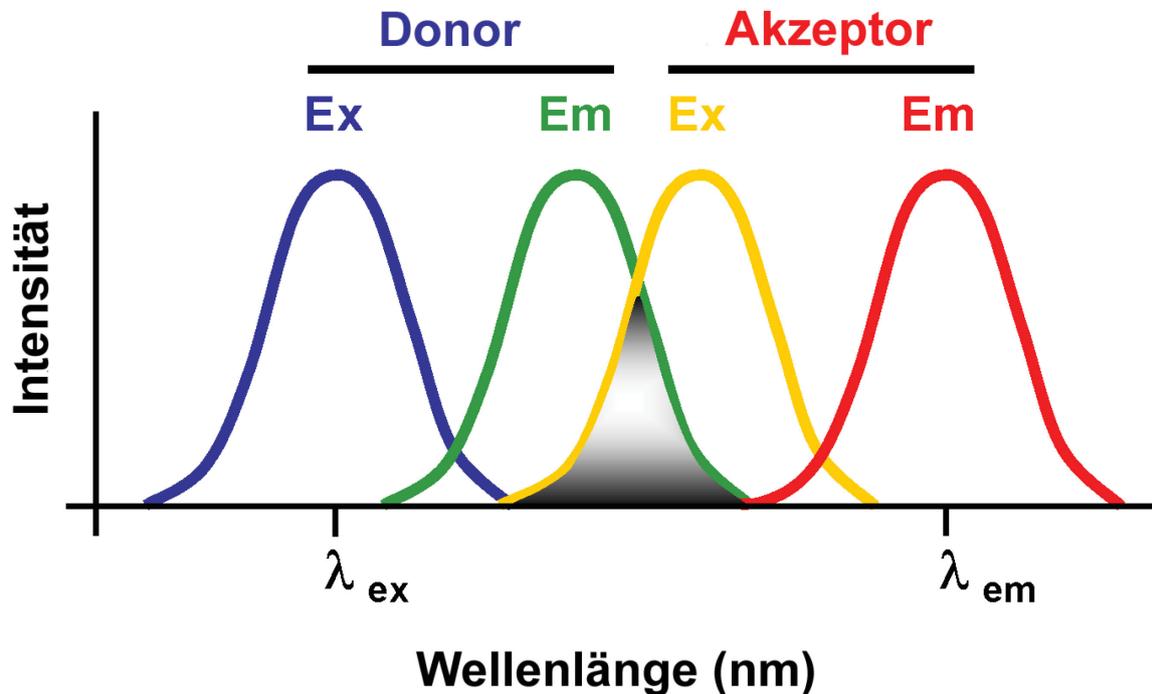


Abb. 27: Spektrale Überlappung eines Donor-Akzeptor Paares als Grundlage für FRET. Der Überlappungsbereich ist hier in grau dargestellt.

Die Effizienz des Energietransfers ist abhängig von drei Parametern: der Entfernung und der relativen Orientierung der beiden Systeme zueinander, und von dem Ausmaß des spektralen Überlappungsintegrals (Abs_{Donor} zu $Fl_{Akzeptor}$). Als theoretische Kenngröße dient hier der Försterradius R_0 . Er bezeichnet die Entfernung der Systeme, bei der die Energieübertragungs-Effizienz 50 % beträgt. In diese Berechnung gehen der Orientierungsfaktor κ beider Systeme (in Lösung ist $\kappa = 2/3$), der Brechungsindex n (für wässrige Lösungen $n = 1,4$), sowie die Fluoreszenzquantenausbeute des Donors Φ_D und das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ ein (Gl. 1).

$$R_0 = 0,211 \left[\frac{\kappa \Phi_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{\frac{1}{6}}$$

Gl. 1

Das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ wird wie in Gl. 2 beschrieben berechnet. Hierbei steht F_D für die Fluoreszenz und ϵ_D für den Extinktionskoeffizienten des Donors.

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Gl. 2

Die Effizienz des Transfers (η) kann dann anhand der Fluoreszenzen von Donor und Akzeptor berechnet werden (Gl. 3).

$$\eta = \frac{\varepsilon(A)_{\lambda_{ex}(D)}}{\varepsilon(D)_{\lambda_{ex}(D)}} \cdot \frac{F(AD)_{\lambda_{em}(A)}}{F(A)_{\lambda_{em}(A)}} \cdot \frac{1}{f_D}$$

Gl. 3

Alternativ kann auch die Messung der Fluoreszenz-Lebenszeiten zur Bestimmung der Effizienz des Energietransfers (Gl. 4) verwendet werden, da die Fluoreszenzlebenszeit des Donors in Abhängigkeit von der Effizienz der Energieübertragung zum Akzeptor verkürzt wird. In Gleichung 4 beschreibt τ_{DA} die Fluoreszenz-Lebenszeit in Anwesenheit von Donor und Akzeptor und τ_D den entsprechenden Wert in Abwesenheit des Akzeptors.

$$\eta = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Gl. 4

Die reale Entfernung zwischen Donor und Akzeptor lässt sich nun aus dem Försterradius R_0 sowie der Effizienz der Energieübertragung η berechnen (Gl. 5).

$$r = R_0 \sqrt[6]{\frac{1 - \eta}{\eta}}$$

Gl. 5

3.4. Stand der Technik

Die verschiedenen Kapitel der Einleitung haben nun dargelegt, wie wichtig Licht im Allgemeinen für die Evolution und für das Überleben von Lebewesen ist. Dabei geht es zum einen um den Erhalt des Lebens und die korrekte Funktion des Erbgutes, aber auch um die Detektion von z.B. blauem Licht als wichtigstem spektralem Bereich, um die darin enthaltenen Informationen und Energie zu nutzen. Diese Vielfalt an Aufgaben hat im Laufe der Jahrtausende dazu geführt, dass blaulichtaktive Photorezeptoren ubiquitär in den verschiedensten Domänen und Habitaten des Lebens dieser Welt zu finden sind. Diese Präsenz hat in den letzten Jahren und Jahrzehnten dazu geführt, dass sich seit der ersten Entdeckung photoaktiver Enzyme die Informationen, das Wissen und im Besonderen die Tiefe des Wissens exponentiell erweitert haben. Weltweit arbeiten nun Forscher in Gruppen daran, die Funktion und die Mechanismen der Photorezeptoren zu charakterisieren. Auch wenn schon viele der molekularen Mechanismen weitestgehend aufgeklärt werden konnten, so sind doch noch viele Funktionen von weit verbreiteten und bekannten Photorezeptoren nicht vollständig charakterisiert. So bleiben speziell z.B. Fragen zur Signaltransduktion von der Photorezeptordomäne zur Effektor-domäne, zur Art und Beschaffenheit der Intermediate sowie zur exakten Rolle der einzelnen Aminosäuren im Photozyklus zu klären. Auch über die physiologischen Funktionen der Photorezeptoren und deren Auswirkungen im Einzelnen ist für viele Systeme wenig bekannt.

Neben den Erkenntnissen, die durch die Erforschung von Photorezeptoren direkt gewonnen werden, können auch Informationen über die strukturellen Veränderungen oder solche, die durch Enzymaktivitäten ausgelöst werden, auf andere photo-inaktive Proteine übertragen werden. Van der Horst und Hellingwerf gaben einst drei Beweggründe an, Photorezeptoren zu studieren¹⁵⁰. Zum Einen ergäben sie zeitlich höchst aufgelöste laserinduzierbare dynamische Strukturänderungen. Zum Zweiten durchlaufen sie große Konformationsänderungen während der Umwandlung in den signalgebenden Zustand, und zum Dritten sei für das relevante Zeitfenster der Betrachtung in der Regel die Farbänderung des Proteins ein guter Indikator.

Bis dato wurden bereits viele verschiedene Photorezeptoren in den unterschiedlichen Bereichen des Lebens, den Bakterien, den Archaeen und der Eukaryoten gefunden.

Allein im Bereich der Bakterien werden bei ca. 25 % der Organismen Photorezeptoren vermutet. Betrachtet man nun den enormen Fortschritt der Algorithmen in der Bioinformatik und der allgemeinen Informationstechnologie mit immer leistungsfähigeren Rechnern, ist mit noch vielen weiteren Funden zu rechnen. Hierfür bedarf es natürlich immer auch neuartiger und außergewöhnlicher Proben von den verschiedensten Orten der Erde, wie zum Beispiel aus den Tiefen der Meere oder den Höhen der Anden.

Je genauer wir Photorezeptoren und ihre Mechanismen verstehen, umso besser können wir diese auch später anwenden. Bis heute liegen die meisten Anwendungsgebiete von Photorezeptoren im Bereich der Spektroskopie oder Mikroskopie, wie zum Beispiel der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie (Nanoskopie) oder in optogenetischen Anwendungen, wie man sie z.B. bei den lichtinduzierbaren Kationenkanälen (Channelrhodopsin(en)) findet. Mit Hilfe der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie können zum Beispiel schon heute die örtliche Verteilung von Proteinen innerhalb einer Zelle aufgeklärt und deren Wege unter verschiedenen physiologischen Bedingungen, wie zum Beispiel Stress, Temperaturänderung, pH-Änderung oder Glukosegradienten verfolgt werden. Dies könnte bald weiter vertieft werden, wenn ein besseres und genaueres Verständnis von Photorezeptoren zu immer neuen und komplexeren Anwendungen und Anwendungsgebieten führen kann und wird. Im Speziellen die Fluoreszenz oder der Förster Resonanzenergie Transfer (FRET) verfügen hier über großes Potential. So können schon heute aufgrund der hohen Qualität der zum Energietransfer verwendeten Systeme die Abstände zwischen Molekülen und verschiedenen Strukturen im Ångströmbereich zuverlässig gemessen werden. Für verschiedene Anwendungsbereiche sind für derartige Analysen allerdings immer auch passende FRET Paarungen Voraussetzung, weswegen hier neben dem präzisen Verständnis der Photozyklen der am Photozyklus der einzelnen Domänen beteiligten Aminosäuren auch eine breite Auswahl an Systemen wichtig ist. Entsprechend hat neben der Verwendung bestehender und charakterisierter Molekülpaare auch die Charakterisierung von neuartigen Paarungen große Bedeutung.

3.5. Zielsetzung

Wie schon an verschiedenen Stellen erwähnt, wächst das Wissen über verschiedenste Photorezeptoren und ihre grundlegenden Mechanismen nun seit Jahrzehnten stetig und immer rasanter an. Dieses Wissen und die Fähigkeit, die Funktionsweise der Photorezeptoren auf ganz spezifische Anwendungsgebiete anzupassen, hat in der letzten Zeit darüber hinaus zu einer Vielzahl von Applikationen geführt.

Diese Arbeit konzentriert sich im Wesentlichen auf die Charakterisierung neuartiger Photorezeptoren, die als aktiven Chromophor ein Flavinderivat tragen, wie zum Beispiel Photolyasen aus extremophilen Stämmen. Der hier vorliegende Energietransfer zwischen den beiden Cofaktoren führte dazu, diesen Förster Resonanzenergietransfer (FRET) eindringlicher in einem eigens modellierten Fusionsprotein zu charakterisieren und damit auch ein neuartiges FRET-Paar für die vielen verschiedenen Anwendungsbereiche dieser Technik zu präsentieren.

Diese Aufgabenstellungen wurden im Zuge der Arbeit bearbeitet, um das vorhandene Wissen um photochemische Komponenten in Bakterien zu erweitern und besonders auch die Photochemie von extremophilen Organismen mit bisher bekannten zu vergleichen. Die Ergebnisse werden im Kapitel 5 zusammenfassend vorgestellt und zum Ende der jeweiligen Teilkapitel der Ergebnissektion eingehend diskutiert und eingeordnet. Ein Teil der Ergebnisse wurde darüber hinaus bereits in einer Publikation veröffentlicht ⁹².

So war es unter anderem Gegenstand der Arbeit, eine Photolyase aus einem kurz zuvor isolierten extremophilen Bakterium heterolog in *E. coli* zu exprimieren, das Protein anschließend aufzureinigen und spektroskopisch zu charakterisieren. Um ein vollständiges Vergleichsbild mit der schon ausgiebig untersuchten Photolyase aus *E. coli* zu erhalten, wurde darüber hinaus noch die Effizienz der DNA-Reparatur des neuen Proteins unter verschiedenen Bedingungen eingehend charakterisiert. Dieser Teil wird vervollständigt durch Untersuchungen des *Acinetobacter*-Stammes, aus dem die Photolyase isoliert wurde. Hier wurde das Ausmaß an DNA-Schädigungen durch UV-Belichtung und die Reparaturfähigkeit des Bakterienstammes untersucht.

Der Förster Resonanzenergie-Transfer (FRET), der in CPD Klasse I Photolyasen wie zum Beispiel EcPhr aus *E. coli* und auch der neuartigen Photolyase Ver3Phr aus *Acinetobacter sp. Ver3*, welche erst kurz zuvor in den Argentinischen Anden aus Umweltproben isoliert wurde, stattfindet, führte zu der Erarbeitung eines eigens konstruierten Fusionsproteins und dessen umfassender Charakterisierung. Dieses Fusionsprotein wurde durch die Verknüpfung einer LOV Domäne aus dem bakteriellen Blaulichtrezeptor YtvA aus *Bacillus subtilis* mit der GAF3 Domäne aus dem Protein Slr1393 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC6803 erzeugt. Neben der einleitenden spektroskopischen Charakterisierung wurden auch die Effizienz und weitere Parameter des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) eingehend charakterisiert.

Des Weiteren war es Ziel der Arbeit, bakterielle LOV Domänen zu charakterisieren und zu vergleichen. Hierzu wurden die LOV Domänen aus den Bacterio-Opsin Aktivatorproteinen (BatLOV) aus *Halobacterium salinarum* und *Natronomonas pharaonis* heterolog in *E. coli* exprimiert und nach der Aufreinigung spektroskopisch charakterisiert. Ähnlich wurde mit vier Mutanten der LOV Domäne des bakteriellen Blaulichtrezeptors YtvA verfahren, um die Auswirkung der Mutationen auf das Wasserstoffbrücken-Netzwerk und damit auf die Eigenschaften des Photozyklus der LOV Domäne zu bestimmen.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Plasmide und Klone

Tab. 1: Übersicht der Proteine und die zur Expression verwendeten Plasmide und Antibiotika

Projekt	Zielprotein	Plasmid	Antibiotika-Resistenz **	Zusatzinformation
Photolyasen / Cryptochrome	Ver3Phr	pET52	Amp	
	EcPhr	pET28a	Kan	
	Ver3PL2	pET52	Amp	
KY1056	-		Tc	
KY1225	-		Tc, Cmp	Phr ⁻
KY1225 pREP4	-	pREP4	Tc, Cmp, Kan	Phr ⁻ Respressionsvektor
KY1225 pREP4 pQE60EcPhr	Ver3Phr	pQE60	Tc, Cmp, Kan, Amp	
KY1225 pREP4 pQE60Ver3Phr	EcPhr	pQE60	Tc, Cmp, Kan, Amp	
pET28NestCryPro	CryPro	pET28a	Kan	aus <i>Nesteronkonio</i> sp. Act20
Fusionsprotein				
	LOV-GAF	pET28a	Kan	ohne PCB
	LG_C62S	pET28a	Kan	ohne PCB
	C62S PCB <i>in vivo</i>	pET28a pACYC- ho1-pcyA	Kan, Cmp	Koexpression mit PCB *
	C62S PEB <i>in vivo</i>	pET28a	Kan, Cmp	Koexpression mit PEB
	1393GAF3 PCB <i>in vivo</i>	pET30a pACYC- ho1-pcyA	Kan, Cmp	Koexpression mit PCB *

Bacterioopsin Aktivator	HsBatLOV	pET28a	Kan	aus <i>Halobacterium salinarum</i>
	NpBatLOV	pET28a	Kan	aus <i>Natronomonas pharaonis</i>
YtvA LOV	YtvA Wildtyp	pET28a	Kan	aus <i>Bacillus subtilis</i>
	F46Y	pET28a	Kan	
	F46A	pET28a	Kan	
	V28I	pET28a	Kan	
	V28L	pET28a	Kan	

* pACYC-ho1-pcyA kodiert eine Ferredoxin Reductase und eine Hämoxygenase, die *E. coli* in die Lage versetzt, PCB in vivo zu produzieren, so dass dieses während der Proteinbiosynthese in die entsprechende GAF Domäne eingebunden werden kann.

** Als Selektionsantibiotika wurden wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, Ampicillin (Amp), Kanamycin (Kan), Tetracyclin (Tc) und Chloramphenicol (Cmp) verwendet. Die Abkürzung Phr bezieht sich auf „photorepair enzyme“ bzw. Photolyase wohingegen die Abkürzung PL ein Photolyase-ähnliches Enzym (photolyase like) beschreibt. Die für die in Abschnitt 4.2.10 beschriebene quantitative Analyse der UV-Resistenz verwendeten Stämme haben die in Tab. 2 beschriebenen Eigenschaften.

Tab. 2: Bezeichnung und Eigenschaften der in Abschnitt 4.2.9 und 4.2.10 für die qualitative und quantitative Bestimmung der UV-Resistenzen verwendeten Stämme

Stamm / Plasmid	Eigenschaften	Quelle / Referenz
pREP4	Repressionsvektor, Kan ^r	QIAGEN
<i>E. coli</i> KY1056	argE3 his-4 leu-6 proA2 thr-I thi-1 rpsL31 galK2 lacY1 ara-14 xyl-5 mtl-1 supE44 srlC300::Tn10 recA56, Tc ^r	Akasaka und Yamamoto, 1991 ¹⁵¹
<i>E. coli</i> KY1225	Wie KY1056 mit <i>phr</i> -36, Tc ^r , Cmp ^r	Akasaka und Yamamoto, 1991 ¹⁵¹
<i>E. coli</i> KY1225 pREP4	KY1225 mit Repressionsvektor pREP4, Cmp ^r , Kan ^r , Tc ^r	Prof. Batschauer, Universität Marburg
<i>E. coli</i> KY1225 pREP4 pQE60-Ver3Phr	KY1225 mit Repressionsvektor pREP4 und CPD-Photolyase aus <i>Acinetobacter</i> sp. Ver3 in einem pQE60 Vektor, Cmp ^r , Kan ^r , Tc ^r , Amp ^r	Diese Arbeit.
<i>E. coli</i> KY1225 pREP4 pQE60-EcPhr	KY1225 mit Repressionsvektor pREP4 und CPD-Photolyase aus <i>E. coli</i> in einem pQE60 Vektor, Cmp ^r , Kan ^r , Tc ^r , Amp ^r	Prof. Batschauer, Universität Marburg

Das LOV-GAF Fusionsprotein wurde nach den beiden nativen Domänen LOV (light oxygen voltage) und der 1393GAF3 (cGMP-spezifische Phosphodiesterase, Adenylcyclase und FhlA) benannt. Diese beiden Domänen sind durch einen flexiblen random coil Linker mit der Sequenz GGGSTGSTTGSSEFGG verbunden. Die Bezeichnungen der LOV Domänen der Bacterio-Opsin-Aktivator Proteine (Bat) setzt sich aus den Stammbezeichnungen (*Halobacterium salinarum*, Hs und *Natronomonas pharaonis*, Np), sowie der Protein und Domänenbezeichnung zusammen.

4.1.2. Medien

Alle verwendeten Medien und Puffer wurden für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Reagenzien wurden sterilfiltriert. Zur Herstellung der Medien, Lösungen und Puffer wurde tridestilliertes Wasser verwendet.

TBY-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt und 10 g/L NaCl
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt und 10 g/L NaCl

4.1.3. Selektionsantibiotika

Ampicillin	100 mg/mL in tridest. Wasser, sterilfiltriert
Kanamycin	50 mg/mL in tridest. Wasser, sterilfiltriert
Tetracyclin	20 mg/mL in tridest. Wasser, sterilfiltriert
Chloramphenicol	30 mg/mL in tridest. Wasser, sterilfiltriert

4.1.4. Puffer und Lösungen

Für Abkürzungen siehe Verzeichnis, Seite IV.

Aufschlusspuffer_PL	50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 10% Saccharose, pH 8,0
Waschpuffer_PL	50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 20% Glycerin, pH 7,5
Elutionspuffer_PL	50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 20% Glycerin, pH 8,0
Lagerpuffer_PL	50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 20% Glycerin, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8,0
PBS (1M)	1 M NaH ₂ PO ₄ , 1 M Na ₂ HPO ₄
Startpuffer	50 mM PBS, 500 mM NaCl, pH 7,2
Waschpuffer_LG	50 mM PBS, 300 mM NaCl, pH 7,2, 20-50 mM Imidazol
Elutionspuffer_LG	50 mM PBS, 300 mM NaCl, pH 7,2, 500 mM Imidazol
Dialysepuffer	50 mM PBS, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,2
IEX-Puffer_A	20 mM PBS, 0M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,2
IEX-Puffer_B	20 mM PBS, 1M NaCl, 5 mM EDTA, pH 7,2
β-Mercaptoethanol	pro analysi, Merck
Pefablock SC	100 mg/mL in tridest. Wasser
MOPS-Puffer	0,2 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 5 mM EDTA, pH 8

MES-Puffer	50 mM MES, 50 mM TRIS, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3
TBE-Puffer	Novex TBE-Laufpuffer (5x), Invitrogen
TAE-Puffer	50 mM EDTA, 2 M TRIS, pH 8
Laemmli-Puffer	126 mM TRIS-HCl (pH 6,8 ± 0,2), 20% Glycerin, 4% SDS, 10 µL/mL β-Mercaptoethanol, 0,01% Bromphenolblau
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue in 60% tridest. Wasser, 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	50% tridest. Wasser, 40% Ethanol, 10% Essigsäure

4.1.5. Materialien

DNA Extraktion	QIAprep Spin Miniprep Kit
SDS-Gel	NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% Acrylamid-Gel, Invitrogen
Proteinstandard	SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard, Invitrogen
GSA-Gel	3-8% Tris-Acetat-Gel, Invitrogen
DNA-Gel	0,8 % Agarose-Gel
FMN	Na-Salz, AppliChem Panreac
FAD	als di-Na-Salz Hydrat, 95 %, Fa. Sigma-Aldrich
MTHF	als Chlorid, 98,1 %, Fa. Schircks Laboratories, Schweiz (No.16.230)

4.1.6. Geräte

FPLC-Säule	Superdex 75 10/300 GL von GE Life Sciences
HPLC-Säule	50 mm Zorbax SB C-18, 1,8 µm, 4,6 mm i.D.,
IEX-Säule	DEAE Säule
ÄKTAprime plus	HPLC System von GE Healthcare
	USWEX03154 von Agilent Technologies
LEDs	365 nm
	470 nm (Intensität: 17,3 W/m ²)
	530 nm
	670 nm
Thermoblock	Thermomixer Comfort, Eppendorf
PCR Thermocycler	Eppendorf
Gel-Scanner	Biorad
Warmluftschüttler	Certomat® H, Braun
Tischzentrifuge	Universal 320 R, Hettich
Beckman-Zentrifuge	Avanti J-20 XP Centrifuge, Beckman-Coulter
Rotor	JA-10
Ultrazentrifuge	Optima L-80 XP Ultracentrifuge, Beckman-Coulter
Ultrazentrifugen-Rotor	Ti-60
Ultra-Turraxgerät	Homogenisator S25N – 18 G, IKA
UV/VIS Spektrometer	Spektralphotometer UV-2401 PC, Shimadzu
Fluoreszenzspektrometer	Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse, Varian
Single-Photon counting	Edinburgh Instruments
Life-Time-LED	PLS-8-2-095 von PicoQuant, $\lambda = 450 \text{ nm}$
pH-Meter	pH-Meter 766 Calimatic, Knick
Küvetten	Präzisionsküvetten aus Quarzglas, Hellma

4.2. Methoden

4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen nach der Calciumchlorid Methode

E.coli BL21 Zellen werden bis zu einer $OD_{600} = 0,3$ inkubiert. Anschließend wird das weitere Wachstum für 30 Minuten auf Eis gehemmt. Nachdem das Medium durch Zentrifugation entfernt wurde werden die Zellen in 1 mL 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und erneut für 60 Minuten auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation werden die Zellen in 100 μ L 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und können nun entweder sofort für die Transformation verwendet oder bei $-80^\circ C$ gelagert werden.

4.2.2. Herstellung von Glycerinkulturen

Um Bakterien über längere Zeit zu lagern, wurden Glycerinstocks verwendet. Hierzu wird eine 5 mL Kultur über Nacht bei $37^\circ C$ und 180 rpm mit den entsprechenden Antibiotika in LB Medium inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen bei 5000 rpm pelletiert. Dieses Pellet wird anschließend mit 2 mL LB Medium und 2 mL 40 % Glycerin-Lösung resuspendiert und mit 1 μ L/mL der entsprechenden Antibiotika versetzt. Die Zellsuspension wird nun auf verschließbare Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei $-80^\circ C$ gelagert. Glycerinkulturen wurden nur von Klonen erstellt, deren DNA-Sequenz durch Sanger Sequenzierung (Firma LGC Genomics, Berlin) eindeutig verifiziert wurde.

4.2.3. Gerichtete Mutagenese (Quickchange Methode)

Zur Durchführung einer Punktmutation mittels PCR wurde zunächst folgender Reaktionsansatz angefertigt:

Templat	3 μ L
Primer (fw + rv) *	je 1 μ L
dNTP Mix	1 μ L
pfu-Polymerase	0,5 μ L
<u>nukleasefreies Wasser</u>	16 μ L
	25 μL

* fw: forward (vorwärts)

rv: reverse (rückwärts)

Die als Templat verwendeten Plasmide wurden zuvor aus den transformierten Wildtyp *E.coli* Zellen extrahiert (nach Qiaprep Miniprep von Qiagen).

Die hierfür verwendeten Primer waren für das LOV-GAF Fusionsprotein:

TGT > AGT:

LOV-GAF_C62S_fw: 5' GAG GAA ATT TTA GGA AAG AAC AGT CGC TTC TTA
CAG GGG AAA C 3'

LOV-GAF_C62S_rv: 5' GTT TCC CCT GTA AGA AGC GAC TGT TCT TTC CTA
AAA TTT CCT C 3'

Für den Blaulichtrezeptor YtvA

TTT > GCT:

F46A_fw: 5' CTA CGT AAA TCA AGG **CGC** TGT TCA AAT GAC CGG C 3'

F46A_rv: 5' GCC GGT CAT TTG AAC **AGC** GCC TTG ATT TAC GTA G 3'

TTT > TAT:

F46Y_fw: 5' CTA CGT AAA TCA AGG **CTA** TGT TCA AAT GAC CGG C 3'

F46Y_rv: 5' GCC GGT CAT TTG AAC **ATA** GCC TTG ATT TAC GTA G 3'

GTA > ATA:

V28I_fw: 5' GTG CGA GTC GGT GTG **ATA** ATT ACA GAT CCC 3'

V28I_rv: 5' GGG ATC TGT AAT TAT **CAC** ACC GAC TCG CAC 3'

GTA > CTA:

V28L_fw: 5' GTG CGA GTC GGT GTG **CTA** ATT ACA GAT CCC 3'

V28L_rv: 5' GGG ATC TGT AAT TAG **CAC** ACC GAC TCG CAC 3'

Die PCR zur Mutagenese wird nun in einem Thermocycler nach folgenden Parametern durchgeführt.

Tab. 3: Quickchange PCR-Programmparameter

Zyklen	Temperatur	Zeit
	95 °C	30 s
16	95 °C	30 s
	55 °C	60 s
	72 °C	450 s
	4 °C	-

Im Anschluss an die PCR wird das Templat mit Hilfe des Restriktionsenzym DpnI verdaut. Hierzu wird 1 µL DpnI zu dem PCR Produkt hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde auf 37 °C temperiert. Da DpnI spezifisch methylierte bzw halbmethylierte DNA schneidet, wird ausschließlich das als Templat verwendete Wildtyp-Plasmid abgebaut, da die PCR-generierte DNA keinerlei Methylierung erfährt. Das so behandelte Plasmid kann nun zu den chemisch kompetenten Zellen (4.2.1) gegeben werden. Die Mischung wird anschließend für 30 Minuten auf Eis gehalten. Nachfolgend wird für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt und die Zellen werden wieder kurz auf Eis abgekühlt. Zu Regeneration werden die Zellen nun mit 300 µL sterilem LB-Medium versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Abschließend werden die Zellen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum zu Portionen von 50 µL und 300 µL ausgebracht (wenn nötig, werden hier auch mehrere Antibiotika verwendet). Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C können Kolonien gepickt und Glycerinstocks wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben angefertigt werden. Aus jeder Kolonie wird die DNA extrahiert und zur Überprüfung sequenziert (LGC Genomics, Berlin).

4.2.4. Überexpression der Zielproteine

Sämtliche mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilbank) durchgeführt.

Die Zielproteine werden durch Überexpression in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 mit den entsprechend transformierten Plasmid gewonnen (Tab. 1). Die Kultivierung der Zellen geschieht in drei Schritten. Zunächst werden 50 µL einer Zellsuspension

aus einer Glycerin-Vorratskultur zu 5 mL LB-Medium, enthaltend 1 $\mu\text{L/mL}$ der entsprechenden Antibiotika (aus Stammlösungen wie in 4.1.3 beschrieben), gegeben. Diese Vorkultur wird nun bei 37°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Großkultur (2 L TBY-Medium mit 1 mL/L der jeweiligen Antibiotika gemäß 4.1.3) hergestellt indem mit 2 mL/L der Vorkultur beimpft wird. Diese Kultur wird nun für 3,5 – 4 Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Hat die Kultur eine $\text{OD}_{600} = 0,6 - 0,7$ ($\text{OD}_{600} = 1 - 1,2$ für BatLOV) erreicht, wird mit 1 mM IPTG induziert und das Zielprotein über Nacht bei 30 °C (20 °C für 48 – 96 Stunden für CryPro) und 180 rpm exprimiert. Im Folgeschritt werden die Zellen bei 4°C und 6500 rpm abzentrifugiert. Nachdem die Masse des Zellpellets ermittelt wurde, werden nun x g Pellet in x mL Aufschlusspuffer (Startpuffer für LOV-GAF, CryPro und BatLOV, 4.1.4) mit 1 $\mu\text{L/mL}$ Pefabloc und 0,2 $\mu\text{L/mL}$ β -Mercaptoethanol aufgeschlämmt. Als Serinprotease-Inhibitor verhindert Pefabloc den Abbau der Zielproteine durch freigesetzte Proteasen.

Der Aufschluss geschieht mit einem Ultra-Turrax Homogenisator in flüssigem Stickstoff, in den die Zellsuspension tropfenweise eingebracht wird. Nachdem der Stickstoff verdampft ist kann das nun flüssige Lysat durch Zentrifugation von Zelltrümmern getrennt werden (4°C, 45000 rpm, 1 h UZ, Rotor: Ti-60). Ist das Rohlysat zu viskos, kann eine Spatelspitze DNase zugegeben werden. Der so gewonnene Überstand wird nun über eine Affinitäts-Chromatographie mit Hilfe von Ni^{2+} -Ionen, die an einem Säulenharz immobilisiert sind, aufgereinigt (IMAC). Da die Zielproteine mit einem C-terminalen His-Tag (üblicherweise sechs Histidine) exprimiert werden, können sie auf Grund der Imidazolseitenkette der Histidine an das Ni^{2+} -Harz binden. Hierbei ist zu beachten, dass das Ni^{2+} -Harz in einer 20% Ethanol-Lösung gelagert wird. Es muss daher vor der Verwendung gründlich mit Waschpuffer gewaschen werden, was durch dreimaliges Zentrifugieren mit destilliertem Wasser bei 1400 rpm und 4°C für jeweils 2 min sowie viermaliges Waschen mit Waschpuffer bei den gleichen Konditionen geschieht. Nun werden 0,2 mL/mL des Nickelharzes pro Rohlysat in Waschpuffer aufgeschlämmt und auf die Säule gegeben. In Folge wird das Rohlysat ebenfalls auf die Säule gegeben, so dass das Zielprotein an das Harz binden kann und die Fremdproteine in mehreren Waschschritten abgetrennt werden können. Hierzu wird zunächst mit zwei Säulenvolumina Waschpuffer ohne Imidazol und mit fünf Säulenvolumina Waschpuffer mit 20 - 50 mM Imidazol

gewaschen. Zur Elution des Zielproteins werden 40 mL Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol verwendet. Nach der Elution wird das Imidazol mittels Dialyse gegen einen Puffer ohne Imidazol (Dialysepuffer wie in 4.1.4 beschrieben) entfernt, so dass die Endkonzentration an Imidazol in der Probe unter 1 mM liegt. Anschließend kann die Reinheit des Proteins mit Hilfe einer FPLC oder SEC erhöht werden. Die erfolgreiche Isolation des Zielproteins kann zeitnah mit einem Absorptionsspektrum überprüft werden, muss aber darüber hinaus noch elektrophoretisch mit einer SDS-PAGE verifiziert werden.

4.2.5. Aufreinigung des Proteins mittels FPLC

Nach der Eluierung des Proteins von der IMAC-Säule kann die Probe mit Hilfe der FPLC weiter aufgereinigt werden. Verwendet wird hierfür eine Superdex 75 Säule (GE Life Science), auf der die Probe durch das Größenausschluss-Chromatographieverfahren aufgetrennt wird. Als Laufmittel dient der Lagerpuffer (s. 3.1.3). Nachdem die Säule mit zwei Säulenvolumen des Puffers gespült worden ist, wird die Probe in den Loop injiziert. Nun wird die Säule mit Alufolie abgedeckt, um das Protein vor Licht zu schützen. Die Flussrate wird auf 0,5 mL/min und die Fraktionsgröße am Fraktionssammler auf 2 mL eingestellt. Die Eluierung wird mit Hilfe eines angeschlossenen Schreibers überprüft, dessen Messsignal auf 0,01 (Maximum der Ordinate) und dessen Geschwindigkeit auf 5 mm/min justiert wird. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthalten, werden im Chromatogramm identifiziert und können anschließend aufkonzentriert und bei -20 °C gelagert oder direkt weiterbearbeitet werden.

4.2.6. Reinigung der Proteine mittels Ionenaustausch-Chromatographie

Zunächst werden das System und die DEAE-Säule mit IEX-Puffer (95:5 für A:B, im Folgenden auch als 5% IEX-Puffer B beschrieben) bei 2 mL/min äquilibriert, bis die Basislinie und die Leitfähigkeitswerte konstant sind. Das zuvor über eine IMAC-Säule aufgereinigte und durch Dialyse umgepufferte Protein wird nun in die Probenschlaufe eingebracht und auf die DEAE Säule aufgetragen. Dieser Schritt wird bei größeren Probenmengen wiederholt. Anschließend wird die Säule wieder mit IEX-Puffer (95:5

für A:B) gewaschen, bis die UV-Messwerte konstant sind. Die Elution des Proteins erfolgt nun bei einer Flussrate von 1 mL/min mit einem Gradienten, der von 5% SEC-Puffer B auf 100% mit einem Prozent pro Minute zunimmt. Zu Beginn des Gradienten wird ebenfalls die Fraktionierung mit einer Fraktionsgröße von 1 mL gestartet. Die Zielfractionen werden anschließend durch UV-Vis Spektroskopie verifiziert und bei -20°C gelagert.

4.2.7. SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Die SDS-PAGE wird nach Laemmli verwendet ¹⁵², um den Erfolg der Aufreinigung und den Grad der Reinheit der einzelnen Waschfraktionen sowie des konzentrierten Eluats nach der Dialyse und weiteren Aufreinigungsschritte zu überprüfen. Zunächst werden die Proben mit Laemmli-Puffer vermischt. Die Proben aus den Waschschritten werden jeweils im Verhältnis 1:1 (10 µL + 10 µL) vermischt, die aufkonzentrierten Proben aus den Elutionsschritten im Verhältnis 6:4 (6 µL Probe + 4µL Laemmli-Puffer). Danach werden diese Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis überführt. Von jeder Probe und dem Proteinstandard werden nun 10 µL in die Geltaschen gefüllt (die entsprechenden Gele sind dem Abschnitt 4.1.5 zu entnehmen). Die Trennung wird bei konstant 100 V für ca. 2 Stunden durchgeführt. Anschließend wird das Gel zunächst für 1 Stunde bei leichtem Schütteln in die Färbelösung eingelegt, dann für 2 Stunden in die Entfärbelösung überführt. Um die Qualität der Anfärbung zu verbessern, wird das Gel über Nacht in einer 100-fach mit tridestilliertem Wasser verdünnten Entfärbelösung belassen. Die Dokumentation erfolgt mit einem Biorad-Gelscanner. Zu beachten ist hier, dass je nach verwendetem Puffersystem die Positionen der Banden auf dem Gel variieren können.

Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE [®] MES	NuPAGE [®] MOPS	NuPAGE [®] Tris-Acetate
Myosin	250	210	188	191	210
Phosphorylase	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alkohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NuPAGE[®] Novex
Bis-Tris 4-12% Gel

Abb. 28: Proteingrößenstandard SeeBlue Plus2 von Invitrogen für verschiedene Puffersysteme.

4.2.8. Agarose-Gelelektrophorese

Um zu bestimmen, inwieweit die hier untersuchten Photolyasen nach der Expression DNA oder Nukleotidfragmente gebunden haben, werden sie mit Hilfe eines 0,8 %-Agarose-Gels (hergestellt mit 1x konzentriertem TAE-Puffer) aufgetrennt¹⁵³. Hierzu werden die Proteinlösungen zunächst für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 30 µL) wird nun mit 6 µL Sybr Green und Loading Dye-Lösung vermischt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Proben und der DNA-Standard auf das Gel aufgetragen. Die Trennung erfolgt für ca. 40 min bei 100 V.

4.2.9. UV-Überlebens-Assay (qualitativ)

Ziel dieses Versuchs ist es, die UV-Resistenzen verschiedener Bakterienspezies qualitativ zu ermitteln und zwischen den einzelnen Stämmen zu vergleichen. Hierzu werden die jeweiligen Stämme in Kleinkulturen zu je 20 mL in LB Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht vermehrt und anschließend pelletiert. Aus diesen Pellets werden nun Zellsuspension der jeweiligen Stämme in 0,9-prozentiger NaCl-Lösung hergestellt und auf $OD_{600} = 0,6$ eingestellt. Anschließend werden 100 µL der Zellsuspensionen mittels einer Verdünnungsreihe bis 10^{-5} -fach verdünnt und von jeder Verdünnung werden jeweils 5 µL auf LB-Agar aufgebracht. Nun werden die Platten für 5 min UVB-Strahlung ausgesetzt und anschließend 120 min mit weißem Licht bestrahlt, um eine Photoreparatur zu gewährleisten (PR). Vergleichsproben werden direkt mit Alufolie abgedeckt, um eine Photoreparatur zu verhindern und die Dunkelreparatur (DR) zu charakterisieren. Entsprechend wurden Platten als Kontrolle für 5 min (T_5) und 125 min (T_{125}) mit Alufolie abgeschirmt und anschließend entsprechend weiterbearbeitet. Nach der Durchführung des Assays wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert; nachfolgend wird das Wachstum bestimmt und mit den Kontrollplatten, die keiner UVB-Strahlung ausgesetzt waren, verglichen.

4.2.10. UV-Überlebens-Assay (quantitativ)

Ziel dieses Versuchs ist es, die UV-Resistenzen verschiedener Bakterienstämme quantitativ zu ermitteln und zu vergleichen. Eine Zellsuspension der jeweiligen Stämme in 0,9% NaCl-Lösung wird identisch zu dem qualitativen Assay hergestellt und auf $OD_{600} = 0,6$ eingestellt, um die nötigen Zellen des jeweiligen Stammes in ausreichender und etwa gleicher Menge zu erhalten. Hierfür werden 50 mL LB-Medium in einen Schüttelkolben gegeben und mit 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ des entsprechenden Antibiotikums sowie 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ der Zellen aus dem Glycerinstock versetzt. Diese Vorkultur wird nun über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei 5000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in einer 0,9-prozentigen NaCl-Lösung resuspendiert und auf eine $OD_{600} = 0,6$ eingestellt. Die so gewonnene Zelllösung wird nun in leere Petrischalen gegeben (10 mL je Petrischale) und verschiedenen Bestrahlungsprotokollen mit und ohne UVB-Licht ausgesetzt. Anschließend werden von allen Petrischalen 100 μL entnommen und mittels einer Verdünnungsreihe bis 10^{-7} -fach verdünnt und auf Agarplatten ausgestrichen (100 $\mu\text{L}/\text{Platte}$). Hierbei werden für den Zeitpunkt T_0 die Zellen sofort verdünnt, ohne weiter behandelt zu werden. Für den Messpunkt T_5 bleiben die Zellen für 5 min und für T_{125} 125 min mit Alufolie abgedeckt, bevor sie verdünnt und ausplattiert werden. Entsprechend wird für „UV₅“ die Zellsuspension 5 min mit UVB-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt und danach direkt verdünnt und ausplattiert. Zellen für den „Photorepair“ (PR) werden ebenfalls für 5 min UVB-Strahlung ausgesetzt und anschließend für 120 min mit weißem Licht bestrahlt. Für den „Darkrepair“ (DR) hingegen werden die Zellen nur 5 min UVB-Strahlung ausgesetzt und anschließend 120 min mit Alufolie abgedeckt. Nachdem die jeweiligen Proben auf Agar ausgestrichen sind, werden sie in Alufolie gewickelt und bei 37°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag ausgezählt. Die in den Petrischalen verbleibende Zellsuspension wird für 10 min bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird nun in 1 mL 0,9-prozentiger NaCl-Lösung resuspendiert und bei -20°C gelagert, um eine DNA-Extraktion durchzuführen.

4.2.11. Dimeranalyse mittels HPLC-ESI-MS/MS

Diese Methode wurde angewandt, um neben der quantitativen Bestimmung des Wachstums nach den in Abschnitt 4.2.10 beschriebenen Behandlungen der jeweiligen Proben auch die Anzahl der Läsionen pro 10^6 Basen zu bestimmen. Hierzu wurde die DNA der entsprechenden Zellen extrahiert (QIAprep Spin Miniprep Kit) und im Laboratoire „Lésions des Acides Nucléiques“ (Grenoble) mittels HPLC-ESI-MS/MS unter Verwendung von publizierten und optimierten Methoden vermessen^{154, 155}. Zur Probenvorbereitung wurde die isolierte DNA durch Inkubation mit Nuklease P1, DNase II und Phosphodiesterase II für zwei Stunden bei pH 6 und 37 °C enzymatisch hydrolysiert, gefolgt von einem zweiten Verdauungsschritt unter Verwendung von Phosphodiesterase I und alkalischer Phosphatase für zwei Stunden bei pH 8 und 37 °C. Die so vorbereiteten Proben werden dann in ein HPLC System injiziert, das aus einer Uptisphere ODB C-18 Säule mit einem Innendurchmesser von 250 x 2 mm und einer Partikelgröße von 5 µm als stationärer Phase bestand. Als mobile Phase wurde ein Acetonitril-Gradient in einer 2 mM wässrigen Lösung von Triethylammonium Acetat (TEAA) verwendet. Die analysierte DNA wurde mit einem UV Detektor (260 nm) quantifiziert und dann direkt in ein API 3000 Elektronenspray Dreifach-Quadrupol Massenspektrometer mit negativer Ionisierung überführt. Durch die Verwendung von Referenzverbindungen zur externen Kalibrierung, konnte unter Verwendung der publizierten Methode das Ausmaß der Läsionen in der extrahierten DNA bestimmt werden^{154, 156}.

