

**Phylogenie, Evolution und strukturelle Basis der
lichtabhängigen Protochlorophyllid Reduktion in
aerob anoxygenen phototrophen Bakterien**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Judith Schneidewind

aus Moers

Heide, September 2018

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
im Forschungszentrum Jülich

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

Berichtersteller:

1. Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
2. Frau Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 05. November 2018

Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.

(Werner von Siemens)

ZUSAMMENFASSUNG

Die Photosynthese ist einer der bedeutsamsten biochemischen Prozesse auf der Erde und ist aus evolutionärer Sicht als entscheidend für die Entwicklung des Lebens in seiner heutigen Form anzusehen. Für die Photosynthese sind Pigmente wie z. B. (Bakterio-)Chlorophylle essentiell, wobei lichtabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen (LPORs) Schlüsselenzyme für deren Synthese darstellen. LPORs benötigen Licht und den Kofaktor Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) für die Reduktion der (Bakterio-)Chlorophyll Vorstufe Protochlorophyllid (Pchlid). Die Entstehungsgeschichte von LPORs ist eng mit der Entwicklung der Photosynthese verbunden. Derzeit wird angenommen, dass LPORs vor ca. 2,5 Milliarden Jahren in Cyanobakterien als Anpassung an den steigenden Sauerstoffgehalt der Atmosphäre entstanden sind. Diese Hypothese beruht hauptsächlich auf dem Verbreitungsmuster von LPORs und deren Fehlen in anoxygenen phototrophen Mikroorganismen. Abweichend von dieser Hypothese konnten Kaschner *et al.* [1] 2014 eine funktionelle LPOR in einem aerob anoxygenen phototrophen Bakterium (AAPB) identifizieren. Zur Zeit dieses Fundes waren keine weiteren LPORs in AAPBs bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten in verschiedenen Datenbanken 27 neue putative LPORs in AAPBs identifiziert werden. Zwölf dieser putativen LPORs wurden in dieser Arbeit heterolog produziert, wenn möglich gereinigt und auf ihre Funktion hin untersucht. Auf diese Weise konnte für neun dieser zwölf putativen Enzyme *in vitro* eindeutige LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Sieben gut zu reinigende AAPB LPOR-Enzyme wurden anschließend, im Vergleich mit einer pflanzlichen LPOR aus *Arabidopsis thaliana* (*AtLPORC*) und der cyanobakteriellen LPOR aus *Thermosynechococcus elongatus* (*TeLPOR*), eingehender biochemisch charakterisiert. Hierbei wurden Temperatur- sowie pH-Aktivitätsoptima, Temperaturstabilitäten, Substratpräferenz und die Dissoziation des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes analysiert. Hinsichtlich dieser Parameter konnten, mit einigen wenigen Ausnahmen, deutliche Unterschiede zwischen den AAPB LPORs und den cyanobakteriellen und pflanzlichen Enzymen nachgewiesen werden. Untersuchungen mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (englisch: *small-angle X-ray scattering*, SAXS) zeigten zudem eine global konservierte Struktur zwischen AAPB LPORs und der cyanobakteriellen *TeLPOR*. In einem, basierend auf einem LPOR-Sequenzalignment rekonstruierten, phylogenetischen Stammbaum bilden die AAPB LPORs eine monophyletische Gruppe, was, zusammen mit den zu den pflanzlichen und cyanobakteriellen LPORs unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften, die Vermutung nahe legt, dass es sich bei AAPB LPORs um eine evolutionär und strukturell konservierte Enzymfamilie handelt. Aus evolutionärer Sicht kann hierbei die Anwesenheit von funktionellen LPORs in AAPBs nicht mittels eines einzigen horizontalen Gentransfers (HGT) von einem Cyanobakterium, wie in der Arbeit von Kaschner *et al.* [1] postuliert, erklärt werden. Vielmehr sind zur Erklärung der erhaltenen Stammbaumtopologie mehrere HGTs

notwendig, wobei bei Betrachtung eines datierten Stammbaums, welcher die Evolution der entsprechenden Bakteriengattungen widerspiegelt, eine unabhängige konvergente Evolution von LPORs in AAPBs zumindest gleich wahrscheinlich erscheint.

Obwohl LPORs bereits seit mehr als 50 Jahren untersucht werden, konnte bisher keine LPOR-Kristallstruktur gelöst werden, was weiterführende Untersuchungen zur Bildung des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes sowie des Reaktionsmechanismus erschwert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, verschiedene LPOR-Enzyme zu kristallisieren, wobei für einige Enzyme zwar Kristalle erhalten werden konnten, die Kristallqualität jedoch bisher eine Strukturlösung in hoher Auflösung unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Struktur und Dynamik des cyanobakteriellen *Te*LPOR-Enzyms in Lösung mittels SAXS und inkohärenter quasielastischer Neutronenstreuung (*incoherent quasielastic neutron scattering*, QENS) untersucht. Hierbei konnte erstmals ein niedrigauflösender Einblick in die Struktur des monomeren LPOR-Apoproteins gewonnen werden, sowie mittels Homologiemodellierung ein physikalisch sinnvolles Modell des Volllängenproteins vorgeschlagen werden. Basierend auf SAXS und analytischen Ultrazentrifugations-Untersuchungen konnte zudem eindeutig nachgewiesen werden, dass die Bildung des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplexes zu einer Dimerisierung des Enzyms führt. Mittels QENS konnte außerdem erstmals gezeigt werden, dass dynamische Prozesse im ps- bis ns-Bereich eine wichtige Rolle bei der Bildung des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes spielen, sowie dass die „Aktivierung“ des ternären Komplexes mittels Licht zu einer Änderung der Proteindynamik führt, was einen Zusammenhang zwischen Proteindynamik und Katalyse nahelegt.

SUMMARY

Photosynthesis is one of the most important biochemical processes on earth. From an evolutionary perspective, the development of photosynthesis was crucial for the development of life in its present form. Pigments like (bacterio-)chlorophylls are essential for photosynthesis, with light dependent protochlorophyllide oxidoreductases (LPORs) representing key enzymes for their synthesis. LPORs need light and the cofactor nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) for the reduction of the (bacterio-)chlorophyll precursor protochlorophyllide (Pchl_{id}). The evolutionary origin of LPORs is hereby closely linked to the development of photosynthesis. Currently it is assumed that LPORs arose approximately 2.5 billion years ago as adaption to the rise of the atmospheric oxygen level. This hypothesis is mainly based on the distribution pattern of LPORs and its absence in anoxygenic phototrophic microorganisms. In contrast to this hypothesis, Kaschner *et al.* [1] recently identified a functional LPOR in an aerobic anoxygenic phototrophic bacterium (AAPB). At this time no further putative LPORs could be found in AAPBs. Within the scope of this thesis 27 new putative LPORs from AAPBs were identified in different databases. Twelve of them were heterologously produced, purified if possible and tested for their functionality. Hereby, using an *in vitro* assay, LPOR activity could clearly be proven for nine of the enzymes. Subsequently, seven AAPB LPOR enzymes, that could easily be purified, were biochemically characterized in comparison to the plant LPOR of *Arabidopsis thaliana* (AtLPORC) and the cyanobacterial LPOR of *Thermosynechococcus elongatus* (TeLPOR). Here, temperature and pH activity optima, temperature stabilities, substrate preferences and the dissociation of the ternary LPOR/NADPH/Pchl_{id} complex were analyzed. With regard to these parameters distinct differences between AAPB LPORs and the cyanobacterial and plant enzymes could be proven with a few exceptions. Furthermore, small-angle X-ray scattering (SAXS) studies revealed a conserved global structure of AAPB LPORs and the cyanobacterial TeLPOR. In a phylogenetic tree that was reconstructed from an LPOR sequence alignment, AAPB LPORs form a monophyletic group. Together with their different biochemical properties this observation warrants the assumption that AAPB LPORs represent a novel evolutionary and structurally conserved group of LPOR enzymes. In evolutionary terms the presence of functional LPORs in AAPBs cannot be explained by a single horizontal gene transfer (HGT) like Kaschner *et al.* [1] postulated. Instead several HGTs are necessary to explain the observed tree topology, whereby the consideration of a dated tree which reflects the evolution of the LPOR-containing bacterial genera, independent convergent evolution of LPORs in AAPBs appears to be at least equally probable.

Although LPORs have been known and investigated for more than 50 years, no crystal structure of an LPOR enzyme has been solved to date, which makes further investigations into the formation of the ternary LPOR/NADPH/Pchl_{id} complex and the reaction mechanism difficult. Therefore, as part of this

thesis, crystallization trials were carried out for different LPOR enzymes. While, for some enzymes crystals could be obtained, the present crystal quality was insufficient to enable the determination of a high-resolution LPOR structure. Hence, the structure and dynamics of the cyanobacterial *Te*LPOR enzyme was investigated in solution by the use of SAXS and *incoherent quasielastic neutron scattering* (QENS). Those studies enabled a first low-resolution glimpse into the structural architecture of the monomeric LPOR apo-protein. Furthermore, a physically meaningful model of the full-length protein could be suggested by homology modelling. Based on SAXS and analytical ultracentrifugation studies it could clearly be proven that the formation of the ternary LPOR/NADPH/Pchl_a holo-protein complex results in dimerization of the enzyme. Using QENS, dynamic processes in ps to ns range could for the first time be shown to play an important role for the formation of the LPOR/NADPH/Pchl_a ternary complex. Furthermore it could be shown that “activation” of the ternary complex by light leads to changes in the protein dynamics, providing a link between protein dynamics, ternary complex formation and catalysis.

PUBLIKATIONEN

Publikationen in Fachjournalen

J. Schneidewind, F. Krause, M. Bocola, A. M. Stadler, M. D. Davari, U. Schwaneberg, K.-E. Jaeger, U. Krauss. **Low-resolution solution structure of a light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase.** (eingereicht)

J. Schneidewind, L. Peters, O. Chernomor, A. Loeschke, E. Knieps-Grünhagen, E. von Lieres, R. J. Kutta, A. von Haeseler, K.-E. Jaeger, T. Drepper, U. Krauss. **Structurally conserved yet functionally distinct light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in aerobic anoxygenic phototrophs.** (in Bearbeitung)

A. M. Stadler, J. Schneidewind, M. Zamponi, E. Knieps-Grünhagen, S. Gholami, U. Schwaneberg, I. Rivalta, M. Garavelli, M. D. Davari, K.-E. Jaeger, U. Krauss. **Ternary complex formation and photoactivation of a photoenzyme results in altered protein dynamics.** (eingereicht)

Posterpräsentationen

J. Schneidewind, L. Peters, M. Kaschner, O. Chernomor, A. von Haeseler, K.-E. Jaeger, T. Drepper, U. Krauss (2016). **Light-dependent protochlorophyllide oxidoreductases in anoxygenic phototrophic bacteria.** Gordon Research Conference, Chemistry & Biology of Tetrapyrroles. Newport, Rhode Island, (USA)

L. Peters, J. Schneidewind, A. Loeschcke, K.-E. Jaeger, U. Krauss, T. Drepper (2016). **Demonstration of *in vivo* activities of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductases isolated from anoxygenic phototrophic bacteria.** Gordon Research Conference, Chemistry & Biology of Tetrapyrroles. Newport, Rhode Island, (USA)

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich für die Möglichkeit meine Promotion im Institut für Molekulare Enzymtechnologie durchführen zu können. Darüber hinaus bin ich dankbar für die überaus guten Bedingungen und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für ihre freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Krauss für seine unglaublich gute Betreuung während meiner gesamten Zeit im Forschungszentrum Jülich. Für seine motivierenden Worte, immer dann wenn ich sie brauchte. Und natürlich auch für seine Zeit, die er für die Auswertung der SAXS-Daten und einiges mehr geopfert hat.

Allen Kooperationspartnern möchte ich für Ihre Hilfe in allen fachlichen Belangen danken. Dr. Andreas Stadler (Jülicher Zentrum für Forschung mit Neutronen (JCNS) und *Institute of Complex Systems* (ICS), Forschungszentrum Jülich) und Dr. Michaela Zamponi (Jülicher Zentrum für Forschung mit Neutronen (JCNS) am Heinz Maier-Leibnitz Zentrum (MLZ), Forschungszentrum Jülich, Garching) danke ich für die Durchführung und Auswertung der QENS-Messungen. Darüber hinaus danke ich Dr. Andreas Stadler für die Durchführung der SAXS-Messungen und seine Hilfe über das Experimentelle hinaus. Dr. Roger Jan Kutta (Lehrstuhl für Physikalische Chemie, Universität Regensburg) danke ich für die Möglichkeit der Durchführung und Unterstützung bei der TA-Messung. Darüber hinaus danke ich ihm für seine freundschaftliche Art während meines kurzen Aufenthalts in Regensburg. Ebenfalls bedanke ich mich für die Hilfe bei der Auswertung der K_d -Wert-Bestimmung. Dr. Klaus Bollig (Shimadzu Europe GmbH) danke ich für die Möglichkeit eine LC-MS-Analyse in der Shimadzu Laborwelt in Duisburg durchzuführen. Dr. Marco Bocola (Protedes, Sankt Augustin) gilt mein Dank für die Erzeugung der verschiedenen LPOR-Homologiemodelle. Dr. Frank Krause (Nanolytics Gesellschaft für Kolloidanalytik mbH und Nanolytics Instruments GmbH) danke ich für die Durchführung der AUZ-Analyse. Dr. Samira Gholami und Prof. Dr. Marco Garavelli (beide Dipartimento di Chimica Industriale, Università degli Studi di Bologna, Italien) und Dr. Mehdi D. Davari (Lehrstuhl für Biotechnologie, RWTH Aachen) danke ich für die Durchführung und Analyse der LPOR-Apo- und -Holoprotein MD-Simulationen. PD Dr. Renu Batra-Safferling und PD Dr. Joachim Granzin (beide Institute of Complex Systems (ICS-6: Strukturbiochemie), Forschungszentrum Jülich) möchte ich meinen Dank für die Unterstützung und guten Ratschläge bezüglich meiner Kristallisationsversuche aussprechen.

Dr. Derren Heyes (University of Manchester, UK) danke ich für die Bereitstellung des *R. capsulatus* ZY5 Stamm.

Mein besonderer Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), die meine Arbeit finanziell möglich gemacht hat.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie möchte ich für die gute Atmosphäre danken.

Der AG Molekulare Biophotonik danke ich für die familiäre Atmosphäre. Die verschiedenen privaten Momente waren ein Highlight. Besonders möchte ich Dipl.-Ing. Esther Knieps-Grünhagen danken. Sie hat mich immer unterstützt und auch bei der Massenproduktion und -vernichtung von Protein nicht aufgegeben.

Meiner Familie und meinen Freunden die mir immer zur Seite standen gilt ebenfalls ein großer Dank.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, Malvin Schneidewind. Ohne seine Hilfe bei der Erstellung des Shell-Skriptes würde ich wohl noch sehr lange auswerten. Darüber hinaus danke ich ihm für seine immer währende Unterstützung in allen Bereichen.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY	III
PUBLIKATIONEN	V
DANKSAGUNG	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XIV
1 EINLEITUNG	1
1.1 PHOTOSYNTHESE	1
1.2 CHLOROPHYLLBIOSYNTHESE	4
1.3 PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDUKTASEN	6
1.3.1 STRUKTUR UND FUNKTION LICHTUNABHÄNGIGER PORs (DPORs)	6
1.3.2 STRUKTUR UND FUNKTION LICHTABHÄNGIGER PORs (LPORs)	8
1.3.2.1 LPOR-STRUKTUR	8
1.3.2.2 PHOTOPHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN VON PCHLID UND LPOR-REAKTIONSMCHANISMUS	10
1.3.2.3 PHOTOAKTIVIERUNG VON LPORs UND DIE ROLLE STRUKTURELLER DYNAMIK	11
1.3.3 EVOLUTION VON LPOR UND DPOR	12
1.3.4 VERBREITUNG VON LPOR UND DPOR	13
1.4 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 BAKTERIENSTÄMME	16
2.2 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN LICHTABHÄNGIGEN PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDUKTASEN	16
2.3 PLASMIDE	17
2.4 OLIGONUKLEOTIDE	19
2.5 ENZYME	20
2.6 NÄHRMEDIEN	20
2.7 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	21
2.7.1 KULTIVIERUNG VON FLÜSSIGKULTUREN	22
2.7.1.1 KULTIVIERUNG VON <i>E. COLI</i> -FLÜSSIGKULTUREN	22
2.7.1.2 EXPRESSION VERSCHIEDENER LICHTABHÄNGIGER PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDUKTASEN IN <i>E. COLI</i> BL21(DE3)	22

2.7.1.2.1	TESTEXPRESSION	22
2.7.1.2.2	EXPRESSION ZUR PRODUKTION VON LPORS	24
2.7.1.3	KULTIVIERUNG VON <i>R. CAPSULATUS</i> -FLÜSSIGKULTUREN ZUR PRODUKTION VON PROTOCHLOROPHYLLID	24
2.8	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA (MODIFIZIERT NACH [96])	25
2.8.1	HERSTELLUNG CHEMISCH TRANSFORMATIONSKOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN	25
2.8.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> -ZELLEN	25
2.9	NUKLEINSÄUREISOLIERUNG UND -REINIGUNG	26
2.9.1	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA MITTELS STANDARD-MINI-PRÄPARATION	26
2.9.2	ELUTION VON DNA AUS AGAROSEGELEN/PCR-PRODUKTREINIGUNG	26
2.10	IN VITRO-REKOMBINATION VON DNA	27
2.10.1	HYDROLYTISCHE SPALTUNG VON DNA MITTELS RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	27
2.10.2	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	27
2.11	POLYMERASEKETTENREAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	28
2.11.1	AUSTAUSCH VON BASEN MITTELS ORTSGERICHTETER MUTAGENESE	29
2.12	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE [92]	30
2.13	DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	31
2.14	DNA-SEQUENZIERUNG	32
2.14.1	KONSTRUKTION DER LPOR-EXPRESSIONSVEKTOREN	32
2.14.1.1	ERZUGUNG C-TERMINAL VERKÜRZTER TELPOR-KONSTRUKTE	36
2.15	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	36
2.15.1	ZELLAUFSCHLUSS	36
2.15.2	PROTEINREINIGUNG MITTELS IMMOBILISierter METALLIONEN-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (IMAC)	37
2.15.3	PUFFERWECHSEL UND ENTSALZUNG VON PROTEINLÖSUNGEN MITTELS GELFILTRATION	38
2.15.4	PROTEINREINIGUNG MITTELS GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE	38
2.15.5	KONZENTRIERUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	39
2.15.6	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINLÖSUNGEN	39
2.15.6.1	KOLORIMETRISCHER BRADFORD-ASSAY	39
2.15.6.2	BERECHNUNG DER PROTEINKONZENTRATION ANHAND DER ABSORPTION BEI 280 NM	40
2.15.6.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON HOLOPROTEINLÖSUNGEN	41
2.15.7	DENATURIERENDE SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) [103]	43
2.15.8	KOLLOIDAL COOMASSIE-BRILLIANT-BLAU-FÄRBUNG VON SDS-GELEN [104]	44
2.16	PRODUKTION, EXTRAKTION UND REINIGUNG VON PROTOCHLOROPHYLLID	44
2.16.1	PRODUKTION VON PROTOCHLOROPHYLLID IN <i>R. CAPSULATUS</i> -FLÜSSIGKULTUREN	44
2.16.2	PROTOCHLOROPHYLLID-EXTRAKTION	45
2.16.3	PROTOCHLOROPHYLLID-REINIGUNG MITTELS FESTPHASENEXTRAKTION	46
2.16.4	TRENNUNG UND IDENTIFIZIERUNG VON MONOVINYL UND DIVINYL-PROTOCHLOROPHYLLID	48
2.16.4.1	ANALYTISCHE TRENNUNG UND IDENTIFIZIERUNG MITTELS LC-MS	48
2.16.4.2	PRÄPARATIVE TRENNUNG VON MV- UND DV-PCHLID	50
2.16.5	(MV/DV-) PCHLID-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	51
2.17	AKTIVITÄTSMESSUNG DER PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDUKTASEN	52
2.17.1	QUALITATIVE AKTIVITÄTSMESSUNG VON LPORS UNTER VERWENDUNG VON ROHEXTRAKTEN	55
2.17.2	ERMITTLUNG DES PH-AKTIVITÄTSOPTIMUMS	55
2.17.3	ERMITTLUNG DES TEMPERATUR-AKTIVITÄTSOPTIMUMS	56
2.17.4	ENZYMKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR UNTERSUCHUNG DER MV/DV-PCHLID-SUBSTRATSPEZIFITÄT	56
2.17.5	BERECHNUNG DER ENZYMAKTIVITÄT	57
2.17.6	BERECHNUNG DER WECHSELZAHL (K_{CAT})	58
2.18	BESTIMMUNG DER TEMPERATURSTABILITÄT	58
2.18.1	TEMPERATURABHÄNGIGE ENTFALTUNG – BESTIMMUNG DER SCHMELZTEMPERATUR	59

2.19	ERMITTLUNG DER DISSOZIATIONSKONSTANTE (K_D)	60
2.20	STRUKTURANALYSEN	60
2.20.1	KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG (<i>SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING, SAXS</i>)	60
2.20.2	KRISTALLOGRAPHIE	62
2.20.2.1	AUFNAHME VON RÖNTGEN-DIFFRAKTIONSBILDERN	65
2.21	ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION	65
2.22	UNTERSUCHUNG DER LPOR-PROTEINDYNAMIK MITTELS INKOHÄRENTER QUASIELASTISCHER NEUTRONENSTREUUNG (QENS)	66
2.23	ERSTE ZEITAUFGELÖSTE SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER LPOR	68
2.23.1	FUNKTIONSWEISE DES PUMP SUPERKONTINUUM-PROBE SPEKTROMETERS	69
2.24	BIOINFORMATISCHE ANALYSEN	69
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	70
3.1	IDENTIFIZIERUNG NEUER LPORS IN AEROB ANOXYGENEN PHOTOTROPHEN ORGANISMEN	70
3.1.1	DIE SUCHE NACH NEUEN LPORS IN AEROB ANOXYGENEN PHOTOTROPHEN ORGANISMEN ERGAB EINE VIELZAHL PUTATIVER LPORS	70
3.1.2	ALLE NEU IDENTIFIZIERTEN LPORS STAMMEN AUS AEROB ANOXYGENEN PHOTOTROPHEN BAKTERIEN UND BILDEN EINE MONOPHYLETISCHE GRUPPE	78
3.1.3	DIE MEISTEN AAPB LPORS KONNTEN MITTELS IMAC UND GRÖßENAUSSCHLUSS-CHROMATOGRAPHIE GEREINIGT WERDEN	81
3.1.4	DER GROßTEIL DER NEU IDENTIFIZIERTEN AAPB LPORS ZEIGT EINE LICHTABHÄNGIGE AKTIVITÄT	83
3.1.5	AAPB LPORS BESITZEN EINEN ZU CYANOBAKTERIELLEN LPORS KONSERVIERTEN REAKTIONSMECHANISMUS	90
3.2	VERGLEICHENDE CHARAKTERISIERUNG DER VERSCHIEDENEN LPORS	94
3.2.1	AAPB LPORS BESITZEN HÖHERE K_D -WERTE FÜR DIE DISSOZIATION DES TERNÄREN KOMPLEXES ALS CYANOBAKTERIELLE UND PFLANZLICHE LPORS	94
3.2.2	UNTERSUCHUNGEN ZU DEN PROTOCHLOROPHYLLID-FORMEN (MV- UND DV-PCHLID)	97
3.2.2.1	MITTELS MASSENSPEKTROMETRIE KONNTEN MV- UND DV-PCHLID EINDEUTIG IDENTIFIZIERT WERDEN	98
3.2.2.2	MV- UND DV-PCHLID KONNTEN ERFOLGREICH PRÄPARATIV GETRENNT WERDEN	101
3.2.2.3	AAPB LPORS ZEIGEN EINE VON DEN CYANOBAKTERIELLEN UND PFLANZLICHEN LPORS ABWEICHENDE SUBSTRATPRÄFERENZ	102
3.2.3	AAPB LPORS BESITZEN IM VERGLEICH ZU DER PFLANZLICHEN UND CYANOBAKTERIELLEN LPOR EINEN BREITEN PH-AKTIVITÄTSOPTIMUMSBEREICH	107
3.2.4	TEMPERATUR-AKTIVITÄTSOPTIMUM UND STABILITÄTEN	110
3.2.4.1	AAPB LPORS BESITZEN IM VERGLEICH ZU DER PFLANZLICHEN UND CYANOBAKTERIELLEN LPOR EINEN BREITEREN TEMPERATUR-AKTIVITÄTSOPTIMUMSBEREICH	110
3.2.4.2	DAS TEMPERATURABHÄNGIGE ENTFALTUNGSVERHALTEN VON LPORS ERSCHEINT UNABHÄNGIG VON IHREM PHYLOGENETISCHEN URSPRUNG	113
3.2.4.3	DIE TEMPERATURSTABILITÄT VON LPORS IST UNABHÄNGIG VON IHREM PHYLOGENETISCHEN URSPRUNG	116
3.2.5	EIN VERGLEICH DER ERMITTELTEN PARAMETER ZEIGT, DASS AAPB LPORS EINE VON DEN CYANOBAKTERIELLEN UND PFLANZLICHEN LPORS SEPARIERTE, EVOLUTIONÄR KONSERVIERTE GRUPPE BILDEN	118
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR STRUKTUR UND DYNAMIK VON LPORS	121
3.3.1	DIE KRISTALLISATION EINER LPOR WAR ZWAR MÖGLICH, LIEFERTE JEDOCH KEINE ZUR STRUKTURLÖSUNG GEEIGNETEN DIFFRAKTIONS DATEN	121
3.3.2	STRUKTURANALYSEN MITTELS KLEINWINKEL-RÖNTGENSTREUUNG	123
3.3.2.1	TELPOR-APO- UND -HOLOPROTEIN ZEIGEN UNTERSCHIEDE IN IHRER OLIGOMERISIERUNG	123
3.3.2.2	AAPB UND PROTOTYPISCHE CYANOBAKTERIELLE LPORS BESITZEN EINE KONSERVIERTE STRUKTUR	137

3.3.3	<i>T</i> ELPOR-APOPROTEIN, DER TERNÄRE HOLOPROTEIN-KOMPLEX UND DAS PHOTOAKTIVIERTE HOLOPROTEIN BESITZEN EINE UNTERSCHIEDLICHE DYNAMIK	139
4	AUSBLICK	153
5	LITERATURVERZEICHNIS	155
6	ANHANG	169
6.1	DNA- UND AMINOSÄURESEQUENZEN	169
6.1.1	DNA- UND AMINOSÄURESEQUENZEN ALLER VERWENDETEN LPORS	169
6.1.2	AMINOSÄURESEQUENZEN DER IDENTIFIZIERTEN RUBISCO-UNTEREINHEIT	191
6.2	SHELL-SKRIPT ZUR AUSWERTUNG DER LPOR-AKTIVITÄT	192
6.3	LPOR-REINIGUNG	200
6.4	LPOR-AKTIVITÄT	202
6.5	BESTIMMUNG DER DISSOZIATIONSKONSTANTE K_D	205
6.6	SUBSTRATSPEZIFITÄT	209
6.7	MESSUNG DER TEMPERATURSTABILITÄT UND DES SCHMELZPUNKTES	210
6.8	KRISTALLISATIONSSCREENS	211
6.9	SAXS	215
7	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	216

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1:	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME UND DEREN GENOTYPEN.....	16
TABELLE 2:	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN PUTATIVEN UND ALS REFERENZ DIENENDEN LICHTABHÄNGIGEN PROTOCHLOROPHYLLID-OXIDOREDUKTASEN (LPORS).....	16
TABELLE 3:	ÜBERSICHT ALLER VERWENDETEN PLASMIDE UND DEREN GENOTYPEN.	17
TABELLE 4:	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE.	19
TABELLE 5:	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN ENZYME.	20
TABELLE 6:	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN ANTIBIOTIKA.	21
TABELLE 7:	ÜBERSICHT DER VERWENDETEN EXPRESSIONSBEDINGUNGEN FÜR DIE UNTERSCHIEDLICHEN LPOR-PROTEINE.....	23
TABELLE 8:	KOMPONENTEN EINES TYPISCHEN PCR-ANSATZES UND DEREN KONZENTRATION.	28
TABELLE 9:	PCR-PROGRAMM.....	29
TABELLE 10:	SEQUENZEN DER ZUR SEQUENZIERUNG VERWENDETEN STANDARDPRIMER DER FIRMA SEQLAB.	32
TABELLE 11:	EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN UND MOLEKULARGEWICHTE DER VERWENDETEN LPORS.	40
TABELLE 12:	ÜBERSICHT DER ERMITTELTEN EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN FÜR NADPH.	42
TABELLE 13:	GRADIENT ZUR TRENNUNG VON MV- UND DV-PCHLID.....	50
TABELLE 14:	PROTEINKONZENTRATIONEN FÜR SAXS-MESSUNGEN.	61
TABELLE 15:	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN KRISTALLISATIONSSCREENS.....	64
TABELLE 16:	ÜBERSICHT DER IDENTIFIZIERTEN PUTATIVEN LPORS.....	72
TABELLE 17:	SEQUENZÄHNLICHKEIT DER LPORS.	77
TABELLE 18:	ÜBERSICHT ÜBER DAS VORKOMMEN VERSCHIEDENER AAPB MARKER-ENZYME.....	79
TABELLE 19:	ÜBERSICHT DER ERZIELTEN AUSBEUTE DER VERSCHIEDENEN PUTATIVEN LPORS.	82
TABELLE 20:	ÜBERSICHT DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄTEN ALLER GEREINIGTER LPORS.....	86
TABELLE 21:	ÜBERSICHT ÜBER DIE <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> AKTIVITÄT.	89
TABELLE 22:	ÜBERSICHT DER DISSOZIATIONSKONSTANTEN (K_D) FÜR PCHLID.	96
TABELLE 23:	ÜBERSICHT ÜBER DIE ENZYMKINETISCHEN PARAMETER IN ABHÄNGIGKEIT VOM SUBSTRAT UNTER VERWENDUNG DER „MICHAELIS-MENTEN“-FUNKTION.	105
TABELLE 24:	ÜBERSICHT ÜBER DAS ABSOLUTE PH-AKTIVITÄTSMAXIMUM SOWIE DEN PH- AKTIVITÄTSMAXIMUMSBEREICH BEI 80 % AKTIVITÄT.....	109
TABELLE 25:	ÜBERSICHT ÜBER TEMPERATUR-AKTIVITÄTSMAXIMA SOWIE DEN 80 % TEMPERATUR- AKTIVITÄTSMAXIMUMSBEREICH.....	113
TABELLE 26:	ÜBERSICHT ÜBER DIE SCHMELZTEMPERATUREN ALLER LPORS.....	115
TABELLE 27:	ÜBERSICHT DER HALBWERTSZEITEN BEI 35 °C AUS DER TEMPERATURSTABILITÄTSMESSUNG. .	117
TABELLE 28:	DURCH SAXS BESTIMMTE MOLEKULARGEWICHTE, STREUMASSERADIEN UND DIMERANTEIL DES <i>TEL</i> POR-APO- UND -HOLOPROTEINS.	130
TABELLE 29:	<i>TEL</i> POR-HOLOPROTEIN-DIMERMODELLIERUNG – BESTE CLUSPRO-MODELLE.....	135
TABELLE 30:	DURCH SAXS BESTIMMTE MOLEKULARGEWICHTE UND STREUMASSERADIEN DER UNTERSUCHTEN LPORS.	138
TABELLE 31:	MITTELS QENS ERMITTELTE DYNAMISCHE PARAMETER DER VERSCHIEDENEN <i>TEL</i> POR- PROTEINPROBEN.	147
TABELLE 32:	ÜBERSICHT ÜBER DIE ENZYMKINETISCHEN PARAMETER IN ABHÄNGIGKEIT VOM SUBSTRAT UNTER VERWENDUNG DER „SUBSTRAT INHIBITION“-FUNKTION.....	209
TABELLE 33:	EIGENER KRISTALLISATIONSSCREEN 1.....	211
TABELLE 34:	EIGENER KRISTALLISATIONSSCREEN 2.....	212
TABELLE 35:	EIGENER KRISTALLISATIONSSCREEN 3.....	213
TABELLE 36:	EIGENER KRISTALLISATIONSSCREEN 4.....	214

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1:	ÜBERSICHT ÜBER DIE PHOTOSYNTHESE AM BEISPIEL DER OXYGENEN PHOTOSYNTHESE.....	2
ABBILDUNG 2:	CHLOROPHYLLBIOSYNTHESE.....	5
ABBILDUNG 3:	STRUKTUR DES DPOR-PROTEINKOMPLEXES BESTEHEND AUS DEN UNTEREINHEITEN BCHB, BCHN UND BCHL AUS <i>PROCHLOROCOCCUS MARINUS</i> (PDB-ID: 2YNM).....	7
ABBILDUNG 4:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ROSSMANN-FALTUNGSMOTIV.....	8
ABBILDUNG 5:	HOMOLOGIEMODELL DER LPOR AUS <i>SYNECHOCYSTIS</i> SP. (SSLPOR).....	9
ABBILDUNG 6:	PHOTOPHYSIKALISCHES/CHEMISCHES MODEL.....	11
ABBILDUNG 7:	HYPOTHESE ZUR EVOLUTIONÄREN ENTWICKLUNG VON LPOR UND DPOR.....	13
ABBILDUNG 8:	SCHEMA ZUR QUIKCHANGE®-PCR.....	30
ABBILDUNG 9:	KLONIERUNGSSCHEMA.....	33
ABBILDUNG 10:	KLONIERUNGSSCHEMA ZUR ERZEUGUNG DER C-TERMINAL <i>GETAGTEN</i> LPORS.....	35
ABBILDUNG 11:	BESTIMMUNG DER MOLAREN EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN (E) VON NADPH BEI 260, 280 UND 340 NM.....	42
ABBILDUNG 12:	PU-WÜRFEL MIT GEBUNDENEM PCHLID.....	45
ABBILDUNG 13:	PCHLID-REINIGUNG ÜBER FESTPHASENEXTRAKTION.....	47
ABBILDUNG 14:	PCHLID-GEWINNUNG UND TROCKNUNG.....	48
ABBILDUNG 15:	STRUKTURFORMEL VON MV- UND DV-PCHLID.....	48
ABBILDUNG 16:	PCHLID-ABSORPTIONSSPEKTRUM.....	51
ABBILDUNG 17:	UMSETZUNG VON PCHLID ZU CHLID DURCH DIE LPOR.....	52
ABBILDUNG 18:	SCHEMA ZUR MESSUNG UND AUSWERTUNG DER AKTIVITÄT.....	53
ABBILDUNG 19:	AMINOSÄURESEQUENZALIGNMENT.....	76
ABBILDUNG 20:	PHYLOGENETISCHER STAMMBAUM ZUR ILLUSTRATION DER VERBREITUNG VON LPORS.....	80
ABBILDUNG 21:	EXEMPLARISCHE AKTIVITÄTSMESSUNG AM BEISPIEL DER <i>ELLPOR</i>	84
ABBILDUNG 22:	AKTIVITÄT ALLER GEREINIGTEN LPORS IM VERGLEICH.....	85
ABBILDUNG 23:	ROHEXTRAKT-AKTIVITÄT DER LPORS IM VERGLEICH.....	87
ABBILDUNG 24:	SDS-PAGE-ANALYSEN DER UNLÖSLICHEN (U) UND LÖSLICHEN (L) FRAKTION DER IM ROHEXTRAKT AKTIVEN LPOR-PROTEINE.....	88
ABBILDUNG 25:	ABSORPTIONSSPEKTREN VOR UND NACH DER TRANSIENTEN ABSORPTIONSMESSUNG.....	91
ABBILDUNG 26:	ZEITAUFGELÖSTE UV/VIS-ABSORPTIONSSPEKTREN DES FREIEN PCHLIDS.....	92
ABBILDUNG 27:	ZEITAUFGELÖSTE UV/VIS-ABSORPTIONSSPEKTREN DES GEBUNDENEN PCHLIDS.....	92
ABBILDUNG 28:	K_b -WERT BESTIMMUNG AM BEISPIEL DER <i>DSPOR</i>	96
ABBILDUNG 29:	STRUKTURFORMELN VON MONOVINYL- UND DIVINYL-PROTOCHLOROPHYLLID.....	98
ABBILDUNG 30:	LC-MS-ANALYSE DER BEIDEN PCHLID-FORMEN.....	100
ABBILDUNG 31:	PRÄPARATIVE MV- UND DV-PCHLID-TRENNUNG.....	101
ABBILDUNG 32:	ENZYMKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM UMSATZ VON MV- UND DV-PCHLID – ANGEPASST AN EINE „SUBSTRAT-INHIBITION“-FUNKTION.....	103
ABBILDUNG 33:	SUBSTRATSPEZIFISCHE AKTIVITÄTSMESSUNGEN – ANGEPASST AN DIE „MICHAELIS-MENTEN“-FUNKTION.....	104
ABBILDUNG 34:	ÜBERSICHT ALLER ENZYMKINETISCHEN PARAMETER.....	106
ABBILDUNG 35:	AKTIVITÄTSMESSUNG BEI VERSCHIEDENEN PH-WERTEN.....	109
ABBILDUNG 36:	TESTMESSUNG ZUR TATSÄCHLICHEN ASSAY-TEMPERATUR.....	111
ABBILDUNG 37:	AKTIVITÄTSMESSUNGEN BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN.....	112
ABBILDUNG 38:	SCHMELZKURVE DER <i>DSPOR</i>	114
ABBILDUNG 39:	TEMPERATURSTABILITÄT DER <i>DSPOR</i>	117
ABBILDUNG 40:	ÜBERSICHT DER BIOCHEMISCHEN CHARAKTERISTIKA IM DIREKTEN VERGLEICH ZUM EVOLUTIONÄREN URSPRUNG.....	120
ABBILDUNG 41:	FOTO EINES MEHRSCICHTIGEN <i>ELLPOR</i> -KRISTALLS UNTER ZUGABE VON NADPH UND TCEP.....	122
ABBILDUNG 42:	RÖNTGENDIFFRAKTIONSBIlder DER <i>ELLPOR</i>	123
ABBILDUNG 43:	AKTIVITÄTSMESSUNG DER <i>TLPOR</i> -HOLOPROTEINPROBE.....	124
ABBILDUNG 44:	ABSORPTIONSSPEKTREN UND SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENTENVERTEILUNG DER AUZ-UNTERSUCHUNG VON <i>TLPOR</i> -APO- UND -HOLOPROTEIN.....	125

ABBILDUNG 45: BEISPIELHAFTE SEDIMENTATIONSGESCHWINDIGKEITSANALYSE.	126
ABBILDUNG 46: SPEKTRALER VERLAUF WÄHREND DER AUZ-MESSUNG DES TELPOR-AOPROTEINS.	127
ABBILDUNG 47: SPEKTRALER VERLAUF WÄHREND DER AUZ-MESSUNG DES TELPOR-HOLOPROTEINS.	127
ABBILDUNG 48: SAXS-DATEN DES APO- UND HOLOPROTEINS DER TELPOR.	129
ABBILDUNG 49: C-TERMINAL VERLÄNGERTE TELPOR-HOMOLOGIEMODELLE UND DEREN CRY SOL-BASIERTE BEWERTUNG.	131
ABBILDUNG 50: SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)-ANALYSE DES TELPOR-AOPROTEINS.	132
ABBILDUNG 51: TELPOR-HOLOPROTEIN-DIMERMODELLIERUNG.	134
ABBILDUNG 52: SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)-ANALYSE DES TELPOR-HOLOPROTEINS.	136
ABBILDUNG 53: SMALL-ANGLE X-RAY SCATTERING (SAXS)-ANALYSE ZWEIER PROTEOBAKTERIELLER UND EINER CYANOBAKTERIELLEN LPOR.	138
ABBILDUNG 54: MESSUNGEN ZUR TELPOR-AKTIVITÄT, -PHOTOAKTIVIERUNG UND -STABILITÄT.	143
ABBILDUNG 55: ANPASSUNG DER BELICHTUNGSZEIT ZUR PHOTOAKTIVIERUNG DER REHYDRIERTEN TELPOR- HOLOPROTEINPROBE.	144
ABBILDUNG 56: TELPOR-APO- UND -HOLOPROTEIN-DATEN DER QENS-MESSUNG.	146
ABBILDUNG 57: TEMPERATURSTABILITÄTSMESSUNG DES TELPOR-APO- UND -HOLOPROTEINS IM VERGLEICH.	148
ABBILDUNG 58: ZEITLICHE CA-RMSD ENTWICKLUNG.	150
ABBILDUNG 59: MD-SIMULATION DES TELPOR-APO- UND -HOLOPROTEINS.	151
ABBILDUNG 60: CHROMATOGRAMME DER IMAC UND GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE.	200
ABBILDUNG 61: SDS-PAGE-ANALYSEN ALLER LPOR-REINIGUNGEN.	201
ABBILDUNG 62: AKTIVITÄT ALLER GEREINIGTEN LPORS MIT ALLEN KONTROLLEN UND SPEKTREN ALS AKTIVITÄTSNACHWEIS.	202
ABBILDUNG 63: ROHEXTRAKT-AKTIVITÄT ALLER LPORS MIT ALLEN KONTROLLEN UND SPEKTREN ALS AKTIVITÄTSNACHWEIS.	203
ABBILDUNG 64: SDS-PAGE-ANALYSEN DER UNLÖSLICHEN (U) UND LÖSLICHEN (L) FRAKTIONEN DER PROBEN FÜR DIE ROHEXTRAKT-AKTIVITÄTSMESSUNGEN.	204
ABBILDUNG 65: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER TELPOR.	205
ABBILDUNG 66: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER ATLPORC.	205
ABBILDUNG 67: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER ELLPOR.	206
ABBILDUNG 68: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER EBLPOR.	206
ABBILDUNG 69: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER LFLPOR.	207
ABBILDUNG 70: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER PDLPOR.	207
ABBILDUNG 71: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER SPLPOR.	208
ABBILDUNG 72: K_D -WERT-BESTIMMUNG DER GPLPOR.	208
ABBILDUNG 73: SCHMELZKURVEN ZUR BESTIMMUNG DER SCHMELZTEMPERATUR (T_M).	210
ABBILDUNG 74: MESSUNG DER THERMOSTABILITÄT BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN.	210
ABBILDUNG 75: TELPOR-HOLOPROTEIN-DIMERMODELLIERUNG.	215

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aminosäuren wurden nach dem gebräuchlichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt.

AAPB	aerob anoxygene phototrophe Bakterien	L	Liter
ADP	Adenosindiphosphat	LB	<i>lysogeny broth</i>
Amp ^R	Ampicilin-Resistenz	LfLPOR	LPOR aus <i>Loktanella fryxellensis</i>
AnLPOR	LPOR aus <i>Acidiphilium angustum</i>	LPOR	lichtabhängige
AtLPORC	LPORC aus <i>Arabidopsis thaliana</i>		Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
ATP	Adenosintriphosphat	LvLPOR	LPOR aus <i>Loktanella vestfoldensis</i>
bp	Basenpaare	M	Molar
BSA	Rinderserumalbumin	MBP	Maltose-Bindeprotein
C	Celsius	ml	Milliliter
CCD	<i>charged coupled device</i>	MSD	mittlere quadratische
Chlid	Chlorophyllid		Abweichung (<i>mean square displacement</i>)
Cps	<i>counts per second</i>		
Da	Dalton	MTP	Mikrotiterplatte
DHFR	Dihydrofolatreduktase	MV	Monovinyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure	MWA	mehrfachwellenlängen
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat		Absorptionsoptik (englisch: <i>multiwavelength absorbance optics</i>)
DPOR	lichtunabhängige (englisch: <i>dark operative</i>) Protochlorophyllid-Oxidoreduktase	μ	mikro
DsLPOR	LPOR aus <i>Dinoroseobacter shibae</i>	n	nano
DTT	Dithiothreitol	NADPH	Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat
DV	Divinyl		
EbLPOR	LPOR aus <i>Erythrobacteraceae</i> bacterium	NTA	Nitrilotriessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	OD	optische Dichte
EiLPOR	LPOR aus <i>Erythrobacter litoralis</i>	p	pico
eT	Elektronentransfer	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
eV	Elektronenvolt	Pchlid	Protochlorophyllid
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	PCR	Polymerasekettenreaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
g	Gramm	PDB-ID	<i>protein data bank identifier</i>
g	mittlere Erdbeschleunigung	PdLPOR	LPOR aus <i>Porphyrobacter dokdonensis</i>
GpLPOR	LPOR aus <i>Gemmatimonas phototrophica</i>	PEG	Polyethylenglycol
HGT	Horizontaler Gentransfer	POR	Protochlorophyllid-Oxidoreduktase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>	pT	Protonentransfer
H ⁺ T	Hydridtransfer	Rg	Streumassradius
HvLPORA	LPORA aus <i>Hordeum vulgare</i>	RMSD	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root mean square displacement</i>)
IMAC	immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie		
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	RMSF	<i>root mean square fluctuation</i>
k	Kilo	RT	Raumtemperatur
K	Kelvin	s	Sekunde
Km ^R	Kanamycin-Resistenz	SalLPOR	LPOR aus <i>Sandarakinorhabdus</i> sp.

SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (englisch: <i>small-angle X-ray scattering</i>)	TA	Transiente Absorption
SDR	kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen (englisch: <i>short-chain dehydrogenases/reductases</i>)	TAE	Tris-Acetat-EDTA
SDS	Natriumdodecylsulfat	TB	<i>terrific broth</i>
SehGCLPOR	LPOR aus <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
SgLPOR	LPOR aus <i>Sulfitobacter guttiformis</i>	TeLPOR	LPOR aus <i>Thermosynechococcus elongatus</i>
S/LPOR	LPOR aus <i>Sandarakinorhabdus limnophila</i>	T _m	Schmelztemperatur
SpLPOR	LPOR aus <i>Spingomonadales</i> sp.	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
SsLPOR	LPOR aus <i>Synechocystis</i> sp.	T _{stab}	Temperaturstabilität
SV	Säulenvolumen	U	units
		UpM	Umdrehungen pro Minute
		UV	Ultraviolett
		V	Volt
		v/v	Volumen pro Volumen
		W	Watt
		w/v	Gewicht pro Volumen

1 EINLEITUNG

1.1 Photosynthese

Alle Lebewesen benötigen Energie in Form hochenergetischer organischer Substanzen wie Zucker, für z. B. Wachstum, Bewegung und Fortpflanzung. Grundsätzlich werden heterotrophe Organismen, welche zur Deckung ihres Energiebedarfs auf die Aufnahme organischer Stoffe angewiesen sind, und autotrophe Organismen, welche diese selbst aus anorganischen Substanzen aufbauen können, unterschieden. Dies kann z. B. bei chemoautotrophen oder chemolithotrophen Bakterien durch die Oxidation anorganischer Stoffe wie Schwefel und Eisen erfolgen [2, 3]. Photoautotrophe Organismen nutzen die Energie des Sonnenlichts mittels des Prozesses der Photosynthese zur Gewinnung chemischer Energie, wobei letztendlich Zucker, welcher den Organismen als Nahrung dient, hergestellt wird. Dieser Zucker wird während der Zellatmung in Energie umgewandelt. Während der Photosynthese wird zunächst Licht von Pigmenten, wie z. B. Chlorophylle, welche nicht kovalent gebunden in Lichtsammelkomplexen vorliegen, absorbiert. Dabei absorbieren die unterschiedlichen Pigmente Licht verschiedener Wellenlänge [4-6]. Im Reaktionszentrum des Antennenkomplexes fungiert Chlorophyll als Elektronendonator und überträgt sein angeregtes Elektron auf einen Elektronenakzeptor. Die Energie des angeregten Elektrons wird über eine Elektronentransportkette in elektrische und osmotische Energie umgewandelt. Das energiearme Elektron wird über weitere Elektronenüberträger zum Chlorophyllradikal zurücktransportiert [7]. Dabei wird aus Kohlenstoffdioxid und einem Reduktans eine energiereiche organische Verbindung hergestellt [7]. Diese Umwandlung von Sonnenlicht in biochemisch nutzbare Energieformen bildet die Grundlage des Lebens auf der Erde [8, 9]. Hierbei wird ein Jahresumsatz von 300 bis 500 Milliarden Tonnen Kohlenstoffdioxid angenommen [10]. Die Photosynthese ist daher einer der bedeutsamsten biochemischen Prozesse auf der Erde und ist aus evolutionärer Sicht als entscheidend für die Entwicklung des Lebens in seiner heutigen Form anzusehen.

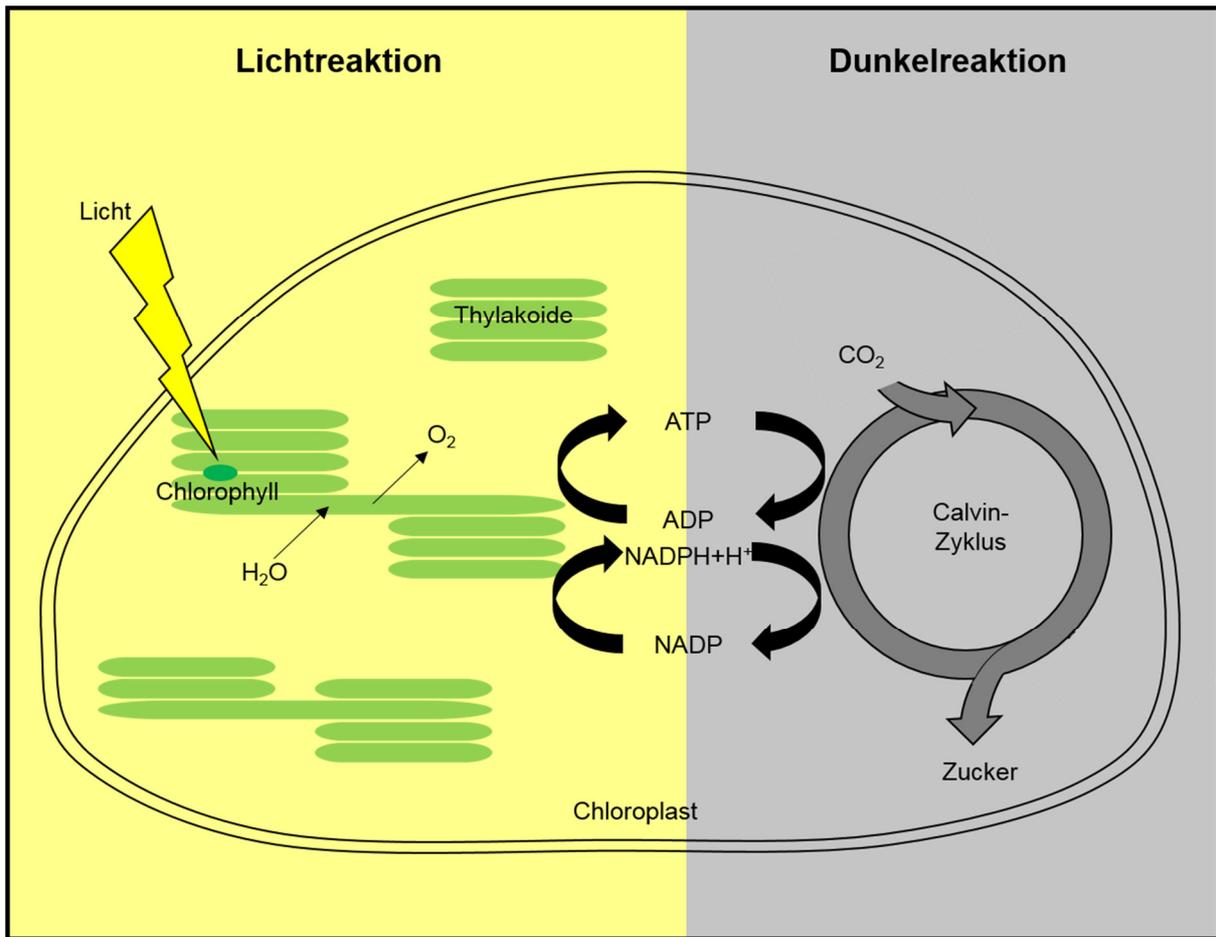
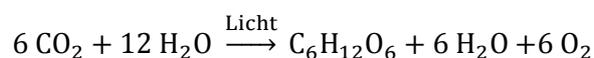


Abbildung 1: Übersicht über die Photosynthese am Beispiel der oxygenen Photosynthese. Die oxygenen Photosynthese findet in zwei Reaktionsfolgen statt: Die Licht- und Dunkelreaktion. Während der Lichtreaktion wird Licht von Chlorophyll absorbiert. Hierdurch wird über das Photosystem (PS) II, PSI und dem (nicht-)zyklischen Elektronentransport Energie in Form von ATP und NADPH+H⁺ generiert. Des Weiteren wird durch die Spaltung von Wasser molekularer Sauerstoff freigesetzt. In der Dunkelreaktion wird die erzeugte Energie verwendet, um Kohlenstoffdioxid zu fixieren und Kohlenhydrate aufzubauen (Calvin-Zyklus).

Pflanzen, Algen und einige Bakterien, wie einige Untergruppen der Proteobakterien (z. B. Purpurbakterien), Chlorobien, Chloroflexi, Acidobakterien und Bakterien aus dem Phylum Firmicutes die *Heliobacteriaceae*, betreiben Photosynthese [11].

Hierbei unterscheidet man zwei Arten der Photosynthese, die oxygenen und anoxygenen Photosynthese. Bei der oxygenen Photosynthese wird ausschließlich Wasser als Reduktans verwendet, wobei molekularer Sauerstoff und Glukose produziert werden [7, 12].

Gleichung der oxygenen Photosynthese [7]:

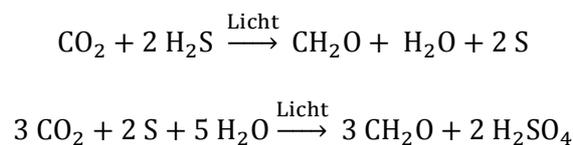


Die oxygenen Photosynthese wird von Pflanzen und Cyanobakterien betrieben und findet in zwei Reaktionsfolgen statt. Diese werden als Licht- und Dunkelreaktion bezeichnet (vereinfacht dargestellt in Abbildung 1). Die Lichtreaktion ist, wie der Name sagt, lichtabhängig. Während der Lichtreaktion

wird molekularer Sauerstoff durch die Spaltung von Wasser freigesetzt. Im Photosystem II (PSII) wird Licht von Chlorophyll absorbiert, wodurch ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben wird. Dieses Elektron wird über eine Elektronentransportkette zum Photosystem I (PSI) transportiert (nicht-zyklischer Elektronentransport). Im PSI wird durch ein weiteres Chlorophyll-Molekül Licht absorbiert, was wiederum dazu führt, dass ein Elektron des Chlorophylls auf ein höheres Energieniveau gehoben und dieses Elektron auf ein oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP⁺) übertragen wird. Durch die Übertragung von zwei Elektronen auf das NADP⁺ kommt es zur Reduktion, sodass ein energiereiches NADPH+H⁺ entsteht. Während der Elektronentransportkette kommt es zur Ausbildung eines Protonengradienten, welcher von der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthase zur Bildung von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) (Photophosphorylierung) genutzt wird. Das angeregte Elektron im PSI wird über mehrere Molekülkomplexe zum Chlorophyll zurückgeführt (zyklischer Elektronentransport). So werden in der Lichtreaktion die beiden für die Dunkelreaktion erforderlichen Energieträger NADPH+H⁺ und ATP produziert. Die Dunkelreaktion ist nicht direkt lichtabhängig. Da sie jedoch auf die Energieträger aus der Lichtreaktion angewiesen ist, ist die Dunkelreaktion bedingt lichtabhängig. In der Dunkelreaktion wird die chemische Energie aus der Lichtreaktion genutzt, um Kohlenstoffdioxid zu fixieren und Kohlenhydrate aufzubauen (Calvin-Zyklus).

Bei der anoxygenen Photosynthese können im Gegensatz zur oxygenen Photosynthese verschiedene anorganische Stoffe wie z. B. Schwefelwasserstoff als Reduktans verwendet werden [3, 7].

Gleichung der anoxygenen Photosynthese am Beispiel von Schwefelwasserstoff als Reduktans [7]:



Anoxygene Photosynthese betreibende Bakterien besitzen nur ein Photosystem. Dieses ist entweder äquivalent zum PSI oder PSII der oxygenen Photosynthese. Im Gegensatz zur oxygenen Photosynthese sind im Reaktionszentrum Bakteriochlorophylle anstelle von Chlorophyllen enthalten. Wie bei der oxygenen Synthese werden diese Bakteriochlorophylle durch Lichtabsorption angeregt und geben ein Elektron ab. Dieses Elektron wird entweder zyklisch (Produktion von ATP) oder nicht-zyklisch (Produktion von NADPH) transportiert. Im Falle des zyklischen Elektronentransports wird das Elektron zurück zum Bakteriochlorophyll transportiert. Während des Transports wird ein Protonenkonzentrationsunterschied aufgebaut, dessen Energie zur Bildung von ATP verwendet wird. Das fehlende NADPH wird aus externen Elektronendonatoren (anorganische Stoffe, z. B. Schwefelwasserstoff) gebildet. Findet ein nicht-zyklischer Elektronentransport statt, so muss die Elektronenlücke im Bakteriochlorophyll durch externe Elektronendonatoren gefüllt werden. In beiden Photosystemen sind sowohl der zyklische als auch der nicht-zyklische Elektronentransfer möglich. Die

anoxygene Photosynthese wird hierbei als die evolutionär ältere Form der Photosynthese erachtet [3]. Es wird angenommen, dass aufgrund der Entwicklung der oxygenen Photosynthese das Sauerstoffniveau in der Erdatmosphäre durch die Produktion des elementaren Sauerstoffs, welcher ein Abfallprodukt in der oxygenen Photosynthese darstellt, anstieg [13, 14]. Durch den Anstieg des Sauerstoffniveaus war eine Anpassung der zu dieser Zeit lebenden Organismen notwendig und so die Entwicklung „höher“ entwickelten Lebens möglich [15]. Durch die Produktion von Sauerstoff besitzt die oxygene Photosynthese eine enorme Bedeutung für das Leben auf der Erde. Das Pigment Chlorophyll spielt dabei, wie zuvor beschrieben, eine zentrale Rolle.

1.2 Chlorophyllbiosynthese

Für die Photosynthese sind Pigmente wie z. B. die (Bakterio-) Chlorophylle essentiell. Sie sind nicht nur für die Lichtabsorption und somit für die Energiegewinnung, sondern auch als Akzeptor eben dieser Energie im Reaktionszentrum verantwortlich. Chlorophylle liegen im Reaktionszentrum immer als Paar vor. Im Falle der Pflanzen handelt es sich dabei um Chlorophyll a. Die Chlorophyllbiosynthese erfolgt über eine Vielzahl enzymatischer Schritte (Abbildung 2). Die ersten drei Schritte des Biosynthesewegs werden durch Glutamyl-tRNA-Synthetasen und Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferasen katalysiert, wobei aus Glutaminsäure 5-Aminolevulinsäure-Hydrochlorid (ALA) hergestellt und für die Folgereaktionen bereitgestellt wird. Zwei ALA-Moleküle werden daraufhin durch ALA-Dehydratasen zu Porphobilinogen verknüpft und aus vier dieser Porphobilinogen-Moleküle wiederum ein Molekül Hydroxymethylbilan gebildet. Die Zyklisierung des Hydroxymethylbilans erfolgt durch Uroporphyrinogen III Synthetasen. Das so entstandene Uroporphyrinogen III wird decarboxyliert und das dadurch gebildete Koproporphyrinogen III durch Dehydrogenierung zu Protoporphyrinogen IX und später zu Protoporphyrin IX umgewandelt. Dieses stellt das letzte gemeinsame Intermediat des Häm- und Chlorophyllbiosyntheseweges dar. Nach der enzymatischen Einlagerung eines Magnesiumions in Protoporphyrin IX folgen die Veresterung der Propionsäurekette und ein Ringschluss. Das so gebildete Divinyl (DV)-Protochlorophyllid (Pchlid) wird durch Reduktion der Vinylgruppe an Ring B zu Monovinyl (MV)-Pchlid reduziert. Die darauf folgende Reduktion der C₁₇=C₁₈-Doppelbindung in Ring D (Abbildung 2, roter Kasten) wird durch die Pchlid-Oxidoreduktase (POR) katalysiert, sodass Chlorophyllid (Chlid) entsteht. Diese Reaktion kann durch lichtabhängige und lichtunabhängige PORs (englisch: *light-dependent protochlorophyllide oxidoreductases* (LPORs), *dark-operative protochlorophyllide oxidoreductases* (DPORs)) katalysiert werden (Kapitel 1.3). Im letzten Schritt der Chlorophyllbiosynthese wird Chlid durch eine Veresterung mit Phytyldiphosphat zu (Bakterio-) Chlorophyll [16]. Bakteriochlorophylle und Chlorophylle besitzen am Ring A verschiedene Substituenten. Bakteriochlorophyll a besitzt im Vergleich mit Chlorophyll a z. B. eine Acetylgruppe anstelle der Vinylgruppe.

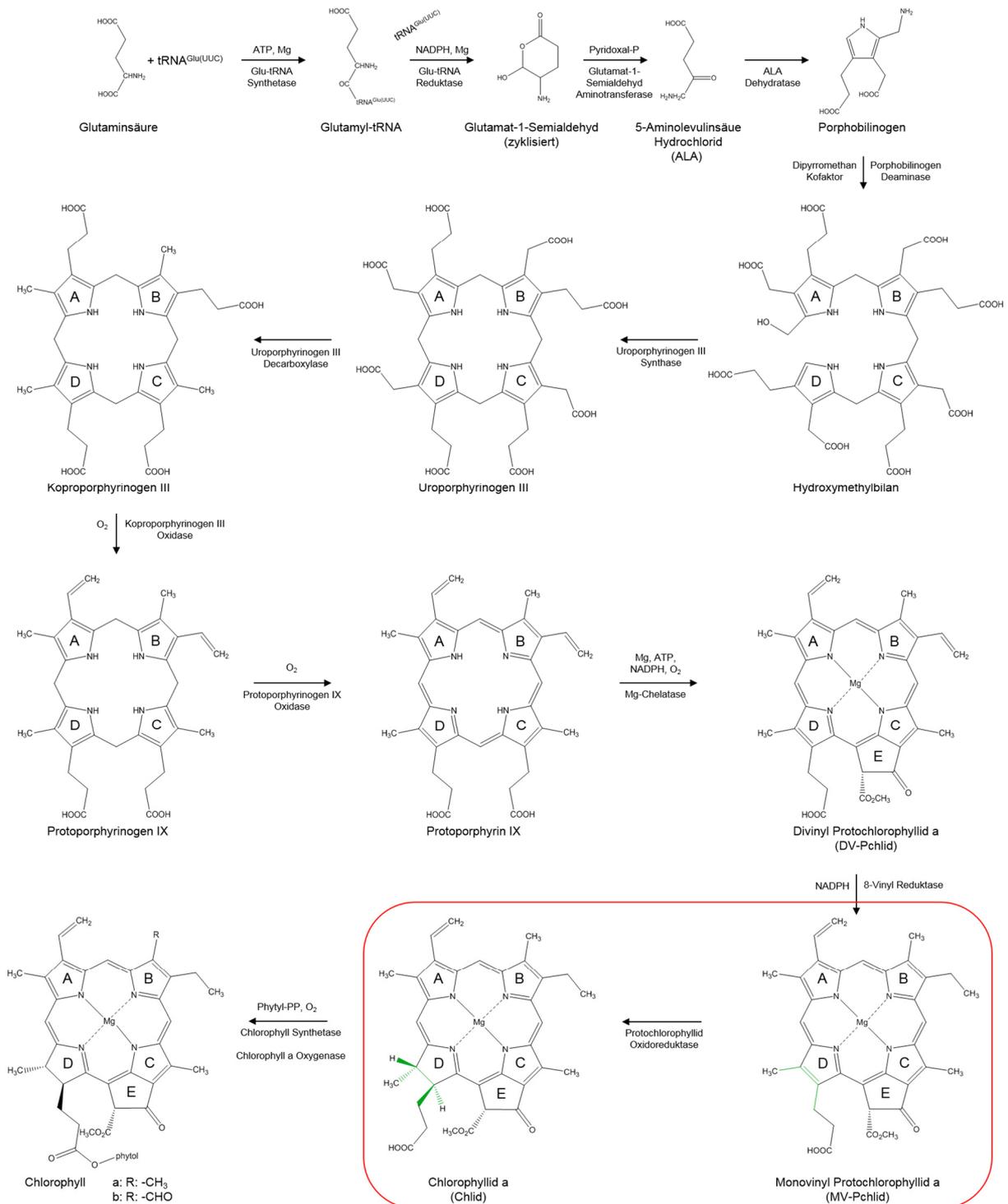


Abbildung 2: Chlorophyllbiosynthese. Modifiziert nach Reinbothe und Reinbothe [16]. Die Chlorophyllbiosynthese ist eine Abfolge vieler Schritte. Die ersten Schritte, bis zur Einlagerung des Magnesiumions, sind identisch zur Hämsynthese. Die durch den roten Kasten hervorgehobene Reaktion ist die Reduktion von Protochlorophyllid, welche durch die Protochlorophyllid-Oxidoreduktase katalysiert wird. Die betreffende $C_{17}=C_{18}$ -Doppelbindung sowie die resultierende Einfachbindung sind in grün hervorgehoben.

Wird die Reduktion des Pchlids zu Chlid von der LPOR katalysiert, wie es in Pflanzen mit Ausnahme der Gymnospermen und verschiedenen Bakterien der Fall ist, so ist diese Reaktion, und somit die Chlorophyllbiosynthese, strikt lichtabhängig [17]. In Abwesenheit von Licht stoppt die Reaktion und

Pchlid akkumuliert. Wird dabei eine bestimmte Pchlid-Konzentration überschritten, so kommt es zu einem Stopp der ALA-Synthese. In Anwesenheit von Licht, ist eine Reduktion des Pchlids wieder möglich und auch die ALA-Synthese wird fortgesetzt [18]. LPORs besitzen somit eine Schlüsselrolle in der Chlorophyllbiosynthese.

1.3 Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen

Wie im vorherigen Kapitel bereits erwähnt, lassen sich Pchlid-Oxidoreduktasen (PORs) in zwei Klassen einteilen, die lichtabhängigen (*light dependent*) PORs (LPORs) und die lichtunabhängigen (*dark operative*) PORs (DPORs). Beide katalysieren dieselbe Reaktion, d.h. die Reduktion der C₁₇=C₁₈-Doppelbindung im Ring D des Pchlids (Abbildung 2, roter Kasten), was zur Bildung von Chlid führt. Die beiden POR-Klassen unterscheiden sich hierbei hinsichtlich struktureller und mechanistischer Aspekte, welche im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.3.1 Struktur und Funktion lichtunabhängiger PORs (DPORs)

DPORs sind sauerstoffsensitiv und bestehen aus drei Untereinheiten. In Pflanzen sind dies die sogenannten ChIL, ChIN und ChIB (ortholog zu BchL, BchN und BchB in Bakterien). Diese weisen eine signifikante Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit zu den Untereinheiten der Nitrogenase NifH, NifD und NifK auf. Es handelt sich also bei der DPOR um ein strukturell zu Nitrogenasen ähnliches Enzym [19, 20]. Die Sauerstoffsensitivität der DPORs wird auf ein Eisen-Schwefel (4Fe-4S)-Cluster im BchNBL-Proteinkomplex zurückgeführt (Abbildung 3). 4Fe-4S-Cluster sind häufig als Kofaktor an Enzymreaktionen beteiligt. Stripp *et al.* [21] klärten die Sauerstoffsensitivität von Enzymen auf, welche diese Cluster enthalten. Sie zeigten für die [FeFe]-Hydrogenase aus *Chlamydomonas reinhardtii*, dass die Reaktion mit Sauerstoff zur Zerstörung des 4Fe-4S-Clusters führt. Des Weiteren wurde postuliert, dass durch die Übertragung von Elektronen auf den gebundenen Sauerstoff reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) entstehen. Diese ROS wiederum attackieren das 4Fe-4S-Cluster, wodurch dieses zerstört wird und das Protein seine Funktion verliert. Die Sauerstoffsensitivität der 4Fe-4S-Cluster hängt vom Schutz durch das Protein ab. DPORs benötigen Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Adenosintri-phosphat (ATP), um die Umsetzung von Pchlid zu Chlid zu katalysieren [22].

Durch verschiedene biochemische Experimente wurde ein möglicher Reaktionsmechanismus von Bröcker *et al.* [23] vorgeschlagen. Durch den Elektronendonator Ferredoxin wird dabei ein Elektron auf das 4Fe-4S-Cluster des BchL-Homodimers (Abbildung 3) übertragen [24]. Nachdem zwei ATP-Moleküle an das Protein binden, verändert das BchL-Homodimer seine Konformation. Im Anschluss an diese Konformationsänderung ermöglicht das BchN-BchB-Heterodimer, welches als Substrat Pchlid bindet, eine transiente Oktamer-Komplexbildung. Während dieser Komplex besteht, wird ATP hydrolysiert

und ein Elektron kann vom 4Fe-4S-Cluster des BchL-Homodimers auf das 4Fe-4S-Cluster des BchN-BchB-Heterodimers übertragen werden. Nach der Hydrolyse dissoziiert der DPOR-Oktamer-Komplex. Zur vollständigen Reduktion des Pchlids wird dieser Zyklus zweimal durchlaufen [23].

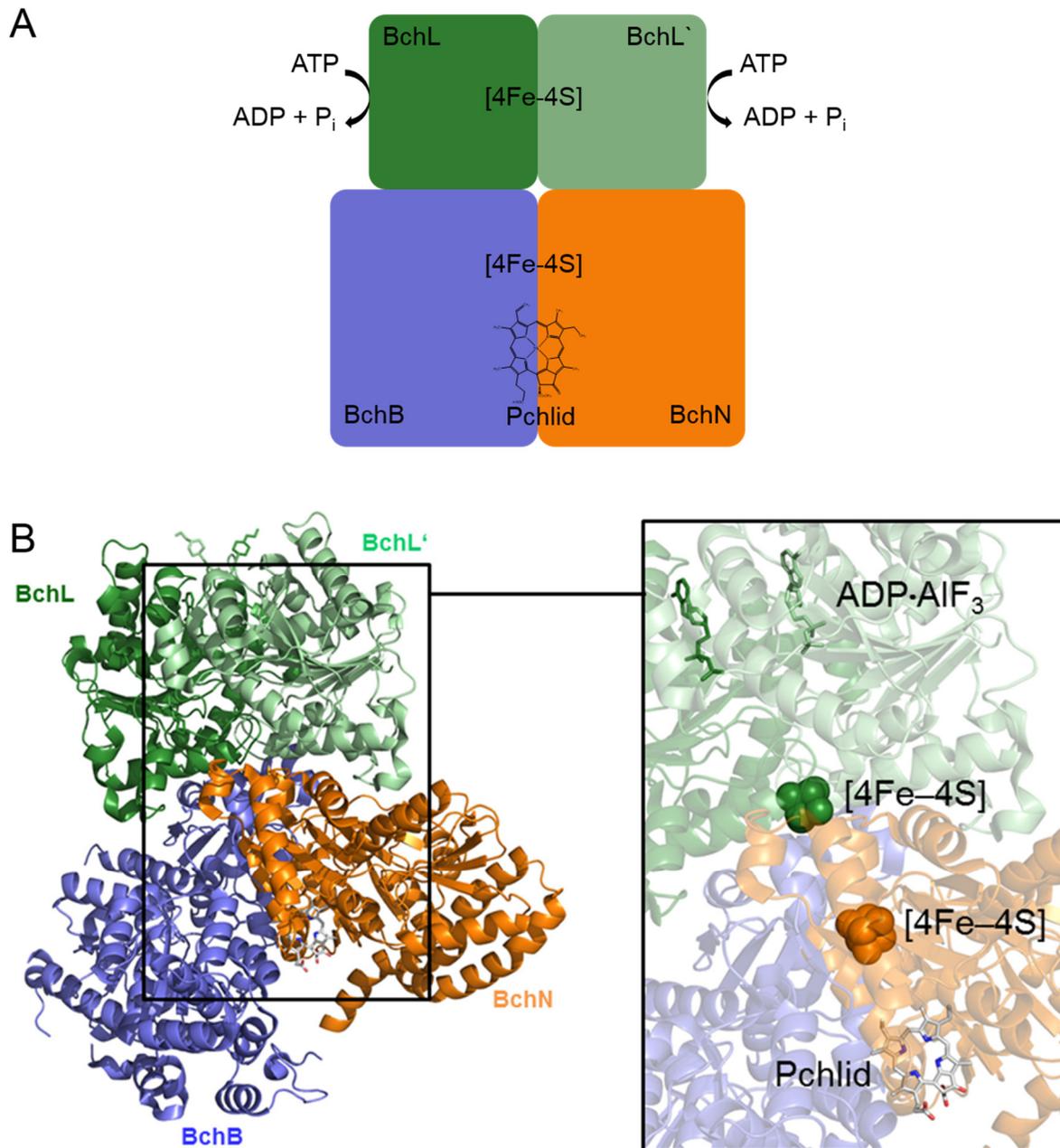


Abbildung 3: Struktur des DPOR-Proteinkomplexes bestehend aus den Untereinheiten BchB, BchN und BchL aus *Prochlorococcus marinus* (PDB-ID: 2YNM). (A) Modifiziert nach Moser *et al.* [25]. Schematische Darstellung und (B) Struktur der DPOR. Der homodimere BchL Proteinkomplex (BchL und BchL') ist in dunkel- und hellgrün, BchB in blau und das BchN in orange dargestellt. Weiterhin ist das Substrat Pchlid, das ko-kristallisierte ATP-Analogon ADP-AlF₃ (beides als Stäbchenmodell) sowie die beiden Eisen-Schwefel-Cluster [4Fe-4S] (als Kugelmodell) dargestellt. Pchlid: Kohlenstoff und Wasserstoff sind in weiß Sauerstoff in rot und Stickstoff in blau visualisiert.

1.3.2 Struktur und Funktion lichtabhängiger PORs (LPORs)

1.3.2.1 LPOR-Struktur

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf den lichtabhängigen LPORs, welche zu den kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (englisch: *short-chain dehydrogenases/reductases*, SDR) mit einem typischen Rossmann-Faltungsmotiv (Abbildung 4) [26-28] gehören. Dieses besteht aus sechs parallelen β -Faltblättern, welche über α -Helices verbunden sind. Die Anordnung der β -Faltblätter ist wie in Abbildung 4 zu sehen 3-2-1-4-5-6 (1 = N-Terminus, 6 = C-Terminus). Im Gegensatz zu den Enzymen der DPOR-Familie besitzen LPORs keine Eisen-Schwefel-Cluster und sind daher nicht sauerstoffsensitiv.

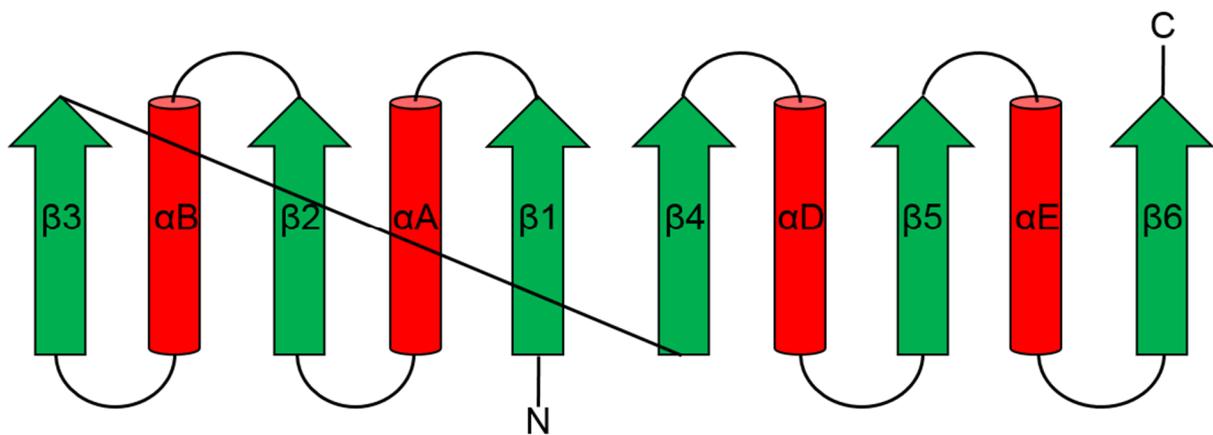


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Rossmann-Faltungsmotiv. Das Rossmann-Faltungsmotiv besteht aus sechs parallelen β -Faltblättern (grün), welche über vier α -Helices (rot) verbunden sind.

Hydroxyl- und Carbonylgruppen bilden die von SDR-Enzymen am häufigsten umgesetzten Verbindungen [29]. Des Weiteren werden jedoch auch Dehydratase-, Sulfotransferase-, Isomerase- und Decarboxylierungsreaktionen sowie die Reduktion von C=N-Doppelbindungen und die von LPORs katalysierte Reduktion von C=C-Doppelbindungen katalysiert [30-38]. Die meisten Proteine der SDR-Superfamilie bilden Oligomere, hauptsächlich Homodimere oder Homotetramere [29]. Monomere SDRs, wie z. B. die Carbonylreduktase, enthalten 41 zusätzliche Aminosäuren vor dem hoch konservierten Tyrosin, welche eine α -Helix bilden [29, 39]. Dieses zusätzliche Strukturelement verhindert die Oligomerisierung. Bis heute existieren lediglich Homologiemodelle von LPORs, welche auf SDRs basieren (Abbildung 5). Der native Oligomerisierungszustand von LPORs wird kontrovers diskutiert. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass das Kofaktor/Substrat-freie Apoprotein als Monomer vorliegt [40-43]. Gleichzeitig existieren jedoch in der Primärliteratur widersprüchliche Informationen über den Oligomerisierungszustand des LPOR-Apoproteins und dem entsprechenden ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplex. Dabei kommt erschwerend hinzu, dass in den meisten frühen Studien LPOR-Präparate verwendet wurden, welche direkt durch Solubilisierung aus

Etioplasten gewonnen wurden [44, 45], wohingegen in neueren Studien rekombinante pflanzliche und cyanobakterielle LPORs Verwendung finden, welche in *Escherichia coli* produziert wurden [46-51]. Martin *et al.* [52] zum Beispiel zeigten in einem Experiment über Größenausschlusschromatographie, unter Verwendung der LPOR aus der Erbse, welche an ein Maltose-Bindeprotein (MBP) fusioniert war, dass die LPOR unabhängig von der Anwesenheit von NADPH und Pchlid als Dimer eluiert. Unter Verwendung von Pflanzenmaterial wurde gezeigt, dass die LPOR-Isoformen von *Arabidopsis thaliana* ebenfalls Dimere bilden [53], wohingegen eine kürzlich durchgeführte Studie mit der rekombinanten LPOR A aus *A. thaliana* zeigte, dass sowohl das Apoprotein als auch der ternäre LPOR/NADPH/Pchlid-Komplex dicht gepackte Oligomere höherer Ordnung bilden [48]. Für die LPOR aus Gerste wurde basierend auf einem Homologie-Modellierungsansatz und nicht-denaturierenden Proteinblots vorgeschlagen, dass ein Hexamer aus fünf LPOR A und einer LPOR B gebildet wird [53]. Da pflanzliche LPORs teilweise schwer zu exprimieren sind, zu Aggregationen neigen und eine Produktion des Proteins in einer ausreichenden Menge für (strukturelle) biophysikalische Untersuchungen nur schwer möglich ist, stammen die neuesten Studien zum LPOR-Reaktionsmechanismus größtenteils aus Versuchen mit cyanobakteriellen LPORs, wie der TeLPOR aus *Thermosynechococcus elongatus*, welche in ausreichender Menge und Reinheit produziert werden können [42, 46, 50, 51, 54-57]. Jedoch fehlen auch hier definitive Aussagen über den Oligomerisierungszustand der Enzyme in Apo- und Holoform. Eine Kristallstruktur, welche einen Quantensprung im Verständnis des Mechanismus bedeuten würde, ist nicht verfügbar.

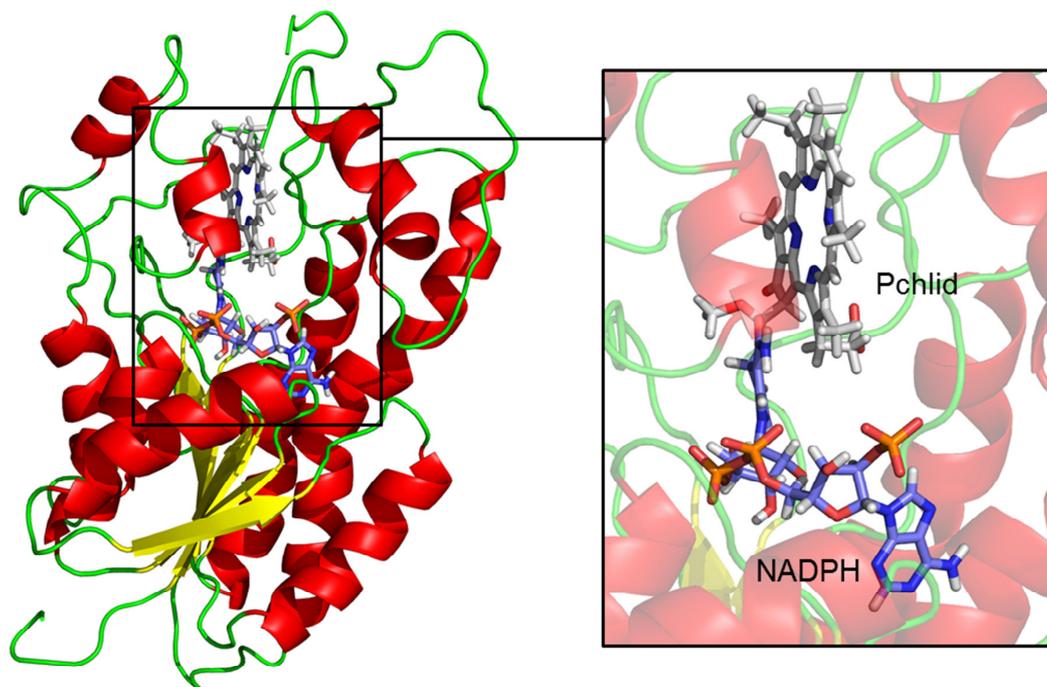


Abbildung 5: Homologiemodell der LPOR aus *Synechocystis* sp. (SsLPOR). Das Modell wurde basierend auf der 7-Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *E. coli* (PDB-ID: 1AHI) generiert [58]. Die typische Rossmann-Faltung des Enzyms ist in diesem Modell gezeigt. Das Substrat Pchlid sowie der Kofaktor NADPH sind als Stäbchenmodell dargestellt. Pchlid: Kohlenstoff und Wasserstoff sind in weiß, Sauerstoff in rot und Stickstoff in blau dargestellt. NADPH: Kohlenstoff ist in hellblau, Wasserstoff in weiß, Sauerstoff in rot, Stickstoff in blau und Phosphor in orange hervorgehoben.

Der allgemeine Reaktionsmechanismus, welcher zur Reduktion einer Doppelbindung im Substrat führt, ist also zwischen LPORs und SDRs (bzw. Reduktasen) konserviert [41, 42, 59]. Da im Gegensatz zu klassischen SDRs für LPORs der aktive ternäre (Enzym/Kofaktor/Substrat) Holo protein-Komplex im Dunkeln rekonstituiert werden kann ohne dass eine Katalyse stattfindet und für die Initiation der Reaktion kurze Lichtpulse ausreichen, können die katalytischen Schritte der Reaktion mittels schneller spektroskopischer Verfahren mit einer hohen zeitlichen Auflösung verfolgt werden. Daher wurden LPORs in den letzten Jahren als attraktives Modell für die Untersuchung von biologischen Hydridtransfer-Reaktionen herangezogen [41, 42, 60]. Hierbei wurde in neuesten Arbeiten erstmals ein schrittweiser Hydridtransfer in einem biologischem System nachgewiesen [46]. Die entsprechenden Arbeiten zum Verständnis des Reaktionsmechanismus sind im folgenden Kapitel zusammengefasst.

1.3.2.2 Photophysikalische Eigenschaften von Pchlid und LPOR-Reaktionsmechanismus

Als Kofaktor benötigen LPORs, wie viele SDR-Enzyme, die reduzierte Form von NADPH (Abbildung 5). Analog zu SDRs wurde postuliert, dass in LPORs die Reduktion der Pchlid $C_{17}=C_{18}$ -Doppelbindung durch einen Hydridtransfer (HT) vom NADPH zum C_{17} -Atom des Pchlid-Moleküls, gefolgt von einem Protonentransfer von einem konservierten Tyrosinrest zum C_{18} -Atom des Substrates erfolgt [58]. Dabei wird NADPH zu $NADP^+$ oxidiert und Pchlid zu Chlid reduziert. Licht, welches durch das Pchlid-Substrat im Enzym absorbiert wird, dient dabei als Katalysator der Reaktion. Dabei führt die Lichtabsorption zu einer elektronischen Anregung des Pchlid-Moleküls was vereinfacht dargestellt einer geänderten Elektronenverteilung im Pchlid-Molekül entspricht. Die photokatalytischen Eigenschaften des Pchlids determinieren also den Reaktionsmechanismus des Enzyms, wobei in neuesten Arbeiten für freies Pchlid sowie für LPOR-gebundenes Pchlid (im pseudoternären Komplex mit $NADP^+$) eine klassische Photophysik nachgewiesen wurde. Diese umfasst, nach Anregung, die Bildung des ersten angeregten Singulettzustands (1P_1) sowie die Ausbildung des korrespondierenden Triplettzustands (3P_1). Aus beiden Zuständen ist eine Rückkehr in den Grundzustand (1P_0) möglich (Abbildung 6).