4.2.12. Identifizierung von Photolyase-Cofaktoren mittels HPLC

Um die Cofaktoren zusätzlich zu den fluoreszenzspektroskopischen Analysen genauer charakterisieren zu können, werden die Bestandteile des hitzedenaturierten Proteins zunächst durch Zentrifugation entfernt um die Chromophore mit Hilfe einer HPLC auftrennen und charakterisieren zu können. Als stationäre Phase wird eine Umkehrphasensäule (C-18) verwendet (s. 4.1.6). Als mobile Phase dient Methanol mit 10 mM TEAA (pH 5,74). Die Trennung beginnt mit einem Verhältnis 15:85, das nach 5 min bei einer Flussrate von 1 mL/min zu 30:70 geändert wird (T = 20 °C). Identifiziert werden die Proben mit Hilfe von UV-Vis-Detektion bei den Wellenlängen 220 nm, 447 nm und 360 nm (Abb. 29 und Abb. 30). Die Referenzen wurden mit Hilfe

der unter 3.1.4 angegebenen Chemikalien hergestellt und vermessen. Anhand dieser Referenzwerte können nun die Cofaktoren der Photolyasen qualitativ identifiziert werden.

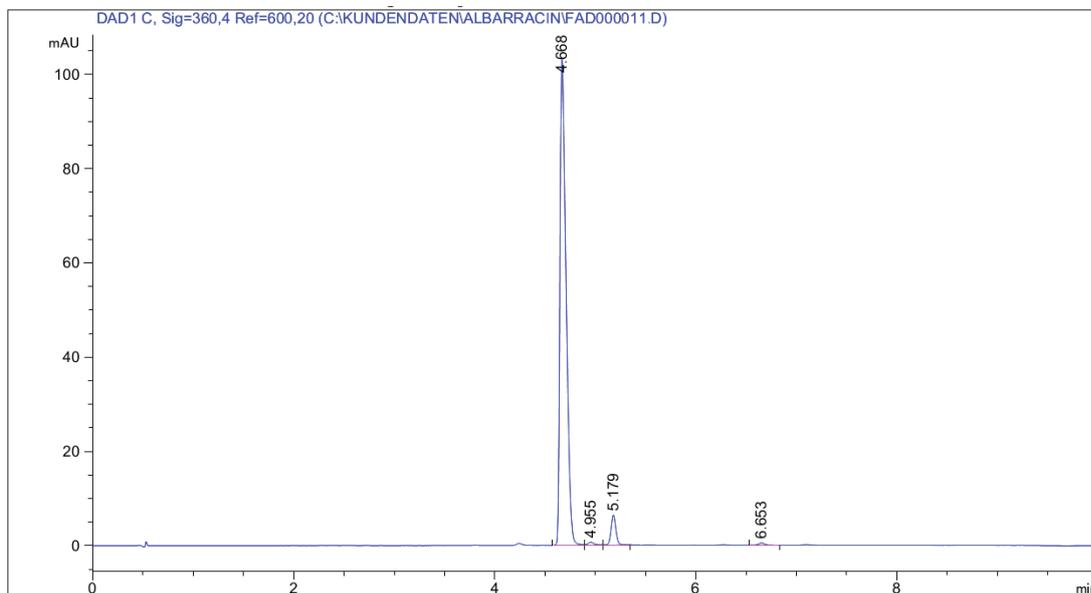


Abb. 29: Chromatogramm mit FAD Standard

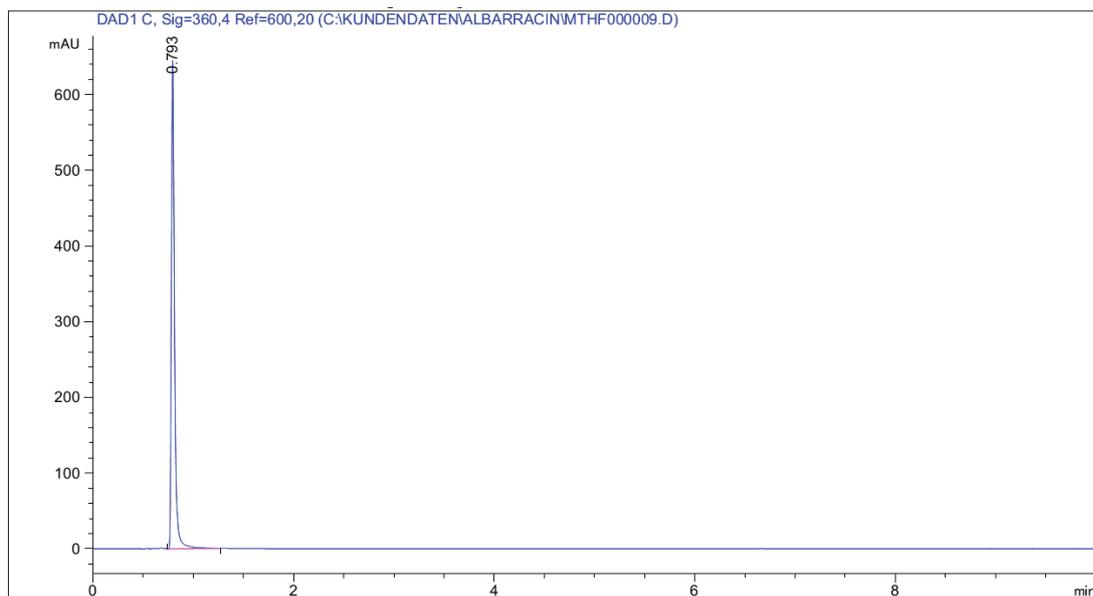


Abb. 30: Chromatogramm mit MTHF Standard

4.2.13. UV/Vis-Spektroskopie

Alle verwendeten Küvetten hatten eine Schichtdicke von $d = 1$ cm. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur und Rotlicht durchgeführt. Die Spektren werden alle im Wellenlängenbereich zwischen 250 nm und 800 nm mit einer Spaltbreite von 1 nm sowie einem Abstandsintervall von 1 nm aufgenommen. Bei Belichtungsexperimenten werden die Proben ausgehend vom Dunkelzustand (0 Minuten) mit einer Diode der entsprechenden Wellenlänge (für Spezifikationen der LEDs, siehe 4.1.6) jeweils für 5 min, +10 min, +15 min, +30 min und +60 min belichtet, so dass sie insgesamt für 120 min belichtet werden (dies gilt für Photolyasen; sollte die Photochemie in anderen Fällen schneller von statten gehen, werden diese Zeiten entsprechend bis auf Sekundenintervalle verkürzt). Um vergleichbare Werte für die Belichtungskinetik zu erhalten, werden die Proben immer im gleichen Abstand (12 cm) unter das Blaulichtdiodenarray gestellt.

4.2.14. Bestimmung der Lebenszeit der thermischen Rückkehr in den Dunkelzustand

Nach Aufnahme der Belichtungskinetiken wird anschließend die Lebenszeit der thermischen Rückkehr in den Dunkelzustand bestimmt. Dazu wird über einen Zeitraum von 5 Stunden die Absorption des Proteins bei 450 nm bei konstanten 20 °C beobachtet. Die daraus entstehende Messkurve kann auf zwei verschiedene Arten ausgewertet werden. Es besteht die Möglichkeit die Messung zu linearisieren, in dem man den natürlichen Logarithmus auf die Absorptionsänderung anwendet. Trägt man diesen gegen die Zeit auf (Gl. 6 und Gl. 7), so lässt sich aus dem Betrag der Steigung der Geraden die Halbwertszeit berechnen ¹⁵⁷.

$$\ln(\Delta A) = -k \cdot t + c$$

Gl. 6

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Gl. 7

Eine präzisere Methode ist die Bestimmung der Lebenszeit. Hierzu wird eine exponentielle Ausgleichsfunktion durch die Messpunkte gelegt. Diese folgt der allgemeinen Formel

$$y = A_1 \cdot e^{\frac{-x}{\tau}} + y_0$$

Gl. 8

Hierbei stellt die Steigung der Funktion t die Lebenszeit für den Zerfall des Lichtzustands dar. Der Einfachheit halber und aus Vergleichbarkeitsgründen, wurden im Allgemeinen die Kinetiken monoexponentiell ausgewertet.

4.2.15. Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren erfolgt im Dunkeln oder bei Rotlicht und bei Raumtemperatur. Zum einen werden die nativen Photolyasen vermessen, zusätzlich werden auch die denaturierten Proteine und damit die freigesetzten Chromophor- und Antennenmoleküle detektiert. Hierzu wird die zu vermessende Probe für 10 Minuten bei 100°C denaturiert und anschließend für 10 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Im Überstand kann nun der freigesetzte Chromophor vermessen werden.

Für die Fluoreszenzmessungen wurde zunächst ein Absorptionsspektrum der Probe aufgenommen und die jeweiligen Maxima dieses Spektrums als Anregungswellenlänge λ_A für Aufnahme der Emissionsspektren gewählt. Anschließend werden anhand der Maxima der Emissionsspektren die Emissionswellenlängen λ_E der Anregungsspektren festgelegt. Gemessen wird stets über den Bereich $\lambda_A + 20$ nm bis $2 \cdot \lambda_A$ für die Emissionsspektren und von $\lambda_E / 2$ bis $\lambda_E - 20$ nm für die Anregungsspektren.

Tab. 4: Geräteeinstellungen des Fluoreszenzspektrometers

Parameter	Emissionsspektrum	Anregungsspektrum
Messwellenlängen [nm]	Maxima des Absorptionsspektrums	Maxima des Emissionsspektrums
Intervall [nm]	1	1
Spaltbreite [nm]	5, 10	5, 10

4.2.16. Fluoreszenz-Lebenszeit-Messung

Bei der Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit wird die Probe mit einer LED bei einer Wellenlänge von 450 nm angeregt. Zum Startzeitpunkt der Messung wird eine interne Zeitmessung gestartet und so die Zeitdifferenz zwischen der Anregung der Probe und dem Auftreffen der durch die Fluoreszenz entstandenen Photonen am Detektor bestimmt. Zunächst wird der Standard IRF-450 (interner Responsefaktor) zur Kalibrierung des Systems vermessen, um die Totzeit und die Hintergrundstreuung des Gerätes zu ermitteln; diese Werte werden später aus den Messwerten durch einen internen Algorithmus herausgerechnet. Der Kalibrierungsmessung folgt die Messung der Probe mit folgenden Parametern:

LED: PicoQuant PLS-8-2-095 (450 nm)

Range (ch/Kanal): 0 – 4095

Time Calibration: 0,012 ns/ch

Mit Hilfe der Sequenz und jeweils einem Vergleichsprotein als Vorlage konnten die in silico Modelle von Ver3Phr (Abb. 33) und Ver3PL2 (Abb. 34) erstellt werden. Hierfür wurde die software „SWISS-MODEL“ des Schweizer Instituts für Bioinformatik „SIB“ (<http://swissmodel.expasy.org>) verwendet. Die Enzyme, die als Vorlage dienen sollten, wurden zunächst über Sequenzhomologien bestimmt. Dies ergab für Ver3Phr die Photolyase von *Escherichia coli* (EcPhr) und für die Ver3PL2 das Cryptochrom aus *Rhodobacter sphaeroides* (RsCryB) als jeweils am nächsten verwandte und bereits charakterisierte Proteine. Des Weiteren konnte über Sequenzabgleiche sichergestellt werden, dass die essentiellen Aminosäuren für die Interaktion mit dem Cofaktor FAD und dem Antennenpigment MTHF sowie die drei Tryptophane der Tryptophantriade in Ver3Phr identisch zu denen in EcPhr sind.

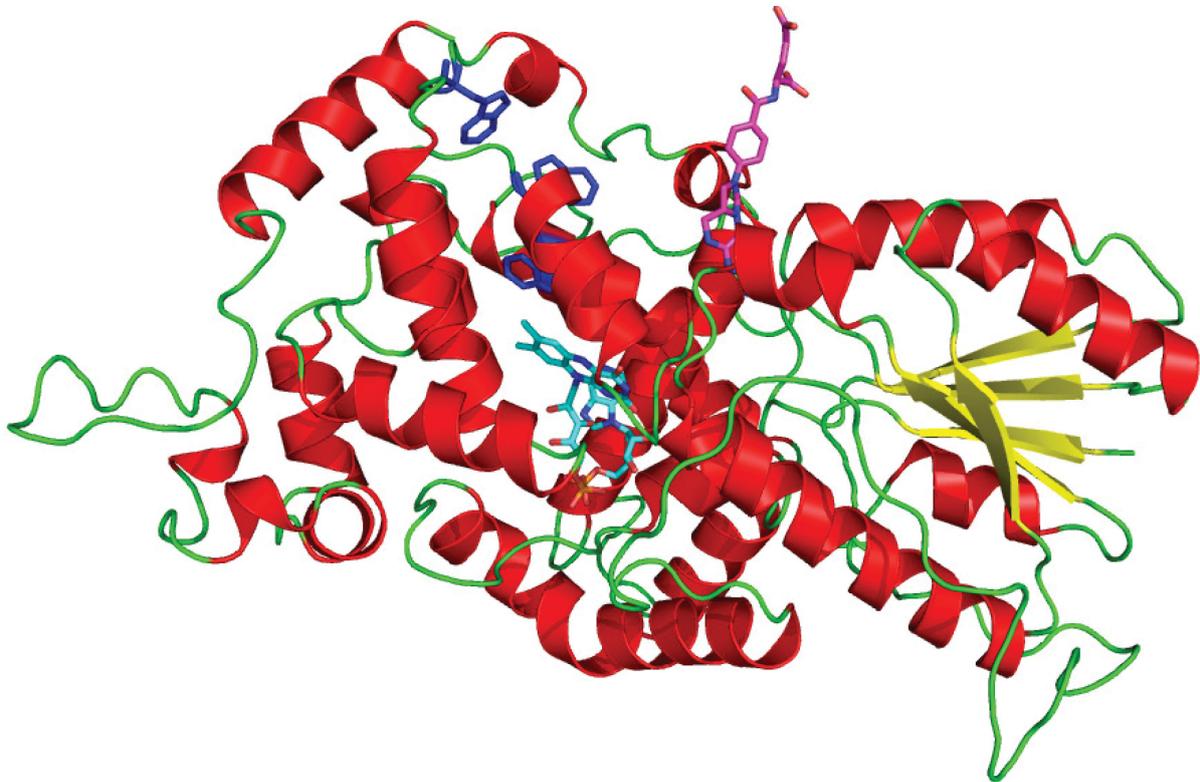


Abb. 33: Strukturmodell von Ver3Phr unter Verwendung der EcPhr (PDB ID: 1dnp) als Vorlage. Die für CPD Klasse 1 Photolyasen typische Tryptophantriade ist oben links in blau dargestellt, die Kofaktoren FAD in türkis und MTHF in violett.

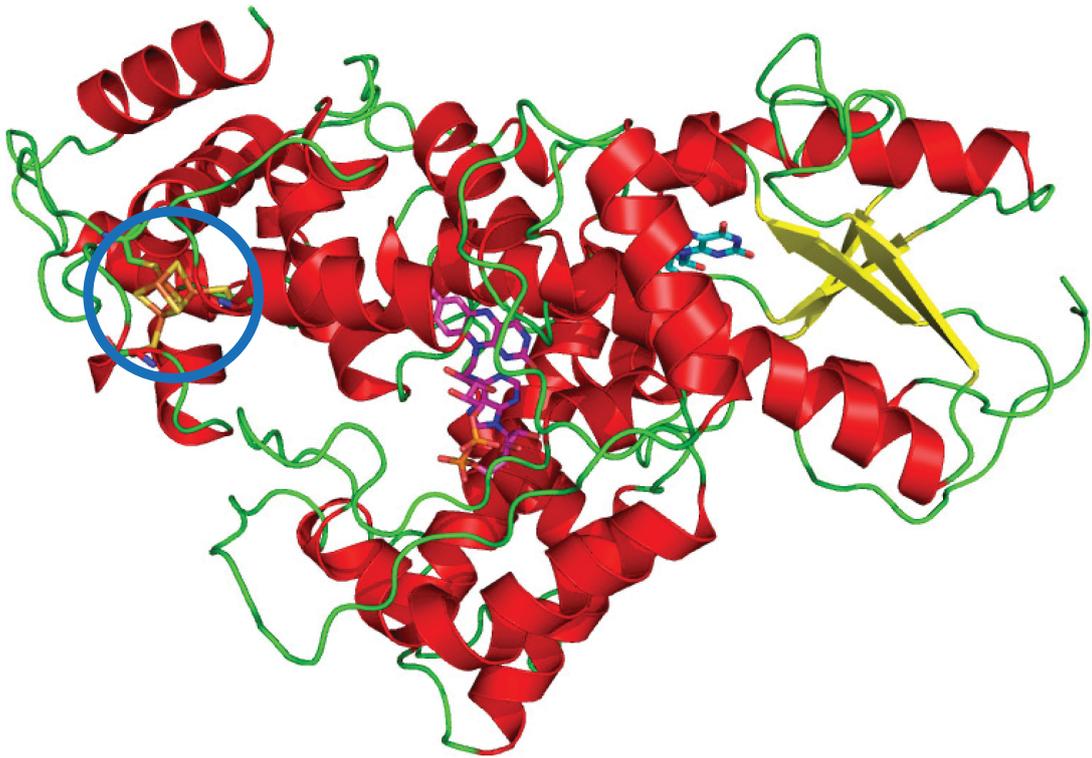


Abb. 34: Strukturmodell von Ver3PL2 mit *RsCryB* (PDB-ID: 3ZXS) als Vorlage. Der FAD Cofaktor ist in violett, das 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin in türkis und der vermutete FeS-Cluster in gelb/orange (eingekreist).

5.1.2. UV/Vis Spektroskopie Ver3Phr

Das UV-Vis Spektrum der Photolyasen Ver3Phr (rot) im Vergleich zu dem der Photolyase aus *E. coli* (EcPhr, blau) im unbelichteten Zustand zeigt Abb. 35. Man erkennt für EcPhr die lokalen Maxima bei 375 nm und 445 nm der MTHF- und FAD Cofaktoren, während für Ver3Phr kaum Absorptionspeaks zu finden sind. Eine breite, wenig ausgeprägte Absorption, die auf der Streuung aufsitzt, mit maximalen Absorptionen um 375 nm könnten dem Antennencofaktor MTHF zugewiesen werden und eine leichte Erhöhung um 420 nm könnte einen Hinweis auf ein reduziertes Flavin geben.

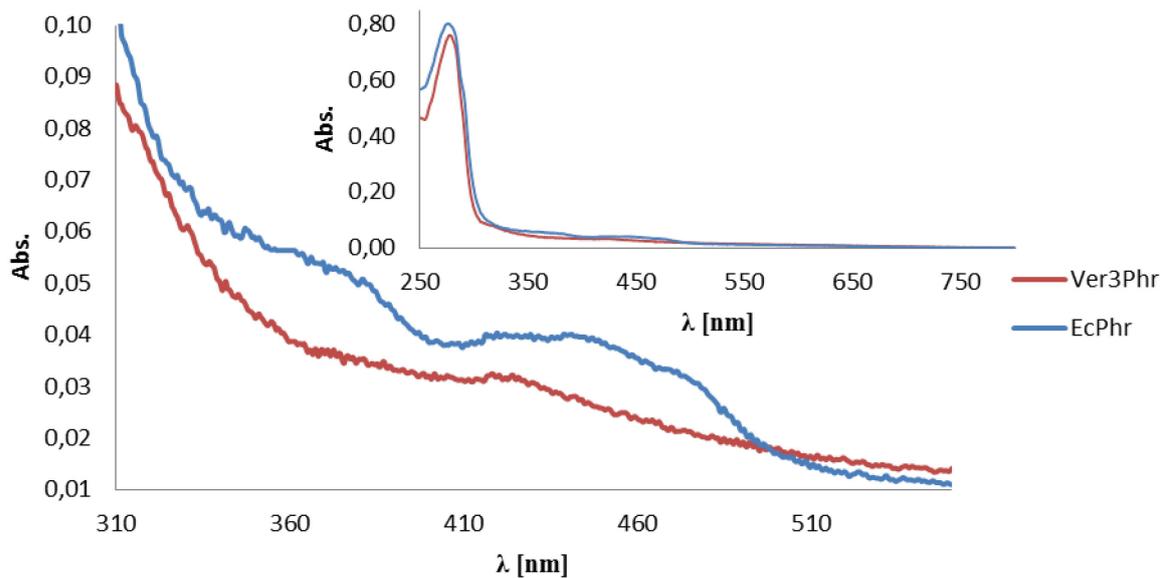


Abb. 35: Ausschnitt der Absorptionsspektren des unbelichteten Zustandes von Ver3Phr (rot) und EcPhr (blau) mit 1 mM DTT; Inset: Gesamtspektrum.

Belichtung von Ver3Phr mit langwelligem Licht (470 nm) führt zu einigen spektroskopisch nachweisbaren Veränderungen (Abb. 36). Insgesamt nimmt die Proteinabsorption um 280 nm ab, was auf Absorptionsveränderungen des Flavins und des Cofaktors hindeutet. Zwischen 310 und 320 nm tritt mit zunehmender Belichtungsdauer ein lokales Maximum auf, das allerdings nach ÜN Inkubation von der insgesamt kurzwellig zunehmenden Absorption wieder überdeckt wird. Im Bereich der Absorption der oxidierten Flavine (um 450 nm) sind allerdings auch nach der ÜN Inkubation nur geringe Absorptionsänderungen zu erkennen, so dass man vermuten kann, dass der Flavinchromophor in (halb)reduzierter Form vorliegt. Abb. 35 verdeutlicht insbesondere das lokale Absorptionsmaximum bei 425 nm, welches auch nach 120 min mit 470 nm nur geringfügig gebleicht wird. Allerdings ist ein isosbestischer Punkt bei 370 nm erkennbar, der auf eine vorhandene Photochemie mit nur geringen Absorptionsänderungen hindeutet.

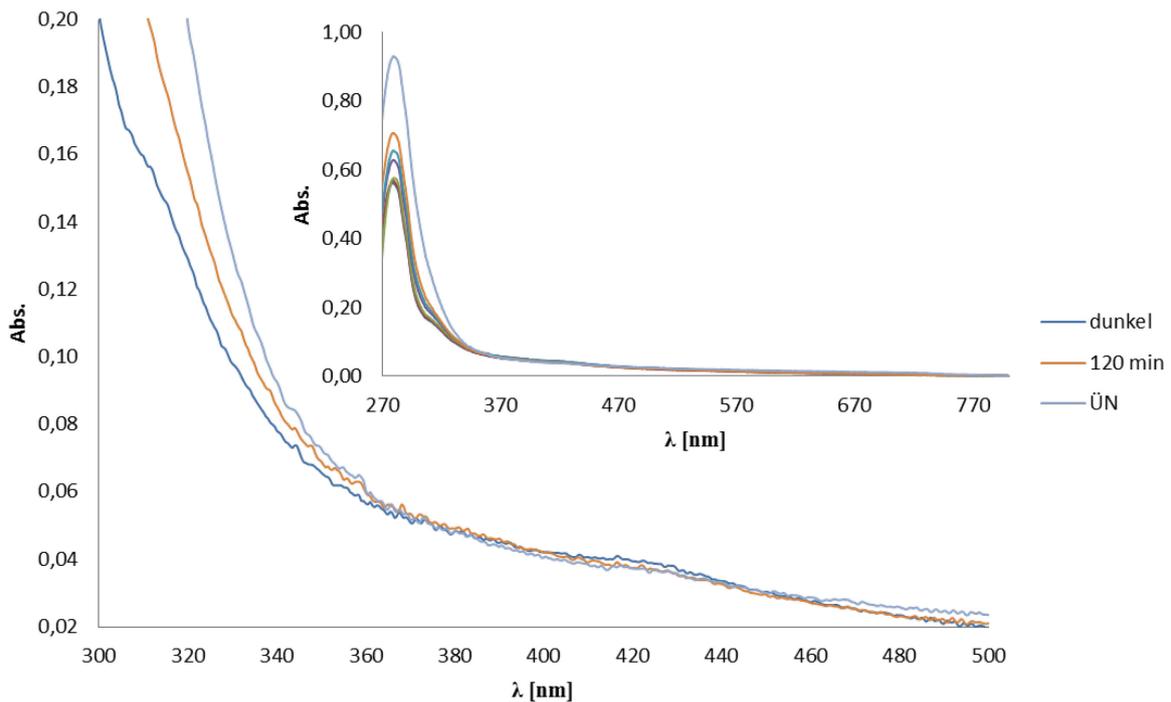


Abb. 36: Belichtungskinetik (470 nm) von Ver3Phr in den angegebenen Intervallen; Inset: Gesamtspektrum

Verwendet man allerdings kurzwelliges Licht (365 nm, Abb. 37), das bevorzugt den Antennenchromophor anregt, so zeigt sich ein anderes Bild: Auch hier verbleibt die geringe Absorption um 425 nm nahezu unverändert, während sich ein isosbestischer Punkt bei 338 nm ausbildet, einhergehend mit einem Absorptionsverlust im langwelligen und einer entsprechenden Zunahme der Absorption im kurzwelligen Bereich. Abb. 36 weist neben dem deutlich erkennbaren lokalen Maximum bei ca. 425 nm, welches durch die Belichtung mit 470 nm nur sehr schwach gebleicht wird. Dieser ist im Vergleich zu der Belichtung mit 365 nm (vergleiche Abb. 37) um ca. 30 nm blauverschoben. Die lokalen Maxima hingegen sind bei den gleichen Wellenlängen zu finden.

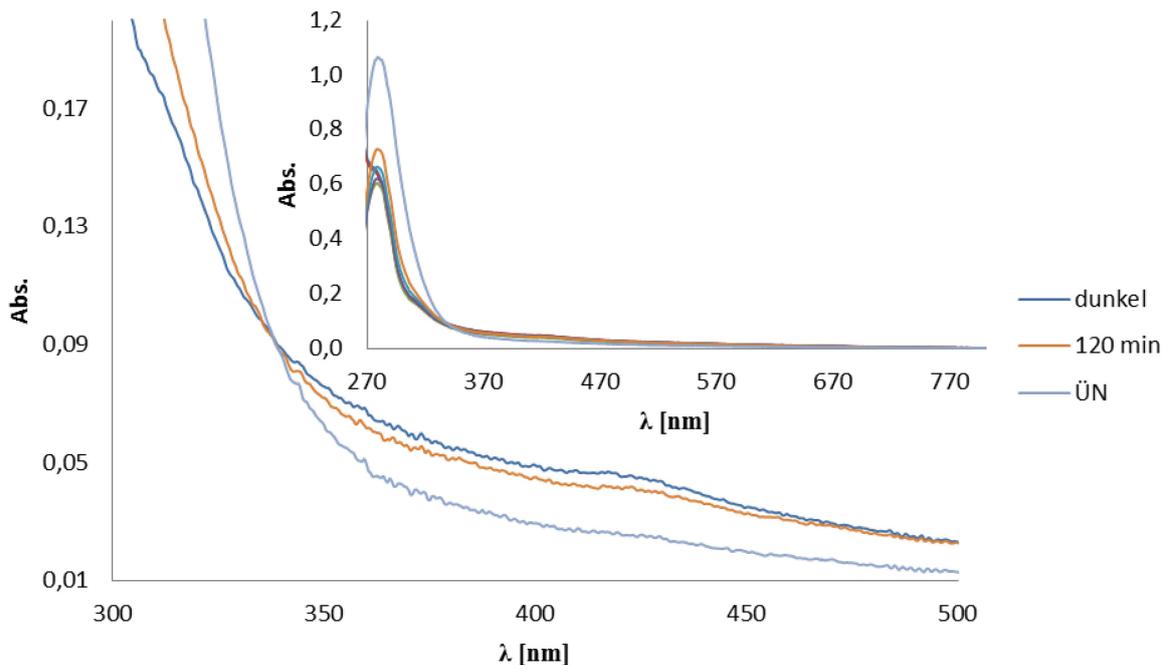


Abb. 37: Ausschnitt (300 – 500 nm) der Belichtungskinetik (365 nm) von Ver3Phr in den angegebenen Intervallen; Inset: Gesamtspektrum.

5.1.3. Fluoreszenzspektroskopie

Nachfolgend wurde Ver3Phr auf seine Fluoreszenzeigenschaften getestet, um genauere Aussagen zu den vorhandenen Chromophoren machen zu können. Zunächst wurde mit einer Anregungswellenlänge vom 440 nm der Bereich der Flavinabsorption überprüft. Die Emissionsmaxima sowohl von Ver3Phr als auch (zum Vergleich aufgenommen) von EcPhr zeigen eine deutliche Übereinstimmung mit der Emission des FAD Standards (Abb. 38). Dies wird darüber hinaus auch von den entsprechenden Anregungsspektren gestützt. Zu beachten ist, dass die Emission von Ver3Phr im Vergleich zu EcPhr um 10 nm blauverschoben ist. Das Anregungsmaximum von Ver3Phr hingegen ist um 15 nm rotverschoben.

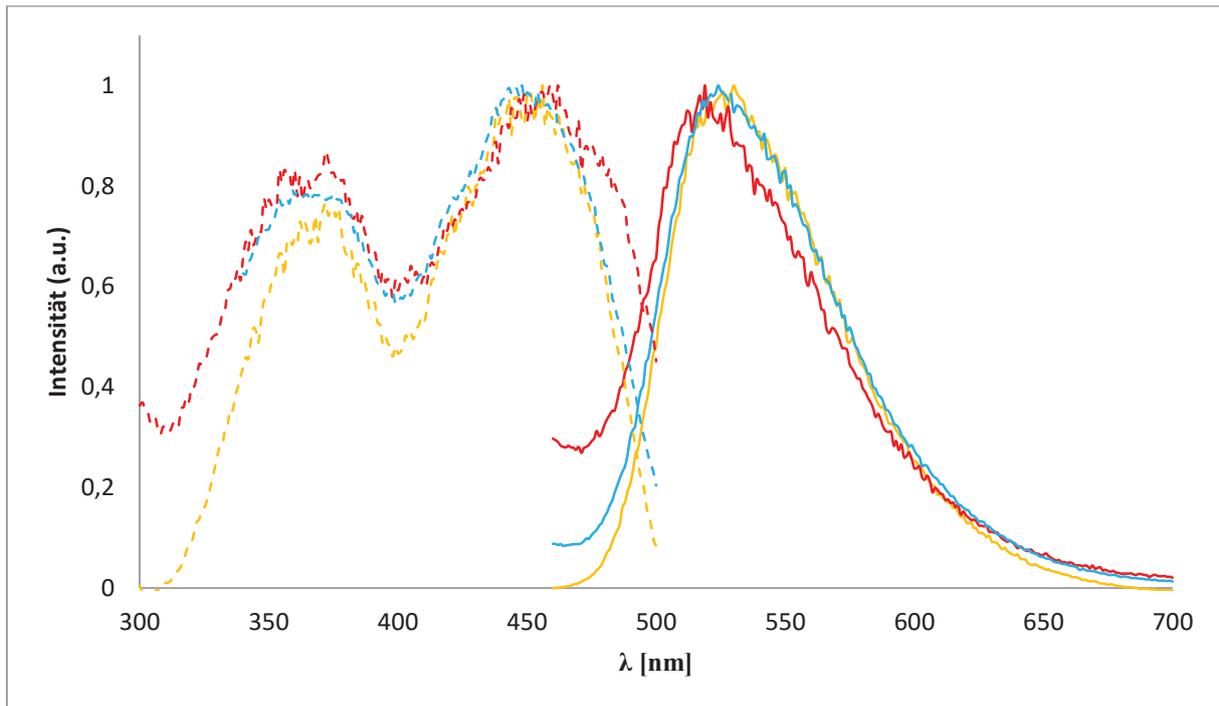


Abb. 38: Normierte Fluoreszenzspektren von Ver3Phr (rot), EcPhr (blau) und FAD in Lösung (gelb). Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$) sind in durchgezogenen Linien angegeben, die Anregungsspektren ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) in gleichen Farben mit gestrichelten Linien.

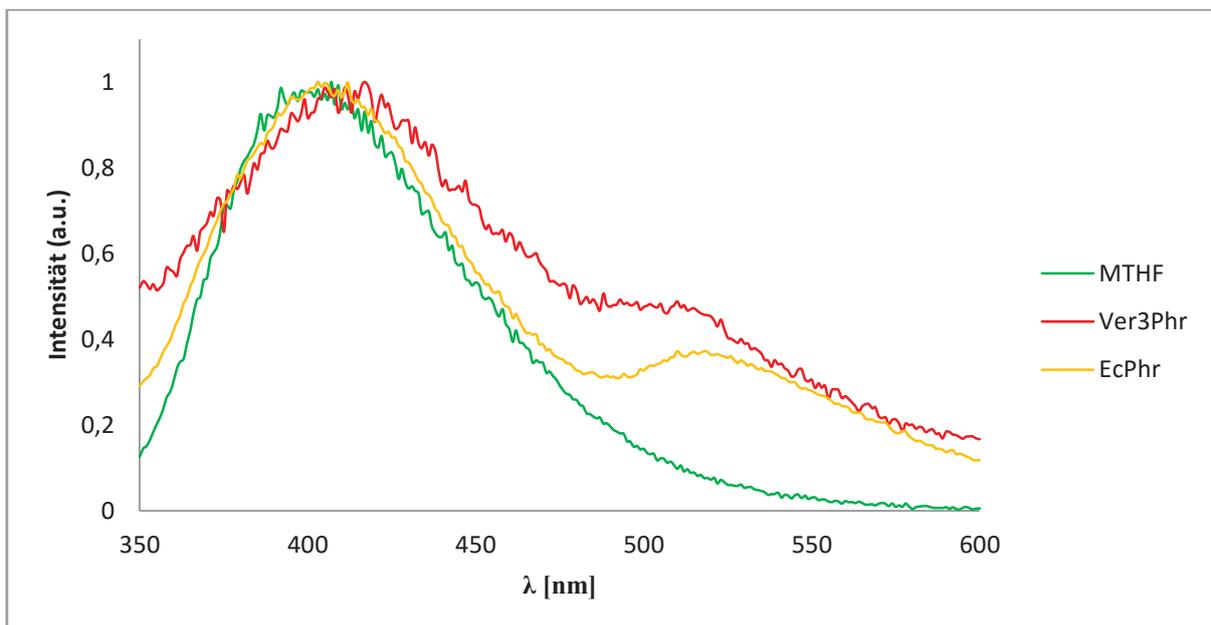


Abb. 39: Normierte Emissionsspektren von Ver3Phr (rot), EcPhr (gelb) und MTHF in Lösung (grün); $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$.

Nachfolgend wurde durch Verwendung von 330 nm bevorzugt der MTHF Cofaktor angeregt (Abb. 39 und Abb. 40). Man erkennt deutlich die Emission des Cofaktors mit Maximum um 400 nm, der damit als Komponente von Ver3Phr nachgewiesen wird. Weiterhin zeigt sich wiederum eine geringe Emission für oxidiertes Flavin im Wellenlängenbereich um 520 nm. Bemerkenswert hierbei ist, dass das

Emissionsmaximum von Ver3Phr im Vergleich mit EcPhr um 10 nm rotverschoben ist.

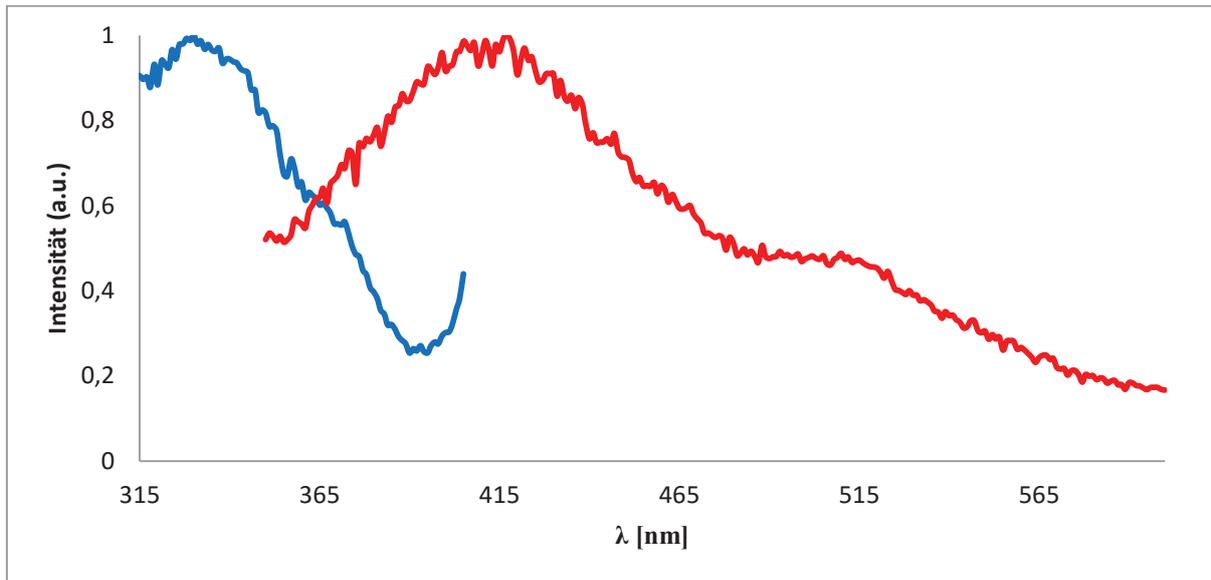


Abb. 40: Emissionsspektrum (rot) ($\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$) und Anregungsspektrum (blau) ($\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$) von Ver3Phr

5.1.4. Analyse der Cofaktoren von Ver3Phr und EcPhr mittels HPLC

Neben den spektroskopischen Nachweisen wurden versucht, die Chromophore beider Photolyasen, Ver3Phr und EcPhr durch Extraktion und nachfolgende HPLC nachzuweisen. Bei diesem Experiment werden allerdings, wie aus der Literatur zu entnehmen ¹¹⁴, die MTHF Cofaktoren zerstört. FAD (Abb. 41 und Abb. 42) konnte sowohl in Proben der denaturierten Ver3Phr als auch vergleichend in der denaturierten EcPhr einwandfrei mit Hilfe von HPLC Analysen und anschließender UV/Vis Spektroskopie der Peakfraktionen (siehe Anhang) nachgewiesen werden. Der Vergleich mit Referenzsubstanzen (s. Abb. 41 und Abb. 42) ergab eine eindeutige Übereinstimmung auch bezüglich der Elutionszeiten. MTHF konnte zwar als Standard vermessen werden (siehe Abschnitt 4.2.12), fand sich jedoch, in Einklang mit der Literatur, weder in den denaturierten Proben von Ver3Phr noch in EcPhr.

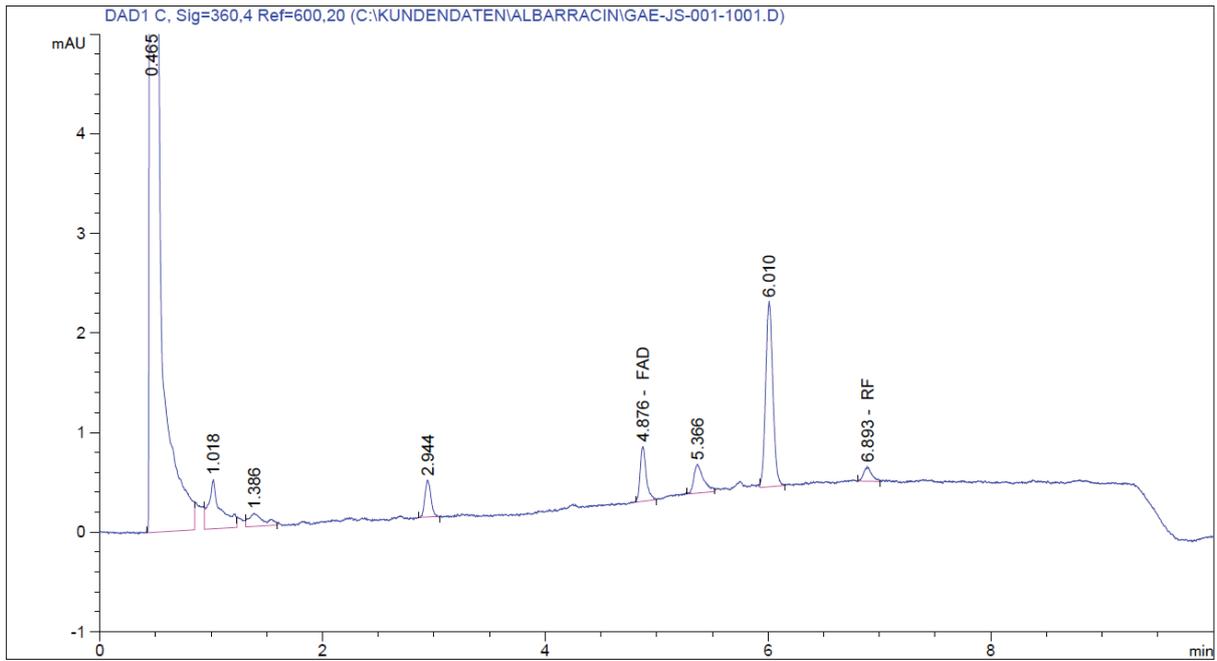


Abb. 41: HPLC Chromatogramm der denaturierten Ver3Phr. FAD wurde bei einer Laufzeit von 4,9 min detektiert, Riboflavin (RF) bei 6,9 min.

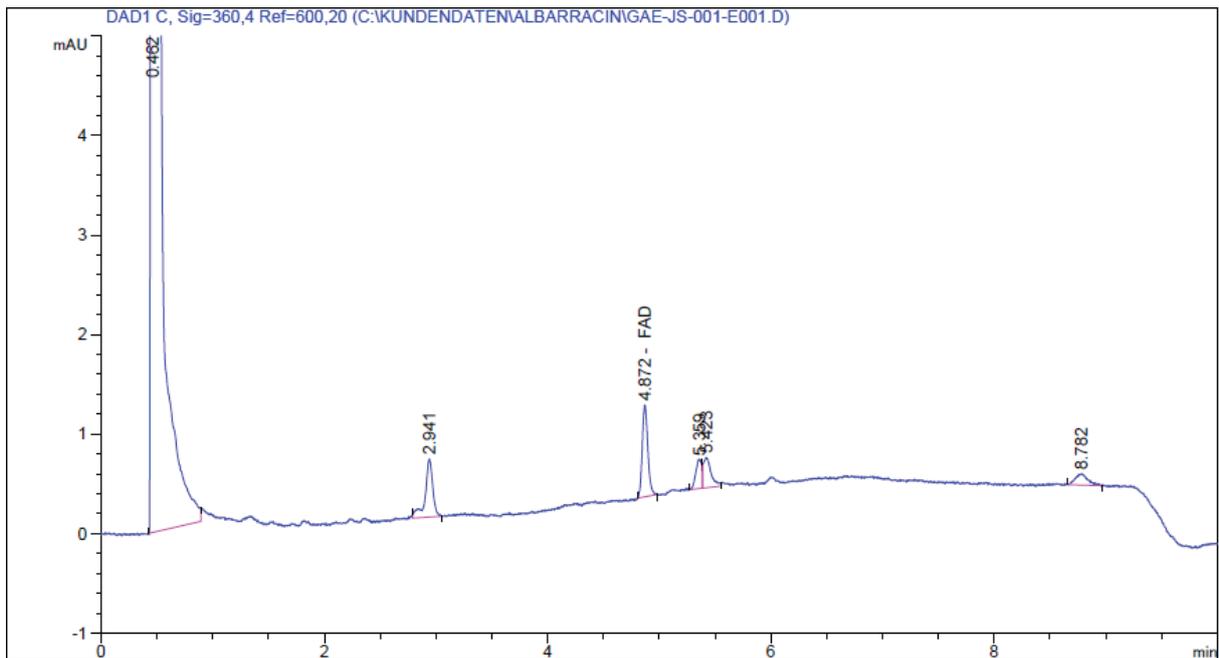


Abb. 42: HPLC Chromatogramm der denaturierten EcPhr. FAD wurde bei einer Laufzeit von 4,9 min detektiert.

5.1.5. Qualitative UV-Überlebens-Assays

Neben den analytischen Experimenten zur genaueren Charakterisierung der Photolyase Ver3Phr wurde auch der Herkunftsstamm (*Acinetobacter* Ver3) auf seine Photo-Reparatur-Eigenschaften getestet. Hierfür wurden die Proben, UV₅ (5 min UVB Bestrahlung und anschließend direkte Weiterverarbeitung), PR (5 min UVB mit anschließenden 120 min Photoreparatur) und DR (5 min UVB mit anschließenden 120 min im Dunkeln) sowie die Kontrollen T₀, T₅, und T₁₂₅ wurden wie in Kapitel 4.2.9 beschrieben hergestellt und behandelt. Bei mit T_x bezeichneten Proben gibt der Index die Zahl an Minuten an, die die Bakterien im Dunkeln inkubiert wurden, um diese so mit den Proben nach UV- Bestrahlung vergleichen zu können. Nach der ÜN-Inkubation der Platten wurden Fotos gemacht und die Anzahl der Kolonien nach Möglichkeit bestimmt, oder ein hohes („unzählbares“) bzw. kein Wachstum festgestellt. Diese Untersuchungsmethode der UV Resistenzen bietet aufgrund der Schwierigkeiten beim Zählen der Kolonien keine sehr hohe Genauigkeit und dient daher lediglich zu einer qualitativen Einordnung der Stämme.

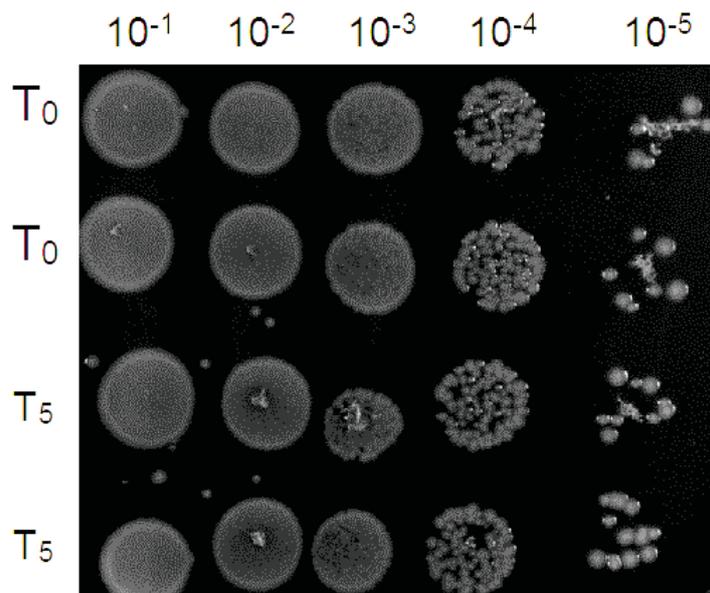


Abb. 43: Verdünnungsreihe von 10^{-1} – 10^{-5} (von links nach rechts) des Kontrollstamms KY1056 nach 0 min (T₀, Reihe eins und zwei) und 5 min UV-Bestrahlung (T₅, Reihe drei und vier) unter Lichtausschluss.

Abb. 43 zeigt sehr deutlich die Schwierigkeiten des Auszählens der Kolonien auf. Bei Proben dieser Art wurden nur die zählbaren Verdünnungsschritte in die spätere graphische Darstellung übernommen. Erläuterungen zu den Stämmen für dieses und das qualitative UV-Assay sowie für die Dimer-Analyse mittels HPLC-MS/MS sind Tab. 2 in Kapitel 4.1.1 zu entnehmen.

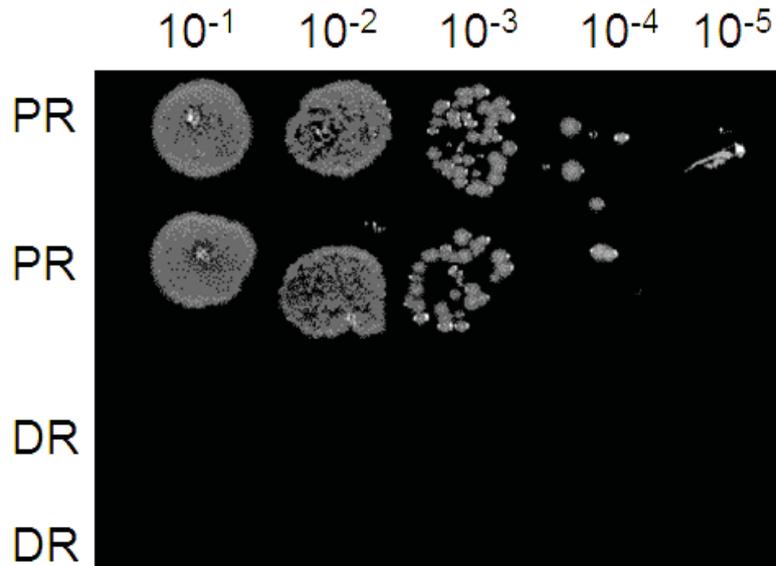


Abb. 44: Verdünnungsreihe von 10⁻¹ – 10⁻⁵ (von links nach rechts) des Kontrollstamms KY1056 nach 5 min UV Bestrahlung und 120 min Photoreparatur unter Weißlicht (PR, oberen beiden Reihen), bzw. nur mit Dunkelreparatur (DR, unten)

Abb. 43 und Abb. 44 wurden stellvertretend ausgewählt, um anhand der Koloniebildung des Kontrollstammes KY1056 die verschiedenen Auswirkungen durch UVB Bestrahlung auf das Wachstum der Bakterien zu veranschaulichen. Die Rohdaten der UV Experimente, die exemplarisch in Abb. 43 und Abb. 44 dargestellt sind, werden im Folgenden aufbereitet in Diagrammen dargestellt. Hierzu werden die nicht mit UV Licht bestrahlten Proben T₀, T₅, T₁₂₅ als Referenzwerte für die Proben UV₅ sowie PR und DR herangezogen (Indizes geben die Dauer der Inkubation in Minuten an, UV₅: 5 min. Bestrahlung mit UV-B Licht, PR: Photoreparatur, DR: Dunkelreparatur, T_x: Referenzproben ohne Behandlung). T₀ gilt hierbei als Standardwert für 100 % Wachstum.

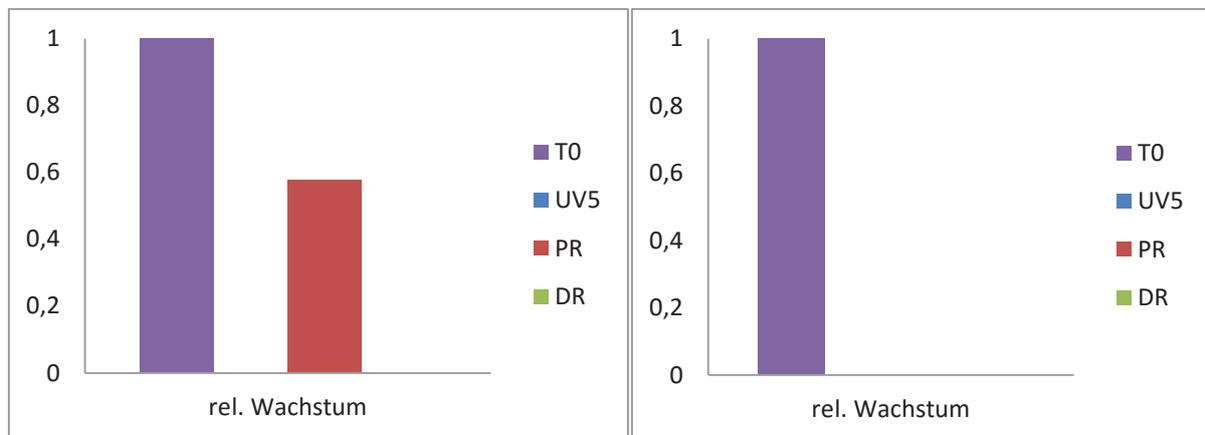


Abb. 45: Qualitative Bestimmung des relativen Wachstums des Stammes KY1056 (links) und des Stammes KY1225 (rechts) nach den angegebenen Behandlungsschritten.

Um die Photolyaseaktivität von ausschließlich Ver3Phr und EcPhr unter besser definierten Bedingungen untersuchen und vergleichen zu können, wurden die

Enzyme in *E. coli* heterolog exprimiert. Hierfür wurden KY1056 und KY1225 als Kontrollstämme herangezogen. Dabei basiert KY1225 auf dem Wildtyp KY1056. Der Unterschied besteht darin, dass in KY1225 die native Photolyase von *E. coli* durch eine knock-out Mutante entfernt wurde. Dies zeigt sich in Abb. 45 sehr deutlich durch das nicht vorhandene Wachstum von KY1225 nach UV Bestrahlung und anschließender Photoreparatur (PR). Im Gegensatz zu KY1225 ist der Wildtyp KY1056 zu einer Erholung nach Photoreparatur in der Lage. Nach alleiniger UV Behandlung ohne anschließende Reparaturmöglichkeit (UV₅) oder nach Dunkelreparatur sind hingegen beide Stämme nicht in der Lage zu überleben. Alle weiteren Angaben bezüglich dieser und anderer verwendeter Stämme im Zuge der UV Untersuchungen sind Tab. 2 in Abschnitt 4.1.1 zu entnehmen.

Zusätzlich zu der Entfernung der nativen Photolyase aus *E.coli* wurde in den Stamm KY1225 das Plasmid pREP4 eingefügt. Dieses codiert das Repressorprotein LacI, welches das Lac Operon und damit die Expression des Zielproteins hemmt, bis eine Verdrängung des Repressors durch IPTG eintritt, woraufhin die Photolyase exprimiert wird.

Dies wird in Abb. 46 verdeutlicht. Sie zeigt das relative Wachstum des Stammes KY1225 pREP4, der mit einem Ver3Phr codierenden Plasmid transformiert wurde. Dieser zeigt zwar nach ausschließlicher fünfminütiger Bestrahlung mit UVB (UV₅) kein Wachstum, dafür hingegen nach Photorepair ein deutlich erhöhtes und nach Dunkelreparatur ein etwas schwächeres Wachstum. Da die Proben für UV₅ kein Wachstum zeigten, konnten in diesem Fall keine relative Erholung nach der Photo- bzw. Dunkelreparatur ermittelt werden.

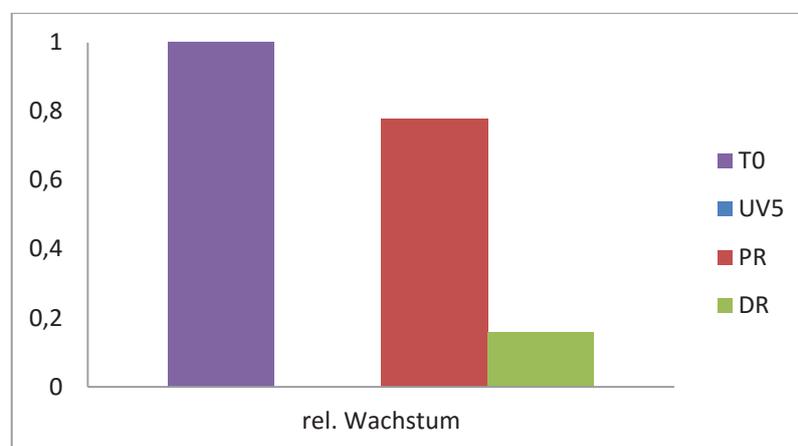


Abb. 46: Qualitative Bestimmung des relativen Wachstums des Stammes KY1225 pREP4 pQE60Ver3Phr nach den angegebenen Behandlungsschritten.

Der Effekt der induzierbaren heterologen Expression der *E. coli* Photolyase im Vergleich zur Expression von Ver3Phr unter ansonsten gleichen Bedingungen wird in Abb. 47 deutlich. Man erkennt das relative Wachstum und die relative Erholung nach fünf Minuten UV Behandlung von EcPhr-tragenden Zellen. Hierbei zeigt sich, dass das relative Wachstum nach Photoreparatur geringfügig niedriger ist als bei Ver3Phr-tragenden Zellen (vgl. Abb. 46). Auf der anderen Seite ist das Wachstum bei EcPhr besser als bei Ver3Phr, wenn man den Zellen nach UV Bestrahlung lediglich die Möglichkeit zur Dunkelreparatur bietet. Zu bemerken ist allerdings, dass Ver3Phr nach völliger Abtötung durch UV Bestrahlung (ohne die Möglichkeit der DNA Reparatur) nach einer Photoreparatur einen weit höheren Wert als EcPhr erreicht. Dagegen fällt der Unterschied vor und nach der Photoreparatur deutlich geringer aus.

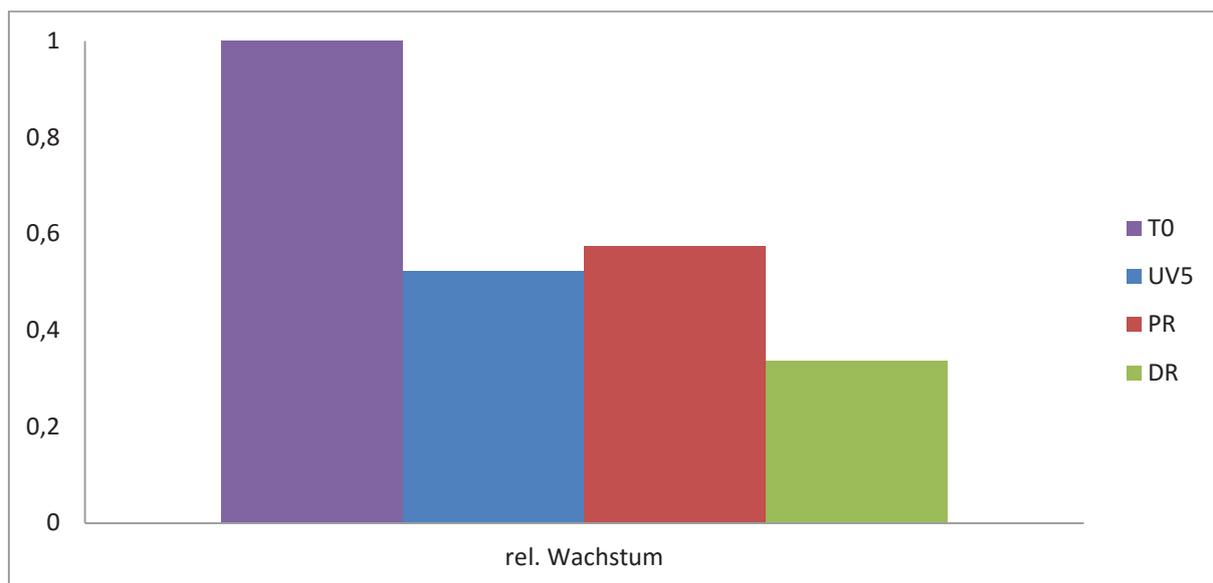


Abb. 47: Qualitative Bestimmung des relativen Wachstums des Stammes KY1225 pREP4 pQE60EcPhr nach den angegebenen Behandlungsschritten.

5.1.6. Quantitative UV-Überlebens-Assays

Die vorhergehenden Untersuchungen wurden durch weitergehende quantitative Assays ergänzt. Um die Beeinträchtigung des Wachstums der einzelnen Stämme durch UV Bestrahlung präziser quantifizieren zu können, wurden sie wie in Kapitel 4.2.10 beschrieben behandelt und die überlebenden Kolonien am folgenden Tag gezählt (Abb. 48).

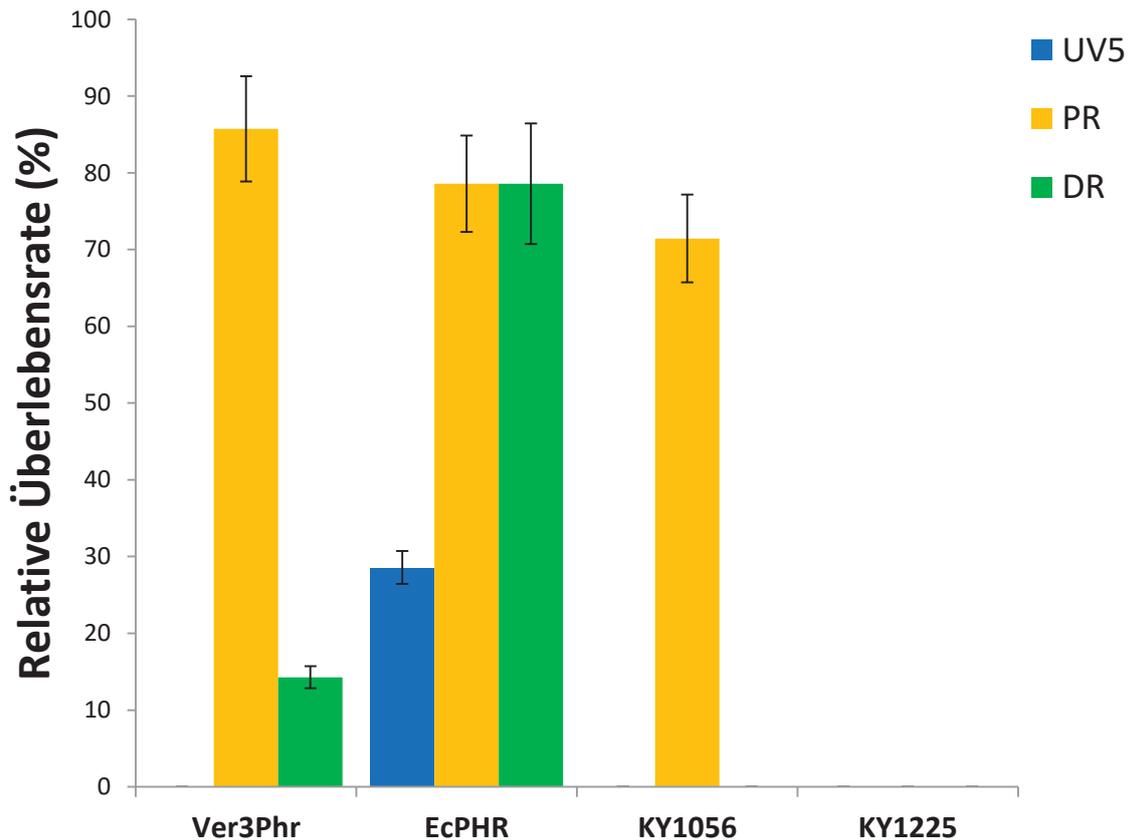


Abb. 48: Relative Überlebensrate nach ausschließlich 5 Minuten UVB Bestrahlung (UV_5), und mit anschließenden 120 Minuten Belichtung mit weißem Licht und damit der Möglichkeit der Photoreparatur (PR) sowie abgedunkelter Vergleichsproben (DR).

Es zeigt sich deutlich, dass lediglich Zellen mit eingefügter EcPhr in der Lage waren, die UV_5 Behandlung ohne anschließende Möglichkeit der Photo- oder Dunkelreparatur zu überleben. Nach 120-minütiger Photoreparatur zeigen mit Ver3Phr ausgestattete Zellen die höchste Überlebensrate von ca. 85%. EcPhr scheint hingegen eine effizientere Dunkelreparatur zu besitzen, da entsprechende Proben eine 80-prozentige Überlebensrate ergaben. Die Kontrollstämme zeigten wie erwartet keinerlei Wachstum. Lediglich der Wildtyp KY1056 zeigte Photoreparaturaktivität, die auf die in *E. coli* vorhandene native Photolyase zurückzuführen ist. Diese wurde in dem Stamm KY1225 durch eine Knock Out Mutation entfernt. Alle weiteren Stämme, so auch die mit EcPhr oder Ver3Phr versehenen, basieren auf KY1225 mit dem Plasmid pREP4. Nähere Informationen zu den verwendeten Stämmen und Plasmiden sind Tab. 2 zu entnehmen. Die DNA aus allen Proben wurde im Anschluss an die Behandlungen extrahiert und wie in Abschnitt 4.2.11 beschrieben untersucht.

5.1.7. Photoproduktanalyse mittels HPLC-ESI-MS/MS

Dieser Teil der Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Thierry Douki und Jean Cadet am Laboratoire „Lésions des Acides Nucléiques“ in Grenoble wie in Kapitel 4.2.11 beschrieben durchgeführt. Hier bestand die Möglichkeit, mittels einer HPLC-MS Kombination die Anzahl an Thymidin-Dimeren pro 10^6 Basen genau zu bestimmen.

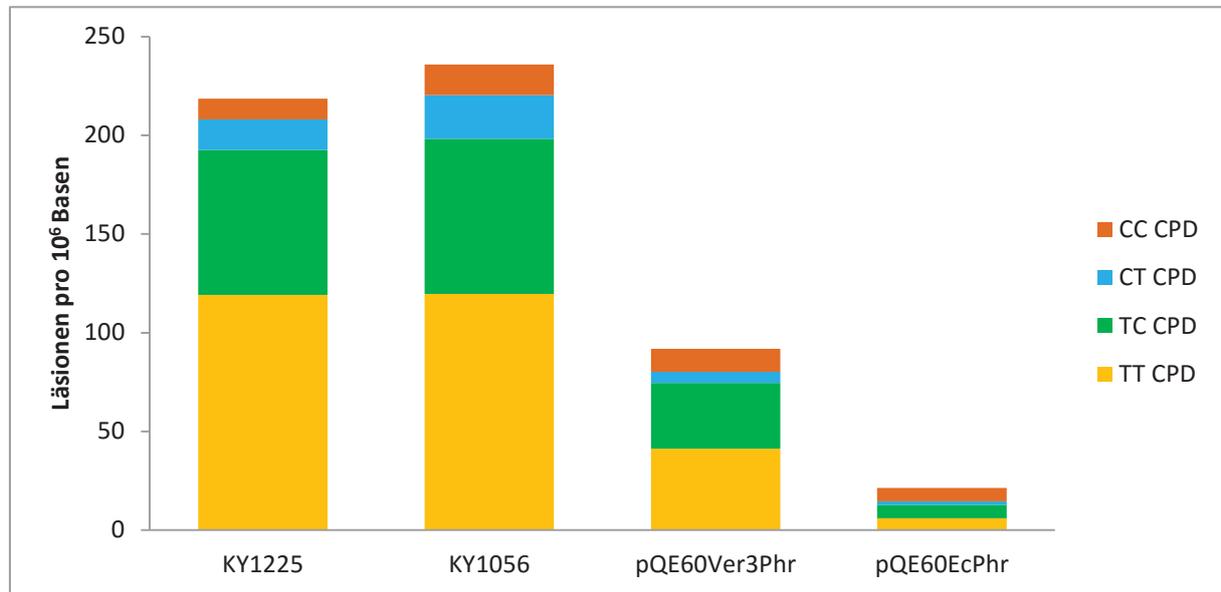


Abb. 49: Anzahl der CPD Photoprodukte in den Photolyase exprimierenden Stämmen (Ver3Phr und EcPhr), im Vergleich mit den untransformierten Kontrollstämmen KY1225 (phr⁻) und KY1056 (phr⁺) nach 5 min UVB Bestrahlung (UV₅). Die Anzahl der Läsionen wird pro 10^6 Basen der extrahierten DNA angegeben.

In der Gegenüberstellung zeigt sich, dass die verschiedenen Arten von Läsionen nicht in gleichen Mengen entstehen. Wie in der Literatur beschrieben¹¹⁴, bilden in jedem Stamm die TT-CPDs den größten Anteil an der Gesamtheit der Läsionen darstellen. Genauer entstehen die Photoprodukte in absteigender Reihenfolge TT > TC > CT > CC (T: Thymin, C: Cytosin)¹⁵⁹. Deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen finden sich auch in der Anzahl der Läsionen (Abb. 49). Wie zu erwarten, weisen die Kontrollstämme KY1225 und KY1056 mit jeweils ca. 219 bzw. 236 Läsionen pro 10^6 Basen die meisten CPDs auf. Für Ver3Phr findet man im Vergleich zu KY1225 58% weniger Läsionen, für EcPhr sind es sogar 90 % weniger. Ausführliche Informationen bezüglich der einzelnen Stämme sind Tab. 2 in Kapitel 4.1.1 zu entnehmen.

Die Qualität der HPLC-MS Methode Läsionen nach UV-Belichtung nachzuweisen, erlaubte es auch, mit hoher Präzision die Reparaturfähigkeit der verschiedenen Bakterienstämme quantitativ zu bestimmen (Abb. 50). Hier wird der Prozentsatz an verbleibenden Läsionen aus der UV-Belichtung nach Photo- oder Dunkelrepar

dargestellt, d.h., hohe Prozentzahlen weisen auf geringe Reparaturfähigkeit hin. Man erkennt eindrucksvoll die Effizienz der Photo- und Dunkelreparatur der einzelnen Stämme. So zeigen die Kontrollstämme fast keine Dunkelreparatur und lediglich KY1056 weist eine Reduzierung der Läsionen nach Photoreparatur durch seine native Photolyase auf. Deutliche Unterschiede sind auch zwischen den Ver3Phr und EcPhr exprimierenden Stämmen zu erkennen. So erreicht Ver3Phr mit einer Reduzierung der Läsionen um 81 % die höchste Effizienz der Photoreparatur. Im Vergleich dazu vermag EcPhr durch Photoreparatur die Läsionen nur um 15 % verringern, zeigt aber andererseits eine effizientere Dunkelreparatur.

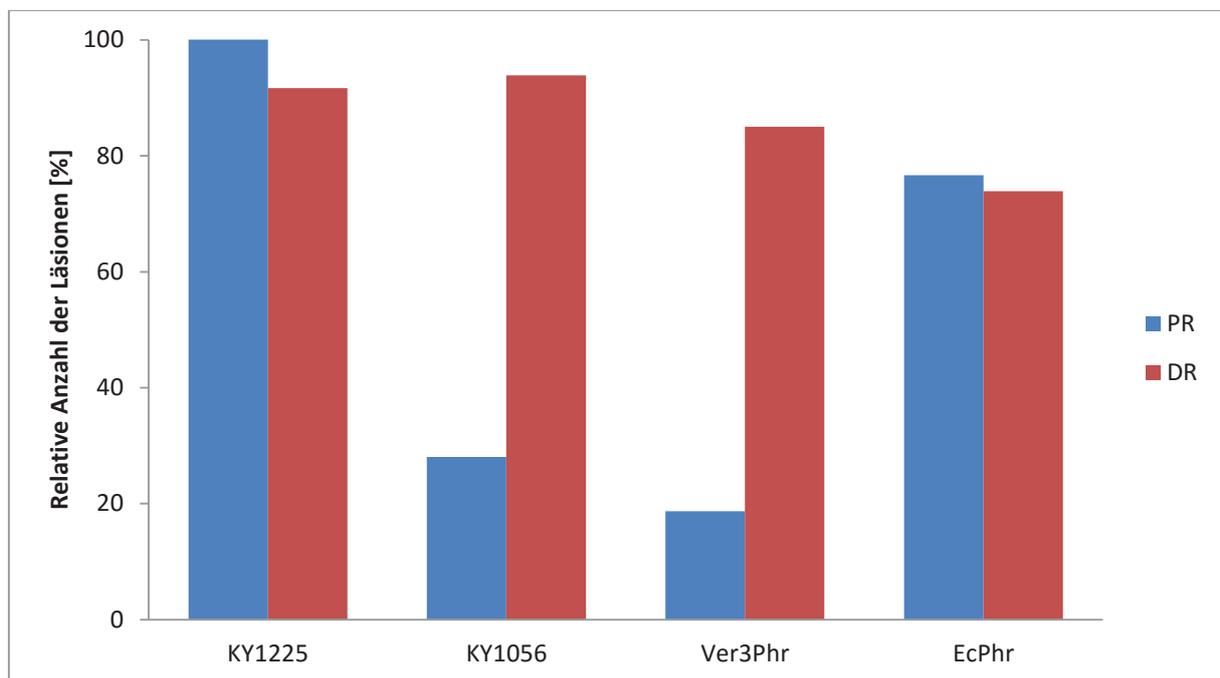


Abb. 50: Relative Anzahl der verbleibenden Läsionen nach Photoreparatur (PR) und Dunkelreparatur (DR) in den jeweiligen transformierten Stämmen und Kontrollstämmen im Vergleich mit UV₅.

Schlüsselt man die CPDs nun nach Art der Läsionen auf (Abb. 51), so zeigt sich, dass Ver3Phr bei allen CPDs mindestens 50 % der Läsionen entfernen kann und dabei vor allem bei Thymidin-haltigen CPDs, speziell TT- und TC-Dimeren am effizientesten ist. EcPhr ist hingegen nur in der Lage, etwa 35 % der Läsionen zu entfernen.

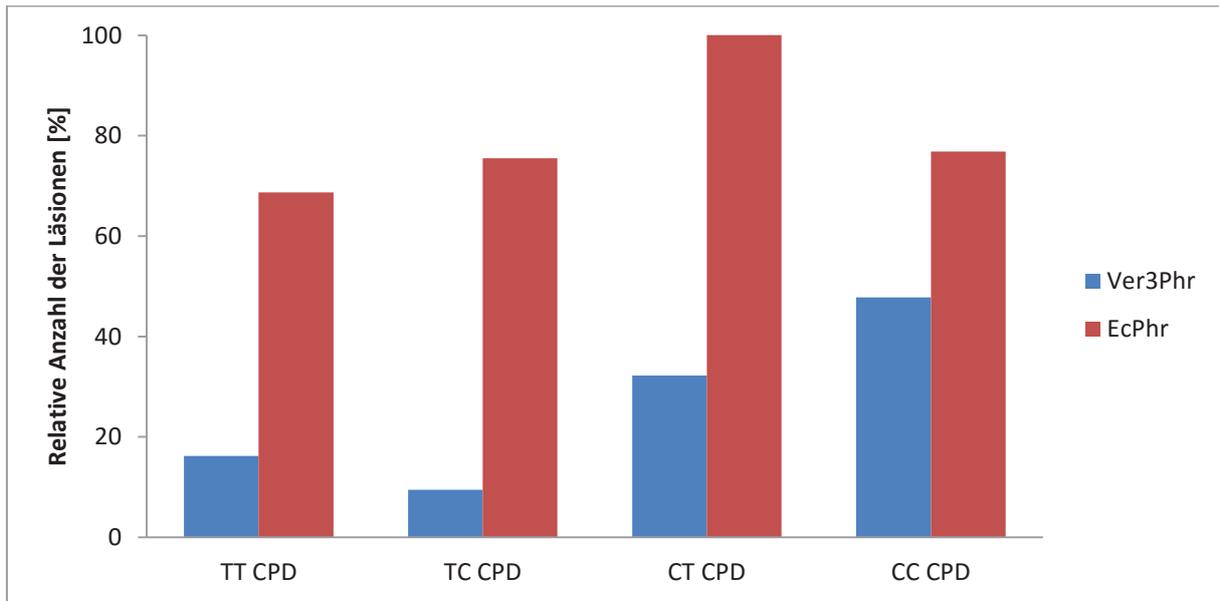


Abb. 51: Aufschlüsselung der in Abb. 50 dargestellten Photoreparatur (PR) nach Art der CPDs für Ver3Phr und EcPhr.

Betrachtet man die gleiche Aufschlüsselung für die Dunkelreparatur, so zeigt sich für Ver3Phr eine ähnliche Verteilung der Effizienz. Diese ist allerdings, wie auch schon Abb. 50 zu entnehmen, insgesamt deutlich geringer als die der Photoreparatur. Bemerkenswert ist jedoch, dass Ver3Phr bezüglich der am häufigsten auftretenden TT-Dimere auch in der Dunkelreparatur effizienter in deren Beseitigung ist als EcPhr. Ansonsten weist EcPhr eine insgesamt höhere Effizienz der Dunkelreparatur auf, speziell bei heterogenen Dimeren mit einer Reduzierung von mindestens je 62 %.

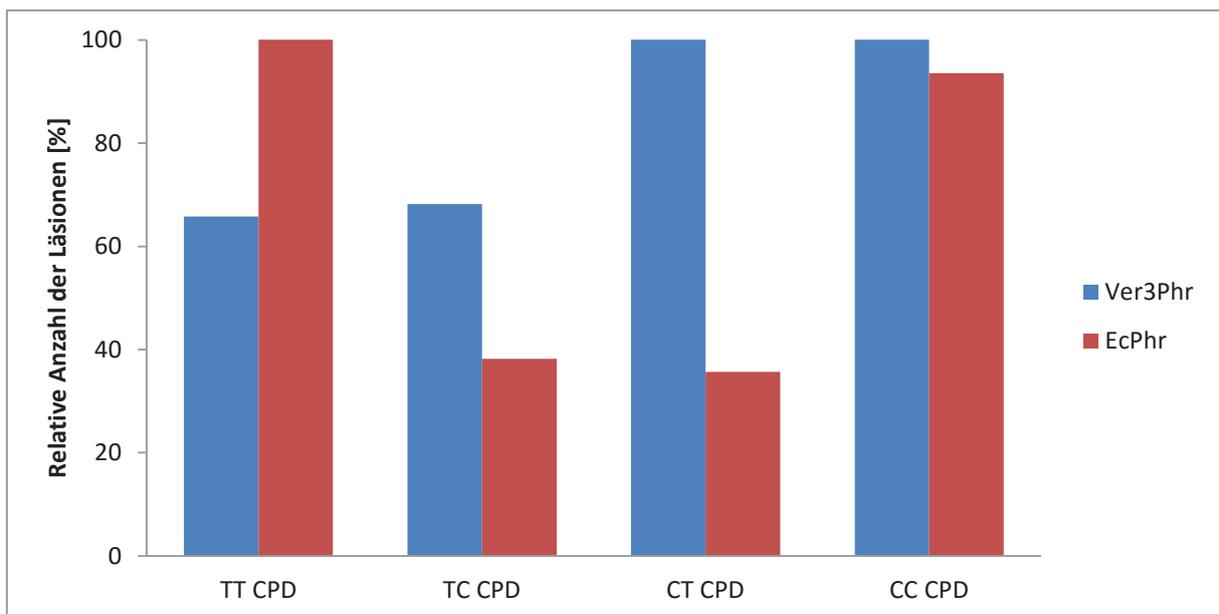


Abb. 52: Aufschlüsselung der in Abb. 50 dargestellten Dunkelreparatur (DR) nach Art der CPDs für Ver3Phr und EcPhr.

5.1.8. Das Cryptochrom Ver3PL2

Dieses ursprünglich als Ver3PL2 charakterisiertes Protein zeigt Eigenschaften, insbesondere die Anwesenheit einer C-terminalen Extension (Abb. 34), die es eher als Cryptochrom einstufen lassen. Auch hier wird spektroskopisch der Nachweis auf vorhandene Chromophore geführt. Allerdings erlaubten Instabilität und geringe Expressionsausbeute keine detaillierteren Untersuchungen.

5.1.8.1. UV/Vis Spektroskopie des Photolyase ähnlichen Proteins Ver3PL2

Im Folgenden werden die Effekte von unterschiedlichen Wellenlängen und Reduktionsmitteln auf die Absorption von Ver3PL2 untersucht. Bei einer einfachen Belichtung von Ver3PL2 mit 470 nm ohne Reduktionsmittel zeigt sich selbst nach 120 min nur eine sehr geringfügige Änderung der Absorption (Abb. 53). Das Differenzspektrum mit nur marginalen Absorptionsänderungen zeigt jedoch eine Bleichung in einem weiten Wellenlängenbereich von 380 – 800 nm mit einer maximalen Auslenkung um 500 nm. Andererseits könnte man eine leichte Erhöhung der Absorption um 320 nm erkennen.

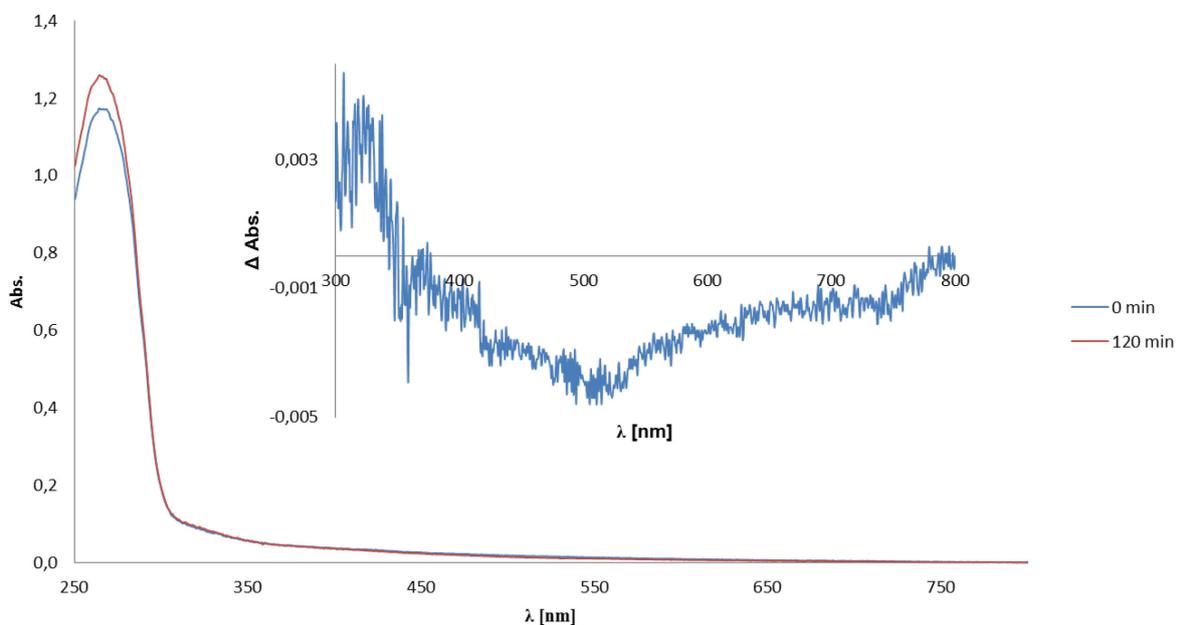


Abb. 53: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 470 nm in den angegebenen Intervallen ohne DTT. Die Spektren nach 5, 15, 30 und 60 min sind um einer besseren Übersichtlichkeit willen und aufgrund der geringeren Änderungen nicht aufgeführt; Inset: Differenzspektrum.

Führt man die Belichtungen in Gegenwart des Reduktionsmittels DTT durch (50 bzw. 150 mM, Abb. 54 und Abb. 55), prägt sich eine Absorption um 320 nm stärker aus. Allerdings führt die Dauer der Belichtung mit 470 nm kaum zu einer Absorptionsänderung.

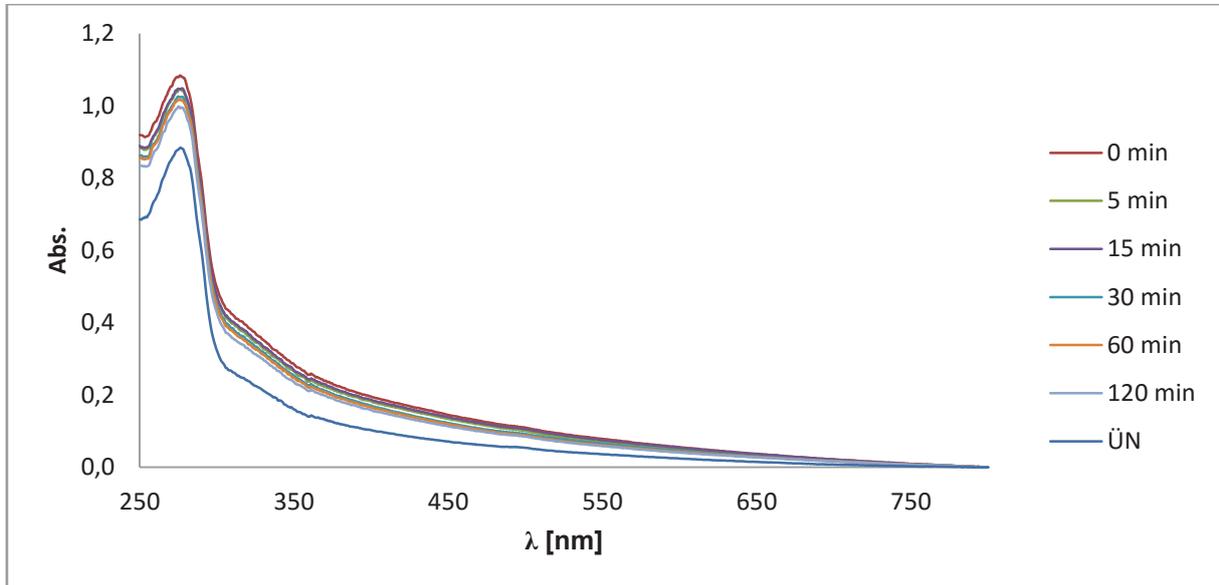


Abb. 54: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 470 nm in den angegebenen Intervallen und unter Zusatz von 50 mM DTT.