Wie einleitend erläutert werden bei der Reduktion von Pchlid zwei Elektronen und zwei Protonen (in Form eines Hydrids (H^-) und eines Protons) übertragen. Abhängig von den Reaktionsraten der notwendigen Elektronentransfer (eT)- und Protonentransfer (pT)-Schritte kann der HT schrittweise, teilweise schrittweise oder komplett konzertiert stattfinden [46, 61-63]. Vor kurzem konnte mittels transientscher Absorptions- und Emissionsspektroskopie die schrittweise Natur dieses Prozesses nachgewiesen werden (Abbildung 6) [46]. Ausgehend vom ersten angeregten Singulettzustand des Pchlid-Moleküls (1P_1) erfolgt zunächst ein eT vom NADPH zum Pchlid, wobei ein anionisches Pchlid-

Radikal ($^2I_0^{(1)}$) entsteht. Da die Verwendung von NADPD anstelle von NADPH zu einer Verlängerung der Lebenszeit der beiden folgenden Schritte führte, muss hier ein H/D-Transfer von NADPH/D erfolgen. Die wahrscheinlichste Interpretation des Reaktionsablaufs ausgehend vom $^2I_0^{(1)}$ ist demzufolge ein Protonen-gekoppelter eT. Als Intermediate entstehen dabei das Pchlid-Neutralradikal ($^2I_0^{(2)}$) gefolgt von einem nicht radikalischen anionischen Pchlid-Intermediat ($^1I_0^{(3)}$), welches schließlich von freien Wassermolekülen oder sauren Aminosäureresten innerhalb der Proteintasche protoniert wird, sodass daraus das finale Chlid-Produkt (1C_0) entsteht.

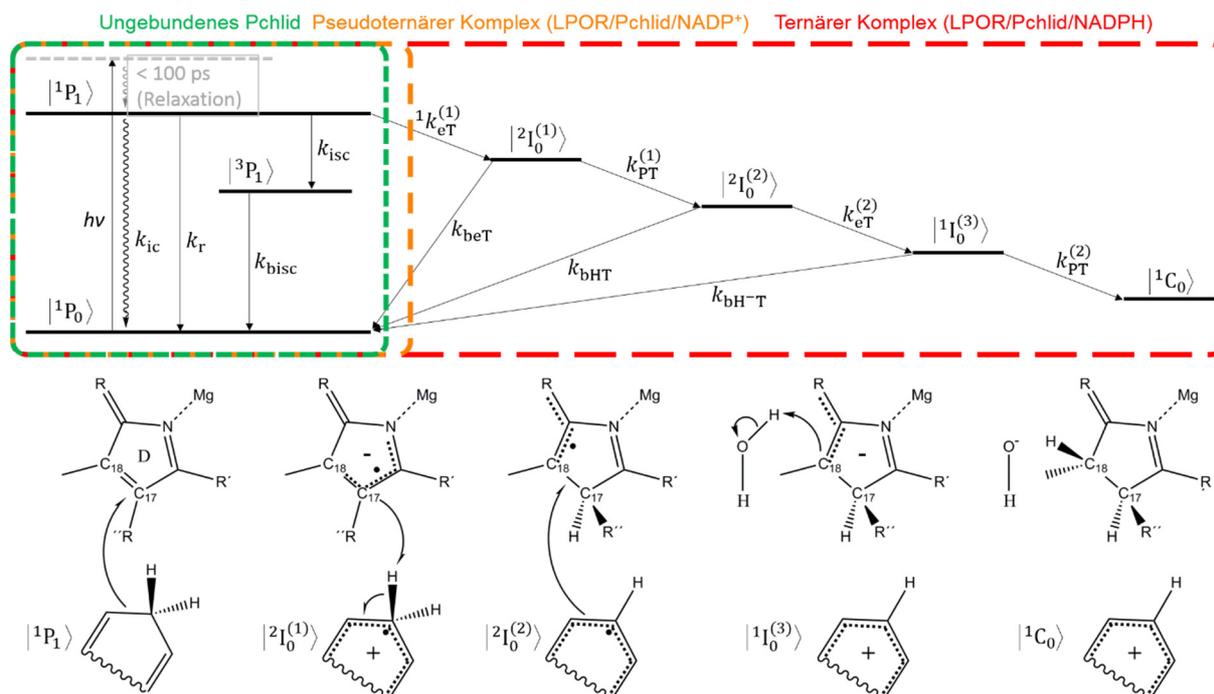


Abbildung 6: Photophysikalisches/chemisches Modell. Modifiziert nach Archipowa *et al.* [46]. 5P_n = Pchlid, $^5I_n^{(x)}$ = Intermediat, 5C_n = Chlid, S = Spinzahl, n = Elektronenzustandsnummer, x = Zahl der individuellen Intermediate, k_{ic} = interne Umwandlung, k_r = Strahlungszerfall, k_{isc} = intersystemer Übergang, k_{bisc} = rückwärtiger intersystemer Übergang, $1k_{eT}^{(1)}$ = erster Elektronentransfer, $k_{PT}^{(1)}$ = erster Protonentransfer, $k_{eT}^{(2)}$ = zweiter Elektronentransfer, $k_{PT}^{(2)}$ = zweiter Protonentransfer, k_{beT} = rückwärtiger Elektronentransfer, k_{bHT} = rückwärtiger Elektronentransfer, k_{bHT-T} = rückwärtiger Hydridtransfer.

1.3.2.3 Photoaktivierung von LPORs und die Rolle struktureller Dynamik

Das Zusammenspiel von Proteinstruktur und Proteindynamik ist entscheidend für die Funktion von biologischen Makromolekülen. Zur Ermöglichung einer effizienten Katalyse ist ein Gleichgewicht zwischen Stabilität und Flexibilität notwendig. Dabei können verschiedenste Bewegungen in unterschiedlichen Zeitskalen (z. B. ps bis s) einen indirekten oder direkten Effekt auf die Katalyse haben. Darunter z. B. lokale Bewegungen, welche die Substrat- oder Kofaktorbindung [64] durch Bewegungen im aktiven Zentrum [65] oder in der Kofaktor-Bindestelle [66] beeinflussen. In vielen Studien, in denen das Zusammenspiel von Proteindynamik und Proteinstruktur untersucht wurde, wurden Dehydrogenasen, wie die Dihydrofolatreduktase (DHFR) [67-70] und andere Enzyme, welche einen Hydrid- und Protonentransfer katalysieren, untersucht. Innerhalb dieser Enzymklasse stellen die

LPORs ein interessantes Modellsystem dar, da der ternäre LPOR/Kofaktor/Substrat-Komplex im Dunkeln hergestellt und die Katalyse durch einen kurzen Lichtimpuls initiiert werden kann [18, 41, 43, 46, 50, 54, 55, 71].

So wurde für die *Te*LPOR aus *T. elongatus* gezeigt, dass die Vorbelichtung des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplexes mit einem kurzen Laserimpuls, welcher zu nahezu keinem Substratumsatz führt, wahrscheinlich die Ausbildung einer geänderten Konformation des aktiven Zentrums zur Folge hat. Dieser Prozess, hier bezeichnet als Photoaktivierung, scheint die Katalyseeffizienz des Enzyms zu steigern [50], dabei wurde von den Autoren ein Zwei-Photonen-Prozess vorgeschlagen, wobei das erste Photon das Enzym „anschaltet“ (Photoaktivierung) und das zweite Photon die Katalyse induziert. Der Nachweis entsprechender Konformationsänderungen erfolgte indirekt mittels zeitaufgelöster Infrarot (IR)-Spektroskopie, wobei gezeigt werden konnte, dass eine kurze Belichtung des Enzymsubstratkomplexes zu einer veränderten Sekundärstruktur des Enzyms führt [50, 72]. Während der Zwei-Photonen-Prozess aus reaktionsmechanistischer Sicht mittlerweile widerlegt werden konnte und die beobachtete Photoaktivierung wahrscheinlich eher auf eine durch Vorbelichtung induzierte Ausbildung von Pchlid-Chlid-Dimeren im Protein zurückzuführen ist [60], bleibt die Natur der nachgewiesenen Konformationsänderung sowie etwaige Konformationsübergänge aufgrund von Kofaktor- und Substratbindung weitgehend unbekannt. Aufgrund des ähnlichen katalytischen Mechanismus von DHFRs und LPORs ist es jedoch denkbar, dass bei den entsprechenden Prozessen auch in LPORs die Proteindynamik eine wichtige Rolle spielt.

1.3.3 Evolution von LPOR und DPOR

Während das DPOR-Enzymsystem aus struktureller und mechanistischer Sicht recht gut verstanden ist (Kapitel 1.3.1), gibt es für die LPORs, insbesondere im Hinblick auf die Proteinstruktur (Kapitel 1.3.2.1) und Proteindynamik (Kapitel 1.3.2.3), Wissenslücken. Außerdem stellt sich aus physiologischer Sicht die Frage, warum ein lichtunabhängiges und ein lichtabhängiges Enzym für die Reduktion der Doppelbindung im D-Ring des Pchlids existieren. Eine mögliche Ursache für die Entwicklung zweier strukturell grundverschiedener Enzymsysteme findet sich unter Berücksichtigung der Sauerstoffsensitivität von DPORs in der Änderung des Luftsauerstoffniveaus der Erde auf evolutionär relevanten Zeitskalen. Die entsprechende Hypothese zur evolutionären Entwicklung der LPOR- und DPOR-Enzyme ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Yamazaki *et al.* [73] postulierten, dass die ersten phototrophen Bakterien anoxygene Photosynthese betrieben und dass die Chlorophyllbiosynthese mittels sauerstoffsensitiver DPORs erfolgte. Aufgrund des niedrigen Luftsauerstoffniveaus (10^{-11} % (v/v)) zu dieser Zeit, ist anzunehmen, dass die Funktionalität der DPORs zu dieser Zeit nicht beeinträchtigt wurde. Mit dem drastischen Anstieg des Luftsauerstoffniveaus vor

etwa 2,4 Milliarden Jahren auf 3 % (v/v) liegt die Annahme nahe, dass die sauerstoffsensitiven DPORs ihre Funktion unter diesen geänderten Bedingungen nicht ausreichend erfüllen konnten, sodass sich die lichtabhängigen und sauerstoffunsensitiven LPOR-Enzyme entwickelten [18, 73].

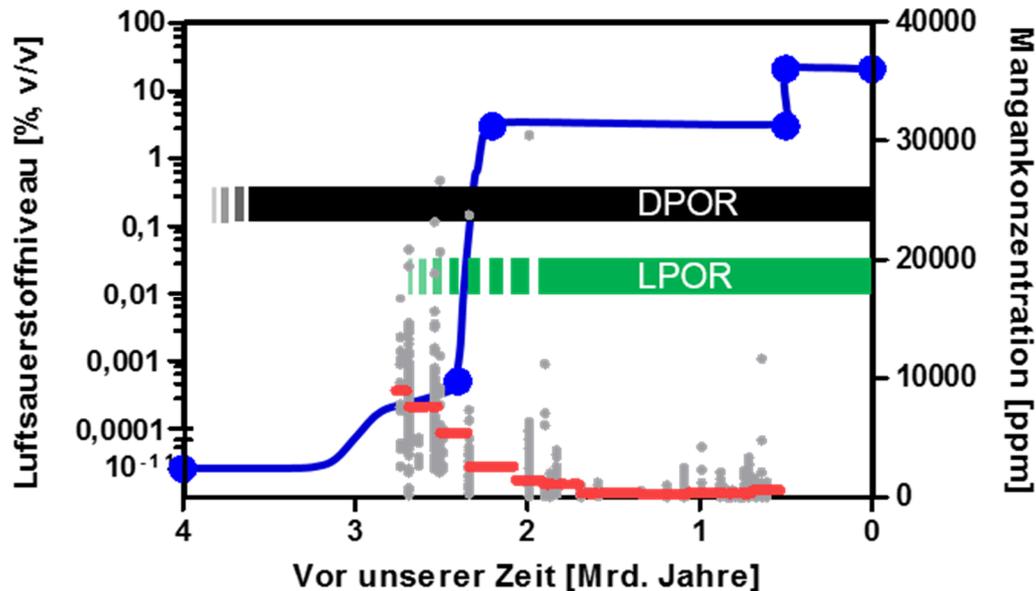


Abbildung 7: Hypothese zur evolutionären Entwicklung von LPOR und DPOR. Modifiziert nach Yamazaki *et al.* [73]. Es wird postuliert, dass die ersten Photosynthese-betreibenden Organismen Bakteriochlorophyll mittels einer sauerstoffsensitiven lichtunabhängigen DPOR synthetisierten. Das Luftsauerstoffniveau zu dieser Zeit betrug 10^{-11} % (v/v) (blaue Punkte). Vor etwa 2,4 Milliarden Jahren stieg das Luftsauerstoffniveau innerhalb von nur 0,2 Milliarden Jahren auf 3 % (v/v). Es wird vermutet, dass aufgrund dieser extremen Änderung des Luftsauerstoffniveaus die sauerstoffsensitiven DPORs ihre Funktion nicht ausreichend erfüllen konnten und sich so, aufgrund der geänderten Umweltbedingungen, die sauerstoffunsensitiven LPORs entwickelten. Das heutige Luftsauerstoffniveau von 21 % (v/v) wurde vor etwa 0,5 Milliarden Jahren erreicht. Die in grau dargestellten Daten zeigen die Mangankonzentration im Gestein an. Die Menge an Mangan gibt einen Hinweis auf die atmosphärische Sauerstoffkonzentration zu dem Zeitpunkt, auf welchen die Entstehung des Gesteins zurückzuführen ist. Je höher die Mangankonzentration umso niedriger die Sauerstoffkonzentration [74]. Aufgrund der hohen Streuung wurden die Daten über einen definierten Zeitraum gemittelt dargestellt (rote Striche).

Diese Hypothese beruht hauptsächlich auf der nachgewiesenen Sauerstoffsensitivität von DPOR-Enzymsystemen und findet in der Verbreitung von LPORs und DPORs in anoxygenen phototrophen Bakterien und oxygenen phototrophen Organismen Bestätigung. Da für diese Arbeit die Verbreitung und Evolution von LPORs von großem Interesse war, werden im Folgenden die entsprechenden Aspekte näher beleuchtet.

1.3.4 Verbreitung von LPOR und DPOR

In Angiospermen ist die enzymatische Umsetzung von Pchlid zu Chlid strikt lichtabhängig, was bedeutet, dass sie von LPORs katalysiert wird. Gymnospermen hingegen besitzen zusätzlich zur LPOR auch eine DPOR [18, 40, 75-77]. LPORs treten dabei in Pflanzen häufig als verschiedene Isoformen in Prolamellarkörpern von Etioplasten auf [78, 79]. Beispiele hierfür sind die Gerste (*Hordeum vulgare*) und die Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*). *H. vulgare* besitzt zwei Isoformen (LPOR A und

LPOR B), welche unterschiedlich reguliert werden. So wird die LPOR A hauptsächlich zu Beginn des Wachstums in den Keimlingen und LPOR B darüber hinaus auch in der adulten Pflanze gebildet [80]. In *A. thaliana* gibt es sogar drei Isoformen der LPOR (LPOR A, LPOR B und LPOR C), welche ebenfalls unterschiedlichen Regulationen unterliegen. Ebenso wie bei der Gerste treten die Isoformen in verschiedenen Stadien des Wachstums auf [81]. LPOR A ist hauptsächlich in der Keimlingsentwicklung und LPOR C in der späten Wachstumsphase zu finden. Die einzige Isoform, welche über alle Wachstumsstadien hinweg nachgewiesen werden kann, ist die LPOR B [82-84]. Des Weiteren ist bekannt, dass die Expression der für die LPOR A- und LPOR C-kodierenden Gene stark lichtabhängig und die der LPOR B lichtunabhängig ist. Hierbei zeigt sich eine Expression des LPOR A-Gens bei niedrigen Lichtintensitäten, wohingegen die LPOR C bei hoher Lichtintensität nachweisbar ist [85]. Aufgrund dieser Regulationsmechanismen ist es der Pflanze möglich ihre Photosyntheseleistung unter verschiedensten Lichtbedingungen sowie während aller Wachstumsphasen aufrecht zu erhalten.

Auch Cyanobakterien besitzen in der Regel sauerstoffunsensitive LPORs, jedoch wurden einige Cyanobakterien beschrieben, welche zusätzlich die sauerstoffsensitive DPOR für die Umsetzung von Pchlid zu Chlid verwenden. Beispiele hierfür sind *Leptolyngbya boryana* [86] und *Synechocystis* sp. PCC 6803 [76].

Außerdem wurde lange angenommen, dass alle anoxygenen phototrophen Bakterien nur die lichtunabhängige und sauerstoffsensitive DPOR besitzen [40, 86, 87]. Diese Annahme wurde 2014 mit der Entdeckung einer funktionellen LPOR in dem aerob anoxygenen phototrophen Bakterium (AAPB) *Dinoroseobacter shibae* DFL12^T widerlegt [1]. Kaschner *et al.* wiesen für die vorerst putative LPOR aus *D. shibae* (*DsLPOR*) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine lichtabhängige Umsetzung von Pchlid zu Chlid nach. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Lichtqualität, wie bei anderen LPORs auch [71], einen Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit der *DsLPOR* hat. Bezüglich der Evolution der *DsLPOR* wurde basierend auf phylogenetischen Studien postuliert, dass das *DsLPOR*-kodierende Gen durch horizontalen Gentransfer (HGT) von einem Cyanobakterium auf *D. shibae* übertragen wurde. *D. shibae* kann anoxygene Photosynthese in Anwesenheit von Sauerstoff betreiben, was klassische anoxygene phototrophe Bakterien wie *Rhodobacter* nicht können, es ist also der Klasse der AAPBs zuzuordnen. Unter diesen Bedingungen sollte die sauerstoffsensitive DPOR inaktiviert sein oder *D. shibae* muss einen Mechanismus besitzen, welcher die DPOR vor dem Sauerstoff schützt. Es scheint daher für AAPBs wie *D. shibae* physiologisch sinnvoll zu sein, eine sauerstoffunsensitive LPOR zu besitzen. Zum Zeitpunkt der Identifizierung der *DsLPOR* (Februar 2014) konnten jedoch in Datenbanken keine weiteren putativen LPORs in Proteobakterien nachgewiesen werden.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Durch die Anwesenheit einer funktionellen lichtabhängigen POR in dem aerob anoxygenen phototrophen Bakterium (AAPB) *Dinoroseobacter shibae* konnte gezeigt werden, dass LPORs nicht nur wie lange Zeit angenommen in Cyanobakterien und Pflanzen vorkommen, sondern auch in aerob anoxygenen phototrophen Proteobakterien. Aufgrund dessen stellt sich die Frage, ob in Zeiten ständig neuer Genomsequenzierungsprojekte weitere aerob anoxygene phototrophe Proteobakterien identifiziert werden können, welche entsprechende Enzyme besitzen. Außerdem wurde die DsLPOR in bisherigen Studien nicht vergleichend zu cyanobakteriellen und pflanzlichen LPORs charakterisiert. Wie einleitend ausgeführt, gibt es insbesondere im Hinblick auf die Struktur von LPORs, sowie hinsichtlich des Einflusses proteindynamischer Prozesse auf die Katalyse, große Wissenslücken.

Ziel dieser Arbeit war daher zunächst die Suche nach weiteren AAPB LPORs sowie ein eindeutiger Funktionsnachweis, um die Einordnung in die Familie der LPOR-Enzyme zu verifizieren. Außerdem sollte die DsLPOR, sowie weitere eventuell identifizierte AAPB LPORs, vergleichend zu bereits beschriebenen cyanobakteriellen und pflanzlichen LPORs, biochemisch charakterisiert werden. Auf Grundlage dieser Charakterisierung sollte die Phylogenie und Evolution der AAPB LPORs betrachtet werden. Da eine Identifizierung funktioneller LPORs proteobakteriellen Ursprungs eine zusätzliche Variabilität für strukturelle Studien bietet und so die Chancen einer erfolgreichen Kristallisation erhöht werden, sollte versucht werden, die DsLPOR sowie weitere eventuell neu identifizierte LPORs zu kristallisieren. Außerdem sollte unabhängig vom Erfolg der Kristallisationsstudien die Struktur und Dynamik von LPORs mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (englisch: *small-angle X-ray scattering*, SAXS) und Inkohärenter Quasielastischer Neutronenspektroskopie (englisch: *quasielastic incoherent neutron spectroscopy*, QENS) untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U196 (Φ 80 Δ <i>lacZM15</i>) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>)	[88]
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>F ompThsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dem</i> (λ <i>Its857indl Sam7 nin5 P_{lacUV5}-</i> <i>T7gene1</i>)	[89]
<i>Rhodobacter capsulatus</i> ZY5	F108:: <i>Km^R rif-10</i>	[90]

2.2 Übersicht der verwendeten lichtabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten putativen und als Referenz dienenden lichtabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen (LPORs). Alle verwendeten LPORs, mit Ausnahme der SpLPOR, wurden in der NCBI-Datenbank gefunden. Die Sequenz der SpLPOR wurde der Datenbank des Joint Genome Institute (JGI) entnommen. FCB: Fibrobacteres, Chlorobi und Bacteroidetes Bakterien.

Proteinname	Ursprungsorganismus	Klasse / Ordnung	Genbank-/UniProt-/Swissprot-ID
AnLPOR	<i>Acidiphilium angustum</i>	α -proteobakterium / <i>Rhodospirillales</i>	WP_029314395.1
EbLPOR	<i>Erythrobacteraceae</i> bacterium HL-111	α -proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	KPP91129.1
ElLPOR	<i>Erythrobacter litoralis</i> DSM 8509	α -proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	KEO90002.1
GpLPOR	<i>Gemmatimonas</i> <i>phototrophica</i>	FCB-Gruppen Bakterium	AMW05784.1
LfLPOR	<i>Loktanella fryxellensis</i> DSM 16213	α -proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	SEN87055.1
LvLPOR	<i>Loktanella vestfoldensis</i> DSM 16212	α -proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	WP_026352701.1
PdLPOR	<i>Porphyrobacter</i> <i>dokdonensis</i>	α -proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	OBV11559.1
SaLPOR	<i>Sandarakinorhabdus</i> sp. AAP62	α -proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	WP_020480449.1
SehGCLPOR	<i>Saccharopolyspora</i> <i>erythraea</i>	Actinobakterium / <i>Pseudonocardiaceae</i>	A4FA51
SgLPOR	<i>Sulfitobacter guttiformis</i> KCTC 32187	α -proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	KIN73509.1
SlLPOR	<i>Sandarakinorhabdus</i> <i>limnophila</i>	α -proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	UPI0003B37375
SpLPOR	<i>Spingomonadales</i> sp. 28- 62-20	α -proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	OYY75650.1
TeLPOR	<i>Thermosynechococcus</i> <i>elongatus</i>	Cyanobakterium / <i>Synechococcales</i>	Q8DLC1

Proteinname	Ursprungsorganismus	Klasse / Ordnung	Genbank-/UniProt-/Swissprot-ID
SsLPOR	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Cyanobakterium / <i>Synechococcales</i>	AAA68281.1
AtLPORC	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Angiosperm / <i>Brassicales</i>	AY048263.1
HvLPORA	<i>Hordeum vulgare</i>	Angiosperm / <i>Poales</i>	P13653.1

2.3 Plasmide

Tabelle 3: Übersicht aller verwendeten Plasmide und deren Genotypen.

Vektor	Genotyp	Referenz	
pET22b	<i>ColE1 lacZ' Amp^R P_{T7} P_{lac}</i>	Novagen	
pET28a	<i>ColE1 lacZ' Km^R P_{T7} P_{lac}</i>		
pET22b_TeLPOR-oH	971 bp TeLPOR Fragment aus pET28a_TeLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET22b kloniert	diese Arbeit	
pET28a_AnLPOR	983 bp AnLPOR Fragment aus pMK- RQ_AnLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	[91]	
pET28a_AtLPORC	1208 bp AtLPORC Fragment aus pJ201_AtLPORC <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_AtLPORC-cHis	1205 bp AtLPORC PCR-Produkt <i>NcoI/XhoI</i> in pET28a kloniert	diese Arbeit	
pET28a_DsLPOR	989 bp DsLPOR PCR-Produkt <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	[1]	
pET28a_EbLPOR	986 bp EbLPOR Fragment aus pMK-RQ_EbLPOR <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a kloniert	diese Arbeit	
pET28a_EL/POR	986 bp EL/POR Fragment aus pMK-RQ_EL/POR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	[91]	
pET22b_EL/POR-cHis	983 bp EL/POR Fragment <i>NdeI/XhoI</i> in pET22b kloniert	diese Arbeit	
pET28a_GpLPOR	971 bp GpLPOR Fragment aus pMK- RQ_GpLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_HvLPORA	1169 bp HvLPORA Fragment aus pEX- K4_HvLPORA <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_LfLPOR	983 bp LfLPOR Fragment aus pMA-T_LfLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_LvLPOR-2.0	965 bp LvLPOR-2.0 Fragment aus pJ201_LvLPOR-2.0 <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_PdLPOR	1001 bp PdLPOR Fragment aus pMK- RQ_PdLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_SaLPOR	974 bp SaLPOR Fragment aus pMK-RQ_SaLPOR <i>NdeI/XhoI</i> in pET28a kloniert		
pET28a_SehGCLPORA	905 bp SehGCLPORA Fragment aus pJ411_SehGCLPORA <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		[91]
pET28a_SgLPOR-2.0	962 bp SgLPOR-2.0 Fragment aus pJ201_SgLPOR-2.0 <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		diese Arbeit
pET28a_SILPORA-2.0	986 bp SILPORA-2.0 Fragment aus pJ201_SILPORA-2.0 <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert		

Vektor	Genotyp	Referenz
pET28a_SpLPOR	1001 bp <i>SpLPOR</i> Fragment aus pMK-RQ_SpLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	
pET28a_SsLPOR	959 bp <i>SsLPOR</i> Fragment aus pEX-A2_SsLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	
pET28a_TeLPOR	971 bp <i>TeLPOR</i> Fragment aus pMA-T_TeLPOR <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	[91]
pET28a_TeLPOR-A302Stopp	971 bp <i>TeLPOR-A302Stopp</i> PCR Produkt <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	diese Arbeit
pET28a_TeLPOR-P272Stopp	971 bp <i>TeLPOR-P272Stopp</i> PCR Produkt <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	
pET28a_TeLPOR-V279Stopp	971 bp <i>TeLPOR-V279Stopp</i> PCR Produkt <i>NdeI/SalI</i> in pET28a kloniert	
pEX-A2_SsLPOR	pUC Amp ^R P _{lac} , <i>SsLPOR</i>	MWG
pEX-K4_HvLPORA	pUC Km ^R P _{lac} , <i>HvLPOR</i>	
pJ201_LvLPOR-2.0	rep (pMB1) Km ^R P _{Amp} , <i>LvLPOR-2.0</i>	DNA2.0
pJ201_SgLPOR-2.0	rep (pMB1) Km ^R P _{Amp} , <i>SgLPOR-2.0</i>	
pJ201_SlLPOR-2.0	rep (pMB1) Km ^R P _{Amp} , <i>SlLPOR-2.0</i>	
pMA-T_LfLPOR	<i>ColE1</i> Amp ^R , <i>LfLPOR</i>	Life Technologies™
pMA-T_SehGCLPOR	<i>ColE1</i> Amp ^R , <i>SehGCLPOR</i>	
pMK-RQ_EbLPOR	<i>ColE1</i> Km ^R , <i>EbLPOR</i>	
pMK-RQ_GpLPOR	<i>ColE1</i> Km ^R , <i>GpLPOR</i>	
pMK-RQ_PdLPOR	<i>ColE1</i> Km ^R , <i>PdLPOR</i>	
pMK-RQ_SaLPOR	<i>ColE1</i> Km ^R , <i>SaLPOR</i>	

2.4 Oligonukleotide

Alle synthetischen Oligonukleotide (Tabelle 4) wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) in Standard-HPLC Reinheitsgrad, in lyophilisierter Form bezogen und in dem vom Hersteller angegebenen Volumen sterilem MilliQ-Wasser aufgenommen um eine Konzentration von 100 pmol/ μ l zu erhalten. Für PCR-Ansätze (Kapitel 2.11) wurden die jeweiligen Oligonukleotide mit sterilem MilliQ-Wasser auf eine Arbeitskonzentration von 10 pmol/ μ l verdünnt.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide. Die Schnittstellen von Restriktionsenzymen, sowie die durch PCR zu generierenden Stopp-Codons, sind farblich markiert. T_m : Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T_m [°C]	Verwendung
AtLPOR-c-term-His_fw	ATATATCCATGGCCCTGCAAG CTGCTTATTCC	63,1	PCR-Amplifikation von <i>AtLPORC</i> mit angefügter <i>NcoI</i> - und <i>XhoI</i> -Schnittstelle zur Klonierung an einen c-terminalen His ₆ -tag
AtLPOR-c-term-His_rv	ATATATCTCGAGCGCCAGACC GACCAATTTCT	63,3	
EILPOR-c-term-His_fw	ATATATCATATGATTGCGGGT CAAACACCTGTCTGC	62,2	PCR-Amplifikation von <i>EILPOR</i> mit angefügter <i>NdeI</i> - und <i>XhoI</i> -Schnittstelle zur Klonierung an einen c-terminalen His ₆ -tag
EILPOR-c-term-His_rv	ATATATCTCGAGCGCCGGTTC GCGGAC	65,3	
TeLPOR_A302Stopp_fw	CCAAGAACTATCGGCAGAGT AAAGTGATGAGCAAAAAGCC	64,5	Mutation von A302 zur Erzeugung eines Stopp-Codons. Verkürzung des <i>TeLPOR</i> -Gens am C-terminus um 21 Aminosäuren
TeLPOR_A302Stopp_rv	GGCTTTTTGCTCATCACTTTAC TCTGCCGATAGTTCTTGG	64,5	
TeLPOR_V279Stopp_fw	TTTCGCCAGTCGGGGTAACAC TGGAGCTGGGGT	70,5	Mutation von V279 zur Erzeugung eines Stopp-Codons. Verkürzung des <i>TeLPOR</i> -Gens am C-terminus um 44 Aminosäuren
TeLPOR_V279Stopp_rv	ACCCAGCTCCAGTGTTACCC CGACTGGCGAAA	70,5	
TeLPOR_P272Stopp_fw	CGATGGTGGTCGCACTAA GAGTTTCGCCAGTCGGG	69,1	Mutation von P272 zur Erzeugung eines Stopp-Codons. Verkürzung des <i>TeLPOR</i> -Gens am C-terminus um 51 Aminosäuren
TeLPOR_P272Stopp_rv	CCCAGCTGGCGAAACTTTAG TCTGCGACCACCATCG	69,1	

2.5 Enzyme

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Enzyme.

Enzym	Firma
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific GmbH (Bonn, Deutschland)
<i>DpnI</i>	
<i>NcoI</i>	
<i>NdeI</i>	
<i>SalI</i>	
<i>XhoI</i>	
Phusion-Polymerase	

2.6 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 121 °C und 200 kPa autoklaviert.

LB-Medium (*lysogeny broth*) [92]

Hefeextrakt	5	g/l
Trypton	10	g/l
NaCl	10	g/l

Das LB-Medium wurde von der Firma ROTH (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) als Fertigmischung bezogen und nach Herstellerangaben angesetzt.

TB-Medium (*terrific broth*) [92]

Hefeextrakt	24	g/l
Caseinhydrolysat, enzymatisch verdaut	12	g/l
K ₂ HPO ₄	9,4	g/l
KH ₂ PO ₄	2,2	g/l

Das TB-Medium wurde von der Firma ROTH (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) als Fertigmischung bezogen, nach Herstellerangaben angesetzt und vor dem Autoklavieren mit 4 ml/l Glycerin versetzt.

Autoinduktionsmedium [93]

Laktose-Lösung	20	g/l
Glukose-Lösung	50	g/l

Zur Herstellung des Autoinduktions (AI)-Mediums wurden, nach dem Autoklavieren, kurz vor dem Gebrauch 445 ml TB-Medium mit 5 ml Glukose-Lösung und 50 ml Laktose-Lösung versetzt.

VN-Medium

Hefeextrakt	10	g/l
K ₂ HPO ₄	5,74	μM
MgSO ₄	2	μM
pH	7,0	

Der Hefeextrakt wurde von der Firma Difco™ (VWR, Radnor, PA, USA) bezogen.

Festmedien

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde dem entsprechenden Medium (LB-Medium: *E. coli*, VN-Medium: *R. capsulatus*) vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt.

2.7 Kultivierung von Bakterien

Alle zur Kultivierung von Bakterien verwendeten Medien (Kapitel 0) wurden zunächst autoklaviert (20 min, 121 °C, 200 kPa). Zur Selektion auf Plasmid-kodierte oder im Genom integrierte Resistenzen wurde den Medien das entsprechende Antibiotikum zugegeben. Aufgrund der Hitzelabilität der Antibiotika wurden diese den Medien erst nach dem Autoklavieren, kurz vor der Verwendung, hinzugegeben. Die verwendeten Antibiotika, sowie die Konzentration im Medium, sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antibiotika. Angegeben ist die Endkonzentration im Medium, das Lösemittel für das jeweilige Antibiotikum und das Bakterium, für welches das Antibiotikum verwendet wurde.

Antibiotikum	Konzentration im Medium [μg/ml]	Lösemittel	Bakterium
Kanamycin	50	Wasser	<i>E. coli</i>
Ampicillin	100	Wasser	<i>E. coli</i>
Rifampicin	25	DMSO	<i>R. capsulatus</i>

2.7.1 Kultivierung von Flüssigkulturen

2.7.1.1 Kultivierung von *E. coli*-Flüssigkulturen

Die Kultivierung von *E. coli*-Flüssigkulturen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei 37 °C und 130 UpM auf einem Rundschtüttler (INFORS HT Multitron Pro, INFORS AG, Bottmingen, Schweiz). Die Plasmid-tragenden antibiotika-resistenten Stämme wurden unter entsprechendem Selektionsdruck (Kapitel 2.7, Tabelle 6) angezogen. Alle Kulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben kultiviert. Dabei betrug das Füllvolumen immer 10 % des Kolbenvolumens. Vorkulturen wurden immer mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht (mindestens 16 Stunden) kultiviert. Hauptkulturen wurden auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600nm}) von 0,05 aus einer Vorkultur inokuliert. Die OD_{600nm} wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Als Referenz diente das jeweilige Medium.

2.7.1.2 Expression verschiedener lichtabhängiger Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen in *E. coli* BL21(DE3)

2.7.1.2.1 Testexpression

Bevor eine Expression im großen Maßstab durchgeführt wurde, wurde die Expression der verschiedenen LPOR-Gene in kleinem Maßstab unter verschiedenen Bedingungen getestet. Die Expression erfolgte in allen Fällen unter Verwendung des pET-Expressionssystems [89] in *E. coli* BL21(DE3). Dieser Stamm trägt im Genom das, für die T7-Polymerase-kodierende, Gen unter der Kontrolle eines P_{LacUV5} -Promotors. Daher konnten Autoinduktionsmedium (AI-Medium) oder LB/TB-Medium mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Induktion der Expression verwendet werden. Im Falle der Autoinduktion beginnt die Induktion nachdem die dem Medium zugesetzte Glukose verbraucht ist und die ebenfalls im Medium vorliegende Laktose verstoffwechselt wird [93]. Für den Expressionstest im kleinen Maßstab wurde ein Kulturvolumen von 50 ml in einem 500 ml Erlenmeyerkolben gewählt. Alle Expressionskulturen wurden auf eine OD_{600nm} von 0,05 inokuliert und zunächst bei 37 °C und 250 UpM (INFORS HT Multitron Pro, INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) unter Selektionsdruck (Kapitel 2.7, Tabelle 6) inkubiert. Die Autoinduktions-Expressionskulturen wurden nach dem Animpfen für zwei Stunden inkubiert und die Temperatur im Anschluss auf 15 °C reduziert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden. Für die Expression in LB- und TB-Medium wurden die Kulturen zunächst bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 1 schüttelnd (250 UpM) inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG. Nach Zugabe des IPTGs wurden die Expressionskulturen für zwei Stunden bei 25 °C schüttelnd (250 UpM) bebrütet. Nach

erfolgter Expression wurden die Zellen mittels Zentrifugation (2915 xg , 30 min, 4 °C) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse einer Testexpression wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (Kapitel 2.15.1) und durch Zentrifugation die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Um die Zusammensetzung der unlöslichen und löslichen Bestandteile zu analysieren, wurden diese über eine SDS-PAGE (Kapitel 2.15.7) getrennt. Anhand dieser SDS-PAGE-Analysen (Daten nicht gezeigt) wurde für jedes Protein die Bedingung ausgewählt bei der die größte Menge an Protein produziert wurde. In Tabelle 7 sind die ausgewählten Expressionsbedingungen für die verschiedenen LPOR-Proteine aufgeführt. Für die meisten LPOR-Proteine wurde eine Expression in AI-Medium mit einer Dauer von 48 Stunden ausgewählt. Für diese Proteine war nach einer Inkubation von 72 Stunden meist eine Abnahme der Proteinmenge zu verzeichnen. Nur für die *EbLPOR* und die *AtLPORC* konnte eine Zunahme der Proteinmenge bei längerer Inkubation erzielt werden. Alle Varianten (anderer *His₆-tag*, Verkürzungen des Proteins) dieser LPORs wurden unter den gleichen Expressionsbedingungen produziert wie das jeweilige Ursprungprotein. Das bedeutet, dass z. B. die Expression der *EILPOR*-cHis, ebenso wie die der *EILPOR* (welche einen N-terminalen *His₆-tag* besitzt), in AI-Medium mit einer Inkubation von 48 Stunden durchgeführt wurde. Auch wurden die C-terminal verkürzten Varianten der *TeLPOR* in identischer Weise wie die *TeLPOR* produziert.

Für alle Proteine, mit Ausnahme der *AnLPOR*, *LvLPOR*, *SgLPOR* und der *SsLPOR*, konnten Bedingungen gefunden werden, bei denen zumindest eine kleine, auf dem SDS-Gel sichtbare, Menge lösliches Protein produziert wurde. Für die *AnLPOR* und die *SsLPOR* war weder lösliches noch unlösliches Zielprotein nachweisbar und die *LvLPOR* und *SgLPOR* lagen lediglich in der unlöslichen Proteinfraction vor.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Expressionsbedingungen für die unterschiedlichen LPOR-Proteine. Die genauen Expressionsbedingungen, sowie die Durchführung, sind dem Kapitel 2.7.1.2 zu entnehmen.

LPOR	Expressionsbedingung	Referenz
<i>AnLPOR</i>	AI-Medium, 48 Stunden	[91]
<i>AtLPORC</i>	AI-Medium, 72 Stunden	[91]
<i>DsLPOR</i>	LB-Medium, 0,4 mM IPTG Induktion	[94]
<i>EbLPOR</i>	AI-Medium, 72 Stunden	[95]
<i>EILPOR</i>	AI-Medium, 48 Stunden	[91]
<i>GpLPOR</i>	TB-Medium, 0,4 mM IPTG Induktion	[95]
<i>HvLPORA</i>	TB-Medium, 0,4 mM IPTG Induktion	diese Arbeit
<i>LfLPOR</i>	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit
<i>LvLPOR</i>	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit

LPOR	Expressionsbedingung	Referenz
<i>Pd</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit
<i>Sa</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit
<i>SehGCL</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	[91]
<i>Sg</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit
<i>SI</i> LPOR	TB-Medium, 0,4 mM IPTG Induktion	diese Arbeit
<i>Sp</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit
<i>Ss</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	diese Arbeit
<i>Te</i> LPOR	AI-Medium, 48 Stunden	[91]

2.7.1.2.2 Expression zur Produktion von LPORs

Für die Produktion der verschiedenen LPORs wurde die Expression im großen Maßstab durchgeführt. Die Expression erfolgte in allen Fällen unter Verwendung des pET-Expressionssystems [89] in *E. coli* BL21(DE3). Hierzu wurde ein Kulturvolumen von 500 ml verwendet und die Kulturen in einem 5 Liter Erlenmeyerkolben ohne Schikanen angezogen. Die Expressionsbedingungen wurden anhand der Ergebnisse der zuvor durchgeführten Expressionsstudie ausgewählt und sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Nach erfolgter Expression wurden die Zellen mittels Zentrifugation (6.750 xg, 30 min, 4 °C) geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.1.3 Kultivierung von *R. capsulatus*-Flüssigkulturen zur Produktion von Protochlorophyllid

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *R. capsulatus*-Stamm ZY5 (Tabelle 1) zur Produktion von Protochlorophyllid (Pchlid), dem Substrat der hier untersuchten lichtabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen (LPORs), verwendet. Im *R. capsulatus* ZY5 wurde das *bchL*-Gen, kodierend für eine Untereinheit der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (*dark-operative*, DPOR), deletiert, wodurch Pchlid akkumuliert und in das Medium abgegeben wird. Die Kultivierung von *R. capsulatus* ZY5 erfolgte bei 30 °C und 130 UpM auf einem Rundschüttler (INFORS HT Multitron Pro, INFORS AG, Bottmingen, Schweiz) im Dunkeln. Zur Anzucht des Protochlorophyllid-produzierenden Stamms *R. capsulatus* ZY5 wurden die Kulturen unter Selektionsdruck (Tabelle 6) in VN-Medium (Kapitel 2.6) angezogen. Sowohl Vor- als auch Hauptkulturen wurden im Erlenmeyerkolben bebrütet. Hierbei betrug die Füllhöhe stets 50 % des Kolbenvolumens (mikroaerobe Bedingungen). Vorkulturen wurden von einer Agarplatte (VN-Agar) angeimpft. Um eine ausreichende Zellzahl in den Kolben zu überführen, wurde hierfür eine Impföse verwendet. Vorkulturen wurden über Nacht bebrütet. Die optische Dichte wurde bei 660 nm (OD_{660nm}) ermittelt und die 500 ml Hauptkulturen aus einer

Vorkultur auf eine OD_{660nm} von 0,1 inokuliert. Hauptkulturen wurden für 24 bis 36 Stunden bei 30 °C bei 130 UpM inkubiert. Die Isolation des Pchlids erfolgte durch den Zusatz hydrophober Polyurethan (PU)- Würfel wie in Kapitel 2.16.1 beschrieben.

2.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA (modifiziert nach [96])

2.8.1 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte in 500 ml LB-Medium (Kapitel 0), welches auf eine OD_{600nm} von 0,05 aus einer am Vortag aus einer Gefrierkultur angeimpften Vorkultur inokuliert wurde. Die Kultur wurde ohne Selektionsdruck bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,6 angezogen. Nachdem die Zellen geerntet (2.915 *xg*, 10 Minuten, 4 °C) und der Überstand vollständig abgenommen wurde, wurden die Zellen vorsichtig in 10 ml gekühlter 100 mM $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen auf Eis, wurden die Zellen mittels Zentrifugation (2.915 *xg*, 10 Minuten, 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml gekühlter 100 mM $CaCl_2$ -Lösung aufgenommen und der Lösung 15 % (v/v) Glycerin zugesetzt. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung autoklaviert. Die nun chemisch transformationskompetenten *E. coli*-Zellen wurden in Aliquots von je 100 μ l bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Ab dem Zeitpunkt der ersten Zellernte wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Zur Überprüfung der transformationskompetenten *E. coli*-Zellen auf Kontaminationen wurde ein Antibioogramm angefertigt. Außerdem wurde nach jeder Herstellung die Transformationseffizienz überprüft.

2.8.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurden je 100 μ l transformationskompetente *E. coli*-Zellen (Kapitel 2.8.1) auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l eines Ligationsansatzes (Kapitel 2.10.2) oder einer QuikChange®-PCR (Kapitel 2.11.1) oder mit 100-200 ng isolierter Plasmid-DNA versetzt. Die mit der DNA vermischten Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss ein 90-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Nach erfolgtem Hitzeschock wurden die Zellen sofort auf Eis gestellt und 700 μ l LB-Medium (Kapitel 0) zugefügt. Zur Ausprägung der Plasmid-kodierten Antibiotikaresistenz wurden die Zellen bei 37 °C für eine Stunde auf einem Rundroller bebrütet. Im Anschluss wurden 50 μ l bis 100 μ l der Zellen auf antibiotikahaltigen (Tabelle 6) LB-Agarplatten (Kapitel 0) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Wurde ein Ligationsansatz oder eine QuikChange® PCR für die Transformation verwendet, so wurden die Zellen nach der Ausprägung der Antibiotikaresistenz durch Zentrifugation (16.016 *xg*, 15 Minuten, RT) pelletiert, der Überstand bis auf

100 µl abgenommen, die Zellen in den übrigen 100 µl resuspendiert und ebenfalls auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

2.9 Nukleinsäureisolierung und -reinigung

2.9.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Standard-Mini-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5α-Zellen wurde das „innuPREP Plasmid Mini“-Kit der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Abweichend vom Protokoll wurde die Plasmid-DNA in 50 µl auf 60 °C temperiertes MilliQ-Wasser eluiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Eluat erneut auf die Membran gegeben, für zwei Minuten inkubiert und erneut eluiert. Die Konzentration der resultierenden DNA-Lösung wurde mittels NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) ermittelt (Kapitel 2.13) und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Elution von DNA aus Agarosegelen/PCR-Produktreinigung

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte siehe Kapitel 2.11, Produkte einer Restriktion siehe Kapitel 2.10.1) wurde eine gelelektrophoretische Trennung (Kapitel 2.12) durchgeführt und die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Agarosegel mittels Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des „innuPREP DOUBLEpure“-Kits der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) aus dem Gel eluiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer. Abweichend vom Protokoll wurde die DNA im ersten Schritt mit 30 µl und im zweiten Schritt mit 20 µl auf 60 °C temperiertem MilliQ-Wasser eluiert. Die Konzentration der resultierenden DNA-Lösung wurde mittels NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) ermittelt (Kapitel 2.13) und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.10 *In vitro*-Rekombination von DNA

2.10.1 Hydrolytische Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten DNA hydrolytisch an einer für jedes Enzym spezifischen DNA-Sequenz. Für alle Restriktionen wurde der 10x „Fast Digest Green“-Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) verwendet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Für Testrestriktionen wurden 5 µl der zu untersuchenden Plasmid-DNA mit 0,5 µl (5 units, U) der jeweiligen Restriktionsendonukleasen und 1 µl 10x „Fast Digest Green“-Puffer vermischt und der Reaktionsansatz mit MilliQ-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Ansätze für zwei Stunden bei der vom Hersteller der jeweiligen Restriktionsendonuklease angegebenen Temperatur inkubiert und der Erfolg der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.12) überprüft.

Die hydrolytische Spaltung von Plasmid-DNA zur späteren Ligation (Kapitel 2.10.2) erfolgte in einem größeren Maßstab. Pro Ansatz wurden 1,5 µg Plasmid-DNA restringiert. Hierzu wurde eine entsprechende Menge DNA-Lösung mit 10 U der jeweiligen Restriktionsendonukleasen und 1x „Fast Digest Green“-Puffer versetzt. Anschließend wurden die Ansätze für zwei bis drei Stunden bei der vom Hersteller der jeweiligen Restriktionsendonuklease angegebenen Temperatur inkubiert, der gesamte Restriktionsansatz mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.12) aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel eluiert (Kapitel 2.9.2).

Zur Restriktion der Matrizen-DNA einer QuikChange®-PCR (Kapitel 2.11.1) wurden dem PCR-Ansatz 0,5 µl der Restriktionsendonuklease *DpnI* (5 U) sowie 6 µl des „Fast Digest Green“-Puffers zugegeben, der Ansatz mit MilliQ-Wasser auf 60 µl aufgefüllt und für zwei bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach einer gelelektrophoretischen Trennung (Kapitel 2.12) wurde das hydrolysierte PCR-Produkt aus dem Gel eluiert (Kapitel 2.9.2).

2.10.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von hydrolytisch gespaltenen DNA-Fragmenten (hydrolysierte Plasmid-DNA und PCR-Produkte) wurde mittels T4-DNA-Ligase (Tabelle 5) durchgeführt. Die T4-DNA-Ligase ermöglicht dabei die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphat- und einer freien 3'-Hydroxy-Gruppe zweier doppelsträngiger DNA-Moleküle. Hierfür benötigt sie als Kofaktor ATP. Eine Ligation mit der T4-DNA-Ligase ist sowohl bei überhängenden (*sticky ends*) als auch bei glatten Enden (*blunt ends*) möglich.

Die Ligation hydrolysierter Fragment (*insert*)- und Vektor-DNA erfolgte in einem molaren Verhältnis von 3:1. Hierzu wurde die entsprechende Menge DNA mit 5 U T4-DNA-Ligase und 1x T4-DNA-Ligasepuffer versetzt und der Ansatz gegebenenfalls auf 15 µl mit sterilem MilliQ-Wasser aufgefüllt. Anschließend wurden die Ansätze bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Ligation wurden transformationskompetente *E. coli* DH5α-Zellen (Kapitel 2.8.1) mit 2 µl des Ligationsansatzes transformiert (Kapitel 2.8.2).

2.11 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion [97] werden *in vitro* gezielt doppelsträngige DNA-Fragmente amplifiziert. Dazu werden eine thermostabile DNA-Polymerase, die Ausgangs-DNA als Matrize, zwei kurze, zum 5'- bzw. 3'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Bereichs komplementäre, Oligonukleotide, sowie dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) benötigt.

Das Prinzip der PCR beruht auf drei sich wiederholenden Schritten. Im ersten Schritt erfolgt bei hoher Temperatur die Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize in Einzelstränge. Durch ein Herabsetzen der Temperatur können sich die Oligonukleotide an entsprechend komplementäre Bereiche der DNA-Matrize anlagern (Hybridisierung). Im anschließenden Schritt, der Elongation, verlängert die DNA-Polymerase die gebundenen Oligonukleotide und fertigt so eine Kopie der DNA-Matrize an. Auf diese Weise wird innerhalb eines Zyklus die DNA verdoppelt, während sie insgesamt exponentiell amplifiziert wird. Nach 20 bis 30 Zyklen können in der Regel ausreichende Mengen DNA aus dem PCR-Ansatz isoliert werden (Kapitel 2.9.2). Alle PCR-Reaktionen wurden in dem Thermozykler „TPProfessional Basic Gradient“ (Analytik Jena, Jena, Deutschland) durchgeführt. Für alle PCR-Reaktionen wurde die Phusion™-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) verwendet.

Tabelle 8: Komponenten eines typischen PCR-Ansatzes und deren Konzentration.

Komponente	Konzentration / Menge im Ansatz
DNA-Matrize	50-200 ng
Oligonukleotid (vorwärts)	10 pmol
Oligonukleotid (rückwärts)	10 pmol
dNTP-Mix	0,2 mM
Phusion-Polymerase	2 U
Phusion-Puffer	1x Puffer
MilliQ-Wasser	ad 50 µl

Tabelle 9: PCR-Programm. Für die Hybridisierung wurde ein Gradient gewählt, um die besten Bedingungen zur Amplifikation zu finden.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Wiederholungen
vollständige Denaturierung	98	5	1
Denaturierung	98	0,5	20
Hybridisierung	55-65	1	
Elongation	72	3	
finale Elongation	72	5	1
Lagerung	10	∞	1

2.11.1 Austausch von Basen mittels ortsgerichteter Mutagenese

Für den gezielten Austausch von Basen in einem bestehenden Plasmid, wurde eine QuikChange®-PCR (Stratagene, San Diego, Kalifornien) durchgeführt. Diese beruht auf dem Einsatz zweier zueinander komplementärer Oligonukleotide, welche den entsprechenden Basenaustausch enthalten. Dabei wurden die Reaktionskomponenten in den gleichen Konzentrationen wie bei der normalen PCR (Tabelle 8) eingesetzt und dasselbe PCR-Programm (Tabelle 9) verwendet. Als DNA-Matrize diente hierbei der Vektor in dem der Basenaustausch generiert werden sollte. Während der PCR verlängert die Polymerase, ausgehend von den beiden Oligonukleotiden, den gesamten Vektor und erzeugt so den entsprechenden Austausch durch den Einbau der Oligonukleotide. Im Anschluss an die QuikChange®-PCR wurde das PCR-Produkt einer Restriktion (Kapitel 2.10.1) mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI*, welche die methylierte DNA-Matrize verdaut, unterzogen, sodass lediglich die nicht-methylierte, PCR-amplifizierte DNA mit dem gewünschten Basenaustausch zurückblieb. Nach der Restriktion wurden transformationskompetente *E. coli* DH5 α -Zellen (Kapitel 2.8.1) mit dem PCR-Produkt transformiert (Kapitel 2.8.2) und der korrekte Basenaustausch durch eine Sequenzierung (Kapitel 2.14) überprüft.

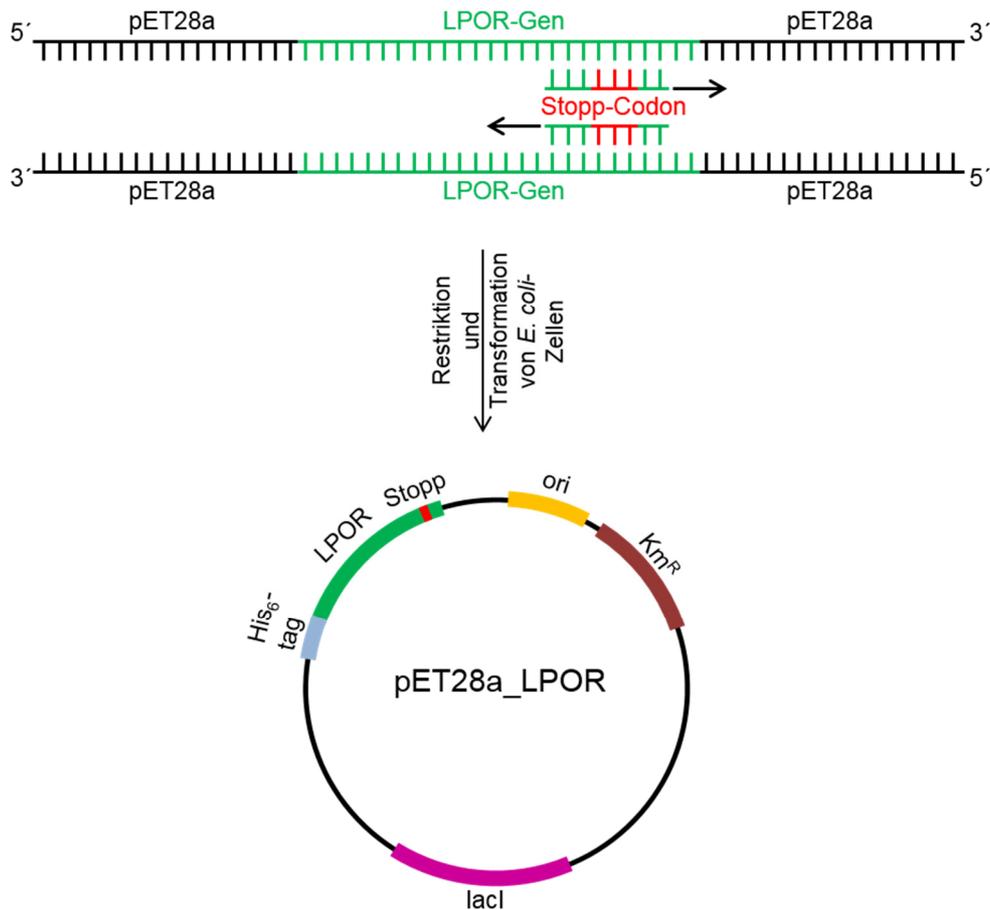


Abbildung 8: Schema zur QuikChange®-PCR. Zur Erzeugung von TeLPOR-Verkürzungen wurde eine QuikChange®-PCR durchgeführt. Hierbei werden Oligonukleotide verwendet, welche zueinander komplementär sind und die gewünschte Mutation (hier: Stopp-Codon) enthalten. Während der PCR wird der gesamte Vektor, ausgehend von den Oligonukleotiden, amplifiziert und so die gewünschte Mutation generiert. Durch die Restriktion mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* wird der Matrizen-Vektor hydrolytisch gespalten (Kapitel 2.10.1). Nach der Restriktion werden *E. coli*-Zellen mit dem amplifizierten Vektor transformiert (Kapitel 2.8).

2.12 Agarose-Gelelektrophorese [92]

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden Nukleinsäure-Moleküle über die negative Ladung ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats in einem elektrischen Feld getrennt. Die Laufgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration des Agarosegels, der Stärke des elektrischen Feldes sowie der Größe und der Konformation des DNA-Stranges. Kleine Fragmente wandern schneller durch die Gelmatrix als große und *supercoiled*-DNA schneller als lineare und zirkuläre DNA. Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA-Restriktionen (Kapitel 2.10.1) verwendet. Für die Gelmatrix wurde eine Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in 1x TAE-Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA im Gel wurde Ethidiumbromid eingesetzt, wobei dem Gel 0,1 µl einer 0,5%igen Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt wurde. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und unter Belichtung mit UV-Licht in Form von Fluoreszenz im sichtbaren Bereich ($\lambda=590$ nm) emittiert. Der bei der Restriktion verwendete „Fast Digest Green“-Puffer fungiert ebenfalls als Probenpuffer, weshalb den Proben kein separater DNA-Probenpuffer zugesetzt werden musste. Lediglich DNA-Proben, welche

zuvor keiner Restriktion unterzogen wurden, wurden vor dem Auftragen mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelkammern (Mini-Sub® Cell GT oder BioRAD wide Mini-Sub® Cell GT, Bio-Rad, Kalifornien, USA) bei einer Spannung von 125 V für 25 Minuten in 1x TAE-Puffer. Als DNA-Molekulargewichtsstandard wurde der „GeneRuler™ 1kb DNA Ladder“ der Firma Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Belichtung mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (INTAS Science Imaging EagleEye II, Stratagene, Amsterdam, Niederlande).

DNA-Molekulargewichtsstandard

„GeneRuler™ 1kb DNA Ladder“, Thermo Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland)

0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10 kb

Agarose-Laufpuffer (TAE-Puffer) (50x)

TRIS	2	M
Essigsäure (p.A.)	1	M
EDTA-Na ₂	50	mM

DNA-Probenpuffer (10x)

EDTA	100	mM
Glycerin	30	% (v/v)
Bromphenolblau	0,25	% (w/v)
SDS	1	% (w/v)

2.13 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen erfolgte mittels NanoDrop™ 2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die ebenfalls gemessenen Absorptionswerte bei 230 nm und 280 nm dienen als Indiz für die Reinheit der DNA. Dabei ist zu beachten, dass das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm (Absorption von Proteinen) optimalerweise zwischen 1,8 und 2 liegen sollte. Die Absorption bei 230 nm, welche ein Indiz für in der

Lösung vorhandene Salze ist, sollte im Verhältnis zur Absorption bei 260 nm nur die Hälfte oder weniger betragen.

2.14 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungsarbeiten zur Überprüfung der erzeugten Expressionsplasmide wurden als Auftragsarbeit von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) mittels Sanger-Methode [98] durchgeführt. Alle Konstrukte wurden mit den Standardprimern T7 und T7term (Tabelle 10) sequenziert.

Tabelle 10: Sequenzen der zur Sequenzierung verwendeten Standardprimer der Firma SeqLab.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
T7	TAATACGACTCACTATAGG
T7term	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG

2.14.1 Konstruktion der LPOR-Expressionsvektoren

Alle in dieser Arbeit identifizierten putativen LPOR-kodierenden Gene (Tabelle 2, Sequenzen siehe Anhang, Kapitel 6.1) wurden in Auftragsarbeit synthetisiert. Dabei wurden die Gene für die LPOR aus *Loktanella fryxellensis* (LfLPOR), *Porphyrobacter dokdonensis* (PdLPOR), *Sandarakinorhabdus* sp. (SaLPOR) und *Spingomonadales* sp. (SpLPOR) sowie die als pflanzliche bzw. cyanobakterielle Referenz dienende LPOR aus *Hordeum vulgare* (HvLPORA, POR A) und *Synechocystis* sp. PCC6803 (SsLPOR) von der Firma Life Technologies™ (Carlsbad, Kalifornien, USA) bezogen. Hierbei wurde die DNA-Sequenz der pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR zuvor auf die Codonverwendung (*codon usage*) von *E. coli* und anderen Proteobakterien angepasst [99]. Dazu wurde von Dr. Anita Loeschke eine Meta-Codon-Tabelle erstellt und verwendet, wodurch eine für *E. coli*, *R. capsulatus* und *P. putida* angepasste DNA-Sequenz erstellt werden konnte, bei der nicht jedes Triplet dem häufigsten Codon für *R. capsulatus* entspricht. Dabei ist zu beachten, dass dieses Verfahren die ursprüngliche *codon usage* des Ursprungsorganismus nicht berücksichtigt. Die putativen LPOR-kodierenden Gene aus *Loktanella vestfoldensis* (LvLPOR), *Sulfitobacter guttiformis* (SgLPOR) und *Sandarakinorhabdus limnophila* (SlLPOR) wurden von der Firma DNA2.0 (Newark, Kalifornien, USA) bezogen. Hier wurden die Gene zunächst *in silico* durch die Optimierung der DNA-Sequenz an den Codongebrauch von *E. coli* angepasst und dann synthetisiert. Die Optimierung erfolgte nach einem patentierten Verfahren der Firma DNA2.0, welches nicht immer das häufigste Codon einsetzt [100].

Für die spätere Klonierung der synthetischen Gene wurde diesen je eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease an beiden Enden (5' und 3') angefügt. Am 5'-Ende war dies die Sequenz für

die Restriktionsendonuklease *Nde*I und am 3'-Ende die Sequenz für *Sal*I oder *Xho*I. Alle Klonierungen erfolgten nach dem gleichen Prinzip (Abbildung 9).

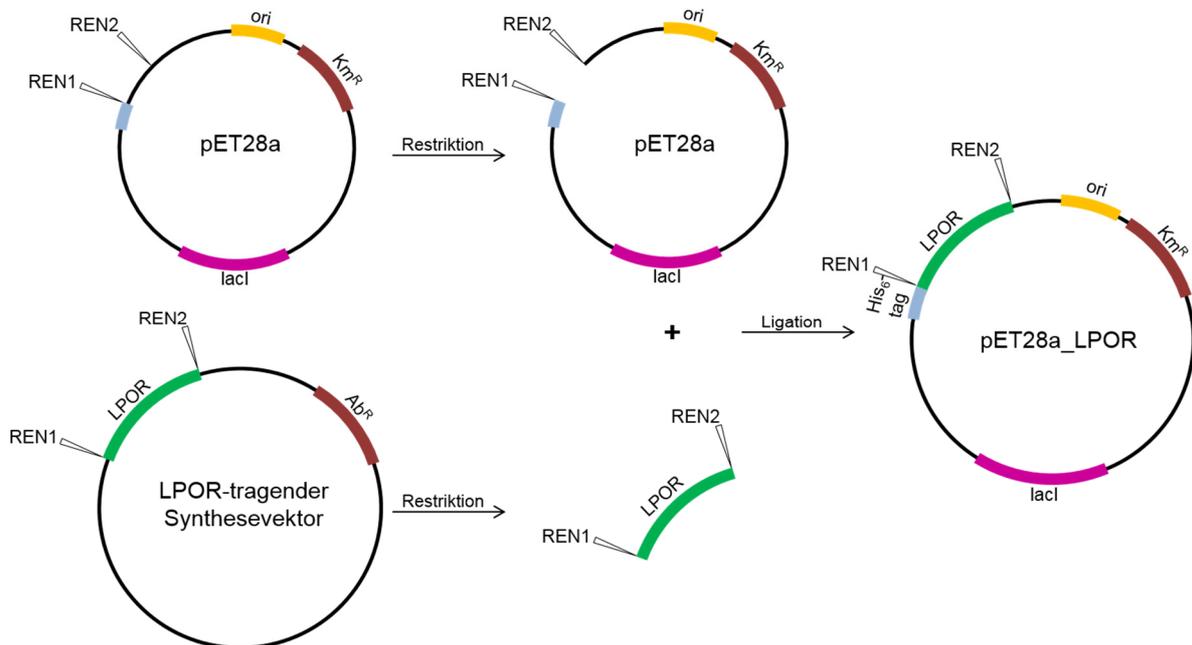


Abbildung 9: Klonierungsschema. Für die Klonierung der künstlich synthetisierten LPOR-Gene in den Expressionsvektor pET28a, wurde zunächst der Leervektor pET28a sowie der LPOR-tragende Synthesevektor (pJ201, pJ411, pMA-T, pMK-RQ und pEX-A2, pEX-K4) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (*Nde*I, *Sal*I und *Xho*I) hydrolytisch gespalten. Über eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.12) wurden die entstandenen DNA-Fragmente auf ihre Größe hin analysiert und die für die Ligation benötigten Fragmente (pET28a-Vektor und LPOR-Gen) aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (Kapitel 2.9.2). Durch eine Ligation (Kapitel 2.10.2) dieser beiden Fragmente entstand der fertige Expressionsvektor. Durch die Wahl der Restriktionsendonuklease *Nde*I wurde das LPOR-Gen an einen N-terminalen *His*₆-tag fusioniert. REN: Restriktionsendonuklease.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurden zunächst der pET28a-Vektor und der LPOR-tragende Synthesevektor hydrolytisch gespalten (Kapitel 2.10.1). Im Anschluss an die Restriktion wurden die Ansätze mittels Agarose-Gelelektrophorese getrennt (Kapitel 2.12) und die benötigte hydrolytisch gespalte Vektor-DNA und das jeweilige LPOR-Gen aus dem Agarosegel eluiert (Kapitel 2.9.2). Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden ligiert (Kapitel 2.10.2), sodass der jeweilige Expressionsvektor entstand (Tabelle 3).

Die Konstruktion der Expressionsvektoren für die LPOR aus *Dinoroseobacter shibae* (DsLPOR) [1] *Erythrobacteraceae* bacterium (EbLPOR), *Gemmatimonas phototrophica* (GpLPOR) [95] *Acidiphilium angustum* (AnLPOR), *Erythrobacter litoralis* (ElLPOR), *Saccharopolyspora erythraea* (SehGCLPOR), sowie den beiden als Referenz dienenden LPORs aus *Arabidopsis thaliana* (AtLPOR) und *Thermosynechococcus elongatus* (TeLPOR) [91], erfolgte in vorangegangenen Arbeiten nach den gleichen Prinzipien wie zuvor beschrieben.

Durch die Wahl der 5'-Restriktionsendonuklease *NdeI* wurde bei der Ligation ein N-terminaler Hexahistidin (His_6)-tag, welcher durch den pET28a-Vektor kodiert ist, *in frame* an die jeweilige LPOR fusioniert.

Im Fall der *AtLPORC* konnte in vorangegangenen Expressions- und Reinigungsstudien [91] gezeigt werden, dass die jeweilige LPOR über den N-terminalen His_6 -tag nur unzureichend gereinigt werden konnte. Daher wurde ein C-terminaler His_6 -tag an das entsprechende Gen fusioniert. Außerdem wurde ein Konstrukt der *ELPOR* mit C-terminalem His_6 -tag für SAXS-Studien (Kapitel 2.20.1 und 3.3.2) erzeugt, um einen Einfluss des 20 Aminosäuren langen N-terminalen His_6 -tags auf das Streuverhalten der Proteine auszuschließen. In diesen beiden Fällen erfolgte die Klonierung unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *XhoI* (*AtLPORC*) in pET28a, bzw. mittels *NdeI* und *XhoI* (*ELPOR*) in pET22b, wodurch an beide Proteine ein C-terminaler His_6 -tag fusioniert wurde. Hierzu wurde mittels PCR (Kapitel 2.11) unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (Tabelle 4) das jeweilige LPOR-Gen amplifiziert und gleichzeitig die benötigten Restriktionsschnittstellen angefügt. Ein Schema zu dieser Klonierung ist in Abbildung 10 dargestellt. Zur Vervielfältigung des fertigen Expressionsvektors wurden *E. coli* DH5 α -Zellen mit diesem transformiert (Kapitel 2.8.2) und die Plasmid-DNA über eine Standard-Mini-Präparation aus den Zellen isoliert (Kapitel 2.9.1). Um sicherzustellen, dass sich die richtige LPOR-Sequenz ohne Mutationen im Vektor befand, wurden alle Plasmide sequenziert (Kapitel 2.14).

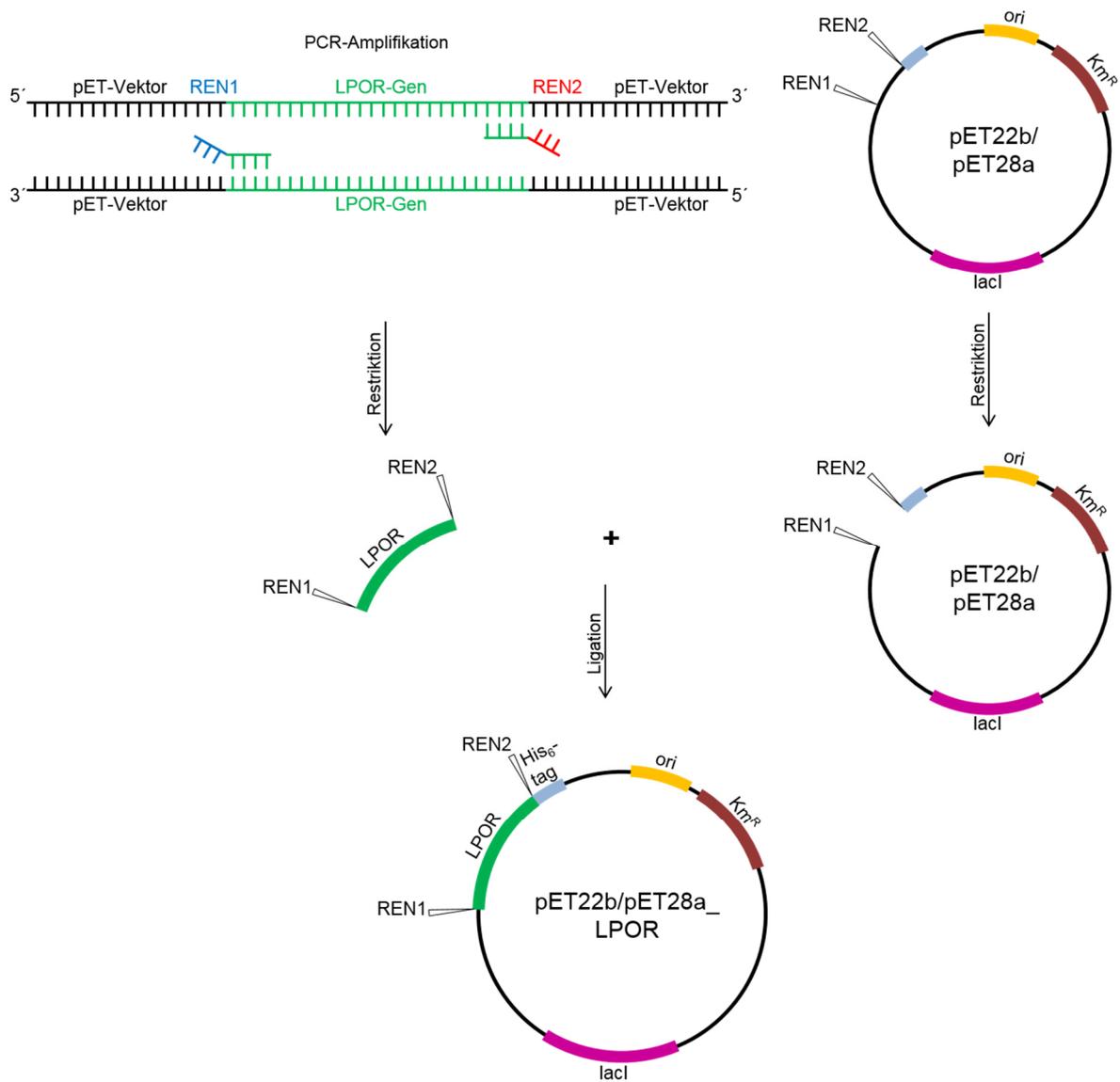


Abbildung 10: Klonierungsschema zur Erzeugung der C-terminal getagten LPORs. Um die gewünschten Restriktionsendonuklease-Sequenzen an das jeweilige LPOR-Gen anzubringen, wurde eine PCR mit Oligonukleotiden (Tabelle 4) mit den entsprechenden Überhängen durchgeführt und das Produkt mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (*AtLPORC*: *NcoI* und *XhoI*, *ELPOR*: *NdeI* und *XhoI*) restringiert (Kapitel 2.10.1). Ebenso wurde der entsprechende Expressionsvektor (*AtLPORC*: pET28a, *ELPOR*: pET22b) einer Restriktion unterzogen. Über eine Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.12) wurden die entstandenen DNA-Fragmente auf ihre Größe hin analysiert und die für die Ligation benötigten Fragmente (pET-Vektor und LPOR-Gen) aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert (Kapitel 2.9.2). Durch eine Ligation (Kapitel 2.10.2) dieser beiden Fragmente entstand der fertige Expressionsvektor. REN: Restriktionsendonuklease.

Alle in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Expressionsplasmide sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

2.14.1.1 Erzeugung C-terminal verkürzter *TeLPOR*-Konstrukte

In dieser Arbeit wurden verschiedene C-terminal verkürzte *TeLPOR*-Konstrukte mittels QuikChange®-PCR (Kapitel 2.11.1) erzeugt. In Abbildung 8 ist die Methode der QuikChange®-PCR schematisch dargestellt. Dabei wurde der bereits bestehende Vektor pET28a_*TeLPOR* als Matrizen-DNA eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Um eine Verkürzung des Proteins zu erreichen, wurde an der gewünschten Stelle im *TeLPOR*-Gen ein Stopp-Codon generiert, welches die Verkürzung dieses Gens zur Folge hatte. In dieser Weise wurden die Konstrukte *TeLPOR*-A302Stopp (C-terminal um 21 Aminosäuren verkürzt), *TeLPOR*-V279Stopp (C-terminal um 44 Aminosäuren verkürzt) und *TeLPOR*-P272Stopp (C-terminal um 51 Aminosäuren verkürzt) generiert (Tabelle 3).

2.15 Proteinbiochemische Methoden

2.15.1 Zellaufschluss

Nach erfolgter Expression des jeweiligen Zielgens in *E. coli* BL21(DE3) (Kapitel 2.7.1.2) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (6.750 *xg*, 30 Minuten, 4 °C) und das Gewicht des Zellpellets bestimmt. Das Zellpellet wurde in Zellaufschlusspuffer resuspendiert, sodass eine 10%ige (w/v) Zellsuspension entstand. Bei einer Testexpression (Kapitel 2.7.1.2.1), erfolgte der Aufschluss mittels Ultraschall (3x 5 Minuten, 5 *cycles*, 50 % Leistung) mit dem Ultraschall-Homogenisator Bandelin Sonopuls HD 2070 der Firma Sigma (München, Deutschland) und der Sonotroden-Spitze KEJ76. Für Volumen unter 2,5 ml wurde der Ultraschall-Aufschluss dreimal für zwei Minuten durchgeführt. Um einer Erwärmung der Proben vorzubeugen, wurden die Zellen in einem Eisbad gekühlt. Zwischen den Zyklen wurden die Zellen für mindestens zwei Minuten auf Eis gestellt. Bei Expressionen im großen Maßstab für eine anschließende Proteinreinigung (Kapitel 2.15.2) erfolgte der Aufschluss mittels des Hochdruckhomogenisators EmulsiFlex-C5 (Avestin Europe GmbH, Mannheim, Deutschland) in vier bis fünf Durchgängen bei 1000 bar. Nach erfolgreichem Aufschluss der Zellen wurden die unlöslichen Bestandteile der Zelle, sowie unaufgeschlossene Zellen, durch Zentrifugation (30.310 *xg*, 30 Minuten, 4 °C) von den löslichen Bestandteilen getrennt. Das Pellet wurde im Ausgangsvolumen Zellaufschlusspuffer resuspendiert und, ebenso wie die lösliche Fraktion, mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.15.7) analysiert. Die entsprechenden löslichen Fraktionen (zellfreier Rohextrakt) wurden für die Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (Kapitel 2.15.2) verwendet.

Zellaufschlusspuffer

TRIS	20	mM
NaCl	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)
pH	7,5	

2.15.2 Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Alle in dieser Arbeit verwendeten LPORs wurden mit einem Amino (N)-terminalen Hexahistidin-*tag* (*His₆-tag*) oder einem Carboxy (C)-terminalen *His₆-tag* fusioniert (*tag*-Sequenzen: N-terminal: MGSSHHHHHSSGLVPRGSH; C-terminal: LEHHHHHH). Alle heterolog in *E. coli* BL21(DE3) produzierten (Kapitel 2.7.1.2.2) *His-getaggten* Proteine wurden mittels IMAC an Ni²⁺-NTA-Material (Ni-NTA Superflow, QIAGEN, Hilden, Deutschland) gereinigt. Jeweils zwei der sechs Histidine des *His₆-tags* interagieren mit einem am Nitrilotriessigsäure (NTA)-Rest gebundenem Ni²⁺-Ion, sodass das jeweilige Protein an das Säulenmaterial gebunden wird. Durch die Zugabe von Imidazol, einem zu Histidin strukturell ähnlichem Molekül, kann das Zielprotein kompetitiv von der Säule eluiert werden. Die Reinigung erfolgte mittels der *fast protein liquid chromatography* (FPLC)-Systeme ÄKTApurifier oder ÄKTApure (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland). Die Elution des Proteins wurde durch *online* Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zunächst wurde das Säulenmaterial mit zwei bis drei Säulenvolumen Lagerpuffer äquilibriert und anschließend der zellfreie Rohextrakt (Kapitel 2.15.1) mit Hilfe eines 50 ml Superloops™ auf die Säule aufgetragen. Bis zum Erreichen der Basislinie bei 280 nm wurde die Säule mit Lagerpuffer gespült um alle Proteine, welche nicht an das Säulenmaterial binden, von der Säule zu entfernen. Um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu spülen, wurde die Säule mit 20 mM Imidazol (92 % Lagerpuffer, 8 % Elutionspuffer, Mischfunktion ÄKTApurifier oder ÄKTApure) gewaschen. Nach erneutem Erreichen der Basislinie bei 280 nm wurde das Zielprotein mit 250 mM Imidazol (Elutionspuffer) von der Säule eluiert. Die mit Hilfe eines Fraktionssammlers gesammelten zielproteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, entsalzt (Kapitel 2.15.3) und konzentriert (Kapitel 2.15.5). Die Reinheit der unterschiedlichen Fraktionen der Reinigung (Durchlauf, Waschschrift und Elution) wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.15.7) analysiert.

Lagerpuffer			Elutionspuffer		
TRIS	20	mM	TRIS	20	mM
NaCl	500	mM	NaCl	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)	Glycerin	20	% (v/v)
pH	7,5		Imidazol	250	mM
			pH	7,5	

2.15.3 Pufferwechsel und Entsalzung von Proteinlösungen mittels Gelfiltration

Im Anschluss an die Affinitätschromatographische Reinigung mittels IMAC wurden die Proteinproben mit Hilfe einer selbst gepackten Sephadex™ G25 (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland) Säule (XK50/60, Säulenvolumen: 981 ml, GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland) mittels FPLC (ÄKTApurifier oder ÄKTApure (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland)) bei einer Flussrate von 5 bis 10 ml pro Minute entsalzt und in Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) überführt. Zunächst wurde die Säule mit dem Lagerpuffer äquilibriert und die Proteinprobe mit Hilfe eines 50 ml Superloops™ auf die Säule gegeben. Durch Spülen der Säule mit Lagerpuffer wurde das Protein aufgrund seiner Größe von dem Salz getrennt und von der Säule gewaschen. Die Elution des Zielproteins wurde durch eine *online* Absorptionsmessung bei 280 nm detektiert. Durch eine gleichzeitige Messung der Leitfähigkeit konnte dabei gezeigt werden, dass das Protein vollständig von den Salzen getrennt wurde. Alle proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 2.15.6) und die Lösung bei Bedarf konzentriert (Kapitel 2.15.5). Die Proteinproben wurden für spezielle Experimente zusätzlich mittels Größenausschlusschromatographie (Kapitel 2.15.4) gereinigt um eine höhere Reinheit zu erzielen. Alle Proteinproben wurden bis zur späteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.15.4 Proteinreinigung mittels Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie können Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt werden. Je größer ein Molekül, desto schneller passiert es die Säule. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur weiteren Erhöhung der Reinheit die IMAC gereinigten und entsalzten Proteinproben mittels präparativer Größenausschlusschromatographie, unter Verwendung einer kommerziell gepackten Superdex™ 200 Säule (HiLoad™16/60, Säulenvolumen: 120 ml, GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland), gereinigt. Die Konzentration der Proteinlösung musste hierfür mindestens 1 mg/ml betragen. Die Reinigung erfolgte mittels FPLC (ÄKTApurifier oder ÄKTApure (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland)) bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min. Die Elution des

Zielproteins wurde durch eine *online* Absorptionsmessung bei 280 nm detektiert. Alle zielproteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, die Proteinkonzentration (Kapitel 2.15.6) bestimmt und die Lösung, wenn nötig, konzentriert (Kapitel 2.15.5).

2.15.5 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zum Konzentrieren von Proteinlösungen wurden Zentrifugationskonzentratoren (Pall, Dreieich, Deutschland) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Die Proben wurden mittels Zentrifugation (2.915 *xg*, 20 °C) unter Verwendung eines Ausschwingrotors mit Hilfe einer Kühlzentrifuge (ROTINA 380R, Hettich AG, Bäch, Schweiz) konzentriert.

2.15.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.15.6.1 Kolorimetrischer Bradford-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford [101] erfolgte mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) als Standard. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 900 µl Bradford-Reagenz mit 100 µl Proteinlösung in einer Küvette gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Proteinlösung musste dafür im Vorfeld auf eine geschätzte Konzentration von 0,1-1 mg/ml verdünnt werden, da nur in diesem Konzentrationsbereich die Kalibrierung mit BSA erfolgte. Als Referenz dienten 900 µl des Bradford-Reagenz mit 100 µl des entsprechenden Puffers. Anschließend wurde die Absorption des entstandenen Protein-Farbkomplexes bei 595 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Cary 60, Agilent Technologies, Ratingen, Deutschland) bestimmt. Über eine Kalibrationsgerade bekannter BSA-Mengen konnte so die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

Bradford-Reagenz

Serva Blau G250	0,1	g/L
85 % (v/v) ortho-Phosphorsäure	10	% (v/v)
Ethanol (abs.)	5	% (v/v)

Das Bradford-Reagenz wurde über Nacht gerührt und im Anschluss filtriert. Die Lagerung erfolgte in einer abgedunkelten Flasche bei Raumtemperatur.

2.15.6.2 Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 280 nm

Die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin) von Proteinen absorbieren Licht der Wellenlänge 280 nm. Diese Eigenschaft kann zur Bestimmung der Proteinkonzentration von gereinigtem Protein verwendet werden. Um die Proteinkonzentration zu berechnen, ist der Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm notwendig. Dieser wurde mit Hilfe des Internettools „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam> [102]) aus der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins ermittelt. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz lässt sich somit die Proteinkonzentration berechnen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop™ 2000c Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) unter Angabe des Molekulargewichts und des Extinktionskoeffizienten.

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \epsilon \cdot c \cdot d$

E: Absorption

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient $\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$

c: Konzentration $\left[\frac{\text{mol}}{\text{L}}\right]$

d: Schichtdicke [cm]

Tabelle 11: Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der verwendeten LPORs. Das theoretische Molekulargewicht und der molare Extinktionskoeffizient wurden mit Hilfe des Internettools „ProtParam“ (<http://web.expasy.org/protparam>) bestimmt.