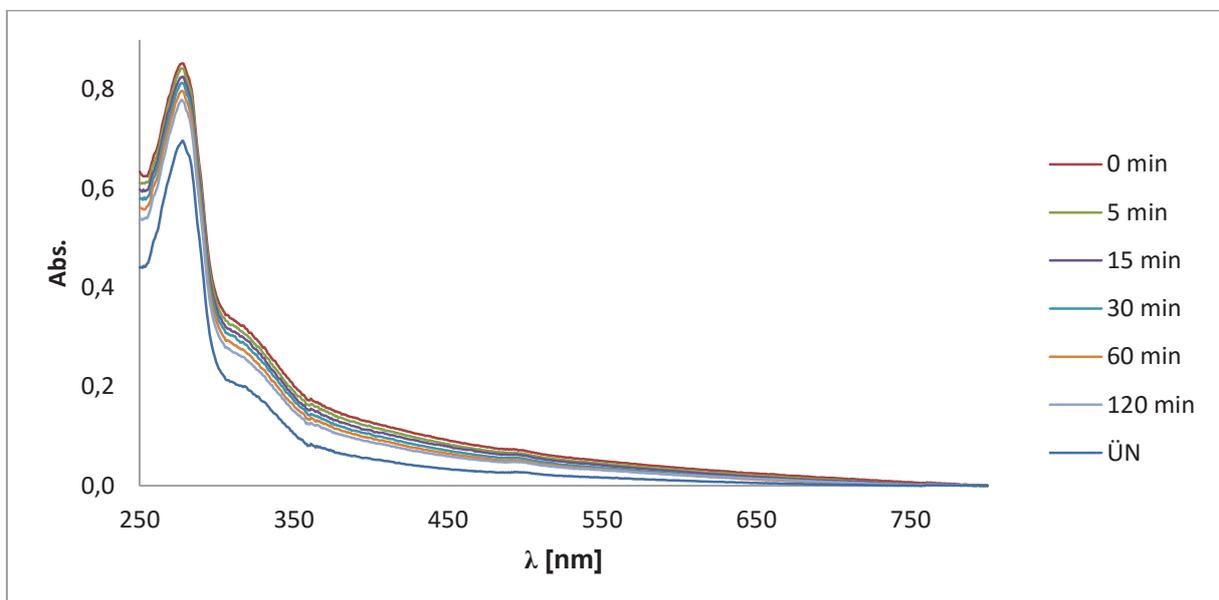


Abb. 55: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 470 nm in den angegebenen Intervallen und unter Zusatz von 150 mM DTT.

Auch eine Änderung der Belichtungswellenlänge zu 365 nm, die bevorzugt den Antennen-Cofaktor anregen würde, führt ohne Zusatz an Reduktionsmittel (DTT) nur zu geringen, nicht systematischen Absorptionsänderungen, die keinerlei Rückschlüsse auf photochemisch aktive Komponenten erlauben.

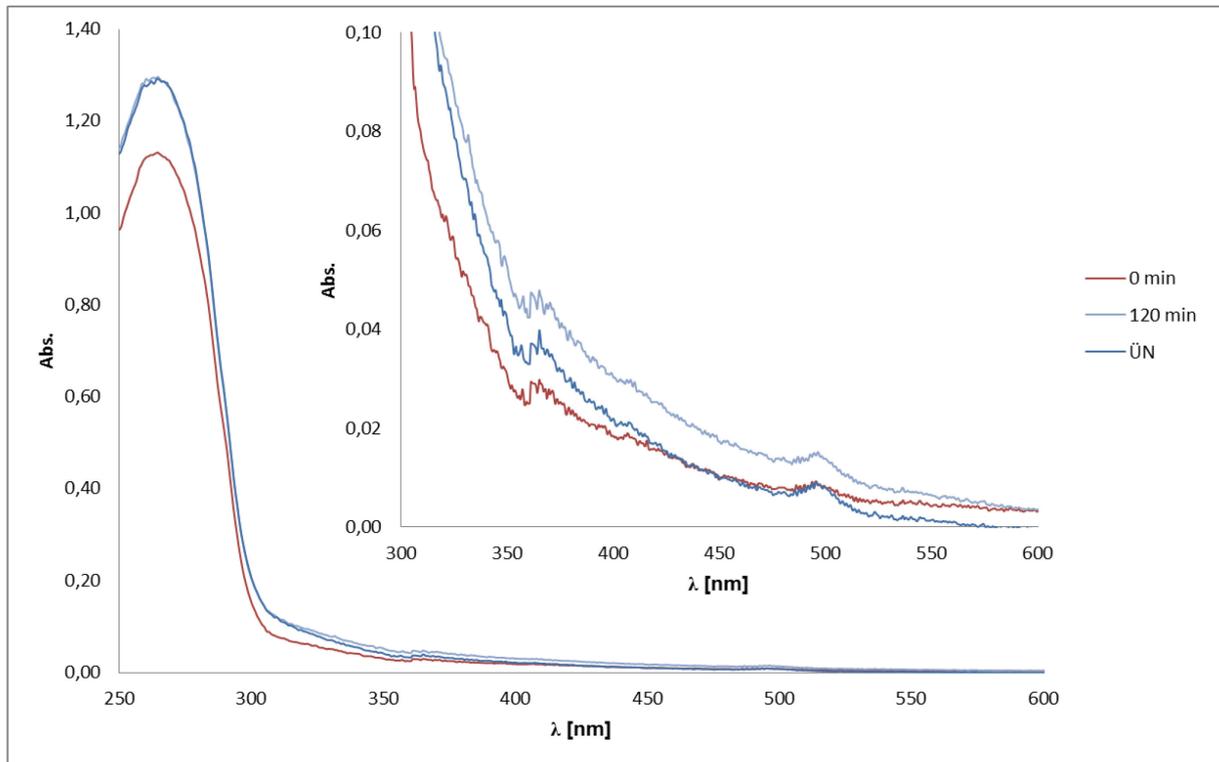


Abb. 56: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 365 nm in den angegebenen Intervallen ohne DTT.

In Anwesenheit von 50 mM DTT (Abb. 57) bildet sich nach einer Bestrahlung mit 365 nm ein lokales Maximum bei 380 nm aus, welches jeweils nach Inkubation über Nacht (ÜN) sichtbar absinkt, wohingegen ein neues, schwach ausgeprägtes Maximum bei 450 nm entsteht.

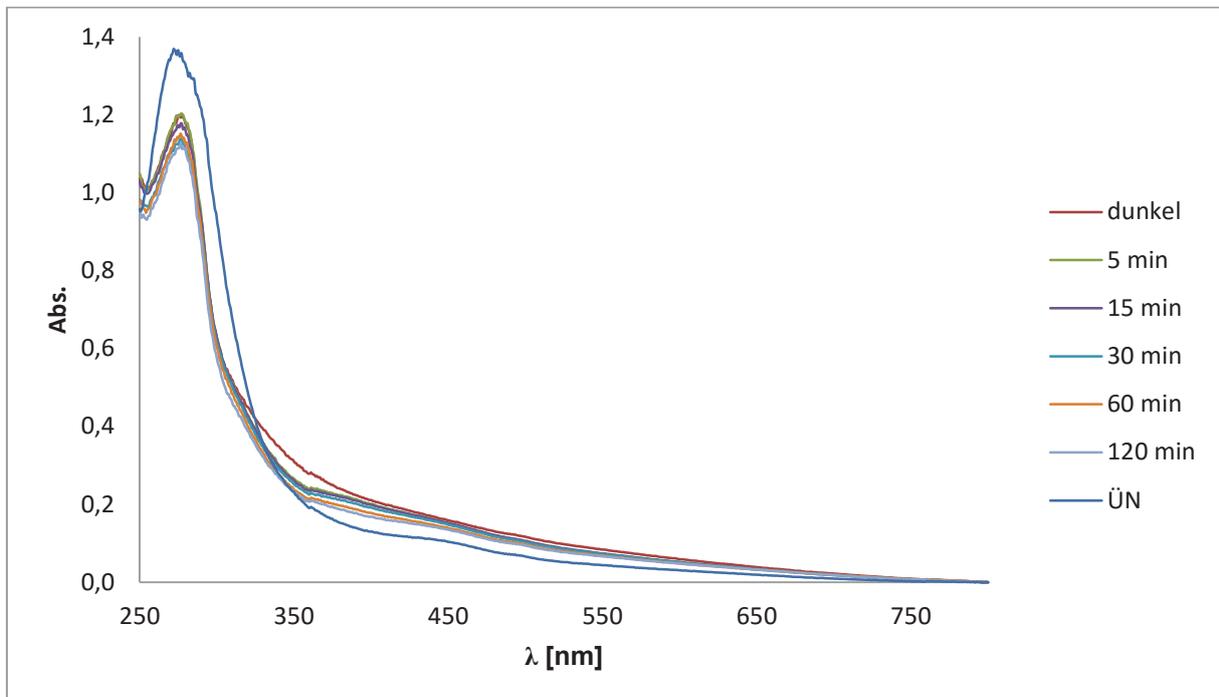


Abb. 57: Belichtungskinetik von Ver3PL2 mit 365 nm in den angegebenen Intervallen und unter Zusatz von 50 mM DTT.

Die Einwirkung des Reduktionsmittels DTT führte zu Veränderungen der Absorption in den Belichtungsexperimenten. Entsprechend wurde die Rolle von DTT durch Zugabe unterschiedlicher Mengen auf die Absorption von Ver3PL2 im Dunkeln geprüft (Abb. 58). Man findet einen stetigen Anstieg der Streuung, die damit auch das lokale Maximum bei 320 nm erhöht. Damit geht einher, dass die Struktur dieser Absorptionsschulter allmählich verschwindet.

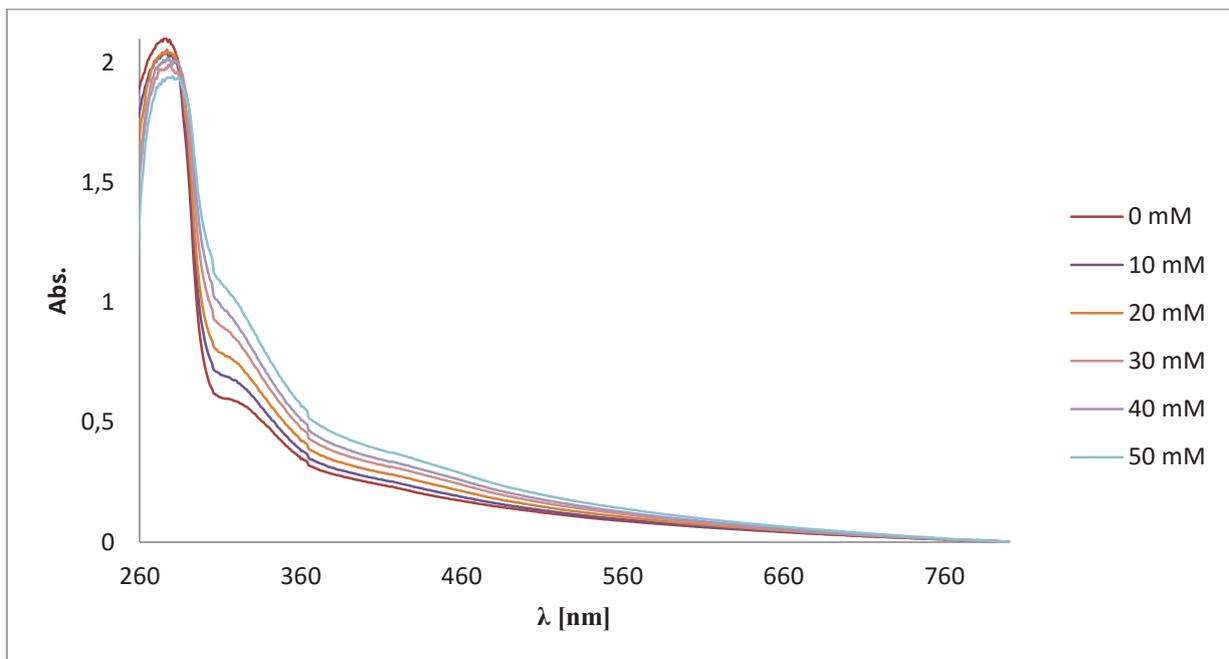


Abb. 58: Absorptionsspektren von Ver3PL2 bei verschiedenen DTT-Konzentrationen.

5.1.8.2. Fluoreszenzspektroskopie von Ver3PL2

Trotz der nur geringen Informationen, die aus den Absorptionsspektren nach verschiedenen Belichtungen und Zugabe von DTT erhalten wurden, wurde versucht, mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie Aussagen über die Anwesenheit verschiedener Chromophore zu erzielen (Abb. 59). Sowohl Emissions- als auch Anregungsspektrum von Ver3PL2 zeigen Charakteristika eines FAD Cofaktors. Interessanterweise ist die Emission von Ver3PL2 im Vergleich zu dem als Referenz verwendeten freien FAD in Pufferlösung um ca. 10 nm blauverschoben.

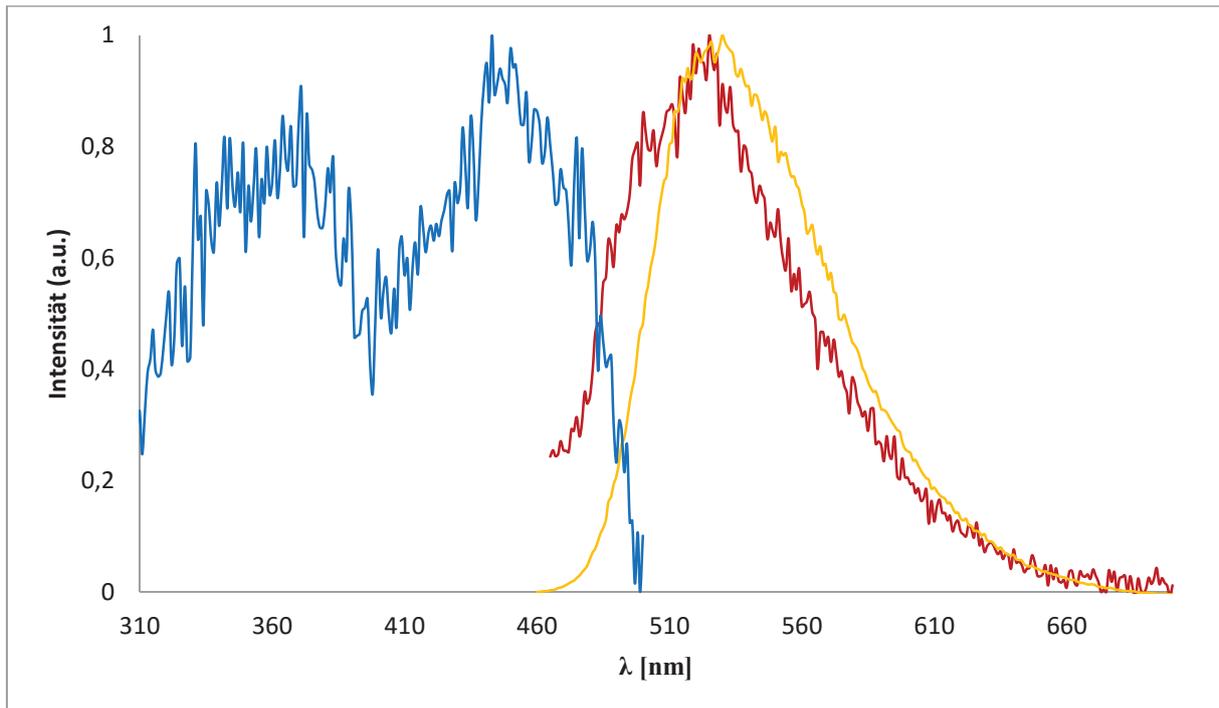


Abb. 59: Normierte Fluoreszenzspektren von Ver3PL2. Das Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) von Ver3PL2 (rot) ist vergleichend mit dem Emissionsspektrum von FAD in Lösung (gelb) bei der gleichen Anregungswellenlänge dargestellt. Das Anregungsspektrum von Ver3PL2 ($\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$) ist in blau dargestellt.

5.1.9. Diskussion: Photolyasen und Cryptochrome

Mit Hilfe verschiedener *in silico* Instrumente wie Sequenz-Alignment-Tools, BLAST und Strukturvorhersage-Algorithmen konnte ein gutes theoretisches Bild von den Photolyasen erstellt werden, um die danach folgenden Messungen auszurichten. Diese Untersuchungen und Abgleiche mit bekannten Photolyasen waren wichtig, um Art und Beschaffenheit der Cofaktoren einzugrenzen. Darüber hinaus tragen 3D-Strukturvorhersagen dazu bei, die Mechanismen dieser Enzyme besser zu verstehen und in späteren Arbeiten folgende Kristallisationsversuche einfacher zu gestalten. Im Vergleich zu früheren Arbeiten an diesen Proteinen konnten Überexprimierung und Aufreinigung der Photolyasen erheblich verbessert werden. Dies hatte natürlich auch einen positiven Effekt auf die folgenden Messungen und daraus resultierenden Ergebnisse. Einen erheblichen Einfluss auf die Proteinqualität nach der Aufreinigung mittels der IMAC-Methode hatte die Anpassung der einzelnen Imidazolkonzentrationen bei der Eluierung. Dies führte dazu, dass sowohl die Quantität als auch die Qualität zunahm. So war es zum Beispiel möglich, die Cofaktoren FAD (Abb. 38) und MTHF (Abb. 39 und Abb. 40) mittels

Fluoreszenzspektroskopie eindeutig zu identifizieren. Das um 10 nm blauverschobenen Emissionsspektrum und das um 15 nm rotverschobenen Anregungsspektrum lassen zudem auf eine weniger polare Umgebung des FAD in der Bindedomäne von Ver3Phr im Vergleich zu der Situation in EcPhr schließen. Darüber hinaus konnte FAD mittels HPLC eindeutig als Chromophor in Ver3Phr nachgewiesen werden. Eine eindeutige Zuordnung des MTHF Cofaktors mit dieser Methode war leider nicht möglich. Fragmente mit kürzerer Retentionszeiten und einem charakteristischen Absorptionsspektrum lassen hingegen darauf schließen, dass das MTHF möglicherweise bei der Denaturierung und der Freisetzung der Cofaktoren aus dem Protein zumindest teilweise zerstört bzw. abgebaut wurde. Dafür spricht ein Chromatographiepeak mit einer Retentionszeit von 2,95 min mit -für beide Photolyasen- einem Absorptionsmaximum unter 300 nm. Außerdem lässt der isosbestische Punkt bei 338 nm diesen Rückschluss zu, da in diesem Bereich sowohl FAD als auch MTHF absorbieren. Da jedoch MTHF in größerem Maße bei 330 nm absorbiert, könnte dieser Befund dafür sprechen, dass sich durch die Belichtung die Beschaffenheit des Antennen-Cofaktors verändert hat ¹⁶⁰. Die Präsenz dieser beiden Cofaktoren kann des Weiteren auch durch Absorptionsspektroskopie bestätigt werden. Basierend auf dem Absorptionsspektrums von Ver3Phr, wie in Abb. 35 dargestellt, kann im Gegensatz zur Photolyase aus *E. coli* auch nach längerer Dunkelinkubation an Luft von einem reduzierten Flavin ausgegangen werden. Ein solches absorbiert nur sehr geringfügig im sichtbaren Bereich, aber vornehmlich im ultravioletten Teil des Lichtspektrums ¹⁰⁰. Dieser Unterschied zu Photolyasen, die vornehmlich auf der Höhe des Meeresspiegels vorkommen (Vergleichsprotein EcPhr), lässt sich möglicherweise mit dem erhöhten UV Index des nativen Lebensraumes des *Acinetobacter* sp. Ver3 in Verbindung bringen. So zeigt EcPhr im Gegensatz zu Ver3Phr charakteristische Merkmale eines neutralen Flavins, wie auch in der Literatur beschrieben ^{112, 114}. Bei diversen Belichtungsexperimenten mit 365 nm und 470 nm, trat bei Ver3Phr lediglich eine marginale spektroskopische Veränderung ein. Dennoch waren bei beiden Belichtungskinetiken jeweils isosbestische Punkte bei 370 nm bzw. 338 nm festzustellen. Da FAD bei 370 nm eines seiner Absorptionsmaxima besitzt, könnte der isosbestische Punkt an dieser Stelle darauf hinweisen, dass das Flavin durch die Belichtung weiter reduziert wird und anschließend im Dunkeln anteilig wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Dass dieser isosbestische Punkt durch eine kürzerwellige Belichtung im ultravioletten

Bereich bei 338 nm erscheint, könnte auf eine effizientere Photoreduzierung durch ultraviolettes Licht zurückzuführen sein. Eine höhere Effizienz der Photoreparatur von Ver3Phr im Vergleich zu EcPhr lässt sich auch durch die durchgeführten in vivo Untersuchungen zur Schädigung bzw. Überlebensrate verifizieren. Hier zeigen insbesondere Abb. 46 und Abb. 47 im Vergleich, dass die Anzahl der überlebenden Zellen bei Expression von Ver3Phr deutlich höher ist als im Fall der heterologen Expression des *E. coli* Enzyms EcPhr. In diesem Zusammenhang ist vor allem zu beachten, dass Ver3Phr-transformierte *E. coli* Zellen kein bzw. nur ein sehr geringes Wachstum unter UV-Belichtung zeigen (Abb. 62), wohingegen der *Acinetobacter* sp. Ver3 Wildtyp fast keinerlei Beeinträchtigung durch eine äquivalente UVB Bestrahlung erleidet.

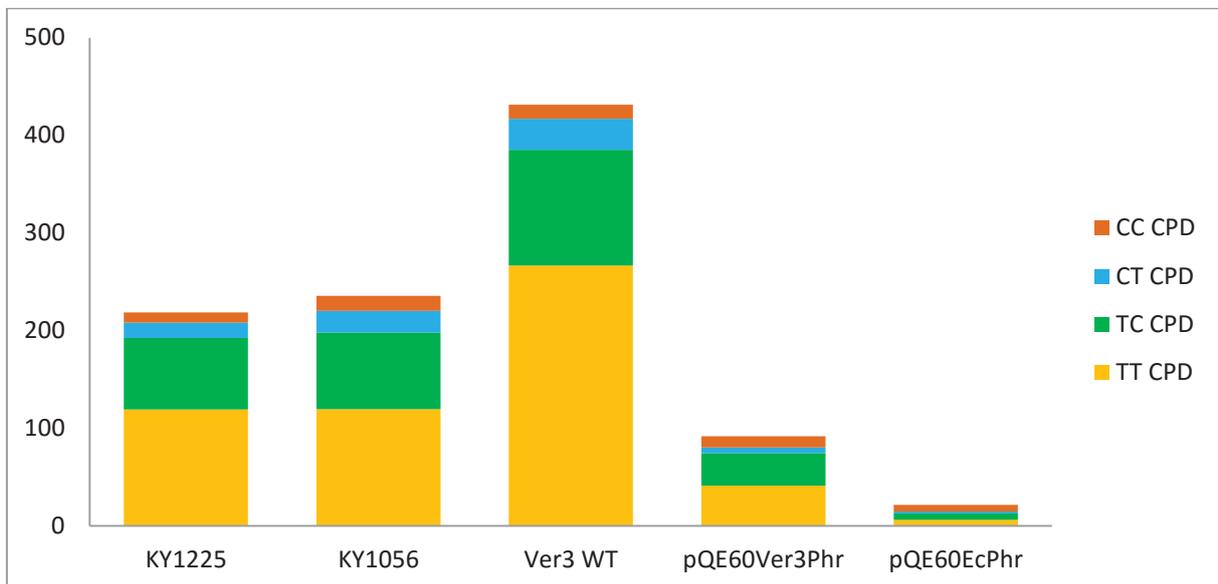


Abb. 60: Vergleich der Läsionen nach 5 Minuten UVB Bestrahlung der entsprechenden Stämme.

Gegenüber Abb. 49 wird hier (Abb. 60) auch der Wildtyp *Acinetobacter* sp. Ver3 gezeigt (Ver3 WT), der eine bemerkenswert hohe Menge an Läsionen erfährt, aber (s.o.) gleichfalls über eine extrem effiziente Reparatureffizienz verfügt.

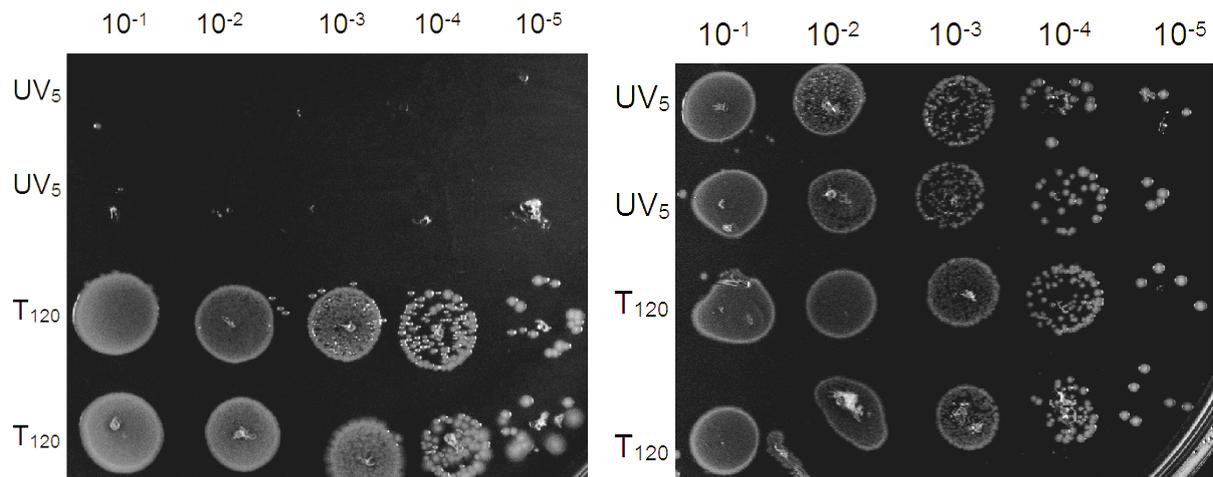


Abb. 61: Vergleich der überlebenden Zellen nach 5 Minuten UVB Behandlung (jeweils die oberen zwei Reihen) mit 120 Minuten im Dunkeln (jeweils die unteren beiden Reihen), von Ver3Phr-transferierten *E. coli* Zellen (links) und dem *Acinetobacter* sp- Ver3 Wildtyp (rechts).

So hat der Wildtyp mit ca. 470% Läsionen pro 10^6 Basen im Vergleich zu transformierten *E. coli* Zellen dennoch eine deutlich höhere Überlebensrate. Es muss also davon ausgegangen werden, dass neben Ver3Phr noch relevante andere Mechanismen und Enzyme für eine Resistenz gegen derartig hohe UV Belastungen, wie sie auf den Hochplateaus der Anden herrschen, nötig sind. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Anzahl der Läsionen nach fünf Minuten UVB Bestrahlung der einzelnen Stämme vergleicht. Auch hier zeigt Ver3Phr einen starken Unterschied mit einer deutlich effizienteren Photoreparatur und einer wesentlich ineffizienteren Dunkelreparatur. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf die hohe Lichtintensität, insbesondere angereichert mit kurzen Wellenlängen im natürlichen Habitat, zurückzuführen. Betrachtet man die Photoreparatur, aufgeschlüsselt nach der Art der verbleibenden Läsionen, so zeigt sich, dass nach Photoreparatur Ver3Phr TC- (ca. 10% verbleibend) und TT CPDs (ca. 16 % verbleibend) am effizientesten reparieren kann, die beiden übrigen Nukleotiddimere, CT mit ca. 32 % und CC mit ca. 47% verbleibend, werden deutlich weniger gut erkannt und repariert. EcPhr hingegen zeigt hier ein eher homogenes Reparaturbild mit ca. 70 -75 % verbleibenden Läsionen.

Eine vergleichbare Betrachtung bezüglich der Dunkelreparatur zeigt, dass zwar Ver3Phr hier im allgemeinen ineffizienter ist, dennoch aber in der Lage ist, TT und CT CPDs um mindestens 30 % auf 65 % und 68 % verbleibende Läsionen zu reduzieren (in gleicher Reihenfolge). EcPhr zeigt sich hier mit einer Reduzierung der Läsionen auf verbleibende 38 % und 35 % vornehmlich bei TC und CT CPDs am

effizientesten. CC CPDs hingegen werden durch das *E. coli* Enzym so gut wie gar nicht behoben. Bedenkt man nun, dass TT CPDs die häufigste Läsionsart bei Einstrahlung von ultraviolettem Licht ist ¹¹², so folgt daraus, dass der Wildtyp *Acinetobacter* sp. Ver3 sich aufgrund der enormen Anzahl an DNA Schäden durch UV Strahlung auf eine effizientere Reparatur bei Licht sowie auf die am häufigsten auftretenden Schäden optimiert hat, um sein Überleben zu sichern.

Zu dem komplexen Gefüge des UV Resistoms könnte unter anderem auch das Photolyase-ähnliche (*photolyase like*) Protein Ver3PL2 gehören. In silico Voruntersuchungen zeigten neben einer FAD Bindedomäne auch eine Desoxyribodipyrimidin Photolyase-ähnliche Domäne sowie eine C-terminale Extension. Diese Charakteristika lassen darauf schließen, dass es sich bei Ver3PL2 um ein Cryptochrom handelt ⁹¹. Dies wird darüber hinaus durch eine sequenzielle Ähnlichkeit mit dem Cryptochrom *RsCryB* aus *Rhodobacter sphaeroides* gestützt. Diese Ähnlichkeit beinhaltet zudem drei Cysteine (C438, C441 und C454), welche in *RsCryB* einen Eisenschwefelcluster ausbilden ⁹⁵. Der FAD Cofaktor konnte (Abb. 59) durch Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden. Durch eine Belichtung mit 470 nm (Anregung evtl. vorhandenen oxidierten Flavins) lässt sich jedoch kaum eine Absorptionsveränderung nachweisen. Die zwar schwache, breite Bleichung über einen Bereich von 375 – 750 nm könnte auf eine photoinduzierte Reduzierung des Flavins vom semireduzierten FAD im unbelichteten Zustand hin zu einem vollständig reduzierten Hydrochinon hindeuten. Durch die Zugabe von DTT in ansteigenden Konzentrationen zeigt sich eine ähnliche Reduzierung der Absorption in diesem Bereich und ein Anstieg bei 350 nm, was dem Absorptionsbereich eines vollständig reduzierten FAD entspricht. Diese Beobachtungen decken sich unter anderem mit denen eines Photolyase-ähnlichen Proteins aus *Agrobacterium tumefaciens*, welches neben einem Eisenschwefelcluster ebenfalls über einen FAD Cofaktor verfügt ¹⁶¹.

5.2. LOV-GAF-Fusionsprotein

Wie anfangs besprochen, wurde in Anlehnung an den in Photolyasen und Cryptochromen vorhandenen Energietransfer zwischen Antenne und Flavinchromophor ein künstliches Protein hergestellt, das aus der nativen LOV Domäne aus *BsYtvA* und der nativen GAF3 Domäne aus *Slr1393* zusammengesetzt ist (Abb. 62 und Abb. 63). Dieses Protein diente dem Versuch, mit definierten Chromophor-Domänen den Energietransfer zwischen einer LOV- und einer Bilin-bindenden GAF-Domäne quantitativ zu studieren. Die Sequenzen der Domänen blieben dabei unverändert. Neben der Wildtyp-LOV Domäne wurde allerdings bevorzugt mit der ebenfalls erzeugten Mutante C62S gearbeitet, da hierdurch der Photozyklus unterbrochen wird und diese Mutante im Gegensatz zum Wildtyp eine konstitutive Fluoreszenz aufweist. Verbunden wurden die beiden Domänen durch einen flexiblen Linker. Dieser Linker wurde bewusst mit hauptsächlich kleinen und polaren Aminosäuren gestaltet, um seine Flexibilität und Löslichkeit zu erhöhen und die Ausprägung einer starken Sekundärstruktur zu verhindern^{162, 163}. Die Gesamtsequenz des Fusionsproteins ist in Abb. 62 dargestellt.

5.2.1. *In silico* Arbeiten

MASFQSFQIP	GQLEVIKKAL	DHVRVGVVIT	DPALDNPIV	YVNQGFVQMT	50
GYETEEILGK	NS RFLQ GKHT	DPAEVDNIRT	ALQNKEPVTV	QIQNYKKDGT	100
MFWNELNIDP	MEIEDKTYFV	GIQNDITKQK	EYEKLLLEDSL	TEITALGGGS	150
TGSTTGSGEF	GGMLQNI FRA	TSDEVRHLLS	CDRVLVYRFN	PDWSGEFIHE	200
SVAQMWEPLK	DLQNNFPLWQ	DTYLQENEGG	RYRNHESLAV	GDVETAGFTD	250
CHLDNLRRFE	IRAFLTVPVF	VGEQLWGLLG	AYQNGAPRHW	QAREIHLLHQ	300
IANQLGVAVY	QAQLLARFQI				320

Abb. 62: Aminosäuresequenz des synthetisch hergestellten LOV-GAF_C62S Fusionsproteins. Die Mutation C62S ist durch Fettdruck hervorgehoben. Die LOV-Domäne (gelb) wird durch einen flexiblen Linker in random coil Struktur (grau) mit der GAF3 Domäne (türkis) verbunden.

Die native LOV Domäne des Blaulichtrezeptors *YtvA* aus *Bacillus subtilis* besitzt das für LOV Domänen charakteristische Cystein, welches durch Belichtung den Chromophor kovalent bindet. Die Mutation C62S in der LOV Domäne wurde wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben eingefügt, um den Photozyklus der LOV Domäne zu unterbinden, so dass die LOV Domäne dauerhaft im nicht belichteten und damit fluoreszierenden Zustand verbleibt. Entsprechend wurde im Weiteren auch

ausschließlich diese Mutante verwendet. Insgesamt hat das Fusionsprotein eine Größe von 38,5 kDa, einen theoretischen $pI = 5,4$ sowie einen Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{280} = 47962,5$.

Durch Größenausschlusschromatographie wurde nachgewiesen, dass das Fusionsprotein in Lösung als Dimer vorliegt (Abb. 64). Dies deckt sich auch mit Veröffentlichungen des Photorezeptors YtvA, dessen LOV Domäne für das Fusionsprotein als Basis diente ⁴⁶.

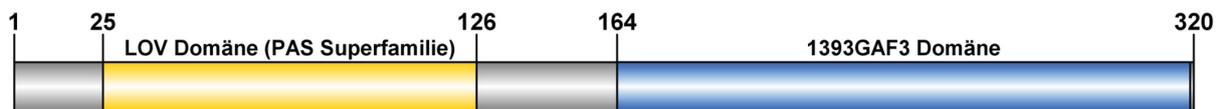


Abb. 63: Graphische Darstellung der Domänenstruktur des LOV-GAF Fusionsprotein durch Auswertung einer BLAST Analyse ¹⁵⁸.

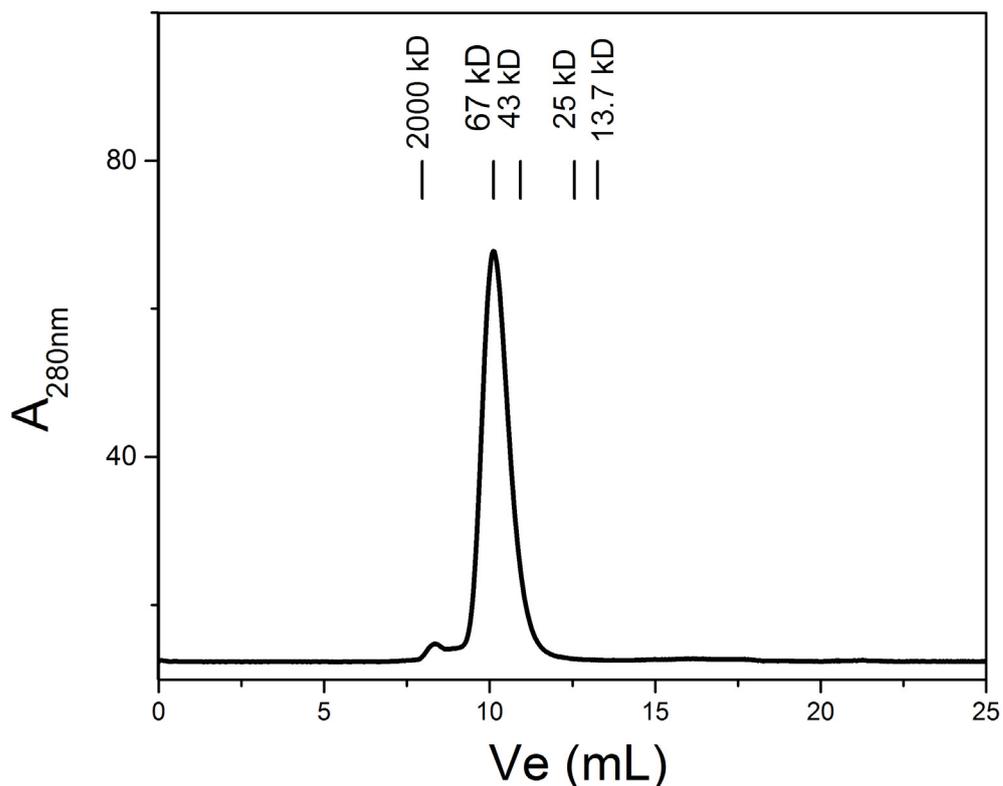


Abb. 64: Größenausschlussdiagramm des Fusionsproteins.

5.2.2. Spektroskopie

Die spektroskopischen Eigenschaften der einzelnen Domänen blieben durch die Fusion weitestgehend erhalten. So zeigten sowohl die LOV Domäne im Wildtypzustand (ohne C62S Mutation) als auch die GAF3 Domäne eine reguläre Photochemie und die bekannten Fluoreszenzeigenschaften.

5.2.2.1. UV/Vis Spektroskopie

Durch Berechnungen nach dem Lambert-Beerschen Gesetz konnte anhand der gemessenen Absorption (Abb. 65) und der Extinktionskoeffizienten der einzelnen nativen Domänen ($\epsilon_{\text{LOV},450} = 12500$ ¹⁶⁴, $\epsilon_{\text{GAF3},650} = 93000$ ¹⁶⁵) eine Beladung der jeweiligen Domänen mit Chromophor ermittelt werden. Demnach wurde durch in vivo Assemblierung die LOV Domäne zu 66 % mit FMN beladen und die GAF3 Domäne zu 33 % mit Phycocyanobilin.

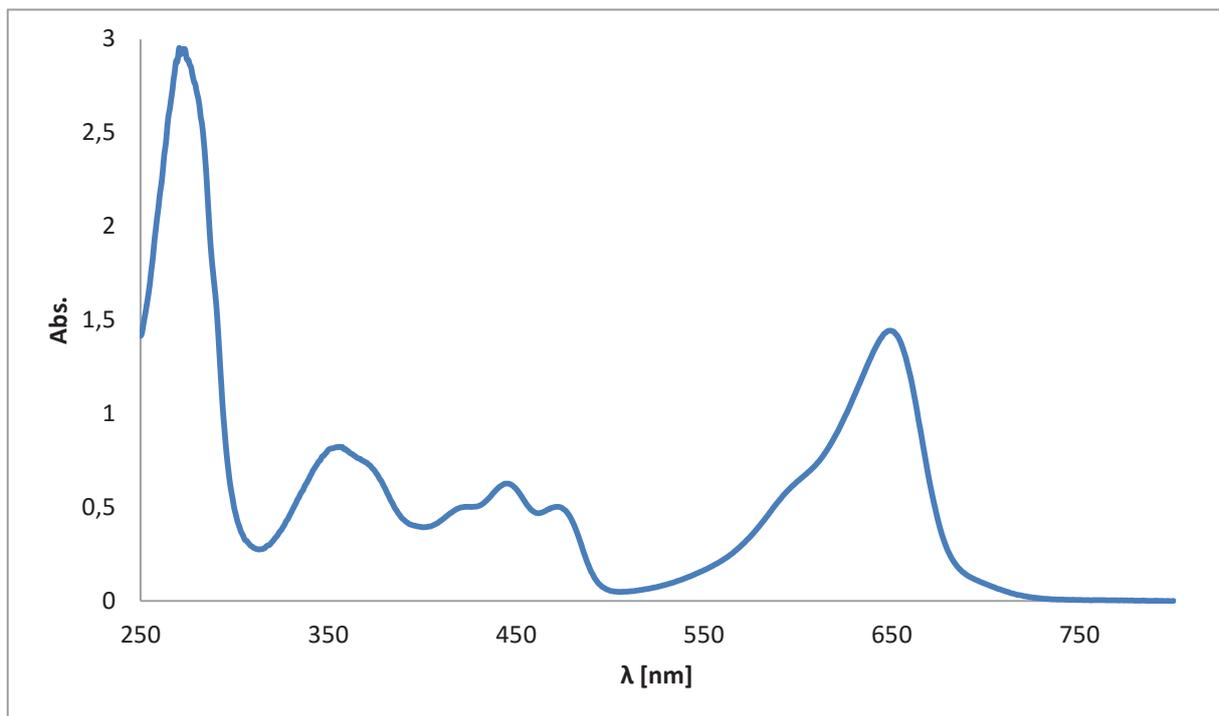


Abb. 65: Absorptionsspektrum des LOV-GAF Fusionsproteins; gezeigt ist für die LOV Domäne der Dunkelzustand und für die GAF3 Domäne die Pr Form.

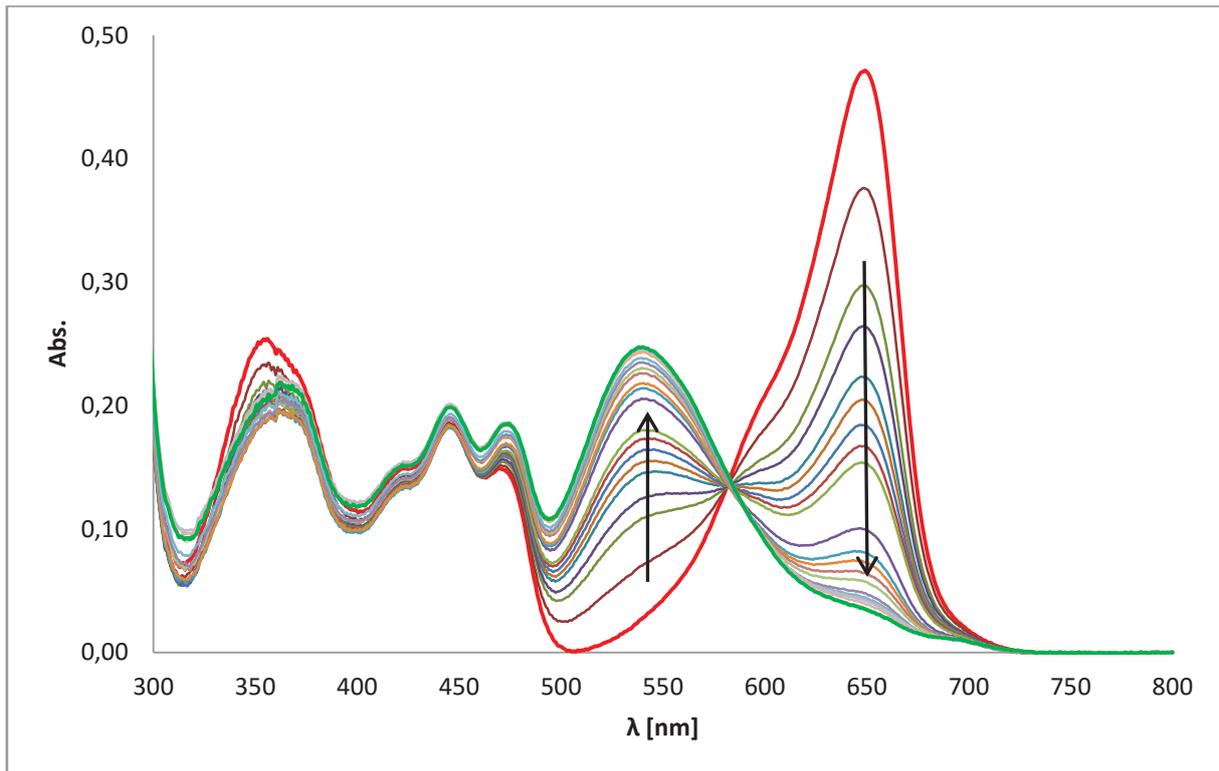


Abb. 66: Belichtungskinetik des Fusionsproteins ($\lambda = 670 \text{ nm}$) für die Umwandlung der rot- in die grün-absorbierende Form. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Messungen beträgt jeweils 1 Sekunde.

Für beide Domänen des Fusionsproteins wurde zunächst sichergestellt, dass durch die Domänenkombination die Photochemie nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 66, Abb. 67 und Abb. 68). Die Umwandlung aus dem Pr Zustand der GAF3 Domäne in ihren Pg Zustand mit Hilfe einer 670 nm LED benötigt ca. 20 Sekunden zur vollständigen Konversion und entsprach vollständig dem Verhalten der isoliert exprimierten GAF Domäne ¹².

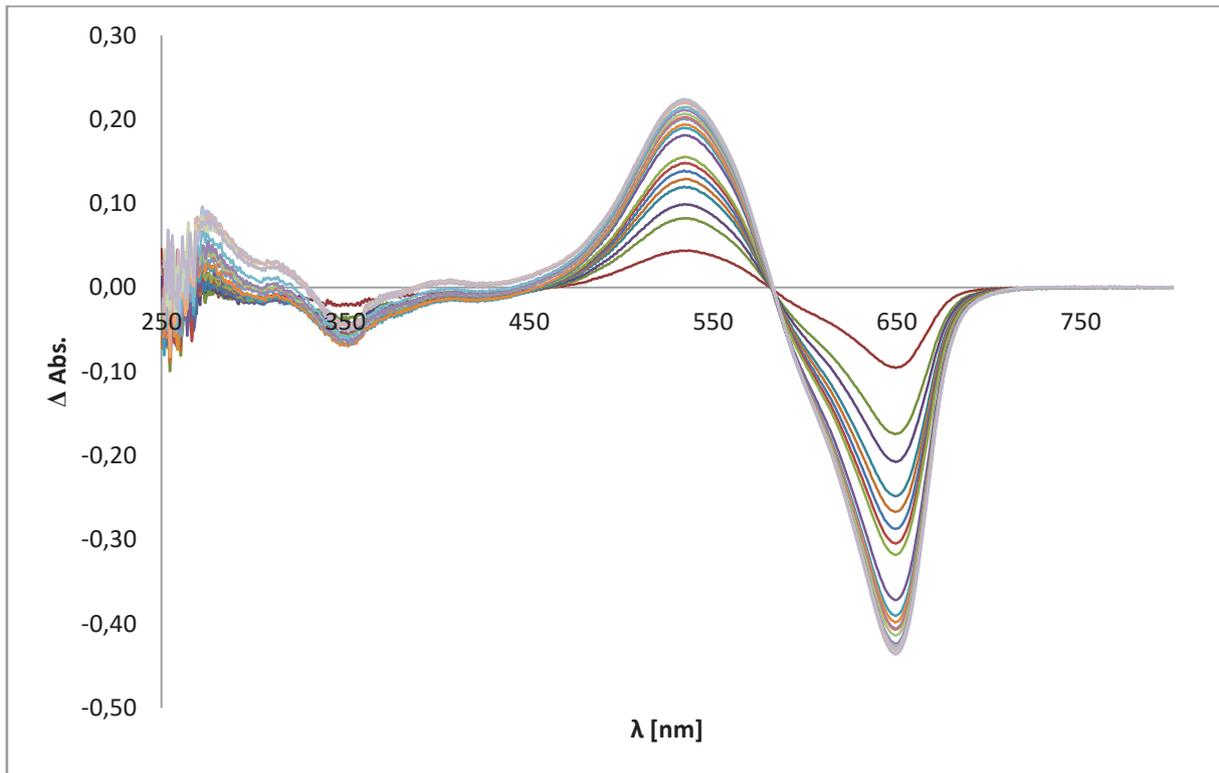


Abb. 67: Differenzspektren zu der in Abb. 66 dargestellten Belichtungs kinetik.

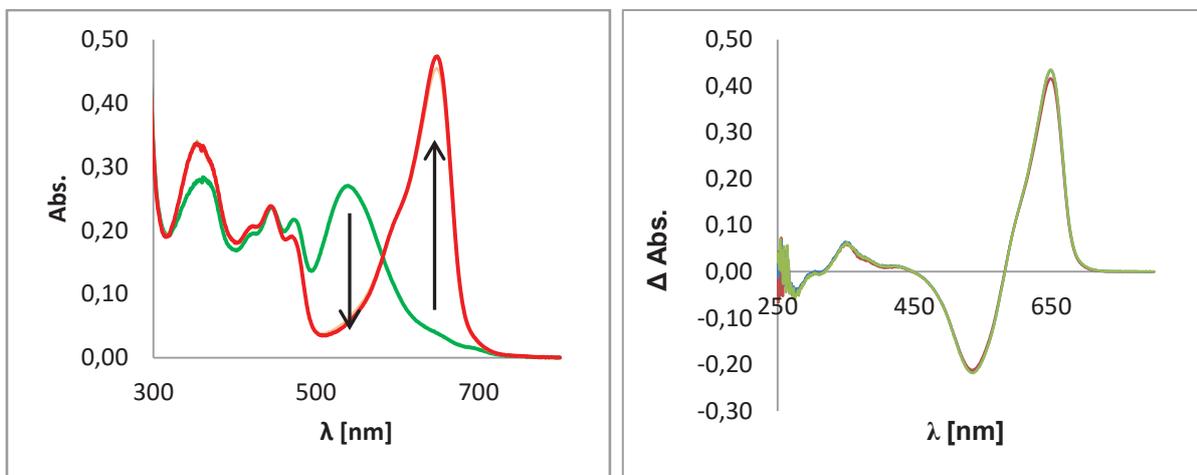


Abb. 68: Belichtungs kinetik des Fusionsproteins durch Bestrahlung mit ($\lambda = 530 \text{ nm}$) für die Umwandlung des Pg- in den Pr Zustand. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Messungen beträgt 1 Sekunde. Die absoluten Spektren werden links dargestellt, die Differenzspektren rechts.

Der Vergleich der Vorwärts- und Rückwärts-Belichtungen (Abb. 66 im Vergleich mit Abb. 68) zeigt, dass die Konversion des Pg in den Pr Zustand deutlich schneller von Statten geht als umgekehrt, nämlich nur ein bis zwei Sekunden benötigt. Nach einer Sekunde Bestrahlung mit einer 530 nm LED war bei weiterer Belichtung im Absorptionsspektrum kaum noch ein Unterschied zu erkennen.

5.2.2.2. Steady state Fluoreszenzspektroskopie

Ziel dieses Teilprojekts ist die Überprüfung eines FRET Effekts in einem artifiziell hergestellten Protein, das zwei Chromophordomänen trägt, eine LOV- und eine GAF-Domäne. Zur Verdeutlichung werden zunächst die Emissionsspektren beider separat vermessener Domänen dargestellt (Abb. 68). Diese zeigen zum einen durch die Gegenüberstellung der beiden nativen Emissionsspektren der LOV und GAF3 Domäne das zu erwartende Emissionsspektrum des Fusionsproteins mit in vivo assembliertem PCB, zum anderen auch die Verschiebung des Emissionsmaximums von 500 nm (für die LOV Domäne) auf 670 nm, welches mit dem LOV-GAF3 Fusionsprotein in der Anwendung erreicht werden kann.

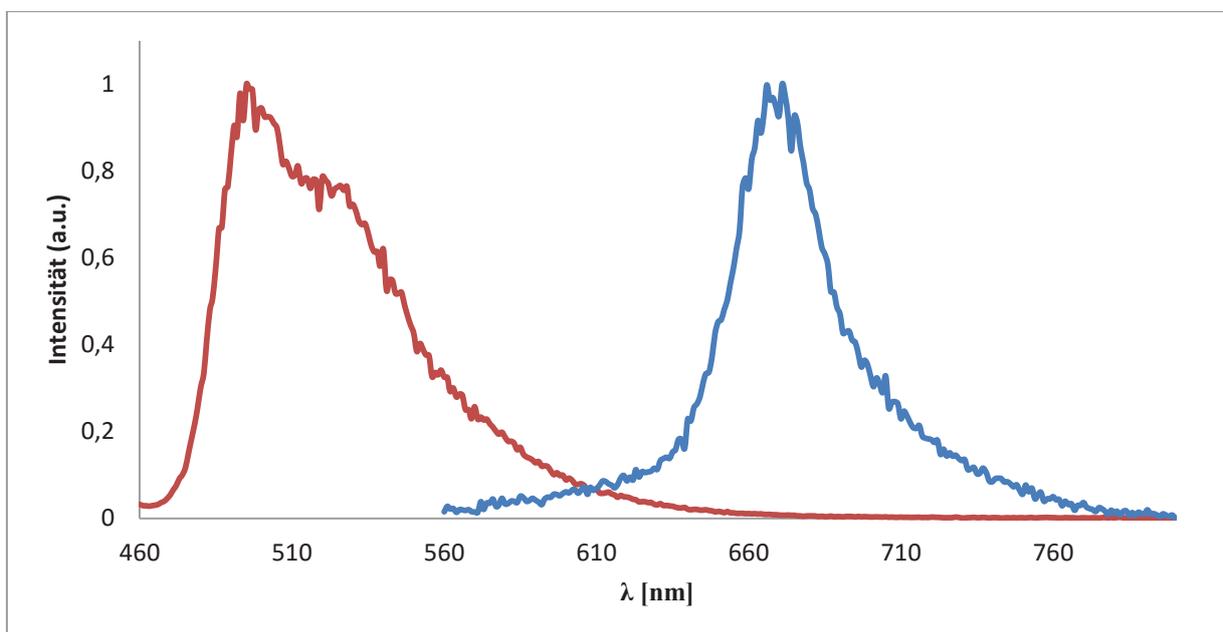


Abb. 69: Emissionsspektren der einzelnen nativen Domänen. Links die LOV Domäne (rot) mit $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm und rechts die GAF3 Domäne in der rot-absorbierenden Form (blau) mit $\lambda_{\text{ex}} = 550$ nm.

Zusätzlich wird eine Reihe von Fluoreszenz-Kontrollexperimenten durchgeführt. Alle im Folgenden dargestellten Fluoreszenzspektren wurden, sofern nicht anders angegeben, auf die jeweiligen Maxima normiert. Zunächst wird die GAF Domäne separat vermessen, also ohne den zusätzlichen Einfluss der LOV Domäne (Abb. 70 und Abb. 71). Die Messungen werden dann zum Vergleich für beide Absorptionsformen der GAF Domäne durchgeführt. Ausgehend von einer Anregungswellenlänge von 375 nm wird für den Pr Zustand die Emission bei 670 nm durchgehend kleiner, bis beim Übergang zu 500 nm die Emission wieder zunimmt. Die relativ hohe Emission für Anregung bei 375 nm ist darauf zurückzuführen, dass hier in die ‚Soret‘-Bande des Bilins eingestrahlt wurde. Die relativ scharfen Emissionssignale bei 700, 750 und etwa 800 nm sind Artefakte, die der jeweils

doppelten Anregungswellenlänge für diese Messungen entsprechen. Ein gleiches Verhalten wird für die Pg Form gefunden. Im Anregungswellenlängenbereich von 515 – 560 nm (Abb. 73) ist nach einem anfänglichen Rückgang eines lokalen Emissionsmaximums bei 610 nm ein kontinuierlicher Anstieg der Emission bei 670 nm festzustellen. Es konnte des Weiteren durch Wiederholung der Fluoreszenzmessungen festgestellt werden, dass die Lichtquelle des Fluoreszenzspektrometers ausreichend war, um die Pg Form der GAF3 Domäne teilweise in ihre Pr Form zu überführen, wie aus Abb. 71 eindeutig hervorgeht.

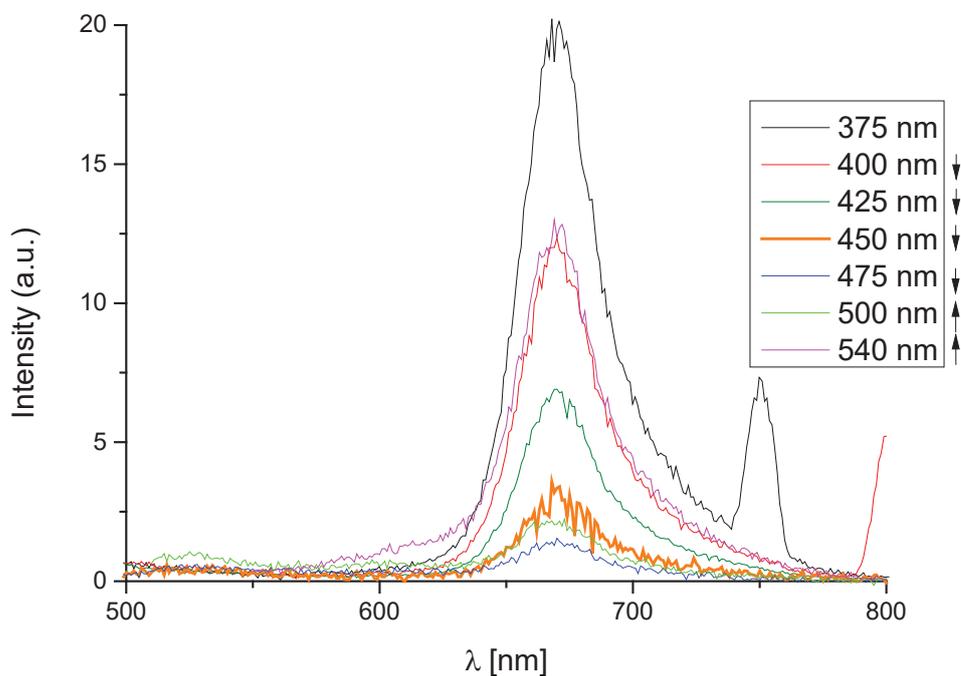


Abb. 70: Emissionsspektren der isolierten GAF3 Domäne im Pr Zustand bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 375 nm bis 540 nm. Die schwarzen Pfeile geben die Richtung der Veränderung der Emission zur jeweils vorhergehenden Messung an.

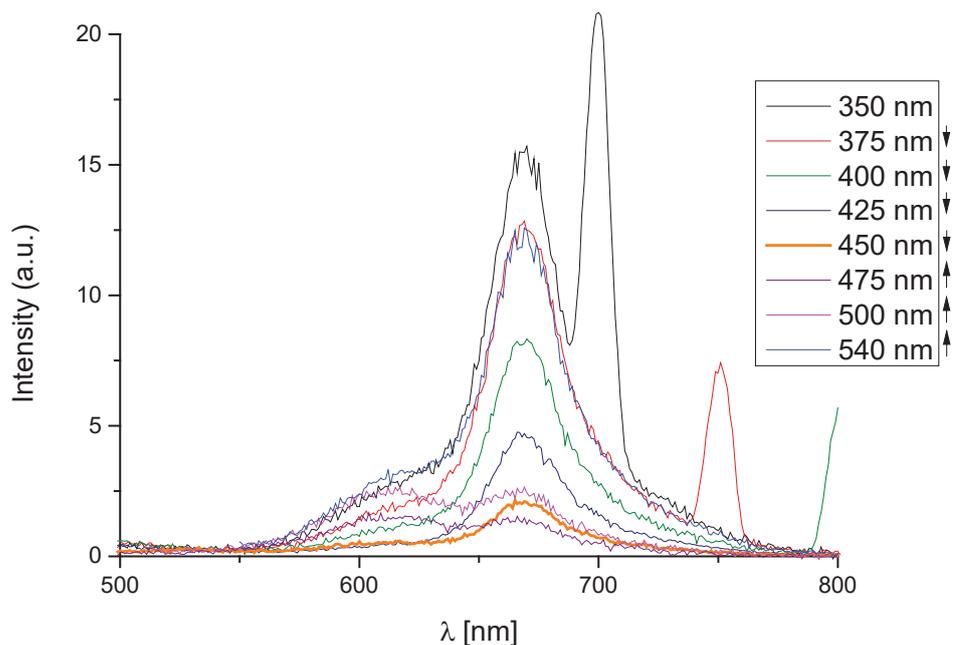


Abb. 71: Emissionsspektren der isolierten GAF3 Domäne im Pg Zustand bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 375 nm bis 540 nm. Die schwarzen Pfeile geben die Richtung der Veränderung der Emission zur jeweils vorhergehenden Messung an.

Wie aus den Absorptionsspektren hervorgeht (z.B. Abb. 66), weist die Pr Form der nativen GAF3 Domäne im Bereich der LOV Absorption von 420 – 470 nm nur eine geringe, aber messbare Absorption auf, durch die eine Fluoreszenz direkt induziert wird. Entsprechend ist zu klären, welchen Beitrag bei Anregung der LOV Domäne dieser Wellenlängenbereich im Fusionsprotein zu der direkten Emission der GAF3 Domäne liefert, die ihr Anregungsmaximum bei 650 nm hat. Hierzu wurde die Emission des Fusionsproteins bei verschiedenen Wellenlängen gemessen (Abb. 72, Abb. 73). Deutlich sichtbar wird hier, dass bei Anregung in diesem Wellenlängenbereich die Intensität sowohl in Pr als auch in Pg sehr gering ist und in beiden Zuständen etwa das Minimum der Fluoreszenz darstellt. Des Weiteren findet man auch hier bei Einsatz der grün-absorbierenden Form der GAF Domäne, dass sich diese durch das Fluoreszenzlicht in die rot-absorbierende umwandelt (auch hier sei auf die Artefakte in den Fluoreszenzspektren hingewiesen, die von der Detektion der zweiten Ordnung der Beugung der Anregungswellenlänge herrühren), da diese bei Gitterfluoreszenzspektrometern stets bei $2 \cdot \lambda$ abgebildet wird. Ebenfalls ist zu bemerken, dass die Fluoreszenzintensität allgemein im Pr Zustand deutlich höher ist als im Pg Zustand. Je höher man dann die Anregungswellenlänge jenseits von 450 nm in den längerwelligen Bereich verschiebt, umso höher ist die Intensität der Fluoreszenz der GAF3 Domäne, da sie nun immer direkter angeregt wird.

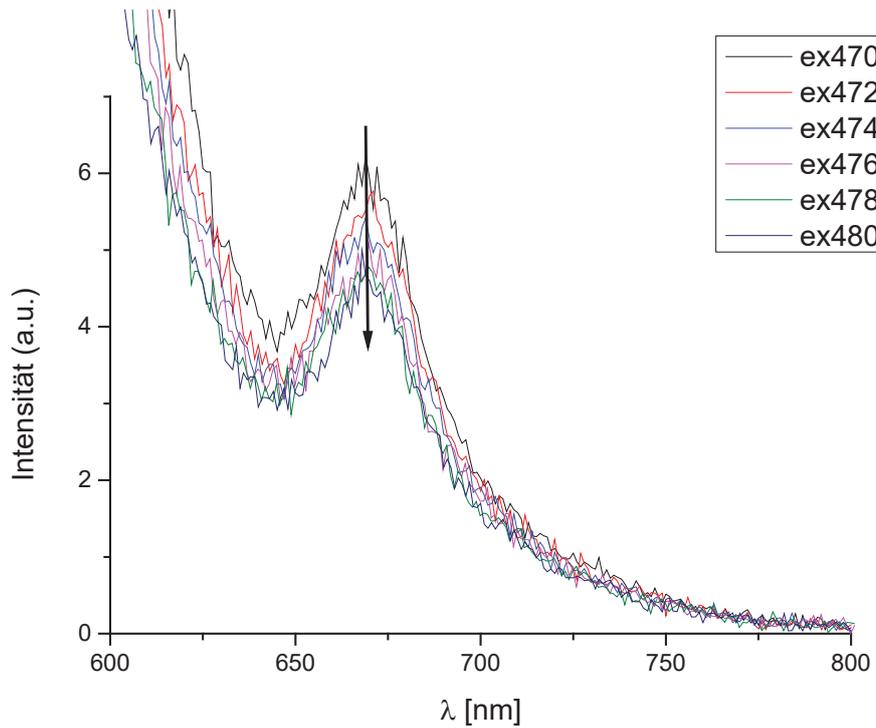


Abb. 72: Emissionsspektren des Fusionsproteins bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 470 nm bis 480 nm. Der schwarze Pfeil gibt die Richtung der Veränderung der Emission zur jeweils vorhergehenden Messung an.

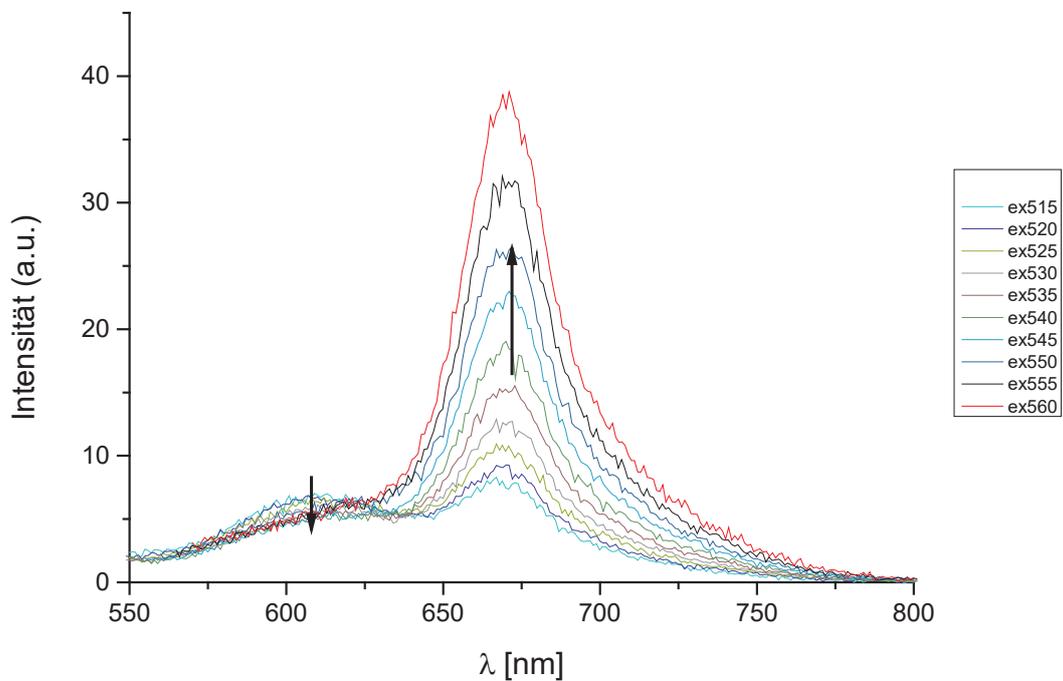


Abb. 73: Emissionsspektren des Fusionsproteins bei verschiedenen Anregungswellenlängen von 515 nm bis 560 nm. Die schwarzen Pfeile geben die Richtung der Veränderung der Emission zur jeweils vorhergehenden Messung an.

Die Fluoreszenz-Emission des Fusionsproteins bei Anregung im Absorptionsbereich der LOV Domäne ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) wird auch bestimmt durch die Fluoreszenz der LOV Domäne, in deren langwelliger Flanke man allerdings eine zusätzliche Emission der GAF Domäne findet (Abb. 74, s. auch Ausschnittvergrößerung). Da, wie oben festgestellt, die GAF Domäne prinzipiell eine geringe Absorption bei der Anregungswellenlänge für die LOV Domäne zeigt, ist zu vergleichen, zu welchen Anteilen die beobachtete Fluoreszenz um 680 nm direkt aus der GAF Domäne entsteht und zu welchem Anteil sie als FRET Effekt definiert werden kann. Das Kontrollexperiment zeigt Abb. 75, in der die direkte Fluoreszenz der GAF Domäne derjenigen aus dem Fusionsprotein gegenüber gestellt wird. Für beide Experimente wurden die Absorptionen der GAF Domänen gleich groß eingestellt.

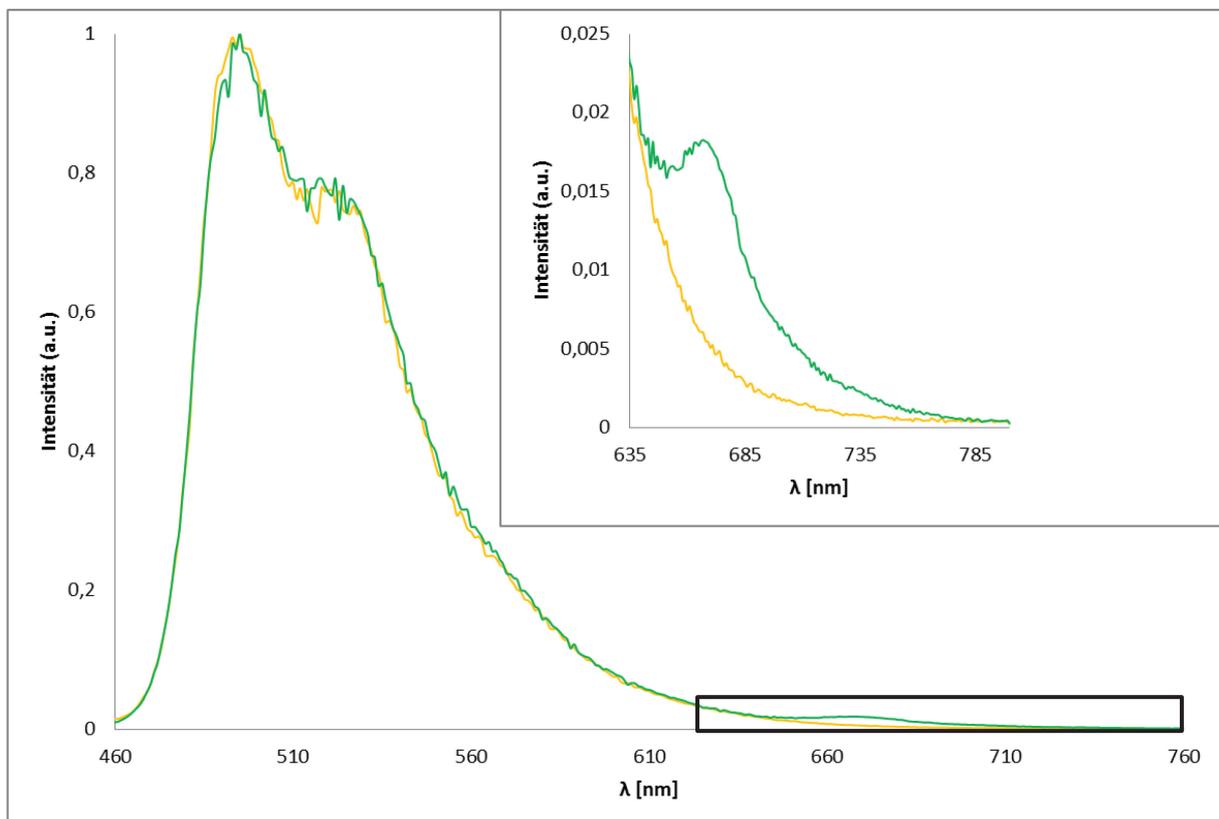


Abb. 74: Emissionsspektren des Fusionsproteins ohne PCB (gelb) und mit in vivo assembliertem PCB (grün) inklusive Ausschnittsvergrößerung oben rechts. Beide wurden mit $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ angeregt.

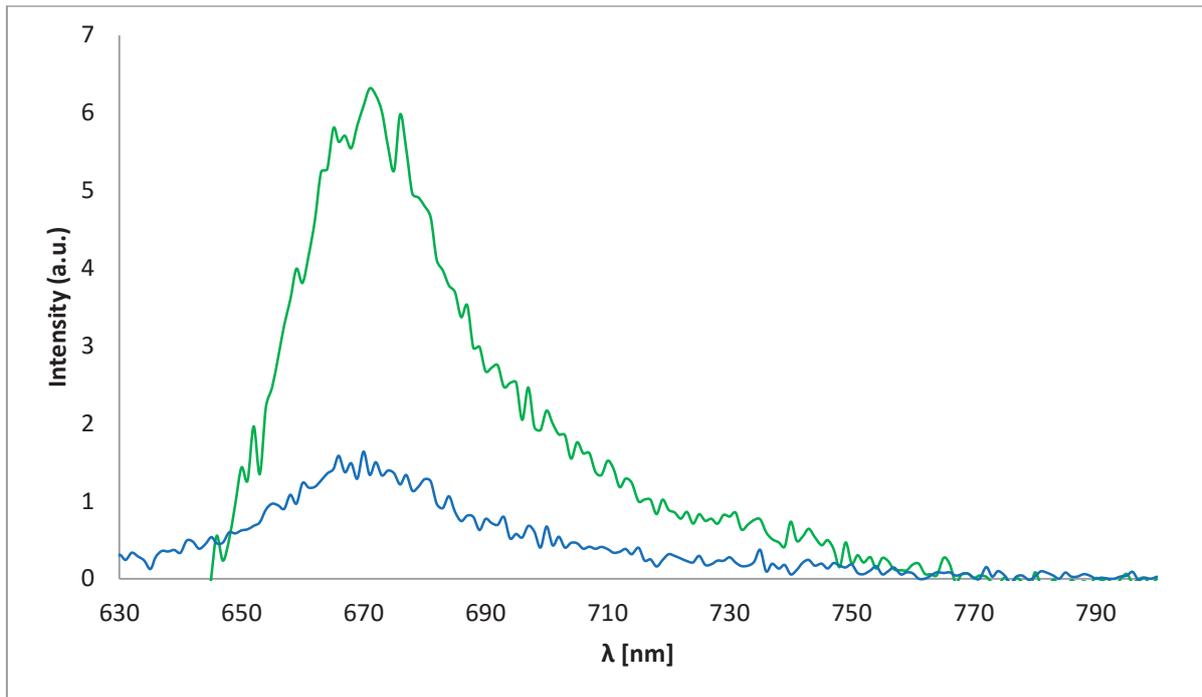


Abb. 75: Vergleich der Fluoreszenz Emissionsspektren des Fusionsproteins von in vivo assembliertem PCB (grün) und der nativen GAF3 Domäne (blau), jeweils bei 450 nm angeregt. Vorausgehend wurde die Absorption bei 650 nm angeglichen, um eine identische Konzentration zu erhalten.

Man erkennt eindeutig, dass die Intensität der Emission bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm im Fusionsprotein deutlich höher ist als in der separat gemessenen GAF3 Domäne. Das Flächenintegral der Emission des Fusionsproteins ist im Vergleich zu der separat gemessenen nativen GAF3 Domäne um ca. 237 % größer. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Emission des Fusionsproteins bei 670 nm bei der gewählten Anregungswellenlänge nicht um eine direkte Anregung der GAF3 Domäne handelt, sondern vielmehr um einen Energietransfer von der LOV Domäne zur GAF Domäne.

5.2.3. Charakterisierung des Energietransfers zwischen beiden Domänen

Für die Berechnung eines Energietransfers zwischen den beiden Domänen gibt es zwei Möglichkeiten. Zum Einen kann die Berechnung des spektroskopischen Überlappungsintegrals $J(\lambda)$ (nach Gl. 2) und zum Anderen die Fluoreszenz Lebenszeiten (nach Gl. 4) verwendet werden. Beide Methoden werden im Folgenden durchgeführt und verglichen.

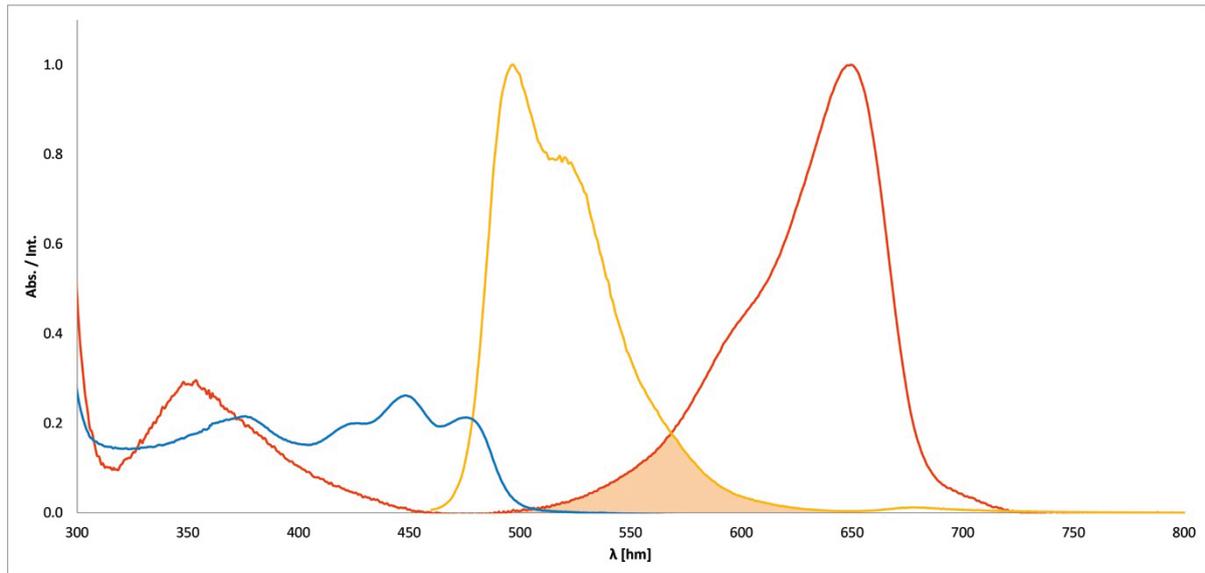


Abb. 76: Absorption der nativen LOV Domäne (blau) sowie der nativen GAF3 Domäne (rot). Die Emission des Fusionsprotein ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$, gelb), normiert auf die Absorption der GAF Domäne, weist mit der Absorption eine Schnittfläche auf (orange), welche für den Resonanz Energietransfer essentiell ist.

Das Absorptionsspektrum des Fusionsproteins setzt sich aus den charakteristischen Absorptionsspektren seiner beiden Domänen zusammen. Diese werden jeweils in Abb. 76 gezeigt und durch Emission des Fusionsproteins (gelb) ergänzt, um die Überlappungs-Integralfläche darzustellen, welche für den FRET essentiell ist. Der Fluoreszenz Resonanzenergietransfer wird im Folgenden für die Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$ und für die GAF3 Domäne im Pr Zustand beschrieben. Das Überlappungsintegral wurde mit Hilfe der Software a|e – UV-Vis-IR Software von FluorTools berechnet (<http://www.fluortools.com/software/ae>) und betrug nach Gl. 2

$$J(\lambda) = 1,094 \cdot 10^{15} \frac{\text{nm}^4}{\text{M} \cdot \text{cm}}$$

Daraus folgt nach Gl. 1 für den Förster-Radius R_0 ,

$$R_0 = 40,03 \text{ \AA}$$

und für die Effizienz des Energietransfers η nach Gl. 3,

$$\eta = 28,4 \%$$

Daher ergibt sich aus Gl. 5 eine Entfernung der beiden Chromophore von

$$r = 46,7 \text{ \AA}$$

Wird nun die GAF Domäne des Fusionsproteins in die Pg Form überführt (Abb. 77), ändern sich die Eigenschaften des Energietransfers für dieses FRET Paar. Anhand des spektralen Integrals ergibt sich dann in der Pg Form $R_0 = 49 \text{ \AA}$ sowie $r = 52 \text{ \AA}$ sowie eine Effizienz von $\eta = 40 \%$.

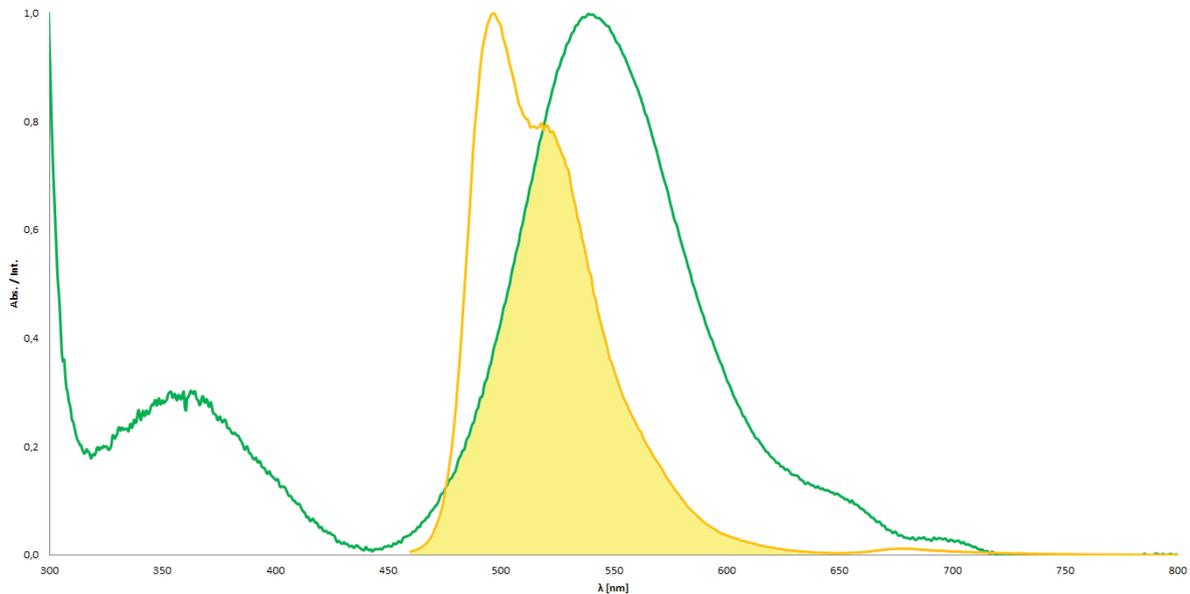


Abb. 77: Fluoreszenzemissionsspektrum der LOV Domäne (gelb) sowie das Absorptionsspektrum der GAF Domäne in der Pg Form. Hellgelb hinterlegt ist die kongruente Fläche der beiden Spektren, welche für den Resonanz-Energietransfer essentiell ist.

Da zu diesem Fusionsprotein bisher nur Kristalle der einzelnen nativen Domänen zur Verfügung stehen, lässt sich die exakte Entfernung der Chromophore zu einander nicht in der Kristallstruktur messen. Zieht man allerdings die Kristallstruktur von Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 (PDB ID: 2vea¹⁶⁶) heran, welche unter anderem aus einer PAS und einer GAF Domäne besteht, so kann man durch Überlagerung der Einzelstrukturen mit dem Vergleichsprotein die Entfernung der beiden Chromophore FMN und PCB abschätzen (Abb. 78). Auf diese Weise ergibt sich eine ungefähre Entfernung von 31 – 32 \AA . Dies deckt sich in der Größenordnung gut mit den berechneten Entfernungen.

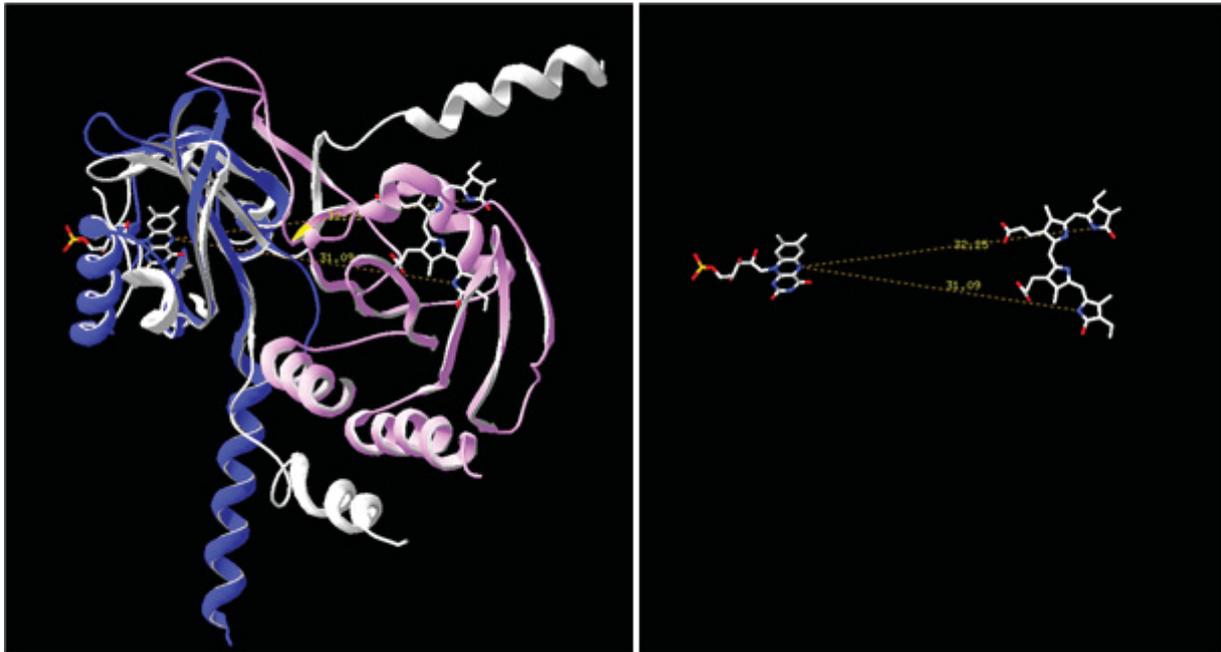


Abb. 78: Überlagerung der nativen LOV Domäne (blau, 2pr5) mit der PAS Domäne aus Cph1 (weiß, 2vea). Die GAF Domäne aus Cph1 wird in violett dargestellt. Im rechten Bildteil sind die Chromophore FMN (links) und PCB (rechts) mit den jeweiligen Entfernungen in Ångström angegeben.