Protein	Molekulargewicht [Da]	Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ) bei 280 nm $\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$
AnLPOR	37.159	35.200
AtLPORC	44.948	37.150
DsLPOR	37.265	36.690
EbLPOR	37.747	40.700
ElLPOR	37.847	42.190
GpLPOR	36.832	39.795
HvLPORA	43.345	32.680
LflLPOR	37.981	38.305
LvLPOR	36.572	38.055
PdLPOR	37.640	42.065

Protein	Molekulargewicht [Da]	Molarer Extinktionskoeffizient (ϵ) bei 280 nm [$\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$]
<i>Sa</i>LPOR	37.155	47.565
<i>Seh</i>GCLPOR	34.644	28.545
<i>Sg</i>LPOR	37.006	39.670
<i>S</i>/LPOR	36.302	47.565
<i>Sp</i>LPOR	37.701	41.160
<i>Ss</i>LPOR	37.824	46.785
<i>Te</i>LPOR	38.015	35.660
<i>Te</i>LPOR-A302Stopp	35.633	30.160
<i>Te</i>LPOR-P272Stopp	32.106	19.160
<i>Te</i>LPOR-V279Stopp	32.908	19.160

2.15.6.3 Konzentrationsbestimmung von Holoproteinlösungen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration des ternären LPOR/NADPH/Protochlorophyllid-Komplexes muss berücksichtigt werden, dass insbesondere der Kofaktor NADPH ebenfalls bei 280 nm absorbiert. Daher musste zunächst der Extinktionskoeffizient von NADPH bei 260 nm, 280 nm und 340 nm bestimmt werden. Hierzu wurde eine definierte Menge NADPH eingewogen und in Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) gelöst. Aus dieser Stocklösung wurden verschiedene Verdünnungen hergestellt. Von den verschiedenen Verdünnungen wurden Absorptionsspektren von 200 nm bis 800 nm aufgenommen (Abbildung 11 A). Zur Ermittlung der Extinktionskoeffizienten wurden die Absorptionswerte bei der entsprechenden Wellenlänge gegen die NADPH-Konzentration aufgetragen (Abbildung 11 B). Mit Hilfe einer linearen Regression wurde die Steigung der resultierenden Gerade bestimmt. Diese Steigung entspricht dem molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH bei der jeweiligen Wellenlänge (Tabelle 12).

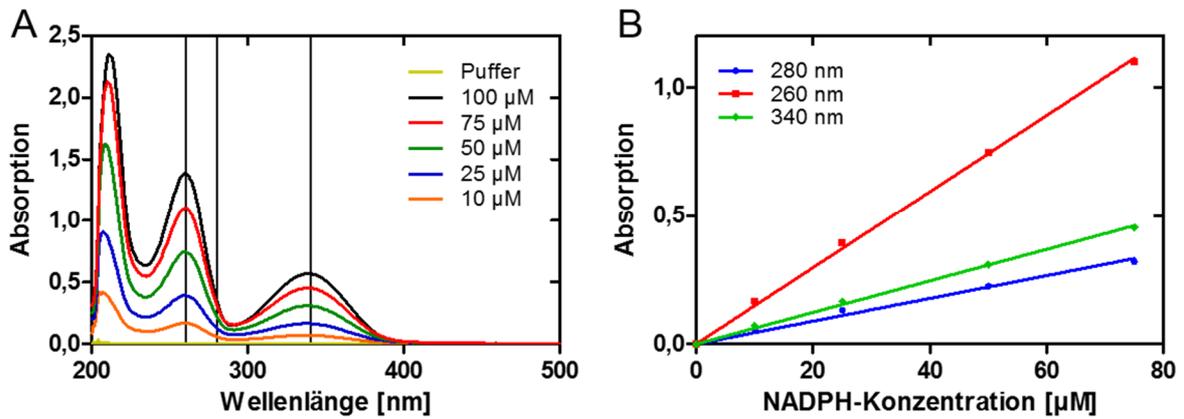


Abbildung 11: Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) von NADPH bei 260, 280 und 340 nm. (A) Absorptionsspektren von NADPH verschiedener Konzentrationen in Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2). Die vertikalen schwarzen Linien markieren die relevanten Wellenlängen (260, 280 und 340 nm). (B) Die Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) von NADPH bei 260, 280 und 340 nm erfolgte durch Auftragen der jeweiligen Absorptionswerte gegen die entsprechende NADPH-Konzentration.

Tabelle 12: Übersicht der ermittelten Extinktionskoeffizienten für NADPH.

Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient (ϵ) von NADPH [$\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$]
230	14.847
260	4.431
340	6.139

Die Berechnung der Proteinkonzentration des ternären Komplexes erfolgte mittels folgender Gleichung.

$$c_{\text{ternärer Komplex}} = \frac{A_{280 \text{ nm}} - \left(\frac{A_{340 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{NADPH } 340 \text{ nm}}} \right) \cdot \epsilon_{\text{NADPH } 280 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{LPOR } 280 \text{ nm}} \cdot d} \cdot MW_{\text{LPOR}}$$

$A_{280 \text{ nm}}$:	Absorption des ternären Komplexes bei 280 nm (Protein und NADPH)	
$A_{340 \text{ nm}}$:	Absorption des ternären Komplexes bei 340 nm (NADPH)	
$c_{\text{ternärer Komplex}}$:	Konzentration des ternären Komplexes	$\left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right]$
$\epsilon_{\text{NADPH } 280 \text{ nm}}$:	molekularer Extinktionskoeffizient von NADPH bei einer Wellenlänge von 280 nm	$\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
$\epsilon_{\text{NADPH } 340 \text{ nm}}$:	molekularer Extinktionskoeffizient von NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm	$\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
$\epsilon_{\text{LPOR } 280 \text{ nm}}$:	molekularer Extinktionskoeffizient der jeweiligen LPOR bei einer Wellenlänge von 280 nm	$\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \right]$
MW_{LPOR} :	Molekulargewicht der jeweiligen LPOR	$\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$
d :	Schichtdicke	[cm]

2.15.7 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [103]

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Durch eine Komplexbildung zwischen Protein und Natriumdodecylsulfat (SDS) wird die Polypeptidkette entfaltet (denaturierende Bedingungen) und dabei die proteineigene Ladung von der negativen Ladung des SDS überlagert. Daraus ergibt sich ein konstantes Masse-zu-Ladungs-Verhältnis, wodurch die Trennung von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts in einem elektrischen Feld ermöglicht wird. Die zu analysierenden Proben wurden auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Unlösliche Proteinproben (Pelletfraktion nach Zellaufschluss (Kapitel 2.15.1)) wurden analog zu der Probe mit den löslichen Proteinen angesetzt. Pro Gelspur wurden 10 µg Protein, bzw. ein äquivalentes Volumen der unlöslichen Pelletproben, aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde in einer „XCell SureLock™ Novex® Mini-Cell“ Gelkammer der Firma Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA), unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Gradientengels (NuPAGE® 4-12 % Bis-TRIS-Gel, Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland), durchgeführt. Hierbei wurde SDS-Laufpuffer verwendet und für eine Stunde eine konstante Spannung von 150 V angelegt. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurde als Referenz der Molekulargewichtsstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet.

SDS-Probenpuffer (5x)

TRIS	225	mM
SDS	5	%
Glycerin	50	% (v/v)
Bromphenolblau	0,05	%
Dithiothreitol	0,25	M

SDS-Laufpuffer (NuPAGE® MES-Puffer) (10x)

MES	500	mM
TRIS	500	mM
SDS	1	%
EDTA	10	mM
pH	7,3	

Molekulargewichtsstandard

„PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland)

10; 15; 25; 30; 40; 50; 70; 80; 115; 140 kDa

2.15.8 Kolloidal Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Gelen [104]

Nach der SDS-PAGE (Kapitel 2.15.7) wurden die SDS-Gele mehrfach mit Wasser gewaschen, anschließend mit Kolloidal Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung überschichtet und schüttelnd über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gele erneut mehrfach mit Wasser gespült und bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Wasser inkubiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland).

Färbelösung

<i>ortho</i> -Phosphorsäure	10	% (v/v)
Ammoniumsulfat	10	% (w/v)
Coomassie-Brilliant-Blau G250	0,12	% (w/v)
Methanol	20	% (v/v)

Die Zugabe des Coomassie-Brilliant-Blau G250 erfolgte langsam, zur Erzeugung kleiner Pigmentkolloide. Die Färbelösung wurde in einer abgedunkelten Flasche bei Raumtemperatur gelagert.

2.16 Produktion, Extraktion und Reinigung von Protochlorophyllid

2.16.1 Produktion von Protochlorophyllid in *R. capsulatus*-Flüssigkulturen

Zur Produktion des kommerziell nicht erhältlichen LPOR-Substrats Protochlorophyllid (Pchlid) wurde der Stamm *R. capsulatus* ZY5 verwendet, in welchem das *bchL*-Gen, kodierend für eine Untereinheit der lichtunabhängigen Protochlorophyllid-Oxidoreduktase (*dark operative protochlorophyllide oxidoreductase*, DPOR), deletiert wurde [90]. Dieser Stamm ist somit nicht in der Lage Pchlid in Chlorophyllid (Chlid) umzusetzen, wodurch das Pchlid akkumuliert und in das Medium abgegeben wird. Die Kultivierung von *R. capsulatus* ZY5 zur Isolation von Pchlid erfolgte wie in Kapitel 2.7.1.3 beschrieben. Die Isolierung des Pchlids aus den entsprechenden Kulturen erfolgte durch die Zugabe hydrophober Polyurethan (PU)-Würfel, welche das Pchlid adsorbieren. Die verwendeten PU-Würfel hatten eine Kantenlänge von etwa einem Zentimeter und wurden vor Gebrauch autoklaviert und getrocknet. Die PU-Würfel (2 Würfel pro 100 ml Kulturvolumen) wurden nach der Inokkulation zu den Kulturen gegeben. Die zuvor weißen, im Medium schwimmenden, PU-Würfel wurden durch das daran bindende Pchlid dunkelgrün und sanken auf den Boden der Kultur (Abbildung 12 A). Reichte die Bindekapazität der in der Kultur befindlichen PU-Würfel nicht aus, so konnte dies anhand grüner

Aggregate, welche sich auf dem Kulturboden absetzen, beobachtet werden. Befanden sich mehr PU-Würfel als nötig in der Kultur, so war dies daran zu sehen, dass die PU-Würfel zur Mitte nur schwach oder gar nicht verfärbt waren und diese nicht auf den Boden der Kultur absanken. Nach 24 bis 36 Stunden wurden die PU-Würfel aus der Kultur entfernt, mit Tricinpuffer gewaschen (Abbildung 12 B) und bis zu ihrem weiteren Gebrauch im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

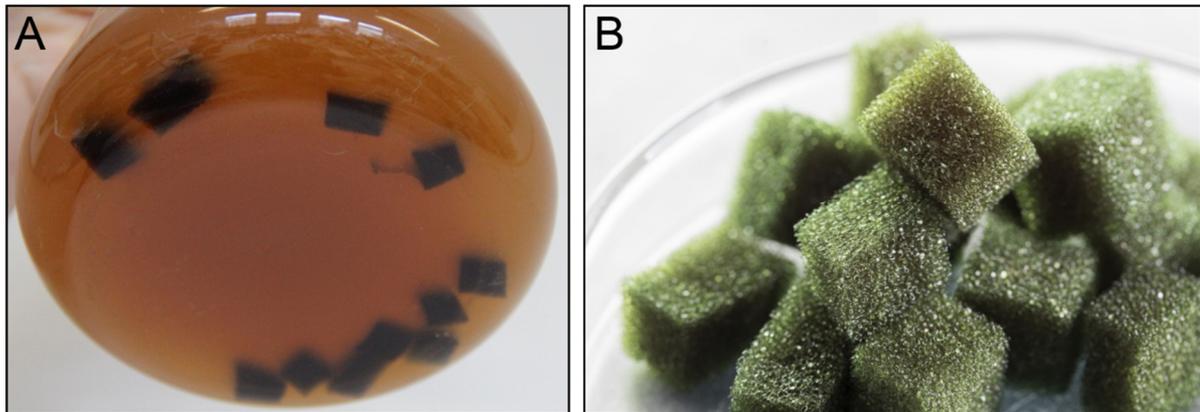


Abbildung 12: PU-Würfel mit gebundenem Pchlid. (A) Zur Produktion des Pchlids wurde *R. capsulatus* ZY5 verwendet, welcher eine Deletion des *bchL*-Gens aufweist. Dadurch kann das gebildete Pchlid nicht umgesetzt werden und wird in das Medium abgegeben. Das Pchlid bindet an die in der Kultur befindlichen hydrophoben PU-Würfel, welche dadurch auf den Boden des Erlenmeyerkolbens absinken. (B) Nach 24- bis 36-stündiger Kultivierung wurden die PU-Würfel geerntet und mit Tricinpuffer (Kapitel 2.16.1) gewaschen. © Forschungszentrum Jülich / Sascha Kreklau.

Tricinpuffer

Tricin	10	mM
pH	7,5	

2.16.2 Protochlorophyllid-Extraktion

Zur Reinigung des Pchlids wurden ca. 50 Pchlid-enhaltende PU-Würfel (Kapitel 2.16.1) zunächst mit Tricinpuffer gewaschen, um eventuell anhaftende Zellen aus den Würfeln zu entfernen und so eine Verunreinigung durch andere Pigmente, ausgelöst durch ein Lysieren der Zellen, zu minimieren. Die gewaschenen PU-Würfel wurden anschließend mit 100 % Methanol überschichtet und gewaschen, wobei sich das Pchlid von den PU-Würfeln löst. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis das gebundene Pchlid quantitativ von den Würfeln entfernt wurde (Entfärbung der PU-Würfel) und als methanolisches Extrakt vorlag.

Um Verunreinigungen durch zurückgebliebenes Zellmaterial zu entfernen, wurde das Pchlid-Extrakt in drei Schritten filtriert. Zunächst wurde das Extrakt mit Hilfe eines Glasfaserfilters (Sartorius, Göttingen, Deutschland) vorfiltriert und anschließend in zwei Schritten mittels Cellulose-Acetatfilter (Porengröße 0,8 µm und 0,45 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland) von kleineren Verunreinigungen befreit. Für

alle Schritte wurde eine Membran-Vakuumpumpe (KNF Neuberger N 726.3 FT.18, KMF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet. Das so von groben Verunreinigungen befreite Extrakt wurde anschließend mit Tricinpuffer (Kapitel 2.16.1) auf eine Methanolkonzentration von 40 % verdünnt. Die weitere Reinigung erfolgte mittels Festphasenextraktion (Kapitel 2.16.3).

2.16.3 Protochlorophyllid-Reinigung mittels Festphasenextraktion

Die Reinigung des Pchlids erfolgte mit Hilfe von C18-Säulenmaterial (Sep-Pak®, Waters Corporation, Milford, MA, USA; Partikelgröße 55-105 µm), welches aus Oktadecylresten besteht, welche kovalent an Kieselgel gebunden sind. Diese Alkylreste verleihen dem Kieselgel eine hydrophobe Oberfläche, wodurch das ebenfalls hydrophobe Pchlid durch hydrophobe Wechselwirkungen am C18-Säulenmaterial gebunden wird. Mit Methanol kann das Pchlid von der Säule eluiert werden. Die Reinigung erfolgte an dem FPLC-System ÄKTAbasic™ (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland), welches für den Einsatz von Lösemitteln mit speziellen Schläuchen (Material: Polyetheretherketon), Fittings (Material: Polyetheretherketon) und einer Entgasungseinheit (Jasco X-LC™, 3080-DG Degasser, JASCO Deutschland GmbH, Pfungstadt, Deutschland) ausgerüstet wurde. Eine druckresistente Chromatographiesäule (ECO^{PLUS}SR TAC15/500LGO-SR-2, YMC Europe GmbH, Dinslaken, Deutschland) wurde mit ca. 35 g des C18-Materials gepackt, woraus sich ein Säulenvolumen (SV) von 75 ml und eine Trennstrecke von 42,5 cm ergaben.

Nachdem die C18-Säule mit drei Säulenvolumen 40 % Methanol / 60 % Tricinpuffer (Kapitel 2.16.1) äquilibriert wurde, wurde das mit Tricinpuffer verdünnte methanolische Pchlid-Extrakt (40:60 Methanol:Tricinpuffer) (Kapitel 2.16.2) auf die Säule gegeben (Abbildung 13). Bei dieser Methanolkonzentration bindet das Pchlid an das C18-Säulenmaterial. Bereits durch längeres Spülen mit 40 % Methanol / 60 % Tricinpuffer konnten weniger hydrophobe Komponenten vom Pchlid getrennt werden (Abbildung 13, 40 %). Durch die Erhöhung der Methanolkonzentration auf 50 % (nach 2 SV) und später 60 % (nach 25 SV) wurden weitere Komponenten abgetrennt (Abbildung 13, 50 % und 60 %). Bei 60 % Methanol erfolgte bereits eine langsame Elution des Pchlids, diese war jedoch deutlich langsamer als die der sich zuvor lösenden Komponenten, sodass eine Trennung dieser gewährleistet war. Sobald die Methanolkonzentration auf 75 % gesteigert wurde (nach 11 SV mit 60 % Methanol), wurde die Elution des Pchlids endgültig eingeleitet (Abbildung 13, 75 %). Stärker hydrophobe Komponenten blieben bei dieser Konzentration jedoch noch an dem C18-Säulenmaterial haften und wurden so ebenfalls von Pchlid getrennt. Zur Regenerierung des Säulenmaterials wurde mit 100 % Methanol gewaschen und die Säule in 100 % Methanol gelagert.

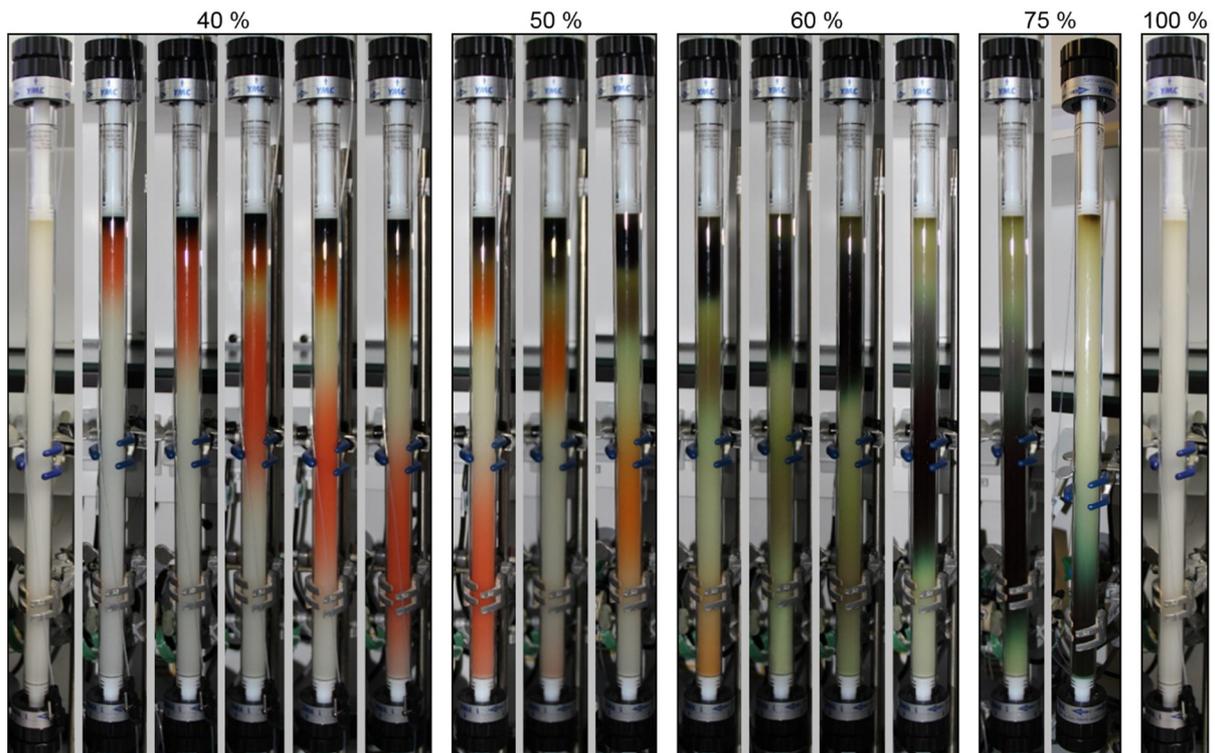


Abbildung 13: Pchlid-Reinigung über Festphasenextraktion. Die Reinigung des durch *R. capsulatus* produzierten Pchlids erfolgte über C18-Material am FPLC-System ÄKTAbasic. Durch die schrittweise Erhöhung der Methanolkonzentration wurden zunächst weniger hydrophobe Pigmente, wie z. B. Karotinoide, von der Säule gespült und so vom Pchlid getrennt. Bei 75 % Methanol erfolgte die Elution des Pchlids, wobei hydrophobere Substanzen weiter auf der Säule verweilten.

Das gereinigte Pchlid wurde nun mit Tricinpuffer (Kapitel 2.16.1) auf eine Konzentration von $\leq 25\%$ verdünnt (Abbildung 14 A) und mittels Diethylether extrahiert. Hierfür wurde das verdünnte Pchlid-Eluat in einem Scheidetrichter mit wasserfreiem Diethylether überschichtet und ausgeschüttelt (Abbildung 14 B). Im Anschluss an die Phasentrennung wurde die wässrige Phase von der Diethylether-Phase getrennt. Dieser Schritt wurde solange wiederholt, bis das Pchlid vollständig aus der wässrigen Phase extrahiert wurde, was anhand der Entfärbung der wässrigen Phase beobachtet werden konnte. Das so erhaltene Pchlid-Diethyletherextrakt wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und über einen Faltenfilter vom Magnesiumsulfat getrennt. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (Rotavapor® R-100, Büchi, Flawil, Schweiz) wurde der Diethylether verdampft und das getrocknete Pchlid (Abbildung 14 C) unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln gelagert. Zur Verwendung des Pchlids wurde dieses in 100 % Methanol gelöst und abgedunkelt auf Eis aufbewahrt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie in Kapitel 2.16.5 beschrieben.

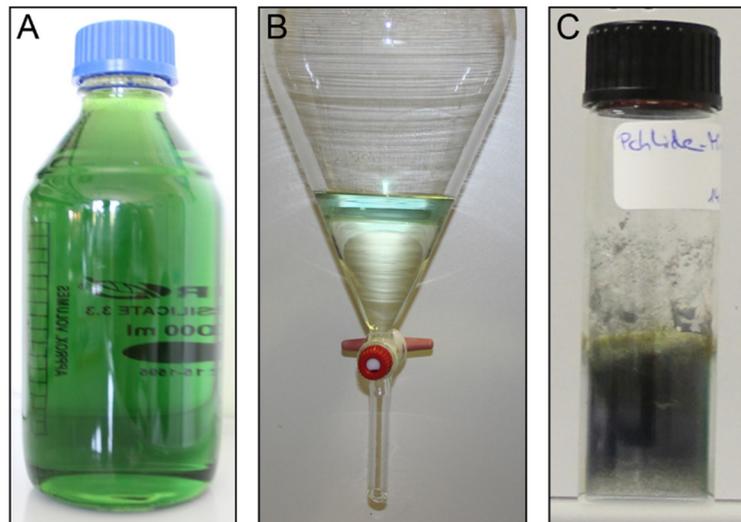


Abbildung 14: Pchlid-Gewinnung und Trocknung. (A) Das gereinigte Pchlid wurde mit Tricinpuffer auf eine Methanolkonzentration von $\leq 25\%$ verdünnt und (B) einer Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Diethylether unterzogen. Das Diethylether-Pchlidextrakt wurde zunächst mit Magnesiumsulfat getrocknet und der Diethylether dann mit Hilfe eines Rotationsverdampfers abgezogen. (C) Das getrocknete Pchlid wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.16.4 Trennung und Identifizierung von Monovinyl und Divinyl-Protochlorophyllid

2.16.4.1 Analytische Trennung und Identifizierung mittels LC-MS

Das von *R. capsulatus* ZY5 produzierte Pchlid besteht aus einer Mischung von Monovinyl (MV)- und Divinyl (DV)-Pchlid [105] (Abbildung 15).

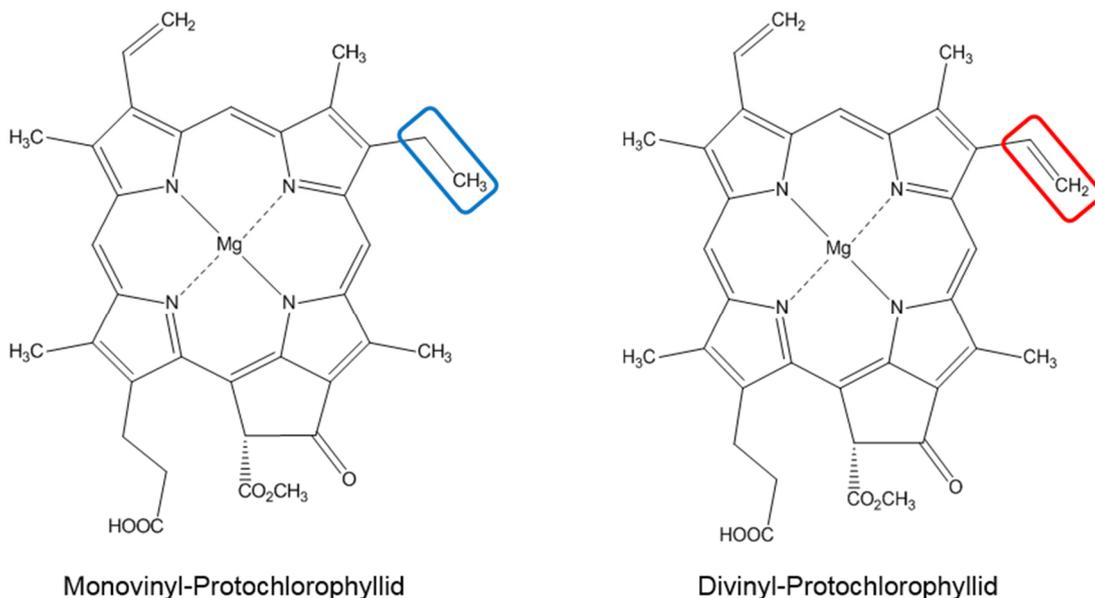


Abbildung 15: Strukturformel von MV- und DV-Pchlid. Die durch den blauen und roten Kasten markierten Strukturen zeigen den einzigen strukturellen Unterschied zwischen MV- und DV-Pchlid auf.

Damit die verschiedenen LPORs auf ihre MV/DV-Pchlid-Substratspezifität hin untersucht werden konnten, mussten die beiden Formen voneinander getrennt werden. Zunächst wurde eine analytische

Trennung der beiden Komponenten an einer *high performance liquid chromatography* (HPLC) mit gekoppelter Massenspektrometrie (MS) durchgeführt, um die eindeutige Identifizierung der Komponenten zu ermöglichen. Diese Arbeiten wurden in der Shimadzu Laborwelt der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) mit der Hilfe von Herrn Bollig durchgeführt. Für die chromatographische Trennung wurde eine analytische C30-Säule (ISAspher 200-5 C30-CXT, ISERA GmbH, Düren, Deutschland) mit einer Trennstrecke von 250 mm und einem Durchmesser von 4,6 mm verwendet. Zunächst wurde das Pchlid-Gemisch (Kapitel 2.16.3) in Methanol gelöst und auf eine ungefähre Konzentration von 200 µM mit Methanol eingestellt. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Ofentemperatur von 35 °C über einen Gradienten (Tabelle 13) unter Verwendung einer Ammoniumacetatpuffer/Methanol Mischung (siehe unten). Die Identifikation der mittels HPLC getrennten Komponenten erfolgte durch ein hybriden Ionenfallen (*ion trap*, IT)-Flugzeit (*time of flight*, TOF)-Massenspektrometer (LCMS-IT-TOF™, Shimadzu, Duisburg, Deutschland). LCMS-IT-TOF Instrumente sind hierbei, aufgrund ihrer verbesserten Genauigkeit und Sensitivität, klassischen IT-MS und TOF-Massenspektrometern, insbesondere bei der Strukturbestimmung von Naturstoffen, deutlich überlegen. In IT-TOF-Massenspektrometern werden die Analyten zunächst mittels einer Ionenquelle (*electrospray ionization* (ESI)-Quelle) durch Elektronensprayionisation ionisiert, im Q-Array fokussiert und in der Ionenfalle einer Stoßfragmentierung durch Argon unterzogen. Die Ionenfalle dient außerdem als Startpunkt für die Massenbestimmung im Flugrohr. Die Messung im MS¹-Modus erfolgte bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 150 bis 1000 und einer Ionenakkumulationszeit im Octopole von 20 ms. Die Messparameter im MS²-Modus wurden zum MS¹-Modus gleich gehalten, lediglich die Ionenakkumulationszeit wurde auf 40 ms verlängert. Alle Messungen erfolgten im positiven Messmodus.

Laufmittel A

Ammoniumacetat	5	mM
Methanol	30	% (v/v)
pH	6	

Laufmittel B

Methanol	100	%
----------	-----	---

Ammoniumacetat wurde von der Firma Fluka (≥ 99 % Reinheitsgrad, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und Methanol in HPLC-Reinheitsgrad von der Firma Fisher Chemical (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) bezogen.

Tabelle 13: Gradient zur Trennung von MV- und DV-Pchlid.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	5	95
2	5	95
25	0	100
45	0	100
45,01	5	95
50	5	95

2.16.4.2 Präparative Trennung von MV- und DV-Pchlid

Um die durch die analytische Trennung mit anschließender Massenspektrometrie (Kapitel 2.16.4.1), eindeutig zugeordneten Komponenten des Pchlid-Mixes quantitativ zu trennen und so eine substratspezifische Aktivitätsmessung der verschiedenen LPORs durchführen zu können, mussten das MV- und das DV-Pchlid präparativ getrennt werden. Die Trennung erfolgte mittels des FPLC-Systems ÄKTAbasic™ (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland) unter Verwendung einer präparativen C30-Säule (ISAspher 200-5 C30-CXT, ISERA GmbH, Düren, Deutschland) mit einer Trennstrecke von 250 mm und einem Durchmesser von 20 mm. Das FPLC-System wurde hierzu, wie in Kapitel 2.16.3 beschrieben, für den Einsatz organischer Lösungsmittel adaptiert. Zudem wurde für die präparative MV/DV-Pchlid-Trennung ein Säulenofen (Gynkotec STH 585, Gynkotec, Dionex, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) verwendet, um reproduzierbare Trennbedingungen zu gewährleisten. In Tabelle 13 ist der verwendete Gradient dargestellt. Die Flussrate wurde im Vergleich zur analytischen Trennung von 1 ml/min auf 15 ml/min erhöht. Die Säulenofentemperatur betrug wie bei der analytischen Trennung 35 °C. Für die Trennung wurden 8 ml eines hoch konzentrierten Pchlid-Gemischs zunächst zentrifugiert (2.915 xg, 10 Minuten) um Pchlidaggregate abzutrennen und dann mit Hilfe einer Probenschleife auf die Säule gegeben. Im Anschluss an die Trennung wurden sowohl das MV-Pchlid als auch das DV-Pchlid, wie in Kapitel 2.16.3 beschrieben, verdünnt und durch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion in Diethylether überführt und getrocknet. Die Lagerung erfolgte ebenfalls unter einer Argon-Schutzatmosphäre bei -20 °C im Dunkeln.

Laufmittel A

Ammoniumacetat 5 mM
pH 6

Laufmittel B

Methanol 100 %

Nach der Herstellung wurde der Ammoniumacetatpuffer mit 30 % (v/v) Methanol versetzt.

Ammoniumacetat wurde von der Firma Fluka (≥ 99 % Reinheitsgrad, Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und Methanol in HPLC-Reinheitsgrad von der Firma Fisher Chemical (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bonn, Deutschland) bezogen.

2.16.5 (MV/DV-) Pchlid-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung einer (MV/DV-) Pchlid-Lösung wurden diese mit Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) auf eine Methanolkonzentration von 5 % verdünnt. Außerdem wurde Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,03 % zugesetzt. Als Referenz diente der Lagerpuffer. Mit Hilfe eines Spektralphotometers (Cary 60, Agilent Technologies, Ratingen, Deutschland) wurde ein Spektrum von 400 nm bis 720 nm aufgenommen. Über das Lambert-Beer'sche Gesetz (Kapitel 2.15.6.2) und der Absorption bei 632 nm (Q_y -Bande, siehe Abbildung 16) sowie der Verwendung des Extinktionskoeffizienten für Pchlid in wässriger Lösung von $23.950 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ [106, 107] konnte die Konzentration des Pchlids bestimmt werden.

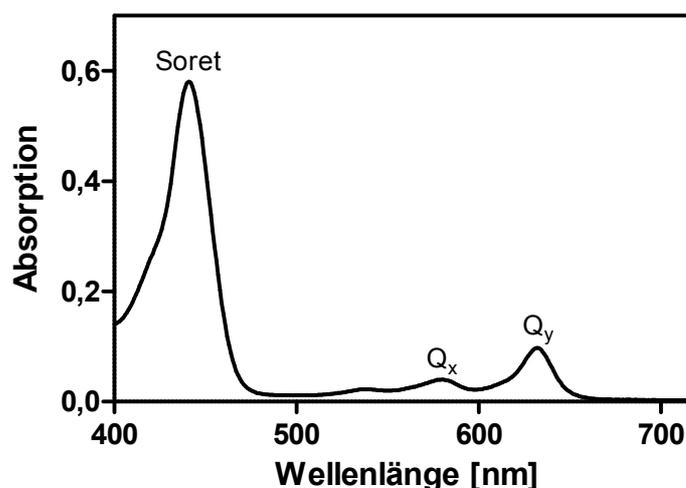


Abbildung 16: Pchlid-Absorptionsspektrum. Typisches Pchlid-Absorptionsspektrum mit den drei Maxima (Soret-Bande, Q_x -Bande und Q_y -Bande).

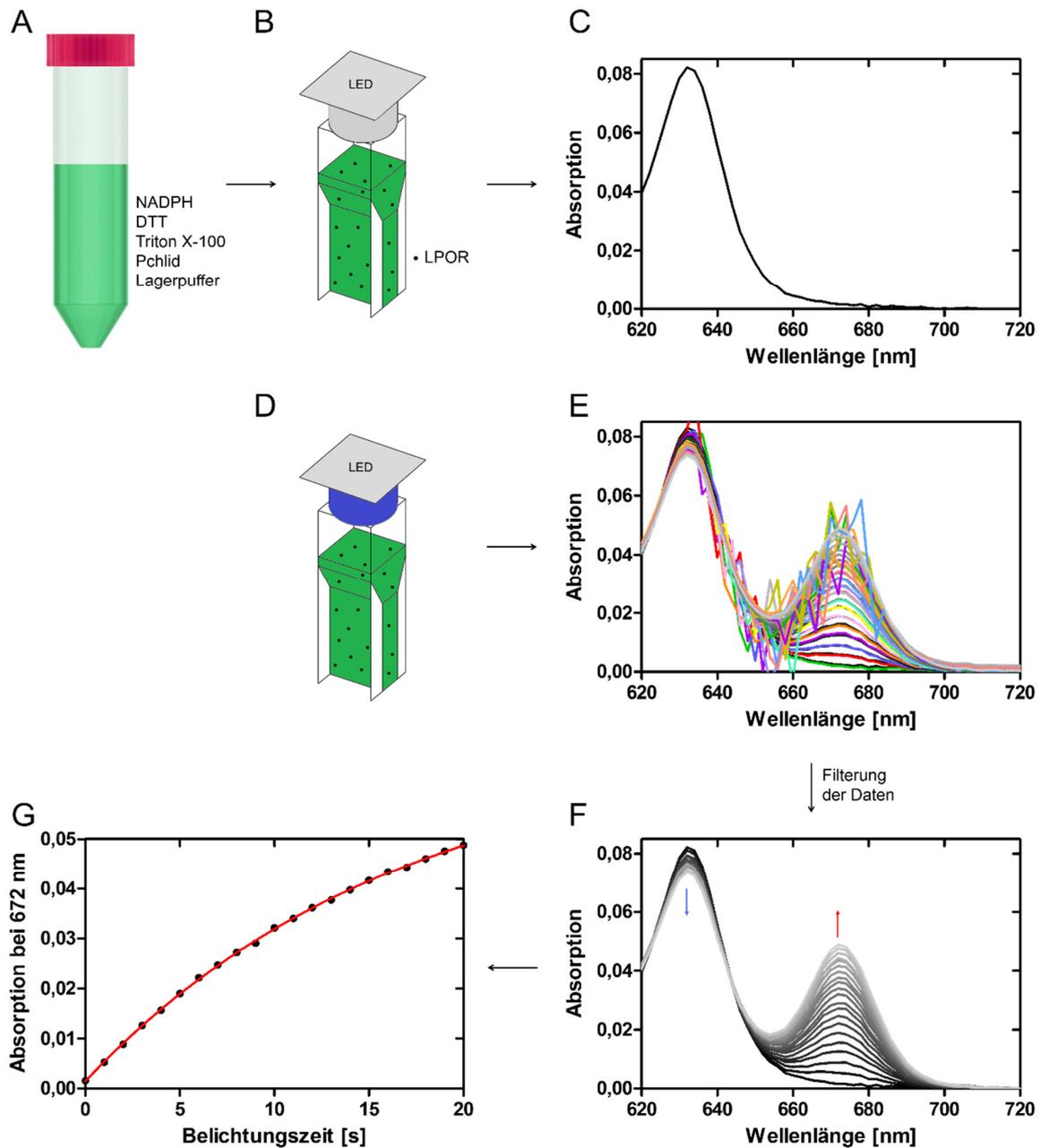


Abbildung 18: Schema zur Messung und Auswertung der Aktivität. Zur Bestimmung der lichtabhängigen Enzymaktivität wurde zunächst (A) ein Mastermix aus NADPH, DTT, Triton X-100, Pchlid und Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) hergestellt. Dieser wurde im Dunkeln auf Eis gelagert. (B) Die zu testende LPOR wurde in einer Kuvette vorgelegt, mit dem Mastermix vermisch, die LED auf der Kuvette angebracht und in der Probenkammer des Spektralphotometers für fünf Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde (C) die serielle Aufnahme von Absorptionsspektren zwischen 620 nm und 720 nm gestartet. Nachdem ein erstes (Dunkel-)Spektrum aufgenommen wurde, wurde (D) die Blaulicht-LED (2,6 mW/cm², $\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ nm}$) über den „Arduino UNO Mikrokontroller“ mit Hilfe eines Arduino.cc Skripts angeschaltet und mittels eines Zeitprogramms in definierten Zeitintervallen Absorptionsspektren aufgenommen. (E) Die daraus resultierenden Spektren wurden (F) über ein Shell-Skript (Kapitel 6.2 im Anhang) gefiltert und auf den Wert von 720 nm normiert. (G) Des Weiteren wurden über das Shell-Skript die Absorptionswerte bei 672 nm (DV-Pchlid oder Pchlid-Mix) oder 670 nm (MV-Pchlid) passend zu der Belichtungszeit extrahiert.

In Abbildung 18 ist die Durchführung zur Messung der LPOR-Aktivität schematisch dargestellt. Zunächst wurde ein Mastermix aus NADPH, DTT, Triton X-100, Pchlid und Lagerpuffer (siehe Seite 54) für eine Dreifachbestimmung angesetzt. Dieser Mastermix wurde im Dunkeln auf Eis gelagert. Als

Nächstes wurde die auf ihre Aktivität zu prüfende LPOR in einer Küvette vorgelegt, der Mastermix hinzugegeben, gut gemischt und dieser Ansatz in der Probenkammer des Spektralphotometers für fünf Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Blaulicht-LED auf der Küvette angebracht und die Aktivitätsmessung gestartet. Hierzu wurden mit Hilfe des Spektralphotometers Cary 60 (Agilent Technologies, Ratingen, Deutschland) Spektren von 620 nm bis 720 nm in einem Intervall von 2 nm, einer Scanrate von 1.200 nm/min, einem Zyklus von 0,1 Minuten und einer *signal averaging time* von 0,1 Sekunden über eine Dauer von sechs Minuten aufgenommen. Nachdem mindestens ein Spektrum ohne vorherige Belichtung aufgezeichnet wurde, wurde die Blaulicht-LED über den „Arduino UNO Mikrokontroller“ mit einer Intensität von 100 % (2,6 mW/cm²) angeschaltet. Hierzu wurde ein Arduino.cc Skript ([http:// www.iet.uni-duesseldorf.de / unsere-arbeitsgruppen / unsere-arbeitsgruppen / molecular-biophotonics-dr-krauss / links-and-resources / 48300.html](http://www.iet.uni-duesseldorf.de/unsere-arbeitsgruppen/unsere-arbeitsgruppen/molecular-biophotonics-dr-krauss/links-and-resources/48300.html)) verwendet, welches die LED in regelmäßigen Intervallen an- und wieder ausschaltete. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden im Regelfall ein 1-sekündiges Lichtintervall und ein 11-sekündiges Dunkelintervall verwendet. Für einige Messungen wurden die Einstellungen so abgewandelt, dass die LED in 18-sekündigen Intervallen für sechs Sekunden leuchtete.

Zur Auswertung der Daten wurde ein Shell-Skript (Kapitel 6.2 im Anhang) verwendet, welches die Daten aufgrund von „Licht-An“-Ereignissen filterte und auf den Wert bei 720 nm normierte, um eine eventuell auftretende Basislinien-Verschiebung während der Messung auszugleichen (Abbildung 18 E-F). Die zur Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit benötigten Daten (Absorption bei 670 nm oder 672 nm) wurden durch das Shell-Skript der entsprechenden Belichtungszeit zugeordnet und in einer neuen Datei gespeichert. Für die Auswertung wurden die Absorptionswerte bei 670 nm (MV-Pchlid) bzw. 672 nm (DV-Pchlid oder Pchlid-Mix) und damit die Produktion von Chlorophyllid gegen die Belichtungszeit geplottet und so die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit mit Hilfe einer linearen Regression ermittelt. Diese konnte zur Berechnung der spezifischen Aktivität (Kapitel 2.17.5) verwendet werden.

Assay-Zusammensetzung

NADPH	160	μM
DTT	70	mM
Triton X-100	0,03	% (v/v)
Pchlid (Mix, MV oder DV)	3,5	μM
LPOR	0,17	μM
ad 1 ml Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2)		

2.17.1 Qualitative Aktivitätsmessung von LPORs unter Verwendung von Rohextrakten

Konnte ein Protein nicht in ausreichender Menge produziert oder nicht gereinigt werden, so wurde eine qualitative Aktivitätsmessung durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.15.1 beschrieben, mittels EmulsiFlex-C5 aufgeschlossen und die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen, mittels Zentrifugation, getrennt. Der Assay wurde, wie in Kapitel 2.17 beschrieben, angesetzt, jedoch wurden anstelle der 10 µl gereinigten Proteins 250 µl des jeweiligen Rohextraktes verwendet und entsprechend weniger Lagerpuffer eingesetzt (Gesamtvolumen: 1 ml). Die Durchführung der Aktivitätsmessung erfolgte ebenso wie für die gereinigten Proteine (Kapitel 2.17), jedoch wurde das Belichtungsintervall von einer Sekunde auf sechs Sekunden erhöht.

2.17.2 Ermittlung des pH-Aktivitätsoptimums

Für die Untersuchung der LPOR-Aktivität bei verschiedenen pH-Werten wurden Aktivitätsmessungen analog zu der in Kapitel 2.17 beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurde als Substrat der Pchlid-Mix verwendet und der Lagerpuffer durch Puffer verschiedener pH-Werte ausgetauscht. Aktivitätsmessungen erfolgten im pH-Bereich von pH 5,5 bis pH 10 unter Verwendung geeigneter Puffer. Da das Puffersystem einen Einfluss auf die Aktivität eines Proteins haben kann, wurde die Aktivität der Proteine bei pH 7,5 in Natriumphosphatpuffer und TRIS-Puffer gemessen. Außerdem wurde die Aktivität bei pH 9 in TRIS-Puffer und Glycinpuffer getestet. Die Auswertung erfolgte ebenfalls wie in Kapitel 2.17 beschrieben.

Natriumphosphatpuffer

<u>Komponente A</u>			<u>Komponente B</u>		
Na ₂ HPO ₄	200	mM	NaH ₂ PO ₄	200	mM
NaCl	500	mM	NaCl	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)	Glycerin	20	% (v/v)

Komponente A und B wurden so gemischt, dass Puffer mit pH-Werten von 5,5 bis 7,5 in 0,5er Schritten vorlagen.

TRIS-Puffer

TRIS	200	mM
NaCl	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)
pH	7,5 bis 9 (in 0,5er Schritten)	

Glycinpuffer

Glycin	200	mM
NaCl	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)
pH	9 bis 10 (in 0,5er Schritten)	

2.17.3 Ermittlung des Temperatur-Aktivitätsoptimums

Zur Bestimmung der Temperatur-Aktivitätsoptima der in dieser Arbeit untersuchten LPORs wurden Aktivitätsmessungen mittels der in Kapitel 2.17 beschriebenen Methode durchgeführt, jedoch wurde die Temperatur während der 5-minütigen Inkubation, sowie während der Aktivitätsmessung, angepasst. Die Inkubation erfolgte von 10 °C bis 55 °C in 5 °C Schritten. Dabei wurde als Substrat der Pchlid-Mix verwendet. Aufgrund starker pH-Wert Schwankungen des Lagerpuffers (500 mM NaCl, 20 % Glycerin, 20 mM TRIS, pH 7,5) bei verschiedenen Temperaturen, wurde der pH-Wert des Lagerpuffers für diese Messung bei der entsprechenden Temperatur eingestellt. Dafür wurde ein Liter des Lagerpuffers angesetzt, der pH-Wert jedoch zunächst nicht eingestellt. Nun wurden je 50 ml des Lagerpuffers in einem Kühl- und Heiz-Thermomixer (MKR 23, HLC BioTech, Bovenden, Deutschland) auf die entsprechende Temperatur gebracht und der pH-Wert eingestellt. Die tatsächliche Temperatur der Assay-Lösung in der Küvette wurde unter identischen Temperaturbedingungen in einem Vorversuch ermittelt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls wie in Kapitel 2.17 beschrieben.

2.17.4 Enzymkinetische Untersuchungen zur Untersuchung der MV/DV-Pchlid-Substratspezifität

Für die Ermittlung der MV/DV-Pchlid-Substratspezifität der jeweiligen LPOR-Enzyme wurden enzymkinetische Untersuchungen, unter Verwendung von MV-Pchlid und DV-Pchlid als Substrat, durchgeführt. Die Messung der Aktivität erfolgte wie in Kapitel 2.17 beschrieben. Für eine kinetische Untersuchung wurde die MV- und DV-Pchlid-Konzentration variiert. Hierzu wurde vor Beginn der Messung eine MV- bzw. DV-Pchlid-Stocklösung angesetzt, welche eine Mindestkonzentration von 140 µM aufwies, sodass Pchlid-Konzentrationen zwischen 0 µM und 7 µM im Assay eingesetzt werden konnten ohne eine Methanolkonzentration von 5 % (v/v) zu überschreiten. Die Methanolkonzentration wurde in jedem Assay auf 5 % (v/v) eingestellt. Hierzu wurde dem Mastermix zunächst die entsprechende Menge Pchlid-Stocklösung zugegeben, um die jeweilig gewünschte Assay-Konzentration zu erhalten und dann das entsprechende Volumen Methanol zugesetzt. Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 2.17 beschrieben. Die spezifische Aktivität wurde gegen die MV- bzw. DV-Pchlid-Konzentration aufgetragen und die Daten an die „Michaelis-Menten“-Funktion und eine „Substrat-

Inhibition“-Funktion angepasst. Die exakte MV/DV-Pchlid-Konzentration im jeweiligen Assay wurde aus der Absorption des unbelichteten Reaktionsgemisches bestimmt (Kapitel 2.16.5).

„Michaelis-Menten“-Funktion
$$Y = \frac{V_{\max} \cdot X}{K_m + X}$$

„Substrat-Inhibition“-Funktion
$$Y = \frac{V_{\max} \cdot X}{K_m + X \cdot \frac{1+X}{K_i}}$$

V_{\max} maximale Umsatzgeschwindigkeit

K_m Michaelis-Menten Konstante

K_i Inhibierungskonstante

2.17.5 Berechnung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der LPOR-Enzymaktivität wurde die lichtabhängige Zunahme der Chlorophyllid-Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe des Programms Origin 7G wurden die experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung angepasst.

$$Y = (Y_0 - Y_\infty) \cdot e^{-k \cdot X} + Y_\infty$$

Y_0 Y-Achsenabschnitt

Y_∞ Y-Wert nach unendlicher Zeit

k Geschwindigkeitskonstante $\left[\frac{1}{\text{min}} \right]$

Für einen Aktivitätsvergleich der verschiedenen LPORs wurde die spezifische Aktivität berechnet. Hierfür wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit durch eine Regression im linearen Anfangsbereich, idealerweise bis maximal 10 % Umsatz, bestimmt.

Berechnung der spezifischen Aktivität: $A_{\text{spez}} = \frac{\frac{dA}{\text{min}} \cdot V}{\epsilon \cdot m \cdot d}$

A_{spez}	spezifische Aktivität	$\left[\frac{\text{U}}{\text{mg}}\right]$
dA/min	Absorptionsänderung pro Minute	
V	Gesamtvolumen des Assays	[L]
ϵ	Extinktionskoeffizient	$\left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}\right]$
m	Enzymmenge im Assay	[mg]
d	Schichtdicke	[cm]

Ein Unit (U) entspricht hier der Enzymmenge, die 1 μmol Pchlid pro Minute zu Chlid unter den angegebenen Pufferbedingungen bei 25 °C und bei Belichtung mit 2,6 mW/cm² Blaulicht ($\lambda_{\text{max}} = 448 \text{ nm}$) umsetzt. Die spezifische Aktivität (A_{spez}) entspricht der Enzymaktivität pro mg Enzym. Zur Quantifizierung des gebildeten Chlids wurde ein Extinktionskoeffizient für Chlid, bestimmt in wässriger Lösung, von $\epsilon_{670\text{nm}} = 69.950 \frac{\text{L}}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$ verwendet [106, 107].

2.17.6 Berechnung der Wechselzahl (k_{cat})

Für die Berechnung der Wechselzahl (k_{cat}) wurden die spezifische Aktivität (Kapitel 2.17.5), sowie das Molekulargewicht (Tabelle 11), des jeweiligen Enzyms benötigt. Die Multiplikation dieser beiden Werte ergibt die Wechselzahl mit der Einheit pro Minute. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurde k_{cat} (μmol Produkt pro Sekunde, pro Untereinheit) aus der maximalen Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}), welche mittels „Michaelis-Menten“-Anpassung der enzymkinetischen Daten ermittelt wurde, bestimmt.

Berechnung der Wechselzahl: $k_{\text{cat}} = A_{\text{spez}} \cdot \text{MW}$

A_{spez}	spezifische Aktivität	$\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}\right]$
MW	Molekulargewicht des Enzyms	$\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$

2.18 Bestimmung der Temperaturstabilität

Zur Messung der Temperaturstabilität (T_{stab}) wurde das Prometheus NT.Plex NanoDSF Instrument der Firma NanoTemper (München, Deutschland), unter Verwendung der Software „PR.TimeControl“, eingesetzt. Das NT.Plex Instrument erlaubt hierbei die parallele Bestimmung der Temperaturstabilität von bis zu zwölf Proben unter Verwendung sehr geringer Probenvolumina (10 μl). Hierzu finden *chips*

mit Quarzglas-Kapillaren (Prometheus NT.Plex nanoDSF *grade standard capillary chips*, NanoTemper, München, Deutschland) Verwendung. Das Messverfahren beruht dabei auf der Differential-Scanning-Fluorimetrie (*differential scanning fluorimetry*, DSF), wobei eine temperaturabhängige Entfaltung anhand einer Fluoreszenzänderung der aromatischen Aminosäuren (hauptsächlich Tryptophan) über die Zeit beobachtet wird. Aufgrund von Lösungsmittel-Relaxationsprozessen (*solvent relaxation*) verschiebt sich das Tryptophan-Emissionsmaximum bei Entfaltung des Proteins von 330 nm auf 350 nm. Diese Verschiebung wird quantifiziert, indem die Fluoreszenzemission der Proben kontinuierlich bei 330 nm und 350 nm gemessen wird. Die Geschwindigkeit der Entfaltung kann dann anhand des Plots des Verhältnisses der 350 nm zu 330 nm Emission abgeleitet werden. Die Thermostabilität der in dieser Arbeit untersuchten LPORs wurde bei verschiedenen Temperaturen über eine Dauer von je 30 Stunden gemessen. Zur Untersuchung der Thermostabilität des *Te*LPOR-Apoproteins und des entsprechenden ternären *Te*LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplexes wurde die Thermostabilität bei 60 °C gemessen. Die Präparation der Apo- und Holoprotein-Proben ist im nächsten Kapitel (Kapitel 2.18.1) beschrieben. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Messungen eine Proteinkonzentration von ca. 0,6 mg/ml verwendet.

2.18.1 Temperaturabhängige Entfaltung – Bestimmung der Schmelztemperatur

Zur Untersuchung des temperaturabhängigen Entfaltungsverhaltens der in dieser Arbeit untersuchten LPORs, wurde das Verfahren der Differential-Scanning-Fluorimetrie, unter Verwendung des Prometheus NT.Plex NanoDSF Instruments (NanoTemper, München, Deutschland), eingesetzt. Zur Steuerung des Gerätes, und zur Analyse der Daten, wurde die „RT.ThermControl“-Software verwendet. Hierbei wurde die Temperatur graduell von 15 °C auf 85 °C, mit einer Rate von 0,5 °C pro Minute erhöht. Wie in Kapitel 2.18 beschrieben, erfolgt die Quantifizierung der Entfaltung durch kontinuierliche Messung der Emission der Proben bei 330 nm und 350 nm. Aus der ersten Ableitung des Plots des Verhältnisses der 350 nm zu 330 nm Emission kann der Schmelzpunkt (T_m) der Probe ermittelt werden. An diesem Punkt liegen 50 % der Proteinmoleküle entfalten vor.

Zur Untersuchung des temperaturabhängigen Entfaltungsverhaltens des *Te*LPOR-Apoproteins und des entsprechenden ternären *Te*LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplexes, wurden diese Messungen analog zu den entsprechenden Apo- und Holoproteinproben durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte im Dunkeln. Die Protochlorophyllid-Lösung wurde im Vorfeld auf die gewünschte Konzentration eingestellt, sodass zu jeder Probe die gleiche Menge Protochlorophyllid-Lösung gegeben werden konnte. Die Methanolkonzentration wurde dabei immer auf 10 % eingestellt. Die Proben wurden so angesetzt, dass ein molares Verhältnis von *Te*LPOR zu NADPH und Pchlid von 1:0 bis

1:2 vorlag. Der Apoproteinprobe wurde aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls 10 % Methanol zugesetzt. Falls nicht anders angegeben, wurde für alle Messungen eine Proteinkonzentration von ca. 0,6 mg/ml verwendet. Alle Messungen erfolgten in Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2).

2.19 Ermittlung der Dissoziationskonstante (K_d)

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d), für den ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplex, erfolgte über eine Quantifizierung der Absorptionsänderung (Rotverschiebung) des Pchlid-Substrates bei Bindung an das Protein. Hierfür wurden für unterschiedliche molare Pchlid:Protein-Mischverhältnisse Absorptionsspektren von 400 nm bis 720 nm mit Hilfe des Cary 60 Spektralphotometers (Agilent Technologies, Ratingen, Deutschland) aufgenommen. Die LPOR-Konzentration wurde bei konstanter Pchlid-, NADPH- und Triton X-100-Konzentration variiert. Um den Einfluss von DTT auf die Bindung zu untersuchen, wurde die Messung ebenfalls unter Zusatz von 70 mM DTT durchgeführt. Als Referenz wurden alle Komponenten unter Verwendung der höchsten LPOR-Konzentration ohne die Zugabe von Pchlid gemischt und ein Absorptionsspektrum gemessen. Die Konzentrationen aller Zusätze (NADPH, Triton X-100 und DTT) entsprachen denen einer Aktivitätsmessung (Kapitel 2.17), wohingegen die Pchlid-Konzentration bei 2 μ M lag. Die LPOR-Konzentration wurde zwischen 0 μ M und 200 μ M variiert.

Die Auswertung erfolgte durch Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

2.20 Strukturanalysen

2.20.1 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (*small-angle X-ray scattering*, SAXS)

SAXS ist eine Kleinwinkelstreutechnik, bei der nanoskalige Dichteunterschiede in Proben quantifiziert werden können. Das bedeutet, dass es Größe und Form von monodispersen Makromolekülen auflösen kann. Aus diesem Grund eignet sich diese Methode für einen ersten Blick auf die Form von Proteinen. Für erfolgreiche Strukturanalysen mittels SAXS sind nicht-aggregierte Proteinproben von herausragender Bedeutung, da der Einfluss von Aggregaten (sichtbar bei kleinen Streuwinkeln) auf das Streuverhalten bei größeren Streuwinkeln nicht ausgeschlossen und/oder rechnerisch kompensiert werden kann. Außerdem ist für alle Auswertungen eine korrekte Subtraktion der Pufferstreuung notwendig. Um eine Aggregation der Proben weitgehend auszuschließen, wurden die, mittels Ni^{2+} -NTA und SEC gereinigten, Proteinproben (Kapitel 2.15.2 und 2.15.4) ausgehend von einer Startkonzentration von 0,5 mg/ml langsam weiter konzentriert (Kapitel 2.15.5). Proben mit definierter Proteinkonzentration (siehe Tabelle 14) wurden während des Konzentrationsvorgangs entnommen

und der dazugehörige Durchlauf aus den Zentrifugalkonzentratoren als Referenz für die jeweilige SAXS-Messung verwahrt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene LPOR-Apoproteinproben, sowie vergleichend eine Probe des ternären *TeLPOR/NADPH/Pchlid*-Holoprotein-Komplexes, mittels SAXS untersucht.

Die Probe des ternären *TeLPOR/NADPH/Pchlid*-Holoprotein-Komplexes wurde hergestellt, indem das Apoprotein (0,44 mg/ml, 11,6 μ M) mit Pchlid (11,0 μ M) und NADPH (11,1 μ M) in einem molaren Verhältnis von 1:1:1 für fünf Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls im Dunkeln durchgeführt. In allen Proben wurde eine Methanolkonzentration von 5 % nicht überschritten. Nach der Inkubation wurde die Probe, wie bereits für das Apoprotein beschrieben, mittels Zentrifugalkonzentratoren konzentriert (Kapitel 2.15.5). SAXS-Proben definierter Konzentration (Tabelle 14) und Pufferreferenzlösungen wurden, wie oben beschrieben, während des Konzentrationsvorgangs gewonnen.

Für den Transport der Proben wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle SAXS-Proben wurden kurz vor der Messung für 20 Minuten bei 21.000 xg und 4 °C zentrifugiert um eventuell vorhandene Aggregate oder Partikel abzutrennen.

Tabelle 14: Proteinkonzentrationen für SAXS-Messungen.

LPOR	Konzentration [mg/ml]			
	<i>DsLPOR</i>	0,56	1,21	2,94*
<i>E/ILPOR</i>	0,52	0,90*	3,11	5,96*
<i>E/ILPOR-cHis</i>	0,45	0,97*	3,53	7,48*
<i>TeLPOR-Apoprotein</i>	0,4	0,91*	3,17	6,83*
<i>TeLPOR-Holoprotein</i>	0,65	1,0	2,87	5,0 [#]

* Datensätze kombiniert für Analyse; [#] Datensatz verwendet für Analyse

Alle SAXS-Messungen wurden an der BM29 *beamline* [108] an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) bei 10 °C, unter Verwendung von 12,5 keV Röntgenstrahlung, mit einer Wellenlänge von 0,992 Å von Dr. Andreas Stadler (Jülicher Zentrum für Forschung mit Neutronen (JCNS) und *Institute of Complex Systems* (ICS), Forschungszentrum Jülich) und Dr. Ulrich Krauss (Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Als Detektor wurde der PILATUS 1M 2D [108] eingesetzt. Die Proteinproben wurden mit einem Fluss von 2,3 μ l/s durch eine 1 mm Quarzkapillare gepumpt und während der Messung der Fluss mit einer Kamera, unter Verwendung einer Kaltlichtquelle, überwacht. Um eine Anregung des Holoproteins durch die Kaltlichtquelle zu vermeiden, wurde ein Filter verwendet, welcher Licht außerhalb des spektralen Bereichs von 275 nm bis 375 nm blockiert. Die Pufferkontrollen

wurden jeweils vor und nach der entsprechenden Proteinprobe vermessen. Für jede Probe und Referenz wurden zehn Bilder mit einer Belichtungszeit von je drei Sekunden aufgenommen.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Dr. Ulrich Krauss (Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich). Die Daten wurden auf die jeweilige Proteinkonzentration skaliert und auf unendliche Verdünnung extrapoliert. Die Streudaten wurden unter Verwendung des ATSAS-Softwarepakets [109] analysiert und die SASX-Daten basierend auf dem Guinier-Plot auf das Vorhandensein von Aggregaten überprüft. Des Weiteren wurde das Porod-Volumen (V_p) für eine Abschätzung des Molekulargewichts der streuenden Partikel verwendet.

Für die finalen Datensätze der LPOR-Apoproteine aus unterschiedlichen Organismen, wurden jeweils Datensätze einer niedrigen und hohen Proteinkonzentration zusammengefasst (Tabelle 14). Dabei wurden die Daten der Proben mit niedrigen Proteinkonzentrationen für den kleinen q -Bereich und die Daten der Proben mit hohen Proteinkonzentrationen für den hohen q -Bereich verwendet. Für das *TeLPOR*-Holoprotein wurden die SAXS-Daten bei hoher Proteinkonzentration (5 mg/ml), als finaler Datensatz, verwendet. Die Abstandsverteilungsfunktion $P(r)$ wurde unter Verwendung des Programms DATGNOM [110] bestimmt. Durch die Verwendung der Programme GASBORP [111], DAMMIF [112] und DAMMIN [113], wurden *ab initio*-Modelle der monomeren Apoproteine erstellt. Für jeden Datensatz wurden 20 *ab initio*-Modelle erzeugt. Die theoretischen Streukurven verschiedener monomeren Apoprotein-Homologiemodelle wurden unter Verwendung des Programms CRY SOL [114] an die experimentellen SAXS-Daten angepasst. Alle Homologiemodelle wurden von Dr. Marco Bocola (Protedes, Sankt Augustin, Deutschland), basierend auf der Sequenz des *TeLPOR*-Proteins oder eines bereits publizierten Homologiemodells der LPOR aus *Synechocystis* sp. (*SsLPOR*) [58] erzeugt. Die *ab initio*-Modelle des dimeren *TeLPOR*-Holoproteins wurden mit GASBORMX [111] erstellt. Dabei werden *ab initio*-Modelle des symmetrischen Oligomers, unter Annahme einer polydispersen Probe, mit einem bestimmten Anteil an Monomeren berechnet. Hierzu wurde ein fester Monomeranteil von 58 % verwendet und ebenfalls 20 *ab initio*-Dimermodelle (P2-Symmetrie) erzeugt. Die DAMMIF, DAMMIN, GASBORP (Apoprotein-Monomer) und GASBORMX (Holoprotein-Dimer) *ab initio*-Modelle wurden, unter Verwendung des Programms DAMAVER [115], gemittelt und gefiltert. Für die entsprechenden gemittelten und gefilterten Modelle wurde, unter Verwendung des Programms pdb2vol des SITUS-Pakets [116], die äußere Hülle bestimmt.

2.20.2 Kristallographie

Um die Struktur der LPOR-Proteinfamilie zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit versucht verschiedene LPOR-Proteine zu kristallisieren. Hierfür wurde das jeweilige LPOR-Protein (*DsLPOR*, *ElLPOR* (N- und C-terminaler His₆-tag) und *TeLPOR* (N-terminaler His₆-tag sowie ohne tag)) zunächst gereinigt

(Kapitel 2.15.2), in den entsprechenden Kristallisationspuffer (siehe Seite 64) überführt (Kapitel 2.15.3) und die Proteine im Anschluss auf ihre jeweilige maximale Konzentration, kurz vor der Löslichkeitsgrenze des jeweiligen Proteins, konzentriert (Kapitel 2.15.5). Zu manchen Proteinproben wurden Zusätze (siehe Seite 64) hinzugegeben, um möglicherweise eine Kristallbildung zu begünstigen. Weiterhin wurde versucht die *ELP*OR (N-terminaler His₆-tag) und *TeLP*OR (N-terminaler His₆-tag) als Holoprotein (LPOR/NADPH/Pchlid-Komplex) zu kristallisieren. Kurz vor der Verwendung des Proteins wurde die Proteinlösung bei 18 °C und 30.797 xg zentrifugiert. Für ein erstes *screening* auf geeignete Kristallisationsbedingungen, wurde das Protein mit Hilfe des FreedomEVO®-Pipettierroboters der Firma Tecan (Männedorf, Schweiz) in eine 96er well Platte überführt und mit verschiedenen Puffern (Kristallisationsscreens, Tabelle 15) versetzt. Die Kristallisation erfolgte hierbei mittels der Dampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen (*sitting drop*). Dabei befindet sich der Tropfen, welcher aus einer 1:1 Mischung der Protein(/Zusätze)-Lösung und der Reservoir-Lösung (0,7 µl Protein(/Zusätze)-Lösung + 0,7 µl Reservoir-Lösung) zusammengesetzt ist, direkt neben der Reservoir-Kammer in der sich die Kristallisations-Lösung der verschiedenen Kristallisationsscreens befindet. Durch die deutlich höhere Konzentration an Salzen in den Reservoir-Lösungen, findet eine kontinuierliche Diffusion von Wasser aus dem Tropfen in die Reservoir-Lösung statt, sodass die Konzentration im Tropfen kontinuierlich steigt und so eine Keimbildung initiiert wird und eine Kristallbildung erfolgen kann. Nachdem die Kristallisationsplatten angesetzt wurden, wurden sie mit Hilfe einer Klebefolie verschlossen und bei 19 °C inkubiert. Nach zwei Wochen, sowie zu regelmäßigen, späteren Zeitpunkten, wurden alle Ansätze auf Kristalle untersucht. Nach den ersten Versuchen konnten günstige Bedingungen identifiziert werden, woraufhin eigene Kristallisationsscreens (siehe Tabelle 33 bis Tabelle 36 im Anhang) angesetzt und mit diesen weitere screenings durchgeführt wurden.

verwendete Puffer und Zusätze

Kristallisationspuffer A

TRIS	20	mM
NaCl	100	mM
Glycerin	10	% (v/v)
pH	8,5	

Kristallisationspuffer B

TRIS	20	mM
NaCl	500	mM
Glycerin	20	% (v/v)
pH	7,5	

Kristallisationspuffer C

TRIS	20	mM
NaCl	150	mM
Glycerin	10	% (v/v)
L-Argenin	50	mM
L-Glutaminsäure	50	mM
pH	7,5	

verwendete Zusätze

DTT	1	mM
NADPH	1	mM
TCEP	1	mM
NADP ⁺	1	mM
Pchlide (50 µM)	5	%

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten Kristallisationsscreens.

Screen	Hersteller
Ammoniumsulfat Screen	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Wizard I/II	Rigaku, Neu-Isenburg, Deutschland
Crystal Screen I/II	Hampton Research, Aliso Viejo, Kalifornien, USA
PEG Screen I	Hampton Research, Aliso Viejo, Kalifornien, USA
PEG Screen II	Hampton Research, Aliso Viejo, Kalifornien, USA
PEG/Ion Screen	Hampton Research, Aliso Viejo, Kalifornien, USA
PGA-LM	Molecular Dimensions, Suffolk, England
JCSG I	QIAGEN, Hilden, Deutschland
JCSG II	QIAGEN, Hilden, Deutschland
JCSG III	QIAGEN, Hilden, Deutschland
JCSG IV	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PACT Screen	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Cations Screen	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Nextal ProComplex	QIAGEN, Hilden, Deutschland
MIDAS I/II	Molecular Dimensions, Suffolk, England
CompAS Screen	QIAGEN, Hilden, Deutschland
MPD Screen	QIAGEN, Hilden, Deutschland
MbClass Screen	QIAGEN, Hilden, Deutschland

2.20.2.1 Aufnahme von Röntgen-Diffraktionsbildern

Die Aufnahme der Röntgen-Diffraktionsbilder erfolgte an der ID30A-3 *beamline* des *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) von PD Dr. Joachim Granzin (Institute of Complex Systems (ICS-6), Forschungszentrum Jülich). Für Diffraktionsexperimente ist es notwendig die Kristalle auf 100 K zu bringen. Hierzu wurde der Kristall mittels einer Haarschleife (*loop*) in die entsprechende Reservoirlösung, welche zusätzlich mit 30 % (v/v) PEG 20.000 versetzt war, überführt und anschließend im Stickstoffstrom (*cryocooling*) auf 100 K gekühlt.

2.21 Analytische Ultrazentrifugation

Die Probenvorbereitung für die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) erfolgte äquivalent zu Kapitel 2.20.1. Die Durchführung der AUZ-Messung erfolgte durch Dr. Frank Krause (Nanolytics Instruments GmbH, Potsdam, Deutschland). Vor der Messung wurden die Proben (1,23 mg/ml und 1 mg/ml) mit Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) 1:1 verdünnt und in individuell hergestellte Titankernstücke mit Saphirfenstern und einer Schichtdicke von 20 mm gefüllt. Außerdem wurden AUZ-Analysen der unverdünnten Proben in einer entsprechenden Messzelle mit 12 mm Schichtdicke durchgeführt. Nachdem die Zellen in den Rotor eingesetzt wurden, wurde die optische Ausrichtung entlang des Zentrifugalfeldes, mit Hilfe eines maßgefertigten Zellausrichtungswerkzeug (Nanolytics Instruments GmbH, Potsdam, Deutschland), sichergestellt. Diese Probenvorbereitungsschritte wurden unter geringem Tageslicht durchgeführt. Die Sedimentationsgeschwindigkeitsexperimente wurden an einer multiwellenlängenabsorptions (MWA)-analytischen Ultrazentrifuge (Nanolytics Instruments GmbH, Potsdam, Deutschland), unter Verwendung einer MWA-Optik bei 20 °C und einer Winkelgeschwindigkeit von 50.000 UpM, durchgeführt. Der MWA-Detektor zeichnet dabei vollständige Absorptionsspektren auf, indem er gleichzeitig die Absorption bei 2.048 Wellenlängen zwischen 185 nm und 894 nm für jeden radialen Scan erfasst [117]. Die Daten für einzelne Wellenlängen, die aus den MWA-Datensätzen ausgewählt wurden, wurden mit dem Standard *c(S)*-Modell in SEDFIT (Version 15.01b) analysiert, um eine diffusionskorrigierte Sedimentationskoeffizientenverteilung mit einem gewichtsgemittelten Reibungsverhältnis zu erzeugen. Die *c(S)*-Verteilungen zeigen die Signalamplitude aller Spezies bei gegebenem Sedimentationskoeffizienten *S* bei der jeweiligen Wellenlänge und ermöglichen die Identifizierung der oligomeren Zustände von Proteinen aus ihren scheinbaren Molmassen. Darüber hinaus wurden vollständige MWA-Datensätze mit SEDANAL (Version 6.82) analysiert, wobei die *wide distribution analysis* (WDA)-Methode eine nicht-diffusionskorrigierte Sedimentationskoeffizientenverteilung ohne Annahmen liefert, um vollständige Absorptionsspektren bestimmter Populationen innerhalb eines gegebenen *S*-Wertebereichs zu extrahieren [118]. Die Entfaltung von

Komponentenkonzentrationsprofilen aus MWL-Datensätzen wurde unter Verwendung von SEDANAL [118] und Ultrascan 3 [119] durchgeführt. Alle Plots der AUZ-Rohdaten wurden mit der Software GUSI, welche von der MBR-Softwareseite (<http://biophysics.swmed.edu/MBR/software.html>) heruntergeladen werden kann, erstellt. Datenplots von $c(S)$ wurden mit einer von Dr. Frank Krause (Nanolytics Instruments GmbH, Potsdam, Deutschland) eigens entwickelten Software erstellt.

2.22 Untersuchung der LPOR-Proteindynamik mittels Inkohärenter Quasielastischer Neutronenstreuung (QENS)

Die $TeLPOR$ wurde wie in Kapitel 2.7.1.2 beschrieben produziert, die resultierenden Zellen aufgeschlossen (Kapitel 2.15.1), das Protein mittels IMAC (Kapitel 2.15.2) gereinigt, über eine Gelfiltration (Kapitel 2.15.3) entsalzt und in QENS-Probenpuffer überführt. Im Anschluss wurde die Probe auf eine Konzentration von rund 10 mg/ml konzentriert (Kapitel 2.15.5), die resultierende Proteinprobe bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und mittels Lyovac GT2 (Steris GmbH, Hürth, Deutschland) lyophilisiert. Nach erfolgter Lyophilisierung wurde das gefriergetrocknete Protein im Ursprungsvolumen D_2O (99,9 % atom D) resuspendiert und für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um einen Austausch aller austauschbaren Protonen gegen Deuterium zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurde eventuell ausgefallenes Protein durch Zentrifugation ($30.797\text{ }xg$, 10 Minuten, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) abgetrennt und die Proteinlösung erneut bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Um einen möglichst vollständigen Austausch aller Protonen zu gewährleisten, wurde die Probe erneut lyophilisiert und in D_2O resuspendiert.

Zur Herstellung des ternären $TeLPOR/NADPH/Pchlid$ -Komplexes (Holoprotein), wurde im Anschluss an den zweiten Lyophilisierungsschritt (nach der Resuspension und Inkubation in D_2O) die Probe mit D_2O auf eine Konzentration von 0,75 mg/ml ($19,8\text{ }\mu\text{M}$) verdünnt. Zur verdünnten Proteinlösung wurden $19,7\text{ }\mu\text{M}$ NADPH als Pulver und $19,8\text{ }\mu\text{M}$ Pchlid, welches zuvor in deuteriertem Methanol (99,8 % atom D) aufgenommen wurde, zugegeben. Dabei wurde eine Methanolkonzentration von 10 % nicht überschritten. Dieser Ansatz wurde gut gemischt, im Dunkeln für zehn Minuten inkubiert und zur Entfernung eventuell vorhandener Aggregate zentrifugiert ($2.915\text{ }xg$, 10 Minuten, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Die so erzeugten, zweimal lyophilisierten und in D_2O rekonstituierten, Apo- und Holoproteinproben wurden erneut eingefroren und lyophilisiert. Je 100 mg lyophilisiertes Protein wurde in einen Aluminium-Probenhalter (4 cm x 3 cm x 0,3 mm) überführt und in einem Exsikkator über Kieselgel (2-5 mm, ROTH, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das getrocknete Proteinpulver wurde dann bis zu einem Verhältnis von 1,6 g D_2O zu 1 g Protein über D_2O rehydriert. Dies entspricht einer 4-fachen Hydrathülle. Durch Verwendung von

Indiumdraht, wurden die Probenhalter verschlossen, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bis zur Messung verwahrt.

Als Referenz diente eine Pufferprobe. Hierfür wurde eine entsprechende Menge QENS-Puffer ebenso wie die Proteinproben lyophilisiert, in D_2O aufgenommen, inkubiert und erneut lyophilisiert. Auch bei dieser Probe erfolgten diese Schritte zweimal. Die Rehydrierung erfolgte ebenso wie bei den Proteinproben.

QENS-Probenpuffer

TRIS	20	mM
NaCl	100	mM
pH	8,5	

Die QENS-Messungen erfolgten am Heinz Maier-Leibnitz Zentrum (MLZ, Garching, Deutschland) am hochauflösenden Rückstreuinstrument SPHERES [120, 121]. Die einfallende Neutronenwellenlänge betrug $6,27\text{ \AA}$. SPHERES besitzt eine Energieauflösung von etwa $0,65\text{ }\mu\text{eV}$ bei voller Halbwertsbreite. Die Aufnahme der Spektren erfolgte über einen Energietransferbereich von $-30\text{ }\mu\text{eV}$ bis $+30\text{ }\mu\text{eV}$. Zur Analyse wurden die Daten zwischen $0,34\text{ \AA}^{-1}$ und $1,76\text{ \AA}^{-1}$ verwendet. Für bessere Statistiken erfolgte ein *binning* der Energiekanäle. Die gemessenen Intensitäten wurden hinsichtlich der Effizienz des energieabhängigen Neutronen-Detektors korrigiert, auf Vanadium normiert und in einen Energietransfer- und Streuvektorraum transformiert. Der Aluminium-Probenhalter wurde zum einfallenden Strahl in einem Winkel von 135° orientiert. Die Auflösungsfunktionen wurden mit einer 1 mm dicken Vanadiumplatte gemessen. Die Streuintensitäten der Pufferprobe wurden von denen der Proteinproben abgezogen.

Die Pufferreferenz sowie die Apoprotein- und Holoproteinproben wurden über 24 Stunden im SPHERES vermessen. Nach der Messung des Holoproteins wurde diese aus dem Kryostaten entnommen, geöffnet und für fünf Minuten aus einem Abstand von 50 cm mit einer 40 W Glühbirne belichtet. Im Anschluss an die Belichtung wurde der Probenhalter erneut mit Indiumdraht verschlossen und die belichtete Probe erneut vermessen. Die Messzeit betrug hierbei zwölf Stunden.

Die Messung, sowie die Auswertung der Daten, erfolgte durch Dr. Andreas Stadler (Jülicher Zentrum für Forschung mit Neutronen (JCNS) und *Institute of Complex Systems* (ICS), Forschungszentrum Jülich) und Dr. Michaela Zamponi (Jülicher Zentrum für Forschung mit Neutronen (JCNS) am Heinz Maier-Leibnitz Zentrum (MLZ), Forschungszentrum Jülich).

2.23 Erste zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen an der LPOR

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Roger J. Kutta am Lehrstuhl für Physikalische Chemie der Universität Regensburg durchgeführt. Dazu wurde eine *DsLPOR*-Probe mit einer Konzentration von 5,2 mg/ml (140 μ M) hergestellt. Die Expression und Reinigung erfolgte wie in Kapitel 2.7.1.2.2 und Kapitel 2.15.2 beschrieben. Eine zusätzliche Reinigung über Größenausschlusschromatographie wurde aufgrund der benötigten Menge und der schon sehr hohen Reinheit der Probe nicht durchgeführt. Als Puffer wurde der Standard-Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) verwendet. Die Proteinprobe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Probentransport erfolgte auf Trockeneis.

Zur Bildung des ternären (*DsLPOR*/NADPH/Pchlid) bzw. pseudoternären (*DsLPOR*/NADP⁺/Pchlid) Komplexes, wurde die *DsLPOR* mit 12 μ M Pchlid, 400 μ M NADPH/NADP⁺ und 0,1 % (v/v) Triton X-100 versetzt. Da das Pchlid in Methanol gelöst wurde, wurde darauf geachtet, dass eine Methanolkonzentration von 5 % nicht überschritten wurde. Zur Bildung der Komplexe wurden die Proben für zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurde ebenfalls die Photophysik von freiem Pchlid untersucht. Hierfür wurde Pchlid mit Lagerpuffer auf eine Methanolkonzentration von 5 % verdünnt. Die Pchlid-Konzentration wurde im Vorfeld so eingestellt, dass nach der Verdünnung eine Pchlid-Konzentration von 12 μ M resultierte. Für die zeitaufgelöste Messung wurde eine Durchflussküvette mit einer Schichtdicke von 2 mm verwendet, was eine optische Dichte von 0,5 bei der Anregungswellenlänge von 450 nm für alle Proben ergab. Die Photophysik des freien, und im pseudoternären Komplex gebundenen, Pchlids ist reversibel, sodass für die Aufnahme je ein Probenvolumen von 10 ml ausreichend war. Die Photochemie des Pchlids im ternären Komplex ist jedoch irreversibel und das entstehende Chlid absorbiert zudem in einem größeren spektralen Bereich, was eine simultane Anregung des Chlids unvermeidbar macht. Demzufolge wurde ein Probenvolumen von ca. 300 ml verwendet, um die spektralen Beiträge des entstehenden Chlids über die Messdauer minimal zu halten. Referenzabsorptionsspektren wurden jeweils vor und nach dem Experiment, zur Überprüfung der Probenintegrität, aufgenommen (2 mm Schichtdicke, LAMBDA9a UV/Vis-Spektralphotometer, PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

Es wurde ein selbstgebautes Pump Superkontinuum-Probe Spektrometer, gemäß Dobryakov *et al.* [122], für die Aufnahme der transienten Absorption verwendet. Die Anregungsenergie bei 450 nm betrug 200 nJ mit einer temporalen Breite von ca. 100 fs.

2.23.1 Funktionsweise des Pump Superkontinuum-Probe Spektrometers

Pump-Probe-Experimente (oder Anregungs-Abfrage Experimente) dienen der Untersuchung von sehr schnellen (unterer ps- bis ns-Bereich) photochemischen Prozessen. Hierbei wird durch einen ersten Laserimpuls das zu untersuchende System in einen angeregten Zustand versetzt und durch einen zweiten Laserpuls, welcher zum ersten Laserpuls durch eine verlängerte Wegstrecke (*delay line*) zeitlich verzögert wird, das Absorptionsspektrum des angeregten Systems abgefragt. Durch die Variation der Verzögerungszeit kann ein Einblick in die Dynamik/Kinetik der ablaufenden Prozesse erfolgen. Da die zeitliche Verzögerung über die Weglänge erfolgt, sind typischerweise nur Zeitfenster von einigen ns möglich (30 cm entsprechen 1 ns). Als Abfragepuls werden heutzutage Superkontinuum-Weißlicht-Pulse verwendet, welche einen breiten spektralen Bereich in der Detektion abdecken. Im verwendeten Experiment wurden diese Weißlicht-Pulse durch Fokussierung von 500 nm Laserpulsen in einem CaF₂-Kristall erzeugt. Die Detektion der transienten Absorptionsspektren erfolgte über zwei *charged coupled device* (CCD) Zeilenkameras mit einem vorgeschalteten Gitterspektrographen. Schwankungen im Weißlicht wurden durch Referenzierungsmessungen korrigiert.

2.24 Bioinformatische Analysen

Die Suche nach neuen Sequenzen aus aerob anoxygen phototrophen Bakterien (AAPBs) mit signifikanter Ähnlichkeit ($E < 0,005$) zu LPORs, erfolgte mit Hilfe von PSI-BLAST [123] in der NCBI-Datenbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Hierzu wurden die Aminosäuresequenzen der bereits bekannten cyanobakteriellen LPOR aus *Thermosynechococcus elongatus*, sowie die erste beschriebene LPOR aus einem AAPB, die DsLPOR (LPOR aus *Dinorosebacter shibae* [1]), verwendet. Weitere putative LPORs wurden von Dr. Olga Chernomor (Universität Wien, Center for Integrative Bioinformatics (CIBIV)) in der JGI-Datenbank identifiziert.

Aminosäuresequenzalignments wurden mit Hilfe des Clustal Omega Webservers [124] (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) generiert und mittels des Alignmenteditors GenDoc [125] editiert und visualisiert. GeneDoc wurde ebenfalls zur Quantifizierung der paarweisen Sequenzidentitäten und Sequenzähnlichkeiten eingesetzt.

Phylogenetische Stammbäume wurden, basierend auf einem entsprechenden LPOR-Aminosäuresequenzalignment von Dr. Olga Chernomor (Universität Wien, Center for Integrative Bioinformatics (CIBIV)) generiert. Datierete Stammbäume wurden von der timetree.org Webseite [126] heruntergeladen.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollten in einem ersten Themenkomplex (Kapitel 3.1 und 3.2) weitere funktionelle lichtabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen (LPORs) in aerob anoxygenen phototrophen Bakterien (AAPBs) identifiziert und diese vergleichend zu bekannten LPORs aus Pflanzen und Cyanobakterien biochemisch charakterisiert werden. Auf diese Weise sollten eventuell vorhandene spezielle funktionelle Eigenschaften der AAPB LPOR-Familie aufgeklärt werden, die neben phylogenetischen Stammbaumberechnungen als Indiz für eine evolutionäre Differenzierung der LPOR-Familie gewertet werden können. Das übergeordnete Ziel der Arbeit dieses ersten Themenkomplexes war somit die nähere Untersuchung des Ursprungs und der Phylogenie der LPOR-Enzymfamilie.

In einem zweiten Themenkomplex (Kapitel 3.3) sollte zudem die Struktur und Proteindynamik von LPOR-Proteinen untersucht werden. Insbesondere die Aufklärung der atomaren Struktur einer LPOR würde hierbei einen neuen Quantensprung hinsichtlich unseres Verständnisses des LPOR-Reaktionsmechanismus ermöglichen. Neben kristallographischen Verfahren sollten zudem Streuverfahren (Kleinwinkel-Röntgenstreuung und Inkohärente Quasielastische Neutronenstreuung) eingesetzt werden um die Struktur und Dynamik von LPOR-Proteinen in Lösung zu untersuchen.

3.1 Identifizierung neuer LPORs in aerob anoxygenen phototrophen Organismen

Ziel des ersten Themenkomplexes dieser Arbeit war es, neben der AAPB LPOR aus *Dinoroseobacter shibae* weitere LPORs in AAPBs zu identifizieren und auf ihre Funktionalität im Vergleich zu einer cyanobakteriellen und einer pflanzlichen LPOR hin zu untersuchen.

3.1.1 Die Suche nach neuen LPORs in aerob anoxygenen phototrophen Organismen ergab eine Vielzahl putativer LPORs

Zu Beginn dieser Arbeit waren die bereits publizierte LPOR aus *D. shibae* [1] sowie sechs weitere putative LPORs aus einer bisher unveröffentlichten Arbeit [91] (Arbeitsgruppe Molekulare Biophotonik, Dr. Ulrich Krauss (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich, Institut für molekulare Enzymtechnologie)) bekannt. Mit Hilfe der NCBI-Sequenzdatenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>), der JGI-Datenbank und dem PSI-BLAST Tool (*position-specific iterative* BLAST) konnten während dieser Arbeit 21 weitere putative LPORs in nicht oxygenen phototrophen Organismen identifiziert werden. Insgesamt wurden 86.583 vollständige bakterielle Genome/Proteome (Genbank Stand 16.09.2017) von Dr. Olga Chernomor (Universität Wien, Center for Integrative Bioinformatics (CIBIV)) durchsucht. Im Vergleich zum üblichen Protein-Protein-BLAST

ist der PSI-BLAST eine sensitivere Methode zur Ermittlung entfernt verwandter Proteine [123]. Die Suche erfolgte dabei anhand der Sequenz der ersten beschriebenen, funktionalen proteobakteriellen LPOR, der DsLPOR [1]. Die neu identifizierten, sowie die in vorherigen Arbeiten [91, 95] identifizierten, putativen LPORs sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die grün hervorgehobenen Enzyme wurden in dieser Arbeit näher untersucht. Mit Ausnahme der SehGCLPOR aus *Saccharopolyspora erytraea*, welche aus einem hoch GC-haltigen grampositiven Aktinobakterium stammt, sind alle neu identifizierten putativen LPORs in phototrophen Organismen (Proteobakterien und FCB-Bakterien) außerhalb oxygen phototropher Gattungen zu finden.

Tabelle 16: Übersicht der identifizierten putativen LPORs. FCB: Fibrobacteres-, Chlorobi- und Bacteroidetes-Bakterien. In grün markiert sind die in dieser Arbeit näher untersuchten LPORs.

Organismus	Protein-Bezeichnung	Genbank-/UniProt-/Swissprot-ID	Klasse / Ordnung	Accession-Nummer / Quelle
In dieser Arbeit neu identifizierte putative LPORs				
<i>Acidiphilium rubrum</i>		SIR58578.1	α -Proteobakterium / <i>Rhodospirillales</i>	DOE Joint Genome Institute, nicht publiziert
Alphaproteobacteria bacterium PA4		OYU15985.1	nicht klassifiziertes Proteobakterium	GCA_002256005.1
<i>Erythrobacter</i> sp. SCN 62-14		ODS93018.1	α -Proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	[127]
<i>Erythrobacteraceae</i> bacterium HL-111	<i>EbLPOR</i>	KPP91129.1	α -Proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	[95, 128]
<i>Gemmatimonas phototrophica</i>	<i>GpLPOR</i>	AMW05784.1	FCB-Gruppen Bakterium	[95, 129, 130]
<i>Loktanella fryxellensis</i> DSM 16213	<i>LfLPOR</i>	SEN87055.1	α -Proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	DOE Joint Genome Institute, nicht publiziert
<i>Polynucleobacter</i> sp. MWH-Feld-100		OWS70994.1	β -Proteobakterium / Burkholderiales	GCA_002206625.1
<i>Porphyrobacter dokdonensis</i>	<i>PdLPOR</i>	OBV11559.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_001677335.1
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>		WP_086617938.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002155695.1
Proteobacteria bacterium ST bin 13		OQW77747.1	nicht klassifiziertes Proteobakterium	[131]
Proteobacteria bacterium ST bin 14		OQW73116.1	nicht klassifiziertes Proteobakterium	[131]
<i>Roseisalinus antarcticus</i>		SLN77620.1	α -Proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	GCA_900172355.1
<i>Sandarakinorhabdus</i> sp. AAP62	<i>SaLPOR</i>	WP_020480449.1	α -Proteobakterium / <i>Sphingomonadales</i>	GCA_000331225.1
<i>Sandarakinorhabdus</i> sp. TH057		OYQ31188.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002251755.1

Organismus	Protein-Bezeichnung	Genbank-/UniProt-/Swissprot-ID	Klasse / Ordnung	Accession-Nummer / Quelle
<i>Spingomonas</i> sp. IBVSS1		OSZ70988.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002127205.1
<i>Spingomonas</i> sp. 12-62-6		OYW22568.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002279655.1
<i>Spingomonas</i> sp. 28-62-11		OYY63160.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002278865.1
<i>Spingomonas</i> sp. 32-62-10		OYX39646.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002280555.1
<i>Spingomonadales</i> bacterium 28-64-96		OYZ16473.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002281615.1
<i>Spingomonadales</i> bacterium 32-65-25		OYX79084.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	GCA_002280855.1
<i>Spingomonadales</i> sp. 28-62-20	<i>SpLPOR</i>	OYY75650.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	DOE Joint Genome Institute, nicht publiziert
In früheren Arbeiten identifizierte putative LPORs [91]				
<i>Acidiphilium angustum</i>	<i>AnLPOR</i>	WP_029314395.1	α -Proteobakterium / <i>Rhodospirillales</i>	DOE Joint Genome Institute, nicht publiziert
<i>Erythrobacter litoralis</i> DSM 8509	<i>E/LPOR</i>	KEO90002.1	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	[132]
<i>Loktanelia vestfoldensis</i> DSM 16212	<i>LvLPOR</i>	WP_026352701.1	α -Proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	DOE Joint Genome Institute, nicht publiziert
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	<i>SehGCLPOR</i>	A4FA51	Actinobakterium / <i>Pseudonocardiales</i>	[133]
<i>Sandarakinorhabdus limnophila</i>	<i>S/LPOR</i>	UPI0003B37375	α -Proteobakterium / <i>Spingomonadales</i>	DOE Joint Genome Institute, nicht publiziert
<i>Sulfitobacter guttiformis</i> KCTC 32187	<i>SgLPOR</i>	KIN73509.1	α -Proteobakterium / <i>Rhodobacterales</i>	Department of Systems Biology, Yonsei University, Korea, nicht publiziert

Abbildung 19 zeigt ein Aminosäuresequenzalignment aller für weitere Untersuchungen ausgewählten putativen LPORs im Vergleich mit bereits bekannten funktionalen LPORs. Die cyanobakteriellen Enzyme (*TeLPOR* und *SsLPOR*), die beiden pflanzlichen LPORs (*AtLPORC* und *HvLPORA*) und nicht zuletzt die erste identifizierte proteobakterielle LPOR (*DsLPOR*) wurden hierbei bereits heterolog produziert, gereinigt und ihre lichtabhängige Aktivität verifiziert [1, 106, 134-136]. Alle LPORs besitzen die vermutlich im aktiven Zentrum am Protonentransfer beteiligten Tyrosin- und Lysinreste (Abbildung 19, blau hinterlegt). Ebenso ist das NADPH-Bindungsmotiv (rot hervorgehoben) in allen LPORs hoch konserviert. Für die vier grün markierten Cysteine (C37, C89, C199, C226, *TeLPOR*-Nummerierung) ist eine Beteiligung an der Substratbindung beschrieben [47, 137]. Zwei dieser vier Cysteine (C37 und C226) sind in den hier betrachteten putativen LPORs, mit Ausnahme der *SehGCLPOR*, vollständig konserviert, während die Cysteine C89 und C199 in den meisten LPORs konserviert, jedoch nicht in allen Sequenzen vorhanden, sind. So fehlen z. B. der LPOR aus *P. dokdonensis* oder *S. limnophila* zwei dieser sonst konservierten Cysteine. Aus dem Aminosäuresequenzalignment wurde die Sequenzidentität und Sequenzähnlichkeit bestimmt. Die resultierenden Werte sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Werden alle proteobakteriellen LPORs betrachtet, so ist zu sehen, dass alle eine Sequenzidentität von im Mittel 62 % (57 % bis 67 %) zu den beiden cyanobakteriellen LPORs aufweisen. Im Vergleich zu den pflanzlichen LPORs liegt die Sequenzidentität im Mittel nur bei 38 % (35 % bis 40 %). Innerhalb der proteobakteriellen LPORs liegt die Sequenzidentität im Mittel bei 68 % (59 % bis 88 %). Die putative LPOR aus *S. erythraea* weist zu allen anderen LPORs (aus Cyanobakterien, Pflanzen und Proteobakterien) die geringste, d.h. eine maximale, Sequenzidentität von 30 % auf.

Die höchsten Aminosäureübereinstimmungen sind zwischen der *EbLPOR* und *ELLPOR* (88 %) sowie zwischen der *SaLPOR* und *SILPOR* (87 %) zu finden. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht überraschend, da die *EbLPOR* und *ELLPOR* aus Organismen stammen, die beide zu der Familie der *Erythrobacteraceae* gehören. Die Organismen, aus welchen die *SaLPOR* und *SILPOR* stammen, gehören sogar zur gleichen Gattung. Wird die erste beschriebene LPOR aus *D. shibae* genauer betrachtet, so zeigt sich zu allen anderen LPORs aus Proteobakterien eine Sequenzidentität von mindestens 63 %. Die höchste Sequenzidentität zur *DsLPOR* weist die LPOR aus *L. vestfoldensis* auf (76 %). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass alle betrachteten LPORs außerhalb oxygen phototropher Gattungen zueinander ähnlicher sind als zu den bekannten LPOR-Klassen aus Cyanobakterien und Pflanzen. Die Vermutung liegt also nahe, dass die hier betrachteten LPORs eine neue funktionelle LPOR-Klasse bilden.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
TeLPOR  : -----MSDQPRPTVITGASSGVGLYATKA : 25
SsLPOR  : -----MKPTVITGASSGVGLYGRKA : 21
AtLPORC : MALQAAYSLLPSTISIQKEGKFNASLKE---TTFTGSSFSNHLRAEKISTLLTIKEQRRQKPRFSTGIRAQTVTATPPANEASPEQKKTERKGTAVITGASSGLGATAKA : 108
HvLPORA : ----MALQLLPSTLSVPKKGSSMGAVAVKDTAAFLGVSSK---AKKA--SLAV-----RTQVATAPSPVTTSPGSTASSPSGKKTLRQGVVITGASSGLGAAAKA : 93
DsLPOR  : -----MTLDPMPRAIVTGASSGVGLHATKS : 25
SpLPOR  : -----MTTAKLPLAIVTGASSGVGLYATAA : 25
ElLPOR  : -----MIAGQTPVCIITGASSGLGWATRA : 25
PdLPOR  : -----MTDLPKKTALVTGASSGVGLWSAKA : 25
EbLPOR  : -----MATGHTPICITGASSGLGWATKA : 25
LfLPOR  : -----MSVQHHPICIVTGASSGVGLHSTKA : 25
GpLPOR  : -----MSTAPTCLITGASSGVGLYGAKS : 23
AnLPOR  : -----MEATTPPHVIVTGASSGVGLHATKA : 25
LvLPOR  : -----MPQDNQPLAIVTGASSGVGLHTTNA : 25
SlLPOR  : -----MSVQAAVQPTAIVTGASSGVGLWAAKS : 27
SgLPOR  : -----MTRSTKQLAIVTGASSGVGLYSTQA : 25
SaLPOR  : -----MSIQPVVITGASSGVGLWAARS : 23
SehGCLPOR : -----MTERVVITGASSGLGQAAAE : 21

```