5.2.4. Fluoreszenz Lebenszeiten

Wie erwähnt, lässt sich die Effizienz des Energietransfers auch mit Hilfe der Fluoreszenz-Lebenszeiten bestimmen, die für den Donor umso kürzer werden, je stärker der Energie-Übertrag ist. Hierzu wurde das Fusionsprotein sowohl ohne PCB-Chromophor (ausschließlich FMN als Chromophor der LOV-Domäne) als auch mit in vivo assembliertem coexprimiertem PCB (Sowohl FMN als Chromophor der LOV-Domäne als auch PCB als Chromophor der GAF-Domäne) exprimiert. Die Proben wurden vor der Messung spektroskopisch bei 450 nm der Flavinabsorption angeglichen. Für die Proben PCB in vivo mit der GAF Domäne in der Pr- und in der Pg-Form wurde jeweils die gleiche Probe verwendet, die dann entsprechend mit Hilfe von Bestrahlung vollständig in den jeweiligen Zustand überführt wurde. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz-Lebenszeit des Flavinchromophors bei Anwesenheit des PCB-Chromophors in der GAF Domäne. Diese ist stärker, wenn die GAF Domäne in der grün-absorbierenden Form vorliegt (Abb. 79). Die Messung wurde dreimal durchgeführt (Abb. 80) und mit Hilfe eines internen „Reconvolution Fit“ des Messprogramms ausgewertet. Daraus ergaben sich Fluoreszenzlebenszeiten wie in Tab. 5 beschrieben.

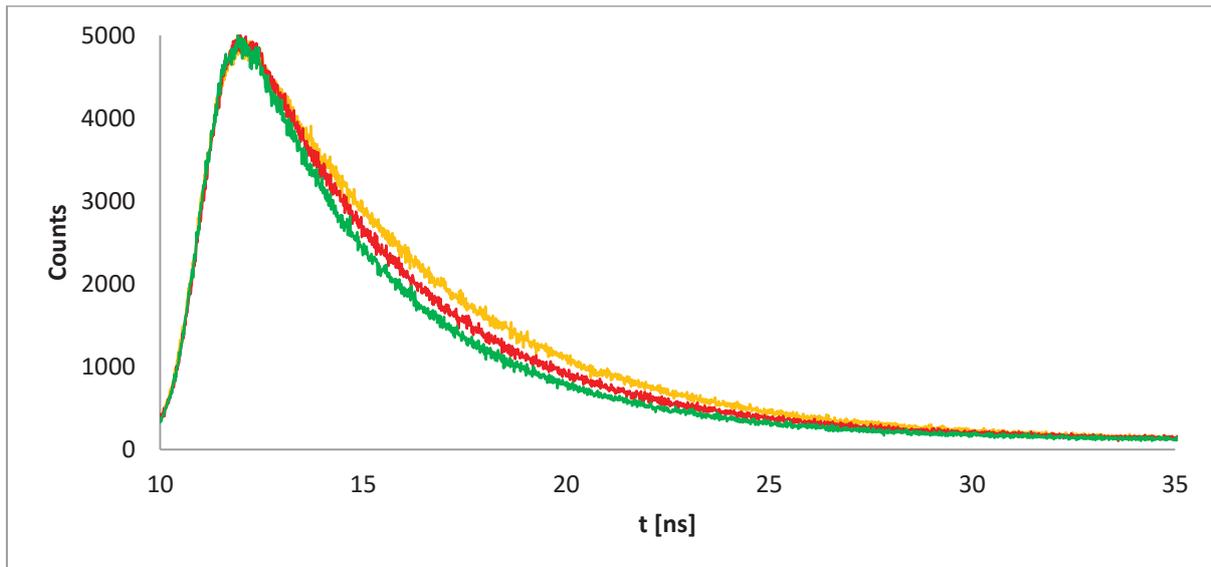


Abb. 79: Fluoreszenz Lebenszeitspektren von PCB-beladenem in vivo im Pr Zustand (rot), im Pg Zustand (grün) sowie des Fusionsproteins ohne Bilin (gelb).

Tab. 5: Berechnete Fluoreszenz Lebenszeiten in Nanosekunden des Fusionsproteins ohne PCB, sowie beladen mit PCB in vivo im Pr und Pg Zustand. Alle Messungen wurden dreimal durchgeführt und anschließend wurde der Mittelwert gebildet.

				Mittelwert	Standardabweichung
ohne PCB	5,1	5,2	5,01	5,1	0,08
PCB in vivo (Pr)	3,97	4,1	3,9	3,99	0,08
PCB in vivo (Pg)	3,3	3,29	3,4	3,33	0,05

Tab. 6: Vergleich der aus den Fluoreszenz Lebenszeiten berechneten Energietransfer Effizienzen.

	Fluoreszenz Lebenszeit τ [ns]	Effizienz η [%]
ohne PCB	5,1	-
PCB in vivo Pr	3,99	21,82
PCB in vivo Pg	3,33	34,75

Für den Pr Zustand ergibt sich so durch Verwendung des spektralen Überlappungsintegrals eine Effizienz von $\eta_{rF} = 28,4\%$ und bei Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit ein Wert von $\eta_{rL} = 21,82\%$. Diese Differenz geht wahrscheinlich auf die Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Integralfläche zurück.

Bei der Bestimmung der Lebenszeit ist allerdings zu beachten, dass die Beladung der beiden Domänen nicht bei 100 % liegt. So ist die LOV Domäne nur zu ca. 60 % und die GAF Domäne nur zu ca. 30 % beladen. Das bedeutet, dass ein Teil der

Flavine keinen FRET Partner haben, welcher die Fluoreszenz-Lebenszeit verkürzen würde. Dies führt dazu, dass zwei Lebenszeiten auftreten sollten, von denen die in Tab. 6 gezeigten den Mittelwert darstellen. Legt man nun bei der Berechnung der Lebenszeit des biexponentiellen Zerfalls eine der Zeiten auf 5,1 ns (entspricht der ungequenchten Fluoreszenz-Lebenszeit des Flavins) fest, so ergeben sich folgende gequenchte Lebenszeiten wie Tab. 7 und Abb. 82 dargestellt.

Tab. 7: Vergleich der aus den biexponentiell gefitteten Fluoreszenz Lebenszeiten berechneten Energietransfer Effizienzen unter Berücksichtigung der Beladung der Domänen.

	Fluoreszenz Lebenszeit τ [ns]	Effizienz η [%]
ohne PCB	5,1	-
PCB in vivo Pr	2,99	41,44
PCB in vivo Pg	2,7	47,12

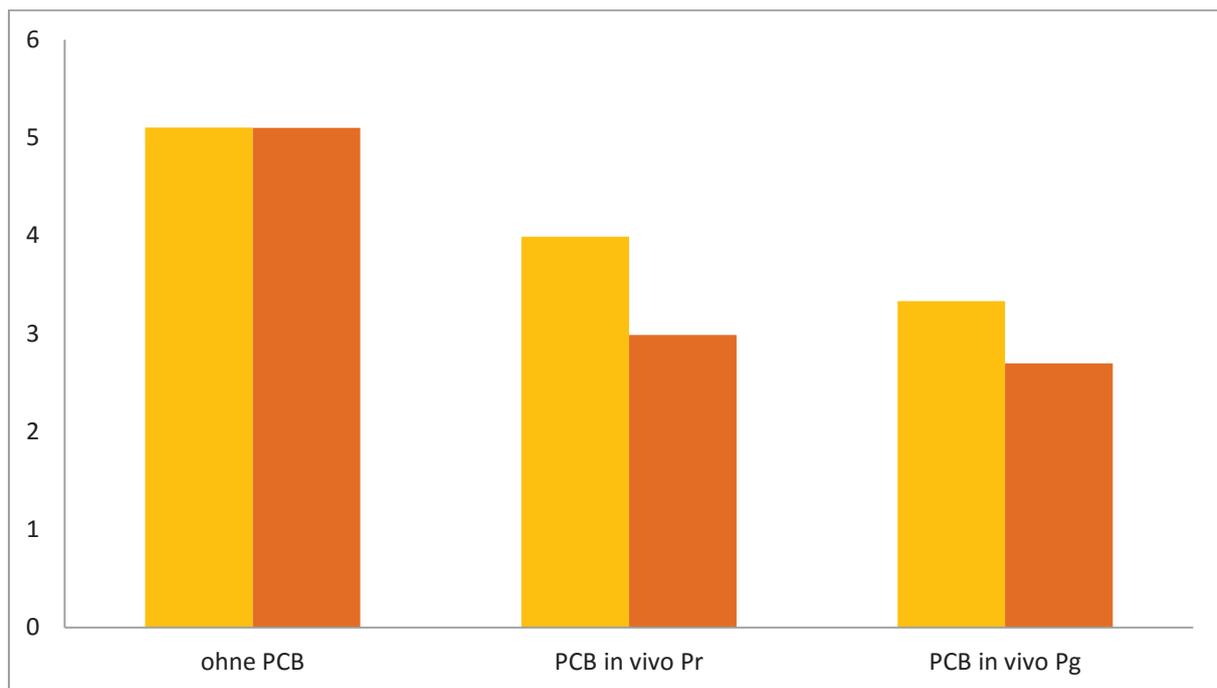


Abb. 80: Vergleichende graphische Darstellung der in Tab. 6 und Tab. 7 aufgeführten Mittelwerte der Fluoreszenzlebenszeiten des Fusionsproteins. Automatische Bestimmung der Lebenszeiten (gelb), Berücksichtigung des biexponentiellen Zerfalls aufgrund einer höheren Beladung der Donordomänen im Vergleich zu den Akzeptordomänen (orange). Y-Achse: Lebenszeit [ns].

5.2.5. Spektroskopische Charakterisierung von LOV-GAF PEB in vivo

CBCR GAF-Domänen können auch das Chromophorderivat Phycoerythrobilin (PEB) binden. Es zeichnet sich auf Grund der fehlenden Doppelbindung zwischen den Ringen C und D dadurch aus, dass es nicht photoisomerisiert, sondern eine deutlich größere Fluoreszenz-Ausbeute als PCB besitzt ¹⁶⁷. Da die PEB-Absorption ausserdem kürzerwellig sein sollte ($\lambda_{\text{Abs,max}} = 575 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{F,max}} = 586 \text{ nm}$ ¹⁶⁸) und es somit zu einem größeren spektralen Überlapp mit der Flavin-Fluoreszenz kommen sollte, wurde versucht, auch PEB als Chromophor in der GAF-Domäne des Fusionsproteins zu verwenden. Die Experimente zeigen aber (Abb. 83), dass die Beladung mit PEB als Chromophor der GAF Domäne deutlich geringer war als bei Versuchen mit PCB Assemblierung. Entsprechend ergaben die Versuche, eine Flavin-vermittelte Fluoreszenz des PEB zu messen, keine auswertbaren Ergebnisse (Abb. 83).

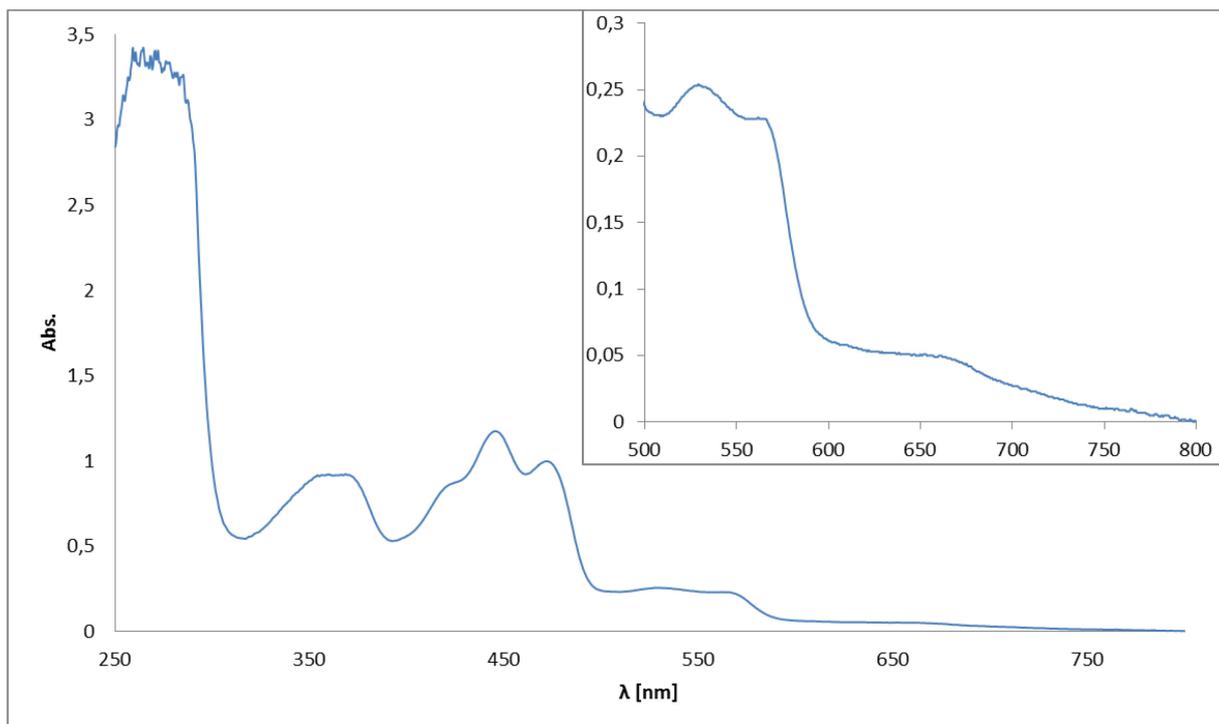


Abb. 81: Absorptionsspektrum des Fusionsproteins mit in vivo assembliertem PEB.

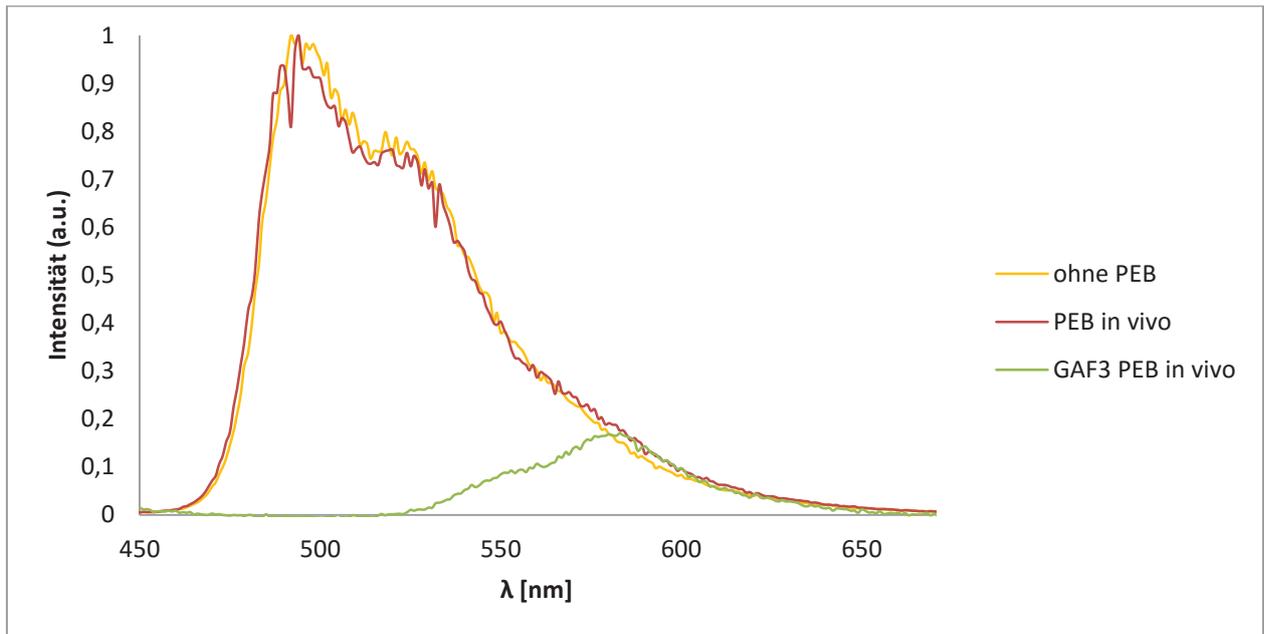


Abb. 82: Vergleich der normierten Fluoreszenzemissionsspektren des Fusionsproteins ohne Bilinchromophor (gelb) mit in vivo assembliertem PEB (rot) und der separat vermessenen, nativen GAF3 Domäne mit in vivo assembliertem PEB (grün). $\lambda_{ex} = 360$ nm

5.2.6. Diskussion: FRET Eigenschaften des LOV-GAF Fusionsproteins

Da es sich bei den beiden Domänen des artifiziellen Fusionsproteins um native Domänen natürlich vorkommender Photorezeptoren handelt, musste als Grundvoraussetzung eine Linkerdomäne erstellt werden, die die beiden Domänen möglichst flexibel verbindet und die Interaktion nicht etwa durch photoaktive Aminosäurereste oder durch sterische Einflüsse stört. Daher wurde unter Zuhilfenahme von bioinformatischen Sekundärstruktur-Vorhersagen und basierend auf bereits vorhandenen Kenntnissen^{162, 169} ein Linker mit einer random coil Struktur gewählt und entwickelt. Des Weiteren wurde durch eine Punktmutation das adduktbildende Cystein C62 durch ein Serin ersetzt (C62S, im Weiteren wird ausschließlich auf diese Mutante des Fusionsproteins Bezug genommen), um den nativen Photozyklus der LOV Domäne zu unterbinden und so sicherzustellen, dass diese dauerhaft fluoreszent ist. Nachdem das synthetische Gen nun auf einem Expressionsvektor in *E. coli* Zellen eingebracht wurde, konnten nach der Aufreinigung mittels IMAC erste spektroskopische Charakterisierungen vorgenommen werden. Dabei zeigte sich zunächst, dass die spektroskopischen Eigenschaften der einzelnen Domänen auch im Fusionsprotein erhalten blieben und sich nicht negativ beeinflussten. Da in der Literatur bisher nur die Emissionsspektren für die naheliegenden Anregungswellen des Pr- (650 nm) und des Pg-Zustandes (540 nm) untersucht wurden¹², musste zunächst der Einfluss von Anregungswellenlängen im Bereich der LOV Absorption (440 – 480 nm) untersucht werden, um das Ausmaß einer direkten Anregung der GAF Domäne bei folgenden FRET Experimenten bestimmen zu können. Hierzu wurde die GAF Domäne bei verschiedenen Wellenlängen angeregt und die Emission aufgenommen (vgl. Abb. 70 und Abb. 71). Dabei zeigte sich, dass bei einer Anregungswellenlänge von 450-480 nm eine direkte Anregung der GAF Domäne am geringsten ausfällt.

Eine Anregung des Fusionsproteins mit in vivo assembliertem PCB bei $\lambda_{ex} = 450$ nm im Vergleich mit dem entsprechenden Emissionsspektrum der GAF3 Domäne bei gleicher Anregungswellenlänge zeigte schon vorab eine deutlich höhere Intensität (vgl. Abb. 75). Ebenfalls zeigt sich in einem entsprechenden Vergleich mit dem Fusionsprotein ohne Bilinchromophor ein deutlicher Unterschied im Emissionsspektrum im Bereich des Emissionsmaximums der GAF Domäne um 670 nm (vgl. Abb. 74). Um diesen hier beobachteten Förster Resonanzenergietransfer

(FRET) zu quantifizieren, wurde sowohl die Methode des Überlappungsintegrals der Donoremission mit der Akzeptorabsorption verwendet wie auch die Verkürzung der Fluoreszenz-Lebenszeiten eingesetzt (vgl. Kapitel 3.3). Diese Verwendung der Überlappungsintegral-Methode war bei dem vorliegenden Fusionsprotein nur in der Pr Form der GAF Domäne möglich, da die Pg Form unter den experimentellen Bedingungen bereits photochemisch in die Pr-Form überführt wird ¹². Aus dieser Berechnung mit der Pr Form ergaben sich ein Försterradius von $R_0 = 40 \text{ \AA}$ sowie eine Effizienz von $\eta = 28,4 \%$. Die zweite Methode der Verkürzung der Fluoreszenz-Lebenszeit des Donors zu bestimmen, verwendete das Fusionsprotein sowohl im Pr und Pg Zustand als auch eine PCB-freie Präparation, die als Referenz diente. Hierbei muss beachtet werden, dass die Beladung der beiden Domänen nur 60 % (LOV Domäne) bzw. 30 % (GAF Domäne) betrug. Dieser Umstand führt dazu, dass ein Teil der Flavine keinen FRET-Partner besitzen und mit ihrer ungequenchten Lebenszeit von $\tau = 5,1 \text{ ns}$ das Ergebnis verfälschen ¹⁷⁰. Daher wurde bei der Berechnung der Fluoreszenzlebenszeiten des Fusionsproteins ein biphasischer Fluoreszenzzerfall angenommen. Wird im Zuge dessen eine der beiden entstehenden Lebenszeiten auf die ermittelte Lebenszeit des Flavins ohne Akzeptor eingestellt, ergeben sich für die mit PCB in vivo assemblierten Fusionsproteine Fluoreszenzlebenszeiten wie in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Vergleich der Fluoreszenzlebenszeiten der mono- und biexponentiellen Fluoreszenzlebenszeitberechnung und die daraus resultierenden Effizienzen η des Energietransfers.

	Lebenszeit τ [ns] biexponentiell	Effizienz η [%] biexponentiell	Lebenszeit τ [ns] monoexponentiell	Effizienz η [%] monexponentiell
ohne PCB	5,1	-	5,1	
PCB in vivo Pr	2,99	41,44	3,99	21,82
PCB in vivo Pg	2,7	47,12	3,33	34,75

Der Unterschied der Effizienzen zu denen, die über das Fluoreszenzüberlappungsintegral berechnet wurden, erklärt sich durch die Ungenauigkeit der Bestimmung des Integrals und der großen Differenzen in den berechneten Werten selbst bei geringen Änderungen in der Integralfäche. Deshalb kann die Berechnung anhand der Fluoreszenzlebenszeit als exakter betrachtet

werden. Die auf diesem Wege ermittelten Effizienzen von $\eta_R = 41,4 \%$ und $\eta_G = 47,1 \%$ liegen beide im Bereich der für vergleichbare FRET Paare ermittelten Effizienzen¹⁷¹. Neben den Effizienzen konnte anhand des spektroskopischen Überlappungsintegrals ebenfalls die Entfernung der beiden Chromophore berechnet werden. Diese liegt mit $46,7 \text{ \AA}$ leicht über dem Försterradius von 40 \AA bei dem dieses FRET Paar eine Übertragungseffizienz von 50% aufweisen würden. Dies deckt sich ebenfalls mit den ermittelten Effizienzen (vgl. Tab. 8).

Außerdem konnte Anhand von ähnlich strukturierten Photorezeptoren wie zum Beispiel das Phytochrom cph1 (2vea) eine näherungsweise Voraussage über die Entfernung der Chromophore im Fusionsprotein getroffen werden. Diese deckt sich mit einem näherungsweise ermittelten Mindestabstand von $31 - 32 \text{ \AA}$ ebenfalls mit den für das Fusionsprotein berechneten Werten.

Zudem ließ sich eine gewisse Abhängigkeit der Energietransfer-Effizienzen von der gewählten Anregungswellenlänge beobachten. Als besonders geeignet erwiesen sich die Wellenlängen zwischen 450 und 480 nm (vgl. Abb. 84). Die vorangehenden Messungen wurden allesamt bei der Anregungswellenlänge 450 nm durchgeführt, da diese dem Maximum der LOV Absorption entspricht. Wählt man jedoch andere Wellenlängen, kann man den Einfluss der direkten Anregung der GAF Domäne noch weiter minimieren. So lassen sich zwar theoretisch mit einer Anregungswellenlänge von 480 nm die besten Ergebnisse erzielen, jedoch zeigte sich nach Untersuchungen, die in Abb. 85 zusammengefasst sind, dass die Effizienz des Förster Resonanzenergietransfers im Bereich von $450 - 480 \text{ nm}$ konstant bleibt. Die Zunahme der Effizienzen in diesem Bereich ist durch die geringere Emission der nativen GAF Domäne und der konstant bleibenden Emission des Fusionsproteins zu erklären. Die Radi blieben bei allen Wellenlängen wie zu erwarten nahezu konstant. So können je nach Anwendungsgebiet und Bedürfnissen verschiedene Wellenlängen zur Anregung gewählt und das vorgestellte FRET Paar noch flexibler eingesetzt werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch geschlossen werden, dass dieses FRET Paar eine zuverlässige Anwendungsmöglichkeit in diesem Anregungswellenlängenbereich mit stabilen Transfer-Effizienzen darstellt.

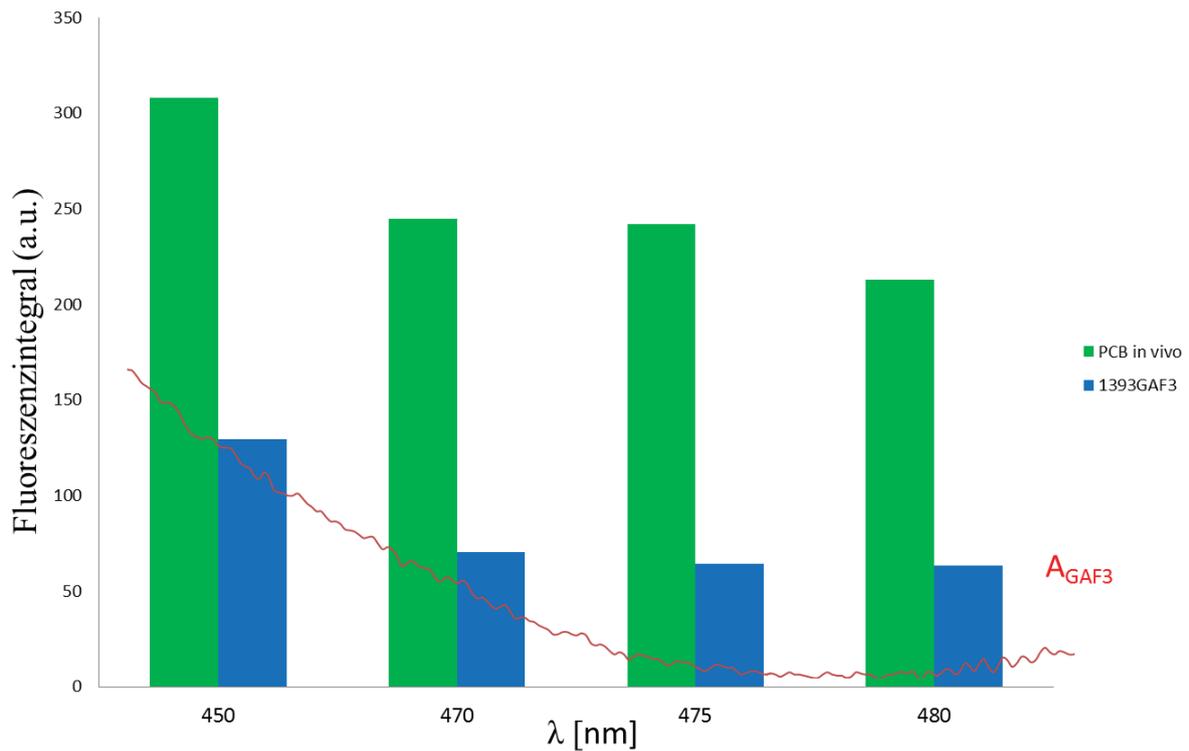


Abb. 83: Vergleich der Emissionsintegrale der separat vermessenen, nativen GAF Domäne (blau) und des mit PCB in vivo assemblierten Fusionsproteins (grün) bei verschiedenen Anregungswellenlängen. In rot dargestellt, die Absorption der GAF3 Domäne bei den jeweiligen Wellenlängen.

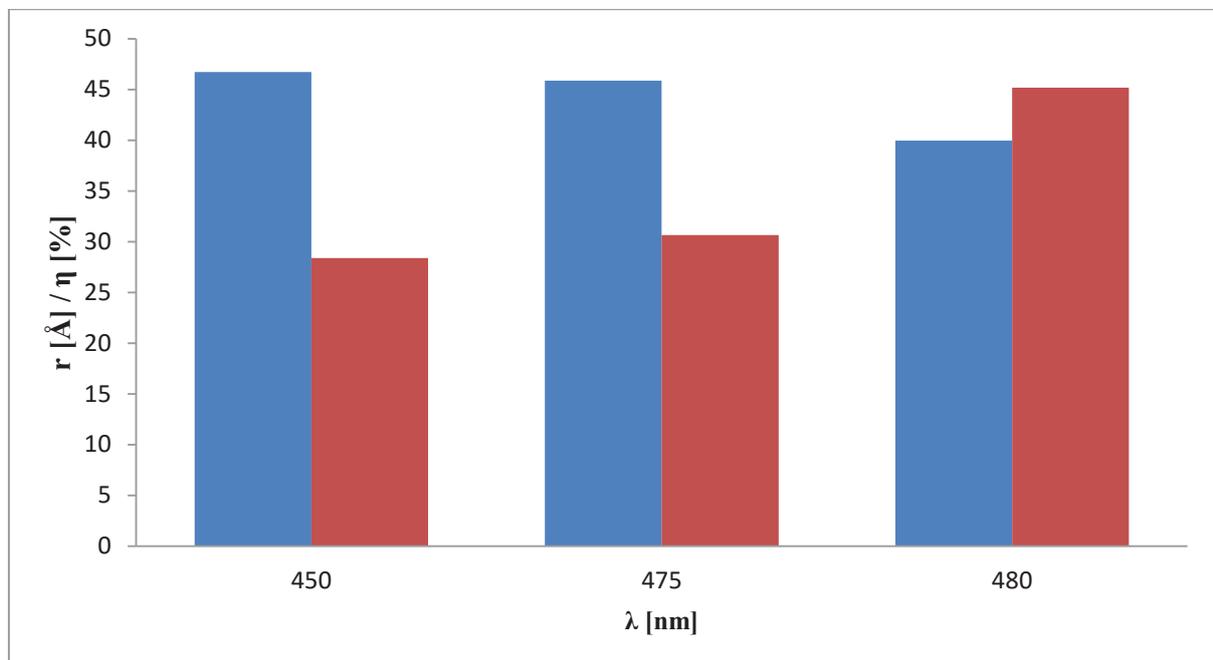


Abb. 84: Vergleich der berechneten Entfernung der Chromophore (blau) und der Energietransfer-Effizienzen (rot) bei verschiedenen Anregungswellenlängen.

5.3. Charakterisierung neuartiger Mutationen in der LOV Domäne des Blaulichtphotorezeptors YtvA aus *Bacillus subtilis*

Viele der hier beschriebenen LOV Domänen weisen, je nach Herkunft des Proteins, deutlich unterschiedliche Geschwindigkeiten für die thermische Rückkehr in den Anfangszustand auf. Diese ist offensichtlich durch die mehr oder weniger starke Einbindung des Flavin-Chromophors in die Proteinbindetasche bestimmt. Es ist daher für prinzipielle Untersuchungen und auch für optogenetische Anwendungen von Interesse, die Stabilitäts-Parameter des Photoprodukt-Zustands genauer zu charakterisieren und durch Mutagenese möglicherweise auch zu beeinflussen. In zahlreichen vorherigen Arbeiten wurde eine Vielzahl von Punktmutationen in dieses Protein eingefügt, um die Protein-Chromophor Interaktionen zu beeinflussen. Entsprechend wurden in der bereits intensiv bearbeiteten LOV Domäne von YtvA (aus *B. subtilis*) zwei Aminosäurekandidaten identifiziert, die einen Einfluss auf die Stabilität des Photoprodukts haben sollten. Beide Aminosäuren befinden sich in der Bindedomäne des Flavin-Cofaktors (Abb. 86): Phenylalanin (F46) liegt auf der C α -Helix, Valin (V28) befindet sich auf dem A β -Faltblatt. Durch gerichtete Mutagenese (wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben) wurden die Mutationen F46A und F46Y sowie V28I und V28L eingefügt und anschließend spektroskopisch charakterisiert.

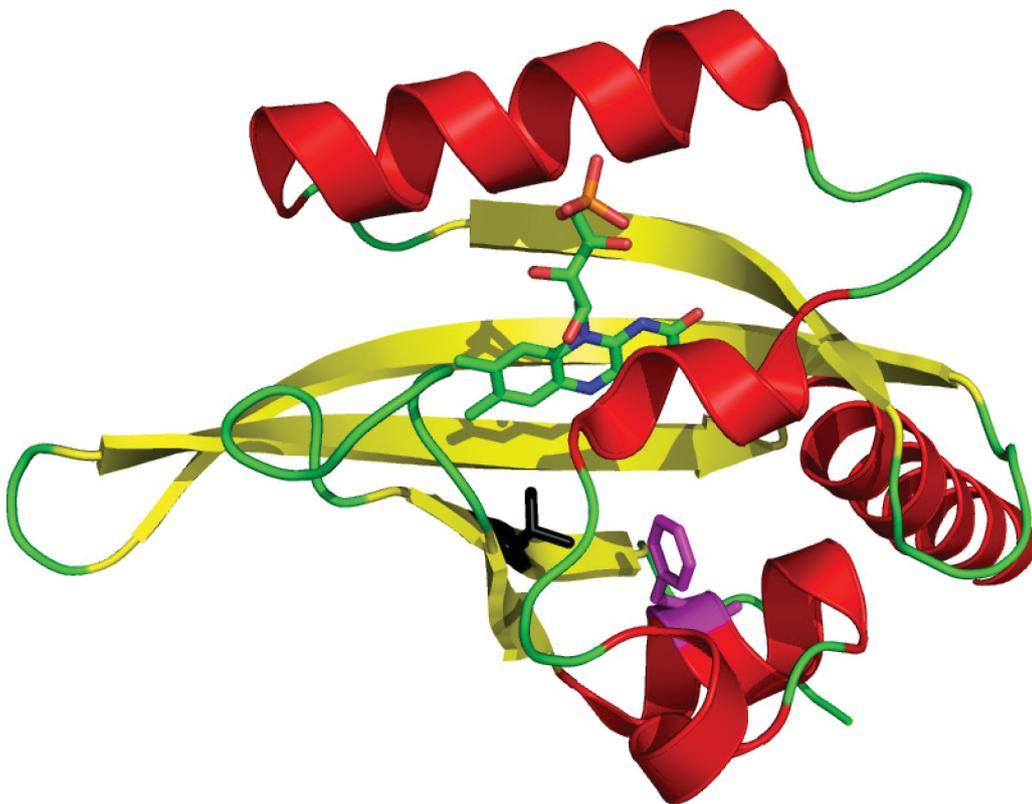


Abb. 85: Flavinbindedomäne des Blaulichtrezeptors YtvA im Dunkelzustand inklusive Darstellung der zu mutierenden Aminosäuren F46 (magenta) und V28 (schwarz) ⁴⁶.

5.3.1. Spektroskopie

5.3.1.1. UV/Vis Spektroskopie

Alle vier Mutanten weisen das charakteristische Absorptionsspektrum einer LOV Domäne mit dem strukturierten dreigipfligen Spektrum auf und zeigen bei Belichtung die Ausbildung eines hypsochrom verschobenen Photoprodukts (Abb. 86 – 90). Für alle vier Mutation wurde die Stabilität des Photoprodukts nach erschöpfender Belichtung als Kinetik der Rückkehr in den Anfangszustand aufgenommen. Sämtliche Kinetiken wurden bei 20 °C durchgeführt (vgl. Kapitel 4.2.14). Für alle vier Mutationen ergaben sich, verglichen mit dem Wildtyp-Protein ($\tau_{20^\circ\text{C}} = 6240 \text{ s}$, $\tau_{25^\circ\text{C}} = 4000 \text{ s}$ ^{39, 50}) z.T. deutliche Veränderungen der Rückkehrkinetik. Für die Mutante F46A wurde nach Gl. 8 eine Lebenszeit von $\tau = 15,89 \text{ min}$ (ca. 950 s) berechnet (Abb. 86). Damit zeigt sich für diese Mutante das Photoprodukt deutlich weniger stabilisiert, d.h., die Rückkehr dieser Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp ca. 7,5-fach schneller.

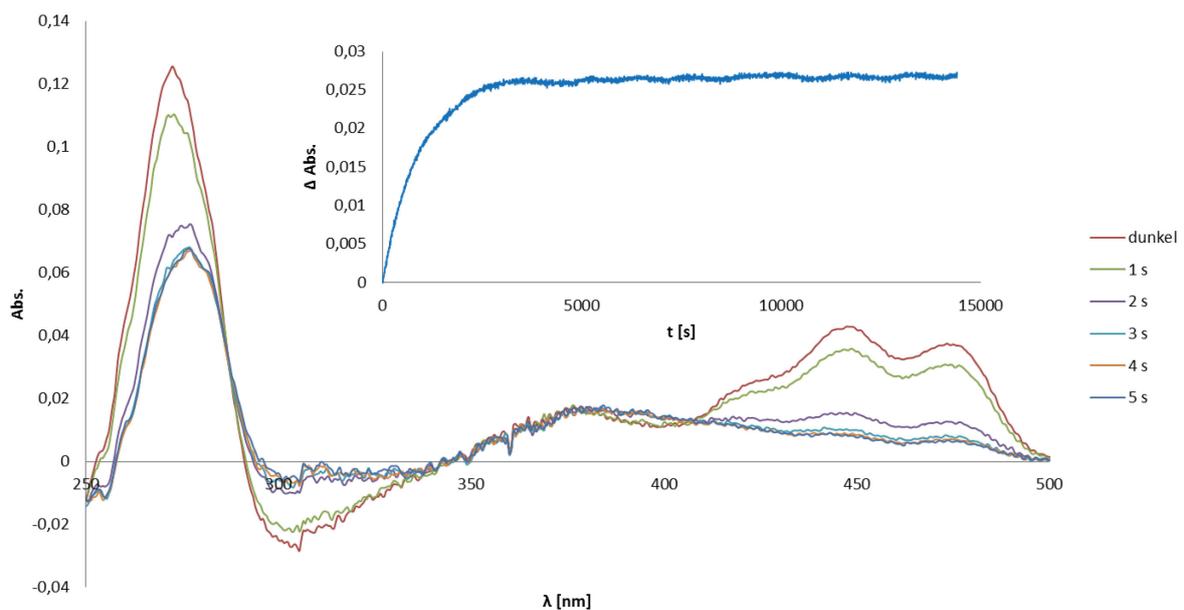


Abb. 86: Belichtungskinetik der Mutante F46A (470 nm) in den angegebenen Intervallen. Inset: Rückkehrkinetik bei einer beobachteten Messwellenlänge von 450 nm (oben rechts).

Ein noch stärkerer Effekt wurde durch die Mutation F46Y erreicht. Für die Rückkehr in den Dunkelzustand ergibt sich nach Gl. 8 eine Lebenszeit von $\tau = 4,36 \text{ min}$. Sie ist damit ca. 30-mal kürzer als die des Wildtyps. Durch die enorm verkürzten Lebenszeiten bei der thermischen Rückkehr in den Dunkelzustand ist es unter den angewandten Messbedingungen bei beiden Mutationen nicht möglich, das Protein

vollständig in den belichteten Zustand zu überführen (besonders deutlich im letztes Spektrum der F46Y Mutante mit einer Belichtungszeit von 5 min, Abb. 88).

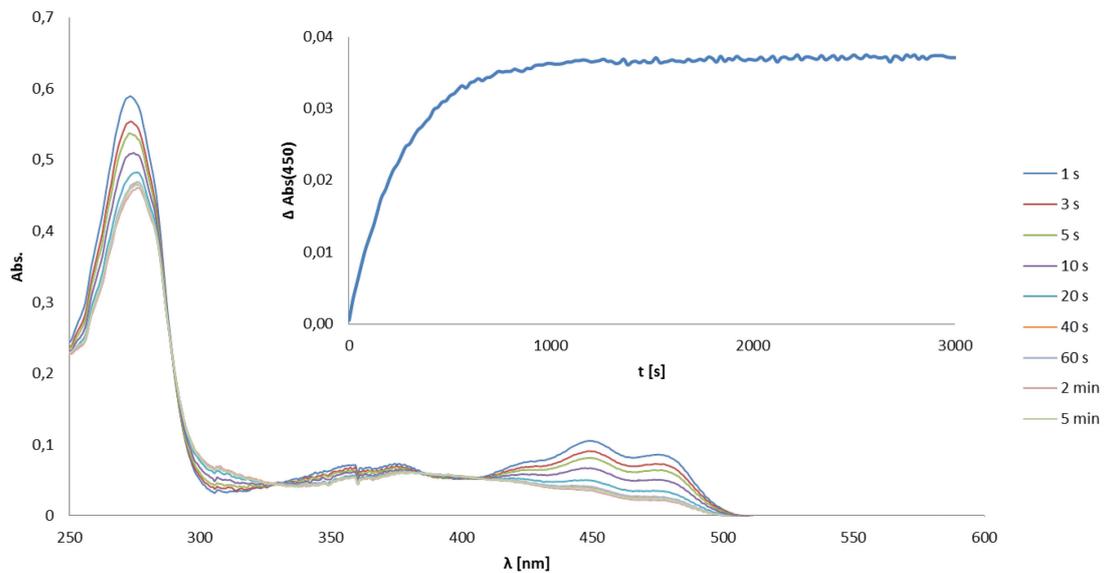


Abb. 87: Belichtungskinetik der Mutante F46Y (470 nm) in den angegebenen Intervallen. Inset: Rückkehrkinetik bei einer beobachteten Messwellenlänge von 450 nm (oben rechts).

Gegenteilige Effekte wurden bei Mutationen an der Position Valin-28 erzielt. Ein Austausch dieser Aminosäure gegen Leucin führte zu einer deutlichen Stabilisierung des Photoprodukt bzw. einer extrem verlängerten Rückkehr in den Anfangszustand. Der Effekt wird bereits dadurch deutlich, dass es hier innerhalb weniger Sekunden Belichtung zu einer vollständigen Konvertierung in das Photoprodukt kommt (Abb. 89) Es wurde eine Lebenszeit von 589 min (entspr. ca. 35600 s) gemessen (Inset in Abb. 92). Durch diese Mutation wird der belichtete Zustand enorm stabilisiert, was zu einer ca. 4,5-mal längeren thermischen Rückkehr in den Dunkelzustand führt.