```

120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
TeLPOR  : LANRG-WHVIMACRNLEKAEQAANKT--QIPPEAYTIHLDLSSLASVVRGFVES----FRALNRPILALVCNAAVYFLLKEPIYSVDGYEITVATNHLGHFLLINLLED : 129
SsLPOR  : LIDKG-WHVIMACRNLDKTQKVADEL--GFPKDSYTIKLDLGLYLDVRRFVAQ---FRELGRPTKALVCNAAVYFLLDEPLWSADDYELSVATNHLGHFLLCNLLED : 125
AtLPORC : LADTGKWHVIMACRNFLKAEKAARSV--GMSKEDYTMHLDLASLESVKQFVEN---FRTEQPLDVLVCNAAVYQFTAKEPSTAEGFELSVGNHLGHFLLSRLLED : 213
HvLPORA : LAETGKWHVIMACRDLKASKAAKAA--GMADGSYTMHLDLASLDVSRQFVDA---ERRAEMPLDVLVCNAAVYREARTARTPTFTADGHEMSVGNHLGHFLLARLLMED : 198
DsLPOR  : LIDRG-WHVIMACRDLAKAEAAAARS--LDLDPGRYAHLDLGLSLASVRAFHAN---IARDHSDLDALVCNAAVYKRLTQGRSPDGFEISVATNYFGHFLLANLMLPL : 129
SpLPOR  : LIGRG-WHVIMACRDLKAAAAATG--GLRTDRYEIAHLDLASQASVRAFAAA---FRASDRPLDALVCNAAVYFLLKEPARSPEGYELNVAATNYLGHFLLANLMLDD : 129
ElLPOR  : LMARG-WHVIMACRDLAKAEAAAAREI--GLAPEGRTIMQLDLGTLGSLVVRGFVSE---ERMLGRPLDALVCNAAVYFRLTAPLRSPEGYELSVATNYFGHFLLANLLED : 129
PdLPOR  : LADRG-WHVIMACRDLAKAEESAAREA--GIAPANRTLHVLDLADFASVRALAEAAARETVRAGGGALDALVLAAYLFRAEAPQRNADGYEISVATNYLGHFLLANLLLPD : 133
EbLPOR  : LVTRG-WHVIMACRDLAKAEAAAAREI--GLAPEGRTIMRLDLGSLAGVRAFAEE---FRAFDRPLDALVCNAAVYFRLAEPLRSPEGFELSVAATNYFGHFLLANLLED : 129
LfLPOR  : LIDKG-WHVIMACRDLKAAAAAQS--NLQRDMFDMHLDLGLSLASVRAFHAA---YRAQNRALDALVCNAAVYFQLKPLRSPEGYELSVATNYLGHFLLANLMLLED : 129
GpLPOR  : LAARG-WHVIMACRDLAKATAAADAL--GIPKASRTMFPIDLGSQASVRAFVEA---FRATGRALDALVCNAAVYLERLTPMRSPEGYELSVATNYFGHFLLANLLLPD : 127
AnLPOR  : LVDRG-WHVIMACRDLAKAARAAAN--DINPASITPEIDLGSQSVRRFAAD---FAALVKPLDALVCNAAVYFLLKTPARSPEGFEISVATNYFGHFLLSHLLLP : 129
LvLPOR  : LIGRG-WHVIMACRDLAKAETAARS--DMASGSYEAHIDLGLSLASVRAFYAG---FRARGVPLDALVCNAAVYFLLKTPARSPEGFEISVATNYFGHFLLANLMLAD : 129
SlLPOR  : LADRG-WHVIMACRDLAKAEAAAAEV--GIPADSRRLHIDLGDQASVRRFADE---FHGLGLPLDALLLNAAVYLERLEAPMRSPEGYELSVATNYFGHFLLAHLLED : 131
SgLPOR  : LIAKG-WQVIMACRNMEKAFQAAMD--GLPTDAYQIMHLDLGLSLASVRAFHAA---FRAQNRALDLISNAAVYFQLKQPARSPEGFEISVATNYLGHFLLANLMLLED : 129
SaLPOR  : LATRG-WLVIMACRDLAKAEAAAATEI--GIPAESRRIMPIDLGDQASVRRFADE---FHATGLPLDALLLTAAYLFRLEAPMRSAQGYEISVATNYFGHFLLAHLLED : 127
SehGCLPOR : VAATG-RHVIMACRDLAKAEAAAADERARVPDASLEVLELDLADLASVRAAAKA----LLAGPPLGALVCNAGVQVY--GGIRRSRDRGHELTFAATNHLGHFLLTRLLLDH : 124

```


Tabelle 17: Sequenzähnlichkeit der LPORs. Die Werte oberhalb der Diagonalen geben die identischen und die unterhalb der Diagonalen die ähnlichen Aminosäuren zwischen den jeweiligen LPORs an. Die Organismen sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

	<i>Te</i>	<i>Ss</i>	<i>At</i>	<i>Hv</i>	<i>El</i>	<i>Ds</i>	<i>Eb</i>	<i>Lf</i>	<i>Pd</i>	<i>Sp</i>	<i>Gp</i>	<i>An</i>	<i>Lv</i>	<i>Sl</i>	<i>Sg</i>	<i>Sa</i>	SehGC
TeLPOR		74 %	44 %	43 %	63 %	60 %	64 %	63 %	62 %	64 %	67 %	63 %	64 %	60 %	63 %	61 %	30 %
SsLPOR	85 %		41 %	41 %	61 %	58 %	59 %	61 %	58 %	62 %	65 %	61 %	62 %	59 %	59 %	57 %	29 %
AtLPOR	57 %	55 %		66 %	35 %	37 %	37 %	36 %	38 %	38 %	40 %	38 %	39 %	37 %	38 %	35 %	22 %
HvLPORA	57 %	55 %	79 %		38 %	37 %	38 %	38 %	39 %	39 %	39 %	39 %	40 %	37 %	38 %	36 %	25 %
ElLPOR	76 %	73 %	51 %	51 %		70 %	88 %	70 %	69 %	70 %	66 %	64 %	69 %	65 %	67 %	66 %	29 %
DsLPOR	73 %	70 %	51 %	51 %	78 %		71 %	71 %	69 %	71 %	64 %	68 %	76 %	64 %	68 %	63 %	26 %
EbLPOR	76 %	72 %	51 %	52 %	93 %	77 %		70 %	69 %	71 %	67 %	67 %	69 %	66 %	67 %	69 %	29 %
LfLPOR	77 %	73 %	52 %	53 %	83 %	81 %	82 %		68 %	74 %	63 %	65 %	74 %	61 %	76 %	59 %	26 %
PdLPOR	75 %	71 %	52 %	53 %	79 %	78 %	78 %	80 %		69 %	65 %	66 %	67 %	66 %	65 %	66 %	28 %
SpLPOR	76 %	72 %	53 %	53 %	81 %	81 %	80 %	85 %	78 %		66 %	66 %	74 %	64 %	74 %	63 %	28 %
GpLPOR	78 %	76 %	53 %	54 %	76 %	74 %	76 %	77 %	76 %	77 %		67 %	66 %	69 %	64 %	70 %	29 %
AnLPOR	75 %	74 %	52 %	53 %	75 %	77 %	75 %	76 %	74 %	76 %	75 %		69 %	66 %	63 %	63 %	29 %
LvLPOR	78 %	76 %	54 %	56 %	80 %	82 %	79 %	84 %	78 %	84 %	77 %	77 %		65 %	75 %	65 %	26 %
SlLPOR	74 %	74 %	51 %	52 %	77 %	73 %	76 %	75 %	77 %	75 %	78 %	76 %	77 %		61 %	87 %	27 %
SgLPOR	78 %	76 %	53 %	53 %	81 %	78 %	81 %	85 %	78 %	84 %	78 %	77 %	86 %	78 %		61 %	25 %
SaLPOR	74 %	73 %	50 %	51 %	76 %	71 %	77 %	75 %	76 %	76 %	80 %	74 %	77 %	93 %	78 %		27 %
SehGCLPOR	44 %	42 %	33 %	36 %	40 %	37 %	39 %	40 %	41 %	39 %	42 %	41 %	39 %	41 %	42 %	42 %	

Mit Hilfe bioinformatischer Methoden konnten seit der Entdeckung der ersten proteobakteriellen LPOR (*DsLPOR*) 27 weitere putative LPORs außerhalb oxygen phototropher Gattungen in verschiedenen Datenbanken gefunden werden. Diese bilden eine neue, stetig wachsende Familie. Zwölf dieser 27 putativen LPORs wurden im Folgenden weiter untersucht.

3.1.2 Alle neu identifizierten LPORs stammen aus aerob anoxygenen phototrophen Bakterien und bilden eine monophyletische Gruppe

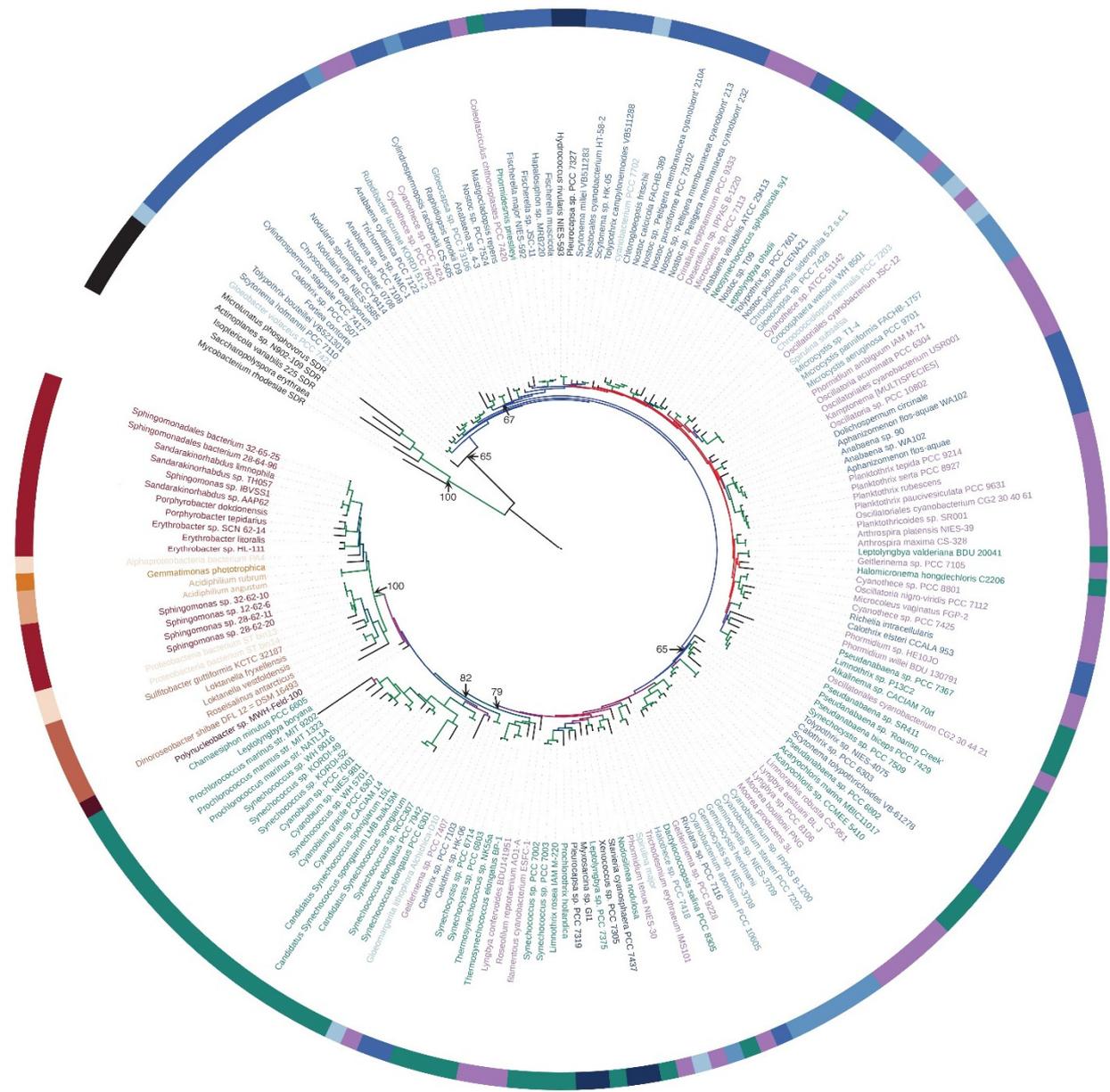
Die erste LPOR außerhalb oxygen phototropher Gattungen wurde in *Dinoroseobacter shibae* gefunden, einem der Gruppe der aerob anoxygenen phototrophen Bakterien (AAPBs) zugeordnetem α -Proteobakterium [1]. Wie einleitend erläutert, bietet das Vorhandensein einer funktionellen LPOR AAPBs einen entscheidenden Vorteil, da mit Hilfe dieser nicht-sauerstoffsensitiven Enzyme unter aeroben Bedingungen, unter denen das DPOR-Enzymsystem wahrscheinlich inaktiviert wird, die Synthese von Bakteriochlorophyll möglich ist (Kapitel 1.3). Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich bei den in dieser Arbeit identifizierten LPOR-tragenden Organismen außerhalb oxygen phototropher Gattungen ebenfalls um AAPBs handelt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die hier neu identifizierten Organismen mit putativen LPORs hinsichtlich des Vorkommens der lichtunabhängigen POR (DPOR) und der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase (RuBisCo) untersucht. Hierbei stellt die DPOR ein Identifikationsmerkmal für eine allgemeine Phototrophie und die RuBisCo ein Identifikationsmerkmal für AAPBs dar [140].

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. In allen Organismen mit putativen LPORs sind ebenfalls die Gene (*bchb*, *bchn* und *bchl*) für die Untereinheiten der DPOR zu finden, was zeigt, dass es sich bei allen Organismen um anoxygene phototrophe Bakterien handelt. Lediglich in dem Organismus *Erythrobacter* sp. SCN 62-14 ist das Gen der BchL-Untereinheit nicht zu finden. Des Weiteren konnte für drei der Organismen ein Gen identifiziert werden, welches für die große Untereinheit von RuBisCo kodiert (Aminosäuresequenzen dieser sind in Kapitel 6.1.2 aufgeführt). Die Abwesenheit von RuBisCo wird hierbei in der Literatur als ein Marker für AAPBs verwendet [141], wobei Organismen wie *Gemmatimonas phototrophica* offensichtlich ein RuBisCo-Enzym besitzen und dennoch der Gruppe der AAPBs zugeordnet werden [142]. Ebenso besitzt *Acidiphilium rubrum* eine aerobe Lebensweise, ist in der Lage Bakteriochlorophyll zu synthetisieren und wird daher in der Literatur den AAPBs zugeordnet [143]. Basierend auf den genannten genetischen Markern können somit alle, bis auf diese drei Organismen, eindeutig der Gruppe der AAPBs zugeordnet werden. Wobei die Vermutung nahe liegt, dass es sich zumindest bei *Acidiphilium rubrum* und *Gemmatimonas phototrophica* ebenfalls um AAPBs handelt. Weitere Untersuchungen, unter Verwendung weiterer genetischer Marker, könnten hierbei zusätzliche Anhaltspunkte liefern. Der Einfachheit halber werden

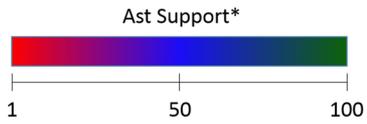
daher im Folgenden alle hier in Organismen außerhalb oxygen phototropher Gattungen (Cyanobakterien und Pflanzen) identifizierten LPORs als AAPB LPORs bezeichnet.

Tabelle 18: Übersicht über das Vorkommen verschiedener AAPB Marker-Enzyme. LPOR: lichtabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, DPOR: lichtunabhängige Protochlorophyllid-Oxidoreduktase, RuBisCo: Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, grün: Gen ist vorhanden, rot: Gen ist nicht vorhanden. Die Aminosäuresequenzen der in *Gemmatimonas phototrophica* und den beiden *Acidiphilium*-Stämme gefundenen RuBisCo sind im Anhang (Kapitel 6.1.2) angegeben.

Organismus	LPOR	DPOR			RuBisCo (große Untereinheit)
		BchB	BchN	BchL	
<i>Acidiphilium angustum</i>					
<i>Acidiphilium rubrum</i>					
Alphaproteobacteria bacterium PA4					
<i>Erythrobacter litoralis</i> DSM 8509					
<i>Erythrobacter</i> sp. SCN 62-14					
<i>Erythrobacteraceae</i> bacterium HL-111					
<i>Gemmatimonas phototrophica</i>					
<i>Loktanella fryxellensis</i> DSM 16213					
<i>Loktanella vestfoldensis</i> DSM 16212					
<i>Polynucleobacter</i> sp. MWH-Feld-100					
<i>Porphyrobacter dokdonensis</i>					
<i>Porphyrobacter tepidarius</i>					
Proteobacteria bacterium ST bin 13					
Proteobacteria bacterium ST bin 14					
<i>Roseisalinus antarcticus</i>					
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>					
<i>Sandarakinorhabdus limnophila</i>					
<i>Sandarakinorhabdus</i> sp. AAP62					
<i>Sandarakinorhabdus</i> sp. TH057					
<i>Spingomonas</i> sp. IBVSS1					
<i>Spingomonas</i> sp. 12-62-6					
<i>Spingomonas</i> sp. 28-62-11					
<i>Spingomonas</i> sp. 32-62-10					
<i>Spingomonadales</i> bacterium 28-65-96					
<i>Spingomonadales</i> bacterium 32-65-25					
<i>Spingomonadales</i> sp. 28-62-20					
<i>Sulfitobacter guttiformis</i> KCTC 32187					



- Actinobakterien
- Cyanobakterien
 - Nostocales
 - Oscillatoriales
 - Synschoococcales
 - Chroococcales
 - Pleurocapsales
 - andere Cyanobakterien
- Proteobakterien
 - Rhodospirillales (α)
 - Rhodobacterales (α)
 - Spingomonadales (α)
 - Burkholderiales (β)
 - nicht klassifizierte Proteobakterien
 - nicht klassifizierte α-Proteobakterien
- FCB-Gruppen Bakterium



*Anzahl in wie vielen der 100 rekonstruierten Stammbäume der entsprechende Stamm beobachtet wurde

Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum zur Illustration der Verbreitung von LPORs. Der Stammbaum enthält neben den neu identifizierten LPORs eine Auswahl von cyanobakteriellen und actinobakteriellen LPOR-Sequenzen. FCB: Fibrobacteres-, Chlorobi- und Bacteroidetes-Bakterien. Die Nummern an den Abzweigungen geben an in wie viel Prozent der 100 unabhängig erstellten Stammbäume diese Abzweigung vorkam.

Unter Verwendung der Sequenzen der hier neu identifizierten putativen LPORs, sowie einer Reihe von LPOR-Sequenzen aus Cyanobakterien, wurde von Dr. Olga Chernomor (Universität Wien, Center for Integrative Bioinformatics (CIBIV)) ein Maximum-Likelihood-Stammbaum erzeugt (Abbildung 20).

Anhand des in Abbildung 20 dargestellten phylogenetischen Stammbaums ist deutlich zu erkennen, dass die gefundenen putativen LPORs aus AAPBs eine monophyletische Gruppe bilden. Lediglich die LPOR aus *Saccharopolyspora erythraea* gliedert sich nicht in diese Gruppe ein, sondern gruppiert mit den hier für das *rooten* des Stammbaums verwendeten aktinobakteriellen kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (englisch: *short chain dehydrogenases/reductases*, SDRs), weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um ein falsch annotiertes Enzym der SDR-Familie handelt. Eine weiterführende Diskussion dieser Ergebnisse im Zusammenhang mit der funktionellen Charakterisierung ist in Kapitel 3.2.5 zu finden.

Bei den meisten der in dieser Arbeit identifizierten putativen LPOR-tragenden Bakterien handelt es sich eindeutig um aerob anoxygene phototrophe Bakterien (AAPBs), welche mit Ausnahme der putativen LPOR aus *Saccharopolyspora erythraea* eine monophyletische Gruppe bilden.

3.1.3 Die meisten AAPB LPORs konnten mittels IMAC und Größenausschlusschromatographie gereinigt werden

Von den 27 identifizierten AAPB LPORs wurden zwölf für eine weiterführende Charakterisierung ausgesucht. Für neun dieser zwölf war eine Expression in löslicher Form möglich. Durch den N- oder C-terminalen Hexahistidin-*tag* (His₆-*tag*), welcher an die Proteine fusioniert wurde, konnten diese über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Ni²⁺-NTA-Material gereinigt werden (Kapitel 2.15.2). Nach erfolgreicher Transformation der *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit dem entsprechenden Plasmid (Kapitel 2.8.2) und anschließender Expression des Zielgens (Kapitel 2.7.1.2.2), wurden die Zellen mittels EmulsiFlex-C5 aufgeschlossen (Kapitel 2.15.1). Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation von den löslichen getrennt und das zellfreie Extrakt auf die zuvor equilibrierte Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen und wie in Kapitel 2.15.2 bis 2.15.4 beschrieben gereinigt (Chromatogramme aller Reinigungen sind im Anhang in Abbildung 60 zu sehen). Während der Reinigung wurden Proteinproben entnommen, welche im Hinblick auf ihre Zusammensetzung mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.15.7) analysiert wurden (alle Reinigungsgele sind im Anhang in Abbildung 61 dargestellt).

Für alle Proteine, mit Ausnahme der *An*LPOR, *Lv*LPOR, *Sl*LPOR und *Sg*LPOR sowie je eine der pflanzlichen (*Hv*LPORA) und cyanobakteriellen (*Ss*LPOR) LPORs, erwies sich die Reinigung mittels

immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Ni²⁺-NTA-Material über den an die Proteine fusionierten His₆-tag als geeignet. Im Falle der *EbLPOR* und *TeLPOR* ist eine geringe Menge des Zielproteins im Durchlauf zu erkennen (Abbildung 61, D und B). Dies könnte sowohl an einer großen Menge Protein liegen, wodurch die Kapazität des Ni²⁺-NTA-Material vollständig ausgeschöpft war, oder aber der His₆-tag war aufgrund der Proteinkonformation nicht vollständig zugänglich und dadurch die optimale Bindung gestört. Im Waschschrift beider Reinigungen sind lediglich geringe Mengen des Zielproteins auszumachen, was wiederum für eine gute Bindung des His₆-tags und damit für eine Überschreitung der Kapazität des Ni²⁺-NTA-Materials spricht. Für alle anderen Proteine ist sowohl im Durchlauf als auch im Waschschrift kein Zielprotein zu erkennen. In allen Fällen scheint der His₆-tag demnach gut zugänglich zu sein und so eine optimale Bindung an das Ni²⁺-NTA-Material zu gewährleisten. Durch die zusätzliche Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie konnte für alle Proteine, mit Ausnahme der *AtLPORC*, eine deutliche Verbesserung der Reinheit erzielt werden (Abbildung 61 A). In Tabelle 19 sind die Ausbeuten aller zu reinigenden Proteine zusammengefasst. Hierbei ist zu erkennen, dass die *EbLPOR*, *ElLPOR* und *PdLPOR* die besten Ausbeuten mit über 10 mg Protein pro g Zellfeuchtmasse aufweisen. Die schlechtesten Ausbeuten sind für die *SaLPOR* (1,0 mg Protein pro g Zellfeuchtmasse) und *LfLPOR* (1,3 mg Protein pro g Zellfeuchtmasse) zu verzeichnen.

Die Reinigung der pflanzlichen *HvLPORA* und *SlLPOR* war trotz löslicher Produktion des Proteins nicht möglich. Hierbei ist davon auszugehen, dass der fusionierte His₆-tag durch die Faltung des Proteins nicht zugänglich und so eine Bindung an das Ni²⁺-NTA-Material nicht ermöglicht wurde. Für die *AnLPOR*, *LvLPOR*, *SgLPOR* und die *SsLPOR* konnten keine Expressionsbedingungen zur Produktion von löslichem Protein gefunden werden (Kapitel 2.7.1.2.1) und so auch keine Reinigung der Proteine erfolgen.

Tabelle 19: Übersicht der erzielten Ausbeute der verschiedenen putativen LPORs.

LPOR	Ausbeute [mg LPOR/g Zellfeuchtmasse]	LPOR	Ausbeute [mg LPOR/g Zellfeuchtmasse]
<i>TeLPOR</i>	7,0	<i>LfLPOR</i>	1,3
<i>AtLPORC</i>	3,6	<i>PdLPOR</i>	10,3
<i>DsLPOR</i>	3,3	<i>SaLPOR</i>	1,0
<i>EbLPOR</i>	11,3	<i>SehGCLPOR</i>	2,7
<i>ElLPOR</i>	14,2	<i>SpLPOR</i>	3,4
<i>GpLPOR</i>	5,7		

Von den zwölf ausgewählten AAPB LPORs konnten für drei LPORs keine Expressionsbedingungen zur Produktion von löslichem Protein gefunden werden. Für die übrigen neun AAPB LPORs war, mit Ausnahme der *S*/LPOR, eine Reinigung mittels IMAC an Ni²⁺-NTA-Material erfolgreich. Durch eine anschließende Größenausschlusschromatographie konnte für alle, mit Ausnahme der *At*LPORC, eine Erhöhung der Reinheit erzielt werden. Für die meisten der hier untersuchten LPORs konnte somit ausreichend Protein in geeigneter Reinheit produziert werden, um detaillierte Aktivitätsmessungen und strukturelle Untersuchungen zu ermöglichen.

3.1.4 Der Großteil der neu identifizierten AAPB LPORs zeigt eine lichtabhängige Aktivität

Um nachzuweisen, dass es sich bei den in dieser Arbeit neu identifizierten LPORs aus AAPBs tatsächlich um funktionelle lichtabhängige Enzyme handelt, wurden mit allen gereinigten LPORs (Kapitel 3.1.3) Aktivitätsuntersuchungen (Kapitel 2.17) durchgeführt. Wie im Materialien- und Methoden-Teil beschrieben, kann die lichtabhängige Aktivität von LPORs durch den Nachweis der lichtabhängigen Bildung des LPOR-Reaktionsprodukts Chlorophyllid (Chlid) erfolgen. Hierzu wurden die entsprechenden Reaktionsansätze (Kapitel 2.17) direkt in der Küvette im Spektralphotometer mit Blaulicht belichtet (Kapitel 2.17). In Abbildung 21 ist eine solche Aktivitätsmessung exemplarisch am Beispiel der *E*/LPOR gezeigt. Dargestellt sind die gemessenen Spektren von 0 Sekunden (schwarz) bis 20 Sekunden (hellgrau) Belichtung nach der Filterung der „Licht-An“-Ereignisse (Kapitel 2.17). Die Absorptionsabnahme bei 632 nm zeigt die Abnahme der Pchlid-Konzentration (blauer Pfeil), wohingegen die Zunahme der Absorption bei 672 nm (roter Pfeil) auf die Bildung des LPOR-Reaktionsprodukts Chlid zurückzuführen ist. Für eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Proteine wurde die Chlid-Bildung in Abhängigkeit zur Belichtungszeit dargestellt. Hierzu wurde die Absorptionsänderung bei 672 nm gegen die Belichtungszeit aufgetragen (Abbildung 21, *inset*).

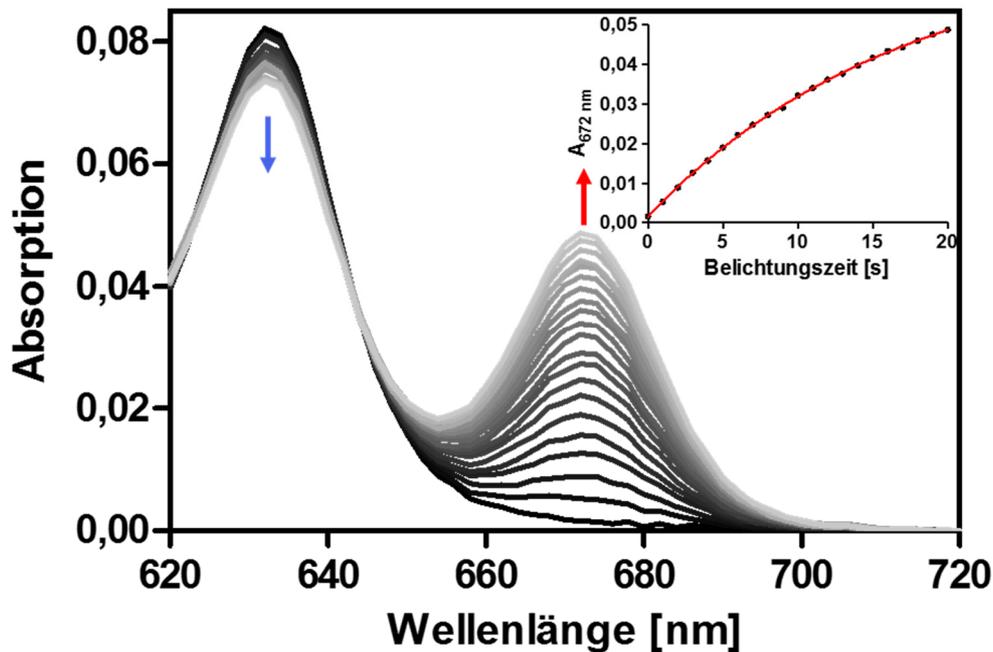


Abbildung 21: Exemplarische Aktivitätsmessung am Beispiel der E/LPOR. Die Aktivitätsmessung erfolgte bei einer Substratkonzentration von $3,5 \mu\text{M}$ Pchlid. Der Assay wurde wie in Kapitel 2.17 beschrieben angesetzt und durchgeführt. Für eine bessere Übersicht sind nur die Spektren von 0 Sekunden (schwarz) bis 20 Sekunden (hellgrau) Belichtung dargestellt. Der blaue Pfeil zeigt die Abnahme der Absorption bei 632 nm und damit die Abnahme der Pchlid-Konzentration. Die Produktion von Chlorophyllid ist an der Absorptionszunahme bei 672 nm zu erkennen (roter Pfeil). Zur Darstellung der Chlid-Bildung in Abhängigkeit zur Belichtungszeit wurde die Absorption bei 672 nm gegen die Belichtungszeit aufgetragen (*inset*). Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe des Programms Origin 7G an eine exponentielle Funktion erster Ordnung angepasst (Kapitel 2.17.5).

In Abbildung 22 ist die belichtungszeitabhängige Chlid-Bildung aller gereinigten putativen LPORs gezeigt. Außerdem sind zum Vergleich die lichtabhängige Aktivität der cyanobakteriellen *TeLPOR* aus *T. elongatus* [134], der pflanzlichen *AtLPORC* aus *A. thaliana* [85, 144] und der bereits beschriebenen AAPB LPOR aus *D. shibae* (*DsLPOR*) [1] dargestellt. Für alle als Kontrolle vergleichend untersuchten, bereits beschriebenen LPORs (*TeLPOR*, *AtLPORC* und *DsLPOR*) konnte, wie erwartet, eine LPOR-Aktivität nachgewiesen werden (Tabelle 20, Abbildung 22). Ein Vergleich der hier als Referenz dienenden LPORs mit der Literatur war nicht möglich, da in der Literatur keine spezifischen Aktivitätswerte angegeben sind. Bei den in der Literatur angegebenen Werten handelt es sich lediglich um Angaben zur umgesetzten Menge Pchlid pro Minute [134] oder es wurde lediglich die generelle Aktivität nachgewiesen [1, 144].

Für die bereits in unterschiedlichen Bachelor- und Masterarbeiten untersuchten LPORs (*E/LPOR* [91], *EbLPOR* und *GpLPOR* [95]) konnte die bereits zuvor beobachtete lichtabhängige Aktivität verifiziert werden. Zusätzlich konnten für die in dieser Arbeit neu identifizierten und gereinigten LPORs aus *Spingomodales* sp. (*SpLPOR*), *Porphyrobacter dokdonensis* (*PdLPOR*) und *Loktanella fryxellensis* (*LfLPOR*) eindeutig LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich nahm die spezifische Aktivität aller hier untersuchten gereinigten LPORs in der Reihenfolge *EbLPOR* > *TeLPOR* > *SpLPOR* >

PdLPOR > *EiLPOR* > *GpLPOR* > *LfLPOR* > *DsLPOR* > *AtLPORC* ab. Die vergleichsweise eher geringe Aktivität der *AtLPORC* ist dabei wahrscheinlich auf eine im Vergleich zu den anderen LPORs geringere Reinheit zurückzuführen (Abbildung 61 A im Anhang). Durch die Verunreinigungen wurde demzufolge die Konzentration der *AtLPORC* im Assay als zu hoch eingeschätzt, woraus sich eine verringerte spezifische Aktivität ergab.

Für die in dieser Arbeit neu identifizierte putative LPOR aus *Sandarakinorhabdus* sp. (*SaLPOR*) konnte, trotz erfolgreicher Reinigung (Abbildung 61 I im Anhang), keine LPOR-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 22, graue Linie). Dasselbe gilt für die putative LPOR aus *Saccharopolyspora erythraea*, welche zwar ebenfalls erfolgreich gereinigt werden konnte (Abbildung 61 J im Anhang), jedoch keine Aktivität aufwies [91]. Die Gruppierung der *SehGCLPOR* zusammen mit der SDR *outgroup* im phylogenetischen Stammbaum (Abbildung 20) sowie die fehlende LPOR-Aktivität erhärten also die Vermutung, dass es sich bei diesem Enzym eher um ein SDR- als um ein LPOR-Enzym handelt. Details zu den entsprechenden Messungen, wie vollständige Umsatzkurven, Spektren zum Nachweis der Chlid-Produktbildung sowie die entsprechenden Kontrollmessungen ohne Belichtung und ohne Enzymzugabe, sind im Anhang (Abbildung 62) zu finden.

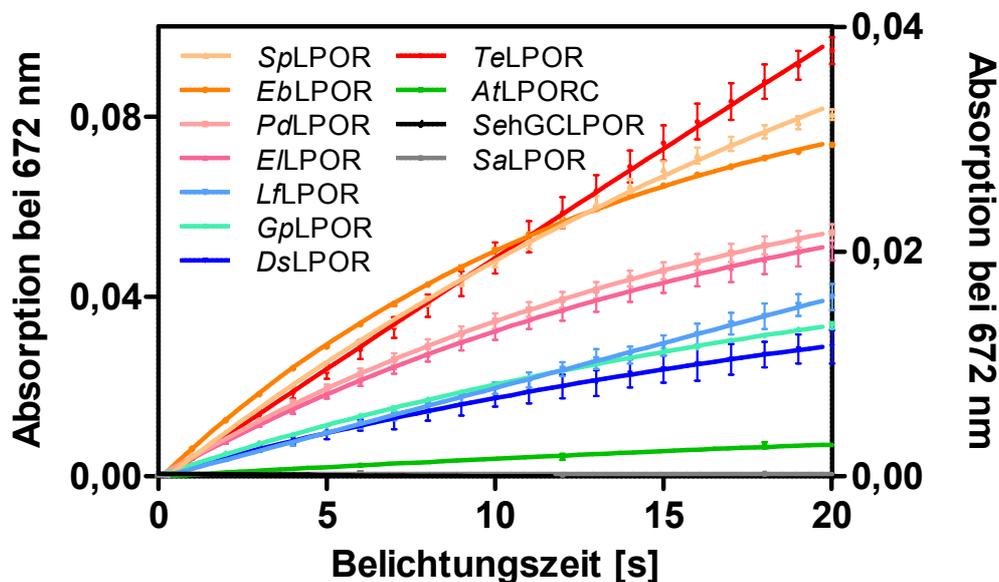


Abbildung 22: Aktivität aller gereinigten LPORs im Vergleich. Die Aktivitätsmessung wurde wie in Kapitel 2.17 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe des Programms Origin 7G an eine exponentielle Funktion erster Ordnung (Kapitel 2.17.5) angepasst. Der Übersichtlichkeit halber wurden zwei unterschiedlich skalierte Y-Achsen für die gemeinsame Darstellung der sehr aktiven LPORs (*SpLPOR*, *EbLPOR*, *PdLPOR*, *EiLPOR* und *TeLPOR*, Rot- und Orangetöne, linke Y-Achse) und die weniger aktiven LPORs (*LfLPOR*, *GpLPOR* und *DsLPOR*, Blau- Grün- und Grautöne, rechte Y-Achse) gewählt.

Tabelle 20: Übersicht der spezifischen Aktivitäten aller gereinigter LPORs. Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgte wie in Kapitel 2.17.5 beschrieben.

Protein	Spezifische Aktivität [$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$]
<i>Te</i> LPOR	0,65 ± 0,04
<i>At</i> LPORC	0,02 ± 0,002
<i>Eb</i> LPOR	0,69 ± 0,01
<i>Sp</i> LPOR	0,58 ± 0,02
<i>Pd</i> LPOR	0,48 ± 0,04
<i>El</i> LPOR	0,41 ± 0,04
<i>Lf</i> LPOR	0,10 ± 0,01
<i>Gp</i> LPOR	0,11 ± 0,001
<i>Ds</i> LPOR	0,09 ± 0,02
<i>Sa</i> LPOR	-
<i>Seh</i> GCLPOR	-

Für einen qualitativen Aktivitätsnachweis der LPORs, welche nicht in ausreichender Menge produziert oder nicht gereinigt werden konnten, sowie für die *Sa*LPOR und *Seh*GCLPOR, welche in gereinigter Form keine Aktivität besaßen, wurden Aktivitätsmessungen unter Verwendung zellfreier Rohextrakte durchgeführt (Kapitel 2.17.1). Als Negativkontrolle diente ein zellfreier Rohextrakt, welcher aus einem pET28a-Leervektor tragenden *E. coli* BL21(DE3)-Stamm gewonnen wurde. In Abbildung 23 sind die Umsatzkurven aus diesen Messungen gezeigt. Für drei dieser acht LPORs (*An*LPOR, *Sl*LPOR, *Lv*LPOR) konnte so eindeutig eine LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Wie aus den in Abbildung 24 dargestellten SDS-PAGE-Analysen ersichtlich, ist für die *An*LPOR keine Expressionsbande des Zielproteins zu erkennen. Für die *Lv*LPOR ist eine Produktion zu erkennen, jedoch liegt das gebildete Protein vorwiegend in unlöslicher Form vor. Eine entsprechende Bande in der löslichen Fraktion ist nicht zu erkennen (Abbildung 24). Eine kleine, auf der SDS-PAGE nicht sichtbare, Menge der *An*LPOR und *Lv*LPOR muss jedoch in löslicher Form produziert worden sein, da der entsprechende Rohextrakt beider Expressionskulturen eindeutig LPOR-Aktivität aufweist. Für alle weiteren so untersuchten putativen LPORs konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die putative *Sa*LPOR und *Seh*GCLPOR, welche bereits als gereinigtes Protein keine Aktivität zeigten, besaßen auch im Rohextrakt keine LPOR-Aktivität. Auch für die hier neu identifizierte putative LPOR aus *Sulfitobacter guttiformis* (*Sg*LPOR) konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Die entsprechenden SDS-PAGE-Analysen zeigten, dass das Protein ausschließlich in unlöslicher Form akkumulierte (Abbildung 64 im Anhang). Ebenso konnte sowohl für die cyanobakterielle LPOR aus *Synechocystis* sp. (*Ss*LPOR) als auch für das pflanzliche Enzym aus *Hordeum vulgare* (*Hv*LPORA, LPOR A) keine LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Da für diese

Enzyme jedoch bereits LPOR-Aktivität beschrieben wurde [80, 106, 145-147], müssen andere Faktoren für die Funktionsunfähigkeit verantwortlich sein. Im Falle der SsLPOR konnte in *E. coli* kein Protein produziert werden (Abbildung 64). Für die pflanzliche LPOR aus *H. vulgare* war eine Expression möglich (Abbildung 64), jedoch konnte anders als bei Schulz *et al.* keine Aktivität nachgewiesen werden. Schulz *et al.* verwendeten für die Expression des HvLPOR-Gens den *E. coli*-Stamm lambda gt11-A7 und resuspendierten die Zellen in einem 20 mM HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 und 20 mM Saccharose, 2 mM Magnesiumsulfat und 5 mM Cystein. Ebenso wie in dieser Arbeit wurde ein Zelllysat für die Aktivitätsmessung verwendet. Während ein Einfluss dieser Faktoren auf die Bildung funktionellen Proteins zwar unwahrscheinlich erscheint, kann dieser dennoch nicht ausgeschlossen werden.

Details zu allen Messungen, wie vollständige Umsatzkurven für jedes Protein mit den dazugehörigen Spektren zum Zweck des eindeutigen Produktbildungsnachweises sowie die dazugehörigen Kontrollmessungen (ohne Belichtung, Leervektorkontrolle), sind im Anhang in Abbildung 63 gezeigt.

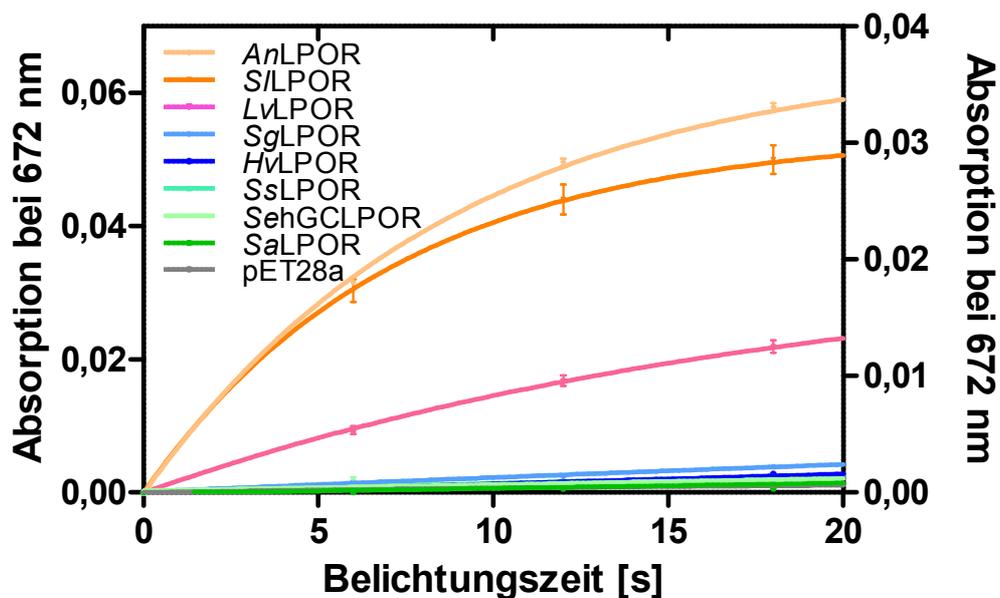


Abbildung 23: Rohextrakt-Aktivität der LPORs im Vergleich. Die Aktivitätsmessung wurde wie in Kapitel 2.17 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Jedoch wurden anstelle von 10 µl gereinigten Proteins 250 µl Rohextrakt im Assay eingesetzt, und das Volumen des Lagerpuffers entsprechend angepasst. Des Weiteren wurde die Belichtungszeit pro Intervall auf 6 Sekunden erhöht. Die experimentellen Daten wurden mit Hilfe des Programms Origin 7G an eine exponentielle Funktion erster Ordnung (Kapitel 2.17.5) angepasst. Der Übersichtlichkeit halber wurden zwei unterschiedlich skalierte Y-Achsen für die gemeinsame Darstellung der aktiven LPORs (*AnLPOR*, *S/LPOR*, und *LvLPOR*, Rot- und Orangetöne, linke Y-Achse) und der inaktiven LPORs (*SgLPOR*, *HvLPOR*, *SsLPOR*, *SehGCLPOR* und *SaLPOR*, Blau- Grün- und Grautöne, rechte Y-Achse) gewählt.

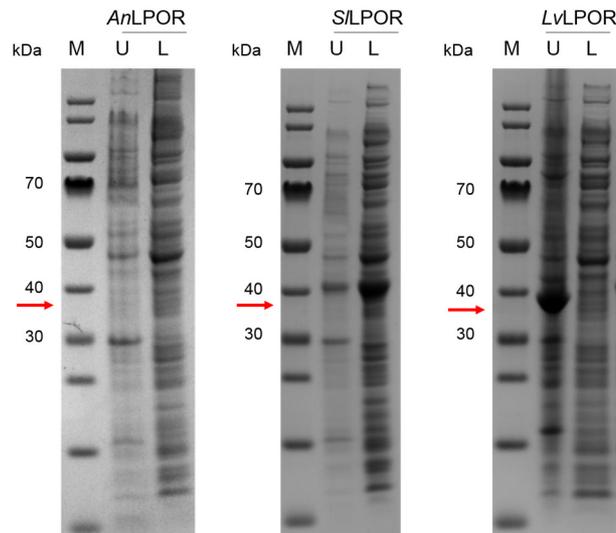


Abbildung 24: SDS-PAGE-Analysen der unlöslichen (U) und löslichen (L) Fraktion der im Rohextrakt aktiven LPOR-Proteine. Es wurden Gradientengele (NuPAGE® 4-15 % Bis-TRIS-Gel) der Firma Thermo Fisher Scientific (Bonn, Deutschland) verwendet. Die Trennung der Moleküle erfolgte für eine Stunde bei 150 V unter Verwendung des MES-Laufpuffers. Zur Abschätzung der Molekülgröße wurde als Referenz der Molekulargewichtsstandard (M) „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet. Die roten Pfeile weisen auf das Molekulargewicht der jeweiligen LPOR.

Parallel zu den hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen wurden für alle putativen LPOR-Enzyme, von Lena Peters (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich, Institut für molekulare Enzymtechnologie, AG Drepper) *in vivo* Komplementationsstudien durchgeführt [148]. Hierfür wurde in dem wildtypischen *R. capsulatus* B10S Stamm die BchB-Untereinheit der DPOR durch Insertion einer Spectinomycin-Resistenzkassette unterbrochen, sodass dieser Stamm kein Bakteriochlorophyll mehr produzieren kann und so ein phototrophes Wachstum nicht mehr möglich ist. Zur Untersuchung der Enzymaktivität wurden die jeweiligen LPOR-tragenden *Rhodobacter*-Expressionsvektoren über Konjugation in die *R. capsulatus*-Zellen eingebracht und in Flüssigkulturen zunächst mikroaerob chemotroph in Minimalmedium und später zum Testen der LPOR-Aktivität anaerob phototroph in einem nährstoffreichen Medium angezogen. Unter diesen Wuchsbedingungen können lediglich Zellen wachsen, welche Plasmid-basiert eine funktionelle LPOR exprimieren. Die Einteilung der Aktivität erfolgte anhand der Zelldichte sowie anhand des gebildeten Bakteriochlorophylls pro Zelle, dessen Konzentration spektrophotometrisch durch die Messung eines Ganzzellabsorptionsspektrums bestimmt wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 21 im Vergleich zu den *in vitro* Ergebnissen zusammengefasst.

Tabelle 21: Übersicht über die *in vitro* und *in vivo* Aktivität. Die Einteilung der Aktivität (*in vitro*: siehe Abbildung 22 und Abbildung 23) erfolgte in vier Kategorien von aktiv (dunkelgrün/+++) zu weniger aktiv (hellgrün/+) und nicht aktiv (rot/-).

Protein	<i>In vitro</i> Aktivität	<i>In vivo</i> Aktivität
TeLPOR	+++	+++
SsLPOR	-	+
AtLPORC	++	++
HvLPORA	-	+ -
EbLPOR	+++	++
SpLPOR	+++	+++
PdLPOR	+++	+++
EILPOR	+++	+
LfLPOR	++	++
GpLPOR	++	-
DsLPOR	++	+++
SILPOR	+	-
LvLPOR	+	++
AnLPOR	+	+++
SaLPOR	-	+++
SehGCLPOR	-	-
SgLPOR	-	-

Für zehn der 17 untersuchten, teils putativen, LPORs zeigt sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine nachweisbare Enzymaktivität. Die quantitative Bewertung der Aktivität ist dabei nicht in allen Fällen identisch, wie am Beispiel der *EILPOR* zu sehen ist. Während die *EILPOR* in den *in vitro* Analysen eine der aktivsten LPORs ist, konnte im korrespondierenden *in vivo* Versuch lediglich eine geringere LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Hier könnte z. B. eine schlechte Expression in *R. capsulatus* eine Erklärung sein. Umgekehrt verhält es sich bei der *AnLPOR*, welche in *E. coli* nur sehr schlecht produziert werden konnte und dadurch nur eine geringe Aktivität im Zellrohextrakt aufwies, wohingegen *in vivo* eine hohe Aktivität nachzuweisen war. Während die *GpLPOR* und die *SILPOR* *in vitro* eindeutig Aktivität besaßen, konnte für beide Enzyme *in vivo* keine Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte für die *SaLPOR* und die *SsLPOR* *in vivo* eindeutig Aktivität nachgewiesen werden, während für die entsprechenden in *E. coli* produzierten Enzyme keine Aktivität detektierbar war. Die *HvLPOR*, für welche *in vitro* keine Aktivität nachzuweisen war, zeigt *in vivo* unterschiedliche Ergebnisse. So kommt es in 50 % der Fälle zu einem Wachstum und in den anderen 50 % zu keinem Wachstum. Für die *SgLPOR* und *SehGCLPOR* konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Im

Falle der SehGCLPOR wurde bereits aufgrund des phylogenetischen Stammbaums (Abbildung 20) eine falsche Annotierung vermutet, sodass dieses Ergebnis keine Überraschung darstellt. Die SgLPOR allerdings gruppiert im Stammbaum mit den anderen hier identifizierten aktiven LPOR-Enzymen. Außerdem sind keine Auffälligkeiten gegenüber den anderen aktiven LPORs im Aminosäuresequenzalignment zu entdecken (Abbildung 19).

Neben der DsLPOR, der ersten in einem AAPB identifizierten LPOR [1], konnten in dieser Arbeit zwölf weitere putative LPORs aus aerob anoxygenen phototrophen Organismen produziert und teilweise gereinigt werden. Für neun dieser zwölf neuen LPORs konnte mittels *in vitro* Aktivitätstests entweder unter Verwendung von gereinigtem Protein oder zellfreier Rohextrakte eine eindeutige LPOR-Aktivität nachgewiesen werden. Werden die *in vivo* Daten von Lena Peters mit einbezogen, so konnten zehn der untersuchten putativen Enzyme eindeutig als LPOR identifiziert werden. Insgesamt wurde also für zehn der 27 in dieser Arbeit neu identifizierten putativen AAPB LPORs eine Aktivität nachgewiesen. Im Einklang mit den hier dargestellten phylogenetischen Analysen, in welchen die hier identifizierten AAPB LPORs eine monophyletische Gruppe bilden (Kapitel 3.1.2), liegt also die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen AAPB LPORs um eine neue, evolutionär konservierte Gruppe an LPOR-Enzymen handelt.

3.1.5 AAPB LPORs besitzen einen zu cyanobakteriellen LPORs konservierten Reaktionsmechanismus

Wie im vorangegangenen Kapitel nachgewiesen, besitzen die meisten der hier untersuchten AAPB LPORs eine lichtabhängige LPOR-Aktivität, d.h. sie katalysieren, genauso wie klassische pflanzliche und cyanobakterielle LPORs, den lichtabhängigen Umsatz von Pchlid zu Chlid. Im Hinblick auf die unterschiedliche phylogenetische Einordnung der AAPB LPORs (Kapitel 3.1.2) stellt sich die Frage, ob diese einen zu den pflanzlichen und cyanobakteriellen LPORs konservierten photochemischen Reaktionsmechanismus besitzen. Die neuesten Arbeiten zum Mechanismus von LPORs wurden 2018 von Archipowa *et al.* [46] präsentiert. Dabei wurde mittels zeitaufgelöster Absorptions- und Emissionsspektroskopie ein schrittweiser Hydridtransfermechanismus für die cyanobakterielle TeLPOR aus *T. elongatus* nachgewiesen. Mechanistisch wurden die Ergebnisse als ein initialer Elektronentransfer von NADPH auf Pchlid im angeregten Singulettzustand, gefolgt von einem Protonen-gekoppelten Elektronentransfer und anschließendem Protonentransfer, interpretiert (Kapitel 1.3.2.2). Mittels transientser Absorptionsspektroskopie (TA) können spektrale Änderungen, z. B. aufgrund photochemischer Prozesse oder Umwandlungen, nach Anregung mit Licht zeitaufgelöst

verfolgt werden. Dabei können Aussagen über die Identität und die Lebensdauer von verschiedenen transient besetzten Zuständen getroffen werden [122].

Um zu untersuchen, ob in AAPB LPORs die Reduktion des Pchlid-Substrates mittels desselben Mechanismus erfolgt, wurde die Photochemie der DsLPOR in Kooperation mit Dr. Roger J. Kutta (Lehrstuhl für Physikalische Chemie der Universität Regensburg) mittels TA untersucht. Insbesondere sollte hier der Protonen- und Elektronentransfer zwischen DsLPOR, NADPH und Pchlid beobachtet werden. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kapitel 2.23 beschrieben. Insgesamt wurden drei Proben untersucht: I) freies Pchlid, II) der pseudoternäre Komplex bestehend aus TeLPOR/NADP⁺/Pchlid und III) der photoaktive ternäre Holoproteinkomplex bestehend aus TeLPOR/NADPH/Pchlid. Die Absorptionsspektren dieser drei Proben vor und nach der transienten Absorption sind in Abbildung 25 dargestellt.

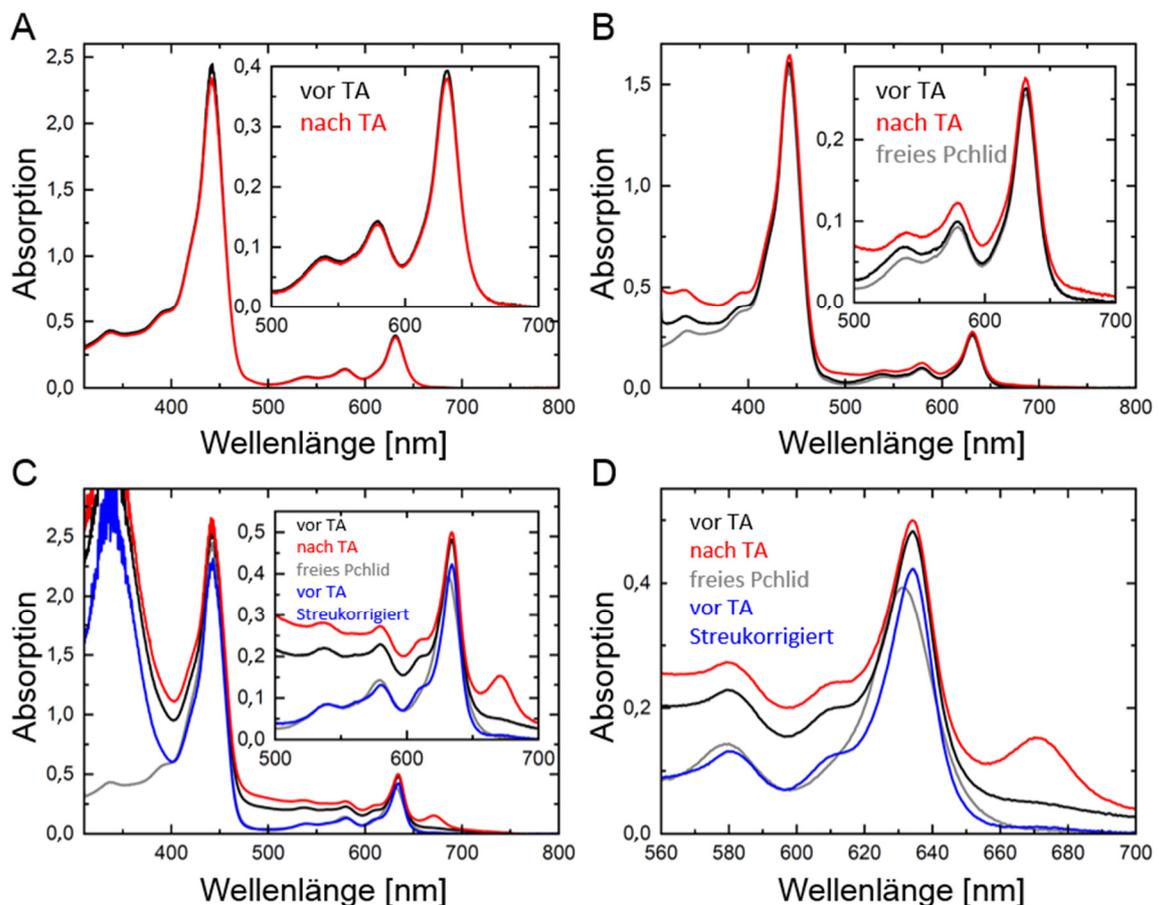


Abbildung 25: Absorptionsspektren vor und nach der transienten Absorption. (A) Absorptionsspektren des freien Pchlids (B) des pseudoternären Komplexes (*DsLPOR/NADP⁺/Pchlid*) (C) und des ternären Komplexes (*DsLPOR/NADPH/Pchlid*). (D) Ausschnitt aus den Spektren des ternären Komplexes im Bereich der Q_y -Bande. Alle Spektren wurden Offset korrigiert. Das blaue Spektrum (C-D) wurde über eine allgemeine Streufunktion $f(\lambda) = b\lambda^{-2} + a$ einer Streukorrektur unterzogen.

Zunächst wurde ungebundenes Pchlid als Referenz analysiert. Anhand der Absorptionsspektren vor und nach der Messung ist zu sehen, dass kein Verlust des Pchlids über die Dauer des Experiments

erfolgte (Abbildung 25 A). Die zeitaufgelösten Daten sind in Abbildung 26 gezeigt. Die maximale messbare Zeitverzögerung von 1,8 ns erlaubte nur die Betrachtung des S_1 -Zerfalls (Abbildung 26 B).

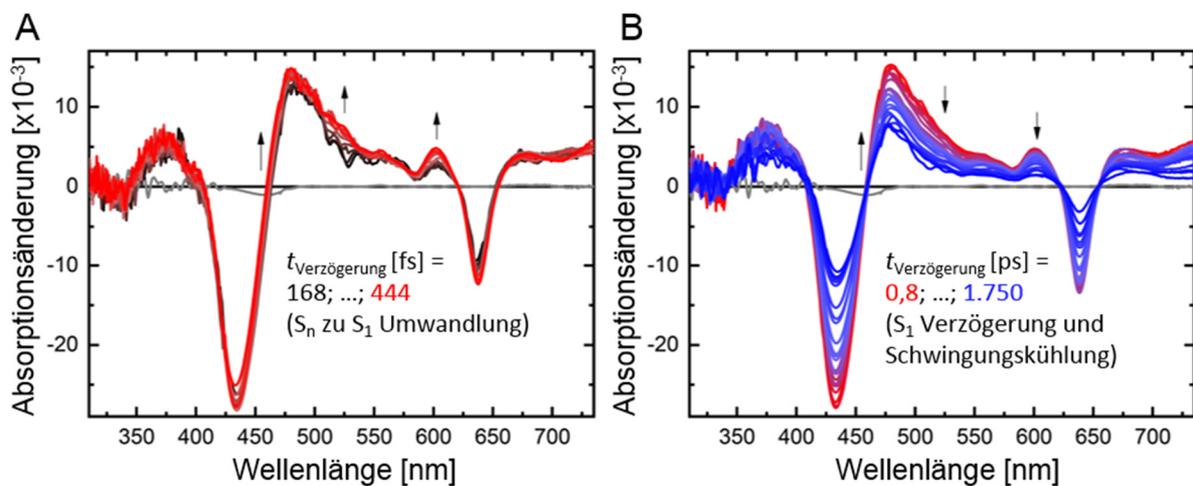


Abbildung 26: Zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektren des freien Pchlid. Die Messung erfolgte über einen Zeitbereich bis 1,8 ns. (A) Der S_n -Zerfall und (B) der S_1 -Zerfall.

Die Absorptionsspektren des pseudoternären Komplexes (*DsLPOR/NADP⁺/Pchlid*) vor und nach der Messung sind in Abbildung 25 B gezeigt. Werden diese Spektren mit denen des freien Pchlid (graue Linie in Abbildung 25 B) verglichen, so ist zu sehen, dass im pseudoternären Komplex fast keine Bindung des Substrates Pchlid erfolgte (keine Rotverschiebung der Q_y -Bande sichtbar, vergleiche Kapitel 3.2.1). Außerdem denaturierte/aggregierte die *DsLPOR* während der Messung, was anhand des spektralen Drifts im Wellenlängenbereich < 400 nm zu erkennen ist. Aus diesem Grund konnten nur die ersten TA-Daten verwendet werden (Schrittweite von 10 ps) und deswegen keine Angaben zur S_1 -Lebensdauer gemacht werden. Diese Daten sind in Abbildung 27 A gezeigt. Aufgrund der fehlenden Pchlid-Bindung entsprechen die Daten denen des ungebundenen Pchlid (Vergleich Abbildung 26).

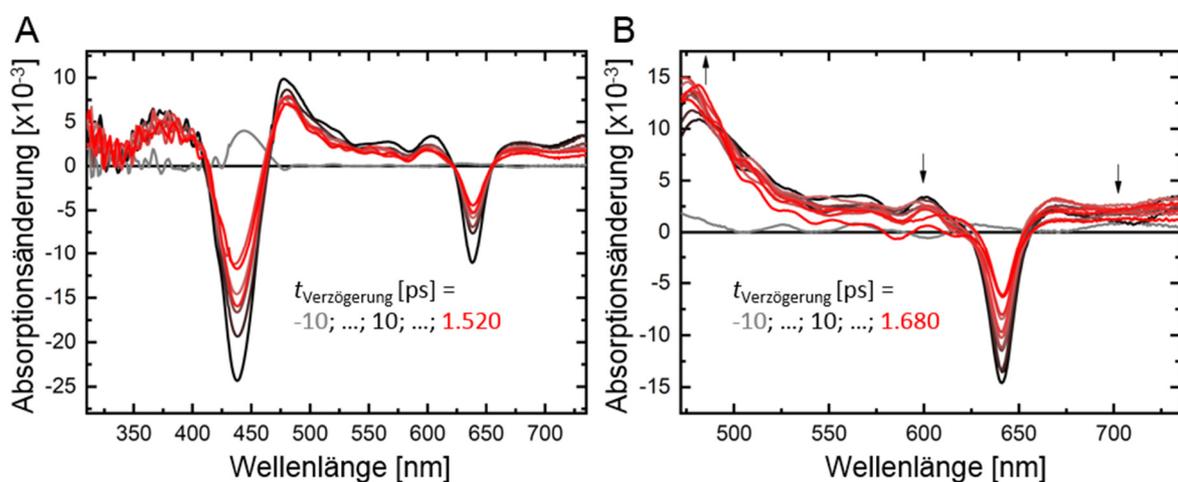


Abbildung 27: Zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektren des gebundenen Pchlid. Die Messung erfolgte über einen Zeitbereich bis 1,8 ns. (A) Messungen des pseudoternären und (B) des ternären Komplexes.

Abbildung 25 C und D zeigen die Absorptionsspektren des photoaktiven ternären Komplexes (*DsLPOR/NADPH/Pchlid*). Eine signifikante Rotverschiebung der Maxima im Vergleich zum ungebundenen Pchlid ist zu erkennen, was eine Pchlid-Bindung im Komplex nachweist (siehe auch Kapitel 3.2.1). Da auch diese Probe während der Messung aggregierte, konnten auch hier nur die ersten TA-Daten bei einer Schrittweite von 10 ps verwendet werden. Die Daten sind in Abbildung 27 B dargestellt. Aufgrund der großen Zeitintervalle kann auch hier keine Aussagen zu Lebenszeiten gemacht, sondern nur der Unterschied in den zeitaufgelösten Daten im Vergleich zum pseudoternären Komplex und freien Pchlid qualitativ betrachtet werden. Während der S_1 -Zerfall vom Pchlid in einem simultanen Zerfall der Absorption im gesamten spektralen Bereich beobachtet werden kann, ist im ternären Komplex ein Anstieg der Absorption bei 475 nm zu erkennen. Zudem klingt die Absorption bei 600 nm im Fall des ternären Komplexes vollständig ab, während eine signifikante positive Absorption im Falle des pseudoternären Komplexes bleibt. Diese spektralen Änderungen wurden ebenfalls von Archipowa *et al.* [46] beobachtet und lassen sich daher ebenfalls einem Elektronentransfer von NADPH zum Pchlid im S_1 -Zustand zuordnen. Aufgrund der Instabilität der *DsLPOR*-Probe unter den hier verwendeten experimentellen Bedingungen konnten keine weiteren detaillierten Aussagen getroffen werden. Für weiterführende Experimente sollten AAPB LPORs mit höherer Stabilität verwendet werden.

Aufgrund der Aggregation der pseudoternären und ternären Komplex-Proben während der transienten Absorptionssmessung konnten nur die ersten Daten aus der transienten Absorptionssmessung mit einer Schrittweite von 10 ps ausgewertet werden. Aus diesem Grund konnten keine genaueren Aussagen zu Lebenszeiten gemacht werden. Anhand des Vergleichs der vorhandenen Daten des ternären *DsLPOR/NADPH/Pchlid*-Holoprotein-Komplexes mit den Daten des freien Pchlids und der Messungen von Archipowa *et al.* [46] kann der beobachtete Zerfall im ternären Komplex einem Elektronentransfer von NADPH zum angeregten Singulettzustand (S_1) des Pchlid-Substrates zugeordnet werden. Mechanistisch scheint also zumindest der initiale Schritt des Reaktionsmechanismus zwischen der cyanobakteriellen *TeLPOR* und der *DsLPOR* aus AAPBs konserviert zu sein.

3.2 Vergleichende Charakterisierung der verschiedenen LPORs

Für alle in dieser Arbeit gereinigten LPORs aus AAPBs sowie für die cyanobakterielle *Tc*LPOR und die pflanzliche *At*LPORC wurden im Folgenden vergleichende Untersuchungen durchgeführt, um gegebenenfalls Parameter zu identifizieren, die für AAPB LPORs spezifisch sind. Hierzu wurden I) Dissoziationskonstanten für den LPOR/NADPH/Pchlid-Komplex, II) die Substratspezifität hinsichtlich der Akzeptanz von Monovinyl- und Divinyl-Pchlid, III) pH- und Temperatur-Aktivitätsoptima, IV) das temperaturabhängige Entfaltungverhalten sowie V) die Temperaturstabilität untersucht.

3.2.1 AAPB LPORs besitzen höhere K_d -Werte für die Dissoziation des ternären Komplexes als cyanobakterielle und pflanzliche LPORs

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes wurden, wie in Kapitel 2.19 beschrieben, Absorptionsspektren von Pchlid in Anwesenheit konstanter NADPH- und Triton X-100-Konzentrationen und unterschiedlichen Enzymkonzentrationen gemessen. Des Weiteren wurde die gleiche Messung in Anwesenheit von 70 mM DTT durchgeführt um den Einfluss von DTT auf die Dissoziation zu untersuchen.

Ohne den Kofaktor NADPH ist eine Bindung des Substrats Pchlid an LPORs nicht möglich. Heyes *et al.* zeigten dies am Beispiel der LPOR aus *Thermosynechococcus elongatus* [149]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bindung des NADPHs an die LPOR mindestens drei kinetische Ereignisse beinhaltet, was wiederum darauf hinweist, dass der NADPH-Bindungsprozess durch Konformationsänderungen im Protein gesteuert ist. Auch die Pchlid-Bindung an das NADPH/LPOR-Koenzym beinhaltet weitere Konformationsänderungen im Protein und ist ein komplizierter Prozess. Während einer relativ schnellen zweiphasigen Reaktion, welche wahrscheinlich die Bildung eines anfänglichen Komplexes darstellt, sind langsamere substratinduzierte Konformationsänderungen innerhalb des Enzyms für die Bildung des endgültigen photoaktiven ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes erforderlich. Diese strukturellen Änderungen sind für die Rotverschiebung des Pchlid-Absorptionsmaximums bei etwa 630 nm verantwortlich.

In Abbildung 28 A und C sind die gemessenen Absorptionsspektren der *Ds*LPOR ohne DTT und mit DTT gezeigt. Die Bildung des ternären Komplexes führt zusätzlich zur eben beschriebenen Rotverschiebung des Absorptionsmaximums der Q_y -Bande (Kapitel 2.16.5) des Pchlid-Substrates auch zur Zunahme der Absorption (erhöhter Extinktionskoeffizient) im Vergleich zu freiem Pchlid [149]. Die entsprechenden Daten (Abbildung 28 A und C) wurden von Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) ausgewertet und so der K_d -Wert bestimmt. Alle Daten zur Bestimmung der Dissoziationskonstante sind im Anhang in Abbildung 65 bis Abbildung 72 gezeigt. Eine Übersicht über die resultierenden K_d -Werte ist Tabelle 22 zu entnehmen. Von allen hier untersuchten LPORs besitzen die pflanzliche und cyanobakterielle LPOR

die niedrigsten K_d -Werte. Diese liegen bei $2,0 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (*TeLPOR*) und $1,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (*AtLPORC*). In der Literatur findet man für die Dissoziation des *TeLPOR*/NADPH/Pchlid-Komplexes einen K_d -Wert von $5,6 \pm 0,6 \mu\text{M}$ [56], wobei die Abweichung auch hier wahrscheinlich auf abweichende Messbedingungen zurückzuführen ist. Außerdem scheint für beide Proteine DTT keinen Einfluss auf die Bindung zu haben. Für beide Proteine resultiert aus einem molaren 1:1 Verhältnis von Enzym und Substrat eine Beladung von mindestens 50 %. Die meisten hier untersuchten AAPB LPORs zeigen K_d -Werte deutlich über denen der cyanobakteriellen und pflanzlichen Enzyme. *DsLPOR* und *GpLPOR* bilden hierbei die beiden Extremfälle. Diese zeigen im Vergleich zu den anderen LPORs vergleichsweise hohe K_d -Werte von $76 \pm 8 \mu\text{M}$ und $84 \pm 20 \mu\text{M}$ ohne DTT sowie einen signifikant höheren K_d -Wert in Anwesenheit von DTT. Diese vergleichsweise hohen K_d -Werte legen nahe, dass die Bindung zwischen Substrat und *DsLPOR* bzw. *GpLPOR* nicht sehr stark ist. Außerdem scheint DTT die Bindung negativ zu beeinflussen, was die eher geringen Aktivitäten der beiden Enzyme unter Standard-Assaybedingungen (Kapitel 3.1.4, Tabelle 20) erklären könnte. Abweichend von den anderen AAPB LPORs weisen die *SpLPOR* und *LfLPOR* interessanterweise K_d -Werte im niedrigen μM -Bereich auf. Ihr Verhalten ist daher ähnlicher zu den cyanobakteriellen und pflanzlichen LPORs als zu den restlichen AAPB Enzymen. In einer kürzlich durchgeführten Mutagenesestudie wurde am Beispiel der *TeLPOR* gezeigt, dass einzelne Aminosäureaustausche einen drastischen Einfluss auf die Dissoziationskonstante für Pchlid haben können, wobei Werte zwischen $3,5 \mu\text{M}$ (*TeLPOR*-G19A) und $45 \mu\text{M}$ (*TeLPOR*-T230F) beobachtet wurden. Der Einfluss dieser Austausch auf den K_d -Wert für NADPH fällt hierbei sogar noch drastischer aus, wobei Werte zwischen 21 nM (wildtypische *TeLPOR*) und 436 nM (*TeLPOR*-T230F) ermittelt wurden [56]. Eine vergleichende Untersuchung der NADPH-Bindung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, wäre jedoch bezüglich dieser Beobachtung von großem Interesse.

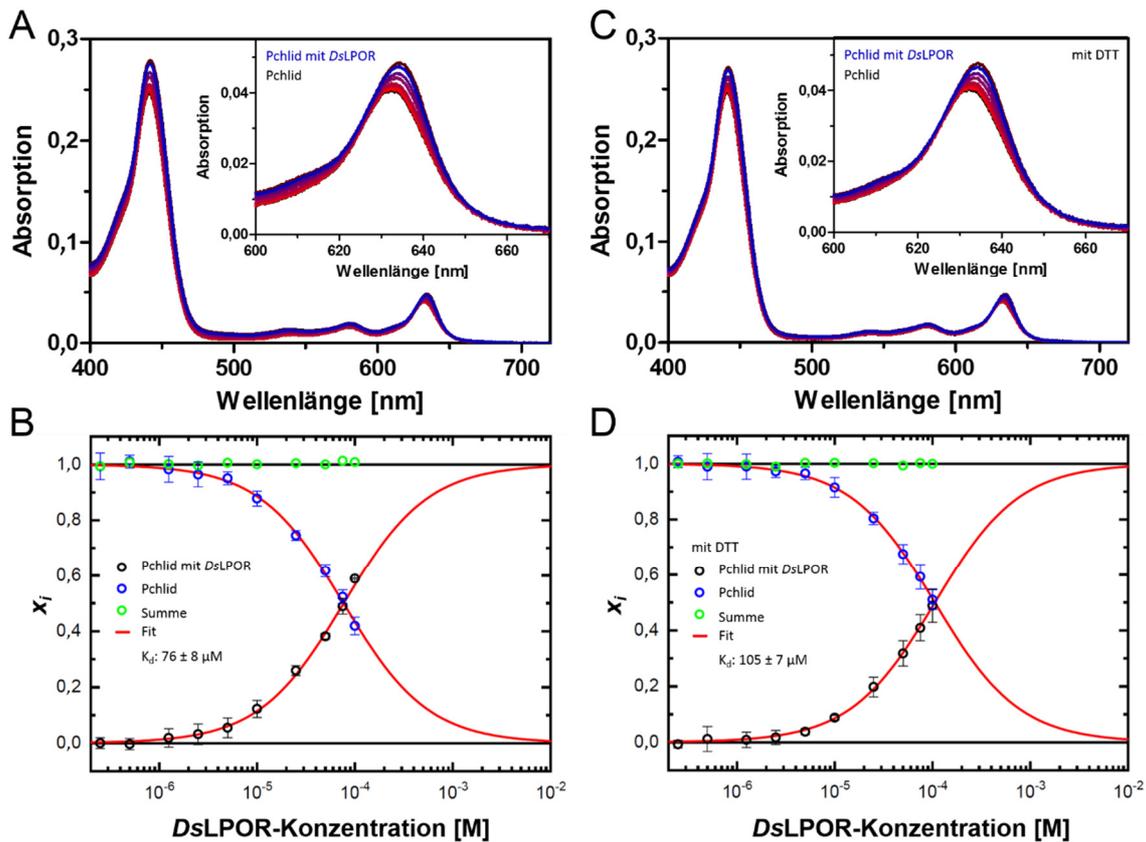


Abbildung 28: K_d -Wert Bestimmung am Beispiel der DsLPOR. (A) Absorptionsmessung und (B) Auswertung der Absorptionsmessung ohne Zugabe von DTT. (C) Absorptionsmessung und (D) Auswertung der Absorptionsmessung unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

Tabelle 22: Übersicht der Dissoziationskonstanten (K_d) für Pchlid.

LPOR	K_d -Wert für Pchlid [μM]	
	ohne DTT	mit DTT (70 mM)
<i>Te</i> LPOR	$2,0 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
<i>At</i> LPORC	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$
<i>E</i> LPOR	56 ± 2	41 ± 1
<i>Ds</i> LPOR	76 ± 8	105 ± 7
<i>Eb</i> LPOR	47 ± 3	44 ± 7
<i>Lf</i> LPOR	$5,9 \pm 0,9$	$5,7 \pm 0,4$
<i>Pd</i> LPOR	38 ± 2	41 ± 2
<i>Sp</i> LPOR	7 ± 1	7 ± 2
<i>Gp</i> LPOR	84 ± 20	134 ± 9

Die Dissoziationskonstanten der *Te*LPOR und *At*LPORC für Pchlid lassen auf eine Beladung von 50 % bei einem molaren Verhältnis von 1:1 schließen. Für alle Enzyme, mit Ausnahme der *Ds*LPOR und *Gp*LPOR, ist kein Einfluss von DTT auf die Bindung von Enzym und Substrat (Dissoziation des ternären Komplexes) zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu scheint DTT im Falle der *Ds*LPOR und *Gp*LPOR die Bindung zu verschlechtern. Trotz der konservierten Natur der hier untersuchten LPORs scheint es also zwischen den Enzymen drastische Unterschiede in der Substratbindung zu geben, wobei sich diese für die AAPB LPORs im Vergleich zu den pflanzlichen und cyanobakteriellen Enzymen in höheren K_d -Werten manifestieren.

3.2.2 Untersuchungen zu den Protochlorophyllid-Formen (MV- und DV-Pchlid)

In den meisten publizierten Arbeiten zu LPORs wird das nicht kommerziell erhältliche Pchlid-Substrat, wie in dieser Arbeit, aus *Rhodobacter capsulatus* ZY5 isoliert [49, 57, 71, 106, 149-153]. Dabei ist bekannt, dass es sich um eine Mischung aus Monovinyl (MV)- und Divinyl (DV)-Pchlid handelt [105]. In Abbildung 29 sind die Strukturformeln von MV- und DV-Pchlid gezeigt. Bisher wurde erst in einer Arbeit untersucht, ob LPORs beide Substratformen akzeptieren, wobei hier lediglich die cyanobakterielle *Te*LPOR betrachtet wurde [150]. In der Arbeit von Heyes *et al.* [150] wurden keine signifikanten Unterschiede beim Umsatz der beiden Substratformen beobachtet. Im Hinblick auf die drastischen Unterschiede im K_d -Wert, welche zwischen *Te*LPOR, *At*LPORC und den AAPB LPORs dieser Arbeit beobachtet wurden, liegt es jedoch nahe eine solche etwaige Substratpräferenz genauer zu untersuchen. Um die beiden Substratformen aus dem Gemisch isolieren zu können, wurde zunächst eine analytische *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Trennung durchgeführt, um das Verhältnis der beiden Formen zu bestimmen, Trennparameter zu identifizieren und deren Identität eindeutig nachzuweisen. Für Letzteres wurde eine massenspektroskopische Analyse durchgeführt um eine eindeutige Zuordnung zu gewährleisten (Kapitel 3.2.2.1). Im nächsten Schritt wurde unter den so identifizierten Bedingungen eine präparative Trennung (Kapitel 3.2.2.2) durchgeführt, sodass beide Substratformen in ausreichender Menge erhalten werden konnten, um eine Charakterisierung der Substratpräferenz der LPORs (Kapitel 3.2.2.3) zu ermöglichen.

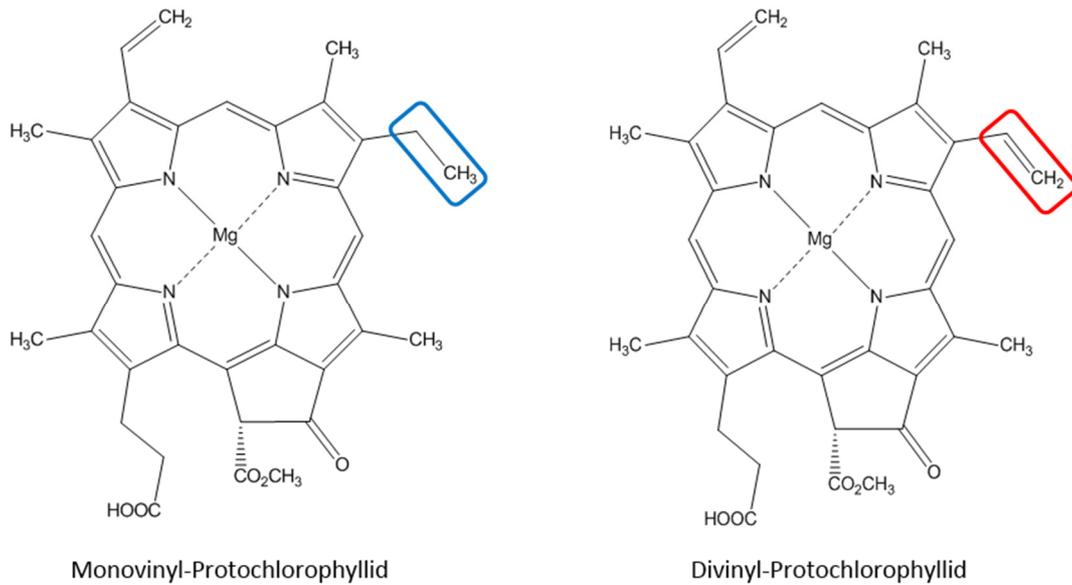


Abbildung 29: Strukturformeln von Monovinyl- und Divinyl-Protochlorophyllid.

3.2.2.1 Mittels Massenspektrometrie konnten MV- und DV-Pchlid eindeutig identifiziert werden

Die analytische Trennung von Monovinyl- und Divinyl-Protochlorophyllid erfolgte mittels HPLC wie in Kapitel 2.16.4.1 beschrieben. In Abbildung 30 A ist das Chromatogramm einer solchen Trennung gezeigt. Es sind zwei basisliniengetrennte Signale mit Retentionszeiten von 22,6 min und 27,3 min zu erkennen. Die dazugehörigen Absorptionsspektren, aufgenommen mittels Photodiodenarray (PDA)-Detektors, sind in Abbildung 30 B dargestellt. Für einen besseren Vergleich wurden die Absorptionsspektren auf die Pchlid-Soretbande bei ca. 432 nm normalisiert, sodass der Unterschied in den Maxima deutlicher zu erkennen ist. Beide unterschiedlich eluierenden Substanzen besitzen ein für Pchlid typisches Absorptionsspektrum mit der charakteristischen Soret- (ca. 432 nm), Q_x - (ca. 571 nm) und Q_y - (ca. 623 nm) Bande [154]. Bei genauerer Betrachtung stellt man jedoch geringe spektrale Unterschiede hauptsächlich bei den Soret- und Q_y -Bandenmaxima fest. Für eine eindeutige Identifizierung dieser beiden spektral leicht unterschiedlichen Pchlidformen wurde im Anschluss an die Trennung eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Diese erfolgte in der Laborwelt der Firma Shimadzu (Duisburg, Deutschland) mit Hilfe von Herrn Klaus Bollig (Shimadzu) unter den in Kapitel 2.16.4.1 beschriebenen Bedingungen.

Die daraus resultierenden Massedaten für die bei 22,6 min und 27,3 min eluierenden Komponenten sind in Abbildung 30 C und D dargestellt. Dabei sind die *counts per second* (cps), welche die Menge an Fragmenten einer Masse beschreiben, gegen das Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) dargestellt. In beiden Fällen sind je drei Hauptsignale zu erkennen. Für die Substanz, welche bei 22,6 min eluiert, ergeben sich die Massen von ca. 589 Da, 611 Da und 643 Da. Im Vergleich zu den gemessenen Massen der bei 27,3 min eluierenden Substanz sind diese somit um je 2 Da größer. Die theoretische Masse von

MV-Pchlid beträgt ca. 613 Da wohingegen, die theoretische Masse von DV-Pchlid bei ca. 611 Da liegt und somit 2 Da geringer ist. Dieser Massenunterschied lässt bereits darauf schließen, dass es sich bei dem Signal bei 22,6 min um DV-Pchlid und bei dem Signal bei 27,3 min um MV-Pchlid handelt. Somit sind sowohl die theoretische Masse von MV-Pchlid als auch von DV-Pchlid in den Ionenspektren zu sehen. Jedoch stellt sich die Frage, worum es sich bei den beiden anderen Massensignalen handelt. Für das Signal bei 643 Da bzw. 641 Da ist davon auszugehen, dass es sich um ein Methanoladukt handelt. Methanol besitzt eine theoretische Masse von 32 Da, was der Differenz dieser Signale zu den Massen von MV-Pchlid und DV-Pchlid entspricht. Da das Pchlid-Gemisch in Methanol gelöst und die chromatographische Trennung unter Verwendung von Methanol durchgeführt wurde, ist eine Methanoladukt-Bildung sehr wahrscheinlich. Bei den kleineren Signalen von 589 Da bzw. 591 Da handelt sich sehr wahrscheinlich ebenfalls um DV- bzw. MV-Pchlid, jedoch nach dem Verlust des Zentralatoms (Mg: ca. 24 Da) und einer Addition von zwei Protonen (H: ca. 1 Da). Anhand der durch die Massenspektrometrie erhaltenen Daten konnten die in der Chromatographie erhaltenen Signale eindeutig zu MV-Pchlid (Retentionszeit: 22,6 min) und DV-Pchlid (Retentionszeit: 27,3 min) zugeordnet werden. In folgenden präparativen Trennungen konnte somit zum einen durch die Retentionszeit und zum anderen durch die Messung eines Absorptionsspektrums, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Maxima, eine Zuordnung von MV- und DV-Pchlid erfolgen.

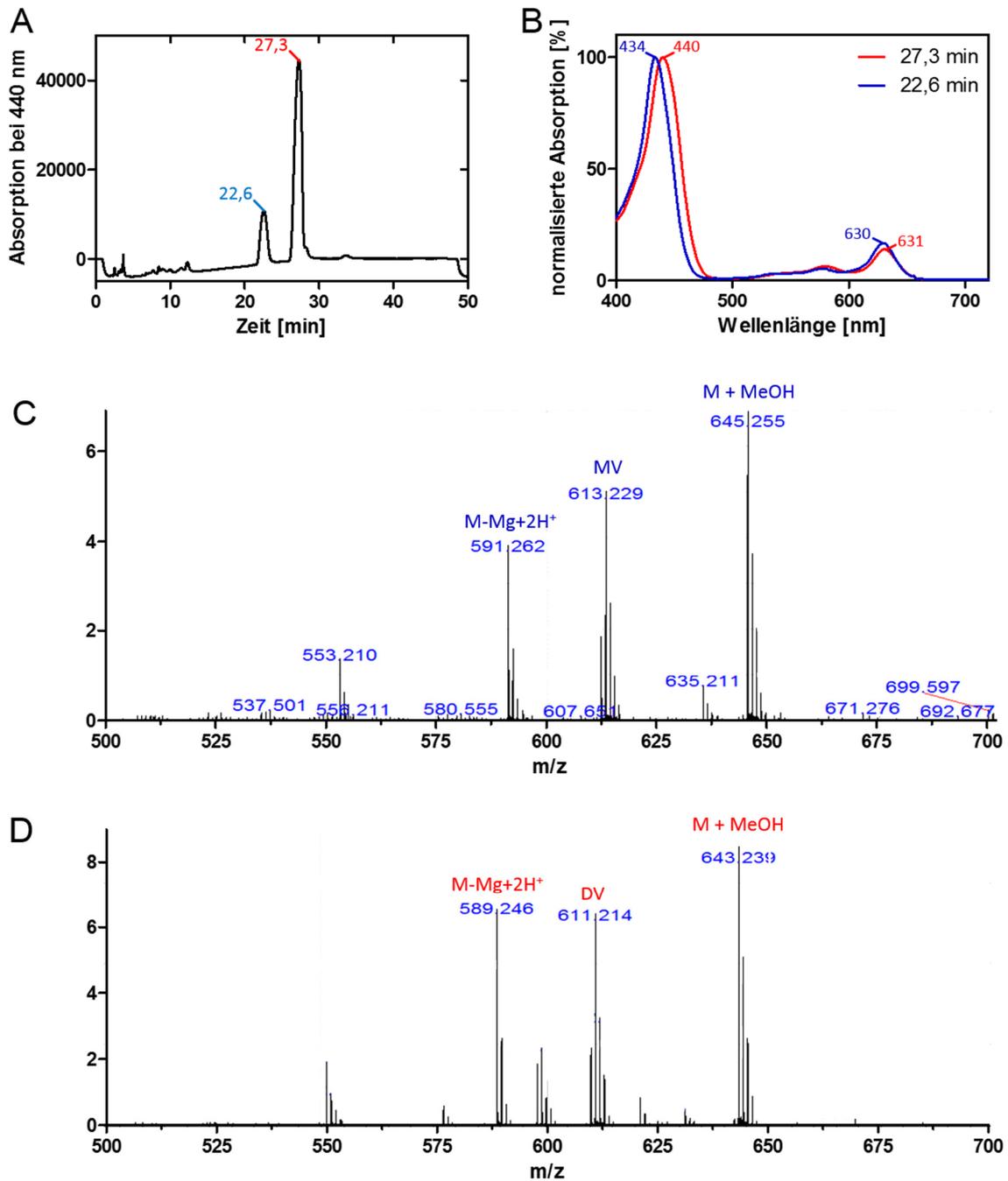


Abbildung 30: LC-MS-Analyse der beiden Pchlid-Formen. (A) Chromatogramm der MV- und DV-Pchlid-Trennung über eine hydrophobe C-30 Säule an einer *high performance liquid chromatography* (HPLC)-Anlage. (B) Absorptionsspektren der beiden Eluenten (22,6 min und 27,3 min). Für einen genauen Vergleich der Absorptionsmaxima sind die Absorptionsspektren auf die Soret-Bande normalisiert dargestellt. Für das Signal bei 27,3 min zeigt sich in beiden Maxima eine Rotverschiebung im Vergleich zu den Maxima des Signals bei 22,6 min. (C) Massenspektrum der bei 22,6 min eluierenden Komponente, welche als MV-Pchlid identifiziert werden konnte. (D) Massenspektrum der bei 27,3 min eluierenden Komponente, welche mittels Massenspektrometrie als DV-Pchlid identifiziert werden konnte.

Das aus *R. capsulatus* ZY5 erhaltene Pchlid-Gemisch konnte erfolgreich mittels HPLC in MV- und DV-Pchlid getrennt werden. Eine anschließende massenspektrometrische Analyse erlaubte eine eindeutige Zuordnung der HPLC-Eluenten.

3.2.2.2 MV- und DV-Pchlid konnten erfolgreich präparativ getrennt werden

Zur Ermöglichung einer Untersuchung der MV-/DV-Pchlid-Substratpräferenz der identifizierten LPORs, war eine präparative Trennung von MV- und DV-Pchlid notwendig, um beide Formen in ausreichenden Mengen zu erhalten. Hierfür wurde eine entsprechende präparative HPLC-Säule verwendet. Da die im Institut zur Verfügung stehenden HPLC-Anlagen keine präparativen Trennungen zulassen, wurde für die Reinigung von MV- und DV-Pchlid ein FPLC-System (ÄKTAbasic, GE Healthcare Life Science, Freiburg, Deutschland) entsprechend adaptiert (Kapitel 2.16.4.2). In Abbildung 31 ist das Chromatogramm einer präparativen Trennung von MV- und DV-Pchlid dargestellt. Die Absorption der Eluenten wurde bei 450 nm verfolgt. Hier absorbiert sowohl das MV-Pchlid als auch das DV-Pchlid stark genug, um sichtbar zu sein. Anhand des Chromatogramms ist zu erkennen, dass die beiden Pchlid-Formen basisliniengetrennt eluieren. Die im Folgenden vereinigten Fraktionen sind durch die schwarzen Kästen hervorgehoben. Beim Vereinigen der Fraktionen wurden jeweils einige Fraktionen am Rand des jeweiligen Peaks verworfen, um eine Verunreinigung zu minimieren. Die vereinigten Eluate wurden, wie in Kapitel 2.16.3 beschrieben, aus dem Puffer/Methanol-Gemisch extrahiert und getrocknet. So konnten bei einem Trennungslauf (8 ml hochkonzentrierte Pchlid-Gemischlösung) 3,8 mg MV- und 4,7 mg DV-Pchlid erhalten werden. Die Zuordnung der Eluenten als MV- bzw. DV-Pchlid erfolgte zusätzlich zur Retentionszeit über das Absorptionsspektrum (Abbildung 31 B).

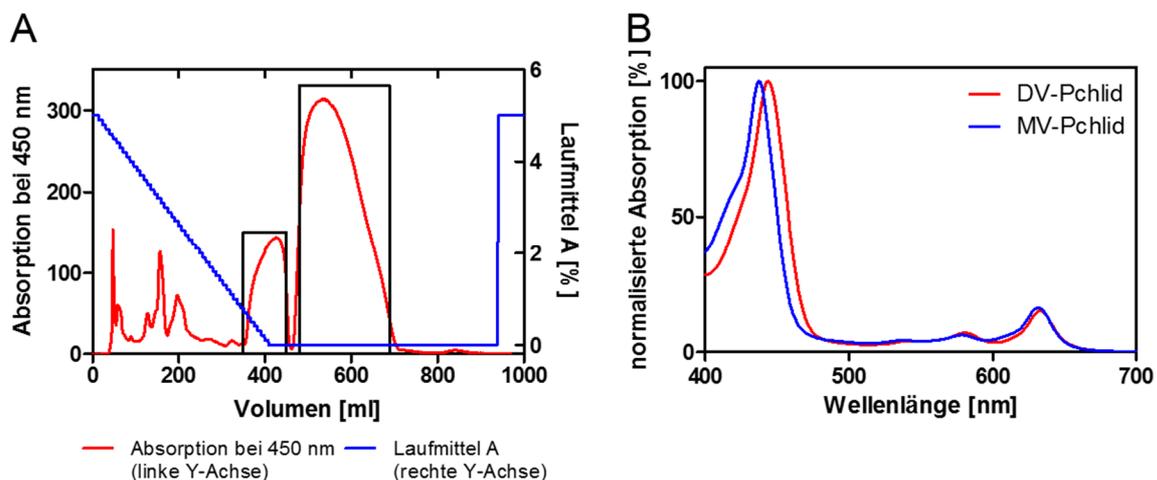


Abbildung 31: Präparative MV- und DV-Pchlid-Trennung. (A) Chromatogramm der präparativen MV- und DV-Pchlid-Trennung. Die schwarzen Kästen zeigen die vereinigten Fraktionen. In (B) sind die zu den beiden Eluenten gehörenden Absorptionsspektren des finalen gereinigten MV/DV-Pchlidpräparats gezeigt.

Mittels Adaption einer FPLC-Anlage konnten MV- und DV-Pchlid präparativ getrennt werden und so genügend Ausgangsmaterial für die Untersuchung der MV-/DV-Pchlid-Substratpräferenz der identifizierten LPORs gewonnen werden.

3.2.2.3 AAPB LPORs zeigen eine von den cyanobakteriellen und pflanzlichen LPORs abweichende Substratpräferenz

Zur Bestimmung der MV-/DV-Pchlid-Substratpräferenz wurden enzymkinetische Untersuchungen unter Verwendung von MV- bzw. DV-Pchlid, wie in Kapitel 2.17.4 beschrieben, durchgeführt. Für jede eingesetzte MV- bzw. DV-Pchlid-Konzentration wurde die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit bestimmt und diese zur Berechnung der spezifischen Aktivität verwendet. Die spezifische Aktivität wurde dann gegen die jeweilige Pchlid-Konzentration im Assay aufgetragen. Letztere wurde, um Ungenauigkeiten zu verringern, aus dem ersten (unbelichteten) Absorptionsspektrum jeder Messung berechnet.

In Abbildung 33 sind die resultierenden Daten für die sieben AAPB LPORs, sowie vergleichend für die cyanobakterielle und pflanzliche LPOR, gezeigt. Da alle Proteine bei hohen Substratkonzentrationen eine Abnahme der spezifischen Aktivität zeigen, wurden die Daten zunächst an eine „Substrat-Inhibition“-Funktion (Abbildung 32) angepasst. Die Ergebnisse aus dieser Anpassung sind in Tabelle 32 im Anhang zusammengefasst. Hier ist jedoch zu beachten, dass für die beobachtete Abnahme bei hohen Substratkonzentrationen verschiedene Effekte verantwortlich sein können. Zum einen wäre eine mechanistisch bedingte Inhibierung der Enzyme durch das Substrat (Substratüberschussinhibierung) denkbar. Weiter kommt eine irreversible Aggregation der Substrate, in Folge geringer Löslichkeit im wässrigen Reaktionsmedium in Frage. Hierdurch stünde eine geringere Substratmenge zur Bindung an das jeweilige Enzym zur Verfügung, was eine Verringerung des Umsatzes zur Folge hätte. Bei zunehmender Substratkonzentration konnte ein zunehmender Basislinienversatz beobachtet werden. Dieser deutet auf einen nicht-mechanistischen „Inhibierungseffekt“ hin, sodass die Daten über eine „Michaelis-Menten“-Funktion (Kapitel 2.17.4) ausgewertet, und im Folgenden die Ergebnisse dieser Auswertung für den Vergleich der Enzyme verwendet wurde.

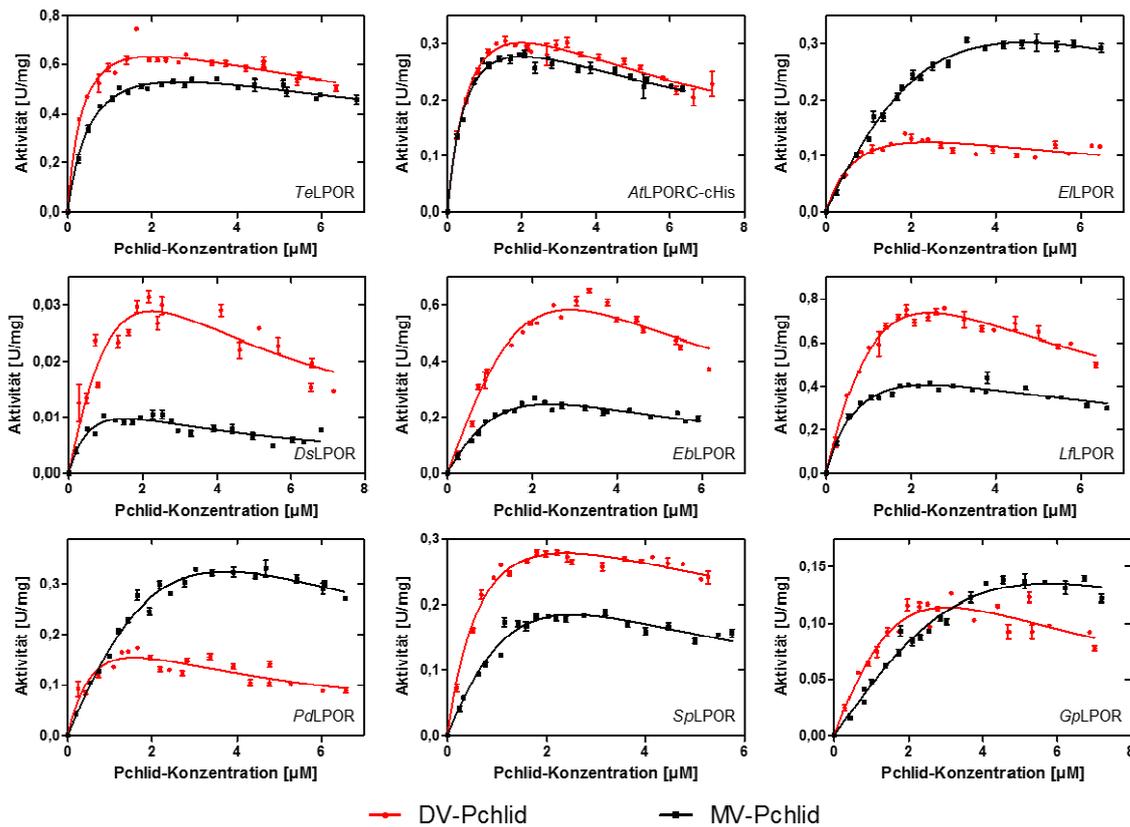


Abbildung 32: Enzymkinetische Untersuchungen zum Umsatz von MV- und DV-Pchlid – angepasst an eine „Substrat-Inhibition“-Funktion. Die dargestellten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus einer Dreifachbestimmung. Die Messwerte für den Umsatz von MV-Pchlid sind in schwarz und die für DV-Pchlid in rot dargestellt. Die verwendete LPOR ist in jedem Graphen unten rechts angegeben.

Für die Auswertung über die „Michaelis-Menten“-Funktion wurde der Datenbereich auf den Bereich ohne eine Abnahme der spezifischen Aktivität reduziert (Abbildung 33). Die aus diesen Daten abgeleiteten enzymkinetischen Parameter sind der Tabelle 23 zu entnehmen. Des Weiteren wurden die Wechselzahl (k_{cat}) und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) der jeweiligen Proteine für die beiden Pchlid-Formen berechnet (Kapitel 2.17.6). Eine Übersicht dieser vier Parameter geben die Balkendiagramme in Abbildung 34.

In Abbildung 33 ist für die pflanzliche LPOR aus *Arabidopsis thaliana* keine Substratpräferenz zu erkennen. Beide Substrat-Formen werden vom Enzym gleich gut umgesetzt. Auch anhand der katalytischen Parameter (Tabelle 23 im Anhang und Abbildung 34) kann keine Präferenz für eine der beiden Substrat-Formen abgeleitet werden. Sowohl die maximale spezifische Aktivität (V_{max} , Abbildung 34 A) als auch die katalytische Effizienz (Abbildung 34 D) zeigen gleiche Werte für MV- und DV-Pchlid. Für die cyanobakterielle *TeLPOR* ist diese Tendenz ebenfalls zu erkennen. Die maximale spezifische Aktivität (V_{max}) für DV-Pchlid im Vergleich zu V_{max} unter Verwendung von MV-Pchlid ist lediglich um 10 % erhöht. Eine ähnliche Tendenz wurde von Heyes *et al.* [150] für die *TeLPOR* bereits nachgewiesen. Hier wurde für MV-Pchlid ein V_{max} von 530 ± 50 mM/min und für DV-Pchlid ein V_{max} von 610 ± 50 mM/min angegeben, was einen Unterschied von ca. 15 % ausmacht. Bei dem direkten

Vergleich der Literaturwerte mit den hier ermittelten Werten für V_{max} ist zu beachten, dass die Literaturwerte die Enzymaktivität in U angeben, wohingegen in dieser Arbeit die spezifische Aktivität in U/mg angegeben ist. Daher bietet die Michaelis-Menten Konstante (K_m) einen besseren Vergleich. In dieser Arbeit wurde für die TeLPOR ein K_m -Wert für MV-Pchlid von $0,40 \pm 0,03 \mu\text{M}$ und für DV-Pchlid von $0,21 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ermittelt, was einem ca. doppelt so hohem K_m -Wert für MV-Pchlid entspricht. Die publizierten K_m -Werte liegen jeweils über diesen Werten und sind mit einem größeren Fehler behaftet (MV-Pchlid: $1,36 \pm 0,34 \mu\text{M}$, DV-Pchlid: $0,92 \pm 0,33 \mu\text{M}$) [150]. Ohne Berücksichtigung des Fehlers entspricht dies einem ca. 1,5-fach höheren K_m -Wert für MV-Pchlid, was dem in dieser Arbeit beobachteten Unterschied recht nahe kommt, wobei jedoch aufgrund des großen Messfehlers keine eindeutige Aussage möglich ist. Die beobachtete Differenz kann sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Durchführung der Messung zurückgeführt werden. Während in dieser Arbeit die entsprechenden Aktivitätsmessungen bei 25 °C durchgeführt wurden, erfolgte die Messung bei Heyes *et al.* bei 50 °C, was dem publizierten Temperaturoptimum des Enzyms entspricht. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht reproduziert werden (Kapitel 3.2.4.1). Werden die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) der TeLPOR für MV- und DV-Pchlid betrachtet, so scheint das Enzym mit DV-Pchlid zweifach effektiver zu arbeiten, wobei dieser Effekt hauptsächlich aus dem kleineren K_m -Wert für DV-Pchlid resultiert.

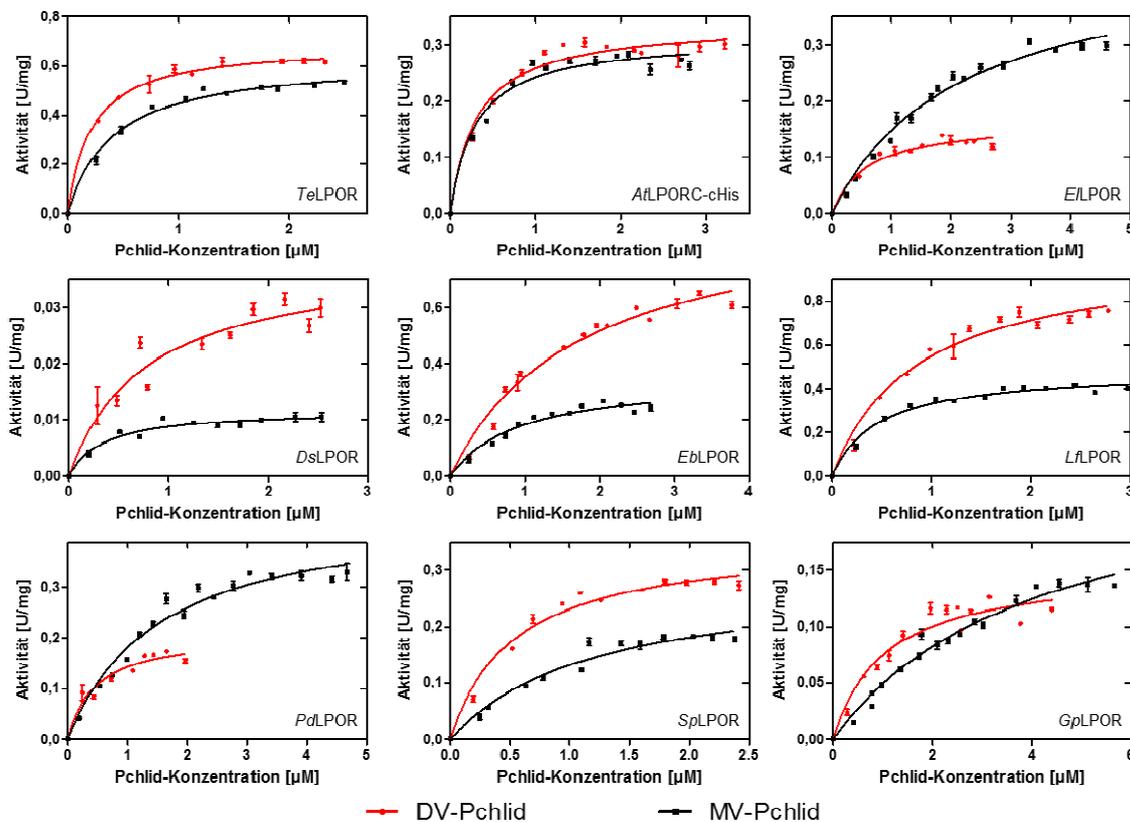


Abbildung 33: Substratspezifische Aktivitätsmessungen – angepasst an die „Michaelis-Menten“-Funktion. Die Fehlerbalken resultieren aus einer Dreifachbestimmung. Die Aktivitätsmessungen unter Verwendung von MV-Pchlid als Substrat sind in schwarz und unter Verwendung von DV-Pchlid in rot dargestellt. Die verwendete LPOR ist in jedem Graphen unten rechts angegeben.

Tabelle 23: Übersicht über die enzymkinetischen Parameter in Abhängigkeit vom Substrat unter Verwendung der „Michaelis-Menten“-Funktion.

LPOR	K_m [μM]	V_{\max} [mU/mg]	k_{cat} [sec^{-1}]	K_{cat}/K_m [$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$]	R^2
MV-Pchlid					
<i>Te</i> LPOR	0,40 ± 0,03	628 ± 13	0,40 ± 0,01	1,00 ± 0,12	0,98
<i>At</i> LPORC	0,29 ± 0,03	314 ± 7	0,24 ± 0,01	0,80 ± 0,07	0,95
<i>Ei</i> LPOR	2,14 ± 0,18	465 ± 18	0,29 ± 0,01	0,14 ± 0,003	0,98
<i>Ds</i> LPOR	0,33 ± 0,06	12 ± 0,5	0,007 ± 0,0004	0,02 ± 0,003	0,92
<i>Eb</i> LPOR	0,91 ± 0,14	349 ± 20	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,95
<i>Lf</i> LPOR	0,47 ± 0,04	485 ± 11	0,31 ± 0,001	0,66 ± 0,05	0,97
<i>Pd</i> LPOR	1,52 ± 0,15	459 ± 17	0,29 ± 0,01	0,19 ± 0,002	0,96
<i>Sp</i> LPOR	1,20 ± 0,18	289 ± 20	0,18 ± 0,001	0,15 ± 0,002	0,95
<i>Gp</i> LPOR	4,15 ± 0,44	253 ± 15	0,16 ± 0,01	0,04 ± 0,001	0,97
DV-Pchlid					
<i>Te</i> LPOR	0,21 ± 0,02	688 ± 12	0,44 ± 0,001	2,05 ± 0,08	0,98
<i>At</i> LPORC	0,31 ± 0,04	339 ± 8	0,25 ± 0,005	0,82 ± 0,06	0,95
<i>Ei</i> LPOR	0,58 ± 0,09	164 ± 7	0,10 ± 0,005	0,18 ± 0,02	0,94
<i>Ds</i> LPOR	0,77 ± 0,16	39 ± 3	0,024 ± 0,001	0,03 ± 0,01	0,89
<i>Eb</i> LPOR	1,72 ± 0,17	961 ± 43	0,61 ± 0,05	0,35 ± 0,03	0,97
<i>Lf</i> LPOR	0,86 ± 0,10	1019 ± 42	0,64 ± 0,02	0,75 ± 0,03	0,96
<i>Pd</i> LPOR	0,45 ± 0,09	207 ± 13	0,13 ± 0,02	0,32 ± 0,09	0,93
<i>Sp</i> LPOR	0,53 ± 0,05	353 ± 11	0,22 ± 0,004	0,42 ± 0,01	0,97
<i>Gp</i> LPOR	1,05 ± 0,15	153 ± 8	0,09 ± 0,002	0,09 ± 0,004	0,93

Werden die in dieser Arbeit identifizierten AAPB LPORs betrachtet, so zeigt sich für drei dieser Enzyme (*Ei*LPOR, *Pd*LPOR und *Gp*LPOR) eine deutlich höhere maximale spezifische Aktivität für MV-Pchlid im Vergleich zu DV-Pchlid. Für die anderen vier AAPB Enzyme (*Ds*LPOR, *Eb*LPOR, *Lf*LPOR und *Sp*LPOR) ist ein höherer V_{\max} für DV-Pchlid zu beobachten, wobei die *Sp*LPOR den geringsten Unterschied zwischen MV- und DV-Pchlid aufweist (20 %). Alle anderen zeigen einen um mindestens 50 % erhöhten V_{\max} für DV-Pchlid. Im Stammbaum (Abbildung 20) ist eine Trennung in diese Gruppen, mit Ausnahme der *Eb*LPOR, ebenfalls zu beobachten (Kapitel 3.2.5, Abbildung 40 A).

Zusätzlich zu den unterschiedlichen V_{\max} -Werten können auch Unterschiede bei den K_m -Werten für MV- und DV-Pchlid beobachtet werden. Wird also die katalytische Effizienz betrachtet, welche den K_m -Wert berücksichtigt, erhält man für alle Enzyme, mit Ausnahme der pflanzlichen *At*LPORC, eine

höhere katalytische Effizienz für DV-Pchlid. Dies scheint hier auch für die cyanobakterielle LPOR der Fall zu sein. Dies ergibt sich aus den zum Teil sehr hohen K_m -Werten.

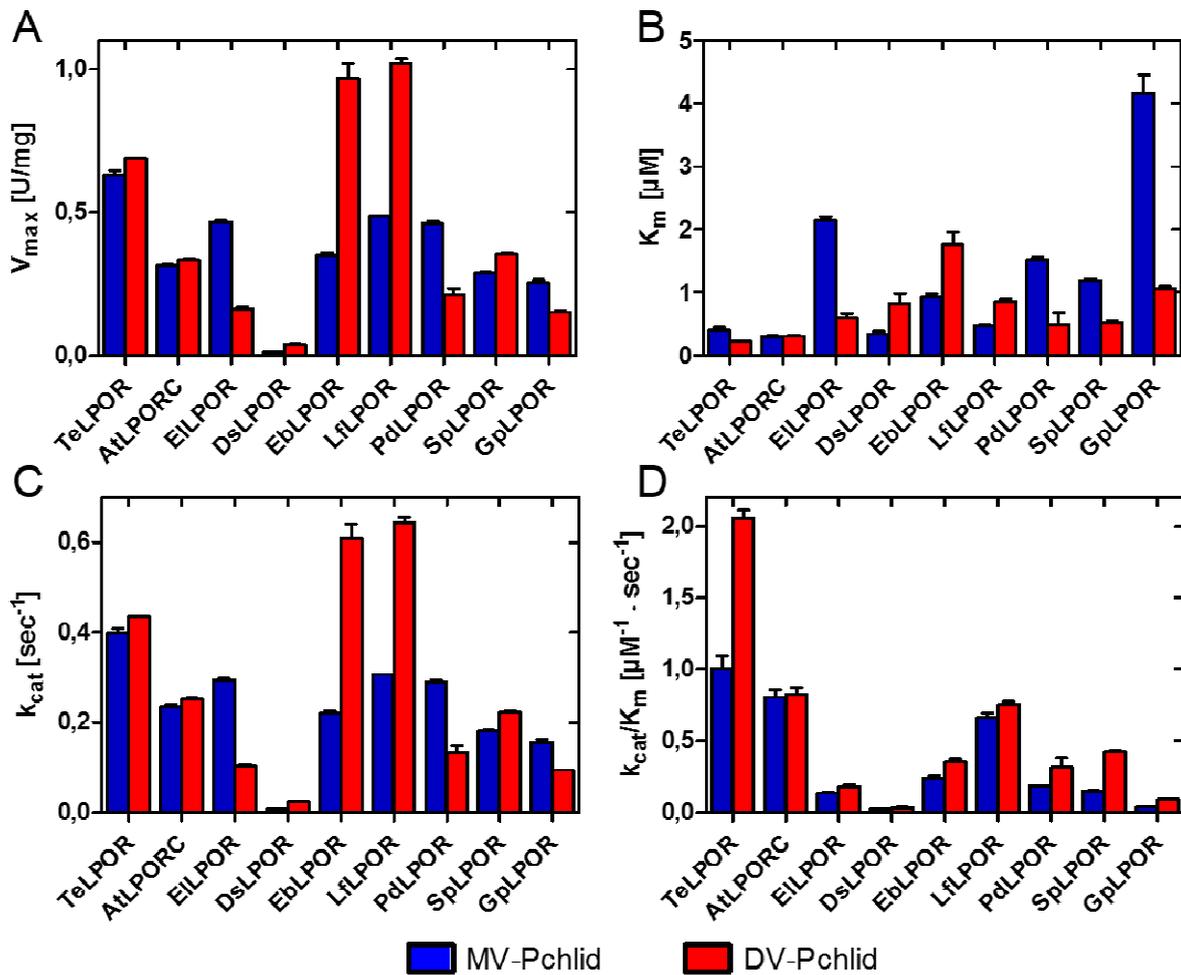


Abbildung 34: Übersicht aller enzymkinetischen Parameter. (A) Darstellung der Werte für die maximale spezifische Aktivität (V_{max}) aller untersuchten Enzyme unter Verwendung von MV- (blau) und DV-Pchlid (rot). (B) Werte für die Michaelis-Menten Konstante (K_m). (C) Darstellung der berechneten (Kapitel 2.17.6) Wechselzahl (k_{cat}) und (D) der katalytischen Effizienz aller Enzyme unter Verwendung von MV- und DV-Pchlid. Die genauen Werte sind der Tabelle 23 im Anhang zu entnehmen.

Als einzige der hier untersuchten LPORs zeigt die pflanzliche LPOR keine Substratpräferenz bezüglich MV- oder DV-Pchlid. Die cyanobakterielle *TeLPOR* zeigt für die maximale spezifische Aktivität (V_{max}) nur einen geringen Unterschied von 10 % zwischen MV- und DV-Pchlid, jedoch ist aufgrund des geringen K_m -Werts eine Verdopplung der katalytischen Effizienz für DV-Pchlid zu beobachten. Drei der LPORs aus AAPBs (*EILPOR*, *PdLPOR* und *GpLPOR*) zeigen eine höhere maximale spezifische Aktivität für MV-Pchlid und vier (*DsLPOR*, *EbLPOR*, *LfLPOR* und *SpLPOR*) für DV-Pchlid. Mit Ausnahme der *EbLPOR* zeigt sich für diese beiden Gruppen im Stammbaum eine Aufteilung in zwei unterschiedliche Äste. Bezüglich der katalytischen Effizienz, also unter Berücksichtigung des K_m -Werts, scheinen alle bakteriellen LPORs, inklusive der *TeLPOR*, DV-Pchlid effizienter umzusetzen.

3.2.3 AAPB LPORs besitzen im Vergleich zu der pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR einen breiten pH-Aktivitätsoptimumsbereich

Die Messung zur Bestimmung der pH-Aktivitätsoptima wurde wie in Kapitel 2.17.2 beschrieben durchgeführt. Zur Abdeckung des pH-Bereichs von 5,5 bis 10 war die Verwendung von drei verschiedenen Puffersystemen notwendig. Da das Puffersystem einen Einfluss auf die Aktivität eines Proteins haben kann, wurde die Aktivität der Proteine bei pH 7,5 in Natriumphosphatpuffer und TRIS-Puffer (Kapitel 2.17.2) gemessen. Außerdem wurde die Aktivität bei pH 9 in TRIS-Puffer und Glycinpuffer getestet. Die Ergebnisse der pH-Aktivitätsoptimumsmessung sind in Abbildung 35 dargestellt. Dabei wurde jeweils die spezifische Aktivität gegen den jeweiligen pH-Wert aufgetragen. Die Daten, welche in verschiedenen Puffersystemen aufgenommen wurden, sind in unterschiedlichen Farben kenntlich gemacht. Da für einige Proteine die spezifische Aktivität bei demselben pH-Wert vom Puffersystem abhing (vergleiche z. B. *EbLPOR* Natriumphosphatpuffer und TRIS-Puffer bei pH 7,5), war es nicht möglich direkt aus den spezifischen Aktivitäten eine pH-Aktivitätsoptimumskurve zu erzeugen. Daher wurden die Werte mit Hilfe der doppelt bestimmten Aktivität im überlappenden pH-Bereich normalisiert. Hierfür wurde jeweils die höchste Aktivität der drei Messwerte (z. B. Messwerte der Dreifachbestimmung von *EbLPOR* im Natriumphosphatpuffer bei pH 7,5) auf 100 % gesetzt und alle anderen Aktivitäten in diesem Puffersystem relativ dazu in Prozent ausgedrückt. Der in dem zweiten Puffersystem entsprechende Mittelwert (z. B. Mittelwert der Dreifachbestimmung von *EbLPOR* im TRIS-Puffer bei pH 7,5) wurde auf den entsprechenden Mittelwert des ersten Puffersystems, in Prozent, gleich gesetzt und alle Messwerte des zweiten Puffersystems dazu relativ in Prozent ausgedrückt. Für den überlappenden pH-Bereich zwischen dem zweiten und dritten Puffersystem (pH 9 in TRIS- und Glycinpuffer) wurde ebenso verfahren, um die Messwerte des dritten Puffersystems relativ zu den anderen Puffersystemen in Prozent auszudrücken. So konnte der Einfluss des Puffersystems auf das jeweilige Protein herausgerechnet werden. Die daraus resultierenden Werte wurden ebenfalls gegen den pH-Wert aufgetragen (Abbildung 35, blaue Kurve) und so eine bessere Übersicht erzielt.

Alle hier untersuchten LPORs besitzen einen recht breiten pH-Aktivitätsoptimumsbereich. Hierbei besitzen tendenziell alle AAPB LPORs einen breiteren pH-Aktivitätsoptimumsbereich (angegeben als 80 % Optimumsbereich in Tabelle 24) als das untersuchte pflanzliche und cyanobakterielle Enzym, welche in allen Fällen bis in den schwach sauren pH-Bereich reichen. Die cyanobakterielle *TeLPOR* zeigt bei allen gemessenen pH-Werten eine gute Aktivität, jedoch liegt der pH-Wert für eine optimale Umsetzung des Pchlids bei 9. Die pflanzliche *AtLPORC* weist ebenfalls ein basisches Aktivitätsoptimum von 8,5 bis 9 auf. Im Gegensatz zur *TeLPOR* ist jedoch eine stärkere Abnahme der Aktivität bei höheren und auch niedrigeren pH-Werten zu erkennen. In der Literatur existieren nahezu keine Informationen zum pH-Aktivitätsoptimum pflanzlicher oder cyanobakterieller LPORs. Lediglich für eine aus

verschiedenen *Chlamydomonas reinhardtii* Mutanten isolierte LPOR wurde ein pH-Aktivitätsoptimum von pH 8,5 bestimmt [155], welches sich mit den hier ermittelten pH-Optima deckt. Ähnlich zu der pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR besitzen alle AAPB LPORs einen breiten pH-Aktivitätsoptimumsbereich zwischen 6,5 und 9. Die *Lf*LPOR und *Pd*LPOR zeigen, ähnlich wie die *Te*LPOR, einen nur geringen Einfluss bei pH-Wert-Änderungen in den sauren Bereich. Insgesamt scheinen alle LPORs aus AAPBs, mit Ausnahme der *Ds*LPOR und der *Pd*LPOR, einen neutralen pH-Bereich mit Tendenz zum basischen für die Umsetzung von Pchlid zu Chlorophyllid zu bevorzugen. *Pd*LPOR und *Ds*LPOR hingegen bevorzugen eher einen neutralen pH-Bereich mit Tendenz zum Sauren. Werden diese Ergebnisse mit den beschriebenen pH-Wachstumsoptima für *Dinoroseobacter shibae* [156], *Porphyrobacter dokdonensis* [157] und *Gemmatimonas phototrophica* [158] verglichen, so zeigt sich für alle drei eine exakte Übereinstimmung zwischen den pH-Wachstumsoptima der Bakterien und den pH-Aktivitätsoptima der jeweiligen LPOR.

In allen Fällen nimmt die Aktivität in den Randbereichen des untersuchten pH-Bereichs (< pH 6,5 und > pH 9) ab. Eine solche Abnahme kann hierbei sowohl strukturelle (Denaturierung) als auch mechanistische Ursachen haben. Aus mechanistischer Sicht könnte die Aktivitätsabnahme im basischen pH-Bereich (pH 10) hierbei auf eine (partielle) Deprotonierung der Lysin- (pK_s : 10,53 [159]) und/oder Tyrosin-Seitenketten (pK_s : 10,07 [159]) zurückzuführen sein. So wurde z. B. mittels eines *R. capsulatus* basierten Komplementationssystem für die LPOR aus der Erbse gezeigt, dass die in allen LPORs hochkonservierten Tyrosine (Y194, *Te*LPOR-Nummerierung, blau hervorgehoben in Abbildung 19) und Lysine (K198, *Te*LPOR-Nummerierung, blau hervorgehoben in Abbildung 19) essentiell für den Umsatz von Pchlid sind [59]. Ohne weiterführende Untersuchungen ist jedoch eine (zusätzliche) Inaktivierung durch Denaturierung im basischen pH-Bereich nicht auszuschließen. Ähnliches gilt für den schwach sauren pH-Bereich, wobei in bisher unveröffentlichten Arbeiten für die *Te*LPOR mittels NMR-Spektroskopie gezeigt werden konnte, dass diese bei pH 5,5 strukturell stabil ist [160].

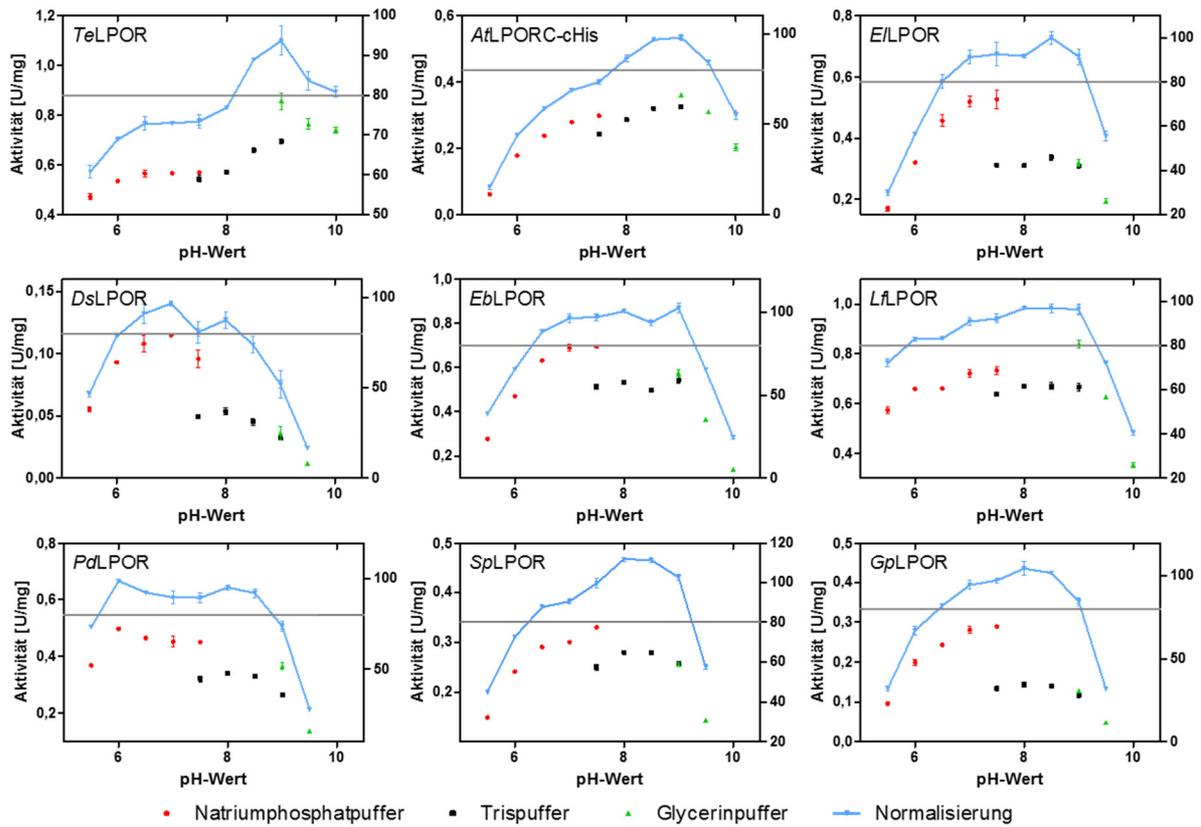


Abbildung 35: Aktivitätsoptimumsmessung bei verschiedenen pH-Werten. Alle Aktivitätsmessungen erfolgten wie in Kapitel 2.17.2 beschrieben. Die Aktivitätsmessungen unter Verwendung von Natriumphosphatpuffer (pH 5,5 bis 7,5) sind in rot, von TRIS-Puffer (pH 7,5 bis 9,0) in schwarz und von Glycinpuffer (pH 9,0 bis 10,0) in grün auf der linken Y-Achse dargestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Aktivität in den unterschiedlichen Puffern wurde die spezifische Aktivität normalisiert und in % ausgedrückt. Die daraus resultierenden Werte wurden in blau auf der rechten Y-Achse dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung des Mittelwerts aus drei unabhängigen Messungen. Die graue Linie markiert den 80 % normalisierten Aktivitätsgrenzwert, welcher hier für die Definition eines Aktivitätsoptimumsbereichs verwendet wurde.

Tabelle 24: Übersicht über das absolute pH-Aktivitätsoptimum sowie den pH-Aktivitätsoptimumsbereich bei 80 % Aktivität. Die angegebenen Werte beziehen sich auf die normalisierte Aktivität. Zur Angabe des 80 % pH-Aktivitätsoptimumsbereichs wurde nicht der Schnittpunkt, sondern nur tatsächliche Messwerte herangezogen. Für die TeLPOR z. B. liegen die Messwerte bei pH 8,5 bis pH 10,0 über der 80 % Grenze.

Protein	Absolutes pH-Aktivitätsoptimum	80 % pH-Aktivitätsoptimumsbereich	80 % pH-Aktivitätsoptimumsbreite (in pH Einheiten)
<i>TeLPOR</i>	9	8,5 - 10	1,5
<i>AtLPORC</i>	9	8 - 9,5	1,5
<i>EILPOR</i>	8,5	6,5 - 9	2,5
<i>DsLPOR</i>	7	6 - 8	2,0
<i>EblPOR</i>	9	6,5 - 9	2,5
<i>LflPOR</i>	9	6 - 9	3
<i>PdLPOR</i>	6/8 [§]	6 - 8,5	2,5
<i>SplPOR</i>	8	6,5 - 9	2,5
<i>GplPOR</i>	8	6,5 - 9	2,5

[§]: *PdLPOR* besitzt zwei pH-Optima mit ähnlichen Maximalwerten.

Alle untersuchten LPORs besitzen einen breiten pH-Aktivitätsoptimumsbereich zwischen pH 6,5 und 9,0, wobei der pH-Aktivitätsoptimumsbereich (hier definiert als 80 % Grenzwert) für die AAPB LPORs signifikant breiter ausfällt als für das untersuchte pflanzliche und cyanobakterielle Enzym. Sowohl für die cyanobakterielle *Te*LPOR als auch für die pflanzliche *At*LPORC ist ein pH-Aktivitätsoptimum im Basischen zu erkennen, jedoch ist der Einfluss des pH-Werts auf die *Te*LPOR-Aktivität im gemessenen Bereich nur sehr gering. Alle LPORs aus AAPBs weisen ein pH-Aktivitätsoptimum zwischen 6,5 und 9 auf. In den meisten Fällen ist eine Präferenz zum Basischen zu erkennen, was mechanistische Ursachen haben könnte. Lediglich die *Ds*LPOR und die *Pd*LPOR weisen eine, wenn auch nur schwach ausgeprägte, Tendenz zu schwach sauren pH-Werten auf.

3.2.4 Temperatur-Aktivitätsoptimum und Stabilitäten

3.2.4.1 AAPB LPORs besitzen im Vergleich zu der pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR einen breiteren Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereich

Alle Messungen zur Bestimmung der Temperatur-Aktivitätsoptima erfolgten wie in Kapitel 2.17.3 beschrieben. Da zur Bestimmung des Temperatur-Aktivitätsoptimums die Aktivitätsmessung bei unterschiedlichen Temperaturen durchzuführen war, musste sichergestellt werden, dass die Probe in der Küvette während der 5-minütigen Inkubation tatsächlich die gewünschte Temperatur erreichte. Eine Erhöhung der Inkubationszeit kam nicht in Frage, da dies eine Verringerung der spezifischen Aktivität mit sich bringt (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde eine Testmessung zur Temperatur durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur des Peltier-Elements in 5 °C Schritten erhöht. Sobald die gewünschte Temperatur erreicht war, wurde eine Küvette mit 1 ml Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) in das Peltier-Element gestellt und für fünf Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde die Temperatur des Puffers in der Küvette gemessen. Außerdem wurde für weitere sechs Minuten inkubiert, diese Zeit entspricht der Dauer einer Aktivitätsmessung, und die Temperatur erneut gemessen. Die Daten dieser Testmessung sind in Abbildung 36 dargestellt. Bei höheren Temperaturen ist eine stärkere Abweichung zwischen der theoretischen (am Peltier eingestellten) Temperatur (Abbildung 36, schwarze Dreiecke) und der tatsächlichen Assay-Temperatur zu erkennen. Außerdem kann eine, wenn auch geringer ausfallende, Abweichung zwischen der Temperatur zu Beginn der Messung (Abbildung 36, grüne Punkte) und der Temperatur am Ende der Messung (Abbildung 36, rote Vierecke) nachgewiesen werden. Basierend auf diesen Daten wurden den jeweiligen Aktivitätsmessungen eine Temperatur bzw. ein Temperaturbereich zugeordnet. Dieser Bereich ergibt sich aus der Temperatur nach 5-minütiger Inkubation, also vor Beginn der eigentlichen

Messung, und der Temperatur nach weiteren sechs Minuten (am Ende der Aktivitätsmessung) und ist als X-Fehlerbalken in Abbildung 37 dargestellt.

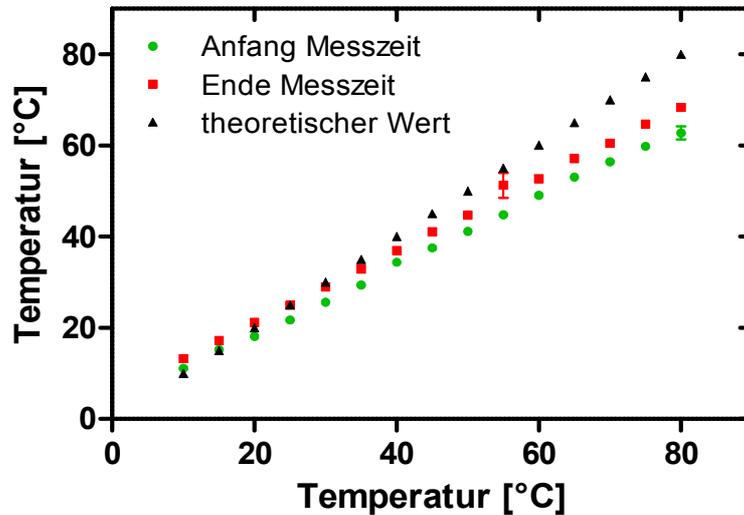


Abbildung 36: Testmessung zur tatsächlichen Assay-Temperatur. Nach dem Erreichen der am Peltier-Element eingestellten Temperatur (X-Achse) wurde eine Küvette mit 1 ml Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) für 5 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Küvette für weitere 6 Minuten (entspricht der Dauer einer Aktivitätsmessung) inkubiert. Sowohl zu Beginn dieser 6 Minuten als auch zum Ende wurde die Temperatur des Lagerpuffers in der Küvette überprüft. Diese Messung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die in Abbildung 37 dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die cyanobakterielle *TeLPOR* ihr Aktivitätsoptimum bei der höchsten Temperatur hat ($35,7 \text{ °C} \pm 1,4 \text{ °C}$). Dies ist nicht verwunderlich, da das Enzym aus dem thermophilen Cyanobakterium *T. elongatus* stammt, welcher optimal bei 55 °C wächst [161]. In der Literatur ist ein Temperatur-Aktivitätsoptimumswert von 50 °C für die *TeLPOR* zu finden [134]. Die abweichenden Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass die hier durchgeführten Messungen unter anderen Bedingungen durchgeführt wurden. Während in der Arbeit von McFarlane *et al.* [134] $0,1 \%$ Genapol X-080 als Detergenz zur Solubilisierung des schlecht wasserlöslichen Pchlids eingesetzt wurde, wurden hier $0,03 \%$ (v/v) Triton X-100 verwendet. Außerdem wurden statt 70 mM DTT $0,1 \%$ (v/v) β -Mercaptoethanol eingesetzt. Auch die LPOR-, Pchlid- und NADPH-Konzentrationen waren leicht unterschiedlich [134]. Mit einem Aktivitätsoptimumswert von $27,3 \pm 1,7 \text{ °C}$ besitzt die pflanzliche *AtLPORC* das zweithöchste Temperatur-Aktivitätsoptimum, gefolgt von der *LfLPOR*, *ElLPOR* und *SpLPOR*, welche ihr Temperatur-Aktivitätsoptimum bei $23,3 \pm 1,6 \text{ °C}$ besitzen. Während die *EbLPOR* und *PdLPOR* am besten bei $19,6 \pm 1,5 \text{ °C}$ arbeiten, besitzen die *DsLPOR* und *GpLPOR* ein niedriges Temperatur-Aktivitätsoptimum, welches bei $16,2 \pm 1,3 \text{ °C}$ liegt. Allgemein liegen die Temperatur-Aktivitätsoptima der AAPB LPORs also unter denen der hier untersuchten pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR. Außerdem besitzen alle AAPB LPORs, mit Ausnahme der *SpLPOR* und *EbLPOR*, einen deutlich breiteren 80% Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereich als die hier untersuchte pflanzliche und cyanobakterielle LPOR (Tabelle 25). Beide Beobachtungen könnten mit dem natürlichen Habitat der LPOR-tragenden AAPBs

zusammenhängen, welche hauptsächlich in marinen Habitaten zu finden sind [157, 158, 162-167]. Hierbei sind marine Lebensumgebungen durch eine ausgeprägte Komplexität, d.h. Schwankungsbreite bzgl. wachstumsrelevanter Umweltparameter wie Temperatur, pH, Druck, Nährstoffverfügbarkeit und Intensität des vorhandenen Lichts sowie der Lichtqualität (Wellenlänge), gekennzeichnet [168]. Es liegt also nahe zu vermuten, dass die hier beobachteten breiten pH- (Kapitel 3.2.3) und Temperatur-Aktivitätsoptima der AAPB LPOR-Enzyme mit dieser Eigenschaft mariner Habitats zusammenhängen.

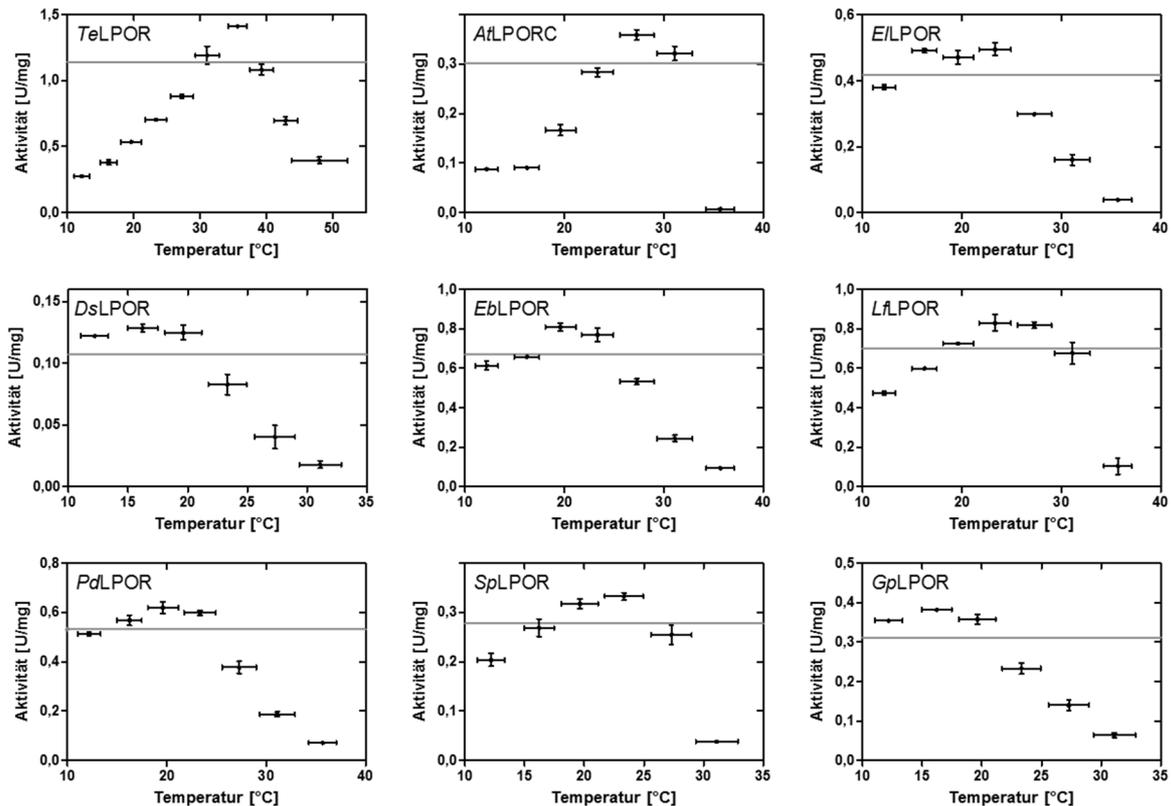


Abbildung 37: Aktivitätsoptimumsmessungen bei verschiedenen Temperaturen. Alle Aktivitätsmessungen erfolgten, wie in Kapitel 2.17.3 beschrieben. Der horizontale Fehlerbalken resultiert aus der Testmessung zur Assay-Temperatur (Abbildung 36) für die Dauer der 6-minütigen Aktivitätsmessung. Die graue Linie zeigt den Bereich ab 80 % Aktivität.

Tabelle 25: Übersicht über Temperatur-Aktivitätsoptima sowie den 80 % Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereich. Zur Angabe des 80 % Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereichs wurde nicht der Schnittpunkt, sondern nur tatsächliche Messwerte herangezogen. Für die *TeLPOR* z. B. liegen die Messwerte bei $31,1 \pm 1,8$ °C und $35,7 \pm 11,4$ °C über der 80 % Grenze. Der angegebene Temperaturbereich pro Messwert basiert hierbei auf der Temperaturabweichung, welche für jeden Messwert experimentell bestimmt wurde (Abbildung 36).

Protein	Absolutes Temperatur-Aktivitätsoptimum [°C]	80 % Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereich [°C]	80 % Aktivitätsoptimumsbreite [°C] [§]
<i>TeLPOR</i>	$35,7 \pm 1,4$	$31,1 \pm 1,8 - 35,7 \pm 1,4$	4,6
<i>AtLPORC</i>	$27,3 \pm 1,7$	$27,3 \pm 1,7 - 31,1 \pm 1,8$	3,8
<i>EiLPOR</i>	$23,3 \pm 1,6$	$16,2 \pm 1,3 - 23,3 \pm 1,6$	7,1
<i>DsLPOR</i>	$16,2 \pm 1,3$	$12,2 \pm 1,1 - 19,6 \pm 1,5$	7,4
<i>EbLPOR</i>	$19,6 \pm 1,5$	$19,6 \pm 1,5 - 23,3 \pm 1,6$	3,7
<i>LjLPOR</i>	$23,3 \pm 1,6$	$19,6 \pm 1,5 - 27,3 \pm 1,7$	7,7
<i>PdLPOR</i>	$19,6 \pm 1,5$	$16,2 \pm 1,3 - 23,3 \pm 1,6$	7,1
<i>SpLPOR</i>	$23,3 \pm 1,6$	$19,6 \pm 1,5 - 23,3 \pm 1,6$	3,7
<i>GpLPOR</i>	$16,2 \pm 1,3$	$12,2 \pm 1,1 - 19,6 \pm 1,5$	7,4

§: bestimmt aus den Mittelwerten des 80 % Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereichs.

Die AAPB LPORs besitzen Temperatur-Aktivitätsoptima, welche im Mittel bei ca. 20 °C liegen, während die hier untersuchte cyanobakterielle und pflanzliche LPOR höhere Optimumstemperaturen aufweisen. Wie zu erwarten besitzt die *TeLPOR*, wahrscheinlich aufgrund ihres thermophilen Ursprungs, das höchste Temperatur-Aktivitätsoptimum. Außerdem scheinen die meisten AAPB LPORs einen breiteren Temperatur-Optimumsbereich zu besitzen als die hier untersuchten pflanzlichen und cyanobakteriellen Enzyme.

3.2.4.2 Das temperaturabhängige Entfaltungsverhalten von LPORs erscheint unabhängig von ihrem phylogenetischen Ursprung

Temperatur-Aktivitätsoptimumskurven ergeben sich aus einer Überlagerung der intrinsischen Temperaturabhängigkeit chemischer Reaktionen (Arrhenius-Verhalten) [169], wobei mit steigender Temperatur die Aktivität aufgrund zunehmender kinetischer Energie der Reaktanden zunimmt, und einer temperaturabhängigen Entfaltung des Proteins bei höheren Temperaturen. Für das Verständnis eines solchen Optimumsverhaltens ist es also unabdingbar, das temperaturabhängige Entfaltungsverhalten und die Temperaturstabilität der jeweiligen Enzyme zu kennen. Daher wurde zur weiteren Charakterisierung der in dieser Arbeit betrachteten LPORs ihr temperaturabhängiges Entfaltungsverhalten untersucht. Hierfür wurde das Prometheus NT.Plex Instrument der Firma

NanoTemper (München, Deutschland) verwendet. Die Messung beruht hierbei auf dem Verfahren der Differential-Scanning-Fluorimetrie [170], wobei die intrinsische Proteinfluoreszenz (Tryptophan- und Tyrosinreste) kontinuierlich in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt wird (Kapitel 2.18.1). Eine solche Messung erlaubt die Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) eines Proteins, definiert als die Temperatur bei der 50 % der Moleküle entfaltet vorliegen. Die Messung wurde wie in Kapitel 2.18.1 beschrieben durchgeführt. In Abbildung 38 ist exemplarisch die Messung zur Bestimmung der Schmelztemperatur der *DsLPOR* gezeigt. In A sind die Schmelzkurven der Mehrfachbestimmung und in B die erste Ableitung, welche zur Bestimmung der Schmelztemperatur verwendet wird, dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert den Mittelwert des Schmelzpunktes der *DsLPOR* von $41,6 \pm 0,07$ °C. Die Schmelzkurven aller anderen untersuchten Proteine sind im Anhang in Abbildung 73 dargestellt. In Tabelle 26 sind die daraus resultierenden Werte zusammen mit den zuvor bestimmten Temperatur-Aktivitätsoptima zusammengefasst.

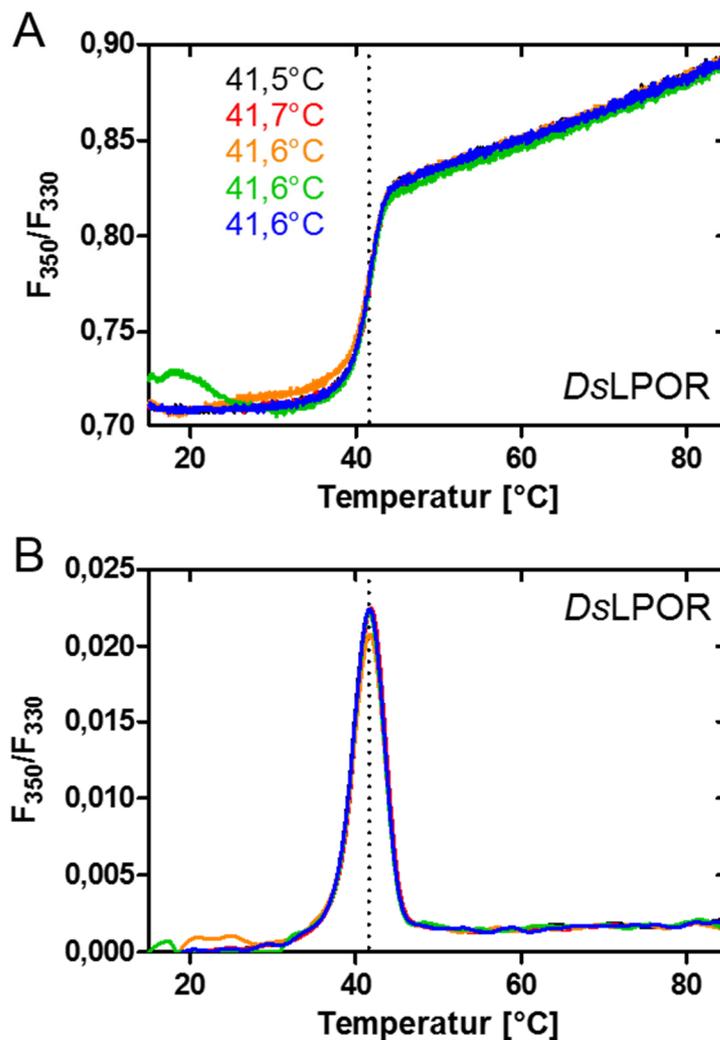


Abbildung 38: Schmelzkurve der *DsLPOR*. Die Messung der Schmelztemperatur erfolgte am Prometheus NT.Plex der Firma NanoTemper (München, Deutschland) mit einer graduellen Erhöhung der Temperatur (0,5 °C pro Minute) von 15 °C auf 85 °C. Die LPOR-Konzentration betrug ca. 0,6 mg/ml. (A) zeigt die Schmelzkurve der *DsLPOR* und in (B) ist die zugehörige erste Ableitung zur Bestimmung der Schmelztemperatur dargestellt.

Tabelle 26: Übersicht über die Schmelztemperaturen aller LPORs.

Protein	Schmelztemperatur T_m [°C]	80 % Temperatur-Aktivitätsoptimumsbereich [°C]
<i>Te</i> LPOR	74,1 ± 0,06	31,1 ± 1,8 - 35,7 ± 1,4
<i>At</i> LPORC	35,1 ± 0,49	27,3 ± 1,7 - 31,1 ± 1,8
<i>E</i> LPOR	46,3 ± 0,09	16,2 ± 1,3 - 23,3 ± 1,6
<i>Ds</i> LPOR	41,6 ± 0,07	12,2 ± 1,1 - 19,6 ± 1,5
<i>Eb</i> LPOR	51,6 ± 0,04	19,6 ± 1,5 - 23,3 ± 1,6
<i>Lf</i> LPOR	35,6 ± 0,07	19,6 ± 1,5 - 27,3 ± 1,7
<i>Pd</i> LPOR	54,5 ± 0,06	16,2 ± 1,3 - 23,3 ± 1,6
<i>Sp</i> LPOR	34,7 ± 0,05	19,6 ± 1,5 - 23,3 ± 1,6
<i>Gp</i> LPOR	40,1 ± 0,09	12,2 ± 1,1 - 19,6 ± 1,5

Wie aufgrund der Temperatur-Aktivitätsoptimumsdaten zu erwarten, zeigt die *Te*LPOR die höchste Schmelztemperatur. Diese liegt mit 74 °C mindestens 20 °C höher als für alle anderen LPORs. Außerdem liegt der Schmelzpunkt der *Te*LPOR rund 30 °C über dem Aktivitätsoptimum, was einen Funktionsverlust aufgrund von Denaturierung bei Temperaturen über dem Optimum zwar nicht vollständig ausschließt, da die Proteine während der Aktivitätsmessung der jeweiligen Temperatur für eine längere Zeit ausgesetzt sind, jedoch zumindest unwahrscheinlich erscheinen lässt. Die verringerte Aktivität muss durch andere temperaturbedingte Umstände zu erklären sein. Dabei wäre denkbar, dass die Flexibilität des Proteins durch Erhöhung der Temperatur erhöht wird und so die Bindung des Substrates und des Kofaktors verringert wird. Für die *At*LPORC hingegen zeigt sich ein Temperatur-Aktivitätsoptimum, welches nahe am T_m liegt, was wiederum dafür spricht, dass das Protein sich bis dahin entsprechend der Arrhenius-Gleichung verhält und dann die temperaturbedingte Denaturierung überwiegt. Für die hier untersuchten AAPB LPORs zeigt sich bis auf zwei Ausnahmen eine Korrelation zwischen der Schmelztemperatur und dem Temperatur-Aktivitätsoptimum. Die *Lf*LPOR und *Sp*LPOR weisen dieselbe Schmelztemperatur (rund 35 °C) auf, obwohl ihre Temperatur-Aktivitätsoptima unterschiedlich sind.

Wird das Temperatur-Aktivitätsoptimum im Verhältnis zur Schmelztemperatur betrachtet, so ergibt sich für die meisten Enzyme mindestens eine Verdopplung der Aktivitätsoptima-Temperatur bis zur Schmelztemperatur. Die einzigen Ausnahmen bilden die bereits erwähnte *At*LPORC, welche lediglich einen Faktor von 1,3 aufweist, die *Lf*LPOR (Faktor 1,4) und *Sp*LPOR (Faktor 1,6). Diese drei Enzyme besitzen somit eine optimale Aktivität nahe ihrem Schmelzpunkt. Der für die Messung des Schmelzpunktes verwendete Puffer (Lagerpuffer, Kapitel 2.15.2) besitzt eine relativ starke Temperaturabhängigkeit, d.h. bei Erhöhung der Temperatur verschiebt sich der pH-Wert ins Saure.

Unter Annahme eines Temperaturkoeffizienten von $\Delta\text{pH}/10\text{ }^\circ\text{C}$ von -0,31 [171], würde sich der pH-Wert bei einer Temperaturerhöhung von 20 °C auf 60 °C, was über dem höchsten hier für AAPB LPORs bestimmten Schmelzpunkt liegt, von pH 8,0 auf pH 6,76 ändern. Dieser Wert liegt für alle hier untersuchten AAPB LPORs innerhalb des 80 % pH-Aktivitätsoptimumsbereichs (Tabelle 24). Da jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine pH-Stabilitäten untersucht wurden, kann hier nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es bei der Messung des Schmelzpunktes zu einer Überlagerung von Temperatur- und pH-Denaturierungsphänomenen kommt.

Die Messungen zur Schmelztemperatur ergaben für die pflanzliche *At*LPORC, die *Lf*LPOR und *Sp*LPOR die niedrigsten Werte von ca. 35 °C, obwohl diese Enzyme zum Teil hohe Temperatur-Aktivitätsoptima aufweisen. Für alle anderen LPORs ergaben sich im Vergleich zum Temperatur-Aktivitätsoptimum mindestens doppelt so hohe Schmelztemperaturen. Mit Ausnahme der *Te*LPOR, welche aufgrund ihres thermophilen Ursprungs an höhere Temperaturen angepasst zu sein scheint ($T_m \approx 75\text{ }^\circ\text{C}$), konnten hinsichtlich des physiologischen/phylogenetischen Ursprungs keine eindeutigen Trends beobachtet werden.

3.2.4.3 Die Temperaturstabilität von LPORs ist unabhängig von ihrem phylogenetischen Ursprung

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität wurde ebenfalls, wie zur Bestimmung des Schmelzpunktes (Kapitel 3.2.4.2), das Verfahren der Differential-Scanning-Fluorimetrie (DSF) unter Verwendung des Prometheus NT.Plex NanoDSF Instruments (NanoTemper, München, Deutschland) eingesetzt (Kapitel 2.18). Zur Überprüfung der Stabilität aller LPORs während der Aktivitätsmessungen wurde die Temperaturstabilität bei 25 °C gemessen. Die daraus resultierenden Daten zeigen für keines der neun Proteine eine Denaturierung über die Dauer von 30 Stunden (Abbildung 39 und Abbildung 74 im Anhang). Damit konnte sichergestellt werden, dass die Assay-Temperatur keinen Einfluss auf die Stabilität der Proteine hat und somit kein Funktionsverlust durch Denaturierung erfolgte. Des Weiteren wurde die Temperaturstabilität bei 35 °C und für manche Proteine bei 30 °C über 30 Stunden verfolgt. In Abbildung 39 ist die Temperaturstabilität bei allen drei Temperaturen am Beispiel der *Ds*LPOR gezeigt. Alle weiteren Daten sind im Anhang in Abbildung 74 dargestellt. Für die *Ds*LPOR zeigt sich über 30 Stunden keine Änderung der Fluoreszenz bei 25 °C und 30 °C. Bei 35 °C hingegen ist direkt zu Beginn der Messung eine Änderung der Fluoreszenz, und somit ein Anstieg im Quotienten (F_{350}/F_{330}), zu erkennen. Für die *Te*LPOR, *Eb*LPOR und *Pd*LPOR zeigte sich sowohl bei 25 °C als auch bei 35 °C keine Denaturierung der Proteine über die betrachteten 30 Stunden. Aus diesem Grund wurde die Messung bei 30 °C nicht durchgeführt. Für die *At*LPORC, *El*LPOR, *Lf*LPOR *Sp*LPOR und *Gp*LPOR ist, ebenso wie bei

der *DsLPOR*, eine Denaturierung der Proteine bei 35 °C zu erkennen. Bei 30 °C hingegen sind diese Proteine stabil. Die, durch Anpassung der experimentellen Daten an eine einfach-exponentielle Funktion, ermittelten Halbwertszeiten ($\tau_{1/2}$) bei 35 °C (Tabelle 27) zeigen, dass die *AtLPORC*, *LfLPOR* und *SpLPOR* bei 35 °C sofort denaturieren. Vergleicht man diese drei mit den Schmelztemperaturen (Tabelle 26), so zeigt sich für alle eine Schmelztemperatur (T_m) von ca. 35 °C. Für die *GpLPOR* wurde eine T_m von ca. 40 °C ermittelt und die Halbwertszeit bei 35 °C liegt lediglich bei $12,1 \pm 2,8$ Minuten. Im Vergleich zur *GpLPOR* weist die *DsLPOR* eine um 2 °C höhere Schmelztemperatur auf. Die Halbwertszeit bei 35 °C hingegen ist mit $62,4 \pm 3,4$ Minuten um das 5-fache gesteigert. Die Temperaturstabilität der Proteine nimmt in der Reihenfolge *TeLPOR* = *EbLPOR* = *PdLPOR* > *ElLPOR* > *DsLPOR* > *GpLPOR* > *SpLPOR* > *LfLPOR* > *AtLPORC* ab.

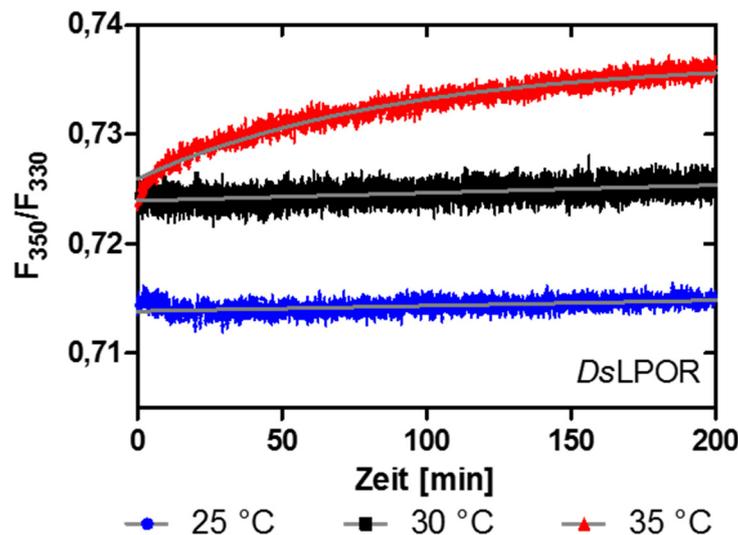


Abbildung 39: Temperaturstabilität der *DsLPOR*. Die Messung der Temperaturstabilität bei 25 °C (blau), 30 °C (schwarz) und 35 °C (rot) wurde am Prometheus NT.Plex der Firma NanoTemper (München, Deutschland) durchgeführt. Die grauen Linien zeigen eine einfach-exponentielle Anpassung der Daten.

Tabelle 27: Übersicht der Halbwertszeiten bei 35 °C aus der Temperaturstabilitätsmessung.

LPOR	Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ bei 35 °C [min]
<i>TeLPOR</i>	> 30 Stunden
<i>AtLPORC</i>	$1,1 \pm 0,3$
<i>ElLPOR</i>	$129,8 \pm 20,1$
<i>DsLPOR</i>	$62,4 \pm 3,4$
<i>EbLPOR</i>	> 30 Stunden
<i>LfLPOR</i>	$1,9 \pm 0,4$
<i>PdLPOR</i>	> 30 Stunden
<i>SpLPOR</i>	$1,9 \pm 0,2$
<i>GpLPOR</i>	$12,1 \pm 2,8$

Basierend auf den hier präsentierten Thermostabilitätsuntersuchungen wären für die zuvor beschriebene TA-Messung (Kapitel 3.1.5) z. B. die LPORs aus *Porphyrobacter dokdonensis* (*PdLPOR*) und *Erythrobacteraceae* bacterium (*EbLPOR*) geeignete Kandidaten, da sie bei 35 °C über 30 Stunden keine Denaturierung aufweisen, jedoch sind die K_d -Werte (Kapitel 3.2.1) dieser beiden mit 40 μM (*PdLPOR*) und ca. 45 μM (*EbLPOR*) sehr hoch, was in einer schlechteren Beladung der Proteine resultiert. Hierfür würden sich die *SpLPOR* (K_d -Wert: 7 μM) oder die *LfLPOR* (K_d -Wert: ca. 6 μM) besser eignen, jedoch zeigen beide eine sehr hohe Temperaturinstabilität. Im Vergleich zur *DsLPOR* sind sie sogar temperaturinstabiler. Auf Grundlage dieser Daten wäre somit die *PdLPOR* für weitere TA-Messungen, trotz des hohen K_d -Werts, das geeignetste Protein.

Alle LPOR-Proteine sind über einen Zeitraum von 30 Stunden bei der für die Aktivitätsmessungen verwendeten Temperatur von 25 °C stabil. Auch bei einer Erhöhung der Temperatur um 5 °C ist für keines der Enzyme einer Denaturierung zu erkennen. Erst bei 35 °C ist für sechs der neun getesteten LPORs eine Denaturierung zu verzeichnen. Anhand der Temperaturstabilitäts-Untersuchungen konnten außerdem die *PdLPOR* und *ElLPOR* als unter Umständen geeignete Enzyme für die Untersuchung des Mechanismus (TA-Messung, Kapitel 3.1.5) identifiziert werden. Bei der Temperaturstabilität konnten hinsichtlich des physiologischen/phylogenetischen Ursprungs keine eindeutigen Trends beobachtet werden.

3.2.5 Ein Vergleich der ermittelten Parameter zeigt, dass AAPB LPORs eine von den cyanobakteriellen und pflanzlichen LPORs separierte, evolutionär konservierte Gruppe bilden

Abbildung 40 A zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit bestimmten biochemischen Charakteristika der identifizierten AAPB LPORs im Vergleich zu den beiden pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR-Enzymen (*TeLPOR* und *AtLPORC*). Für die weiterführende Diskussion des evolutionären Ursprungs und der Entwicklung von AAPB LPORs ist zudem neben dem Übersichtsstammbaum (Abbildung 40 B, adaptiert aus Abbildung 20) ein Stammbaum, welcher für einen reduzierten Datensatz erzeugt wurde (Abbildung 40 C), sowie ein datierter Stammbaum (Abbildung 40 D), welcher die bakterielle Evolution widerspiegelt, dargestellt. Alle dargestellten Stammbäume wurden von Dr. Olga Chernomor (Universität Wien, Center for Integrative Bioinformatics (CIBIV)) erstellt. Mit einigen Ausnahmen scheinen die AAPB LPORs deutliche Unterschiede in der biochemischen Charakterisierung, im Vergleich zu der hier untersuchten cyanobakteriellen und pflanzlichen LPOR, zu zeigen (Abbildung 40 A). Besonders deutlich sind diese Unterschiede, wie in Kapitel 3.2.1, 3.2.2.3, 3.2.3 und 3.2.4.1 beschrieben, bei den pH- und Temperatur-

Aktivitätsoptimumsbereichen, bei den K_d -Werten des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes und bei der Substratpräferenz zu erkennen. Des Weiteren scheint es Unterschiede zwischen den beiden AAPB-Ästen zu geben. So zeigen die *EiLPOR*, *EbLPOR*, *PdLPOR* und *GpLPOR* im Vergleich zur *SpLPOR*, *LflLPOR* und *DsLPOR* in den verschiedenen Kategorien der biochemischen Charakterisierung ebenfalls Unterschiede. Zum Beispiel zeigen die *EiLPOR*, *PdLPOR* und *GpLPOR* höhere V_{max} -Werte für die Umsetzung von MV-Pchlid im Vergleich zum DV-Pchlid, während dies bei der *SpLPOR*, *LflLPOR* und *DsLPOR* genau umgekehrt zu sein scheint. Ähnliches gilt für die K_d -Werte des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes, wobei hier die *EiLPOR*, *EbLPOR*, *PdLPOR* und *GpLPOR* alle vergleichsweise hohe K_d -Werte aufweisen, während die *SpLPOR* und *LflLPOR* niedrige K_d -Werte besitzen, welche denen der *AtLPORC* und *TeLPOR* ähneln. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint ein einziger Horizontaler Gentransfer (HGT)-Event, wie in der Arbeit von Kaschner *et al.* [1] postuliert, als eher unwahrscheinlich. Vielmehr sind zur Erklärung der erhaltenen Stammbaumtopologie mehrere HGTs notwendig, wobei bei Betrachtung eines datierten Stammbaums, welcher die Evolution der entsprechenden Bakteriengattungen widerspiegelt, eine unabhängige konvergente Evolution von LPORs und AAPBs zumindest gleich wahrscheinlich erscheint.

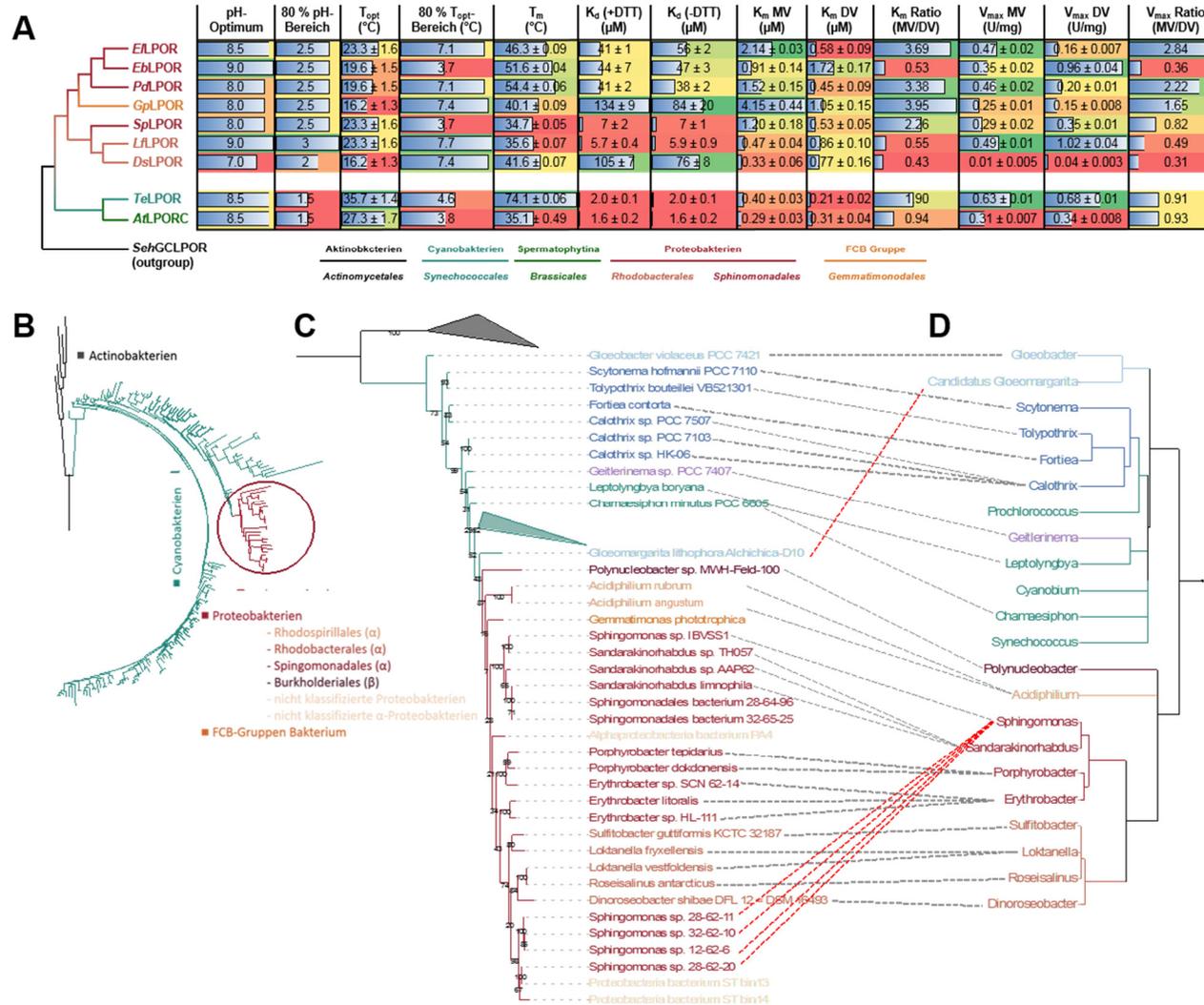


Abbildung 40: Übersicht der biochemischen Charakteristika im direkten Vergleich zum evolutionären Ursprung. (A) Biochemische Charakteristika der AAPB LPORs im Vergleich zu denen der pflanzlichen und cyanobakteriellen LPOR. Die jeweiligen Spaltenwerte wurden zur Klassifizierung, entsprechend eines Farbcodes, mit kleinen Werten in rot und großen Werten in grün herangezogen um Unterschiede zwischen den AAPB LPORs und den pflanzlichen und cyanobakteriellen Enzymen einfacher erkennen zu können. (B) Übersichtsstammbaum sowie (C) ein Stammbaum mit reduziertem Datensatz und (D) ein Stammbaum, welcher die bakterielle Evolution widerspiegelt. Die roten gestrichelten Linien zeigen Diskrepanzen zwischen dem Organismenstammbaum (D) und dem LPOR-Stammbaum (C) an.

3.3 Untersuchungen zur Struktur und Dynamik von LPORs

Die ersten Arbeiten zu LPOR-Enzymen reichen in die 50er Jahre des 19. Jahrhundert zurück [45, 172, 173]. In den Anfangsjahren wurden hauptsächlich pflanzliche LPORs untersucht, welche oftmals direkt aus Etioplasten der entsprechenden Pflanzenart gewonnen wurden. Insbesondere in den letzten Jahren, befeuert durch die Möglichkeit der rekombinanten Herstellung cyanobakterieller LPORs, welche einfacher zu produzieren und zu reinigen sind als die entsprechenden pflanzlichen Enzyme, konnten große Fortschritte beim Verständnis des katalytischen Mechanismus von LPORs gemacht werden [46, 50, 56, 57, 71, 137-139, 149-151, 153, 174]. Obwohl eine Kristallstruktur einer LPOR einen Quantensprung für das Verständnis des Mechanismus bedeuten würde, ist es bisher nicht gelungen die Struktur eines LPOR-Enzyms mittels Röntgenkristallographie aufzuklären. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, einige der hier neu identifizierten LPORs zu kristallisieren. Außerdem sollte die Struktur und Dynamik des NADPH/Pchlid freien Apoproteins sowie des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes mittels verschiedener biophysikalischer Streuverfahren (Kleinwinkel-Röntgenstreuung und Inkohärente Quasielastische Neutronenstreuung) untersucht werden.

3.3.1 Die Kristallisation einer LPOR war zwar möglich, lieferte jedoch keine zur Strukturlösung geeigneten Diffraktionsdaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht einige der heterolog produzierten LPORs zu kristallisieren. Hierfür wurden die *Te*LPOR, *Ds*LPOR und *El*LPOR (verschiedene Varianten siehe Kapitel 2.20.2) zunächst in *E. coli* BL21(DE3) heterolog produziert (Kapitel 2.7.1.2), mittels IMAC (Kapitel 2.15.2) gereinigt und auf die für das jeweilige Protein maximale Konzentration konzentriert (Kapitel 2.15.5). Für ein erstes *screening* auf geeignete Kristallisationsbedingungen wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Kristallisationsscreens verwendet, jedoch konnte bei keiner dieser Bedingungen eine Kristallbildung beobachtet werden. Daher wurden in weiteren Tests den Proteinproben nach der Reinigung verschiedenen Zusätze zugegeben. Dabei fiel auf, dass die Zugabe von NADPH bzw. NADP⁺ essentiell für eine Kristallbildung ist. Nachdem die ersten geeigneten Bedingungen gefunden wurden, wurden vier eigene Screens (Tabelle 33 bis Tabelle 36) hergestellt und verwendet. Durch die Verwendung der drei Proteine mit unterschiedlichen His₆-tags, welche in drei verschiedenen Puffern und sieben unterschiedlichen Additiv-Kombinationen verwendet wurden, und den 18 Standardscreens sowie den vier selbst hergestellten Screens, ergaben sich insgesamt 105 verschiedene Mikrotiterplatten (MTP)-Ansätze woraus sich wiederum 10.080 getestete Kristallisationsbedingungen ergaben (bei 96 Bedingungen pro MTP). Trotz dieses ausgedehnten Screenings wurden hauptsächlich geschichtete Kristalle (Abbildung 41), welche für Diffraktionsexperimente ungeeignet erscheinen, gebildet.

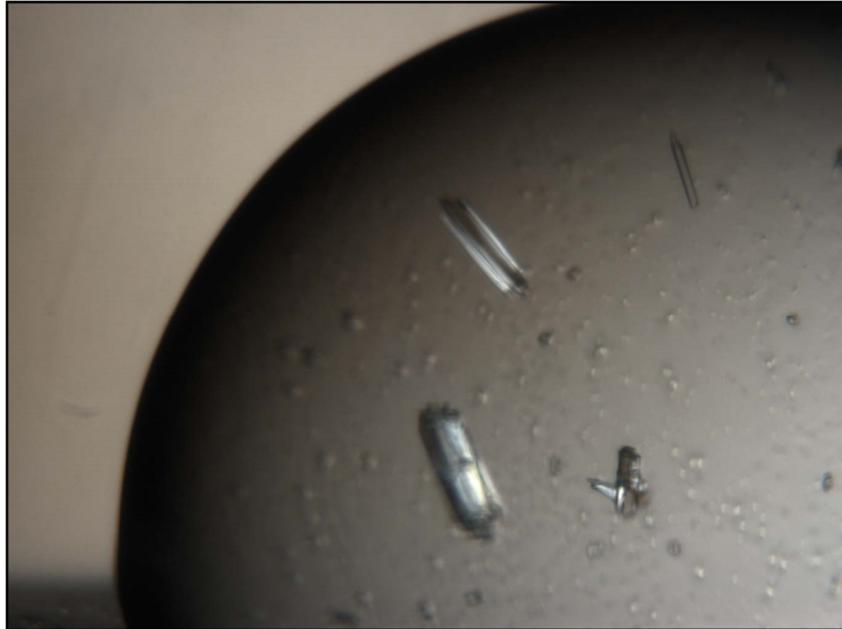


Abbildung 41: Foto eines mehrschichtigen ELPOR-Kristalls unter Zugabe von NADPH und TCEP. Die ELPOR mit N-terminalem His₆-tag (6,45 mg/ml in Kristallisationspuffer A (Kapitel 2.20.2), Zugabe von 1 mM NADPH und 1 mM TCEP) kristallisierte innerhalb einer Woche in 100 mM TRIS, pH 8,5 versetzt mit 24 % PEG 6.000 bei 19 °C.

Für die ELPOR mit N-terminalem His₆-tag wurde einer dieser Kristalle näher untersucht. Das Protein (11,2 mg/ml in Kristallisationspuffer B (Kapitel 2.20.2), Zusatz von 1 mM NADPH und 1 mM TCEP) kristallisierte hierbei innerhalb von zwei Wochen in Anwesenheit von 0,2 M Lithiumacetat und 15 % (w/v) PEG 20.000 bei 19 °C. Für Diffraktionsexperimente ist es notwendig die Kristalle auf 100 K zu kühlen. Hierzu wurde der Kristall mittels einer Haarschleife (*loop*) in die entsprechende Reservoirolösung, welche zusätzlich mit 30 % (v/v) PEG 20.000 versetzt war, überführt und anschließend im Stickstoffstrom (*cryocooling*) auf 100 K gekühlt. Der Kristall wurde an der ID30A-3 *beamline* des *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) von PD Dr. Joachim Granzin (Institute of Complex Systems (ICS-6), Forschungszentrum Jülich) vermessen. Die daraus resultierenden Röntgendiffraktionsbilder bei $\varphi = 0^\circ$ und $\varphi = 90^\circ$ mit einem Rotationswinkel $\Delta\varphi$ von 1° sind in Abbildung 42 gezeigt. Die ungefähre Datenauflösung betrug 7 \AA bei ungenügender Beugungsdatenqualität. Eine Bestimmung der Gitterkonstanten und der Raumgruppen ergab: $a = 80,2 \text{ \AA}$, $b = 42,9 \text{ \AA}$, $c = 85,2 \text{ \AA}$ und $\beta = 109,5^\circ$ mit monokliner P2- oder P2₁-Symmetrie. Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten ergab bei einem Lösemittelgehalt von 36,5 % zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Leider ist bei der vorliegenden Datenqualität die Bestimmung einer hochauflösenden Röntgenstruktur nicht sehr vielversprechend, könnte aber erfolgen wenn die Kristallqualität verbessert werden kann.

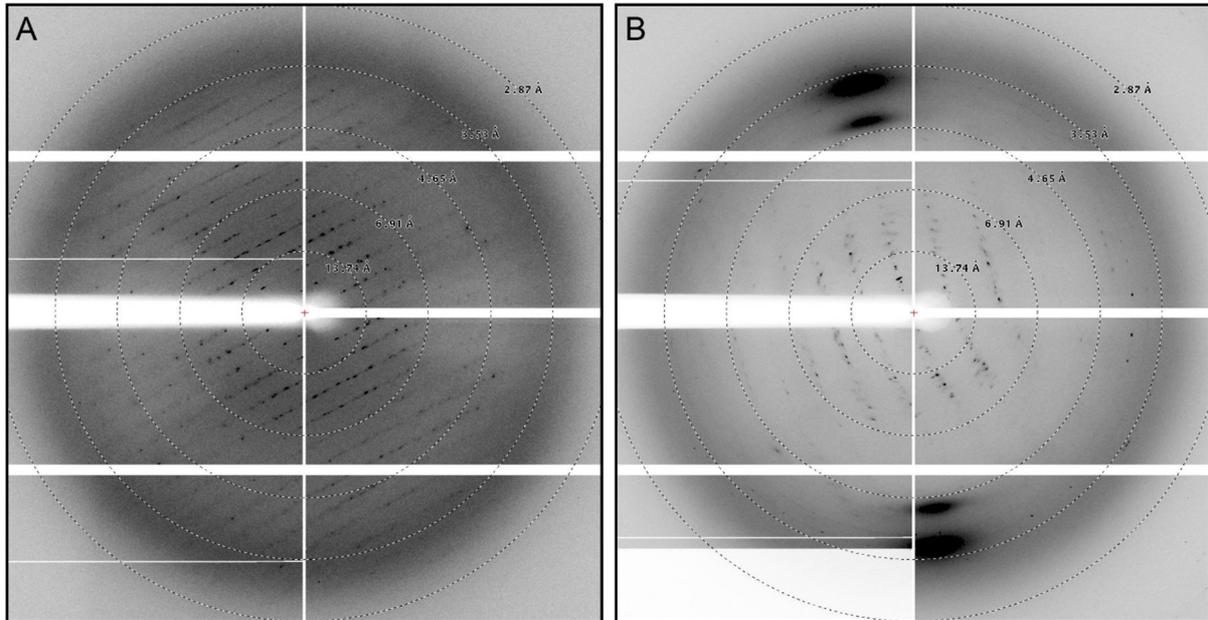


Abbildung 42: Röntgendiffraktionsbilder der ELPOR. Diffraktionsbilder ($T = 100$ K, ID30A-3 *beamline*, ESRF, Grenoble, Frankreich) mit einer φ -Trennung von 90° (A) $\varphi = 0\text{-}1^\circ$ Rotation und (B) $\varphi = 90\text{-}91^\circ$ Rotation.

Alle untersuchten Bedingungen ergaben lediglich geschichtete Kristalle, weshalb eine Strukturlösung basierend auf den vorliegenden Daten nicht möglich war.

3.3.2 Strukturanalysen mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung

3.3.2.1 *Te*LPOR-Apo- und -Holoprotein zeigen Unterschiede in ihrer Oligomerisierung

Da im Rahmen dieser Arbeit für keines der untersuchten LPOR-Enzyme eine hochauflösende Struktur mittels Röntgenkristallisation erhalten werden konnte, wurde im Folgenden versucht, die globale Struktur (in niedriger „Auflösung“) eines LPOR-Proteins mittels Kleinwinkel-Röntgenstreuung (englisch: *small-angle X-ray scattering*, SAXS) aufzuklären. Als Zielenzym wurde hierzu die LPOR aus *T. elongatus* (*Te*LPOR) gewählt und SAXS-Analysen in Kooperation mit Dr. Andreas Stadler (Jülicher Zentrum für Forschung mit Neutronen (JCNS) und *Institute of Complex Systems* (ICS), Forschungszentrum Jülich) sowohl für das pigmentfreie Apoprotein als auch für den ternären *Te*LPOR/NADPH/Pchlid-Holoproteinkomplex durchgeführt. Bei der *Te*LPOR handelt es sich um das am besten untersuchte und damit mechanistisch am besten verstandene LPOR-Enzym. Außerdem besitzt dieses einen niedrigen K_d -Wert (Kapitel 3.2.1), sodass eine Beladung des Apoproteins mit Pchlid und NADPH als am aussichtsreichsten erschien.

Um die entsprechenden Analysen zu ermöglichen, wurde das *Te*LPOR-Apoprotein wie in Kapitel 2.20.1 beschrieben produziert und der ternäre Holoproteinkomplex wie in Kapitel 2.20.1 beschrieben

rekonstituiert. Für das TeLPOR-Apoprotein wurden insgesamt drei unabhängig präparierte Proben mittels SAXS analysiert, während für den Holoproteinkomplex nur eine Probe vermessen wurde. Detaillierte Auswertungen der SAXS-Daten wurden jedoch lediglich für eine Apo- und eine Holoproteinprobe durchgeführt.

Um die Funktionalität und die Beladung des rekonstituierten Holoproteins nachzuweisen, wurde zunächst eine Aktivitätsuntersuchung (Abbildung 43) durchgeführt. Hierzu wurde der TeLPOR-Holoproteinprobe 70 mM DTT zugesetzt und die Aktivität bei Belichtung mit Blaulicht durch die Messung von Absorptionsspektren untersucht. Um den Vergleich zu einem normalen Aktivitätsassay zu gewährleisten, wurde nach einer Belichtungszeit von 120 Sekunden zusätzlich 0,03 % Triton X-100 zugegeben. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsspektrum zu den für proteingebundenes Pchlid typischen Absorptionsmaxima.

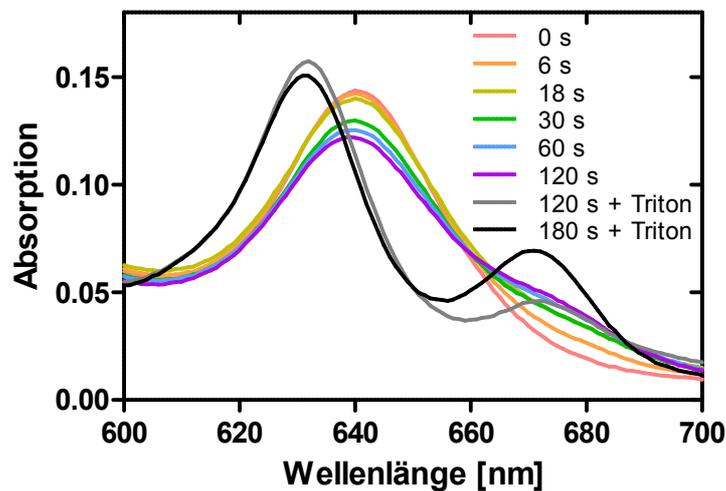


Abbildung 43: Aktivitätsnachweis der TeLPOR-Holoproteinprobe. Zunächst wurden der TeLPOR-Holoproteinprobe 70 mM DTT zugegeben und die Aktivität durch Belichtung mit Blaulicht untersucht. Aufgrund des geringen sichtbaren Umsatzes ohne die Zugabe von Triton X-100 wurde dem Assay nach einer Belichtungsdauer von 120 s 0,03 % Triton X-100 zugesetzt und erneut ein Absorptionsspektrum gemessen. Durch die Zugabe von Triton X-100 verschiebt sich das Spektrum zu den für proteingebundenes Pchlid typischen Absorptionsmaxima und zeigt definierte Peaks.

Des Weiteren wurde die Apo- und Holoproteinprobe in Kooperation mit Dr. Frank Krause (Nanolytics Instruments GmbH, Potsdam, Deutschland) mittels analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) mit mehrfachwellenlängen Absorptionsoptik (englisch: *multiwavelength absorbance optics*, MWA) [117] untersucht. Bei der AUZ wird die Probe während der Sedimentation parallel zur Rotationsachse optisch untersucht. Hierbei erhält man ein orts- und zeitaufgelöstes Konzentrationsprofil. Durch die Kombination mit einer MWA kann hierbei im Vergleich zur üblichen AUZ, nicht nur eine Wellenlänge, sondern ein Spektrum im UV/Vis-Bereich gemessen werden. Aufgrund dieser Möglichkeit ist eine Wiederholung der Experimente bei unterschiedlichen Wellenlängen nicht mehr notwendig und die Experimentalzeit, sowie die benötigte Probenmenge, kann reduziert werden. Außerdem können so direkt spektrale Informationen über die sedimentierenden Spezies erhalten werden.

Die AUZ-Experimente dienen hierbei zur Evaluierung der Monodispersität der Probe und der Untersuchung der Änderung des Oligomerisierungszustandes aufgrund der ternären TeLPOR/NADPH/Pchlid-Komplexbildung.

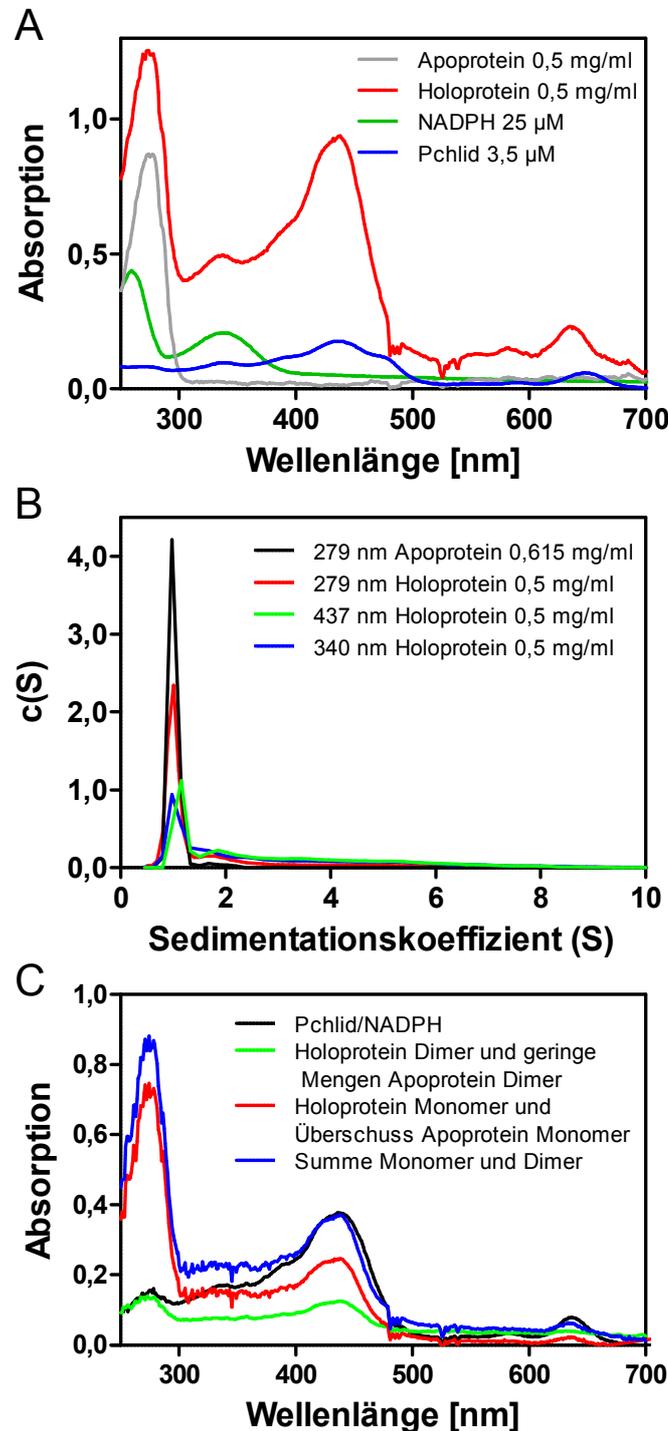


Abbildung 44: Absorptionsspektren und Sedimentationskoeffizientenverteilung der AUZ-Untersuchung von TeLPOR-Apo- und -Holoprotein (A) Absorptionsspektren des TeLPOR-Apo- und -Holoproteins sowie von NADPH und Pchlid in Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) aus dem ersten Scan in zentral-radialer Position während der analytischen Ultrazentrifugation. Die Messung der Absorptionsspektren erfolgte mit einem *benchtop* Spektrometer (Schichtdicke 20 mm). (B) Sedimentationskoeffizientenverteilung $c(S)$ von TeLPOR-Apo- und -Holoprotein bei 279 nm, 340 nm und 437 nm, welche die relative Häufigkeit des vorherrschenden monomeren Proteins (0,98 S) sowie des nahegelegenen Dimers zeigen. (C) Extrahierte Absorptionsspektren der drei Hauptpopulationen des TeLPOR-Holoproteins zur Beurteilung des TeLPOR/NADPH/Pchlid-Gehalts. Die jeweiligen Sedimentationskoeffizientenbereiche wurden aus den Peakgrenzen, wie sie in (B) erkennbar sind, ausgewählt: Monomer (0,47 S bis 1,50 S), Dimer (1,50 S bis 2,20 S) und Pchlid/NADPH (>2,20 S).

Wie in Abbildung 44 B zu erkennen, weist die Sedimentationskoeffizientenverteilung $c(S)$ des *TeLPOR*-Apoproteins eine deutlich überwiegende Monomerpopulation (1,01 S), mit einer scheinbaren molaren Masse von 43 kDa und einem relativen Gehalt von 94,2 %, auf. Dimere und größere Oligomere/Aggregate treten zu 3,6 % und 2,2 % relativ zum Gesamtprotein auf (Abbildung 44 B und Abbildung 45 A). Im Gegensatz zum überwiegend monomeren *TeLPOR*-Apoprotein zeigt die $c(S)$ -Verteilung des *TeLPOR*-Holoproteins bei 279 nm, 340 nm und 437 nm wesentlich höhere Mengen schneller sedimentierender Spezies wie Proteindimere und verschiedene Aggregate (Abbildung 44 B).

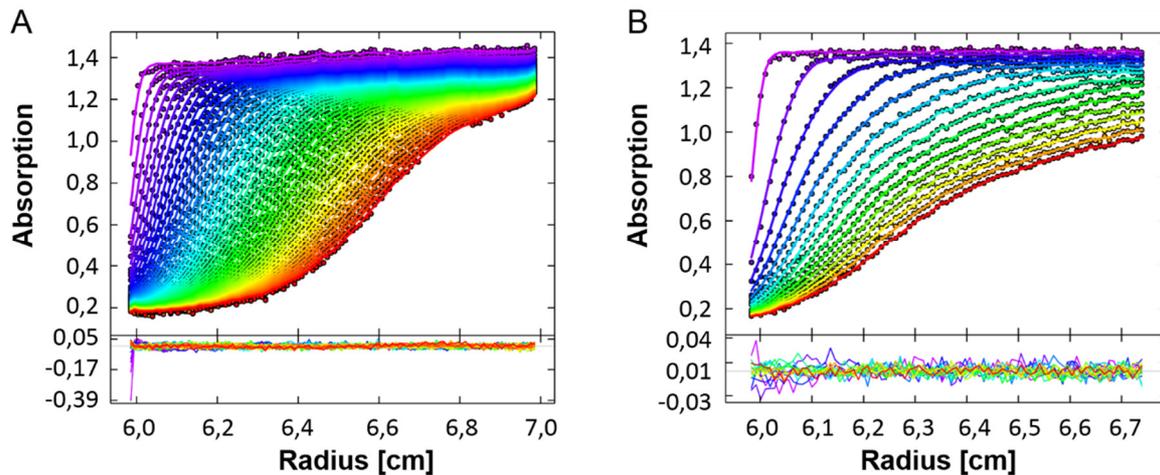


Abbildung 45: Beispielhafte Sedimentationsgeschwindigkeitsanalyse. (A) *TeLPOR*-Apoprotein (0,615 mg/ml) bei 279 nm und (B) *TeLPOR*-Holoprotein (1 mg/ml) bei 440 nm mit dem Standard $c(S)$ -Modell. (A und B) Die oberen Bereiche zeigen Rohdaten (Kreise) und die beste Anpassung an die Daten (Linie). Für eine bessere Übersicht wurde nur jeder zweite Scan des Datensatzes gezeigt. Im unteren Bereich ist die jeweilige Abweichung der Anpassung von den Messwerten dargestellt.

Die Anwesenheit signifikanter Mengen von freiem NADPH und Pchlid, welche schneller sedimentieren als *TeLPOR*, ist in Abbildung 47 zu sehen. Hier ist die Ausbreitung der charakteristischen Absorptionsmaxima als Teil der sich bewegenden Sedimentationsgrenze insbesondere im Vergleich zum *TeLPOR*-Apoprotein (Abbildung 46) zu sehen.

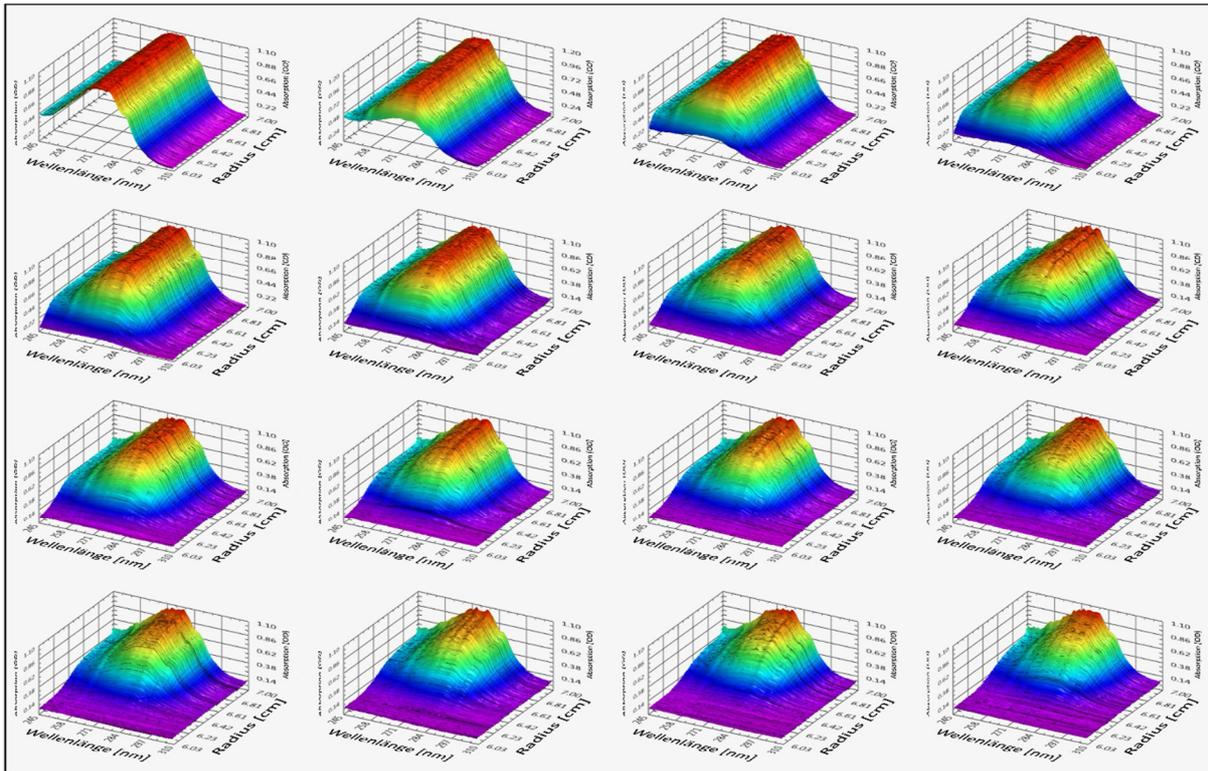


Abbildung 46: Spektraler Verlauf während der AUZ-Messung des TeLPOR-Apoproteins.

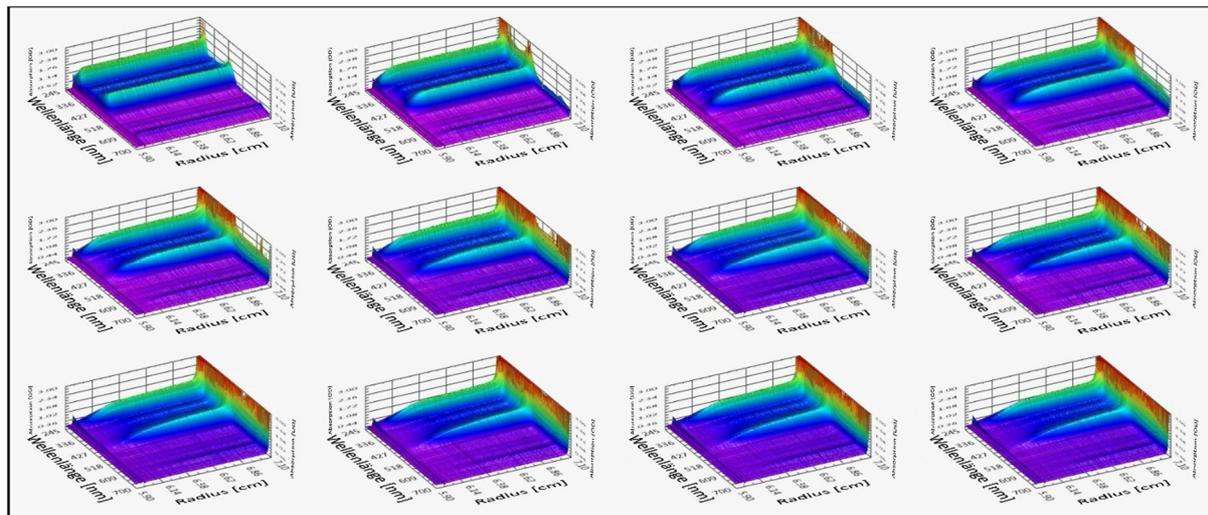


Abbildung 47: Spektraler Verlauf während der AUZ-Messung des TeLPOR-Holoproteins.

Eine Entfaltung in die Komponentensedimentationsprofile unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten aus den Absorptionsspektren der drei einzelnen Komponenten (TeLPOR-Apoprotein, NADPH und Pchlid, wie in Abbildung 44 A) führt zu verzerrten Komponentenkonzentrationen. Dieser Befund zeigt, dass verschiedene Spezies chromatische Verschiebungen bei der Komplexbildung mit bestimmten spektralen Merkmalen zeigen, die keine lineare Kombination der Spektren der einzelnen Komponenten darstellt. Tatsächlich sind signifikante

chromatische Verschiebungen zwischen gelöstem Pchlid und dem *TeLPOR*-Holoprotein zu erkennen (Abbildung 44 A). Ungeachtet dessen erlaubt das Absorptionsspektrum der *TeLPOR*-Holoproteinprobe (Abbildung 44 A), sowie die extrahierten Absorptionsspektren des sedimentierten Materials (Abbildung 44 C), die den Peaks von monomerer *TeLPOR* (0,47 S bis 1,5 S) und dimerer *TeLPOR* (1,5 S bis 2,2 S) entsprechen, eine robuste quantitative Bewertung der Oligomerverteilung. Das Absorptionsspektrum des *TeLPOR*-Holoproteins (Abbildung 44 A) ähnelt in der Region > 400 nm der Summe aus den einzelnen Absorptionsspektren von *TeLPOR*-Apoprotein, NADPH und Pchlid in einem molaren Verhältnis von etwa 1:0,67:0,67. Unter der Annahme, dass die Summe der chromophoren Eigenschaften aller Spezies im Wellenlängenbereich > 400 nm im Wesentlichen identisch mit den Spektren der drei unabhängig gelösten Komponenten ist, lässt dies darauf schließen, dass etwa ein Drittel des NADPH und Pchlid in Aggregaten in der Anfangsphase des Experiments sedimentiert wurden. Dabei ist davon auszugehen, dass ebenfalls kleine Mengen proteinhaltiger Komplexe mit sedimentieren. Zusammenfassend stellen ungefähr 67 % des Gesamtproteins Apoprotein, vorwiegend als Monomer, dar und 33 % zeigen durch die Co-Sedimentierung mit NADPH und Pchlid eine Holoproteinbildung. Holoprotein-Monomere kommen im Verhältnis zu Holoprotein-Dimeren ungefähr zweimal häufiger vor, wie durch das Verhältnis der Monomer-/Dimer-Absorption bei 438 nm zu erkennen ist. Dieses Verhältnis stimmt weiterhin mit den relativen Monomer-/Dimer-Signalamplituden aus den $c(S)$ -Verteilungen bei 340 nm und 437 nm überein (Abbildung 44 B). Insgesamt repräsentieren *TeLPOR*-Holoproteinmonomere und -dimere ungefähr 22 % bzw. 11 % des Gesamtproteins.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mit der gewählten Methodik die *TeLPOR* in funktionaler, photoaktiver Form als Holoproteinkomplex rekonstituiert werden konnte. Die MWA-AUZ-Analysen bei niedriger Proteinkonzentration (0,5 mg/ml) zeigen eine Beladung des Apoproteins mit Pchlid und NADPH von 33 %, wobei bei dieser Konzentration davon 22 % als Holoproteinmonomere und 11 % als Holoproteindimere vorliegen. Bei den verbleibenden 67 % handelt es sich um monomeres Apoprotein.

In Abbildung 48 sind die SAXS-Daten des *TeLPOR*-Apo- und -Holoproteins im Vergleich dargestellt. Hierbei wurden Datenpunkte bei kleinen q -Werten für die Auswertung nicht berücksichtigt (Abbildung 48 A und C, dargestellt in grau), um den Einfluss potentieller Aggregationseffekte zu minimieren. Außerdem wurden für die Apoprotein-Analyse ein Datensatz niedriger Konzentration und ein Datensatz bei hoher Konzentration vereinigt, während für die Auswertung der Holoprotein SAXS-Daten lediglich ein Datensatz bei hoher Konzentration verwendet wurde. Letzteres war notwendig, da für die Holoproteinprobe ein konzentrationsabhängiges Monomer/Dimer-Gleichgewicht nachgewiesen werden konnte (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund können die

Monomer/Dimer-Verteilungen, welche in der MWA-AUZ-Analyse beobachtet wurden (bei 0,5 mg/ml), nicht direkt mit den Daten der Holoprotein SAXS-Messung (bei 5 mg/ml) verglichen werden.

Anhand der in Tabelle 28 zusammengefassten Molekulargewichte, welche aus dem Provd-Volumen und den entsprechenden *ab initio*-Modellen (siehe unten) ermittelt wurden, ist zu erkennen, dass es sich bei dem Apoprotein um ein Monomer handelt. Für das Holoprotein hingegen zeigt sich eine Dimerbildung von 42 %, wenn davon ausgegangen wird, dass lediglich Monomere und Dimere vorliegen.

Während aus den oben genannten Gründen ein direkter Vergleich zwischen den Monomer/Dimer-Verteilungen, welche mittels MWA-AUZ und SAXS ermittelt wurden, nicht möglich ist, so zeigten doch beide Verfahren unabhängig voneinander, dass die Beladung von TeLPOR mit Pchlid und NADPH zu einer Dimerisierung/Oligomerisierung des Proteins führt.

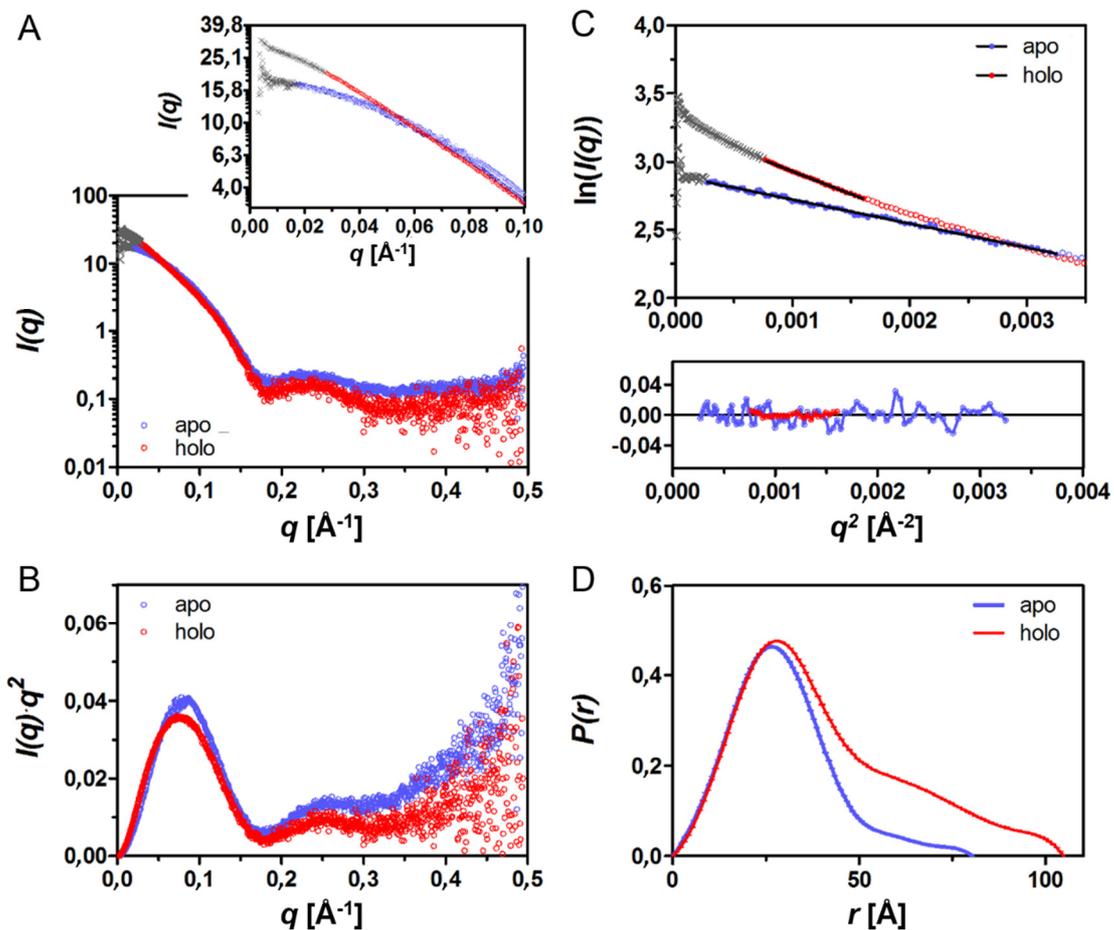


Abbildung 48: SAXS-Daten des Apo- und Holoproteins der TeLPOR. Die Daten des Apoproteins sind in blau und die des Holoproteins in rot dargestellt. (A) SAXS-Streukurven. Das Inset zeigt die gleiche Streukurve im kleinen q -Wert-Bereich. (B) Kratky-Plots. (C) Guinier-Plot. (D) Abstandsverteilungsfunktion ($P(r)$). Die Daten im kleinen q -Wert-Bereich, welche in der Guinier-Analyse nicht berücksichtigt wurden, sind in allen Plots als graue Kreuze dargestellt.

Tabelle 28: Durch SAXS bestimmte Molekulargewichte, Streumasseradien und Dimeranteil des TeLPOR-Apo- und -Holoproteins. Der Monomer-Gehalt (φ) wurde gemäß $M = \varphi M_{\text{theoMonomer}} + (1-\varphi)M_{\text{theoDimer}}$, wobei $M_{\text{theoMonomer}}$ und $M_{\text{theoDimer}}$ die theoretische Molekülmasse des TeLPOR-Apo- und -Holoprotein-Monomers bzw. Dimers darstellen. TeLPOR-Apoprotein: $M_{\text{theoMonomer}} = 38.014$ Da und $M_{\text{theoDimer}} = 76.028$ Da; TeLPOR-Holoprotein: $M_{\text{theoMonomer}} = 39.370$ Da und $M_{\text{theoDimer}} = 78.740$ Da. Für die theoretische Molekülmasse des TeLPOR-Holoprotein-Monomers und Dimers wurde eine 1:1-Beladung des Proteins mit NADPH (744 Da) und Pchlid (612 Da) angenommen.

Protein	Molekulargewicht [Da]			Dimer-Gehalt [%]
	Porod-Volumen	<i>ab initio</i>	theoretisch	
TeLPOR-Apoprotein	38.649	31.110	38.014	1,7
TeLPOR-Holoprotein	55.895	58.153	39.370	42

Die in Abbildung 48 D dargestellten Abstandsverteilungsfunktionen ($P(r)$ -Funktionen) für das Apo- und Holoprotein wurden zur Rekonstruktion verschiedener *ab initio*-Modelle genutzt. Hierbei wurden je 20 unabhängige Apoproteinmodelle mit Hilfe der Programme DAMMIF [112], DAMMIN [113] und GASBORP [111] erzeugt und mittels DAMAVER [115] gemittelt und gefiltert. In Abbildung 50 C sind die resultierenden gemittelten und gefilterten *ab initio*-Modelle des TeLPOR-Apoprotein gezeigt. Die DAMMIF-, DAMMIN- und GASBORP-Modelle zeigen eine sehr ähnliche Struktur, bestehend aus einer großen und kleinen Unterdomäne mit global kegelähnlicher Struktur. Da bisher für LPORs keine Strukturinformation existiert, wurden in Kooperation mit Dr. Marco Bocla (Protedes, Sankt Augustin, Deutschland) verschiedene TeLPOR-Homologiemodelle erzeugt. Ausgehend von einem Homologiemodell des zu TeLPOR verwandten Enzyms aus *Synechococcus* sp. (SsLPOR) [58] wurde ein Homologiemodell der Rossmannfaltungsmotiv-Hauptdomäne der TeLPOR erzeugt. Diesem Modell fehlen C-terminal 31 Aminosäuren, welche von der zur Modellierung der SsLPOR verwendeten Templatestruktur (PDB-ID: 1AHI; 7 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase aus *E. coli*) nicht abgedeckt wurde. Um ein Modell des TeLPOR-Volllängenproteins zu erzeugen, wurden drei unterschiedlich verlängerte Modelle erzeugt und mittels CRY SOL deren theoretische Streukurven an die experimentellen SAXS-Daten des Apoproteins angepasst (Abbildung 49). Von allen getesteten Modellen beschreibt das TeLPOR-C_{helix}-Modell die experimentellen SAXS-Daten am besten (CRY SOL $\chi = 1,654$). Hierbei gilt: je kleiner der χ -Wert, desto besser beschreibt der Fit die experimentellen Daten. Gleichzeitig lässt sich dieses Modell hervorragend in die entsprechenden *ab initio*-Modelle einpassen (Abbildung 50 C, Struktur als rotes Cartoon-Modell). Im Vergleich dazu ist in Abbildung 50 die Struktur der TeLPOR-Rossmannfaltungsmotiv-Hauptdomäne, ohne C-terminale Verlängerung, als blaues Cartoon-Modell gezeigt. Hierbei wird deutlich, dass die C-terminale Verlängerung notwendig ist, um das *ab initio*-Modell auszufüllen und die experimentellen SAXS-Daten zu erklären (vergleiche χ -Wert für die TeLPOR-Rossmannfaltungsmotiv-Hauptdomäne ($\chi = 2,864$) und das C-terminal verlängerte TeLPOR-C_{helix}-Modell ($\chi = 1,654$)). Für den finalen CRY SOL-Fit (Abbildung 50) wurde zusätzlich eine

Konstante von den Daten subtrahiert, um etwaige Effekte aufgrund einer unzureichenden Pufferkorrektur auszugleichen. Dies liefert einen verbesserten χ -Wert von 1,332 für das $TeLPOR-C_{helix}$ -Modell.

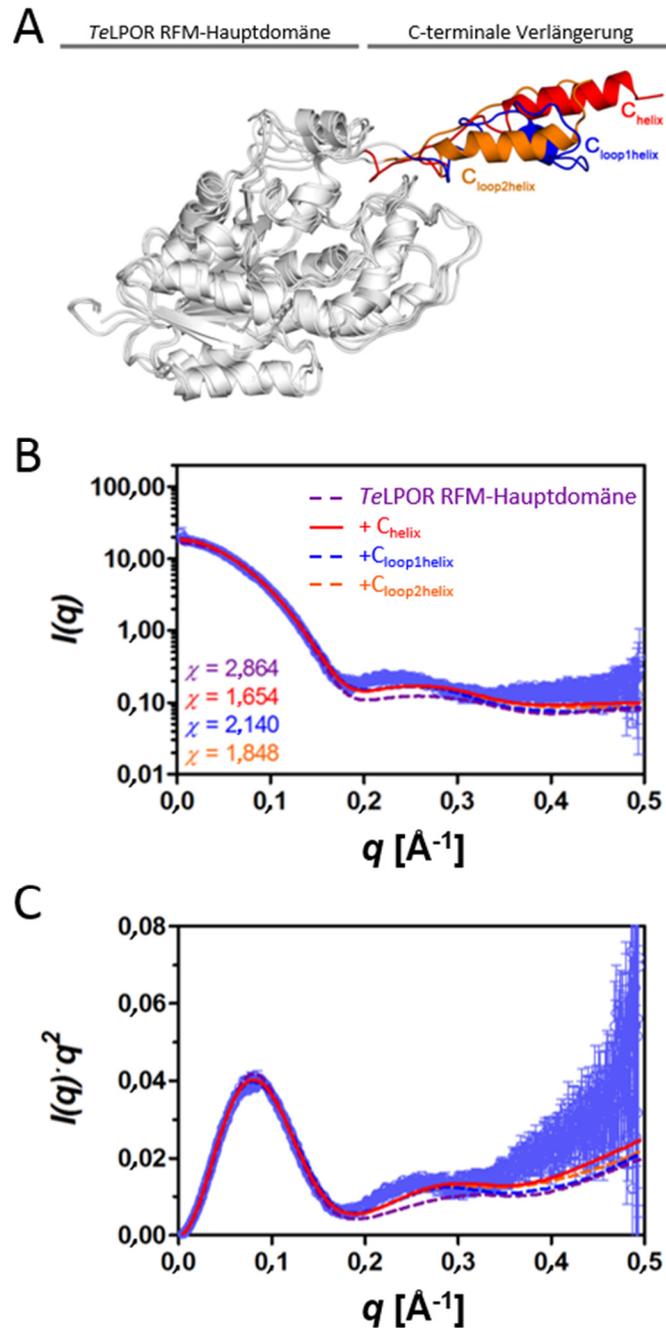


Abbildung 49: C-terminal verlängerte *TeLPOR*-Homologiemodelle und deren CRY SOL-basierte Bewertung. (A) *TeLPOR*-Homologiemodelle mit verschiedenen C-terminalen Verlängerungen. (B) SAXS-Streukurve und der dazugehörige (C) Kratky-Plot. Die experimentellen Streudaten des Apoproteins wurden an die mit CRY SOL abgeleitete theoretische Streukurve der jeweiligen Modelle angepasst. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurde hier für alle Modelle während des CRY SOL-Fits keine Konstante subtrahiert. RFM: Rossmannfaltungsmotiv.

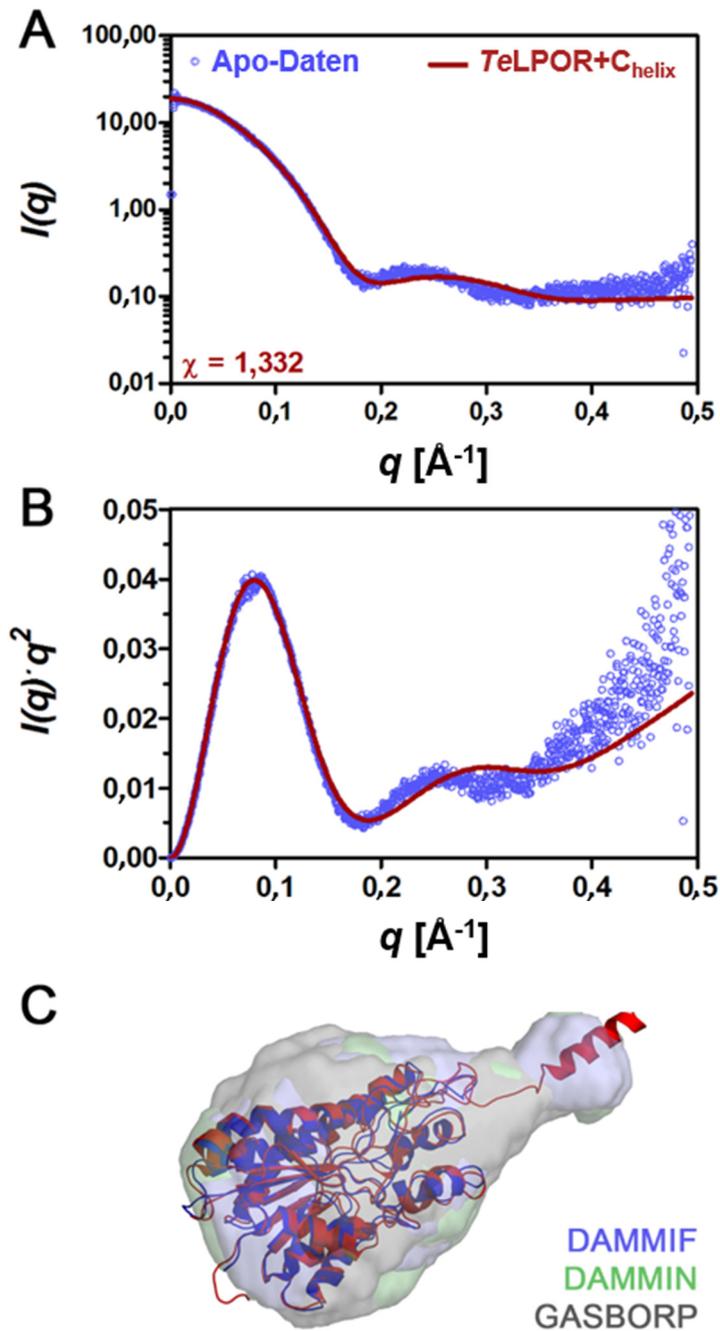


Abbildung 50: Small-angle X-ray scattering (SAXS)-Analyse des TeLPOR-Apoproteins. Die experimentellen Daten des Apoproteins (blaue Kreise) wurden zusammen mit der theoretischen Streukurve (rote Linie), welche aus dem Homologiemodell der am C-Terminus um 31 Aminosäuren verlängerten TeLPOR resultiert, dargestellt. Die 31 Aminosäuren sind dabei als eine abstehende α -Helix modelliert (A). (B) zeigt den dazugehörigen Kratky-Plot und (C) die *ab initio*-Modelle des Apoproteins mit dem am C-Terminus verlängerten TeLPOR-Homologiemodell.

In Abbildung 52 sind die Daten für das TeLPOR-Holoprotein gezeigt. Für die Rekonstruktion der globalen Struktur des Holo Proteins mittels *ab initio*-Modellierung wurde GASBORMX [111] verwendet, welches ein *ab initio*-Modell für einen symmetrischen Oligomer unter Annahme einer polydispersen Probe, bestehend aus dem gewählten Oligomer (hier Dimer mit P2-Symmetrie) und dem entsprechenden Monomer, erzeugt. Als Dimeranteil, wurde der experimentell mittels SAXS ermittelte

Dimeranteil von 42 % angenommen. Ausgehend von der $P(r)$ -Funktion der Holoproteinprobe wurden 20 unabhängige GASBORMX-Modelle erzeugt, welche im Anschluss mittels DAMAVER gemittelt und gefiltert wurden.

Die Modellierung der dimeren Struktur des ternären *TeLPOR*/NADPH/Pchlid-Komplexes erfolgte über Homo-Multimer Protein-Protein *docking* unter Verwendung des ClusPro-Webservers (<https://cluspro.org>) [175-179]. Dabei wurde sowohl das *TeLPOR*-Monomermodell, welchem die 31 AS am C-Terminus fehlen, als auch das *TeLPOR*-Monomermodell, mit den ergänzten 31 AS (*TeLPOR*-C_{helix}-Monomermodell) für das ClusPro-*docking*, verwendet. Insgesamt wurden 78 *TeLPOR*-Dimermodelle ohne und 81 mit C-terminaler Erweiterung generiert. Die Modellvalidität wurde anhand des Vergleichs der theoretischen Streukurve der entsprechenden Monomer/Dimer-Mischung (erhalten durch OLIGOMER [180]) mit den entsprechenden SAXS-Daten des Holoproteins bewertet. Das Programm OLIGOMER passt hierbei die experimentellen Streukurven aus einem Mehrkomponentengemisch (hier Monomer und Dimer) an. OLIGOMER benötigt eine Reihe von Formfaktoren für jede in der Mischung enthaltene Komponente. Diese Formfaktor-Dateien des Monomer- und Dimer-Modells wurden unter Verwendung von FFMAKER erzeugt. Zusätzlich zu einem χ -Wert für die Anpassung an die experimentellen Daten liefert OLIGOMER eine Schätzung des Streumasseradius und der berechneten Monomer- und Dimerfraktion. In Abbildung 51 und Tabelle 29 ist die Modellbewertung zusammengefasst. In allen Fällen liefern die Dimermodelle mit dem C-terminal verlängerten Monomermodell als Rechengrundlage besser passende Modelle in Bezug auf den χ -Wert und den Streumasseradius (R_g). Die entsprechende Analyse für die Dimermodelle, welche unter Verwendung der *TeLPOR*-Hauptdomäne erzeugt wurden, ist im Anhang (Abbildung 75) dargestellt. Das beste Modell wurde hinsichtlich des χ -Werts und eines aus der Literatur abgeleiteten Abstandskriteriums ausgewählt. Hier wurde für die LPORA aus *Arabidopsis thaliana* (*AtLPORA*) durch Vernetzungsstudien mit Bis(sulfosuccinimidyl)suberat-Vernetzer (BS3-Vernetzer), welcher Lysinreste über die NZ-Atome kovalent verknüpft, gezeigt, dass die Lysinreste 281 und 284 in zwei Untereinheiten der *AtLPORA* (entsprechen K194 und K197 der *TeLPOR*) bei Bildung des ternären *AtLPORA*/NADPH/Pchlid-Komplexes vernetzt werden, während dies beim Apoprotein nicht der Fall war [48]. Von Merkley *et al.* [181] wurde ein maximaler Abstand von 26-30 Å zwischen den CA-Atomen von zwei Lysinen als notwendig für eine erfolgreiche Vernetzung durch BS3 beschrieben. Unter Berücksichtigung dieses Abstandskriteriums wurde für das beste *TeLPOR*-Holoprotein-Dimermodell das Modell ausgesucht, welches den niedrigsten Abstand zwischen K197-CA und K197-CA' und den besten χ -Wert aufweist (Tabelle 29). So konnte das Modell 4d mit einem χ -Wert von 1,64 und einem Abstand von 36,8 Å als das beste Modell identifiziert und als repräsentatives *TeLPOR*-Holoprotein-Dimermodell definiert werden. Dieses wurde anschließend in das GASBORMX generierte Dimer *ab initio*-Modell, welches basierend auf den SAXS-Daten der Holoproteinprobe erzeugt wurde, eingepasst (Abbildung 52 C).

Die Streumasseradien von *TeLPOR*-Apo- und -Holoprotein unterscheiden sich deutlich. So liegt der Streumasseradius des monomeren *TeLPOR*-Apoproteins bei 23,0 Å (Guinier) bzw. 22,9 Å (CRYSOL) und für das dimere *TeLPOR*-Holoprotein bei 31,6 Å (Guinier) bzw. 32,8 Å (CRYSOL).

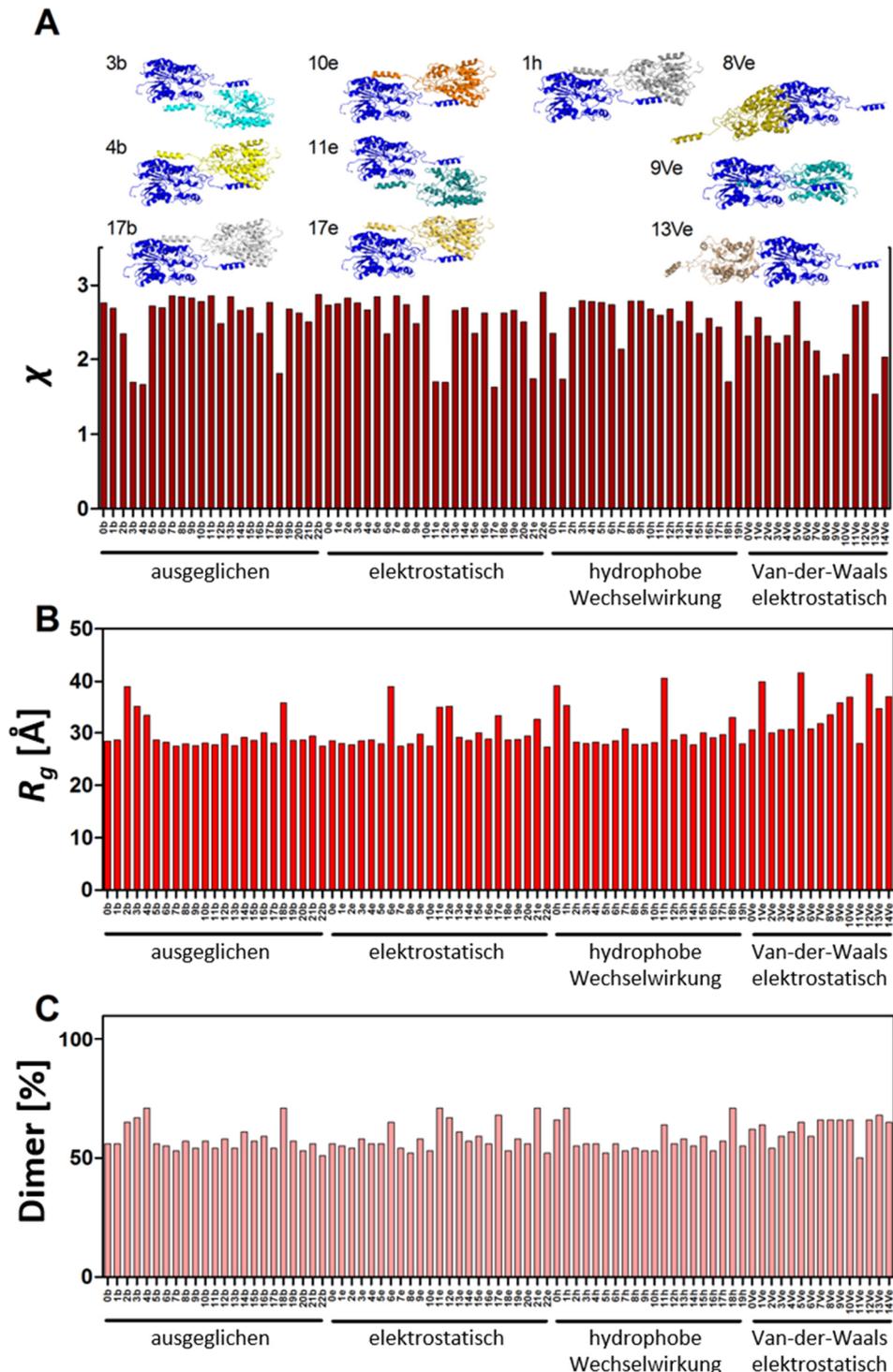
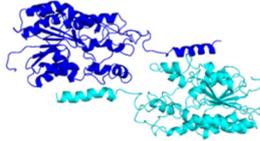
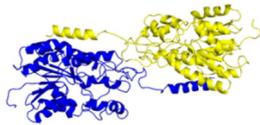
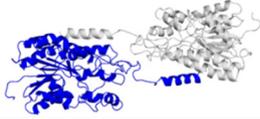
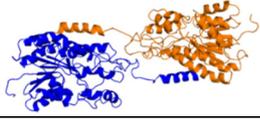
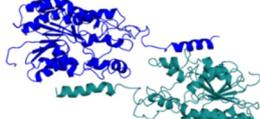
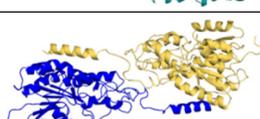
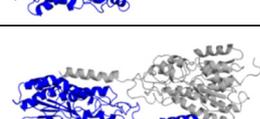
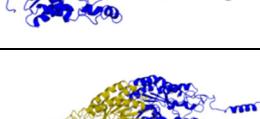
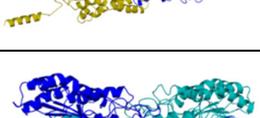
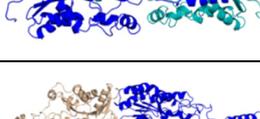


Abbildung 51: *TeLPOR*-Holoprotein-Dimermodellierung. Bewertung der *TeLPOR*-Holoprotein-Modelle anhand des χ -Werts (A), des Streumasseradius (B) und des Dimeranteils (C). Die *TeLPOR*-Holoprotein Dimermodelle wurden über Homo-Multimer Protein-Protein *docking* unter Verwendung des ClusPro-Webservices generiert. Hierbei wurde als Monomermodell das C-terminal verlängerte *TeLPOR*-C_{helix}-Modell verwendet. Alle Modelle wurden mit der experimentellen Streukurve des Holoproteins (5,0 mg/ml Datensatz) unter Verwendung des Programms OLIGOMER verglichen. Die benötigten Formfaktor-Dateien wurden unter Verwendung von FFMAKER aus der jeweiligen PDB-Datei erzeugt. *R_g*: Streumasseradius.

Tabelle 29: TeLPOR-Holoprotein-Dimermodellierung – beste ClusPro-Modelle. Die TeLPOR-Holoprotein-Dimermodelle wurden über Homo-Multimer Protein-Protein *docking*, unter Verwendung des ClusPro-Webservers, generiert. Hierbei wurde als Monomermodell das C-terminal verlängerte TeLPOR-C_{helix}-Modell verwendet. Alle Modelle wurden mit der experimentellen Streukurve des Holoproteins (5,0 mg/ml Datensatz) unter Verwendung des Programms OLIGOMER verglichen. Die benötigten Formfaktor-Dateien wurden unter Verwendung von FFMAKER aus der jeweiligen PDB-Datei erzeugt. Die erzeugten Modelle variieren in Bezug auf die bevorzugte Wechselwirkung (ausgeglichen, elektrostatisch, hydrophob oder eine Kombination aus Van-der-Waals- und elektrostatischen Wechselwirkungen [175]). R_g : Streumasseradius.

Bevorzugte Wechselwirkung	Modell	Repräsentatives Bild	χ	R_g [nm]	Monomer [%]	Dimer [%]	Abstand [Å] K197-NZ ... K197-NZ' (K197-CA ... K197-CA')
ausgeglichen	3b		1,69	35,05	33	67	47,2 (53,6)
ausgeglichen	4b		1,64	33,30	29	71	26,5 (36,8)
ausgeglichen	18b		1,81	35,70	29	71	34,5 (44,5)
elektrostatisch	11e		1,70	34,91	29	71	32,1 (49,8)
elektrostatisch	12e		1,69	35,05	33	67	47,2 (62,8)
elektrostatisch	17e		1,63	33,26	32	68	26,8 (43,3)
Hydrophobe Wechselwirkung	1h		1,73	35,19	29	71	32,9 (50,5)
Van-der-Waals und elektrostatisch	8Ve		1,78	33,42	34	66	74,4 (59,2)
Van-der-Waals und elektrostatisch	9Ve		1,80	35,74	34	66	46,0 (58,7)
Van-der-Waals und elektrostatisch	13Ve		1,54	34,62	32	68	79,8 (64,0)

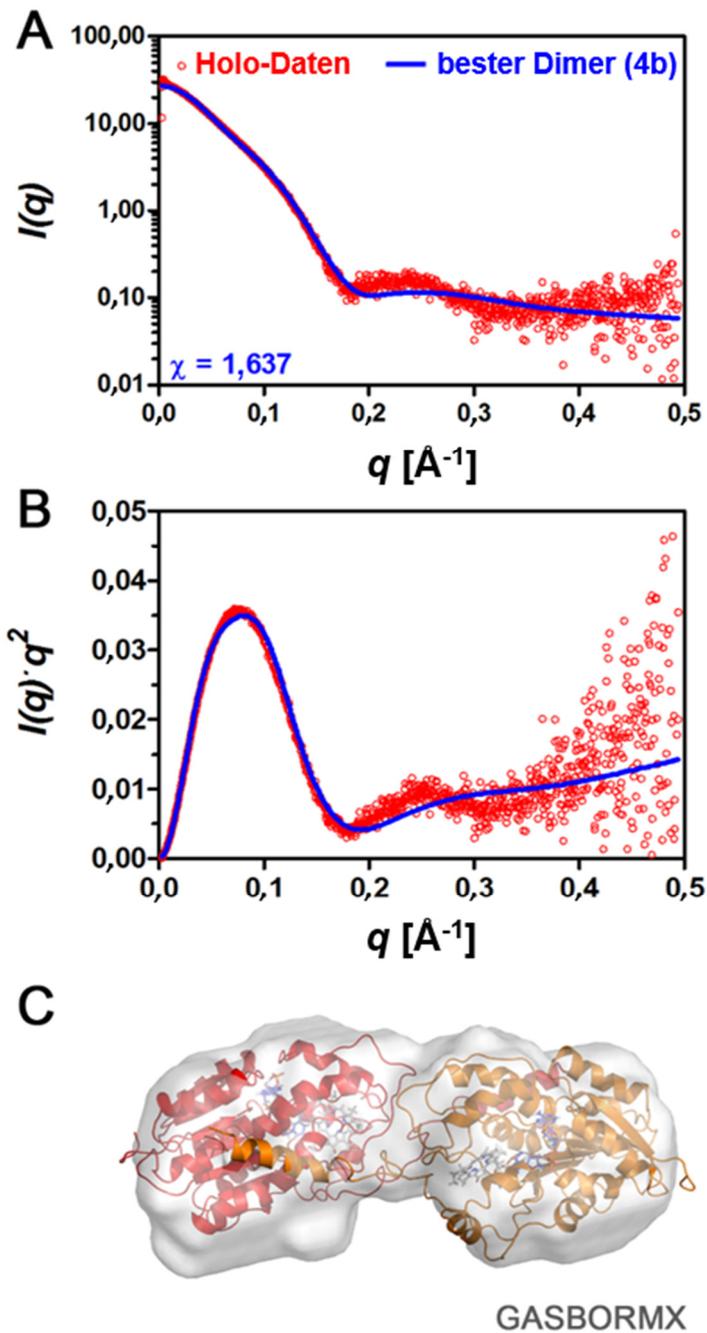


Abbildung 52: Small-angle X-ray scattering (SAXS)-Analyse des TeLPOR-Holo proteins. (A) Die experimentellen Daten des Holo proteins (rote Kreise) zusammen mit der theoretischen Streukurve eines Monomer/Dimer-Gemischs (blaue Linie), welche aus dem Homologiemodell der am C-Terminus um 31 Aminosäuren verlängerten TeLPOR resultiert. (B) zeigt den dazugehörigen Kratky-Plot und (C) das gemittelte und gefilterte *ab initio*-Modell des dimeren Holo proteins mit überlagertem Homologiemodell des dimeren Holo protein-Komplexes. Die beiden Untereinheiten sind in rot und orange dargestellt.

Mittels SAXS-Analyse konnte für das *Te*LPOR-Apoprotein eine Struktur, bestehend aus einer großen und einer kleinen Unterdomäne, nachgewiesen werden. Durch C-terminale Komplettierung der in bisher vorliegenden Homologiemodellen fehlenden Sequenzbereiche konnte ein Homologiemodell erzeugt werden, welches mit einem χ -Wert von 1,332 sehr gut zu den experimentellen SAXS-Daten passt. Ebenso lässt sich dieses Homologiemodell sehr gut in die *ab initio*-Modelle des Apoproteins einpassen. Die hier dargestellten SAXS-Analysen liefern erstmals einen strukturellen, dreidimensionalen, wenn auch niedrig „aufgelösten“ Einblick in die strukturelle Organisation von LPORs. Durch die Bildung des ternären *Te*LPOR/NADPH/Pchlid-Komplexes kommt es zu einer Dimerisierung. Mittels SAXS und AUZ konnte eindeutig eine Dimerisierung als Folge der Beladung des Apoproteins mit NADPH und Pchlid nachgewiesen werden, wobei bei einer Konzentration von 5 mg/ml ein Dimeranteil von 42 % mittels SAXS nachgewiesen wurde. Die Modellierung des Holoпротеins zeigte, unter Verwendung des Apoprotein-Homologiemodells mit C-terminaler Verlängerung, für die experimentellen Daten die besten Ergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals ein strukturelles Verständnis der Konsequenzen der Bildung des ternären Komplexes von LPORs erlangt werden.

3.3.2.2 AAPB und prototypische cyanobakterielle LPORs besitzen eine konservierte Struktur

Um zu überprüfen, ob die hier neu identifizierten AAPB LPORs global eine zur *Te*LPOR konservierte Struktur besitzen, wurden SAXS-Analysen des *Ds*LPOR- und *E*LPOR-Apoproteins durchgeführt und mit den SAXS-Daten der *Te*LPOR verglichen. Alle drei Proteine besaßen für die Reinigung mittels IMAC (Kapitel 2.15.2) einen N-terminalen His₆-tag. Um den Einfluss dieses tags zu untersuchen, wurde außerdem die *E*LPOR mit einem C-terminalen His₆-tag versehen und ebenfalls mittels SAXS vermessen. Wie zuvor wurden alle Proteine zunächst heterolog in *E. coli* produziert und das jeweilige Protein mittels IMAC (Kapitel 2.15.2) und Größenausschlusschromatographie (Kapitel 2.15.4) gereinigt. Die Konzentrierung der Proteinproben erfolgte wie in Kapitel 2.20.1 beschrieben. Anhand der über das Porod-Volumen und der *ab initio*-Modelle ermittelten Molekulargewichte (Tabelle 30), welche mit den über die Aminosäuresequenz ermittelten theoretischen Werten gut zusammen passen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich in allen Fällen um Monomere handelt.

Tabelle 30: Durch SAXS bestimmte Molekulargewichte und Streumasseradien der untersuchten LPORs.

Protein	Molekulargewicht [Da]			Streumasseradius (R_g) [Å]	
	Porod-Volumen	<i>ab initio</i>	theoretisch	Guinier	Crysol
<i>DsLPOR</i>	43.176	39.970	37.265	23,86	21,56
<i>E/LPOR</i>	41.264	36.278	37.847	23,39	21,35
<i>E/LPOR-cHis</i>	37.705	36.288	36.749	22,38	20,85
<i>TeLPOR</i>	38.664	31.082	38.014	22,99	20,71

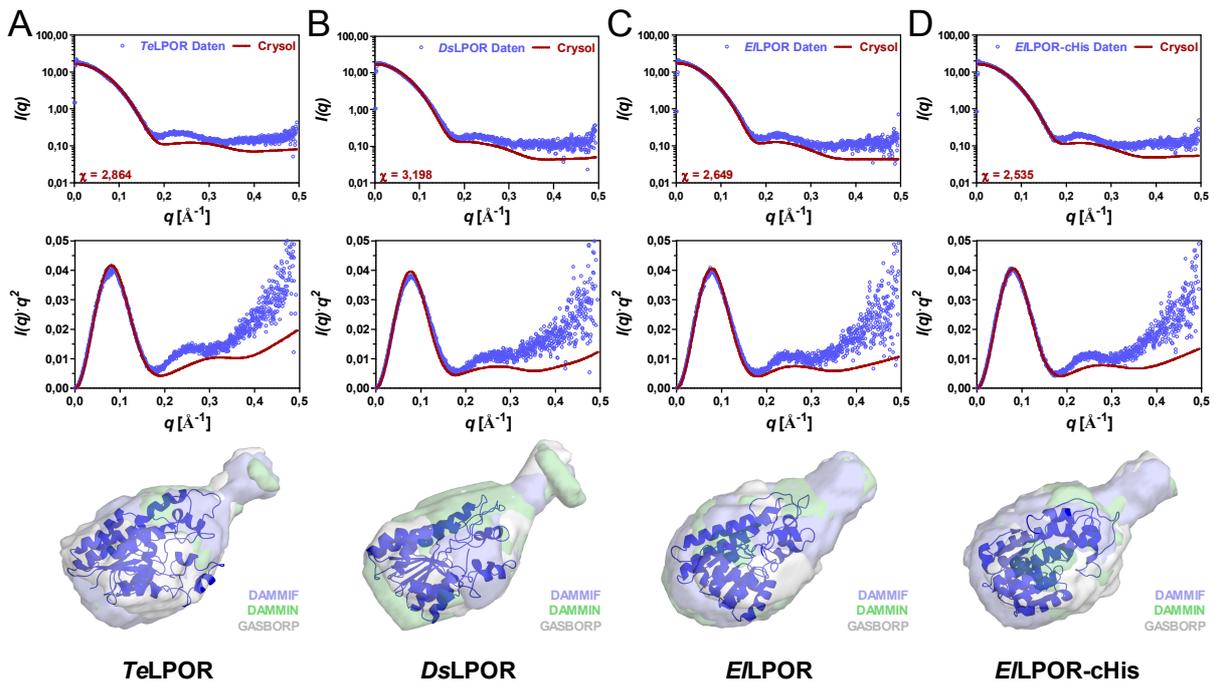


Abbildung 53: Small-angle X-ray scattering (SAXS)-Analyse zweier proteobakterieller und einer cyanobakteriellen LPOR. Die experimentellen Daten (blauen Kreise) sind im obersten Panel zusammen mit der theoretischen Streukurve (rote Linien), welche aus dem jeweiligen Homologiemodell mittels CRYSQL berechnet wurde, dargestellt. Im mittleren Panel sind die dazugehörigen Kratky-Plots und im unteren Panel die jeweiligen *ab initio*-Modelle, berechnet mittels DAMMIF (blau), DAMMIN (grün) und GASBOR (grau), überlagert mit einem Homologiemodell der jeweiligen LPOR, gezeigt.

Die experimentellen SAXS-Daten, sowie die aus der $P(r)$ -Funktion errechneten DAMMIF, DAMMIN und GASBOR *ab initio*-Modelle, sind in Abbildung 53 dargestellt. Im oberen Panel sind die experimentellen Daten (schwarze Kreise) zusammen mit der theoretischen Streukurve (rote Linien, berechnet mittels des Programms CRYSQL des ATSA- Pakets [114]) für die cyanobakterielle *TeLPOR* (A), sowie für die AAPB LPORs *DsLPOR* (B), *E/LPOR* (C) und die *E/LPOR* mit C-terminalem His₆-tag (D), gezeigt. Die aus den Homologiemodellen berechneten Streukurven passen mit den χ -Werten zwischen 2,5 (*E/LPOR*-cHis) und 3,1 (*DsLPOR*) gut zu den experimentellen Daten. Dabei gilt: je kleiner der χ -Wert, desto besser beschreibt der Fit die experimentellen Daten. Hierbei ist zu beachten, dass für alle CRYSQL-Analysen ein Homologiemodell der jeweiligen Rossmannfaltungsmotiv-Hauptdomäne verwendet wurde und

nicht, wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben, die entsprechenden C-terminal verlängerten Modelle. Im mittleren Panel sind die zugehörigen Kratky-Plots und im unteren die jeweiligen *ab initio*-Modelle gezeigt. Die Modelle zeigen für alle Proteine eine Kegelform, welche auf eine kleine und eine große Unterdomäne schließen lässt. Anhand der SAXS-Daten und den daraus resultierenden *ab initio*-Modellen der *ELPOR* mit C-terminalem *His₆-tag*, welche nahezu identisch zu den Modellen des *ELPOR*-Proteins mit N-terminalem *His₆-tag* sind, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei der kleinen Unterdomäne um ein Artefakt des N-terminalen *His₆-tags* handelt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der kleinen Unterdomäne um ein reales strukturelles Merkmal der LPOR handelt. Die in die Modelle integrierten Homologiemodelle zeigen keine Struktur für die kleine Unterdomäne, jedoch ist zu bedenken, dass für die Erstellung der Homologiemodelle das publizierte Homologiemodell der LPOR aus *Synechocystis* [58] verwendet wurde, welches ca. 30 Aminosäuren am C-terminus nicht abdeckt. Detaillierte Modellierungen zur Struktur dieser Verlängerung wurden in Kapitel 3.3.2.1 vorgestellt. Basierend auf diesen Daten ist also in allen Fällen davon auszugehen, dass die C-terminale Verlängerung eine α -helikale Struktur, wie für die *TeLPOR* (Kapitel 3.3.2.1) postuliert, annimmt. Des Weiteren zeigt sich für alle untersuchten Proteine eine nahezu gleiche Form. Damit ist davon auszugehen, dass AAPB LPORs und cyanobakterielle LPORs wie die *TeLPOR* eine konservierte Struktur besitzen.

Mittels SAXS konnte nachgewiesen werden, dass die cyanobakterielle *TeLPOR* und die beiden AAPB LPORs (*ELPOR* und *DsLPOR*) konservierte globale Strukturen besitzen. Alle weisen in Apoforn als Monomer eine Kegelform auf (siehe auch Kapitel 3.3.2.1), welche sich aus einer kleinen und einer großen Unterdomäne zusammensetzt, wobei die größere Unterdomäne sehr wahrscheinlich durch die LPOR-Hauptdomäne (mit Rossmann-Faltungsmuster) konstituiert wird. Der Einfluss des *His₆-tags* auf die Form konnte für die *ELPOR*, welche sowohl N- als auch C-terminal *getagt* untersucht wurde, ausgeschlossen werden, da beide Varianten die gleiche Form aufwiesen. So kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der kleinen Unterdomäne um ein reales strukturelles Merkmal der LPOR handelt, welche bereits in Kapitel 3.3.2.1 diskutiert wurde.

3.3.3 *TeLPOR*-Apoprotein, der ternäre Holoprotein-Komplex und das photoaktivierte Holoprotein besitzen eine unterschiedliche Dynamik

Das Zusammenspiel von Proteinstruktur und Proteindynamik ist entscheidend für die Funktion von biologischen Makromolekülen. Um eine effiziente Katalyse zu ermöglichen ist ein Gleichgewicht zwischen Stabilität und Flexibilität notwendig. Dabei können verschiedenste Bewegungen auf unterschiedlichen Zeitskalen (z. B. ps bis s) einen indirekten oder direkten Effekt auf die Katalyse

haben, darunter z. B. lokale Bewegungen, welche die Substrat- oder Kofaktorbindung [64] durch Bewegungen im aktiven Zentrum [65] oder in der Kofaktor-Bindetasche [66] beeinflussen. In vielen Studien, in denen das Zusammenspiel von Proteindynamik und Proteinstruktur untersucht wurde, wurden Dehydrogenase-Enzyme, wie die Dihydrofolatreduktase (DHFR) [67-70], und andere Enzyme, welche einen Hydrid- und Protonentransfer katalysieren, untersucht. Innerhalb dieser Enzymklasse stellen die LPORs ein interessantes Modellsystem dar, da der ternäre LPOR/Kofaktor/Substrat-Komplex im Dunkeln hergestellt und die Katalyse durch einen kurzen Lichtimpuls initiiert werden kann [18, 41, 43]. Dieser Vorteil erlaubt einen detaillierten Einblick in die frühen bzw. schnellen, durch das Licht induzierten Schritte des Substratumsatzes [50, 54, 55, 71] und lieferte kürzlich das erste Beispiel für einen schrittweise Hydridtransfer in einem biologischen System [46] (Kapitel 1.3.2.2 und 3.1.5). Für die *Te*LPOR wurde von Sytina *et al.* gezeigt, dass eine Photoaktivierung, d.h. eine kurze Vorbelichtung mit Licht ohne signifikanten Substratumsatz, die Katalyse-Effizienz steigert [50]. Mechanistisch wurde hierbei ein Zwei-Photonen-Prozess vorgeschlagen, wobei das erste Photon das Enzym „anschaltet“ (Photoaktivierung) und das zweite Photon die Katalyse induziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine kurze Belichtung des Enzymsubstratkomplexes zu einer Konformationsänderung in der Sekundärstruktur des Enzyms führt [50]. Die Art dieser Konformationsänderung und die Konformationsübergänge aufgrund der Kofaktor- und Substratbindung sind weitgehend unbekannt, was u. a. auf eine fehlende Kristallstruktur zurückzuführen ist. Aufgrund des ähnlichen katalytischen Mechanismus von DHFRs und LPORs ist es denkbar, dass auch in LPORs die Proteindynamik eine wichtige Rolle sowohl bei der Bildung des Enzym/Kofaktor/Substrat-Komplexes als auch bei der Katalyse spielt. Neben kernspinresonanzspektroskopischen (*nuclear magnet resonance*, NMR) Techniken [182-184] ist insbesondere die inkohärente quasielastische Neutronenspektroskopie (*quasielastic incoherent neutron spectroscopy*, QENS) ein hervorragend geeignetes Verfahren um die lokale Dynamik biologischer Makromoleküle auf Pikosekunden- bis Nanosekunden-Zeitskalen im Å-Längenbereich zu untersuchen [185]. QENS ist aufgrund des großen inkohärenten Streuquerschnitts von ^1H im Vergleich zu allen anderen chemischen Elementen, die in biologischen Makromolekülen einschließlich ^2H vorkommen, überwiegend empfindlich gegenüber Protonenbewegungen. Dabei ermöglicht QENS die Untersuchung der globalen internen Dynamik eines Proteins, da Wasserstoffatome homogen in Proteinen verteilt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Proteindynamik des *Te*LPOR-Apoproteins, des ternären *Te*LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplexes und des oben erwähnten photoaktivierten Holoprotein-Komplexes mittels QENS untersucht.

Die Herstellung der *TeLPOR*-Apo- und -Holoproteinprobe erfolgte wie in Kapitel 2.22 beschrieben. Zur Überprüfung der *TeLPOR*-Holoproteinprobe auf lichtabhängige Aktivität wurde ein Belichtungsexperiment durchgeführt. Hierfür wurden 2 μ l der rehydrierten Holoproteinprobe in Lagerpuffer (Kapitel 2.15.2) gelöst und mit 70 mM DTT und 0,03 % (v/v) Triton X-100 versetzt. An einem Spektralphotometer (Cary 60, Agilent Technologies, Ratingen, Deutschland) wurde zunächst ein Absorptionsspektrum von 400 nm bis 720 nm gemessen. Im Anschluss wurde die rekonstruierte Probe für sechs Sekunden mit Blaulicht belichtet und erneut ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Abbildung 54 A). Während die Absorption bei ca. 630 nm (Pchlid Q_y -Bande) bei Belichtung abnimmt, kommt es gleichzeitig zur Ausbildung eines neuen Maximums bei etwa 675 nm, was der Q_y -Bande des Chlid-Produkts entspricht. Somit konnte also eindeutig eine lichtabhängige Aktivität der mit NADPH und Pchlid rekonstruierten *TeLPOR*-QENS-Probe nachgewiesen werden. Außerdem wurde ein Experiment von Sytina *et al.* [50] reproduziert, wodurch getestet werden sollte, ob eine minimale Vorbelichtung, welche zu keinem signifikanten Pchlid-Umsatz führt, in einer höheren LPOR-Aktivität im Vergleich zu einer Probe ohne Vorbelichtung resultiert. Dabei wurden die Proben äquivalent zu Sytina *et al.* [50] mit einer 40 W Glühbirne in einem Abstand von 50 cm für 30 s vorbelichtet. Aus dieser Vorbelichtung ergab sich eine geringe Menge des Reaktionsprodukts Chlid (Abbildung 55, blaue Linie). In Abbildung 54 B ist die Chlid-Bildung in Abhängigkeit von der Belichtungszeit mit (rote Linie) und ohne (schwarze Linie) vorheriger Belichtung gezeigt. Dabei ist deutlich zu sehen, dass aus der vorherigen Belichtung ein schnellerer Anstieg der Absorption bei 672 nm resultiert. Aus den beiden Geraden ergeben sich spezifische Aktivitäten von $0,87 \pm 0,04$ U/mg (vorbelichtete Probe) und $0,78 \pm 0,01$ U/mg (Probe ohne vorherige Belichtung), was einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von 11 % durch eine vorherige Belichtung entspricht. Desweiteren wurden der Zerfall dieses photoaktivierten Zustandes sowie die Stabilität des Apo- und Holoproteins bei 25 °C über einen längeren Zeitraum untersucht, um eine Stabilität der Probe während der QENS-Messung sicherzustellen. In Abbildung 54 C sind diese Messungen dargestellt. Für die Messung des Zerfalls des photoaktivierten Zustandes wurde ein Assay wie in Kapitel 2.17 beschrieben angesetzt und wie zuvor beschrieben vorbelichtet. Nach der Vorbelichtung wurde die Probe aliquotiert und für unterschiedlich lange Zeiträume bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Um Verdunstungseffekte zu minimieren, wurden die Küvetten zuvor möglichst luftdicht verschlossen. Nach definierten Zeitintervallen wurden Aktivitätsmessungen (Kapitel 2.17) der Aliquots bei 6-sekündigen Blaulicht-Belichtungsintervallen durchgeführt. Wie in Abbildung 54 C (unteres Bild, blaue Punkte) zu sehen, nimmt die Chlorophyllid-Produktion mit Zunahme der Lagerungszeit ab. Über eine einfach-exponentielle Funktion konnte die Lebenszeit des photoaktivierten Zustandes auf $\tau_{akt} \approx 159$ Stunden abgeschätzt werden. Als einen Beweis der *TeLPOR*-Stabilität über die Dauer der QENS-Messung und als Beweis, dass die Abnahme des photoaktivierten Zustandes kein *TeLPOR*-Aktivitätsverlust-Effekt ist, wurde die Temperaturstabilität mittels Differential-

Scanning-Fluorimetrie (T_{stab} , Kapitel 2.18) bei 25 °C gemessen (Abbildung 54 C, oberes Bild). Sowohl das *TeLPOR*-Apo- als auch das Holoprotein zeigen keine Entfaltung und sind damit über ein Messintervall von 30 Stunden als stabil anzusehen. Des Weiteren wurden über einen Zeitraum von 60 Stunden Aktivitätsmessungen ohne vorherige Belichtung durchgeführt, um die Stabilität bzw. den Aktivitätsverlust der *TeLPOR* in Assay-Lösung zu untersuchen (Abbildung 54 C unteres Bild, rote Punkte). Während der ersten 30 Stunden ist kein signifikanter Abfall der *TeLPOR*-Aktivität zu verzeichnen, wohingegen nach dieser Zeit ein Aktivitätsverlust von ca. 10 % bis 15 % eintritt. Mittels dieser Untersuchungen konnte einerseits gezeigt werden, dass die Vorbelichtung des *TeLPOR*-Holo Proteins zu einem photoaktivierten Zustand führt, dessen Population im Dunkeln über die Zeit abnimmt. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das Apo- als auch das Holo Protein über einen Zeitraum von 30 Stunden stabil ist und so eine QENS-Messung, welche 12 bis 24 Stunden je Probe dauert, möglich ist.