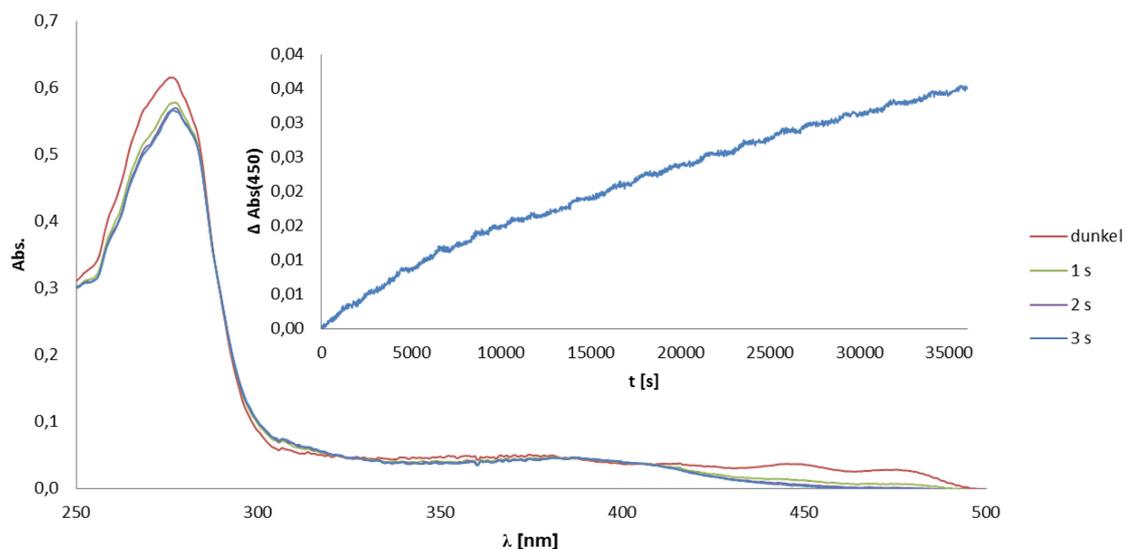


Abb. 88: Belichtungskinetik der Mutante V28L mit 470 nm in den angegebenen Intervallen. Rückkehrkinetik mit einer beobachteten Messwellenlänge von 450 nm (oben rechts).

Eine vollständige Stabilisierung des Photoprodukts erzielt man durch Mutation des Valin-28 gegen Isoleucin (Abb. 90). Bereits das aus der Expression isolierte Protein befindet sich in der bei 390 nm absorbierenden Photoproduktform. Eine über mehrere Stunden durchgeführte Dunkelinkubierung führte zu keiner Veränderung dieser Absorption und dokumentiert die Fixierung dieser Mutante in der Photoproduktform.

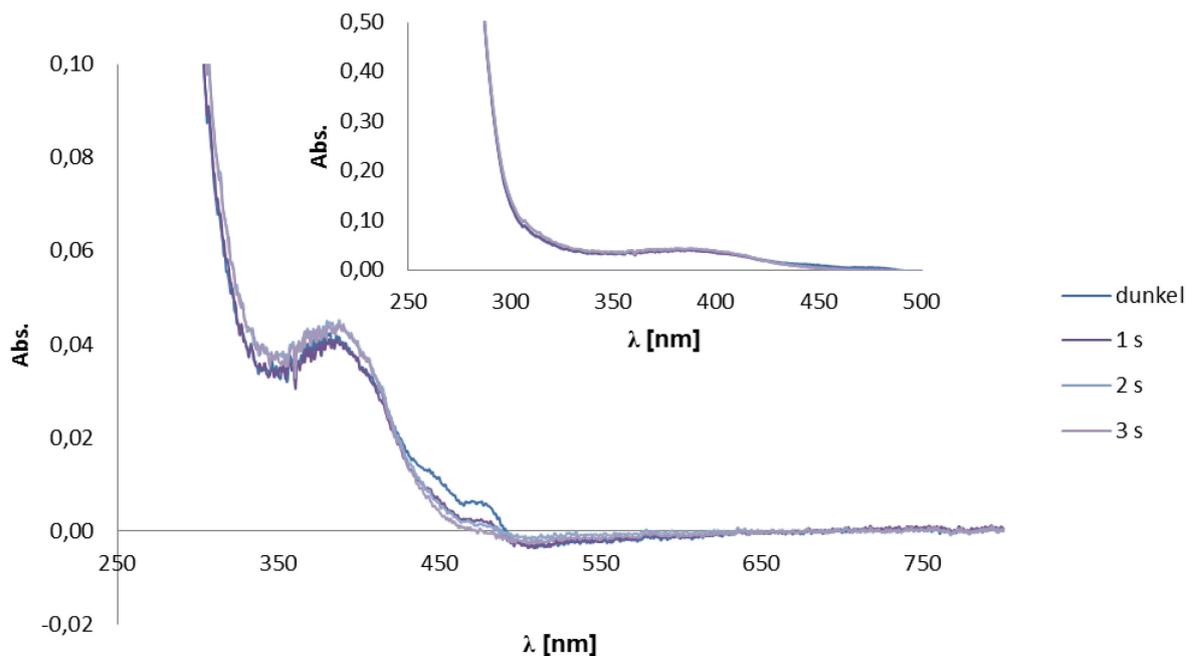


Abb. 89: Belichtungskinetik der Mutante V28I mit 470 nm in den angegebenen Intervallen.

Durch die hier gezeigten Belichtungskinetiken ergeben sich unterschiedlich starke Bleichungen der Absorption der einzelnen Mutanten. Die in Abb. 91 dargestellten Differenzspektren zeigen deutlich, dass ausschließlich F46Y eine stärkere Bleichung im für Flavoproteine charakteristischen Bereich von 430 – 500 nm erfährt, während unter den gewählten Bedingungen die anderen drei Mutationen z.T. erheblich weniger konvertiert werden können.

Aus diesen Belichtungskinetiken ergeben sich Differenzspektren zwischen Dunkel- und belichtetem Zustand wie in Abb. 91 dargestellt.

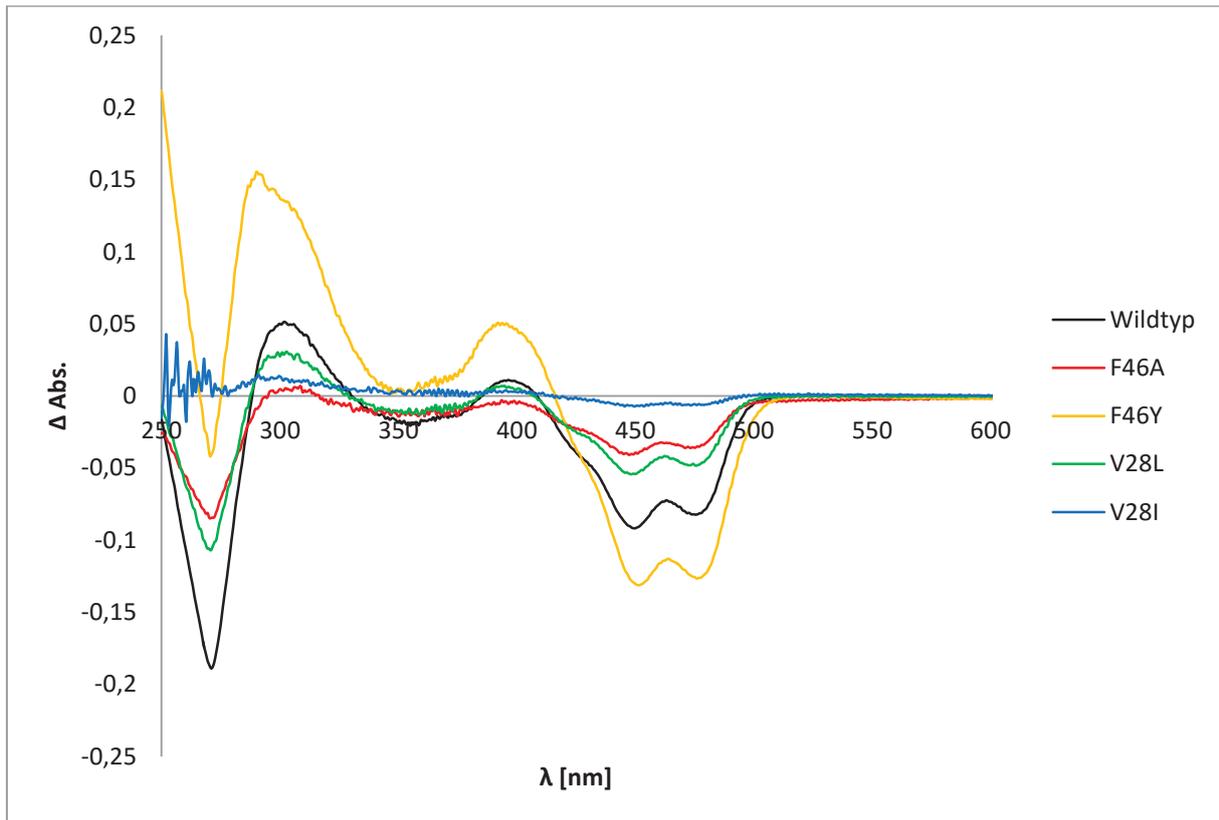


Abb. 90: Vergleich der Differenzspektren der Mutanten F46A, F46Y, V28L mit dem entsprechenden Differenzspektrum des Wildtyps.

5.3.2. Fluoreszenzspektroskopie

Die an Positionen 28 und 46 mutierten YtvA Mutanten wurden auch bezüglich ihrer Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert. Gemessen wurde bei allen Proben mit einer Anregungswellenlänge von 450 nm. Das Integral zur Bestimmung der Quantenausbeute wurde nach Gleichung 9 in den Grenzen von 460 nm bis 660 nm bestimmt, wobei als Vergleichswert die Quantenausbeute des Wildtyps verwendet wurde ($\Phi_{YtvA} = 0,22$ ¹⁷²).

$$\Phi_{F_X} = \frac{\int X}{\int WT} \cdot \frac{1 - 10^{-Abs_{WT}}}{1 - 10^{-Abs_X}} \cdot \Phi_{FWT}$$

Gl. 9

Für den Wildtyp wurde bei einer Absorption bei 450 nm (A_{447}) von 0,1167 ein Fluoreszenzintegral von $\int F_{YtvA} = 17175$ erhalten. Diese Werte wurden im Folgenden für die Berechnung aller Mutanten von YtvA verwendet.

Die Mutante F46A ergab ein Integral von $\int F_{F46A} = 2690$, gemessen bei $A_{447} = 0,0704$. Dies führt nach Gl. 9 zu einer Quantenausbeute von $\Phi_{F46A} = 0,05$. Für die Mutante F46Y ergab sich ein Integral von $\int F_{F46AY} = 6289$, gemessen bei $A_{447} = 0,2719$, entsprechend einer Quantenausbeute von $\Phi_{F46Y} = 0,04$. Die entsprechenden Werte für V28L ergaben ein Integral von $\int F_{V28L} = 9108$, gemessen bei $A_{447} = 0,0599$, woraus sich eine Quantenausbeute von $\Phi_{V28L} = 0,21$ errechnete. Da die Mutation V28I zu einer stabilen Photoproduktform führte, konnte hier keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die entsprechenden Anregungs- und Emissionsspektren der jeweiligen weiteren Mutationen sind in Abb. 92 bis Abb. 95 dargestellt.

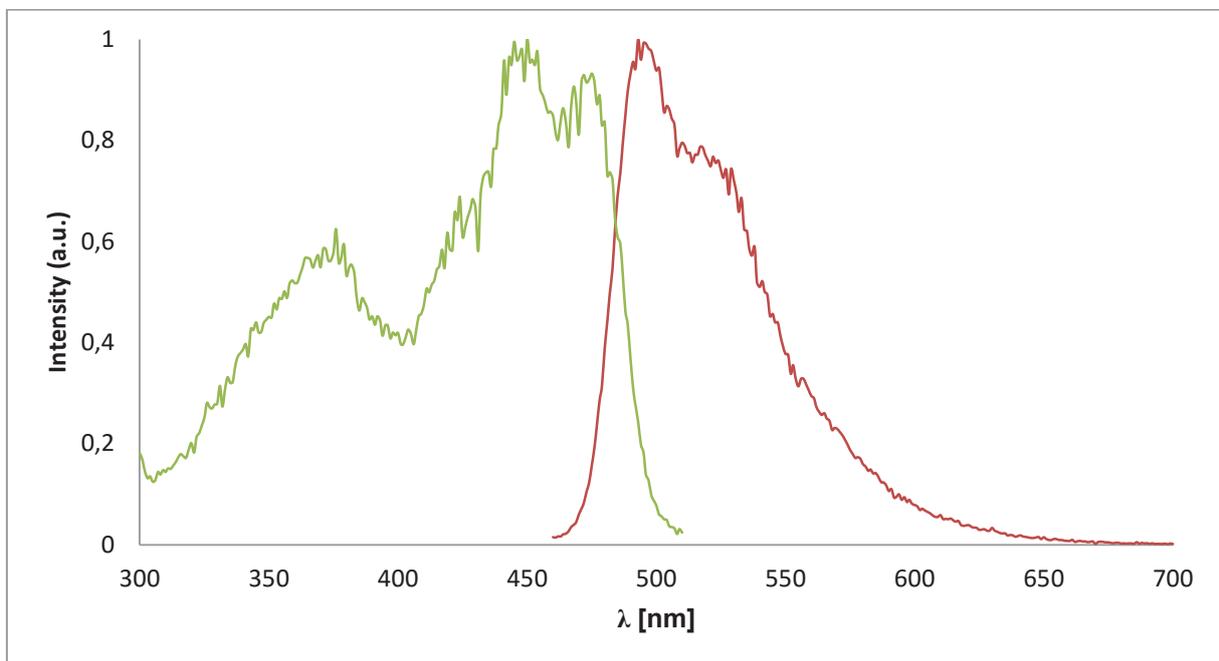


Abb. 91: Fluoreszenzspektren der Mutante F46A. Dargestellt sind die Emissionsspektren ($\lambda_{ex} = 450$ nm) für den Dunkelzustand (rot) sowie das Anregungsspektrum (grün); $\lambda_{em} = 520$ nm.

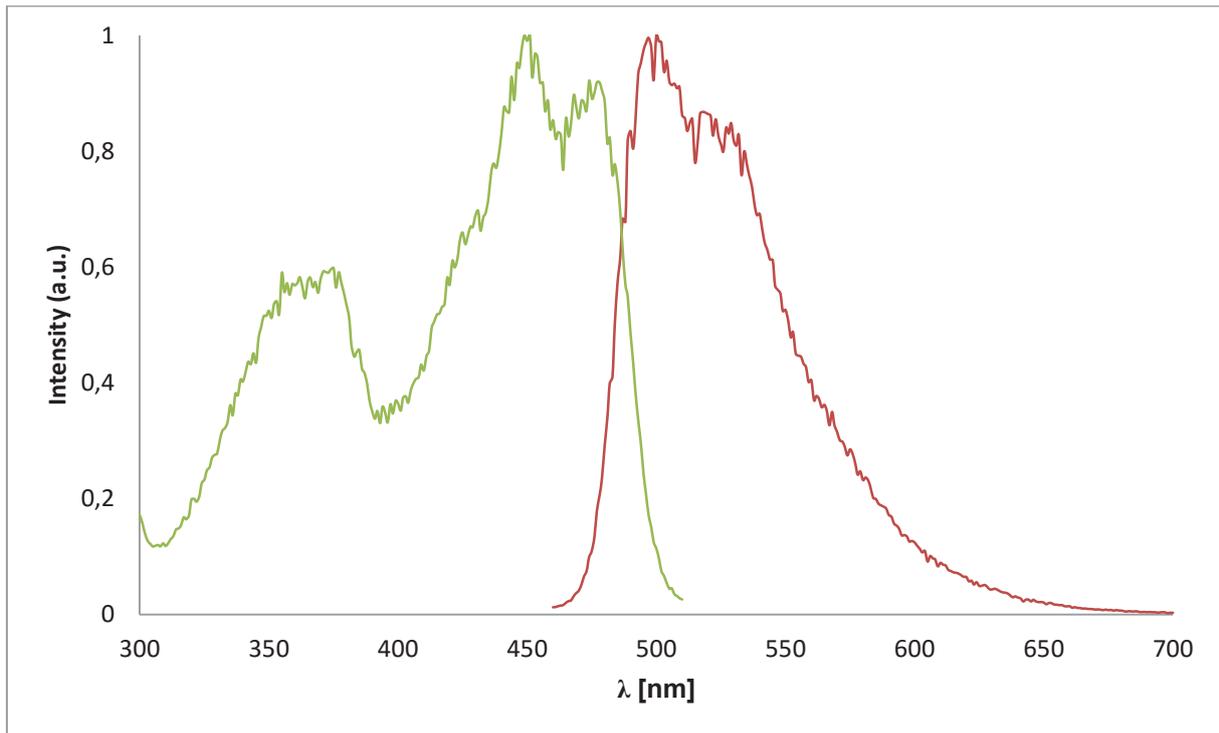


Abb. 92: Fluoreszenzspektren der Mutante F46Y. Dargestellt sind die Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm) für den Dunkelzustand (rot) sowie das Anregungsspektrum (grün); $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm.

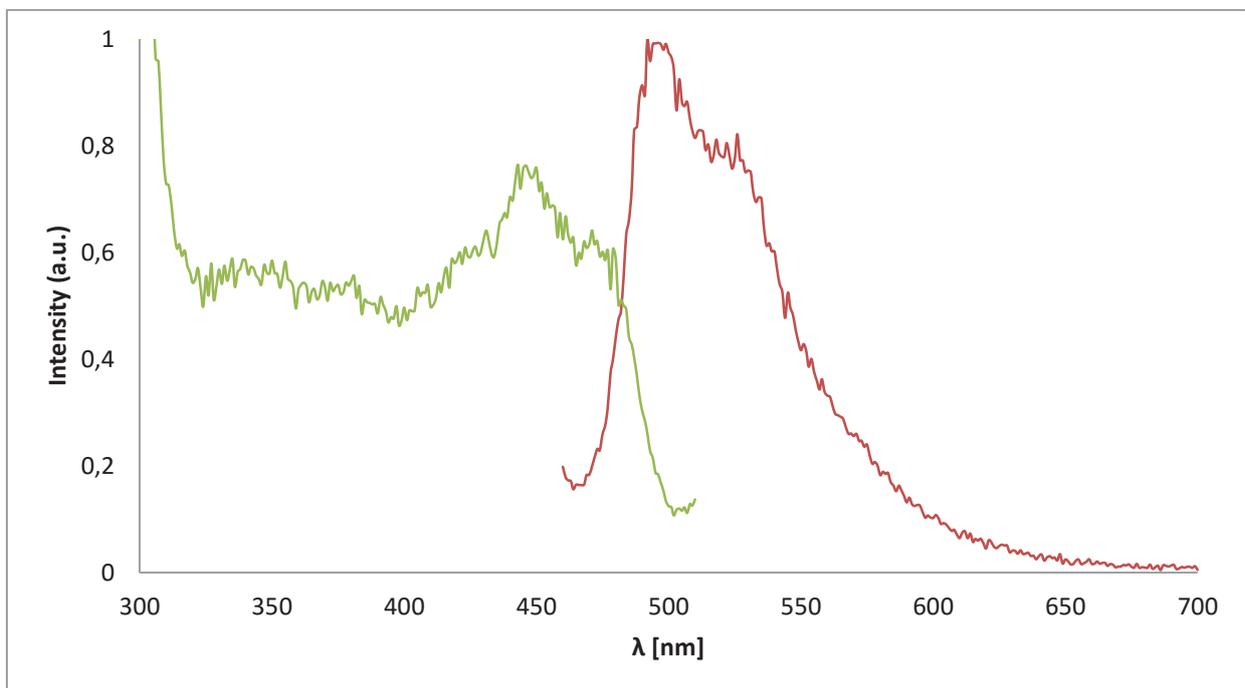


Abb. 93: Fluoreszenzspektren der Mutante V28I. Dargestellt ist das Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm, blau) sowie das Anregungsspektrum mit einer Emissionswellenlänge ($\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, grün).

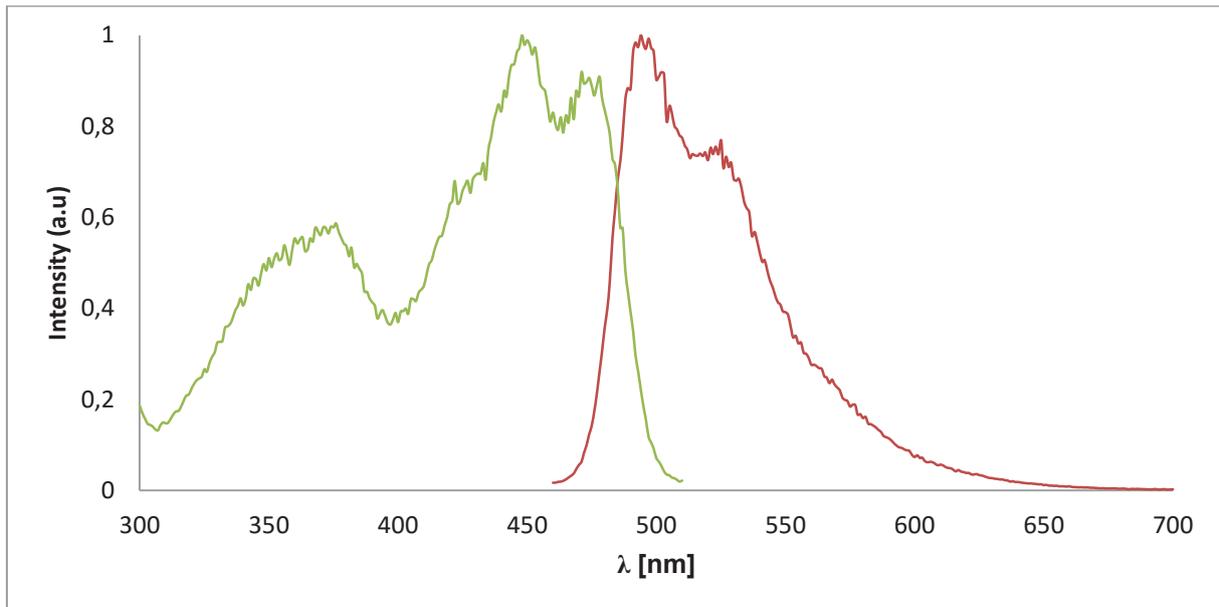


Abb. 94: Fluoreszenzspektren der Mutante V28L. Dargestellt sind die Emissionsspektren ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) für den Dunkelzustand (rot) sowie das Anregungsspektrum (grün); $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$.

5.3.3. Diskussion: Mutationen in der LOV Domäne von YtvA zur Modulation der Kinetiken

Der bakterielle Blaulichtrezeptor YtvA aus *Bacillus subtilis* ist in der Vergangenheit bereits umfangreich untersucht worden. Besonders die Charakterisierung des Photozyklus lag dabei im Fokus der Untersuchungen. So wurden durch zahlreiche Mutationen von Aminosäuren im Bereich der Flavin-Bindedomäne das Wasserstoffbrücken-Netzwerk moduliert, um dadurch Rückschlüsse auf die Funktionsweise und die Beiträge einzelner Aminosäuren auf die verschiedenen Schritte des Photozyklusses zu untersuchen^{50, 157, 172}. Zum anderen wurde auch durch das Einbringen synthetischer Flavinderivate in die LOV Domäne von YtvA der Einfluss verschiedener funktioneller Gruppen des Flavins auf die photochemischen Eigenschaften nachgewiesen⁵². Diese Kenntnisse führten dann dazu, dass 2013 eine Anwendungsmethode im Bereich der hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie (FPALM) von Losi *et al.* veröffentlicht werden konnte^{51, 173}.

Teil dieser Arbeit war es, zum einen Valin-28 durch die Aminosäuren Leucin und Isoleucin zu substituieren und zum anderen Phenylalanin-46 durch Alanin und Tyrosin zu ersetzen.

So konnte bei V28L eine fast 6-fach verlangsamte Rückkehr in den Dunkelzustand gemessen werden. Im Falle einer Substitution des Valins durch ein Isoleucin hingegen konnte gar nicht erst ein Dunkelzustand beobachtet werden. Da YtvA nur im Dunkelzustand fluoresziert, konnte dementsprechend auch keine Fluoreszenzemission bzw. Fluoreszenz-Quantenausbeute gemessen werden. Die Mutation V28I hatte jedoch kaum einen Einfluss auf die Fluoreszenz-Quantenausbeute der LOV Domäne. Valin-28 ist innerhalb der Flavin-Bindedomäne in der Nähe des N5 des Flavins lokalisiert. Andere Arbeiten zeigten, dass diese Aminosäure eine besondere Rolle in der Deprotonierung des N5 in der LOV Domäne des pilzlichen Blaulichtrezeptors VVD und damit die Rückkehr in den Dunkelzustand des Proteins fördert ¹⁷⁴. Diese wird maßgeblich durch den pH-Wert des Mediums bestimmt. Da Valin-28 zwischen dem Flavin und einem Zugangskanal vom äußeren Medium sowie in der Nähe zum adduktbildenden Cystein-62 und dem benachbarten Glutamin-123 lokalisiert ist, kann eine Substitution durch Isoleucin dazu führen, dass die Methylgruppe des Isoleucins in sterischen Kontakt mit Q123 und C62 tritt. Darüber hinaus vermindert Isoleucin den Zugang zum N5 des Flavins, was wiederum zur Folge hat, dass die Deprotonierung des N5 und damit die Rückkehr in den Dunkelzustand entweder deutlich verlangsamt wird (V28L) oder sich die LOV Domäne dauerhaft im A₃₉₀ Zustand befindet (V28I). Dies wird darüber hinaus möglicherweise durch eine Einschränkung der Rotationsfähigkeit des Glutamin-123 bestärkt. Die Rotationsfähigkeit ist deshalb essentiell, da durch die Adduktbildung bzw. dessen Auflösung der pK_s Wert von N5 eine große Differenz aufweist ^{147, 175-178}. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen beobachteten Zoltowski *et al.* in VVD bei der entgegen gerichteten Mutation von I74V (entspricht V28 in YtvA) einen gegenteiligen Effekt ¹⁷⁴.

Betrachtet man die Aminosäure Phenylalanin-46, welche auf der entgegengesetzten Seite des adduktbildenden Cystein-62 (und des zuvor beschriebenen Valin-28) lokalisiert ist, so zeigt sich hier eine deutliche Verkürzung der Rückkehrkinetiken in den Dunkelzustand. Der Dunkelzustand wird mitunter so stark favorisiert, dass es nicht möglich ist, das Protein vollständig in den belichteten Zustand zu überführen. Entsprechend ist die thermische Rückkehr in den Dunkelzustand für F46A 6,5 mal schneller und für F46Y sogar fast 24 mal so schnell. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute wurde in beiden Mutationen des Phenylalanin-46 stark beeinflusst

und war mit $\Phi_{F;F46A} = 0,05$ und $\Phi_{F;F46Y} = 0,04$ um das 4,4- bzw. 5,5-fache geringer. Für das Wildtypprotein, welches ein Phenylalanin an dieser Stelle besitzt, ist publiziert, dass die sterische Interaktion der Seitenkette zum N5 des Flavins möglicherweise zu π - π Interaktionen führen kann, die im weiteren Konformationsänderungen über den β -Strang, auf dem das Phenylalanin lokalisiert ist, erleichtern. Da im Falle einer Substitution durch Alanin das π -Elektronensystem des Benzolrings entfernt wird und darüber hinaus die Größe der Seitenkette deutlich reduziert wird, könnte dies erklären, warum eine vollständige Bleichung nicht mehr möglich ist und eine Rückkehr in den Dunkelzustand 6,5 mal schneller stattfindet¹⁷⁹. Betrachtet man nun die Mutante F46Y, trifft diese Argumentation nicht mehr zu. Zum einen ist die Größe der Seitenkette vergleichbar und zum anderen bleibt trotz Mutation die Aromatizität erhalten. Jedoch erhöht sich durch die OH-Gruppe des Tyrosins die Elektronennegativität im Vergleich zu Phenylalanin deutlich, was wiederum die Deprotonierung des N5 begünstigen und beschleunigen könnte, so dass die Rückkehr in den Dunkelzustand im Vergleich zum Wildtyp deutlich beschleunigt wird.

Tab. 9: Zusammenfassung der Messergebnisse

	F46A	F46Y	V28L	V28I	Wildtyp
A_{max} [nm]	445	448	447	385 **	450
BL [s]	3 *	60 *	3	/ **	420
τ_R (20 °C) [s]	950	261	35600	/	6240
Φ_F	0,05	0,04	0,21	/	0,22

* keine vollständige Belichtung möglich

** kein Dunkelzustand vorhanden

5.4. Bacterioopsin Aktivator

Wie in der Einleitung ausgeführt, wird die Expression des Bacterio-Opsingens in dem Archaeon *Halobacterium salinarum* durch das Genprodukt des bacterio-opsin activators (Bat) induziert, das eine LOV-Domänen ähnliche PAS Domäne als einzige Chromophor-bindende Struktur enthält. Allerdings trägt diese LOV Domäne kein Flavin-bindendes Cystein, sondern an dieser Stelle befindet sich ein Histidin. Ein weiterer bemerkenswerter Austausch findet sich an der Position 79, an der entgegen dem normalerweise vorhandenen Arginin ein Tryptophan gefunden wird. Um eine mögliche Blaulicht-Photochemie dieses Proteins besser vergleichen zu können, wurde neben dem Bat-Protein aus *Halobacterium salinarum* (HsBatLOV) ein homologes Protein, die LOV Domäne aus dem ebenfalls Bat genanntes Protein aus *Natronomonas pharaonis* verwendet. Diese beiden LOV Domänen weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf und besitzen auch sonst die charakteristischen Elemente einer LOV Domäne (wie in Kapitel 3.2.2 und 3.2.8 beschrieben). Allerdings ist die LOV Domäne aus *Natronomonas pharaonis* eine ‚klassische‘ LOV-Domäne mit dem üblicherweise vorhandenen Cys-Arg Motiv. Auch bezüglich der beschriebenen bzw. vermuteten Funktion ähneln sich diese beiden Proteine. *N. pharaonis* trägt kein Bacterio-Opsin, sondern nur ein Gen, das für ein Halo-opsin kodiert. In den Genomen beider Organismen liegt das bat Gen auf einem Operon vor dem bacterio- bzw. halo-opsin Gen. Offensichtlich fungiert das Np-BAT Protein in *N. pharaonis* in gleicher Weise wie das Bat Protein in *H. salinarum*.

5.4.1. Expression der Domänen und Probleme

Dieses Teilprojekt war vorhergehend im Rahmen einer Masterarbeit der Goethe Universität in Frankfurt am Main mit dem Titel „Charakterisierung des lichtregulierten Transkriptionsfaktors Bat“ partiell bearbeitet worden¹⁸⁰. Hauptziel dieser Arbeit war es unter anderem, das Protein HsBat in voller Länge sowie ausschließlich die LOV Domäne HsBatLOV zugänglich zu machen. Diese beiden Konstrukte wurden dann übernommen und weitergehend spektroskopisch charakterisiert. Leider war es in dieser Arbeit bei der Expression von HsBatLOV nicht möglich, das Protein mit einem ausreichend großen Anteil an Holoprotein zu exprimieren. Daraufhin wurden für *E. coli* Codon-optimierte Konstrukte für die Expression verwendet (vergl. Tab. 1 in

Kapitel 4.1.1). Leider wurde auch mit diesen Konstrukten HsBatLOV lediglich als Apoprotein exprimiert. Versuche, FMN als Chromophor in vitro zu assemblieren, schlugen ebenfalls fehl. Hier wurde zum Einen FMN zum Rohlysat hinzugegeben und freies FMN später chromatographisch von dem Protein getrennt, zum Anderen wurde ein etabliertes Chromophoraustauschprotokoll verwendet, um FMN in die HsBatLOV Domäne einzubinden⁵². Daher war es im Folgenden nur möglich, die NpBatLOV Domäne spektroskopisch zu charakterisieren.

5.4.2. Spektroskopie

Entsprechend der aus der Sequenz abgeleiteten ‚normalen‘ LOV-Funktion konnte die LOV Domäne des Bakterio-opsin-Aktivatorproteins (ebenfalls Bat genannt) aus *N. pharaonis* nach 10 s mit 470 nm nahezu vollständig in den belichteten Zustand überführt werden (Abb. 96) deutlicher zu erkennen ist dies in den Differenzspektren (Inset Abb. 96).

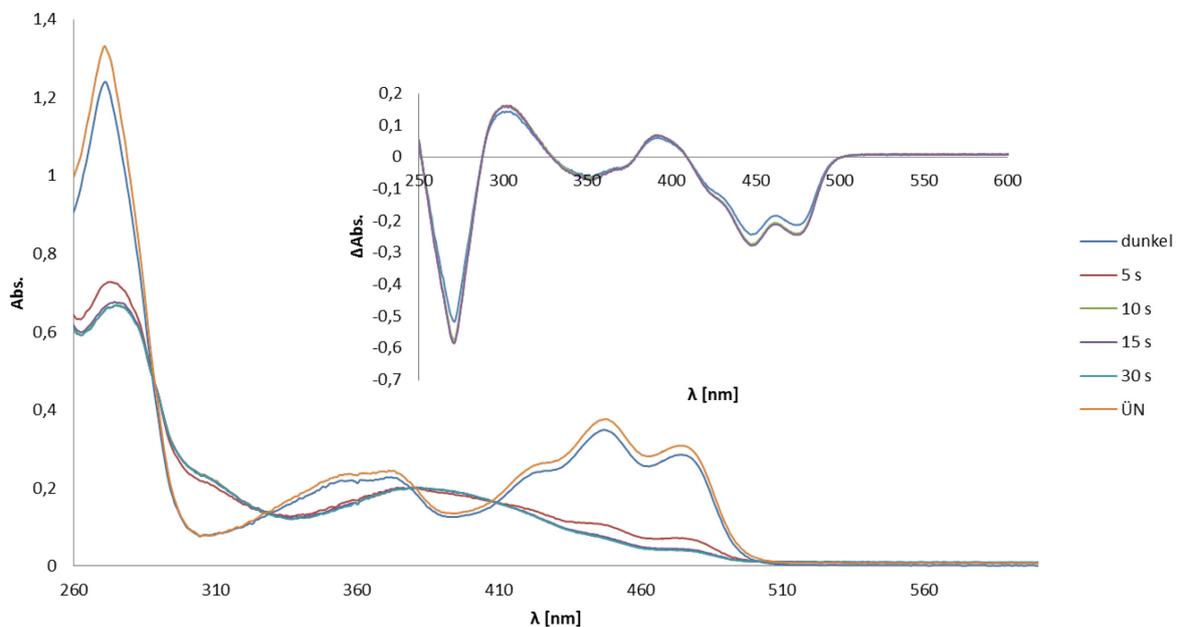


Abb. 95: Belichtungskinetik von NpBatLOV; Inset: Differenzspektren.

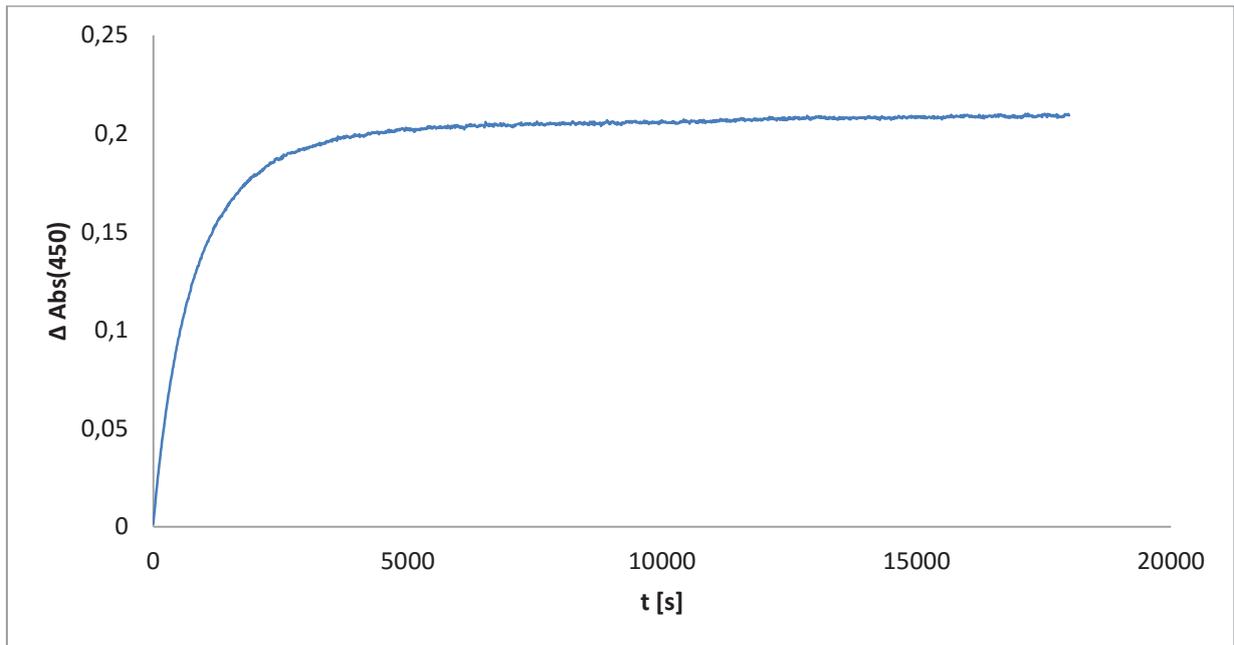


Abb. 96: Kinetik der thermischen Rückkehr von NpBatLOV aus dem belichteten Zustand in den Ausgangszustand.

Ebenfalls dem Verhalten einer kanonischen LOV Domäne entsprechend konnte eine thermisch induzierte Rückkehr in den Anfangszustand mit einer Lebenszeit von $\tau = 16,59$ min bestimmt werden (Abb. 97). Gleiches gilt für die Fluoreszenz-Emissions und -Anregungsspektren (Abb. 98) sowie für die Fluoreszenz-Lebenszeiten (Abb. 99). In zwei unabhängigen Messungen wurden jeweils bi-exponentielle Kinetiken gefunden (s. Tab. 10).

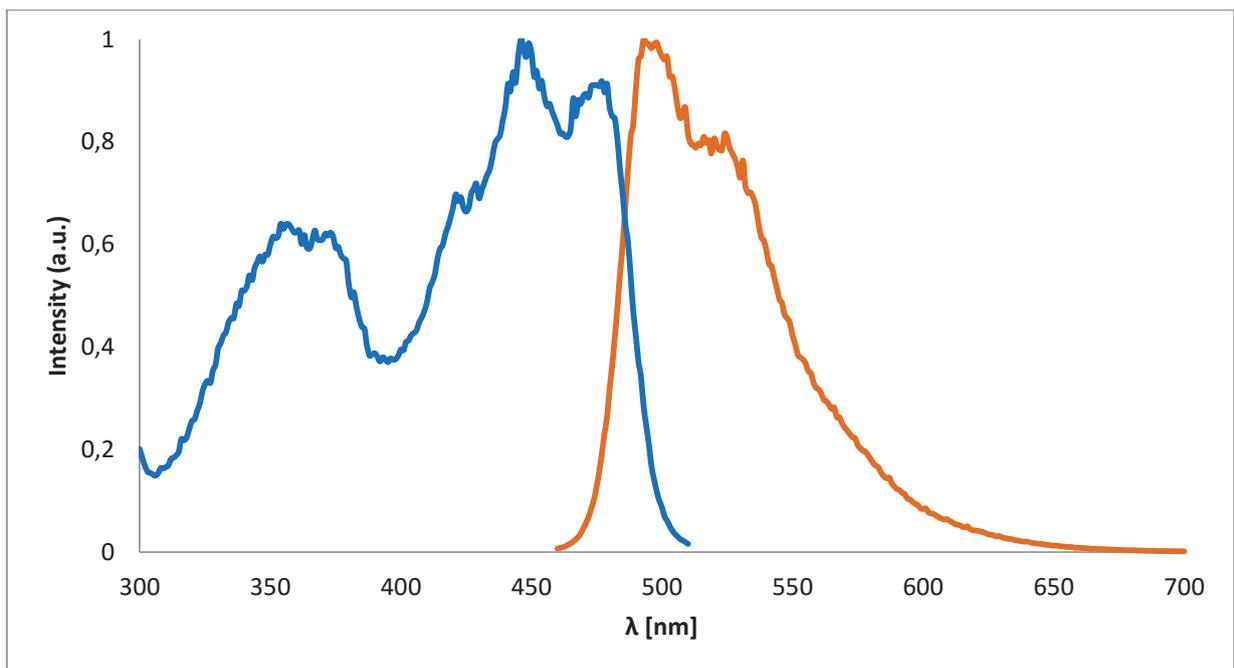


Abb. 97: Emissionsspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm, orange) und Anregungsspektrum ($\lambda_{\text{em}} = 520$ nm, blau) von NpBatLOV.

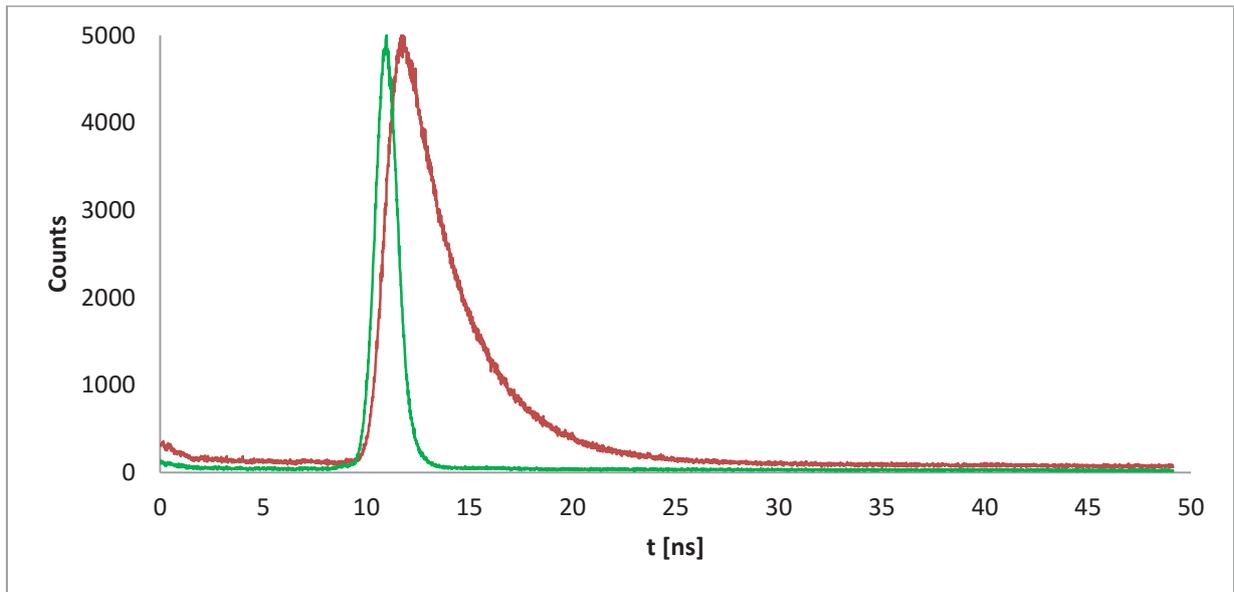


Abb. 98: Fluoreszenzlebenszeitspektren von NpBatLOV (rot) mit einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Detektionswellenlänge von 520 nm. Der Interne Responsefaktor ist in grün dargestellt

Tab. 10: Berechnete Fluoreszenz Lebenszeiten von NpBatLOV

	τ_1 [ns]		τ_2 [ns]	
1. Messung	2,77	71,39 %	57,3	28,61 %
2. Messung	2,76	90,17 %	23,2	9,83 %

5.4.3. Diskussion: LOV Domäne des Bat Proteins aus *Natronomonas pharaonis*

In silico Untersuchungen ergaben für das Bacterio-opsin Aktivatorproteins (Bat) eine klassische LOV-Struktur, wie sie auch für andere Bat Proteine in der Literatur beschrieben wird (vgl. Abb. 100). So besitzt NpBat neben einer C-terminal liegenden DNA bindenden Helix-turn-Helix (HTH) Domäne sowohl eine GAF Domäne als auch eine PAS/PAC Domäne, welche eine Regulation des Apoproteins Bacterio-opsin und des Chromophors Retinal in Abhängigkeit von Licht als auch der Sauerstoffverfügbarkeit ermöglichen^{139, 141}. Bisher wurde allerdings in der Literatur davon ausgegangen, dass die PAS/PAC Domäne für die Redoxsensitivität verantwortlich war^{142, 146}.