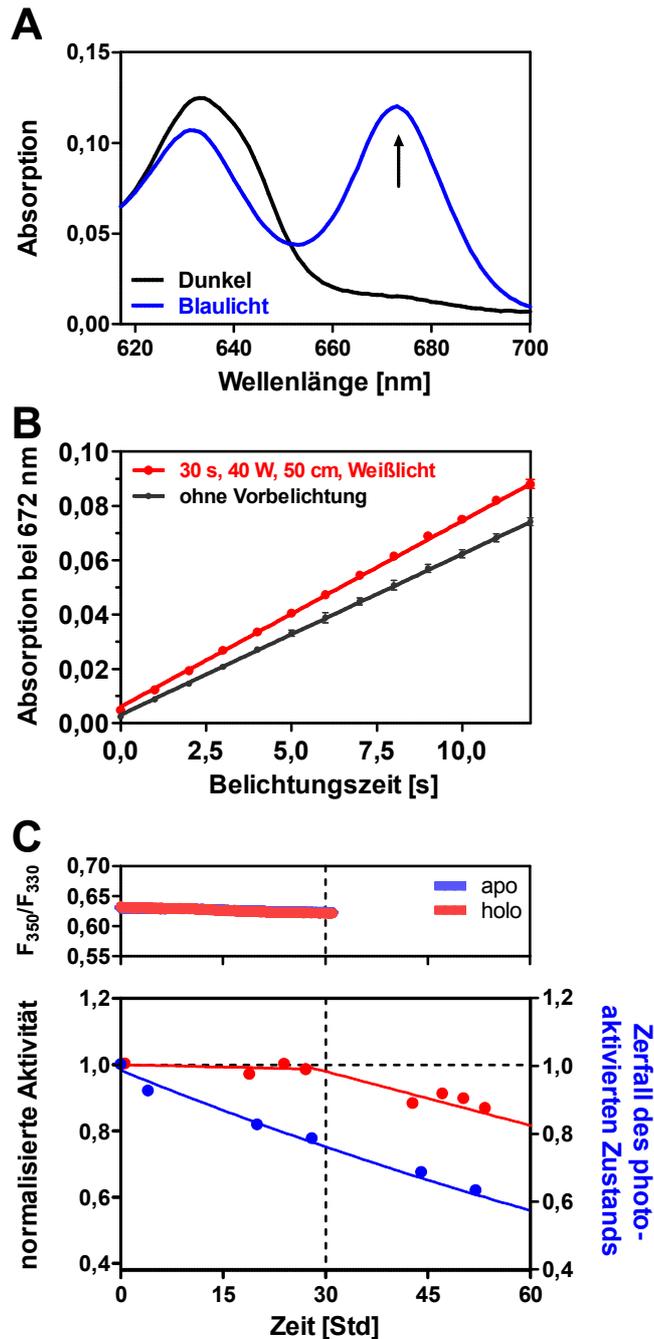


Abbildung 54: Messungen zur TeLPOR-Aktivität, -Photoaktivierung und -Stabilität. (A) Lichtabhängige Aktivität der TeLPOR-Holoproteinprobe für die QENS-Messung. Hierfür wurden 2 μ l der rehydrierten TeLPOR-Holoproteinprobe in Assaypuffer (Kapitel 2.17) gelöst und eine Aktivitätsmessung durchgeführt (Kapitel 2.17). Gezeigt ist das Absorptionsspektrum ohne vorherige Belichtung (schwarz) und nach 6-sekündiger Belichtung mit Blaulicht (blau). Der Pfeil zeigt die Bildung von Chlorophyllid. (B) Messung zur Photoaktivierung. Die Aktivitätsmessung erfolgte wie in Kapitel 2.17 beschrieben, jedoch unter 1-sekündiger Belichtung. Nach der Herstellung des Mastermixes wurde dieser geteilt. Die eine Hälfte wurde, wie von Sytina *et al.* [50] beschrieben, für 30 Sekunden aus einem Abstand von 50 cm, unter Verwendung einer 40 W Glühbirne, belichtet. Im Anschluss daran wurden Aktivitätsmessungen für die vorbelichteten (rote Linie) und nicht belichteten (schwarze Linie) Proben durchgeführt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung einer unabhängigen Dreifachbestimmung. (C) TeLPOR-Stabilität und Zerfall des photoaktivierten Zustandes. Die Temperaturstabilität des TeLPOR-Apo- und -Holoproteins wurde für rund 30 Stunden bei 25 °C an dem Prometheus NT.Plex der Firma NanoTemper (München, Deutschland) untersucht (oberes Bild) (Kapitel 2.18). Des Weiteren wurde die Langzeitstabilität (60 Stunden) der TeLPOR im Assay (Kapitel 2.17) bei Raumtemperatur untersucht. Hierfür wurde der Assay angesetzt und aliquotiert. Zur Vermeidung von Verdunstungseffekten wurden die Küvetten möglichst luftdicht verschlossen und im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert. Die lichtabhängige Aktivität wurde nach definierten Zeitintervallen bestimmt (rote Punkte). Zur Bestimmung des Zerfalls des photoaktivierten Zustandes wurde diese Messung wiederholt. Dabei wurde der Assay vor dem Aliquotieren wie zuvor beschrieben vorbelichtet (blaue Punkte). Die blaue Linie zeigt eine einfach-exponentielle Funktion. Beide Messungen wurden normalisiert auf die Aktivität zum Zeitpunkt $t = 0$ dargestellt.

Nachdem die Stabilität und Funktionalität des *TeLPOR*-Apo- und -Holoproteins nachgewiesen wurde, mussten nun die Vorbelichtungsbedingungen zur Photoaktivierung in Flüssig-Proben [50] an die partiell hydrierten Proben der QENS-Messung, welche eine hohe Viskosität und optische Dichte aufweisen, angepasst werden. Hierfür wurden 2 μl der rehydrierten Holoproteinprobe (Kapitel 2.22) bei variabler Belichtungszeit aus einem Abstand von 50 cm mit einer 40 W Glühbirne vorbelichtet und dann in Assaypuffer unter Zusatz von 70 mM DTT, 0,03 % Triton X-100 und 160 μM NADPH (Kapitel 2.17) gelöst. Wie in Abbildung 55 zu sehen, erhält man für die rehydrierte QENS-Probe bei einer Belichtungszeit von 5 Minuten eine zur 30-sekündigen Belichtung in flüssiger Form vergleichbare Menge Chlorophyllid.

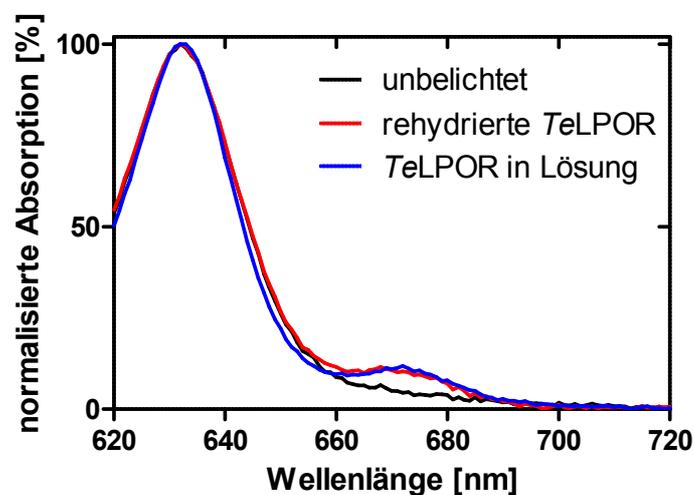


Abbildung 55: Anpassung der Belichtungszeit zur Photoaktivierung der rehydrierten *TeLPOR*-Holoproteinprobe. 2 μl der rehydrierten Holoproteinprobe (Kapitel 2.22) wurden äquivalent zu *Sytina et al.* [50] (50 cm, 40 W) bei variabler Belichtungszeit vorbelichtet und in einem Assay (Kapitel 2.17) gelöst. Dargestellt sind hier zum einen ein Absorptionsspektrum der rehydrierten Probe ohne vorherige Belichtung (schwarz), nach 5-minütiger Vorbelichtung (rot) und als Referenz das Absorptionsspektrum der *TeLPOR* als Flüssig-Probe nach 30-sekündiger Vorbelichtung.

Nachdem die Stabilität und Funktionalität des *TeLPOR*-Apo- und -Holoproteins gezeigt und die Belichtungsbedingungen für die Photoaktivierung des *TeLPOR*-Holoproteins auf die viskose, optisch dichte, QENS-Probe angepasst werden konnten, wurden QENS-Messungen durchgeführt (Kapitel 2.22). Diese wurden von Dr. Andreas Stadler und Dr. Michaela Zamponi am Heinz Maier-Leibnitz Zentrum (MLZ) in Garching vorgenommen. Hierbei wurde die *TeLPOR*-Apoproteinprobe sowie die *TeLPOR*-Holoproteinprobe sowohl dunkel als auch photoaktiviert hinsichtlich ihrer molekularen Dynamik untersucht. Die Messung der Apo- und Holoproteinprobe (dunkel) erfolgte über einen Zeitraum von 24 Stunden. Um einen signifikanten Zerfall des photoaktivierten Zustandes während der Messzeit ausschließen zu können und dennoch genügend Daten für eine ausreichende Statistik zu sammeln, wurde die photoaktivierte Holoproteinprobe lediglich für 12 Stunden vermessen. Unter der Annahme eines einzelnen exponentiellen Zerfalls des photoaktivierten Zustandes, welcher mit einer Lebensdauer von $\tau_{\text{akt}} \approx 159$ Stunden auftritt, sollten sich etwa 93 % der Moleküle nach 12 Stunden

Messzeit immer noch im photoaktivierten Zustand befinden. In Abbildung 56 A ist ein typisches QENS-Spektrum des TeLPOR-Apoproteins beim größten Streuvektor ($q = 1,76 \text{ \AA}^{-1}$) dargestellt. Vereinfacht zusammengefasst werden die experimentellen Daten an eine Funktion, bestehend aus der Summe von zwei Lorentz-Funktionen $L_G(q, \omega)$ und $L_{G+I}(q, \omega)$, angepasst, welche als Parameter die Halbwertsbreiten bei halbmaximaler Höhe Γ_G und Γ_I und als bekannte Größen den Streuvektor q und die Energie der Neutronenstrahlung ($\hbar\omega$; \hbar : Planckkonstante, ω : Frequenz der Strahlung) enthalten. Γ_G und Γ_I können so aus den experimentellen Daten ermittelt werden und geben die Dynamik und Diffusion des Proteins wieder. Die in Abbildung 56 C und D gezeigten, aus den Messdaten ermittelten, Γ_G und Γ_I zeigen die globale Proteindiffusion und die interne, lokale Dynamik der unterschiedlichen Proben. Die effektiven Diffusionskoeffizienten (globale Proteindiffusion, Rotations- und Translationsdiffusion) wurden gemäß $\Gamma_G(q) = D_{\text{eff}} \cdot q^2$ berechnet. Die beobachteten Werte für Γ_G liegen nahe am oder unter der Energieauflösung des Spektrometers, welche bei $0,3 \text{ \mu eV}$ liegt. Jedoch folgen die Werte, wenn gegen q^2 geplottet, dem erwarteten linearen Verlauf, welches auf globale Proteindiffusion hinweist (Abbildung 56 C). Die erhaltenen D_{eff} -Werte sind in Tabelle 31 zusammengefasst. Die Tatsache, dass eine globale Proteindiffusion unter diesen viskosen Bedingungen beobachtet werden kann, zeigt, dass die Proteine ausreichend hydratisiert sind und die interne Proteindynamik aufgrund mangelnden Hydrationswassers nicht unterdrückt wird.

Quantitative Informationen über interne Diffusionsbewegungen können aus dem erhaltenen Γ_I (Abbildung 56 D) extrahiert werden. Γ_I in Abhängigkeit von q^2 zeigt diffusive interne Proteinbewegung, welche mit einer einfachen analytischen Modellfunktion interpretiert werden kann. Die Sprungdiffusionsbewegung wurde gemäß $\Gamma_I = (D_{\text{int}} \cdot q^2) / (1 + D_{\text{int}} \cdot q^2 \cdot \tau)$, mit dem effektiven Diffusionskoeffizienten der internen Dynamik D_{int} und der Verweilzeit τ zwischen den Sprüngen, interpretiert. Die daraus resultierenden Werte für D_{int} und τ sind der Tabelle 31 zu entnehmen. Im kleinen q^2 -Bereich sind diffusive Bewegungen von H-Atomen, welche an Aminosäuren oder an das Proteinrückgrat gebunden sind, sichtbar und Γ_I folgt der Abhängigkeit $\Gamma_I = D_{\text{int}} \cdot q^2$ mit dem durchschnittlichen Diffusionskoeffizienten D_{int} . Bei größeren q^2 -Werten wird die Granularität der Bewegung im Protein sichtbar. Lokale Sprünge von Aminosäuren oder der Rückgratkette zwischen leicht unterschiedlichen strukturellen Orientierungen führen zu einem Plateau, das bei hohen q^2 -Werten zu erkennen ist. Auf molekularer Ebene kann dieses Verhalten so interpretiert werden, dass ein Protein nicht in einer festen Konfiguration existiert, sondern zwischen und innerhalb leicht unterschiedlicher Strukturzustände fluktuiert. Diese Zustände wurden von Frauenfelder *et al.* [186] als konformationelle Unterzustände (englisch: *conformational substrates*) bezeichnet. Diffusionsbewegungen würden dabei den Bewegungen innerhalb eines dieser konformativen Unterzustände entsprechen. Nach einer gewissen Zeit nimmt das Protein somit einen etwas anderen konformationellen Unterzustand an. Die durchschnittliche Zeit in der ein H-Atom in einem

Konformationszustand verweilt, spiegelt sich dabei in der Verweilzeit τ wider, welche das Plateau in der hohen q^2 -Grenze verursacht ($\Gamma_1 = 1/\tau$).

Informationen über die Amplitude der internen Proteindynamik sind in den experimentell bestimmten elastischen inkohärenten Strukturfaktoren (EISF), welche in der Abbildung 56 C als $A_0(q)$ abgekürzt sind, enthalten. Die mittlere quadratische Abweichung (*mean square displacement* (MSD), $\langle x^2 \rangle$), als Maß für die Flexibilität des Systems, wurde aus den EISF nach $\langle x^2 \rangle = (-A \cdot \ln A_0(q)) / q^2$ berechnet [187, 188], wobei A ein Faktor ist um den fehlenden y-Achsenabschnitt der Daten bei null zu berücksichtigen. Die berechneten MSD-Werte sind Tabelle 31 zu entnehmen.

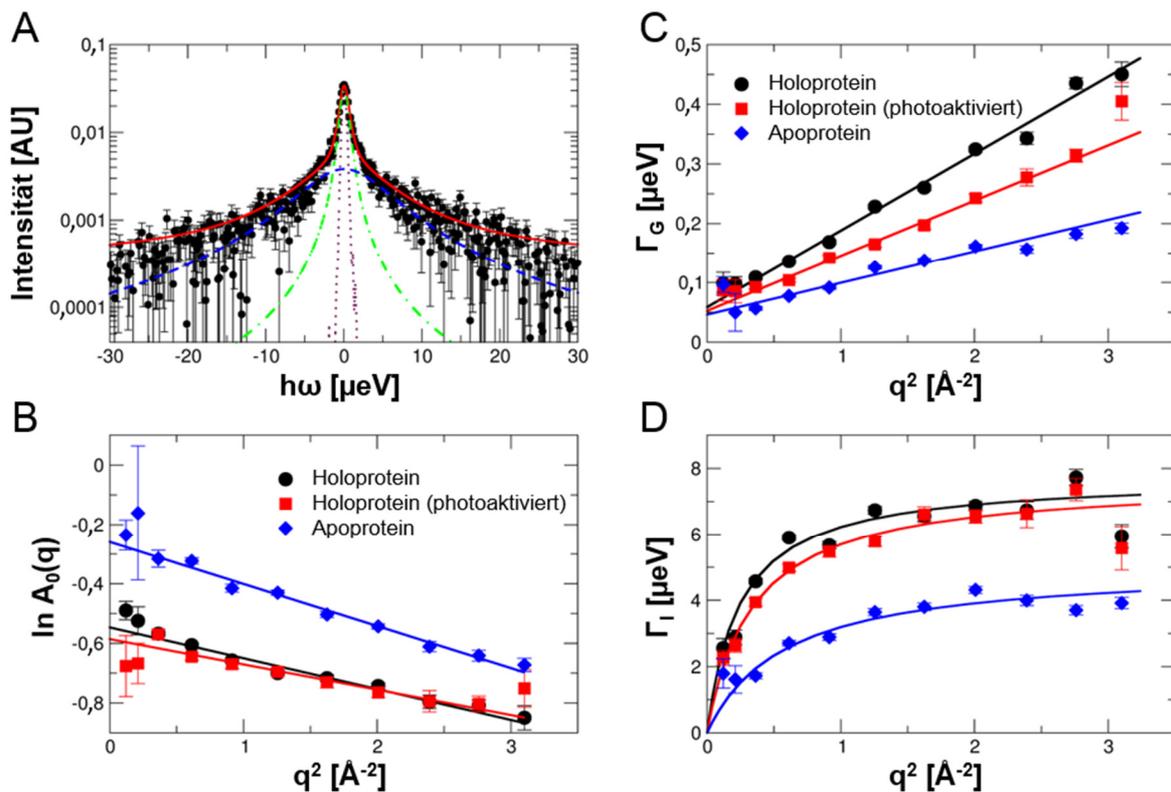


Abbildung 56: TeLPOR-Apo- und -Holoprotein-Daten der QENS-Messung. (A) Gemessenes QENS-Spektrum am Streuvektor von $q = 1,76 \text{ \AA}^{-1}$ des TeLPOR-Apoproteins. Die schwarzen Punkte zeigen die experimentellen Daten. Die rote Linie zeigt die Gesamtanpassung, welche die interne Proteinbewegung (blaue Linie) und die globale Proteindiffusion (grüne Linie) beinhaltet. Die instrumentelle Auflösungsfunktion ist durch die braunen Linien gegeben. (B) Elastischer inkohärenter Strukturfaktor (EISF) des TeLPOR-Apo- und -Holoproteins sowie der photoaktivierten Holoproteinprobe. Die Daten wurden an eine lineare Regression angepasst. (C) Linienbreite der begrenzten Lorentz-Funktion, welche die globale Proteindiffusion beschreibt. Die Daten wurden an eine lineare Regression angepasst, um die globalen Proteindiffusionskoeffizienten zu extrahieren. (D) Linienbreite, welche die interne diffusive Proteindynamik beschreibt. Die Anpassung der Daten erfolgte mittels des im Text beschriebenen Sprungdiffusionsmodells.

Tabelle 31: Mittels QENS ermittelte dynamische Parameter der verschiedenen *TeLPOR*-Proteinproben.

Probe	D_{eff} [$\text{\AA}^2/\text{ns}$]	MSD [\AA^2]	D_{int} [$\text{\AA}^2/\text{ns}$]	τ [ps]
<i>TeLPOR</i>-Apoprotein	$0,081 \pm 0,003$	$0,85 \pm 0,04$	$13,2 \pm 0,8$	$130,7 \pm 3,7$
<i>TeLPOR</i>-Holoprotein (dunkel)	$0,196 \pm 0,003$	$0,62 \pm 0,02$	$48,3 \pm 2,4$	$85,0 \pm 1,3$
<i>TeLPOR</i>-Holoprotein (photoaktiviert)	$0,141 \pm 0,004$	$0,51 \pm 0,02$	$33,9 \pm 2,0$	$86,1 \pm 2,2$

Die experimentellen QENS-Daten zeigen deutliche Unterschiede in der internen Dynamik zwischen dem *TeLPOR*-Apo- und -Holoprotein. Das Apoprotein weist im Vergleich zum Holoprotein eine größere innere Flexibilität auf, dies ist anhand des größeren MSD-Werts zu erkennen. Andererseits ist die beobachtete Diffusionsfähigkeit im Apoprotein reduziert und die Verweildauer zwischen lokalen Sprüngen im Vergleich zum Holoprotein erhöht. Der interne Diffusionskoeffizient (D_{int}), sowie die Verweildauer (τ) sind Indikatoren für energetische Barrieren zwischen leicht unterschiedlichen Konformationszuständen, während die MSD-Werte den zugänglichen Konformationsraum des Proteins widerspiegeln. Die Pchlid- und NADPH-Bindung im Holoprotein scheint somit zu einer steiferen Proteinkonformation zu führen, welche einen eingeschränkteren Konformationsraum im Vergleich zum Apoprotein zeigt. Gleichzeitig sind für das Holoprotein ein schnellerer interner Diffusionskoeffizient und eine kürzere Verweilzeit im Vergleich zum Apoprotein zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung von NADPH und Pchlid die energetischen Barrieren zwischen den konformationellen Unterzuständen nicht signifikant verändert. Stattdessen scheint die Bindung die Amplituden der Bewegungen aufgrund von strukturellen Einschränkungen zu beschränken. Als Folge sind nur lokale Übergänge zwischen Strukturzuständen möglich, welche nicht durch große energetische Barrieren getrennt sind, was effektiv zu einer Erhöhung des internen Diffusionskoeffizienten und einer Verringerung der Verweilzeit führt. Eine ähnliche Beobachtung wurde kürzlich für die innere Dynamik von gefaltetem und ungefaltetem Rinderserumalbumin (BSA) gemacht [189]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bewegungsamplitude im gefalteten BSA im Vergleich zum ungefalteten reduziert ist, dass aber die interne Diffusion im gefalteten BSA signifikant schneller ist.

Werden nun das photoaktivierte Holoprotein mit dem unbelichteten Holoprotein verglichen, so fallen die Unterschiede in der internen Proteindynamik subtiler aus. Die Amplitude der Bewegung im photoaktivierten Holoprotein ist im Vergleich zum unbelichteten reduziert. Gleichzeitig wird der interne Diffusionskoeffizient ebenfalls reduziert, während die Verweildauer mit dem unbelichteten Holoprotein vergleichbar ist. Zusammen mit dem niedrigen MSD-Wert müsste hier ein anderer dynamischer Mechanismus als Erklärung in Betracht gezogen werden. Hierbei könnte die Photoaktivierung den zugänglichen Konformationsraum beschränken und gleichzeitig die interne

Bewegung verlangsamt werden. Die Ergebnisse können daher als steifere Konformation des photoaktivierten Holoproteins im Vergleich zum unbelichteten Holoprotein interpretiert werden. Diese „Versteifung“ könnte hierbei die beobachtete Erhöhung der katalytischen Leistung (lichtabhängiger Pchlid-Umsatz; Abbildung 54 B) bedingen.

Die beobachteten Unterschiede in der Proteindynamik des *TeLPOR*-Apoproteins im Vergleich zum ternären *TeLPOR*/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplex könnten sich in unterschiedlichen Temperaturstabilitäten und einem unterschiedlichen temperaturabhängigen Entfaltungsverhalten äußern. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Temperaturstabilität und der Schmelzpunkt des Apo- und Holoproteins mittels DSF (siehe Kapitel 2.18, 2.18.1, 3.2.4.2 und 3.2.4.3) bestimmt. Apo- und Holoproteinproben wurden wie in Kapitel 2.18 und 2.18.1 beschrieben vorbereitet, wobei darauf geachtet wurde, dass die Methanolkonzentration bei allen Proben gleich war.

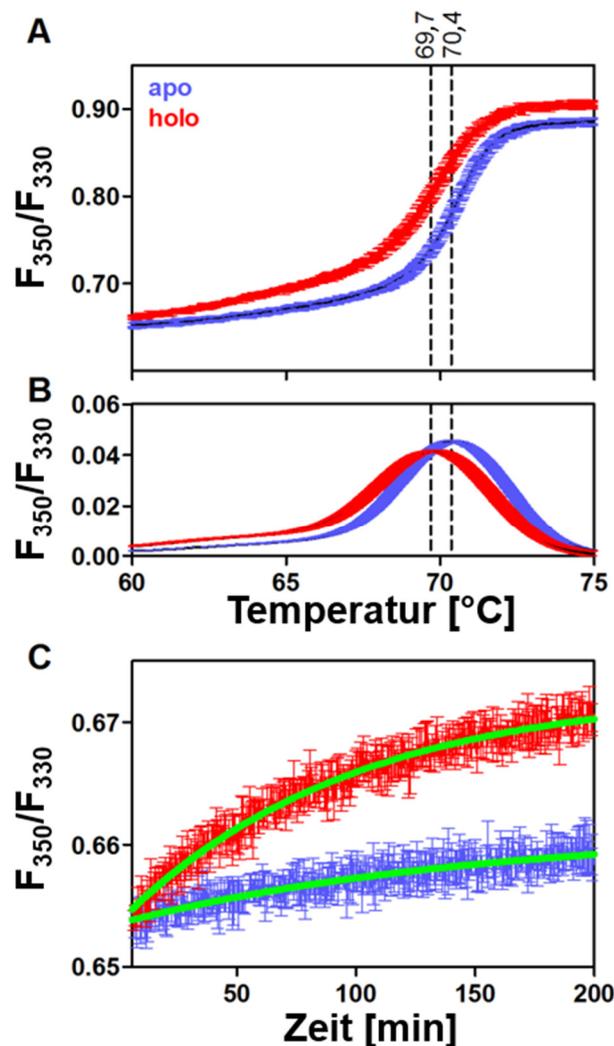


Abbildung 57: Temperaturstabilitätsmessung des *TeLPOR*-Apo- und -Holoproteins im Vergleich. (A) Schmelzkurven des *TeLPOR*-Apo- (blau) und -Holoproteins (rot) und (B) die dazugehörige erste Ableitung. (A-B) Die Linien zeigen die resultierende Schmelztemperatur (Apoprotein: T_m : $70,4 \pm 0,1$ °C, Holoprotein: T_m : $69,7 \pm 0,1$ °C) an. (C) Ebenso wurde die Thermostabilität bei 50 °C für das *TeLPOR*-Apo- (blau) und -Holoprotein (rot) gemessen. Die grünen Linien zeigen eine einfach-exponentielle Anpassung der Daten, woraus sich eine Halbwertszeit von $95,2 \pm 9,1$ min (Apoprotein) und $67,0 \pm 3,4$ min (Holoprotein) ergibt. Die Standardabweichung ergibt sich aus einer (A-B) 3-fach- oder (C) 4-fach-Bestimmung.

In Abbildung 57 sind die Daten dieser Untersuchungen gezeigt. Die Schmelzkurven (Abbildung 57 A) zeigen für das Holoprotein eine um $0,7\text{ °C}$ reduzierte Schmelztemperatur im Vergleich zum Apoprotein ($70,4\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$). Des Weiteren denaturiert das Holoprotein bei 50 °C schneller als das Apoprotein. Die Halbwertszeiten liegen bei $95,2 \pm 9,1$ Minuten für das Apoprotein und bei $67,0 \pm 3,4$ Minuten für das Holoprotein. Die Beobachtung, dass das flexiblere Apoprotein einen etwas höheren Schmelzpunkt sowie eine erhöhte Temperaturstabilität besitzt, erscheint auf den ersten Blick nicht intuitiv erfassbar. Diese anscheinende Diskrepanz kann jedoch wie folgt in Einklang gebracht werden. Die Thermostabilität eines Proteins wird durch die Differenz der freien Energie ΔG zwischen dem ungefalteten und dem gefalteten Zustand bestimmt, wobei ΔG entsprechend der Formel $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, einen enthalpischen (ΔH) sowie einen entropischen ($T\Delta S$) Beitrag besitzt. Wie mittels DSF gezeigt, ist das Apoprotein thermisch stabiler als das Holoprotein. Dies zeigt, dass der enthalpische Beitrag, bedingt durch die Wechselwirkungen des Proteins mit dem gebundenen Substrat Pchlid und dem NADPH-Kofaktor im ternären Holoprotein-Komplex, keine wesentliche Rolle für die thermische Stabilität spielt. Wie mittels QENS-Experimenten nachgewiesen, ist das Apoprotein flexibler als das Holoprotein. Die erhöhte Flexibilität des Apoproteins führt somit zu einer entropischen Stabilisierung im Vergleich zum Holoprotein. Diese Interpretation stimmt mit der mittels QENS beobachteten Veränderung der molekularen Diffusionsfähigkeit des Proteins bei NADPH/Pchlid-Bindung überein. Die Bildung des ternären LPOR/NADPH/Pchlid-Holoprotein-Komplexes verändert die energetischen Barrieren der molekularen Bewegungen im Protein nicht signifikant. Daher findet im Holoprotein keine enthalpische thermische Stabilisierung statt.

Um ein atomistisches Verständnis der Ergebnisse der QENS-Messungen zu erhalten, wurden Molekulardynamik (MD)-Simulationen von Dr. Samira Gholami, Prof. Dr. Marco Garavelli (beide Dipartimento di Chimica Industriale, Università degli Studi di Bologna, Italien) und Dr. Mehdi D. Davari (Lehrstuhl für Biotechnologie, RWTH Aachen) durchgeführt (Abbildung 59). Aufgrund der fehlenden Kristallstruktur von LPOR-Enzymen, wurde ein kürzlich erstelltes Homologiemodell der TeLPOR [190] als Ausgangsmodell für die MD-Simulationen verwendet. Für das TeLPOR-Apoprotein, sowie für den ternären TeLPOR/NADPH/Pchlid-Komplex, wurden drei unabhängige 20 ns MD-Simulationen durchgeführt. Diese drei unabhängigen Simulationen konvergieren nach etwa 5 bis 10 ns, wobei nach dieser Zeit konstante α -RMSD-Werte (*root mean square displacement*, berechnet für alle α -Atome des Proteins) von ca. 6 Å für das TeLPOR-Apoprotein und ca. 3 Å für den ternären Holoprotein-Komplex, zu beobachten waren (Abbildung 58).

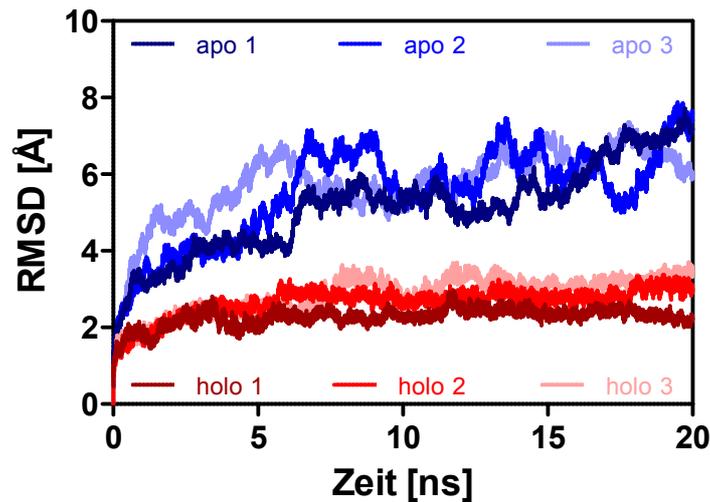


Abbildung 58: Zeitliche α -RMSD Entwicklung. Die Berechnung erfolgte über die Trajektorien von drei unabhängigen Molekulardynamik (MD)-Simulationen des *TeLPOR*-Apo- und -Holo Proteins im Bezug zur Ausgangsstruktur, wobei nur die α -Atome des Proteinrückgrats in die Berechnung einbezogen wurden.

Stellvertretend für die mittels QENS ermittelte Proteindynamik, wurden für alle Aminosäuren der *TeLPOR* RMSF-Werte (*root mean square fluctuation*, berechnet für alle nicht austauschbaren Wasserstoffatome) über ein Zeitfenster von 1 ns bestimmt (Abbildung 59 A). Hierbei waren für das *TeLPOR*-Apoprotein global erhöhte RMSF-Werte im Vergleich zum Holo Protein (Abbildung 59 B) zu beobachten. Die erhöhten RMSF-Werte weisen dabei auf eine höhere Flexibilität des Apoproteins während der MD-Simulation hin, was die zuvor dargestellten Ergebnisse der QENS-Messung bestätigt, in der eine erhöhte innere Flexibilität des Apoproteins beobachtet wurde. Die größten RMSF-Unterschiede zwischen dem *TeLPOR*-Apo- und -Holo Protein wurden für den N-terminalen β_1 - α_A -loop und die C-terminale Substratbindedomäne beobachtet, welche an der NADPH-Bindung (GxxxGxG-Motiv), respektive der Pchlid-Bindung, beteiligt sind [56] (Abbildung 59 C). Beide Strukturregionen weisen für das Apoprotein eine erhöhte Flexibilität auf. Für die DHFR aus *E. coli* wurde für die dem β_1 - α_A -loop entsprechende Region (Met20-loop in DHFR) gezeigt, dass deren Dynamik direkt mit der Enzymkatalyse verbunden ist [191]. Abgesehen von diesen beiden Regionen bleibt die restliche Struktur in den MD-Simulationen verhältnismäßig starr, bzw. unterscheidet sich deren Flexibilität nicht zwischen den Apo- und Holo Protein-Simulationen (Abbildung 59 C).

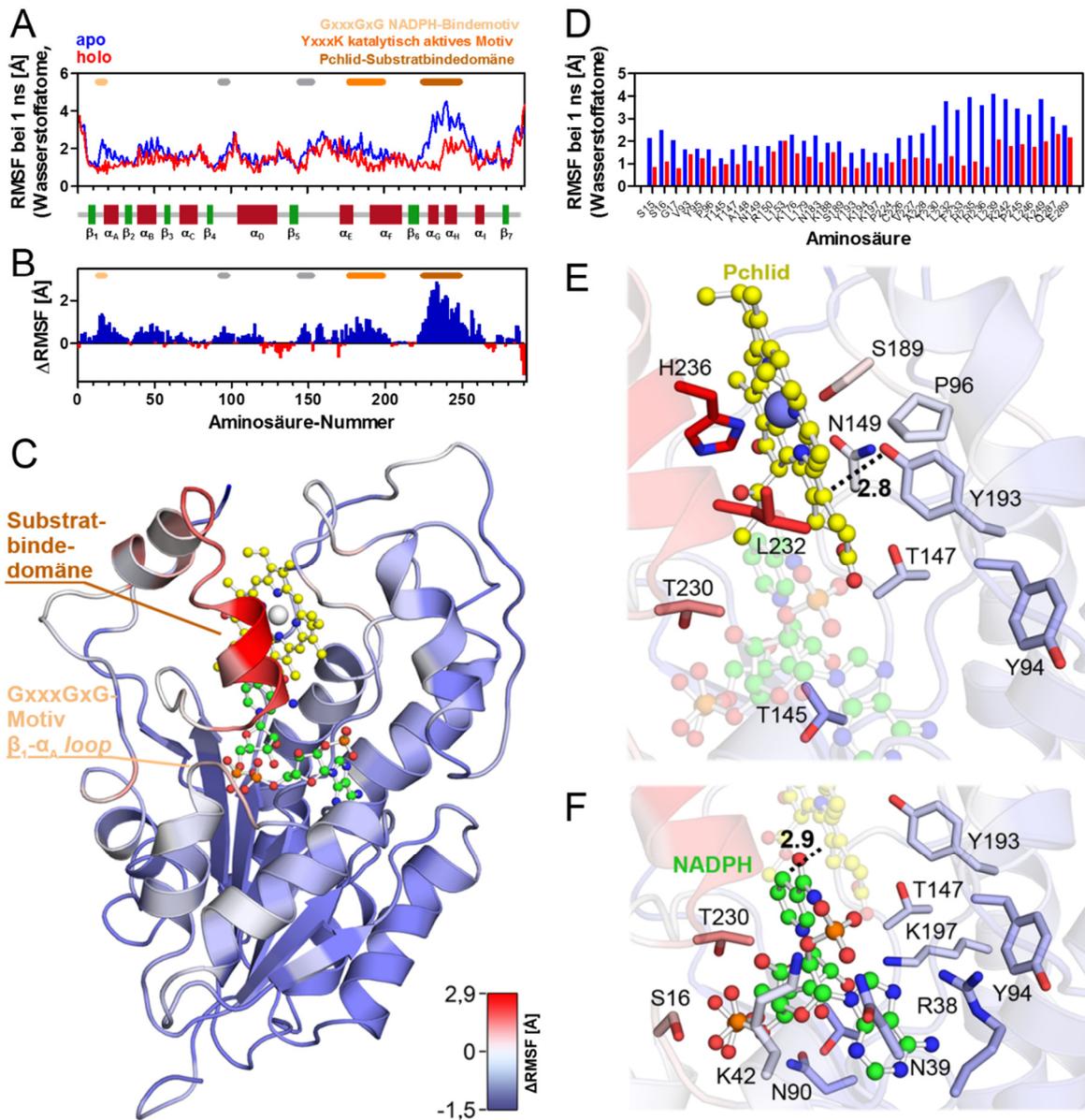


Abbildung 59: MD-Simulation des TeLPOR-Apo- und -Holo proteins. (A) RMSF (*root mean square fluctuation*) der Aminosäuren des TeLPOR-Proteins. Die Werte wurden aus drei unabhängigen MD-Simulationen des TeLPOR-Apoproteins (blau) und des TeLPOR-Holo proteins (rot) bestimmt. (B) ΔRMSF-Plot, in welchem eine erhöhte (positive Werte, blau) und eine verringerte (negative Werte, rot) Flexibilität des TeLPOR-Apoproteins im Vergleich zum TeLPOR-Holo protein angezeigt werden. Die Berechnung von ΔRMSF erfolgte gemäß $\Delta\text{RMSF} = \text{RMSF}_{\text{Apo}} - \text{RMSF}_{\text{Holo}}$. (C) Struktur des ternären TeLPOR-Holo protein-Komplexes in Cartoon-Darstellung. NADPH und Pchlid sind als Kugel- und Stabmodell dargestellt. Die Kohlenstoffatome sind in grün (NADPH) oder gelb (Pchlid), die Stickstoff-, Sauerstoff-, und Phosphoratome sind in blau, rot und orange dargestellt. Die TeLPOR-Struktur wurde gemäß den ΔRMSF-Werten in blau über weiß bis rot gefärbt. (D) Darstellung der RMSF-Werte für ausgewählte, funktionell wichtige, Sequenzmotive des TeLPOR-Apo- (blau) und -Holo proteins (rot). Zu diesen Sequenzmotiven zählen z. B. das NADPH-Bindemotiv und die Pchlid-Substratbindedomäne, wie sie bereits in A-D hervorgehoben sind. In der Nahansicht der Pchlid- (E) und NADPH-Bindestelle (F) sind ausgewählte Reste, welche an der Pchlid- und NADPH-Bindung beteiligt sind, als Stabmodelle dargestellt. Die Kohlenstoffatome sind korrespondierend zu den RMSF-Werten gefärbt. Stickstoff-, Sauerstoff-, und Phosphoratome sind wie in (C) gefärbt.

Ein detaillierter RMSF-Vergleich für wichtige ausgewählte Sequenzmotive, wie der NADPH- und Pchlid-Bindestelle, sowie AS, welche wahrscheinlich Teil des katalytischen Mechanismus sind, ist in Abbildung 59 D-F dargestellt. Interessanterweise zeigen die beiden wichtigsten Aminosäuren (Y193

und K197, *TeLPOR*) des katalytischen Motivs (YxxxK-Motiv) [59], sowie die meisten Aminosäuren des zusätzlichen *loops*, welcher LPORs von anderen SDRs unterscheidet und in dem hier verwendeten Homologiemodell einen Teil der Pchlid-Bindestelle darstellt, sowohl im *TeLPOR*-Apoprotein als auch im ternären Holo protein-Komplex eine ähnliche Flexibilität (Abbildung 59 D-F). Zusammenfassend konnte somit anhand von MD-Simulationen gezeigt werden, dass die durch QENS-Messungen beobachtete Flexibilität des Apoproteins aus strukturellen Fluktuationen der Aminosäuren der NADPH- und Pchlid-Bindestelle des *TeLPOR*-Proteins resultiert. Daher ist es naheliegend zu spekulieren, dass im photoaktivierten Zustand, welcher in den QENS-Messungen eine reduzierte interne Bewegung im Vergleich zum nicht-photoaktivierten Holo protein aufweist, weitere geringfügige Konformationsänderungen innerhalb der NADPH- und Pchlid-Bindestelle auftreten, welche die Geometrie des aktiven Zentrums optimieren und somit einen erhöhten Pchlid-Umsatz ermöglichen.

Mittels QENS konnte gezeigt werden, dass das *TeLPOR*-Apoprotein so wie das unbelichtete und photoaktivierte *TeLPOR*-Holo protein Unterschiede in der internen Proteindynamik zeigen. Hierbei besitzt das Apoprotein die größte interne Proteindynamik. Die Bindung von NADPH und Pchlid scheint die Amplitude der Bewegungen aufgrund von strukturellen Einschränkungen zu reduzieren. Durch die Photoaktivierung kommt es zu einer weiteren „Versteifung“ des Proteins, was sehr wahrscheinlich die erhöhte katalytische Leistung nach der Photoaktivierung erklärt. Temperaturstabilitätsuntersuchungen und MD-Simulationen untermauern diese Beobachtungen. Die hier erstmals für LPORs beschriebenen proteindynamischen Untersuchungen zeigen, dass bei LPORs, wie bei den verwandten Dihydrofolatreduktasen, die ps- bis ns-dynamische Prozesse eine wichtige Rolle bei der Bildung des ternären Enzym/Kofaktor/Substrat-Komplexes spielen. Außerdem konnte durch Untersuchungen des photoaktivierten Holo proteins ein Zusammenhang zwischen Proteindynamik und Katalyse nachgewiesen werden.

4 AUSBLICK

In weiterführenden Arbeiten könnte zunächst eine Suche nach weiteren neuen putativen AAPB LPORs zur Erweiterung des Stammbaumes durchgeführt werden. Diese Untersuchungen können helfen den evolutionären Ursprung von LPORs besser nachzuvollziehen, insbesondere wenn weitere LPORs in β -Proteobakterien oder anderen aerob anoxygenen phototrophen Bakteriengattungen nachgewiesen werden könnten. Des Weiteren könnte für die in dieser Arbeit identifizierten aber zurzeit noch putativen AAPB LPORs eine LPOR-Aktivität nachgewiesen und in weiterführenden Arbeiten eine biochemische Charakterisierung durchgeführt werden. Zusätzlich zu den bereits untersuchten α -proteobakteriellen LPORs wäre die Untersuchung der hier identifizierten putativen LPOR des β -Proteobakteriums *Polynucleobacter* sp. MWH-Feld-100 ein sehr interessanter Ansatz. Durch die Untersuchung weiterer cyanobakterieller und pflanzlicher LPORs könnten außerdem die Unterschiede zwischen den AAPB LPORs und cyanobakteriellen und pflanzlichen LPORs besser untersucht und validiert werden.

Unter Verwendung einer anderen LPOR, als der recht instabilen *Ds*LPOR, könnte mittels transientscher Absorption (TA) der Mechanismus der AAPB LPORs untersucht werden und so der Nachweis konservierter Reaktionsmechanismen eindeutiger geführt werden. Für diese Untersuchung bietet sich aus den Erkenntnissen dieser Arbeit die *Pd*LPOR an, da sie bei 35 °C über 30 Stunden keine Denaturierung aufweist. Außerdem lässt sich die *Pd*LPOR in großen Mengen produzieren und gut reinigen, was aufgrund der benötigten Menge an Protein für die TA-Messung einen nicht zu vernachlässigenden Vorteil darstellt.

Für eine weitere biochemische Charakterisierung könnten, zusätzlich zum hier gemessenen Dissoziationskoeffizienten (K_d) des Pchlids, auch noch der K_d -Wert für NADPH der verschiedenen LPORs ermittelt werden. Ebenso könnte die pH-Stabilität der unterschiedlichen Enzyme ermittelt, und so die Überlagerung von Temperatur- und pH-Denaturierungsphänomenen bei der Messung des Schmelzpunktes ausgeschlossen werden.

Um die für das Verständnis des Mechanismus so wichtige Struktur der LPORs zu erhalten, könnten weiterführende Kristallisationscreenings, unter Verwendung vieler verschiedener LPORs, durchgeführt werden, um so einen nicht geschichteten Kristall zu erhalten.

Für die verschiedenen Untersuchungen des ternären LPOR/NADPH/Pchlid- oder pseudoternären LPOR/NADP⁺/Pchlid-Komplexes wäre eine Verbesserung der Präparation nötig, damit wenn möglich das gesamte Protein beladen ist und als Dimer vorliegt. Dies sollte es ermöglichen das hier vorgeschlagene SAXS-basierte Modell des Holoproteindimers zu validieren.

Die hier, mittels inkohärenter Quasielastischer Neutronenstreuung durchgeführte, Untersuchung der *TeLPOR*-Proteindynamik in Apo- und Holoform könnte für AAPB und pflanzliche LPORs durchgeführt werden, um so eventuell dynamische Unterschiede zwischen den LPORs mit unterschiedlichem Ursprung zu identifizieren.

5 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Kaschner, M., Loeschcke, A., Krause, J., Minh, B. Q., Heck, A., Endres, S., Svensson, V., Wirtz, A., von Haeseler, A., Jaeger, K. E., Drepper, T. and Krauss, U.** (2014) Discovery of the first light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in anoxygenic phototrophic bacteria. *Molecular Microbiology*. 93(5): p. 1066-1078.
2. **Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H. and Heller, H. C.** (2006) *Biologie*. 7. Auflage: p. 644.
3. **Hohmann-Marriott, M. F. and Blankenship, R. E.** (2011) Evolution of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 62: p. 515-548.
4. **Permentier, H. P., Neerken, S., Overmann, J. and Amesz, J.** (2001) A Bacteriochlorophyll *a* Antenna Complex from Purple Bacteria Absorbing at 963 nm. *Biochemistry*. 40(18): p. 5573-5578.
5. **Gottstein, J. and Scheer, H.** (1983) Long-wavelength-absorbing forms of bacteriochlorophyll *a* in solutions of Triton X-100. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 80(8): p. 2231-2234.
6. **Hu, Q., Sturgis, J. N., Robert, B., Delagrave, S., Youvan, D. C. and Niederman, R. A.** (1998) Hydrogen Bonding and Circular Dichroism of Bacteriochlorophylls in the *Rhodobacter capsulatus* Light-Harvesting 2 Complex Altered by Combinatorial Mutagenesis. *Biochemistry*. 37(28): p. 10006-10015.
7. **Kiang, N. Y., Siefert, J., Govindjee and Blankenship, R. E.** (2007) Spectral Signatures of Photosynthesis. I. Review of Earth Organisms. *Astrobiology*. 7(1): p. 222-251.
8. **Kurreck, J., Niethammer, D. and Kurreck, H.** (1999) Primärprozesse der Photosynthese und ihre Modellierung. *Chemie in unserer Zeit*. 33(2): p. 72-83.
9. **Rothschild, L. J.** (2008) The evolution of photosynthesis...again? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363(1504): p. 2787-2801.
10. **Gernot, R.** (1994) Biologische Wasserspaltung durch Sonnenlicht im Photosyntheseapparat. *Chemie in unserer Zeit*. 28(3): p. 118-130.
11. **Raymond, J.** (2008) Coloring in the tree of life. *Trends in Microbiology*. 16(2): p. 41-43.
12. **Blankenship, R. E. and Hartman, H.** (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 23(3): p. 94-97.
13. **Kopp, R. E., Kirschvink, J. L., Hilburn, I. A. and Nash, C. Z.** (2005) The Paleoproterozoic snowball Earth: A climate disaster triggered by the evolution of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(32): p. 11131-11136.
14. **Buick, R.** (2008) When did oxygenic photosynthesis evolve? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363(1504): p. 2731-2743.
15. **Blankenship, R. E.** (2010) Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiology*. 154(2): p. 434-438.
16. **Reinbothe, S. and Reinbothe, C.** (1996) Regulation of Chlorophyll Biosynthesis in Angiosperms. *Plant Physiology*. 111(1): p. 1-7.
17. **Yang, J. and Cheng, Q.** (2004) Origin and Evolution of the Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase (LPOR) Genes. *Plant Biology*. 6(5): p. 537-544.

18. **Reinbothe, C., El Bakkouri, M., Buhr, F., Muraki, N., Nomata, J., Kurisu, G., Fujita, Y. and Reinbothe, S.** (2010) Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends in Plant Science*. 15(11): p. 614-624.
19. **Burke, D. H., Hearst, J. E. and Sidow, A.** (1993) Early evolution of photosynthesis: Clues from nitrogenase and chlorophyll iron proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90(15): p. 7134-7138.
20. **Fujita, Y., Takagi, H. and Hase, T.** (1996) Identification of the *chlB* Gene and the Gene Product Essential for the Light-Independent Chlorophyll Biosynthesis in the Cyanobacterium *Plectonema boryanum*. *Plant and Cell Physiology*. 37(3): p. 313-323.
21. **Stripp, S. T., Goldet, G., Brandmayr, C., Sanganas, O., Vincent, K. A., Haumann, M., Armstrong, F. A. and Happe, T.** (2009) How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(41): p. 17331-17336.
22. **Nomata, J., Kitashima, M., Inoue, K. and Fujita, Y.** (2006) Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Letters*. 580(26): p. 6151-6154.
23. **Bröcker, M. J., Watzlich, D., Saggi, M., Lendzian, F., Moser, J. and Jahn, D.** (2010) Biosynthesis of (Bacterio)chlorophylls: ATP-dependent transient subunit interaction and electron transfer of dark operative protochlorophyllide oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*. 285(11): p. 8268-8277.
24. **Nomata, J., Swem, L. R., Bauer, C. E. and Fujita, Y.** (2005) Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1708(2): p. 229-237.
25. **Moser, J., Lange, C., Krausze, J., Rebelein, J., Schubert, W. D., Ribbe, M. W., Heinz, D. W. and Jahn, D.** (2013) Structure of ADP-aluminium fluoride-stabilized protochlorophyllide oxidoreductase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(6): p. 2094-2098.
26. **Baker, M. E.** (1994) Protochlorophyllide reductase is homologous to human carbonyl reductase and pig 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 300 (Pt 2): p. 605-607.
27. **Labesse, G., Vidal-Cros, A., Chomilier, J., Gaudry, M. and Mornon, J. P.** (1994) Structural comparisons lead to the definition of a new superfamily of NAD(P)(H)-accepting oxidoreductases: the single-domain reductases/epimerases/dehydrogenases (the 'RED' family). *Biochemical Journal*. 304 (Pt 1): p. 95-99.
28. **Jörnvall, H., Hoog, J. O. and Persson, B.** (1999) SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. *FEBS Letters*. 445(2-3): p. 261-264.
29. **Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B. and Oppermann, U.** (2008) The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(24): p. 3895-3906.
30. **Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R. and Ladenstein, R.** (1999) The Catalytic Reaction and Inhibition Mechanism of *Drosophila* Alcohol Dehydrogenase: Observation of an Enzyme-bound NAD-ketone Adduct at 1.4 Å Resolution by X-ray Crystallography. *Journal of Molecular Biology*. 289(2): p. 335-355.

31. **Filling, C., Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H. and Oppermann, U.** (2002) Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Biological Chemistry*. 277(28): p. 25677-25684.
32. **Mulichak, A. M., Theisen, M. J., Essigmann, B., Benning, C. and Garavito, R. M.** (1999) Crystal structure of SQD1, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant sulfolipid headgroup donor UDP-sulfoquinovose. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(23): p. 13097-13102.
33. **Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J. and Yamada, Y.** (1998) Crystal structures of two tropinone reductases: Different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(9): p. 4876-4881.
34. **Roth, S., Kilgore, M., Kutchan, T. and Muller, M.** (2018) Exploiting Catalytic Diversity of Short-Chain Dehydrogenases/Reductases: Versatile Enzymes from Plants with Extended Imine Substrate Scope. *ChemBioChem*. 19(17): p. 1849-1852.
35. **Ghosh, D., Erman, M., Wawrzak, Z., Duax, W. L. and Pangborn, W.** (1994) Mechanism of inhibition of 3α , 20β -hydroxysteroid dehydrogenase by a licorice-derived steroidal inhibitor. *Structure*. 2(10): p. 973-980.
36. **Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D.** (1995) Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDR). *Biochemistry*. 34(18): p. 6003-6013.
37. **Sanda, S., Leustek, T., Theisen, M. J., Garavito, R. M. and Benning, C.** (2001) Recombinant *Arabidopsis* SQD1 Converts UDP-glucose and Sulfite to the Sulfolipid Head Group Precursor UDP-sulfoquinovose *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry*. 276(6): p. 3941-3946.
38. **Gatzeva-Topalova, P. Z., May, A. P. and Sousa, M. C.** (2005) Structure and Mechanism of ArnA: Conformational Change Implies Ordered Dehydrogenase Mechanism in Key Enzyme for Polymyxin Resistance. *Structure*. 13(6): p. 929-942.
39. **Ghosh, D., Sawicki, M., Pletnev, V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S. and Duax, W. L.** (2001) Porcine Carbonyl Reductase: Structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *Journal of Biological Chemistry*. 276(21): p. 18457-18463.
40. **Schoefs, B. and Franck, F.** (2003) Protochlorophyllide Reduction: Mechanisms and Evolutions. *Photochemistry and Photobiology*. 78(6): p. 543-557.
41. **Gabruk, M. and Mysliwa-Kurziel, B.** (2015) Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase: Phylogeny, Regulation, and Catalytic Properties. *Biochemistry*. 54(34): p. 5255-5262.
42. **Heyes, D. J. and Hunter, C. N.** (2005) Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase. *Trends in Biochemical Sciences*. 30(11): p. 642-649.
43. **Björn, L. O.** (2018) Photoenzymes and Related Topics: An Update. *Photochemistry and Photobiology*. 94(3): p. 459-465.
44. **Nielsen, O. F. and Kahn, A.** (1973) Kinetics and quantum yield of photoconversion of protochlorophyll(ide) to chlorophyll(ide) α . *Biochimica et Biophysica Acta*. 292(1): p. 117-129.
45. **Schopfer, P. and Siegelman, H. W.** (1968) Purification of Protochlorophyllide Holochrome. *Plant physiology*. 43(6): p. 990-996.

46. **Archipowa, N., Kutta, R. J., Heyes, D. J. and Scrutton, N. S.** (2018) Stepwise Hydride Transfer in a Biological System: Insights into the Reaction Mechanism of the Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Angewandte Chemie International Edition*. 57(10): p. 2682-2686.
47. **Buhr, F., El Bakkouri, M., Valdez, O., Pollmann, S., Lebedev, N., Reinbothe, S. and Reinbothe, C.** (2008) Photoprotective role of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(34): p. 12629-12634.
48. **Gabruk, M., Nowakowska, Z., Skupien-Rabian, B., Kedracka-Krok, S., Mysliwa-Kurdzial, B. and Kruk, J.** (2016) Insight into the oligomeric structure of PORA from *A. thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1864(12): p. 1757-1764.
49. **Lebedev, N., Karginova, O., McIvor, W. and Timko, M. P.** (2001) Tyr275 and Lys279 Stabilize NADPH within the Catalytic Site of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase and Are Involved in the Formation of the Enzyme Photoactive State. *Biochemistry*. 40(42): p. 12562-12574.
50. **Sytina, O. A., Heyes, D. J., Hunter, C. N., Alexandre, M. T., van Stokkum, I. H., van Grondelle, R. and Groot, M. L.** (2008) Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity. *Nature*. 456(7224): p. 1001-1004.
51. **Heyes, D. J., Sakuma, M., de Visser, S. P. and Scrutton, N. S.** (2009) Nuclear Quantum Tunneling in the Light-activated Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*. 284(6): p. 3762-3767.
52. **Martin, G. E., Timko, M. P. and Wilks, H. M.** (1997) Purification and kinetic analysis of pea (*Pisum sativum* L.) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase expressed as a fusion with maltose-binding protein in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*. 325 (Pt 1): p. 139-145.
53. **Yuan, M., Zhang, D. W., Zhang, Z. W., Chen, Y. E., Yuan, S., Guo, Y. R. and Lin, H. H.** (2012) Assembly of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase complex is needed for effective greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 169(13): p. 1311-1316.
54. **Heyes, D. J., Ruban, A. V., Wilks, H. M. and Hunter, C. N.** (2002) Enzymology below 200 K: The kinetics and thermodynamics of the photochemistry catalyzed by protochlorophyllide oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(17): p. 11145-11150.
55. **Heyes, D. J., Hardman, S. J., Hedison, T. M., Hoeven, R., Greetham, G. M., Towrie, M. and Scrutton, N. S.** (2015) Excited-State Charge Separation in the Photochemical Mechanism of the Light-Driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Angewandte Chemie International Edition*. 54(5): p. 1512-1515.
56. **Menon, B. R., Hardman, S. J., Scrutton, N. S. and Heyes, D. J.** (2016) Multiple active site residues are important for photochemical efficiency in the light-activated enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 161: p. 236-243.
57. **Heyes, D. J., Ruban, A. V. and Hunter, C. N.** (2003) Protochlorophyllide Oxidoreductase: "Dark" Reactions of a Light-Driven Enzyme. *Biochemistry*. 42(2): p. 523-528.
58. **Townley, H. E., Sessions, R. B., Clarke, A. R., Dafforn, T. R. and Griffiths, W. T.** (2001) Protochlorophyllide Oxidoreductase: A Homology Model Examined by Site-Directed Mutagenesis. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 44(3): p. 329-335.

-
59. **Wilks, H. M. and Timko, M. P.** (1995) A light-dependent complementation system for analysis of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase: Identification and mutagenesis of two conserved residues that are essential for enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(3): p. 724-728.
60. **Heyes, D. J., Hardman, S. J., Mansell, D., Gardiner, J. M. and Scrutton, N. S.** (2012) Mechanistic Reappraisal of Early Stage Photochemistry in the Light-Driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *PLoS ONE*. 7(9): p. e45642.
61. **Yuasa, J., Yamada, S. and Fukuzumi, S.** (2008) One-Step versus Stepwise Mechanism in Protonated Amino Acid-Promoted Electron-Transfer Reduction of a Quinone by Electron Donors and Two-Electron Reduction by a Dihydronicotinamide Adenine Dinucleotide Analogue. Interplay between Electron Transfer and Hydrogen Bonding. *Journal of the American Chemical Society*. 130(17): p. 5808-5820.
62. **Liu, Z., Deeth, R. J., Butler, J. S., Habtemariam, A., Newton, M. E. and Sadler, P. J.** (2013) Reduction of Quinones by NADH Catalyzed by Organoiridium Complexes. *Angewandte Chemie International Edition*. 52(15): p. 4194-4197.
63. **Fukuzumi, S., Kotani, H., Lee, Y.-M. and Nam, W.** (2008) Sequential Electron-Transfer and Proton-Transfer Pathways in Hydride-Transfer Reactions from Dihydronicotinamide Adenine Dinucleotide Analogues to Non-heme Oxoiron(IV) Complexes and *p*-Chloranil. Detection of Radical Cations of NADH Analogues in Acid-Promoted Hydride-Transfer Reactions. *Journal of the American Chemical Society*. 130(45): p. 15134-15142.
64. **Zhang, H., Kanaan, C., Hamdane, D., Hoa, G. H. and Hollenberg, P. F.** (2009) Effect of conformational dynamics on substrate recognition and specificity as probed by the introduction of a de novo disulfide bond into cytochrome P450 2B1. *Journal of Biological Chemistry*. 284(38): p. 25678-25686.
65. **Epstein, D. M., Benkovic, S. J. and Wright, P. E.** (1995) Dynamics of the Dihydrofolate Reductase-Folate Complex: Catalytic Sites and Regions Known To Undergo Conformational Change Exhibit Diverse Dynamical Features. *Biochemistry*. 34(35): p. 11037-11048.
66. **Vaughn, M. B., Zhang, J., Spiro, T. G., Dyer, R. B. and Klinman, J. P.** (2018) Activity-Related Microsecond Dynamics Revealed by Temperature-Jump Förster Resonance Energy Transfer Measurements on Thermophilic Alcohol Dehydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*. 140(3): p. 900-903.
67. **Kohen, A.** (2015) Dihydrofolate reductase as a model for studies of enzyme dynamics and catalysis. *F1000Research*. 4: p. 1-8.
68. **Luk, L. Y., Javier Ruiz-Pernia, J., Dawson, W. M., Roca, M., Loveridge, E. J., Glowacki, D. R., Harvey, J. N., Mulholland, A. J., Tunon, I., Moliner, V. and Allemann, R. K.** (2013) Unraveling the role of protein dynamics in dihydrofolate reductase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110(41): p. 16344-16349.
69. **Singh, P., Abeyasinghe, T. and Kohen, A.** (2015) Linking Protein Motion to Enzyme Catalysis. *Molecules*. 20(1): p. 1192-1209.
70. **Singh, P., Francis, K. and Kohen, A.** (2015) Network of remote and local protein dynamics in dihydrofolate reductase catalysis. *ACS Catalysis*. 5(5): p. 3067-3073.
71. **Sytina, O. A., van Stokkum, I. H., Heyes, D. J., Hunter, C. N. and Groot, M. L.** (2012) Spectroscopic characterization of the first ultrafast catalytic intermediate in protochlorophyllide oxidoreductase. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 14(2): p. 616-625.
-

72. **Sytina, O. A., Alexandre, M. T., Heyes, D. J., Hunter, C. N., Robert, B., van Grondelle, R. and Groot, M. L.** (2011) Enzyme activation and catalysis: characterisation of the vibrational modes of substrate and product in protochlorophyllide oxidoreductase. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 13(6): p. 2307-2313.
73. **Yamazaki, S., Nomata, J. and Fujita, Y.** (2006) Differential Operation of Dual Protochlorophyllide Reductases for Chlorophyll Biosynthesis in Response to Environmental Oxygen Levels in the Cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant Physiology*. 142(3): p. 911-922.
74. **Shields, G. and Veizer, J.** (2002) Precambrian marine carbonate isotope database: Version 1.1. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*. 3(6): p. 1-12.
75. **Fujita, Y.** (1996) Protochlorophyllide Reduction: a Key Step in the Greening of Plants. *Plant and Cell Physiology*. 37(4): p. 411-421.
76. **Gao, Y., Xiong, W., He, M. J., Tang, L., Xiang, J. Y. and Wu, Q. Y.** (2009) Action Spectra of Chlorophyll *a* Biosynthesis in Cyanobacteria: Dark-Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase-Deficient Mutants. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 64(1-2): p. 117-124.
77. **Suzuki, J. Y. and Bauer, C. E.** (1995) A prokaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(9): p. 3749-3753.
78. **Reinbothe, S., Pollmann, S. and Reinbothe, C.** (2003) *In Situ* Conversion of Protochlorophyllide *b* to Protochlorophyllide *a* in Barley: Evidence for a novel role of 7-formyl reductase in the prolamellar body of etioplasts. *Journal of Biological Chemistry*. 278(2): p. 800-806.
79. **Reinbothe, S., Runge, S., Reinbothe, C., van Cleve, B. and Apel, K.** (1995) Substrate-Dependent Transport of the NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase into Isolated Plastids. *The Plant Cell*. 7(2): p. 161-172.
80. **Holtorf, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Bereza, B. and Apel, K.** (1995) Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(8): p. 3254-3258.
81. **Oosawa, N., Masuda, T., Awai, K., Fusada, N., Shimada, H., Ohta, H. and Takamiya, K.** (2000) Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*. 474(2-3): p. 133-136.
82. **Armstrong, G. A., Runge, S., Frick, G., Sperling, U. and Apel, K.** (1995) Identification of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B: A Branched Pathway for Light-Dependent Chlorophyll Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 108(4): p. 1505-1517.
83. **Paddock, T. N., Mason, M. E., Lima, D. F. and Armstrong, G. A.** (2010) *Arabidopsis* protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) restores bulk chlorophyll synthesis and normal development to a *porB porC* double mutant. *Plant Molecular Biology*. 72(4-5): p. 445-457.
84. **Frick, G., Su, Q., Apel, K. and Armstrong, G. A.** (2003) An *Arabidopsis porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested. *The Plant Journal*. 35(2): p. 141-153.
85. **Su, Q., Frick, G., Armstrong, G. and Apel, K.** (2001) POR C of *Arabidopsis thaliana*: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. *Plant Molecular Biology*. 47(6): p. 805-813.

-
86. **Yamamoto, H., Kurumiya, S., Ohashi, R. and Fujita, Y.** (2009) Oxygen Sensitivity of a Nitrogenase-Like Protochlorophyllide Reductase from the Cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Plant and Cell Physiology*. 50(9): p. 1663-1673.
 87. **Yamamoto, H., Kato, M., Yamanashi, K. and Fujita, Y.** (2014) Reconstitution of a sequential reaction of two nitrogenase-like enzymes in the bacteriochlorophyll biosynthetic pathway of *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 448(2): p. 200-205.
 88. **Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. and Graham, M. W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*. 17(9): p. 3469-3478.
 89. **Studier, F. W. and Moffatt, B. A.** (1986) Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes. *Journal of Molecular Biology*. 189(1): p. 113-130.
 90. **Yang, Z. M. and Bauer, C. E.** (1990) *Rhodobacter capsulatus* Genes Involved in Early Steps of the Bacteriochlorophyll Biosynthetic Pathway. *Journal of Bacteriology*. 172(9): p. 5001-5010.
 91. **Krause, J.** (2014) Biochemische Charakterisierung Licht-abhängiger Protochlorophyllid-Oxidoreduktasen aus Bakterien und Pflanzen. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
 92. **Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor. 2nd ed.
 93. **Studier, F. W.** (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein expression and purification*. 41(1): p. 207-234.
 94. **Pohlig, L.** (2013) Biochemische Charakterisierung der lichtgetriebenen Protochlorophyllid-Oxidoreduktase aus *Dinoroseobacter shibae*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
 95. **Schmitz, F.** (2016) Lichtabhängige Oxidoreduktasen aus anoxygenen phototrophen Bakterien. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
 96. **Hanahan, D.** (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166(4): p. 557-580.
 97. **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.** (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239(4839): p. 487-491.
 98. **Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(12): p. 5463-5467.
 99. **Loeschke, A., Hage Hülsmann, J., Troost, K., Wewer, V., Jaeger, K.-E. and Drepper, T.** Heterologous production of plant terpenes in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. (unveröffentlicht).
 100. **Welch, M., Govindarajan, S., Ness, J. E., Villalobos, A., Gurney, A., Minshull, J. and Gustafsson, C.** (2009) Design Parameters to Control Synthetic Gene Expression in *Escherichia coli*. *PIOS ONE*. 4(9): p. e7002.

101. **Bradford, M. M.** (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72: p. 248-254.
102. **Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A.** (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, Edited By: J. M. Walker, Humana Press Inc. 31: p. 571-607.
103. **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): p. 680-685.
104. **Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P. G.** (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 25(9): p. 1327-1333.
105. **Kruk, J. and Mysliwa-Kurdziel, B. M.** (2004) Separation of Monovinyl and Divinyl Protochlorophyllides Using C-30 Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Column: Analytical and Preparative Applications. *Chromatographia*. 60(1-2): p. 117-123.
106. **Heyes, D. J., Martin, G. E., Reid, R. J., Hunter, C. N. and Wilks, H. M.** (2000) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Synechocystis*: overexpression, purification and preliminary characterisation. *FEBS Letters*. 483(1): p. 47-51.
107. **Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S. and Rudiger, W.** (1999) Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Avena sativa* L. Purification and substrate specificity. *European Journal of Biochemistry*. 265(3): p. 862-874.
108. **Pernot, P., Round, A., Barrett, R., De Maria Antolinos, A., Gobbo, A., Gordon, E., Huet, J., Kieffer, J., Lentini, M., Mattenet, M., Morawe, C., Mueller-Dieckmann, C., Ohlsson, S., Schmid, W., Surr, J., Theveneau, P., Zerrad, L. and McSweeney, S.** (2013) Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution. *Journal of Synchrotron Radiation*. 20(Pt 4): p. 660-664.
109. **Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D., Konarev, P. V. and Svergun, D. I.** (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*. 45(Pt 2): p. 342-350.
110. **Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Kikhney, A. G. and Svergun, D. I.** (2007) ATSAS 2.1 – towards automated and web-supported small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*. 40: p. S223-S228.
111. **Svergun, D. I., Petoukhov, M. V. and Koch, M. H.** (2001) Determination of Domain Structure of Proteins from X-Ray Solution Scattering. *Biophysical Journal*. 80(6): p. 2946-2953.
112. **Franke, D. and Svergun, D. I.** (2009) DAMMIF, a program for rapid *ab-initio* shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*. 42(Pt 2): p. 342-346.
113. **Svergun, D. I.** (1999) Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing. *Biophysical Journal*. 76(6): p. 2879-2886.
114. **Svergun, D., Barberato, C. and Koch, M. H. J.** (1995) CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates. *Journal of Applied Crystallography*. 28: p. 768-773.

-
115. **Volkov, V. V. and Svergun, D. I.** (2003) Uniqueness of *ab initio* shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*. 36: p. 860-864.
116. **Wriggers, W.** (2012) Conventions and workflows for using *Situs*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 68: p. 344-351.
117. **Pearson, J. Z., Krause, F., Haffke, D., Demeler, B., Schilling, K. and Colfen, H.** (2015) Next-Generation AUC Adds a Spectral Dimension: Development of Multiwavelength Detectors for the Analytical Ultracentrifuge. *Methods in Enzymology*. 562: p. 1-26.
118. **Walter, J., Sherwood, P. J., Lin, W., Segets, D., Stafford, W. F. and Peukert, W.** (2015) Simultaneous Analysis of Hydrodynamic and Optical Properties Using Analytical Ultracentrifugation Equipped with Multiwavelength Detection. *Analytical Chemistry*. 87(6): p. 3396-3403.
119. **Zhang, J., Pearson, J. Z., Gorbet, G. E., Cölfen, H., Germann, M. W., Brinton, M. A. and Demeler, B.** (2017) Spectral and Hydrodynamic Analysis of West Nile Virus RNA-Protein Interactions by Multiwavelength Sedimentation Velocity in the Analytical Ultracentrifuge. *Analytical Chemistry*. 89(1): p. 862-870.
120. **Wuttke, J., Budwig, A., Drochner, M., Kammerling, H., Kayser, F. J., Kleines, H., Ossovyi, V., Pardo, L. C., Prager, M., Richter, D., Schneider, G. J., Schneider, H. and Staringer, S.** (2012) SPHERES, Jülich's high-flux neutron backscattering spectrometer at FRM II. *Review of Scientific Instruments*. 83(7): p. 075109; 075101-075111.
121. **Zamponi, M. and Khanef, M.** (2015) SPHERES: Backscattering spectrometer. *Journal of large-scale research facilities*. 1.
122. **Dobryakov, A. L., Kovalenko, S. A., Weigel, A., Perez-Lustres, J. L., Lange, J., Müller, A. and Ernsting, N. P.** (2010) Femtosecond pump/supercontinuum-probe spectroscopy: Optimized setup and signal analysis for single-shot spectral referencing. *Review of Scientific Instruments*. 81(11): p. 113106.
123. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): p. 3389-3402.
124. **Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. and Higgins, D. G.** (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular System Biology*. 7: p. 539.
125. **Nicholas, K. B., Nicholas, H. B. and Deerfield, D. W.** (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation EMBNEW.NEWS. 4: p. 14.
126. **Hedges, S. B., Marin, J., Suleski, M., Paymer, M. and Kumar, S.** (2015) Tree of Life Reveals Clock-Like Speciation and Diversification. *Molecular Biology and Evolution*. 32(4): p. 835-845.
127. **Kantor, R. S., van Zyl, A. W., van Hille, R. P., Thomas, B. C., Harrison, S. T. and Banfield, J. F.** (2015) Bioreactor microbial ecosystems for thiocyanate and cyanide degradation unravelled with genome-resolved metagenomics. *Environmental Microbiology*. 17(12): p. 4929-4941.
128. **Nelson, W. C., Maezato, Y., Wu, Y. W., Romine, M. F. and Lindemann, S. R.** (2016) Identification and Resolution of Microdiversity through Metagenomic Sequencing of Parallel Consortia. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(1): p. 255-267.
-

129. **Zeng, Y. H., Feng, F. Y., Medova, H., Dean, J. and Koblizek, M.** (2014) Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum *Gemmatimonadetes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111(21): p. 7795-7800.
130. **Zeng, Y., Baumbach, J., Barbosa, E. G., Azevedo, V., Zhang, C. and Koblizek, M.** (2016) Metagenomic evidence for the presence of phototrophic *Gemmatimonadetes* bacteria in diverse environments. *Environmental Microbiology Reports*. 8(1): p. 139-149.
131. **Wang, Y., Ma, L., Mao, Y., Jiang, X., Xia, Y., Yu, K., Li, B. and Zhang, T.** (2017) Comammox in drinking water systems. *Water Research*. 116: p. 332-341.
132. **Wang, Y., Zhang, R., Zheng, Q. and Jiao, N.** (2014) Draft Genome Sequences of Two Marine Phototrophic Bacteria, *Erythrobacter longus* Strain DSM 6997 and *Erythrobacter litoralis* Strain DSM 8509. *Genome Announcements*. 2(4).
133. **Oliylyk, M., Samborskyy, M., Lester, J. B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S. F. and Leadlay, P. F.** (2007) Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nature Biotechnology*. 25(4): p. 447-453.
134. **McFarlane, M. J., Hunter, C. N. and Heyes, D. J.** (2005) Kinetic characterisation of the light-driven protochlorophyllide oxidoreductase (POR) from *Thermosynechococcus elongatus*. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 4(12): p. 1055-1059.
135. **Garrone, A., Archipowa, N., Zipfel, P. F., Hermann, G. and Dietzek, B.** (2015) Plant Protochlorophyllide Oxidoreductases A and B: Catalytic Efficiency and Initial Reaction Steps. *Journal of Biological Chemistry*. 290(47): p. 28530-28539.
136. **Pattanayak, G. K. and Tripathy, B. C.** (2002) Catalytic Function of a Novel Protein Protochlorophyllide Oxidoreductase C of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 291(4): p. 921-924.
137. **Menon, B. R., Davison, P. A., Hunter, C. N., Scrutton, N. S. and Heyes, D. J.** (2010) Mutagenesis Alters the Catalytic Mechanism of the Light-driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*. 285(3): p. 2113-2119.
138. **Menon, B. R., Waltho, J. P., Scrutton, N. S. and Heyes, D. J.** (2009) Cryogenic and Laser Photoexcitation Studies Identify Multiple Roles for Active Site Residues in the Light-driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*. 284(27): p. 18160-18166.
139. **Heyes, D. J. and Hunter, C. N.** (2002) Site-directed mutagenesis of Tyr-189 and Lys-193 in NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from *Synechocystis*. *Biochemical Society Transactions*. 30(4): p. 601-604.
140. **Yurkov, V. V. and Beatty, J. T.** (1998) Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): p. 695-724.
141. **Brinkmann, H., Goker, M., Koblizek, M., Wagner-Dobler, I. and Petersen, J.** (2018) Horizontal operon transfer, plasmids, and the evolution of photosynthesis in *Rhodobacteraceae*. *The ISME Journal*. 12(8): p. 1994-2010.
142. **Thiel, V., Tank, M. and Bryant, D. A.** (2018) Diversity of Chlorophototrophic Bacteria Revealed in the Omics Era. *Annual Review of Plant Biology*. 69: p. 21-49.

-
143. **Wakao, N., Yokoi, N., Ioyama, N., Hiraishi, A., Shimada, K., Kobayashi, M., Kise, H., Iwaki, M., Itoh, S. and Takaichi, S.** (1996) Discovery of Natural Photosynthesis using Zn-Containing Bacteriochlorophyll in an Aerobic Bacterium *Acidiphilium rubrum*. *Plant and Cell Physiology*. 37(6): p. 889-893.
144. **Masuda, T., Fusada, N., Oosawa, N., Takamatsu, K., Yamamoto, Y. Y., Ohto, M., Nakamura, K., Goto, K., Shibata, D., Shirano, Y., Hayashi, H., Kato, T., Tabata, S., Shimada, H., Ohta, H. and Takamiya, K.** (2003) Functional Analysis of Isoforms of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR), PORB and PORC, in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 44(10): p. 963-974.
145. **Masuda, S., Ikeda, R., Masuda, T., Hashimoto, H., Tsuchiya, T., Kojima, H., Nomata, J., Fujita, Y., Mimuro, M., Ohta, H. and Takamiya, K.** (2009) Prolamellar bodies formed by cyanobacterial protochlorophyllide oxidoreductase in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 58(6): p. 952-960.
146. **Schulz, R., Steinmüller, K., Klaas, M., Forreiter, C., Rasmussen, S., Hiller, C. and Apel, K.** (1989) Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics*. 217(2): p. 355-361.
147. **Knaust, R., Seyfried, B., Schmidt, L., Schulz, R. and Senger, H.** (1993) Phototransformation of monovinyl and divinyl protochlorophyllide by NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase of barley expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 20(2-3): p. 161-166.
148. **Peters, L.** (in Bearbeitung) *In vivo* Charakterisierung von Licht-abhängigen Enzymen der Bacteriochlorophyll a Biosynthese in *Rhodobacter capsulatus* und Verwendung BChl a-produzierender Bakterien für die optoakustische Analyse von Tumoren. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
149. **Heyes, D. J., Menon, B. R., Sakuma, M. and Scrutton, N. S.** (2008) Conformational Events during Ternary Enzyme–Substrate Complex Formation Are Rate Limiting in the Catalytic Cycle of the Light-Driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Biochemistry*. 47(41): p. 10991-10998.
150. **Heyes, D. J., Kruk, J. and Hunter, C. N.** (2006) Spectroscopic and kinetic characterization of the light-dependent enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR) using monovinyl and divinyl substrates. *Biochemical Journal*. 394(Pt 1): p. 243-248.
151. **Heyes, D. J. and Hunter, C. N.** (2004) Identification and Characterization of the Product Release Steps within the Catalytic Cycle of Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Biochemistry*. 43(25): p. 8265-8271.
152. **Sytina, O. A., van Stokkum, I. H., van Grondelle, R. and Groot, M. L.** (2011) Single and Multi-Exciton Dynamics in Aqueous Protochlorophyllide Aggregates. *The Journal of Physical Chemistry A*. 115(16): p. 3936-3946.
153. **Sytina, O. A., van Stokkum, I. H., Heyes, D. J., Hunter, C. N., van Grondelle, R. and Groot, M. L.** (2010) Protochlorophyllide Excited-State Dynamics in Organic Solvents Studied by Time-Resolved Visible and Mid-Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*. 114(12): p. 4335-4344.
154. **Griffiths, W. T.** (1978) Reconstitution of Chlorophyllide Formation by Isolated Etioplast Membranes. *Biochemical Journal*. 174(3): p. 681-692.
-

155. **Ford, C., Mitchell, S. and Wang, W.-y.** (1983) Characterization of NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase in the *y-7* and *pc-1 y-7* Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and General Genetics*. 192(1): p. 290-292.
156. **Biebl, H., Allgaier, M., Tindall, B. J., Koblizek, M., Lunsdorf, H., Pukall, R. and Wagner-Dobler, I.** (2005) *Dinoroseobacter shibae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(Pt 3): p. 1089-1096.
157. **Yoon, J. H., Kang, S. J., Lee, M. H., Oh, H. W. and Oh, T. K.** (2006) *Porphyrobacter dokdonensis* sp. nov., isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(Pt 5): p. 1079-1083.
158. **Zeng, Y., Selyanin, V., Lukes, M., Dean, J., Kaftan, D., Feng, F. and Koblizek, M.** (2015) Characterization of the microaerophilic, bacteriochlorophyll *a*-containing bacterium *Gemmatimonas phototrophica* sp. nov., and emended descriptions of the genus *Gemmatimonas* and *Gemmatimonas aurantiaca*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65(8): p. 2410-2419.
159. **Lide, D. R.** (1991) *Handbook of Chemistry and Physics*, 72th ed. CRC Press.
160. **Armstrong, D. R.** (2014) *Structural and Functional Studies of the Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase Enzyme*. The University of Sheffield.
161. **Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. and Tabata, S.** (2002) Complete Genome Structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*. 9(4): p. 123-130.
162. **Yurkov, V., Stackebrandt, E., Holmes, A., Fuerst, J. A., Hugenholtz, P., Golecki, J., Gad'on, N., Gorlenko, V. M., Kompantseva, E. I. and Drews, G.** (1994) Phylogenetic Positions of Novel Aerobic, Bacteriochlorophyll *a*-Containing Bacteria and Description of *Roseococcus thiosulfatophilus* gen. nov., sp. nov., *Erythromicrobium ramosum* gen. nov., sp. nov., and *Erythrobacter litoralis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(3): p. 427-434.
163. **Yoon, J. H., Kang, S. J., Lee, M. H. and Oh, T. K.** (2007) Description of *Sulfitobacter donghicola* sp. nov., isolated from seawater of the East Sea in Korea, transfer of *Staleyia guttiformis* Labrenz *et al.* 2000 to the genus *Sulfitobacter* as *Sulfitobacter guttiformis* comb. nov. and emended description of the genus *Sulfitobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(Pt 8): p. 1788-1792.
164. **Gich, F. and Overmann, J.** (2006) *Sandarakinorhabdus limnophila* gen. nov., sp. nov., a novel bacteriochlorophyll *a*-containing, obligately aerobic bacterium isolated from freshwater lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(Pt 4): p. 847-854.
165. **Wichlacz, P. L., Unz, R. F. and Langworthy, T. A.** (1986) *Acidiphilium angustum* sp. nov. *Acidiphilium facilis* sp. nov. and *Acidiphilium vubrum* sp. nov.: Acidophilic Heterotrophic Bacteria Isolated from Acidic Coal Mine Drainage. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36(2): p. 197-201.

-
166. **Van Trappen, S., Mergaert, J. and Swings, J.** (2004) *Loktanella salsilacus* gen. nov., sp. nov., *Loktanella fryxellensis* sp. nov. and *Loktanella vestfoldensis* sp. nov., new members of the *Rhodobacter* group, isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(Pt 4): p. 1263-1269.
167. **Labrenz, M., Tindall, B. J., Lawson, P. A., Collins, M. D., Schumann, P. and Hirsch, P.** (2000) *Staleyella guttiformis* gen. nov., sp. nov. and *Sulfitobacter brevis* sp. nov., α -3-Proteobacteria from hypersaline, heliothermal and meromictic antarctic Ekho Lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50 (Pt 1): p. 303-313.
168. **Zhang, C. and Kim, S. K.** (2010) Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Marine Drugs*. 8(6): p. 1920-1934.
169. **Lottspeich, F. and Engels, J. W.** (2006) *Bioanalytik*. Springer Spektrum. 2. Auflage.
170. **Senisterra, G. A. and Finerty, P. J., Jr.** (2009) High throughput methods of assessing protein stability and aggregation. *Molecular BioSystems*. 5(3): p. 217-223.
171. **Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. and Singh, R. M. M.** (1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*. 5(2): p. 467-477.
172. **Smith, J. H. C. and Kupke, D. W.** (1956) Some Properties of Extracted Protochlorophyll Holochrome. *Nature*. 178: p. 751.
173. **Krasnovsky, A. A. and Kosobutskaya, L. M.** (1952) Spectral investigations of chlorophyll during its formation in plants and in colloidal solutions of material from etiolated leaves. *Doklady Akademii Nauk*. (85): p. 177-180.
174. **Hoeven, R., Hardman, S. J., Heyes, D. J. and Scrutton, N. S.** (2016) Cross-Species Analysis of Protein Dynamics Associated with Hydride and Proton Transfer in the Catalytic Cycle of the Light-Driven Enzyme Protochlorophyllide Oxidoreductase. *Biochemistry*. 55(6): p. 903-913.
175. **Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D. and Vajda, S.** (2017) The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*. 12(2): p. 255-278.
176. **Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R. and Vajda, S.** (2013) How Good is Automated Protein Docking? *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 81(12): p. 2159-2166.
177. **Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R. and Vajda, S.** (2006) PIPER: An FFT-Based Protein Docking Program with Pairwise Potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 65(2): p. 392-406.
178. **Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. and Camacho, C. J.** (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*. 32(Web Server issue): p. W96-99.
179. **Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. and Camacho, C. J.** (2004) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 20(1): p. 45-50.
180. **Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. and Svergun, D. I.** (2003) *PRIMUS*: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*. 36(5): p. 1277-1282.
-

181. **Merkley, E. D., Rysavy, S., Kahraman, A., Hafen, R. P., Daggett, V. and Adkins, J. N.** (2014) Distance restraints from crosslinking mass spectrometry: Mining a molecular dynamics simulation database to evaluate lysine-lysine distances. *Protein Science*. 23(6): p. 747-759.
182. **Kovermann, M., Rogne, P. and Wolf-Watz, M.** (2016) Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 49: p. e6.
183. **Konrat, R.** (2014) NMR contributions to structural dynamics studies of intrinsically disordered proteins. *Journal of Magnetic Resonance*. 241: p. 74-85.
184. **Kumar, A., Mohanram, H., Kong, K. W., Goh, R., Hoon, S., Lescar, J. and Miserez, A.** (2018) Supramolecular propensity of suckerin proteins is driven by β -sheets and aromatic interactions as revealed by solution NMR. *Biomaterials Science*. 6(9): p. 2440-2447.
185. **Fitter J., G. J., Katsaras J.** (2006) *Neutron Scattering in Biology-Techniques and Applications*. Springer Verlag Berlin. 1st ed.
186. **Frauenfelder, H., Parak, F. and Young, R. D.** (1988) Conformational substates in proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 17: p. 451-479.
187. **Bicout, D. J. and Zaccai, G.** (2001) Protein Flexibility from the Dynamical Transition: A Force Constant Analysis. *Biophysical Journal*. 80(3): p. 1115-1123.
188. **Zaccai, G.** (2000) How Soft Is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering. *Science*. 288(5471): p. 1604-1607.
189. **Ameseder, F., Radulescu, A., Khanef, M., Lohstroh, W. and Stadler, A. M.** (2018) Homogeneous and heterogeneous dynamics in native and denatured bovine serum albumin. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 20(7): p. 5128-5139.
190. **Gholami, S., Nenov, A., Rivalta, I., Bocola, M., Bordbar, A. K., Schwaneberg, U., Davari, M. D. and Garavelli, M.** (2018) Theoretical Model of the Protochlorophyllide Oxidoreductase from a Hierarchy of Protocols. *The Journal of Physical Chemistry B*. 122(31): p. 7668-7681.
191. **Bhabha, G., Lee, J., Ekiert, D. C., Gam, J., Wilson, I. A., Dyson, H. J., Benkovic, S. J. and Wright, P. E.** (2011) A dynamic knockout reveals that conformational fluctuations influence the chemical step of enzyme catalysis. *Science*. 332(6026): p. 234-238.

6 ANHANG

6.1 DNA- und Aminosäuresequenzen

6.1.1 DNA- und Aminosäuresequenzen aller verwendeten LPORs

Die DNA- und Aminosäuresequenzen aller verwendeten LPORs sind im Folgenden dargestellt. Dabei wurde die Aminosäuresequenz über der DNA-Sequenz dargestellt. Die Aminosäure wurde jeweils über der ersten Base des Codons dargestellt. In der Aminosäuresequenz wurde der **N-terminale His₆-tag in rot** und der **C-terminale His₆-tag in blau** dargestellt. Die jeweilige LPOR wurde in grün markiert. Die Schnittstellen der für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden in der DNA-Sequenz unterstrichen.

AnLPOR