Abb. 99: Graphische Darstellung der Domänenstruktur des Bacterio-opsin Aktivatorproteins aus *Natronomonas pharaonis* auf der Grundlage von BLAST Analysen¹⁵⁸.

Durch die selektive Expression der PAS/PAC Domäne konnte diese unabhängig vom Rest des Proteins untersucht werden. Die Sequenz ließ hier auf ein LOV Motiv schließen, was durch die Messungen bestätigt werden konnte. Die vorliegende LOV Domäne des *N. pharaonis* Bacterio-opsin Aktivatorproteins (NpBatLOV) zeigt den klassischen Photozyklus einer kanonischen LOV Domäne. Sowohl die Belichtung als auch die Rückkehr in den Dunkelzustand gehen sehr schnell von Statten. Dies lässt auf eine sehr zeitnahe positive Regulation des Bacteriorhodopsins schließen, so dass die Expression bei nachlassender Lichtintensität schnellstmöglich gehemmt wird.

Tab. 11: Zusammenfassung der Messergebnisse

	NpBatLOV
A_{\max} [nm]	447
BL [s]	10
τ_R (20 °C) [s]	995
τ_F [ns]	2,77

6. Ausblick

Diese Dissertationsschrift setzt sich zum einen mit den schädlichen Aspekten von kurzweiligem Licht auseinander und widmet sich auf der anderen Seite ebenso der Verwendung dieser Lichtqualität, vornehmlich im blauen und ultravioletten Spektralbereich. In beiden Fällen konnten neuartige Blaulichtrezeptoren charakterisiert werden, wodurch zum Einen das Verständnis bezüglich extremophiler Organismen erweitert wurde und zum Anderen die Grundlage für die Optimierung und Anwendung eines neuen FRET Sensorpaares gelegt wurde.

Die Charakterisierung der Photolyase aus *Acinetobacter sp. Ver3* hat spannende Grundlagen der Funktionsweise und Konstitution dieses Photorezeptors aus einem extremophilen Bakterium hervorgebracht. Die weitere Charakterisierung dieses *Acinetobacter*-Stammes, die Optimierung der heterologen Expression von Ver3Phr und Ver3PL2, sowie die Identifizierung weiterer Stämme aus dem Hochplateau der Anden (HAAL) verspricht die Gewinnung neuer, leistungsstärkerer extremophiler Enzyme, Mechanismen und kompatibler Solute, die sich aufgrund der schwierigen Lebensbedingungen in den dortigen Habitaten entwickelt haben. Diese Erkenntnisse werden Aufschluss geben, auf welche Weise effektive Schutzmechanismen in derartig harschen und lebensfeindlichen Umweltbedingungen funktionieren. Nicht umsonst wurde dieses Hochplateau der Anden u.a. durch die NASA als Modellhabitat für Experimente über extraterrestrisches Leben verwendet. Auf der anderen Seite wird die Etablierung von *Acinetobacter sp.* als Modellorganismus für derartige extremophile Organismen angestrebt, so dass eines Tages Erkenntnisse übertragen und andere neuartige und leistungsstarke Enzyme identifiziert und charakterisiert werden können.

Der der Funktion der Photolyase zugrundeliegende Förster Resonanzenergietransfer (FRET) wurde eindrucksvoll mit Hilfe des synthetisch konstruierten YLOV-1393GAF3 Fusionsproteins demonstriert. FRET ist schon seit geraumer Zeit zu einer wichtigen und leistungsstarken molekularen Methode geworden, mit deren Hilfe Prozesse intrazellulär in geringsten Konzentrationen und im Ångström-Distanzbereich präzise beobachtet und überwacht werden können¹⁸¹⁻¹⁸³. Mit dem hier vorgestellten und charakterisierten FRET Paar konnte die Vielfalt der Optionen erneut erweitert werden. Die erzielten Ergebnisse weisen darüber hinaus darauf hin, dass es sich bei

dieser Paarung um eine sehr effiziente FRET Sensorik handelt, die durch eine Optimierung der Chromophorbeladung der jeweiligen Domänen noch gesteigert werden kann. Darüber hinaus bieten die bereits zahlreich durchgeführten Mutagenesestudien ^{12, 50} beider nativen Domänen sowie die Untersuchung der Auswirkung von synthetischen Chromophoren in der LOV Domäne ebenfalls große Möglichkeiten der Optimierung ^{12, 50, 52}.

Vier weitere Mutationen wurden deshalb im Zuge dieser Arbeit in den bakteriellen Blaulichtrezeptor YtvA eingefügt, um das Verständnis der Interaktion zwischen Chromophor und Protein genauer beschreiben zu können, um speziell Mechanismen der thermischen Rückkehr zu erweitern und im Detail zu charakterisieren. So konnten mit F46 und V28 zwei für diesen Mechanismus essentielle Aminosäuren identifiziert und ihre Funktion und Aufgabe charakterisiert werden.

Zur Erweiterung des Verständnisses außergewöhnlicher LOV Domänen ohne kanonische Aminosäuren wie zum Beispiel das adduktbildende Cystein wurde angestrebt, die BatLOV Domäne aus *Halobacterium salinarum* zu charakterisieren. Diese konnte allerdings nur als Apoprotein aufgereinigt werden. Man könnte vermuten, dass in diesem Protein Chaperone die Chromophor-Einbindung unterstützen, die natürlich im *E. coli*-Expressionssystem nicht vorhanden sind. Hier können nächste Schritte zum Beispiel die Co-expression mit einem Flavin-Transporterprotein sein, um die in vivo Beladung der HsBatLOV Domäne zu verbessern ¹⁸⁴. Die LOV Domäne des Bat Proteins aus *Natronomonas pharaonis* hingegen konnte erfolgreich aufgereinigt und spektroskopisch vermessen werden. Die dort gesammelten Ergebnisse erlauben interessante Rückschlüsse auf die blaulichtregulierte Expression des Bacteriorhodopsins (im Fall von *N. pharaonis* des Halorhodopsins) in halophilen Archaeen. Außerdem bietet sich NpBat als hervorragendes Referenzsystem bei der Untersuchung des HsBat Proteins an, in dem das kanonische adduktbildende Cystein in der LOV Domäne durch ein Histidin zu ersetzen wäre. Die weitere Charakterisierung derartiger oder ähnlich gestalteter LOV Domänen, die dennoch blaulichtaktiv sind, ermöglicht es, bei weiteren Suchen in Gendatenbanken bisher noch nicht entdeckte LOV Domänen zu identifizieren und möglicherweise bisher ungeahnte Photorezeptoren für die Forschung und anschließende Anwendung zur Verfügung zu stellen.

7. Literaturverzeichnis

1. solar radiation spectrum, [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Sonne Strahlungsintensitaet.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Sonne_Strahlungsintensitaet.svg)).
2. C. A. Gueymard, *Solar Energy*, 2001, **71**, 325-346.
3. C. A. Gueymard, *Solar Energy*, 2004, **76**, 423-453.
4. A. Jablonski, *Nature*, 1933, **131**, 839-840.
5. Jablonski-Termschema, [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Jablonski Diagramm Deutsch.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5c/Jablonski_Diagramm_Deutsch.png)).
6. H. Scheer, B. Grimm, R. J. Poora and W. Rüdiger, 1991, DOI: 10.1007/1-4020-4516-6, ch. Structure and Occurrence of Chlorophylls, p. 10.
7. B. Knipp, M. Muller, N. Metzler-Nolte, T. S. Balaban, S. E. Braslavsky and K. Schaffner, *Helv. Chim. Acta*, 1998, **81**, 881-888.
8. W. R. Briggs, in *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria*, eds. E. Schäfer and F. Nagy, Springer Netherlands, 2006, DOI: 10.1007/1-4020-3811-9_10, ch. 10, pp. 171-197.
9. W. L. Butler, K. H. Norris, H. W. Siegelman and S. B. Hendricks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1959, **45**, 1703-1708.
10. O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown and H. Kandori, *Chemical Reviews*, 2014, **114**, 126-163.
11. Oesterhelt D and Stockenius W, *Nature-New Biology*, 1971, **233**, 149-152.
12. X.-L. Xu, A. Gutt, J. Mechelke, S. Raffelberg, K. Tang, D. Miao, L. Valle, C. D. Borsarelli, K.-H. Zhao and W. Gärtner, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 1190-1199.
13. Y. Chen, J. Zhang, J. Luo, J.-M. Tu, X.-L. Zeng, J. Xie, M. Zhou, J.-Q. Zhao, H. Scheer and K.-H. Zhao, *FEBS Journal*, 2012, **279**, 40-54.
14. F. Pennacchietti, A. Losi, X. L. Xu, K. H. Zhao, W. Gärtner, C. Viappiani, F. Cella, A. Diaspro and S. Abbruzzetti, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2015, **14**, 229-237.
15. W. Schmidt, *Bioscience*, 1984, **34**, 698-704.
16. F. Ghetti, G. Checcucci and F. Lenci, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 1992, **15**, 185-198.
17. M. Iseki, S. Matsunaga, A. Murakami, K. Ohno, K. Shiga, K. Yoshida, M. Sugai, T. Takahashi, T. Hori and M. Watanabe, *Nature*, 2002, **415**, 1047-1051.
18. A. Baudry, S. Ito, Y. H. Song, A. A. Strait, T. Kiba, S. Lu, R. Henriques, J. L. Pruneda-Paz, N. H. Chua, E. M. Tobin, S. A. Kay and T. Imaizumi, *Plant Cell*, 2010, **22**, 606-622.
19. W. R. Briggs, *J. Biomed. Sci.*, 2007, **14**, 499-504.
20. S. Anderson, V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat and C. Bauer, *Biochemistry*, 2005, **44**, 7998-8005.
21. R. Kort, W. D. Hoff, M. VanWest, A. R. Kroon, S. M. Hoffer, K. H. Vlieg, W. Crielaard, J. J. VanBeeumen and K. J. Hellingwerf, *Embo Journal*, 1996, **15**, 3209-3218.
22. A. O'Hara and G. I. Jenkins, *Plant Cell*, 2012, **24**, 3755-3766.
23. Q. Wu, B. L. Huang, T. A. Niehaus, X. J. Yang, J. Fan and R. Q. Zhang, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, **17**, 10786-10794.
24. M. M. Caldwell, A. H. Teramura and M. Tevini, *Trends in Ecology & Evolution*, 1989, **4**, 363-367.

25. E. L. Fiscus, R. Philbeck, A. B. Britt and F. L. Booker, *Environmental and Experimental Botany*, 1999, **41**, 231-245.
26. J. B. Kerr and C. T. McElroy, *Science*, 1993, **262**, 1032-1034.
27. M. E. Farias, V. Fernandez-Zenoff, R. Flores, O. Ordonez and C. Estevez, *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 2009, **114**, 8.
28. V. H. Albarracin, G. P. Pathak, T. Douki, J. Cadet, C. D. Borsarelli, W. Gärtner and M. E. Farias, *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 2012, **42**, 201-221.
29. D. J. Kliebenstein, J. E. Lim, L. G. Landry and R. L. Last, *Plant Physiology*, 2002, **130**, 234-243.
30. D. Wu, Q. Hu, Z. Yan, W. Chen, C. Y. Yan, X. Huang, J. Zhang, P. Y. Yang, H. T. Deng, J. W. Wang, X. W. Deng and Y. G. Shi, *Nature*, 2012, **484**, 214-U296.
31. J. M. Christie, A. S. Arvai, K. J. Baxter, M. Heilmann, A. J. Pratt, A. O'Hara, S. M. Kelly, M. Hothorn, B. O. Smith, K. Hitomi, G. I. Jenkins and E. D. Getzoff, *Science*, 2012, **335**, 1492-1496.
32. M. Wu, E. Grahn, L. A. Eriksson and A. Strid, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, **51**, 1287-1295.
33. A. A. Voityuk, R. A. Marcus and M. E. Michel-Beyerle, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, **111**, 5219-5224.
34. T. Mathes, M. Heilmann, A. Pandit, J. Y. Zhu, J. Ravensbergen, M. Kloz, Y. A. Fu, B. O. Smith, J. M. Christie, G. I. Jenkins and J. T. M. Kennis, *Journal of the American Chemical Society*, 2015, **137**, 8113-8120.
35. M. Heijde and R. Ulm, *Trends in Plant Science*, 2012, **17**, 230-237.
36. F. Vandebussche, K. Tilbrook, A. C. Fierro, K. Marchal, D. Poelman, D. Van der Straeten and R. Ulm, *Molecular Plant*, 2014, **7**, 1041-1052.
37. J. Herrou and S. Crosson, *Nature Reviews Microbiology*, 2011, **9**, 713-723.
38. F. W. Li, C. J. Rothfels, M. Melkonian, J. C. Villarreal, D. W. Stevenson, S. W. Graham, G. K. S. Wong, S. Mathews and K. M. Pryer, *Frontiers in Plant Science*, 2015, **6**, 11.
39. A. Losi, E. Polverini, B. Quest and W. Gärtner, *Biophysical Journal*, 2002, **82**, 2627-2634.
40. A. Losi, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2004, **3**, 566-574.
41. J. M. Christie, M. Salomon, K. Nozue, M. Wada and W. R. Briggs, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**, 8779-8783.
42. B. L. Taylor and I. B. Zhulin, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999, **63**, 479-+.
43. M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert and W. R. Briggs, *Biochemistry*, 2000, **39**, 9401-9410.
44. R. M. Kowalczyk, E. Schleicher, R. Bittl and S. Weber, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 11393-11399.
45. E. Schleicher, R. M. Kowalczyk, C. W. M. Kay, P. Hegemann, A. Bacher, M. Fischer, R. Bittl, G. Richter and S. Weber, *Journal of the American Chemical Society*, 2004, **126**, 11067-11076.
46. A. Möglich and K. Moffat, *Journal of Molecular Biology*, 2007, **373**, 112-126.
47. S. Crosson and K. Moffat, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**, 2995-3000.
48. A. Losi and W. Gärtner, *Photochemistry and Photobiology*, 2011, **87**, 491-510.
49. G. P. Pathak, A. Losi and W. Gärtner, *Photochemistry and Photobiology*, 2012, **88**, 107-118.

50. S. Raffelberg, M. Mansurova, W. Gärtner and A. Losi, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, **133**, 5346-5356.
51. A. Losi, W. Gärtner, S. Raffelberg, F. C. Zancacchi, P. Bianchini, A. Diaspro, C. Mandalari, S. Abbruzzetti and C. Viappiani, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2013, **12**, 231-235.
52. M. Mansurova, P. Scheercousse, J. Simon, M. Kluth and W. Gärtner, *Chembiochem*, 2011, **12**, 641-646.
53. S. M. Harper, L. C. Neil and K. H. Gardner, *Science*, 2003, **301**, 1541-1544.
54. E. Huala, P. W. Oeller, E. Liscum, I. S. Han, E. Larsen and W. R. Briggs, *Science*, 1997, **278**, 2120-2123.
55. J. M. Christie, P. Reymond, G. K. Powell, P. Bernasconi, A. A. Raibekas, E. Liscum and W. R. Briggs, *Science*, 1998, **282**, 1698-1701.
56. T. Kagawa, T. Sakai, N. Suetsugu, K. Oikawa, S. Ishiguro, T. Kato, S. Tabata, K. Okada and M. Wada, *Science*, 2001, **291**, 2138-2141.
57. 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 and W. R. Briggs, *Plant Physiology*, 2002, **129**, 762-773.
58. J. M. Christie and W. R. Briggs, in *Handbook of Photosensory Receptors*, eds. W. R. Briggs and J. Spudich, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005, DOI: 10.1002/352760510X.ch13, pp. 277-303.
59. T. Kinoshita, M. Doi, N. Suetsugu, T. Kagawa, M. Wada and K. Shimazaki, *Nature*, 2001, **414**, 656-660.
60. J. M. Christie, S. B. Corchnoy, T. E. Swartz, M. Hokenson, I. S. Han, W. R. Briggs and R. A. Bogomolni, *Biochemistry*, 2007, **46**, 9310-9319.
61. H. Y. Cho, T. S. Tseng, E. Kaiserli, S. Sullivan, J. M. Christie and W. R. Briggs, *Plant Physiology*, 2007, **143**, 517-529.
62. J. M. Christie, *Annual Review of Plant Biology*, 2007, **58**, 21-45.
63. J. M. Christie, T. E. Swartz, R. A. Bogomolni and W. R. Briggs, *Plant Journal*, 2002, **32**, 205-219.
64. M. A. Jones, K. A. Feeney, S. M. Kelly and J. M. Christie, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**, 6405-6414.
65. M. Salomon, U. Lempert and W. Rudiger, *Febs Letters*, 2004, **572**, 8-10.
66. M. Nakasako, T. Iwata, D. Matsuoka and S. Tokutomi, *Biochemistry*, 2004, **43**, 14881-14890.
67. D. Matsuoka and S. Tokutomi, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**, 13337-13342.
68. M. Gomelsky and G. Klug, *Trends in Biochemical Sciences*, 2002, **27**, 497-500.
69. A. Losi, *Photochemistry and Photobiology*, 2007, **83**, 1283-1300.
70. J. P. Götze, C. Greco, R. Mitric, V. Bonacic-Koutecky and P. Saalfrank, *Journal of Computational Chemistry*, 2012, **33**, 2233-2242.
71. C. Bonetti, T. Mathes, I. H. M. van Stokkum, K. M. Mullen, M. L. Groot, R. van Grondelle, P. Hegemann and J. T. M. Kennis, *Biophysical Journal*, 2008, **95**, 4790-4802.
72. H. Yuan, S. Anderson, S. Masuda, V. Dragnea, K. Moffat and C. Bauer, *Biochemistry*, 2006, **45**, 12687-12694.
73. A. Jung, J. Reinstein, T. Domratheva, R. L. Shoeman and I. Schlichting, *Journal of Molecular Biology*, 2006, **362**, 717-732.
74. A. Udvarhelyi and T. Domratheva, *Photochemistry and Photobiology*, 2011, **87**, 554-563.
75. A. Udvarhelyi and T. Domratheva, *J. Phys. Chem. B*, 2013, **117**, 2888-2897.

76. M. Gauden, I. H. M. van Stokkum, J. M. Key, D. C. Luhrs, R. Van Grondelle, P. Hegemann and J. T. M. Kennis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**, 10895-10900.
77. M. H. V. Huynh and T. J. Meyer, *Chemical Reviews*, 2007, **107**, 5004-5064.
78. B. J. Kraft, S. Masuda, J. Kikuchi, V. Dragnea, G. Tollin, J. M. Zaleski and C. E. Bauer, *Biochemistry*, 2003, **42**, 6726-6734.
79. W. Laan, M. A. van der Horst, I. H. van Stokkum and K. J. Hellingwerf, *Photochemistry and Photobiology*, 2003, **78**, 290-297.
80. N. Mataga, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, F. Tanaka, N. Kido and M. Kitamura, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 8917-8920.
81. D. P. Zhong and A. H. Zewail, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**, 11867-11872.
82. M. Unno, S. Masuda, T. A. Ono and S. Yamauchi, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**, 5638-5639.
83. T. Mathes, J. Y. Zhu, I. H. M. van Stokkum, M. L. Groot, P. Hegemann and J. T. M. Kennis, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, **3**, 203-208.
84. S. P. Liptonok, A. Lukacs, R. Brust, A. Haigney, A. Gil, M. Towrie, G. M. Greetham, P. J. Tonge and S. R. Meech, *Faraday Discussions*, 2015, **177**, 293-311.
85. S. Masuda, K. Hasegawa, A. Ishii and T. Ono, *Biochemistry*, 2004, **43**, 5304-5313.
86. S. Masuda, K. Hasegawa and T. Ono, *Biochemistry*, 2005, **44**, 1215-1224.
87. K. Sadeghian, M. Bocola and M. Schutz, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 12501-12513.
88. T. Domratcheva, B. L. Grigorenko, I. Schlichting and A. V. Nemukhin, *Biophysical Journal*, 2008, **94**, 3872-3879.
89. H. Kruse, L. Goerigk and S. Grimme, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 10824-10834.
90. M. Ahmad and A. R. Cashmore, *Nature*, 1993, **366**, 162-166.
91. C. T. Lin and T. Todo, *Genome Biology*, 2005, **6**, 9.
92. V. H. Albarracin, J. Simon, G. P. Pathak, L. Valle, T. Douki, J. Cadet, C. D. Borsarelli, M. E. Farias and W. Gärtner, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2014, **13**, 739-750.
93. A. Sancar, *DNA Repair and Replication*, 2004, **69**, 73-100.
94. J. Deisenhofer, *Mutation Research-DNA Repair*, 2000, **460**, 143-149.
95. Y. Geisselbrecht, S. Fruhwirth, C. Schroeder, A. J. Pierik, G. Klug and L. O. Essen, *Embo Reports*, 2012, **13**, 223-229.
96. H. T. Liu, B. Liu, C. X. Zhao, M. Pepper and C. T. Lin, *Trends in Plant Science*, 2011, **16**, 684-691.
97. I. Chaves, R. Pokorny, M. Byrdin, N. Hoang, T. Ritz, K. Brettel, L. O. Essen, G. T. J. van der Horst, A. Batschauer and M. Ahmad, *Annual Review of Plant Biology*, 2011, **62**, 335-364.
98. I. A. Solov'yov, T. Domratcheva, A. R. M. Shahi and K. Schulten, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 18046-18052.
99. R. Brudler, K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer and E. D. Getzoff, *Molecular Cell*, 2003, **11**, 59-67.
100. B. Liu, H. T. Liu, D. P. Zhong and C. T. Lin, *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, **13**, 578-586.
101. K. Malhotra, S. T. Kim, A. Batschauer, L. Dawut and A. Sancar, *Biochemistry*, 1995, **34**, 6892-6899.

102. C. T. Lin, D. E. Robertson, M. Ahmad, A. A. Raibekas, M. S. Jorns, P. L. Dutton and A. R. Cashmore, *Science*, 1995, **269**, 968-970.
103. J. P. Bouly, E. Schleicher, M. Dionisio-Sese, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten, N. Bakrim, S. Meier, A. Batschauer, P. Galland, R. Bittl and M. Ahmad, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**, 9383-9391.
104. A. Kelner, *Journal of Bacteriology*, 1953, **65**, 252-262.
105. A. Novick and L. Szilard, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1949, **35**, 591-600.
106. P. K. Cooper and P. C. Hanawalt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1972, **69**, 1156-&.
107. P. A. Cerutti, *Life Sciences*, 1974, **15**, 1567-1575.
108. P. Kleihues and H. K. Cooper, *Oncology*, 1976, **33**, 86-88.
109. A. S. Fonseca, V. M. A. Campos, L. A. G. Magalhaes and F. Paoli, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2015, **48**, 929-938.
110. A. Kelner, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1949, **35**, 73-79.
111. A. Kelner, *Genetics*, 1953, **38**, 672-673.
112. A. Sancar, *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**, 32153-32157.
113. C. S. Rupert, S. H. Goodgal and R. M. Herriott, *Journal of General Physiology*, 1958, **41**, 451-471.
114. A. Sancar, *Chemical Reviews*, 2003, **103**, 2203-2237.
115. D. M. Popovic, A. Zmiric, S. D. Zaric and E. W. Knapp, *Journal of the American Chemical Society*, 2002, **124**, 3775-3782.
116. S. Weber, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2005, **1707**, 1-23.
117. L. Xu, W. M. Mu, Y. W. Ding, Z. F. Luo, Q. K. Han, F. Y. Bi, Y. Z. Wang and Q. H. Song, *Biochemistry*, 2008, **47**, 8736-8743.
118. J. E. Hearst, *Science*, 1995, **268**, 1858-1859.
119. J. L. Johnson, S. Hammalvarez, G. Payne, G. B. Sancar, K. V. Rajagopalan and A. Sancar, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988, **85**, 2046-2050.
120. H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar and J. Deisenhofer, *Science*, 1995, **268**, 1866-1872.
121. S. H. Song, B. Dick, A. Penzkofer, R. Pokorny, A. Batschauer and L. O. Essen, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2006, **85**, 1-16.
122. Z. Y. Liu, L. J. Wang and D. P. Zhong, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, **17**, 11933-11949.
123. C. W. Chang, L. J. Guo, Y. T. Kao, J. Li, C. Tan, T. P. Li, C. Saxena, Z. Y. Liu, L. J. Wang, A. Sancar and D. P. Zhong, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, **107**, 2914-2919.
124. Z. Y. Liu, X. M. Guo, C. Tan, J. Li, Y. T. Kao, L. J. Wang, A. Sancar and D. P. Zhong, *Journal of the American Chemical Society*, 2012, **134**, 8104-8114.
125. J. Wang, X. L. Du, W. S. Pan, X. J. Wang and W. J. Wu, *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, 2015, **22**, 84-102.
126. J. Li, Z. Y. Liu, C. Tan, X. M. Guo, L. J. Wang, A. Sancar and D. P. Zhong, *Nature*, 2010, **466**, 887-U124.
127. G. B. Sancar and A. Sancar, in *DNA Repair, Pt A*, eds. J. Campbell and P. Modrich, Elsevier Academic Press Inc, San Diego, 2006, vol. 408, pp. 121-156.
128. Oesterhelt D and Stoeckenius W, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1973, **70**, 2853-2857.

129. H. Luecke, B. Schobert, H. T. Richter, J. P. Cartailler and J. K. Lanyi, *Journal of Molecular Biology*, 1999, **291**, 899-911.
130. A. Terakita, *Genome Biology*, 2005, **6**, 213.
131. D. Oesterhelt and B. Hess, *European Journal of Biochemistry*, 1973, **37**, 316-326.
132. R. Mattern, Zyklus von Bacteriorhodopsin mit H-Ionen-Transport bei Belichtung., <https://de.wikipedia.org/wiki/Datei:BacteriorhodopsinCyclus.svg>).
133. Y. A. Ovchinnikov, *Febs Letters*, 1982, **148**, 179-191.
134. A. E. Blaurock and Stoecken.W, *Nature-New Biology*, 1971, **233**, 152-&.
135. Y. Shichida and H. Imai, *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 1998, **54**, 1299-1315.
136. T. H. Ji, M. Grossmann and I. H. Ji, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**, 17299-17302.
137. U. Gether and B. K. Kobilka, *Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**, 17979-17982.
138. M. Betlach, J. Friedman, H. W. Boyer and F. Pfeifer, *Nucleic Acids Res.*, 1984, **12**, 7949-7959.
139. R. F. Shand and M. C. Betlach, *Journal of Bacteriology*, 1991, **173**, 4692-4699.
140. D. Leong, F. Pfeifer, H. Boyer and M. Betlach, *Journal of Bacteriology*, 1988, **170**, 4903-4909.
141. P. DasSarma, R. C. Zamora, J. A. Muller and S. DasSarma, *Journal of Bacteriology*, 2012, **194**, 5530-5537.
142. M. C. Betlach and F. Gropp, *Syst. Appl. Microbiol.*, 1994, **16**, 712-715.
143. N. S. Baliga and S. DasSarma, *Mol. Microbiol.*, 2000, **36**, 1175-1183.
144. A. O. Nina Gunde-Cimerman, Ana Plemenitaš, *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*, 2006.
145. R. F. Shand and M. C. Betlach, *Journal of Bacteriology*, 1994, **176**, 1655-1660.
146. N. S. Baliga, S. P. Kennedy, W. V. Ng, L. Hood and S. DasSarma, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**, 2521-2525.
147. E. F. Yee, R. P. Diensthuber, A. T. Vaidya, P. P. Borbat, C. Engelhard, J. H. Freed, R. Bittl, A. Moglich and B. R. Crane, *Nature communications*, 2015, **6**, 10079.
148. R. M. Clegg, *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**, 103-110.
149. T. Förster, *Annalen der Physik*, 1948, **437**, 55-75.
150. M. A. Van der Horst and K. J. Hellingwerf, *Accounts of Chemical Research*, 2004, **37**, 13-20.
151. S. Akasaka and K. Yamamoto, *Mutation Research*, 1991, **254**, 27-35.
152. U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680-&.
153. S. Adkins and M. Burmeister, *Anal. Biochem.*, 1996, **240**, 17-23.
154. T. Douki, M. Court, S. Sauvaigo, F. Odin and J. Cadet, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, **275**, 11678-11685.
155. S. Mouret, P. Bogdanowicz, M. J. Haure, N. Castex-Rizzi, J. Cadet, A. Favier and T. Douki, *Photochemistry and Photobiology*, 2011, **87**, 109-116.
156. T. Douki and J. Cadet, *Biochemistry*, 2001, **40**, 2495-2501.
157. Y. Tang, Master of Science Master Thesis, Univ. Duisburg-Essen, Univ. Duisburg-Essen, 2007.
158. W. Z. Liu, Y. B. Xie, J. Y. Ma, X. T. Luo, P. Nie, Z. X. Zuo, U. Lahrmann, Q. Zhao, Y. Y. Zheng, Y. Zhao, Y. Xue and J. Ren, *Bioinformatics*, 2015, **31**, 3359-3361.

159. D. Chandrasekhar and B. Van Houten, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2000, **450**, 19-40.
160. O. Kling and H. L. Schlafer, *Z. Elektrochem.*, 1961, **65**, 142-149.
161. I. Oberpichler, A. J. Pierik, J. Wesslowski, R. Pokorny, R. Rosen, M. Vugman, F. Zhang, O. Neubauer, E. Z. Ron, A. Batschauer and T. Lamparter, *Plos One*, 2011, **6**, e26775.
162. X. Y. Chen, J. L. Zaro and W. C. Shen, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 1357-1369.
163. P. Argos, *J. Mol. Biol.*, 1990, **211**, 943-958.
164. A. Losi, E. Ghiraldelli, S. Jansen and W. Gärtner, *Photochemistry and Photobiology*, 2005, **81**, 1145-1152.
165. J. A. Zhang, X. J. Wu, Z. B. Wang, Y. Chen, X. Wang, M. Zhou, H. Scheer and K. H. Zhao, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, **49**, 5456-5458.
166. J. Hughes, *Biochemical Society Transactions*, 2010, **38**, 710-716.
167. J. T. Murphy and J. C. Lagarias, *Curr. Biol.*, 1997, **7**, 870-876.
168. Y. F. Sun, J. G. Xu, K. Tang, D. Miao, W. Gärtner, H. Scheer, K. H. Zhao and M. Zhou, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2014, **13**, 757-763.
169. D. Frishman and P. Argos, *Protein Engineering*, 1996, **9**, 133-142.
170. I. V. Gopich and A. Szabo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**, 7747-7752.
171. X. L. Zeng, K. Tang, N. Zhou, M. Zhou, H. J. M. Hou, H. Scheer, K. H. Zhao and D. Noy, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, **135**, 13479-13487.
172. A. Losi, B. Quest and W. Gärtner, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2003, **2**, 759-766.
173. F. Pennacchietti, S. Abbruzzetti, A. Losi, C. Mandalari, R. Bedotti, C. Viappiani, F. C. Zancchi, A. Diaspro and W. Gärtner, *Plos One*, 2014, **9**, e107489.
174. B. D. Zoltowski, B. Vaccaro and B. R. Crane, *Nature Chemical Biology*, 2009, **5**, 827-834.
175. H. Ishikita, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **47**, 4394-4402.
176. K. Yagi, N. Ohishi, K. Nishimoto, J. D. Choi and P. S. Song, *Biochemistry*, 1980, **19**, 1553-1557.
177. R. Fedorov, I. Schlichting, E. Hartmann, T. Domratcheva, M. Fuhrmann and P. Hegemann, *Biophysical Journal*, 2003, **84**, 2474-2482.
178. J. Kennis, M. Alexandre, J. Arents, R. van Grondelle and K. Hellingwerf, *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, 2007, **146**, S227-S227.
179. A. Yamamoto, T. Iwata, S. Tokutomi and H. Kandori, *Biochemistry*, 2008, **47**, 922-928.
180. S. Adams, Master of Science Master Thesis, Göthe Universität Frankfurt am Main, 2014.
181. U. Sung, M. Sepehri-Rad, H. H. Piao, L. Jin, T. Hughes, L. B. Cohen and B. J. Baker, *Plos One*, 2015, **10**, e0141585.
182. S. Van de Wiel, M. Merckx and S. Van de Graaf, *J. Vis. Exp.*, 2016, DOI: 10.3791/53659, 11.
183. F. L. Zhao, C. Zhang, C. Zhang, Y. Tang and B. C. Ye, *Biosens. Bioelectron.*, 2016, **77**, 901-906.
184. T. Mathes, Dr. rer. nat. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin, 2008.

8. Aminosäuren-Einbuchstabencode

Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

9. Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Julian Simon
Geburtsdatum: 17.12.1986
Geburtsort: Lüdinghausen, Nordrhein-Westfalen

Ausbildung

2012 – 2016 Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion,
formals: Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie,
Mülheim, Deutschland
Promotionsarbeit: Spektroskopische Charakterisierung
von blaulichtinduzierbaren Photorezeptoren – Perzeption,
Nutzbarmachung und Reaktion auf blaues Licht und
UV-Strahlung

2012 Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion
Masterarbeit: Herstellung und Charakterisierung
neuartiger Photolyasen des extremophilen
 γ -Proteobakteriums *Acinetobacter sp. Ver3*

2010 – 2012 Hochschule Niederrhein – University of Applied Sciences,
Master of Science: Angewandte Chemie und
Biotechnologie

2010 Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie
Bachelorarbeit: Einbau von synthetischen Chromophoren
in die LOV-Domäne des Blaulichtrezeptors Ytva und deren
funktionelle Charakterisierung

2007 – 2010 Hochschule Niederrhein – University of Applied Sciences
Bachelor of Science: Chemie und Biotechnologie

2006 – 2007 Zivildienst im St. Ludgerus Haus in Lüdinghausen
im Bereich Altenpflege

1997 – 2006 St. Antonius Gymnasium in Lüdinghausen

1993 – 1997 Paul-Gerhard Grund Schule in Lüdinghausen

Ich versichere, dass ich die vorliegende Abschlussarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen deutlich als solche gekennzeichnet habe. Diese Abschlussarbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland als Prüfungsarbeit vorgelegt.

Krefeld, den 10.03.2016

Julian Simon

10. Anhang

>fig|469.9.peg.1747 [Acinetobacter undefined Ver3] [Deoxyribodipyrimidine photolyase (EC 4.1.99.3)]

MNLIWFRQDLRVRDNTALMEATRHGNTCAVVILSPEQWKLHDDAEIKIDFYLRQLKS
LEIELKQFNIPLMVEIVPQWDDVPARLLTFANKYQVTVIHANIEIGVNELHRDAQVQTL
LESHKVTVEYYHDRTIFPLGSIRNKTHQPYQVFGAYKRACYEILNISVPQPLAVPKVQ
PHELIQRFHTFKIPSIHDFYPDAQVKYQWPVGESFALQMLEKFVDENLEPYKQQRDF
PNIDATSQLSPYLNLGIVSIRQCLAAIFSRNNGNFHLYSDGQQTWLDPELLWREFYQHI
LDFPRLSKYQPFNLNTSNVPWRDAPDELNAWKFGQTGIPIVDAGIRQMLETGWM
HNRVRMIVAMFLSKNLLIDWRKGEQWFMQHLIDGDLAANNGGWQWCASTGTDAV
PYFRIFNPISQSQKFDSSQGNIRKWVPELAHLDAKIIHEPYAKNPNLKLNYPKPIVDLK
MSRQRALAAFKSA

>Ver3PL2 Acinetobacter sp. Ver3

MRFGLILGDQLHHQLATLKTLDRTDVILMAEVVEEATYVTHHPQKIALIFSAMRHFA
KELKAEGWRVRYHDFQSGSPIRSLDFVQAQQQQFPVTELVMTQCGEYRLQQQIE
QQWSQHLQLPIQCLNDERFFCSPEQFRHWASRYQTLRMEYFYREMRKQTGYLMQ
GQQPLGQQWNYDSANRKAWSGSPPLTAQLHFERDQIDMDVLELVEREFSSHHPGS
LDDFRWATTRSNALRALEHFITYSLPHFGDYQDAMVQGADTLFHSLLSPYLNCGLL
PREVCDAAEAVYHAGHAPLNAVEGFIRQILGWREYVRGIYWLYMPEYASRNALQHS
TPLPQFYWTGHTRMNCMVECFRNTFQHAYAHHIQRLMVTGNFALLTGIDSQQISE
WYLAVYADAYEWVELPNTLGMVMHADGGLMASKPYGASGNYIHKMSDYCKHCSY
NVKTRTEPDSCPFNSLYWYFMIRHEATFRTHPRMGMIYRQLDKLDRPQIISHAQQ
LSRIDEL

>YLOV-1393GAF3_C62S (Restriktionsstellen: NdeI – BamHI)

CATATGGCTAGTTTTCAATCATTGGGATACCAGGACAGCTGGAAGTCATCAAA
AAAGCACTTGATCACGTGCGAGTCGGTGTGGTAATTACAGATCCCGCACTTGAA
GATAATCCTATTGTCTACGTAAATCAAGGCTTTGTTCAAATGACCGGCTACGAGA
CCGAGGAAATTTTAGGAAAGAAC**AGT**CGCTTCTTACAGGGGAAACACACAGATC
CTGCAGAAGTGGACAACATCAGAACCGCTTTACAAAATAAAGAACCGGTCACCG
TTCAGATCCAAAACACTACAAAAAGACGGAACGATGTTCTGGAATGAATTAATAT
TGATCCAATGGAAATAGAGGATAAAACGTATTTTGTTCGGAATTCAGAATGATATC
ACCAAGCAAAAAGAATATGAAAAGCTTCTCGAGGATTCCCTCACGGAAATTACT
GCACTTGGCGGAGGGAGCACCGGGAGCACGACCGGGAGCGGGGAGTTCGGA
GGCATGCTGCAAATATCTTTTCGTGCGACCTCGGATGAAGTGCCTCACCTGCTG
AGCTGCGACCGTGTTCTGGTTTACCGCTTTAACCCGGACTGGAGTGGTGAATTT
ATCCATGAATCCGTTGCGCAAATGTGGGAACCGCTGAAAGATCTGCAGAACAAT
TTCCCGCTGTGGCAAGACACCTACCTGCAGGAAAACGAAGGCGGTTCGTTATCG
CAATCATGAAAGTCTGGCAGTCGGTGTGTTGAAACCGCTGGCTTTACGGATTG
CCACCTGGACAACCTGCGTCGCTTTGAAATTCGTGCCTTCCTGACGGTGCCGGT
TTTCGTTCGGTGAACAGCTGTGGGGTCTGCTGGGTGCATACCAAACCGGTGCAC
CGCGTCACTGGCAGGCGCGCAAATCCATCTGCTGCACCAGATTGCCAATCAA
CTGGGTGTGGCCGTTTATCAGGCACAACCTGCTGGCTCGCTTTCAGATCTAA**GGA**
TCC

>YLOV-1393GAF3_C62S

HMASFQSFQIPGQLEVIKKALDHVRVGVVITDPALEDNPVYVNQGFVQMTGYETEE
ILGKNSRFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKPEVTVQIQNYKKDGMTFWNELNIDPMEI
EDKTYFVGIQNDITKQKEYEKLLDSLTEITALGGGSTGSTTGSGEFFGMLQNIFRAT
SDEVRHLLSCDRVLVYRFNPDWSGEFIHESVAQMWEPLKDLQNNFPLWQDTYLQE
NEGGRYRNHESLAVGDVETAGFTDCHLDNLRFEIRAFLLVFPVFGQLWGLLGAY
QNGAPRHWQAREIHLLHQIANQLGVAVYQAQLLARFQI

>HsBatLOV_gene

ATGGTTGAAAGCGAACGCCGTCTGAAGGAGCAAGCGCTGGACGAAGCGCCGAT
TGGCATTACCATTAGCGACGCGACCGACCCGGAGGAGCCGATCATTTACATCAA
CGACAGCTTCGAGGATATTACCGGTTATAGCCCGGACGAAGTGGTTGGCGCGA
ACCACCGTTTCCTGCAGGGTCCGAAGACCAACGAGGATCGTGTGGCGGAATTT
TGGACCGCGATCACCGAGGACCACGATACCCAGGTGGTTCTGCGTAACTACCG
TCGTGACGGCAGCCTGTTTTGGAACCAAGTGGATATCAGCCCGATTTATGACGA
AGATGGTACCGTTAGCCACTATGTGGGTTTTCAAATGGATGTGAGCGAACGTAT
GGCGGCGCAACAAGAACTGTAA

>HsBatLOV

MVESERRLKEQALDEAPIGITISDATDPEEPIIYINDSFEDITGYSPDEVVGANHRFLQ
GPKTNEDRVAEFWTAITEDHDTQVVLARNYRRDGSLEFWNQVDISPIYDEDGTVSHYV
GFQMDVSERMAAQQEL

>NpBatLOV_gene

ATGGCGGCGGACCTGCAACTGAGCAAGCGTACCCTGGACGAAGCGCCGGTGG
GCGTGGTGGTGGCGGACCCGCACGAAGAAGACGAGCCGCTGGTGTACATCAA
CGAGGCGTTCGAACGTCTGACCGGTTATGAGCGTCACGAAGTTCTGGGCCGTA
ACTGCCGTTTTCTGCAGGGCGAGGATACCAACCCGGAAGCGGTGGCGACCATT
CGTCAAGCGGTTGACGATCGTCGTCCGGTGAGCGTTGAGCTGCTGAACTACCG
TAAGGACGGCGAACCGTTCTGGAACCAGCTGAACATCGCGCCGATTCGTGACG
ATGACGGTCGTGTGACCCACCTGGTTGGCTTTCAAACCGATATCACCGAGCGTA
AAGAGGTTGAACTGCGTGCGCAACGTCAGGCGGAACAACCTGCGTGCGGACTAA

>NpBatLOV

MAADLQLSKRTLDEAPVGVVADPHEEDEPLVYINEAFERLTGYERHEVLGRNCRF
LQGEDTNPEAVATIRQAVDDRRPVSVELLNYRKDGEPFWNQLNIAPIRDDDGRVTH
LVGFQTDITERKEVELRAQRQAEQLRAD