```

                His6-tag                                     AnLPOR
    M G S S H H H H H S S G L V P R G S H M E A T
ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGGAGGCCACA
                AnLPOR                                     NdeI
    T P P H V I V T G A S S G V G L H A T K A L V D R
ACACCGCCGCACGTCATCGTCACCGGGCGCCTCGTCCGGCGTGGGCTGCATGCGACAAAGGCGTTGGTTGACCGT
                AnLPOR
    G W H V V M A C R D L A K A A R A A A N L D I N P
GGCTGGCACGTGGTCATGGCCTGCCGCGACCTCGCCAAAGCAGCGCGCGCCGCGCAAATCTGGATATCAATCCG
                AnLPOR
    A S I T P L E I D L G S Q S S V R R F A A D F A A
GCGTCGATCACCCCGCTCGAAATCGACCTCGGATCGCAGTCGAGCGTCCGGCGCTTCGCGGCCGATTTTCGCCGCG
                AnLPOR
    L V K P L D A L V C N A A V Y L P L L K T P A R S
CTGGTAAAACCGCTCGATGCCCTGGTCTGCAACGCGGCGGTCTATCTGCCGTTGTTGAAAACCCCGCGCGCTCG
                AnLPOR
    P E G F E I S V A T N H F G H F L L S H L L L P H
CCCGAAGGCTTCGAGATCAGCGTGGCGACCAATCATTTTCGGCCATTTTCTGTTAAGCCATTTGCTGCTGCCGCAT
                AnLPOR
    L Q S P G R R A K R L V T L G T V T A N S E E F G
CTGCAATCGCCGGGCCCGCGTGCGAAACGCCTGGTCACACTCGGCACCGTCACCGCCAATTCGAGGAATTCGGC
                AnLPOR
    G K I P I P A P A N L G A L A G L E A G F R A P V
GGCAAATCCCAATCCCCGCGCCAGCCAACCTAGGCGCGCTGGCAGGGCTGGAAGCTGGCTTCCGCGCACCCGTC
                AnLPOR
    A M I D G K K F K P G K A Y K D S K L C N M I I S
GCCATGATCGACGGCAAAAAGTTCAAGCCAGGCAAAGCCTATAAAGACAGCAAATTATGCAACATGATCATCAGC
                AnLPOR
    R E F H R R Y H Q N T G I I F N T L Y P G C V A D
CGCGAATTTACCGGCGCTACCACCAGAACACCGGCATCATCTTCAACACCCTCTATCCGGGTTGCGTGGCGGAC
                AnLPOR
    T A L F R D A P K L F Q T I F P W F Q K T I T K G
ACGGCATTGTTCCGTGACGCCCCAAAAGTGTCCAGACGATTTTCCCGTGGTTTCAAAGACCATCACCAAAGGC
                AnLPOR
    Y V S Q A L A G T R V A Q V V A D D A F A Q S G V
TACGTCTCGCAGGCGTTAGCCGGTACGCGCGTCGCCAAGTGGTGGCCGATGACGCGTTTGCGCAATCGGGCGTC
                AnLPOR
    H W S W G N R Q L P S R D A F S Q P L S S A A N D
CACTGGAGCTGGGGAAACCGCAATTGCCAAGCCGCGATGCGTTTTTCGCGAGCCGCTATCGTCCGGCCGGAACGAC
                AnLPOR
    A A R A A R L W E L T A E L V G R T P P T G *
GCAGCGCGGGCCGCGCCTGTGGAACTGACCGCGGAGTTGGTCCGGTTCGCACACCACCAACGGGATAAGTCGAC
                SalI
    
```

AtLPORC

M A L Q A A Y S L L P S T I S I Q K E G K F N A
ACCATGGCCCTGCAAGCTGCTTATTCCCTGTTGCCGAGCACGATTAGCATTCAAAAAGGAAGGTAAGTTTAACGCC
S L K E T T F T G S S F S N H L R A E K I S T L L
AGCTTGAAAGAAACCACGTTTACGGGCAGCTCTTTTACGCAACCACCTTGCGTGCAGAGAAAAATCAGCACGCTGCTG
T I K E Q R R Q K P R F S T G I R A Q T V T A T P
ACCATTAAAGAACAGCGTCGTCAGAAACCACGCTTACGACGCGGTATTTCGTGCGCAGACCGTTACGGCAACCCCA
P A N E A S P E Q K K T E R K G T A V I T G A S S
CCGGCAAATGAAGCATCCCCGGAGCAAAAAAGACCGAGCGCAAGGGTACCGCGGTGATTACTGGTGCATCGAGC
G L G L A T A K A L A D T G K W H V I M A C R N F
GGCCTGGGCCTGGCGACCGCGAAGGCTCTGGCGGACACTGGTAAGTGGCATGTGATCATGGCGTGTGTAACCTTC
L K A E K A A R S V G M S K E D Y T V M H L D L A
CTGAAAGCCGAGAAAGCTGCGCGTAGCGTTGGTATGTCTAAAGAAGATTATACCGTTATGCATCTGGACCTGGCG
S L E S V K Q F V E N F R R T E Q P L D V L V C N
AGCTTAGAGAGCGTGAAACAGTTTGTGCGAGAATTTCCGTCGCACCGAGCAGCCGTTGGATGTCTCTGCTGCAAT
A A V Y Q P T A K E P S F T A E G F E I S V G T N
GCAGCAGTCTACCAACCGACCGCGAAAGAACCTAGCTTTACCGCCGAGGGCTTTGAGATCAGCGTGGGTACCAAC
H L G H F L L S R L L L D D L K K S D Y P S K R M
CACCTGGGCCATTTCTGCTGAGCCGCCTTCTGCTGGACGACCTGAAGAAATCCGATTACCCGAGCAAGCGCATG
I I V G S I T G N T N T L A G N V P P K A N L G D
ATCATTGTGGGTTTCGATCACCGGTAATACGAACACCCTGGCGGGTAACGTGCCGCCGAAGGCAAATCTGGGCGAT
L R G L A S G L N G Q N S S M I D G G E F D G A K
CTGCGTGGTTTTGGCCAGCGGTCTGAATGGTCAGAACTCCTCTATGATTGATGGCGGCGAGTTTGACGGCGCGAAA
A Y K D S K V C N M L T M Q E L H R R Y H E E T G
GCGTACAAAGATAGCAAGGTTTGTAAACATGTTGACGATGCAAGAGCTGCACCGTTCGTTATCACGAAGAAACCGGC
V T F A S L Y P G C I A T T G L F R E H I P L F R
GTTACCTTCGCGAGCCTGTATCCGGGTTGCATCGCGACGACGGGTCTGTTCCGTTGAGCACATCCCGCTGTTTCGC
L L F P P F Q K Y I T K G Y V S E E E A G K R L A
CTGCTGTTTTCCGCCGTTTCCAAAAGTACATTACCAAGGGTTACGTCAGCGAAGAAGAGGCCGGCAAACGCCCTGGCA
Q V V S D P S L G K S G V Y W S W N N N S S S F E
CAGGTTGTGTCCGACCCGTCCTACTGGGTAAGAGCGGCTCTACTGGTCTTGGGAATAACAATAGCTCTAGCTTCGAG
N Q L S K E A S D A E K A K K L W E V S E K L V G
AACCAGCTGAGCAAAGAGGCGAGCGACGCCGAAAAGGCTAAAAAGCTGTGGGAAGTTAGCGAGAAATTGGTCGGT
L A L E H H H H H H *
CTGGCGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGAT
XhoI

DsLPOR

M G S S H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M T L D DsLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACCCCTTGAC
P M P R A I V T G A S S G V G L H A T K S L I D R DsLPOR NdeI
 CCCATGCCCCGTGCCATCGTCACCGGCGCCTCCTCCGGGTGGGCTGCACGCGACGAAATCCCTGATCGACCGG
G W H V T M A C R D L A K A E A A A R S L D L D P DsLPOR
 GGCTGGCATGTGACCATGGCCTGCCGGGACCTGGCCAAGGCCGAGGCGGCGGGTCGCTCGATCTGGACCCG
G R Y A L A H L D L G S L A S V R A F H A N I A R DsLPOR
 GGCCGCTACGCGCTGGCCCATCTGGACCTCGGATCGCTGGCCAGCGTGC GCGCCTTCCACGCCAACATCGCCCGC
D H D S L D A L V C N A A V Y K P R L T Q P G R S DsLPOR
 GACCATGACAGCCTCGATGCGCTGGTGTGCAACGCCGCGGTCTATAAGCCCCGGCTGACCCAGCCCGGCCGTCC
P D G F E I S V A T N Y F G H F L L A N L M L P L DsLPOR
 CCCGACGGGTTTCGAGATCAGCGTGC GACCAACTATTTCCGGGCATTTCTGCTCGCCAACCTGATGCTGCCGCTG
L E G A P S P R L I T L G G T V T A N S E E F G G K DsLPOR
 CTGGAGGGCGCCCCGTCCCCGCGGCTGATCACCCCTGGGCACCGTGACCGCCAATTCCGAGGAATTCGGCGGCAAG
V P I P A P A D L G D F A G L K A G F R A P V A M DsLPOR
 GTCCCGATCCCCGCCCCGGCGGACCTGGGCGATTTTGCCGGGCTGAAGGCCGGCTTCCGCGCCCCGGTGGCGATG
I D G K P F K A G K A Y K D S K L C T M M M S R E DsLPOR
 ATCGACGGCAAGCCGTTCAAGGCGGGCAAGGCCTACAAGGACAGCAAGCTCTGCACCATGATGATGAGCCGGGAG
L H T R H H A R T G I V F A T L Y P G C V A D T P DsLPOR
 CTGCACACCCGCCACCACGCGCGGACCGGGATCGTCTTCGCCACGCTCTATCCCGGCTGCGTCGCGGACACGCCG
L F R D T P K A F Q T I F P W F Q K N V T K G Y V DsLPOR
 CTGTTCCGCGACACGCCCAAGGCGTTCCAGACGATCTTCCCTGGTTCCAGAAAAACGTCACCAAGGGCTATGTC
S Q A L S G E R V A M V V A D P E F A Q S G V H W DsLPOR
 AGCCAGGCCCTGTCCGGCGAACGGGTGCCATGGTTCGTGGCCGACCCGGAGTTTCGCGCAGTCCGGCGTGCATTGG
S W G N R Q R E G R S A F A Q G L S T K A T D A A DsLPOR
 AGCTGGGGCAACCGCCAGCGCGAAGGCCGAGCGCCTTTGCCAGGGCCTGTCCACCAAGGCCACGGATGCCGCC
R S A E L W E L T A A L T G L T T P A E P V A A * DsLPOR
 CGCTCCGCAGAGCTGTGGGAGCTGACCGCAGCCCTCACCGGGCTGACCACCCCCGCCGAGCCGGTCCGCCCTGA

GTCGACAAG
 SalI

EbLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M A T G EbLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGGCTACGGGT
H T P I C I I T G A S S G I G L W A T K A L V T R EbLPOR NdeI
 CACACGCCGATCTGCATCATCACCGGGGCTCGTTCGGGCATCGGCCTGTGGGCGACCAAGGCGCTCGTACAGCGC
G W H V V M A C R D T A K A E A A A R E I G I A P EbLPOR
 GGCTGGCACGTCGTCATGGCGTGCCGCGACACCGCCAAGGCCGAGGCCCGCGCGAGATCGGCATCGCGCCG
E G R T I M R L D L G S L A G V R A F A E E F R A EbLPOR
 GAAGGCCGACGATCATGCGGCTCGATCTCGGCAGTCTTGGCGGGCGTGCGCGCCTTCGCGGAGGAATTCCGTGCG
F D R P L D A L V C N A A T Y M P R L A E P L R S EbLPOR
 TTCGACCGCCCGCTCGACGCGCTGGTCTGCAACGCCGACCTATATGCCGCGCCTTCAGAGCCGCTGCGCTCG
P E G F E L S V A T N Y F G H F L L A N L L L D E EbLPOR
 CCGGAAGGTTTCGAGCTTTCGTGGCGACCAATTATTTTCGGGCATTTCTGCTGGCGAACCTGCTGCTCGACGAA
L V R A R D A R L V T L G G T V T A N S E E F G G K EbLPOR
 CTCGTCCGGGCGCGGACGCGGCTGGTGACGCTCGGCACGGTGACCGCAATTCCGAGGAATTCGGCGGTAAG
I P I P A P A D L G D F A G L K A G F T G P H A M EbLPOR
 ATCCCGATTCCCGCCCCCGCGACCTCGGCGATTTTCGAGGGCTGAAGGGGGCTTACCAGGGCCGACGCGATG
I D G K P F K P G K A Y K D S K L A C M M M S R E EbLPOR
 ATCGACGGCAAGCCGTTCAAGCCGGGCAAGGCCTACAAGGACAGCAAGCTCGCCTGCATGATGATGAGCCGCGAA
F H A R F H E S T G I V F T T L Y P G C V A D T P EbLPOR
 TTCCACGCCCCTTCCACGAGTCGACCGGCATCGTCTTACCACGCTCTATCCCGGCTGCGTCGCGGACACGCCG
L F R H A P R A F Q R I F P W F Q K N I T G G Y V EbLPOR
 CTGTTCCGCCATGCGCCGAGGGCCTTCCAGCGGATCTTCCCGTGGTTCCAGAAGAACATCACCGGGGGCTATGTC
S Q P L A G E R V A D V V A D P A F A R S G V H W EbLPOR
 TCGCAGCCGCTCGCGGGGGAGCGGGTTCGCGGACGTGGTTGCCGATCCGGCCTTCGCGCGATCGGGCGTCCACTGG
S W G N R Q R E G R A A F A Q S L S P R A T D A A EbLPOR
 AGCTGGGGCAATCGCCAGCGCGAAGGCCGCGGGCCTTCGCCCAGAGCCTGTGCGCCGAGGGCCACCGACGCTGCC
R A R E L W D L T A R L V G L E E R V R E P A * EbLPOR
 CGCGCGCGCAATTGTGGGACCTCACCGCAAGGCTCGTTCGGACTGGAGGAGCGCGTCCGCGAACCCCGGTGACTC
XhoI

GAGCAC
XhoI

EILPOR (N-terminaler His₆-tag)

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M I A G EILPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGATTGCGGGT
Q T P V C I I T G A S S EILPOR G I G L W A T R A L M A R NdeI
 CAAACACCTGTCTGCATCATCACGGGGGCTCTTCGGGCATCGGGCTGTGGGCCACCAGGGCGCTGATGGCGCGC
G W H V V M A C R D T A K A E A A A R E I G L A P EILPOR
 GGATGGCATGTCTGCATGGCCTGCCGCGACACGGCGAAGGCCGAAGCGGCCGCGCGAGATCGGCCTTGCCCC
E G R T I M Q L D L G T L S G V R G F V S E F R M EILPOR
 GAAGGCCGACGATCATGCAGCTCGATCTCGGCACGCTTTCGGGGGTGCGCGGCTTCGTCAGCGAATTCGCGCATG
L G R P L D A L V C N A A T Y M P R L T A P L R S EILPOR
 CTCGGCCGTCCGCTCGACGCGCTGGTCTGCAATGCGGCGACTACATGCCGCGCCTGACTGCGCCGCTGCGCTCG
P E G Y E L S V A I N Y F G H F L L A N L L L E D EILPOR
 CCCGAGGGGTATGAGCTTTCGTCGCGATCAATTATTTGCGTCATTTCTGCTCGCGAACCTGTGCTCGAAGAT
L G R A R D P R L V T L G T V T A N S E E F G G R EILPOR
 CTCGGGCGGGCGCGGATCCCCGGCTCGTGACGCTCGGCACGGTGACTGCCAATTCGAGGAGTTCGGCGGCAGG
I P I P A P A D L G D F E G L K A G F K D P V A M EILPOR
 ATCCCCATAACCCGCGCCCGCGGATCTCGGCGATTTTCGAGGGGCTGAAGGCAGGCTTCAAGGATCCGGTTGCGATG
I D G N P F K P G K A Y K D S K L A C M M M S R E EILPOR
 ATCGACGGCAATCCGTTCAAGCCGGGCAAGGCATACAAGGATTCAAAGCTCGCCTGCATGATGATGAGCCGCGAA
L H A R F H D R T G I V F T T L Y P G C V A D T P EILPOR
 CTGCACGCGGATTCCATGACCGCACCGGCATCGTCTTACCACGCTCTATCCCGGCTGCGTGGCCGACACGCCG
L F R H A P R A F Q R I F P W F Q K N V T G G Y V EILPOR
 CTGTTCCGCCACGCGCCGCGCCTTCCAGCGCATCTTCCCGTGGTTCAGAAGAACGTCACCGGAGGCTATGTC
S Q P L A G E R V A D V V A D P A F A R S G V H W EILPOR
 TCGCAGCCGCTTGCGGGCGAACGGGTGCGGATGTGGTTCGCCACCCGGCCTTTGCGCGCTCGGGCGTTCACTGG
S W G N R Q R E G R E A F A Q S L S P K A T D A A EILPOR
 AGCTGGGGCAACCGCCAGCGCGAAGGGCGCGAGGCGTTCCGCCAGAGCCTGTGCCAAAGGCCACCGATGCCCGC
R A R E L W D L T A R L V G L E Q R V R E P A * EILPOR
 CGGGCACGCGAATTGTGGGACCTTACCGCGCGGCTCGTTCGGGCTGGAGCAGCGCTCCGCGAACCGGCGTGAGTC
XhoI

GACAAGCTT
XhoI

E/LPOR (C-terminaler His₆-tag)

M I A G Q T P V C I I T G A S S G I G L W A T
 ATACATATGATTGCGGGTCAAACACCTGTCTGCATCATCACGGGGGCTCTTCGGGCATCGGGCTGTGGGCCACC
 R A L M A R G W H V V M A C R D T A K A E A A A R
 AGGGCGCTGATGGCGCGCGGATGGCATGTGTCATGGCCTGCCGCGACACGGCGAAGGCCGAAGCGGCCGCGCGC
 E I G L A P E G R T I M Q L D L G T L S G V R G F
 GAGATCGGCCTTGCCCCGAAGGCCGCACGATCATGCAGCTCGATCTCGGCACGCTTTCGGGGGTGCGCGGCTTC
 V S E F R M L G R P L D A L V C N A A T Y M P R L
 GTCAGCGAATTCCGCATGCTCGGCCGTCCGCTCGACGCGCTGGTCTGCAATGCGGCGACCTACATGCCGCGCCTG
 T A P L R S P E G Y E L S V A I N Y F G H F L L A
 ACTGCGCCGCTGCGCTCGCCCGAGGGGTATGAGCTTTCGTCGCGATCAATTATTCGGTCATTCCTGCTCGCG
 N L L L E D L G R A R D P R L V T L G T V T A N S
 AACCTGCTGCTCGAAGATCTCGGGCGGGCGCGGATCCCCGGCTCGTGACGCTCGGCACGGTACTGCCAATTC
 E E F G G R I P I P A P A D L G D F E G L K A G F
 GAGGAGTTCGGCGGCAGGATCCCCATACCCGCGCCCGCCGATCTCGGCGATTTCGAGGGGCTGAAGGCAGGCTTC
 K D P V A M I D G N P F K P G K A Y K D S K L A C
 AAGGATCCGGTTGCGATGATCGACGGCAATCCGTTCAAGCCGGGCAAGGCATACAAGGATTCAAAGCTCGCCTGC
 M M M S R E L H A R F H D R T G I V F T T L Y P G
 ATGATGATGAGCCGGAACCTGCACGCGCGATTCCATGACCGCACCGGCATCGTCTTCACCACGCTCTATCCCGGC
 C V A D T P L F R H A P R A F Q R I F P W F Q K N
 TGCCTGGCCGACACGCCGCTGTTCCGCCACGCGCCGCGCCTTCCAGCGCATCTTCCCGTGGTTCAGAAGAAC
 V T G G Y V S Q P L A G E R V A D V V A D P A F A
 GTCACCGGAGGCTATGTCTCGCAGCCGCTTGCGGGGCAACGGGTCGCGGATGTGGTTCGCCGACCCGGCCTTTGCC
 R S G V H W S W G N R Q R E G R E A F A Q S L S P
 CGCTCGGGCGTTCACTGGAGCTGGGGCAACCGCCAGCGCGAAGGGCGCGAGGCGTTCGCCAGAGCCTGTCCGCA
 K A T D A A R A R E L W D L T A R L V G L E Q R V
 AAGGCCACCGATGCCGCGCGGGCACGCAATTGTGGGACCTTACCGCGCGGCTCGTTCGGGCTGGAGCAGCGCGTC
 R E P A L E H H H H H H H *
 CGCGAACCGGCGCTCGAGCACCACCACCACCACCCTGA
 XhoI

GpLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M S T A GpLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTCAACTGCT
P T C I I T G A S S G V G L Y G A K S L A A R G W GpLPOR NdeI
 CCTACCTGTATCATCACCGGCGCCTCGTCTGGCGTTCGGGTTGTACGGCGCCAAATCACTGGCCGCTCGTGGTTGG
H V V M A C R D L A K A T A A A D A L G I P K A S GpLPOR
 CATGTGGTGTATGGCCTGCCGCGATCTCGCCAAGGCTACGGCGGCCGAGACGCCCTGGGGATCCCCAAGGCGAGC
R T L M P I D L G S Q A S V R A F V E A F R A T G GpLPOR
 CGTACCCTGATGCCCATCGATCTGGGCTCCCAGGCCAGCGTGC GCGCCTTTGTTCGAGGCCCTTTCGCGCCACCGGC
R A L D A L V C N A A V Y L P R L T E P M R S P E GpLPOR
 CGGGCGCTCGACGCGCTGGTGTGCAACGCAGCCGTGTACTGCCACGCCTCACGGAGCCCATGCGATCGCCGGAG
G Y E I S V A T N H F G H F L L A N L L L P D L Q GpLPOR
 GGCTACGAAATCAGTGTGGCCACCAACCACTTCGGCCACTTTCTGCTCGCCAATCTCCTCCTCCCCGATTGCGAG
R S T H A S R R L I I L G G T V T A N Y E E F G G K GpLPOR
 CGCAGCACGCACGCGTTCGCGCCGCCTCATCATTCTGGGCACGGTAACCGCCAACCTACGAAGAGTTCGGCGGCAAG
I P I P A P A D L G N L E G L E A G F L A P I A M GpLPOR
 ATCCCCATTCCGGCACCGGCAGACCTCGGCAACCTCGAGGGGCTGGAAGCCGGGTTTCTGGCGCCCATCGCCATG
L N G K A F K P G K A Y K D S K L C N M I T G R E GpLPOR
 CTCAACGGCAAGGCGTTCAAGCCGGGGAAAGCGTATAAGGACAGCAAGCTGTGCAATATGATCACCGGGCGTGAA
L H R R Y H G Q T G I V F N T L Y P G C V A D T P GpLPOR
 CTGCATCGCCGGTATCACGGACAGACGGGGATCGTCTTCAACACGCTCTATCCCGGATGTGTGGCTGACACGCCG
L F R H T P P A F Q R I F P W F Q K N I T K G Y V GpLPOR
 CTGTTCCGGCACACACCGCCGGCATTCCAGCGCATCTTCCCGTGGTTTCAAAAGAACATCACCAAGGGGTACGTG
T Q E L A G D R L A Q V V A D P A F G S R S G V H GpLPOR
 ACGCAGGAGCTGGCGGGTGACCGCCTGGCGCAGGTGGTTGCTGATCCGGCCTTTGGGAGCCGCGAGCGGAGTGCAC
W S W G N R Q K E G R E A F A Q Q L T A R A Q D Q GpLPOR
 TGGAGCTGGGGCAACCGCCAGAAGGAGGGGCGGAAGCATTTGCGCAGCAACTCACCGCGCGCGCAGGACCAG
A L G E R L W T L T A G C V G M G S * GpLPOR
 GCATTGGGCGAACGCCTGTGGACGCTGACGGCGGGGTGCGTGGGGATGGGGAGTTGAGTCGACAAGCTT
Sall

HvLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S S G L V P R G S H M A L Q HvLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGGCGCTGCAG
L L P S T L S V P K K G S S M G A V A V K D T A A HvLPOR NdeI
 CTGCTGCCGAGCACCTGAGCGTGCCGAAAAAGGCAGCAGCATGGGCGCGGTGGCGGTGAAAGATACCGCGGGC
F L G V S S K A K K A S L A V R T Q V A T A P S P HvLPOR
 TTCCTGGGCGTGAGCAGCAAAGCGAAAAAGCGAGCCTGGCGGTGCGCACCCAGGTGGCGACCGCGCCGAGCCCC
V T T S P G S T A S S P S G K K T L R Q G V V V I HvLPOR
 GTGACCACCAGCCCCGGGCAGCACCGCGAGCAGCCCCGAGCGGCAAAAAAACCTGCGCCAGGGCGTGGTGGTGATC
T G A S S G L G L A A A K A L A E T G K W H V V M HvLPOR
 ACCGGCGCGAGCAGCGGCCTGGGCCTGGCGGCGGCGAAAGCGCTGGCGGAAACCGCAAATGGCATGTGGTGATG
A C R D F L K A S K A A K A A G M A D G S Y T V M HvLPOR
 GCGTGCCGCGATTTCTGAAAGCGAGCAAAGCGGCGAAAGCGGCGGGCATGGCGGATGGCAGCTATACCGTGATG
H L D L A S L D S V R Q F V D A F R R A E M P L D HvLPOR
 CATCTGGATCTGGCGAGCCTGGATAGCGTGCGCCAGTTCGTGGATGCGTTCGCCGCGCGAAATGCCGCTGGAT
V L V C N A A I Y R P T A R T P T F T A D G H E M HvLPOR
 GTGCTGGTGTGCAACGCGGCATCTATCGCCCCACCGCGCGCACCCCGACCTTCACCGCGGATGGCCATGAAATG
S V G V N H L G H F L L A R L L M E D L Q K S D Y HvLPOR
 AGCGTGGGCGTGAACCATCTGGGCCATTTCTGCTGGCGCGCCTGCTGATGGAAGATCTGCAGAAAAGCGATTAT
P S R R M V I V G S I T G N S N T L A G N V P P K HvLPOR
 CCGAGCCGCGCATGGTGATCGTGGGCAGCATCACCGGCAACAGCAACACCCTGGCGGGCAACGTGCCGCCGAAA
A S L G D L R G L A G G L S G A S G S A M I D G D HvLPOR
 GCGAGCCTGGGCGATCTGCGCGGCCTGGCGGGCGGCTGAGCGGCGGAGCGGCAGCGGATGATCGATGGCGAT
E S F D G A K A Y K D S K V C N M L T M Q E F H R HvLPOR
 GAGAGCTTCGATGGCGGAAAGCGTATAAAGATAGCAAAGTGTGCAACATGCTGACCATGCAGGAATTCCATCGC
R Y H E E T G I T F S S L Y P G C I A T T G L F R HvLPOR
 CGCTATCATGAAGAAACCGGCATCACCTTCAGCAGCCTGTATCCGGGCTGCATCGCGACCACCGGCCTGTTCGGC
E H I P L F R T L F P P F Q K F V T K G F V S E A HvLPOR
 GAACATATCCCGCTGTTCCGCACCCTGTTCCCGCCGTTCCAGAAATTCGTGACCAAAGGCTTCGTGAGCGAAGCG
E S G K R L A Q V V A E P V L T K S G V Y W S W N HvLPOR
 GAAAGCGGCAAACGCCTGGCGCAGGTGGTGGCGGAACCGGTGCTGACCAAAGCGGCGTGTATTGGAGCTGGAAC
K D S A S F E N Q L S Q E A S D P E K A R K V W E HvLPOR
 AAAGATAGCGGAGCTTCGAAAACCAGCTGAGCCAGGAAGCGAGCGATCCGGAAAAAGCGCGCAAAGTGTGGGAA
L S E K L V G L A * HvLPOR
 CTGAGCGAAAAACTGGTGGGCCTGGCGTGAGTCGACAAGCTT
SaII

LfLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M S V Q LfLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGAGTGTTCAA
H H P L C I V T G A S S G V G L H S T K A L I D K LfLPOR NdeI
 CACCATCCCCTTTGCATCGTCACCGGGGCTCCTCCGGGTTGGCCTGCACAGCACGAAGGCCCTGATTGACAAG
G W H V I M A C R D L E K A A A A A Q S L N L Q R LfLPOR
 GGATGGCACGTCATCATGGCGTGTCTGATCTGGAAAAGGCAGCCGCGCAATCCCTGAATCTCCAGCGC
D M F D V M H L D L G S L D S V R A F H A A Y R A LfLPOR
 GACATGTTTCGACGTTATGCACCTCGATCTAGGGTCGCTGGACAGCGTGC GCGCTTTTCATGCCGCTATCGGGC
Q N R A L D A L V C N A A T Y L P Q L K V P L R S LfLPOR
 CAGAACAGGGCGCTTGATGCGCTCGTGTGCAACGCCGCGACTATCTGCCGCAACTCAAGGTGCCGCTGAGGTCG
P D G Y E I S V A T N Y L G H F L L A N L M L E D LfLPOR
 CCCGACGGGTATGAGATCAGTGTGGCAACCAACTACCTCGGGCACTTCTGCTGGCGAACCTGATGCTGGAGGAT
L Q K S P A P R L V T L G G T V T A N S E E F G G K LfLPOR
 CTGCAGAAATCCCCGCCCCGCGACTGGTGACGCTTGGCACTGTGACGGCCAATTCCGAAGAATTCGGTGGCAAG
V P I P A P A D L G D F Q G M K A G F K D P I A M LfLPOR
 GTGCCAATCCCTGCGCCC GCGATCTGGGCGATTTTCAGGGGATGAAAGCCGGTTTTAAGGATCCGATCGCGAT
I D G K P F K P G K A Y K D S K L C C M M M S R E LfLPOR
 ATCGATGGCAAACCTTCAAGCCGGGAAAGGCATACAGGACAGCAAGCTGTGCTGCATGATGATGAGCCGTGAA
L H A R F H D R T G I V F S T L Y P G C V A D T P LfLPOR
 TTGCATGCCAGATTCCATGACCGGACCGGCATCGTGTTCAGCACGCTTTATCCCGGCTGTGTCGCTGACACGCC
L F R N A P R L F Q N I F P W F Q K K I T K G Y V LfLPOR
 TTGTTCCGCAACGCGCCGCGCCTGTTTCAGAACATCTTTCCCTGGTTTTCAAAAGAAGATCACCAAGGGTTACGTG
S Q P L S G E R V A Q V V T D P D F A R S G V H W LfLPOR
 TCTCAGCCCCTGTCCGGCGAACGCGTGCACAGGTGGTGACAGACCCCCGACTTTGCCCGGTCCGGCGTCCATTGG
S W G N R Q E Q G R K A F S Q S L S S K A T D T T LfLPOR
 AGTTGGGAAACCGCCAGGAGCAGGGTCGAAAGGCGTTTTTCGCAAAGCCTGTCTCCAAGGCGACTGACACGACG
R S E T L W N L S A A L V R I D V S G R P L LfLPOR *
 CGAAGTGAGACGCTTTGGAACCTCAGCGCAGCGCTGGTGC GGATAGATGTCAGCGGCAGGCCGTTGTGAGTCCGAC
SaI I

LvLPOR

M G S S H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M P Q D LvLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGCCACAAGAT
N Q P L A I V T G A S S G G V G L H T T N A L I G R LvLPOR NdeI
 AATCAGCCACTTGCAATCGTCACCGGTGCCTCCTCGGGTGTGGTCTGCATACCACTAATGCGCTGATTGGTCTG
G W H V I M A C R D L A K A E T A A R S L D M A S LvLPOR
 GGTGGCACGTTATCATGGCCTGCCGTGACCTGGCGAAAAGCCGAAACGGCAGCGCGCTCACTGGATATGGCGTCT
G S Y E L A H I D L G S L D S V R A F Y A G F R A LvLPOR
 GGTAGCTATGAACTGGCGCACATCGATCTGGGCTCCCTGGATAGCGTCCGTGCGTTCTACGCGGGTTTTTCGTGCG
R G V P L D A L V C N A A V Y L P L L K T P A R S LvLPOR
 CGTGGCGTCCCGCTGGACGCGCTGGTGTGTAACGCCGAGTTTATCTGCCGCTGCTGAAAACCCCGGCGGTAGC
P E G F E I S V A T N Y F G H F L L A N L M L A D LvLPOR
 CCTGAGGGCTTTGAAATCAGCGTGGCAACCAACTATTTTGGTCATTTCTTACTGGCAAATCTGATGCTCGCAGAT
L Q K S A A P R L I T L G G T V T A N S E E F G G K LvLPOR
 CTGCAGAAAAGCGCGGCACCGCGCCTGATTACCCTGGGTACCGTGACCGCGAACAGCGAAGAATTCGGCGGCAAG
V P I P A P A D L G E L Q G L K A G F K A P V A M LvLPOR
 GTTCCGATCCCGCTCCGGCCGATCTGGGTGAGCTGCAAGGTTTGAAGGCTGGTTTCAAGGCTCCGGTTGCAATG
I D G K P F K A G K A Y K D S K L G T M V M S R E LvLPOR
 ATCGACGGTAAGCCGTTCAAGGCTGGCAAGGCCTACAAAGATAGCAAACCTGGGTACGATGGTGATGAGCCGCGAG
L H T R F H D E T G I V F S T L Y P G C V A D T P LvLPOR
 CTGCACACGCGCTTTCATGACGAAACTGGTATTGTCTTTAGCACCTTGTACCCGGGTTGCGTCGCGGACACGCCG
L F R N A P P L F Q K V F P W F Q K N I T K G Y V LvLPOR
 TTGTTTCGTAATGCGCCGCGGTTGTTCCAAAAAGTGTTCCTTGGTTCCAGAAAAACATTACCAAGGGCTACGTG
S Q S L S G E R V A Q V V A D P G F S Q S G V H W LvLPOR
 AGCCAAAGCCTGAGCGGCGAACGTGTTGCGCAAGTTGTTGCCGACCCGGGCTTCAGCCAGAGCGGTGTCCACTGG
S W G N R Q R E G R K A F S Q G L S I K A T D A E LvLPOR
 TCTTGGGGTAACCGTCAGCGCGAGGGTTCGTAAGGCATTTCAGCCAGGGTCTGTCCATTAAAGCCACCGACGCGGAG
R S R E L W D L T A G L V G L N LvLPOR *
 CGCAGCCGTGAGCTGTGGGACCTGACGGCTGGCCTGGTGGGCTTGAATTAAGTCGACAAGCTT
SaII

PdLPOR

M G S S H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M T D L PdLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACCGACCTT
P K K T A L V T G A S S G V G L W S A K A L A D R PdLPOR NdeI
 CCGAAAAAGACAGCCCTCGTTACCGGAGCATCCTCGGGCGTGGGCTTGTGGAGCGCAAAGGCGCTCGCCGATCGC
G W H V I M A C R D L A K A E S A A R E A G I A P PdLPOR
 GGCTGGCATGTCATCATGGCCTGCCGCGACCTCGCCAAGGCAGAATCCGCCGCCAGGGAGGCGGGGATCGCTCCT
A N R T L L H V D L A D F A S V R A L A E A A R E PdLPOR
 GCAAACCGTACCTTGCTGCATGTGCATCTCGCCGATTTTCGCCAGCGTGC GCGCGCTGGCCGAAGCGGCGGGAG
T V R A G G G A L D A L V L N A A V Y L P R A E A PdLPOR
 ACAGTGC GCGCAGGCGGCGGCGGCTTGATGCACTCGTTCTCAACGCTGCCGTCTACCTGCCGCGCGCCGAGGCA
P Q R N A D G Y E I S V A T N Y L G H F L L A N L PdLPOR
 CCGCAACGCAATGCCGATGGTTACGAAATTTTCGGTGGCGACCAACTATCTCGCCATTTCTCTGCTCGCCAACCTG
L L P D L E A A P A P R L V T L G T V T A N S E E PdLPOR
 CTCCTGCCCCGACCTCGAGGCCGCCCCGCTCCGCGGTGVTACGCTCGGAACGGTAACAGCCAATTCGAGGAA
F G G K I P I P A P A D L G D L E G L E A G F R D PdLPOR
 TTCGGAGGCAAGATCCCGATCCCCGCTCCTGCCGATCTGGGGACCTCGAAGGCCTTGAAGCCGTTTCAGGGAC
P V A M I D G K P F K P G K A Y K D S K L A L M I PdLPOR
 CCGGTGCGGATGATCGACGGCAAGCCTTTCAAGCCCGCAAGGCCTACAAGGACTCAAAGCTTGCACTGATGATC
M S R E L H A R F H D K T G I I F A T L Y P G C V PdLPOR
 ATGAGCCGCGAGCTGCACGCGCGGTTTTACGACAAGACGGGGATCATCTTCGCTACACTTTACCCCGCTGCGTT
A D T P L F R H A P K A F Q T I F P W F Q K N I T PdLPOR
 GCCGACACACCACTGTTCCGCCATGCGCCCAAGGCATTCAGACCATTTTCCCGTGGTTTCAGAAGAACATCACC
K G Y V S Q P L S G E R V A Q V V A D P D F T R S PdLPOR
 AAGGGCTATGTCTCGCAGCCGCTCTCGGGCGAGCGGGTGGCGCAGGTTCGTGGCCGATCCGGACTTCACCCGCTCG
G V H W S W G N R Q K P G G A Q A F A Q P L S S K A PdLPOR
 GGCGTCCACTGGAGCTGGGGCAACCGCCAGAAGCCGGCGCACAGGCCTTTGCCCAACCCTTGTCAAGCAAGGCC
E N A H R A A R L W D L S A K L V G L E D A R I G PdLPOR
 GAGAACGCCCATCGCGCCGCACGCCTGTGGGATCTGAGCGCCAAGCTGGTTCGGGCTTGAGGACGCGCGGATCGGG
E P A * PdLPOR
 GAACCGGCCTAGGTCGACAAGCTT
SalI

SaLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M S I Q SaLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGTCCATCCAA
P V V I I T G A S S G V G L W A A R S L A T R G W SaLPOR NdeI
 CCAGTGGTGATCATTACCGGCGCCTCGTTCGGGCGTTGGCCTGTGGGCCGCCAGATCGCTGGCGACGCGGGCTGG
L V I M A C R D L A K A E A A A T E I G I P A E S SaLPOR
 CTCGTATCATATGGCCTGCCGCGATCTCGCCAAGGCCGAAGCCGCCGCGACGGAAATCGGCATCCCGGCCGAAAGC
R R I M P I D L G D Q A S V R K F A D E F H A T G SaLPOR
 CGCCGCATCATGCCATCGATCTGGGCGATCAGGCCAGCGTGCGCAAGTTCGCGGACGAATTCACGCCACCGGC
L P L D A L L L T A A V Y L P R L E A P M R S A Q SaLPOR
 CTCCCCCTCGACGCGCTGCTCTTGACCGCCGCGTCTACCTGCCCGCCTCGAAGCGCCGATGCGCAGCGCGCAA
G Y E I S V A T N Y F G H F L L A H L L I D D L K SaLPOR
 GGCTATGAAATCAGCGTTGCCACCAATTATTTGCGCCACTTCTCTCGCCACCTCTCATCGACGATCTGAAG
Q A K G R L A S P P R L I T L G T V T A N S E E F SaLPOR
 CAGGCCAAGGGCCGCTCGCCTCGCCGCCACGCTGATCAGCTCGGCACGGTGACGGCCAACAGCGAGGAATTC
G G K I P I P A P A D L G D L A G L A A G F Q A P SaLPOR
 GGCGGAAGATCCCCATCCCCGCCCCGGCTGACCTCGGCGACCTCGCCGGCCTCGCAGCCGGCTTCCAGGCCCC
I A M I D G K P F K P G K A Y K D S K L A C M I M SaLPOR
 ATCGCCATGATCGACGGCAAACCGTTCAAGCCCGGAAGGCCACAAGGATTCGAAACTCGCCTGCATGATCATG
S R E F Q K R W G S T G I V F N T L Y P G C V A E SaLPOR
 AGCCGCGAGTTCCAGAAACGCTGGGGCTCAACCGGCATCGTCTTCAACACCCTTACCCCGGCTGCGTCGCCGAA
T L L F R H T P P A F Q K I F P W F Q K N I T K G SaLPOR
 ACCCTCCTCTTCCGCCACACCCACCCGCTTCCAGAAAATCTTCCCCTGGTTCCAGAAAAACATCACCAAGGGC
Y V S Q P L A G E R T A Q V I A D P A F A S Q S G SaLPOR
 TACGTCTCCCAACCCCTCGCCGGCGAAGCGACGGCGCAAGTCATCGCCGACCCCGCCTTCGCCAGCCAATCCGGC
V H W S W G G N R Q K E G R M P F A Q P L S T R G T SaLPOR
 GTCCACTGGAGCTGGGGCAACCGCCAGAAAGAAGGCCGATGCCGTTTGGCCAGCCCTTGTCGACGCGCGGCACC
N E A R N E R L W D L T M K A V G L A * SaLPOR
 AACGAAGCGCGCAACGAACGGCTGTGGGATTTGACGATGAAGGCGGTGGGGCTGGCCTGACTCGAGCAC
XhoI

SehGCLPOR

M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M T E R
His₆-tag
SehGCLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGACTGAACGC
SehGCLPOR
NdeI
 V V I T G A S S G L G Q A A A E E V A A T G R H V
 GTTGTATCACTGGTGCAAGCTCTGGTCTGGGTCAAGCGGCTGCTGAAGAAGTGGCGGCAACGGGTCGTACAGTG
SehGCLPOR
 V L A C R D A D R G A A A A D E I R A R V P D A S
 GTGTTGGCGTGCCGTGACGCGGATCGTGGCGCAGCGGCAGCCGACGAGATTTCGCGCTCGTGTCCCGGATGCCAGC
SehGCLPOR
 L E V L E L D L A D L A S V R A A A K A L L A G P
 CTGGAAGTCCTGGAGTTGGACCTGGCGGATCTGGCCAGCGTCCGTGCGGCAGCGAAAGCGCTGCTGGCTGGCCCC
SehGCLPOR
 P L G A L V C N A G V Q V V G G I R R S R D G H E
 CCTCTGGGTGCGCTGGTCTGTAACGCCGGTGTCCAGGTAGTCGGCGGTATTTCGCCGACCCGCGACGGTCATGAA
SehGCLPOR
 L T F A T N H L G H F L L T R L L L D H L A E A G
 CTGACCTTTGCAACCAACCATCTGGGCCATTTTCTGTAAACCCGCTGTTGCTGGACCACCTTGCCGAGCCGGC
SehGCLPOR
 R I V L V S S G T H Y G P R R S M G F P A P H W E
 CGCATTGTGTTGGTGAGCAGCGGTACGCACTATGGCCCGCGCCGTAGCATGGGTTTTCCGGCACCGCACTGGGAG
SehGCLPOR
 N P S A L A D P E L S V L D D S P R S G R I R Y A
 AATCCATCCGCGTTGGCGGACCCGGAAGTGAAGCGTCTGGATGATTTCGCCGCGTTCGGTTCGTATCCGCTACGCG
SehGCLPOR
 T S K L A N I Y T T Y E L N R R R N G R R I T V N
 ACCAGCAAAGTGGCCAATATTTACACGACCTATGAGCTGAATCGTTCGCAACGGTTCGTTCGTATCACGGTTAAC
SehGCLPOR
 A F D P G L M P Q T G L A R D Y P D R F R R L Y G
 GCGTTCGATCCGGGTCTGATGCCACAGACCGGCTGGCGCGTGATTACCCGACCGTTTCGCCGCTCTGTATGGC
SehGCLPOR
 R I A P V L V R A V P G V R S V A R S A A D L S W
 CGCATCGCACCGGTTCTGGTGCCTGCCGTTCCGGGCGTTCGTAGCGTTGCACGTTCCGCAGCCGACCTGAGCTGG
SehGCLPOR
 L V T A G E P G V V S G L Y F V G R R P R K T S D
 CTGGTTACCGCTGGCGAGCCGGGTGTCGTTAGCGGTCTGTACTTCGTGGGTTCGTGCCCCTCGCAAGACCAGCGAC
SehGCLPOR
 E S Y D R V R A L E L W E F S E R L V S E *
 GAGTCTTATGATCGTGTGCGTGCCTGGAAGTGTGGGAATTCAGCGAGAGACTGGTGAGCGAGTAAGTCGACAAG
SalI

SgLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M T R S SgLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGACTCGTAGC
T K Q L A I V T G A S S G V G L Y S T Q A L I A K SgLPOR NdeI
 ACTAAACAATTGGCAATCGTCACCGGTGCATCTAGCGGCGTTGGTTTGTATAGCACCCAGGCACTGATTGCTAAG
G W Q V I M A C R N M E K A F Q A A H D L G L P T SgLPOR
 GGTTGGCAAGTGATCATGGCGTGTGCAATATGGAAAAAGCGTTTCAAGCCGCGCACGATCTCGGTCTGCCGACC
D A Y Q I M H L D L G S L S S V R A F H A A F R A SgLPOR
 GACGCGTACCAAATCATGCATCTGGACCTGGGTAGCCTGAGCAGCGTCCGCGCGTTTCACGCGGCTTTCGTGCT
Q N R A L D T L I S N A A T Y L P Q L K Q P A R S SgLPOR
 CAGAACCGTGCCTGGACACGTTGATCAGCAATGCCGACCTATCTGCCGCAGCTGAAGCAACCGGCACGTAGC
P E G F E I S V A T N Y L G H F L L A N L M L E D SgLPOR
 CCAGAGGGCTTTGAGATTTCCGTGGCGACGAATTACCTGGGTCAATTCCTGCTGGCAAACCTGATGCTGGAAGAT
L Q K S H L P R L V T L G G T V T A N S E E F G G K SgLPOR
 CTGCAGAAGTCTCATCTTCCTCGTTTAGTTACGCTGGGCACCGTGACCGCAAATAGCGAAGAATTCGGTGGCAAG
I P I P A P A D L G E F Q G L K D G F Q A P V S M SgLPOR
 ATCCCGATCCAGCTCCGGCGGACCTGGGTGAGTTCCAGGGCCTGAAGGACGGCTTCCAGGCACCGGTGTCGATG
I D G K P F K P G K A Y K D S K L C C M M M S R E SgLPOR
 ATTGATGGTAAACCGTTTTAAACCGGGTAAGGCCTATAAAGACAGCAAACCTGTGTTGCATGATGATGAGCCGTGAG
L H A R Y H E D T G I V F S T L Y P G C V A E T P SgLPOR
 CTGCACGCTCGTTACCACGAAGATACGGGCATTGTGTTCTCCACCCTGTACCCGGGTGCGTGGCGGAGACTCCG
L F R N A P A L F Q K V F P W F Q K N I T K G Y V SgLPOR
 CTGTTTCGTAACGCGCCTGCGCTGTTTCAAAAAGTTTCCCGTGGTTCCAGAAGAACATTACCAAGGGCTATGTG
S Q P L S G A R V A Q V V A D P E F T R S G V H W SgLPOR
 AGCCAGCCGCTGTCCGGCGCACGCGTGGCCAAAGTTGTCGCGGACCCGGAATTCACGCGCAGCGGTGTTTCATTGG
S W G N R Q K V G Q V A F A Q S M S D K A T D A A SgLPOR
 TCTTGGGGTAACCGTCAAAAAGTCCGCCAGGTCCGCTCGCTCAGAGCATGAGCGATAAAGCGACCGATGCAGCG
R S K E L W D L S A G L V C L * SgLPOR
 CGCAGCAAAGAAGTGTGGGATTTGAGCGCCGGTCTGGTTTGCCTGTAAGTCGACAAGCTT
SaII

SILPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S S G L V P R G S H M S V Q SILPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGAGCGTTCAG
A A V Q P T A I I T G A S S G V G L W A A K S L A SILPOR NdeI
 GCAGCAGTCCAACCAACGGCGATTATCACGGGTGCGAGCAGCGGTGTCGGTCTGTGGGCTGCTAAGTCCCTGGCC
D R G W L V I M A C R D L A K A E A A A A E V G I SILPOR
 GATCGTGGTTGGCTTGTGATTATGGCGTGCCGTGACCTGGCGAAAAGCTGAGGCCGCCGCCAGAGGTTGGTATT
P A D S R R I L H I D L G D Q A S V R R F A D E F SILPOR
 CCGGCGGATTTCGCGTCGCATCCTCCACATCGATCTGGGCGATCAGGCGAGCGTGCCTGCTTTGCCGACGAATTT
H G L G L P L D A L L L N A A V Y L P R L E A P M SILPOR
 CACGGTTTGGGCCTGCCGCTGGACGCGCTGCTGCTGAATGCCGCGGTTTATCTGCCGCGTTTGAAGCGCCGATG
R S P E G Y E I S V A T N Y F G H F L L A H L L L SILPOR
 CGTAGCCCCGAAGGCTACGAAATCAGCGTCGCGACTAACTATTTCCGGTCATTTCTGTGGCACATCTGCTGCTG
D D L K K A K G R L P S P R L I T L G T V T A N SILPOR
 GACGACCTGAAAAAAGCAAAGGGTCGCTTGGCGAGCCCTCCGCGCCTGATCACGCTGGGTACCGTCACCGCAAAT
S E E F G G K V P I P A P A E L G D L A G L A A G SILPOR
 AGCGAAGAATTTGGTGGCAAGGTTCCAATTCGGCCCCGGCAGAGCTGGGCGACCTGGCGGGTCTGGCTGCAGG
F K A P I A M I D G K P F K P G K A Y K D S K L A SILPOR
 TTTAAAGCACCGATTGCGATGATTGACGGCAAGCCGTTTAAAGCCTGGCAAAGCGTACAAAGATAGCAAACCTGGCT
C M I M N R E F H K R W G D T G I V F N T L Y P G SILPOR
 TGTATGATCATGAACCGCGAGTTCCACAAGCGTTGGGGCGATACGGGTATCGTGTTCAATACCTTGTACCCGGG
C V A D T A L F R D T P Q A F R T I F P W F Q K N SILPOR
 TGCCTGGCGGACACCGCGCTGTTCCGTGACACCCCGCAAAGCGTTCCGTACCATCTTCCCGTGGTTCCAAAAGAAC
I T K G Y V S Q P L A G D R T A Q V I A D P A F A SILPOR
 ATTACCAAGGGTTACGTGTCTCAACCGCTGGCGGGCGATCGTACTGCTCAGGTTATTGCGGACCCGGCGTTTGGC
S Q S G V H W S W G N R Q K Q G R M P F A Q P L S SILPOR
 AGCCAGTCTGGTGTCCATTGGTCTGGGGTAATCGTCAGAAAACAGGGTTCGTATGCCGTTCCGCCAACCGCTGAGC
A R G T N E A R N E R L W D L T L K A V G L A * SILPOR
 GCACGCGGCACGAATGAAGCCCCTAACGAACGCCTGTGGGATCTGACCCTGAAAAGCCGTGGGTCTGGCGTAAGTC
SallI

GACAAGCTT
SallI

SpLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S S G L V P R G S H M T T A SpLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGACGACAGCG
K L P L A I I T G A S S G V G L Y A T A A L I G R SpLPOR NdeI
 AAATTGCCTCTGGCGATCATCACCGGGGCATCGTCCGGCGTTGGCTTATACGCAACCGCCGCGCTGATTGGACGG
G W H V I M A C R D L D K A A A A A T G L G L R T SpLPOR
 GGCTGGCACGTCATCATGGCGTGCCGCGATCTCGACAAGGCAGCAGCGGCAGCCACCGGGCTCGGCCTGCGCAGC
D R Y E I A H L D L A S Q A S V R A F A A A F R A SpLPOR
 GATCGATACGAAATTGCGCATCTCGATCTTGCCTCCCAAGCATCAGTCCGCGCCTTTGCGGGCGGCTTCCGCGCC
S D R P L D A L V C N A A T Y L P L L K E P A R S SpLPOR
 AGCGACCGGCCGCTCGATGCCCTGGTCTGCAATGCGGACCTATTTGCCGCTGCTCAAGGAACCGGCCCGGTGC
P E G Y E L N V A T N Y L G H F L L A N L M L D D SpLPOR
 CCTGAAGGCTATGAGCTGAACGTCGCGACCAATTATCTCGGCCATTTCTGCTCGCCAATCTGATGCTTGACGAT
L Q R A P A P R L V T L G T V T A N S E E F G G R SpLPOR
 TTGCAGCGCGCGCCCGCGCCGGCTGGTGACCTTGGGGACAGTCACTGCCAATTCAGAGGAGTTTGGCGGCCGT
I P I P A P A D L G D F E G L A A G F K A P I A M SpLPOR
 ATCCCGATTCCGGCGCCTGCCGATCTCGGGCATTTTGAAGGGCTGGCCCGCGGTTCAAGGCACCGATCGCGATG
I D G K P F K G G K A Y K D S K L C T M M M S R E SpLPOR
 ATCGACGGCAAGCCGTTCAAAGGTGGCAAGGCGTATAAAGACAGCAAGTTATGCACGATGATGATGAGCCGGGAG
L H A R Y H A Q T G I I F S T L Y P G C V A D T P SpLPOR
 CTGCACGCGCGCTATCACGCGCAGACCGGCATCATCTTCAGCACGCTGTATCCCGGCTGCGTTGCCGATACCCCG
L F R N A P K L F Q K I F P W F Q K N I T K G Y V SpLPOR
 CTGTTCCGGAACGCGCCCAAGCTGTTCCAGAAGATATTTCCCTGGTTTCAGAAAAATATCACCAAGGGTTATGTC
S Q P L S G D R V A Q V V A D P G F T Q S G V H W SpLPOR
 TCGCAGCCGCTATCAGGCATCGCGTCTCAAGTGGTGGCCGATCCCGGCTTTACCCAATCGGGCGTCCATTGG
S W G N R Q Q E G R E A F A Q S L S S K A T D A S SpLPOR
 AGCTGGGGCAATCGCCAGCAAGAGGGGCGAGAGGCCCTTTGCCAGAGCCTGTGAGCAAGGCAACCGACGCCAGC
R S Q R L W A L S A G L V G L A S D K Q P V R S V SpLPOR
 CGATCGCAGCGGCTCTGGGCGCTGAGCGCTGGGCTGGTCTGGGCTGGCCAGTGATAAGCAACCGGTGCGATCCGTTG
V A A SpLPOR *
 GTCGCGGCGTAAGTCGACAAGCTT
SalI

SsLPOR

M G S S H H H H H H S His₆-tag S S G L V P R G S H M K P T SsLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAAACCGACC
V I I T G A S S G V G L Y G R K A L I D K G W H V SsLPOR NdeI
 GTGATCATCACCGGCGCGAGCAGCGGCGTGGGCCTGTATGGCCGCAAAGCGCTGATCGATAAAAGGCTGGCATGTG
I M A C R N L D K T Q K V A D E L G F P K D S Y T SsLPOR
 ATCATGGCGTGCCGCAACCTGGATAAAACCCAGAAAGTGGCGGATGAACTGGGCTTCCCGAAAAGATAGCTATACC
I I K L D L G Y L D S V R R F V A Q F R E L G R P SsLPOR
 ATCATCAAACCTGGATCTGGGCTATCTGGATAGCGTGCGCCGCTTCGTGGCGCAGTTCGCGAACTGGGCCGCCCC
L K A L V C N A A V Y F P L L D E P L W S A D D Y SsLPOR
 CTGAAAGCGCTGGTGTGCAACGCGGCGGTGTATTTCCCGCTGCTGGATGAACCGCTGTGGAGCGCGGATGATTAT
E L S V A T N H L G H F L L C N L L L E D L K A C SsLPOR
 GAACTGAGCGTGGCGACCAACCATCTGGGCCATTTCTGTGTGCAACCTGCTGCTGGAAGATCTGAAAGCGTGC
P D A D K R L I I L G T V T A N S K E L G G K I P SsLPOR
 CCGGATGCGGATAAACGCCTGATCATCTGGGCACCGTGACCGCGAACAGCAAAGAACTGGGCGGCAAAATCCCG
I P A P P D L G N F E G F E A G F K K P I A M I N SsLPOR
 ATCCCGGCGCCGCGGATCTGGGCAACTTCGAAGGCTTCGAAGCGGGCTTCAAAAAACCGATCGCGATGATCAAC
N K K F K S G K A Y K D S K L C N M L T T R E L H SsLPOR
 AACAAAAAATTCAAAGCGGCAAAGCGTATAAAGATAGCAAACCTGTGCAACATGCTGACCACCCGCGAACTGCAT
R R F H Q E T G I V F N S L Y P G C V A D T P L F SsLPOR
 CGCCGCTTCCATCAGGAAACCGGCATCGTGTTC AACAGCCTGTATCCGGGCTGCGTGGCGGATACCCCGCTGTT
R N H Y S L F R T I F P W F Q K N V T K G Y V S Q SsLPOR
 CGCAACCATTATAGCCTGTTCCGCAACCATCTTCCCGTGGTTCAGAAAAACGTGACCAAAGGCTATGTGAGCCAG
E L A G E R V A M V V A D D K F K D S G V H W S W SsLPOR
 GAACTGGCGGGCGAACGCGTGGCGATGGTGGTGGCGGATGATAAATTCAAAGATAGCGGCGTGCATTGGAGCTGG
G N R Q Q A G R E A F V Q E L S E Q G S D A Q K A SsLPOR
 GGCAACCGCCAGCAGGCGGGCCGCAAGCGTTCGTGCAGGAACTGAGCGAACAGGGCAGCGATGCGCAGAAAAGCG
Q R M W D L S E K L V G L V SsLPOR *
 CAGCGCATGTGGGATCTGAGCGAAAAACTGGTGGGCCTGGTGTGAGTCGACAAGCTT
Sali

TeLPOR (N-terminaler His₆-tag)

M G S S H H H H H H S His₆-tag S G L V P R G S H M S D Q TeLPOR
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGAGTGATCAG
P R P T V I I T G A S S G V G L Y A T K A L A N R TeLPOR NdeI
 CCACGCCAACGGTCATTATTACGGGTGCATCCTCTGGAGTCGGATTGTATGCTACCAAGGCCTTAGCCAATCGG
G W H V I M A C R N L E K A E Q A A K N L Q I P P TeLPOR
 GGCTGGCACGTTATAATGGCCTGCCGCAATCTTGAAAAAGCAGAGCAAGCCGCCAAAACTTGCAGATTCCGCGC
E A Y T I L H L D L S S L A S V R G F V E S F R A TeLPOR
 GAGGCCTACACGATTTTGCACCTGGACTTGTCTCTCTTGGCCAGTGTGCGCGGCTTTGTTGAATCATTTCCGGCA
L N R P L R A L V C N A A V Y Y P L L K E P I Y S TeLPOR
 TTGAATCGCCCCTTGCCTGCCCTTGTCTGCAATGCCGCTGTCTATTATCCCCTGCTCAAGGAACCTATCTACAGT
V D G Y E I T V A T N H L G H F L L I N L L L E D TeLPOR
 GTGGATGGCTATGAAATCACTGTGGCCACCAACCATTTGGGGCATTTCCTTTTGATCAACCTGCTGCTAGAAGAC
L K N S P E S D K R L V I L G T V T A N R K E L G TeLPOR
 TTGAAAAATTCTCCCGAAAGCGATAAGCGCTTGGTGATTCTCGGCACAGTGACAGCCAACCGCAAAGAACTCGGC
G K I P I P A P P D L G N L E G F E K G F K K P I TeLPOR
 GGTAAAATTCCCATTCTGCTCCCCCTGATTTGGGCAACCTCGAAGGCTTTGAAAAAGGCTTCAAGAAGCCGATT
A M I N G K P F K S G K A Y K D S K L C N M L T A TeLPOR
 GCCATGATTAACGGTAAGCCCTTCAAGTCGGGCAAGGCTACAAAAGACAGCAAGCTCTGCAATATGCTGACGGCA
R E L H R R F H E S T G I V F N S L Y P G C V A D TeLPOR
 CGGGAAGTGCATCGCCGCTTTCACGAGAGCACCGGAATTGTTTTAATTCCCTTACCCCGGTTGTGTGGCCGAC
T P L F R H H F P L F Q K L F P L F Q K K I T G G TeLPOR
 ACACCCCTGTTTCGCCACCACTTCCCCCTGTTTCAGAAACTCTTCCCCCTCTTCCAGAAAAAGATTACTGGGGGC
Y V S Q E L A G E R V A M V V A D P E F R Q S G V TeLPOR
 TATGTCAGCCAAGAAGTGGCGGGTGAGCGCGTCGCGATGGTGGTTCGAGACCCAGAGTTTCGCCAGTCGGGGGTC
H W S W G N R Q K E G R K A F V Q E L S A E A S D TeLPOR
 CACTGGAGCTGGGGTAATCGCCAAAAAGAAGGCCGCAAAGCCTTTGTCCAAGAACTATCGGCAGAGGCAAGTGAT
E Q K A R R L W E L S E K L V G L A * TeLPOR
 GAGCAAAAAGCCCGCCGCTTTTGGGAGCTGAGTGAAAAACTGGTGGGATTGGCCTAAGTCGACAAGCTT
SalI

TelPOR (ohne His₆-tag)

TeLPOR
 M S D Q P R P T V I I T G A S S G V G L Y A T
 ATACATATGAGTGATCAGCCACGCCCAACGGTCATTATTACGGGTGCATCCTCTGGAGTCGGATTGTATGCTACC
NdeI
 K A L A N R G W H V I M A C R N L E K A E Q A A K
 AAGGCCTTAGCCAATCGGGGCTGGCACGTTATAATGGCCTGCCGCAATCTTGAAAAAGCAGAGCAAGCCGCCAAA
TeLPOR
 N L Q I P P E A Y T I L H L D L S S L A S V R G F
 AACTTGACAGATTCCGCCGGAGGCTACACGATTTTGCACCTTGGACTTGTCTCCTTGGCCAGTGTGCGCGGCTTT
TeLPOR
 V E S F R A L N R P L R A L V C N A A V Y Y P L L
 GTTGAATCATTTTCGGGCATTGAATCGCCCCTTGCCTGCCCCTTGTCTGCAATGCCGCTGTCTATTATCCCTGCTC
TeLPOR
 K E P I Y S V D G Y E I T V A T N H L G H F L L I
 AAGGAACCTATCTACAGTGTGGATGGCTATGAAATCACTGTGGCCACCAACCATTGGGGCATTTCCTTTTGATC
TeLPOR
 N L L L E D L K N S P E S D K R L V I L G T V T A
 AACCTGCTGCTAGAAGACTTGAAAAATTCTCCCGAAAGCGATAAGCGCTTGGTGATTCTCGGCACAGTGACAGCC
TeLPOR
 N R K E L G G K I P I P A P P D L G N L E G F E K
 AACCGCAAAGAAGCTCGGCGGTAAAATTCCCATTCTGCTCCCCCTGATTTGGGCAACCTCGAAGGCTTTGAAAA
TeLPOR
 G F K K P I A M I N G K P F K S G K A Y K D S K L
 GGCTTCAAGAAGCCGATTGCCATGATTAACGGTAAGCCCTTCAAGTCGGGCAAGGCCTACAAAGACAGCAAGCTC
TeLPOR
 C N M L T A R E L H R R F H E S T G I V F N S L Y
 TGCAATATGCTGACGGCACGGGAAGTGCATCGCCGCTTTACGAGAGCACCAGGAAATGTTTTAATTCCTTTTAC
TeLPOR
 P G C V A D T P L F R H H F P L F Q K L F P L F Q
 CCCGTTGTGTGGCCGACACACCCTGTTTTCGCCACCCTTCCCCCTGTTTCAGAAACTCTTCCCCCTCTTCCAG
TeLPOR
 K K I T G G Y V S Q E L A G E R V A M V V A D P E
 AAAAAAGATTACTGGGGGCTATGTCAGCCAAGAAGTGGCGGTGAGCGCGTCGCGATGGTGGTTCGACACCCAGAG
TeLPOR
 F R Q S G V H W S W G N R Q K E G R K A F V Q E L
 TTTCCGAGTCGGGGGTCCACTGGAGCTGGGGTAATCGCCAAAAAGAAGGCCGAAAGCCTTTGTCCAAGAAGTAA
TeLPOR
 S A E A S D E Q K A R R L W E L S E K L V G L A *
 TCGGCAGAGGCAAGTGATGAGCAAAAAGCCCGCGTCTTTGGGAGCTGAGTGAAAAACTGGTGGGATTGGCCATA

GTCGACAAGCTT
SaiI

TeLPOR-A302Stopp

M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M S D Q His₆-tag TeLPOR-A302Stopp
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGAGTGATCAG
P R P T V I I T G A S S G V G L Y A T K A L A N R TeLPOR-A302Stopp
 CCACGCCAACGGTCATTATTACGGGTGCATCCTCTGGAGTCGGATTGTATGCTACCAAGGCCTTAGCCAATCGG
G W H V I M A C R N L E K A E Q A A K N L Q I P P TeLPOR-A302Stopp
 GGCTGGCACGTTATAATGGCCTGCCGCAATCTTGAAAAAGCAGAGCAAGCCGCCAAAAACTTGCAGATTCCGCCG
E A Y T I L H L D L S S L A S V R G F V E S F R A TeLPOR-A302Stopp
 GAGGCCTACACGATTTTGCACCTGGACTTGTCTCTCTTGGCCAGTGTGCGCGGCTTTGTTGAATCATTTCCGGGCA
L N R P L R A L V C N A A V Y Y P L L K E P I Y S TeLPOR-A302Stopp
 TTGAATCGCCCCTTGCCTGCCCTTGTCTGCAATGCCGCTGTCTATTATCCCCTGCTCAAGGAACCTATCTACAGT
V D G Y E I T V A T N H L G H F L L I N L L L E D TeLPOR-A302Stopp
 GTGGATGGCTATGAAATCACTGTGGCCACCAACCATTTGGGGCATTCTTTTGTGATCAACCTGCTGCTAGAAGAC
L K N S P E S D K R L V I L G T V T A N R K E L G TeLPOR-A302Stopp
 TTGAAAAATTCTCCCGAAAGCGATAAGCGCTTGGTGATTCTCGGCACAGTGACAGCCAACCGCAAAGAACTCGGC
G K I P I P A P P D L G N L E G F E K G F K K P I TeLPOR-A302Stopp
 GGTAAAATTCCCATTCTGCTCCCCCTGATTTGGGCAACCTCGAAGGCTTTGAAAAAGGCTTCAAGAAGCCGATT
A M I N G K P F K S G K A Y K D S K L C N M L T A TeLPOR-A302Stopp
 GCCATGATTAACGGTAAGCCCTTCAAGTCGGGCAAGGCCTACAAAAGACAGCAAGCTCTGCAATATGCTGACGGCA
R E L H R R F H E S T G I V F N S L Y P G C V A D TeLPOR-A302Stopp
 CGGGAACTGCATCGCCGCTTTCACGAGAGCACCGGAATTGTTTTTAATTCCCTTTACCCCGGTTGTGTGGCCGAC
T P L F R H H F P L F Q K L F P L F Q K K I T G G TeLPOR-A302Stopp
 ACACCCCTGTTTTCGCCACCACTTCCCCCTGTTTCAGAACTCTTCCCCCTCTTCCAGAAAAAGATTACTGGGGGC
Y V S Q E L A G E R V A M V V A D P E F R Q S G V TeLPOR-A302Stopp
 TATGTCAGCCAAGAAGTGGCGGGTGAGCGCGTCGCGATGGTGGTTCGCAGACCCAGAGTTTCGCCAGTCGGGGGTC
H W S W G N R Q K E G R K A F V Q E L S A E * TeLPOR-A302Stopp
 CACTGGAGCTGGGGTAATCGCCAAAAAGAAGGCCGCAAAGCCTTTGTCCAAGAACTATCGGCAGAGTAA

TelPOR-V279Stopp

M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M S D Q His₆-tag TelPOR-V279Stopp
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGAGTGATCAG
P R P T V I I T G A S S G V G L Y A T K A L A N R TelPOR-V279Stopp
 CCACGCCCAACGGTCATTATTACGGGTGCATCCTCTGGAGTCGGATTGTATGCTACCAAGGCCTTAGCCAATCGG
G W H V I M A C R N L E K A E Q A A K N L Q I P P TelPOR-V279Stopp
 GGCTGGCACGTTATAATGGCCTGCCGCAATCTTGAAAAAGCAGAGCAAGCCGCCAAAAACTTGCAGATTCCGCGC
E A Y T I L H L D L S S L A S V R G F V E S F R A TelPOR-V279Stopp
 GAGGCCTACACGATTTTGCACCTGGACTTGTCTCCTTGGCCAGTGTGCGCGGCTTTGTTGAATCATTTCCGGGCA
L N R P L R A L V C N A A V Y Y P L L K E P I Y S TelPOR-V279Stopp
 TTGAATCGCCCCTTGCCTGCCCTTGTCTGCAATGCCGCTGTCTATTATCCCCTGCTCAAGGAACCTATCTACAGT
V D G Y E I T V A T N H L G H F L L I N L L L E D TelPOR-V279Stopp
 GTGGATGGCTATGAAATCACTGTGGCCACCAACCATTTGGGGCATTTTCTTTTGATCAACCTGCTGCTAGAAGAC
L K N S P E S D K R L V I L G T V T A N R K E L G TelPOR-V279Stopp
 TTGAAAAATTCTCCCGAAAGCGATAAGCGCTTGGTGATTCTCGGCACAGTGACAGCCAACCGCAAAGAACTCGGC
G K I P I P A P P D L G N L E G F E K G F K K P I TelPOR-V279Stopp
 GGTAAAATTCCCATTCTGCTCCCCCTGATTTGGGCAACCTCGAAGGCTTTGAAAAAGGCTTCAAGAAGCCGATT
A M I N G K P F K S G K A Y K D S K L C N M L T A TelPOR-V279Stopp
 GCCATGATTAACGGTAAGCCCTTCAAGTCGGGCAAGGCCTACAAAGACAGCAAGCTCTGCAATATGCTGACGGCA
R E L H R R F H E S T G I V F N S L Y P G C V A D TelPOR-V279Stopp
 CGGGAACTGCATCGCCGCTTTCACGAGAGCACCGGAATTGTTTTTAATTCCCTTACCCCGGTTGTGTGGCCGAC
T P L F R H H F P L F Q K L F P L F Q K K I T G G TelPOR-V279Stopp
 ACACCCCTGTTTCGCCACCACTTCCCCCTGTTTCAGAACTCTTCCCCCTCTTCCAGAAAAAGATTACTGGGGGC
Y V S Q E L A G E R V A M V V A D P E F R Q S G TelPOR-V279Stopp *
 TATGTCAGCCAAGAAGCTGGCGGGTGTAGCGCGTTCGCGATGGTGGTTCGAGACCCAGAGTTTCGCCAGTCGGGGTAA

TeLPOR-P272Stopp

M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M S D Q
 ACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGGGCAGCCATATGAGTGATCAG
P R P T V I I T G A S S G V G L Y A T K A L A N R
 CCACGCCAACGGTCATTATTACGGGTGCATCCTCTGGAGTCGGATTGTATGCTACCAAGGCCTTAGCCAATCGG
G W H V I M A C R N L E K A E Q A A K N L Q I P P
 GGCTGGCACGTTATAATGGCCTGCCGCAATCTTGAAAAAGCAGAGCAAGCCGCCAAAAACTTGCAGATTCCGCCC
E A Y T I L H L D L S S L A S V R G F V E S F R A
 GAGGCCTACACGATTTTGCACCTGGACTTGTCTCTCTTGGCCAGTGTGCGCGGCTTTGTTGAATCATTTCCGGGCA
L N R P L R A L V C N A A V Y Y P L L K E P I Y S
 TTGAATCGCCCCTTGCGTGCCCTTGTCTGCAATGCCGCTGTCTATTATCCCCTGCTCAAGGAACCTATCTACAGT
V D G Y E I T V A T N H L G H F L L I N L L L E D
 GTGGATGGCTATGAAATCACTGTGGCCACCAACCATTTGGGGCATTTTCTTTTGATCAACCTGCTGCTAGAAGAC
L K N S P E S D K R L V I L G T V T A N R K E L G
 TTGAAAAATTCTCCCGAAAGCGATAAGCGCTTGGTGATTCTCGGCACAGTGACAGCCAACCGCAAAGAACTCGGC
G K I P I P A P P D L G N L E G F E K G F K K P I
 GGTAAAATTCCCATTCTGCTCCCCCTGATTTGGGCAACCTCGAAGGCTTTGAAAAAGGCTTCAAGAAGCCGATT
A M I N G K P F K S G K A Y K D S K L C N M L T A
 GCCATGATTAACGGTAAGCCCTTCAAGTCGGGCAAGGCCTACAAAAGACAGCAAGCTCTGCAATATGCTGACGGCA
R E L H R R F H E S T G I V F N S L Y P G C V A D
 CGGGAACTGCATCGCCGCTTTCACGAGAGCACCGGAATTGTTTTAATTCCCTTACCCCGGTTGTGTGGCCGAC
T P L F R H H F P L F Q K L F P L F Q K K I T G G
 ACACCCCTGTTTCGCCACCACTTCCCCCTGTTTCAGAACTCTTCCCCCTCTTCCAGAAAAAGATTACTGGGGGC
Y V S Q E L A G E R V A M V V A D *
 TATGTCAGCCAAGAACTGGCGGGTGAGCGCGTTCGCGATGGTGGTTCGCGACTAA

6.1.2 Aminosäuresequenzen der identifizierten RuBisCo-Untereinheit

Acidiphilium angustum (Accession-Nummer: WP_029311241.1; UniProt-ID: A0A1N6TDA9)

MDTPTPSVADAKTVRGKDRYRSGVMEYSKMGYWEPTYEPKITDVIALFRITPQDGVDAIEAAAAVAGESSTATWT
 VVWTDRLTACEKYRAKAYRVDVVPNGPGQYFAYIAYDLALFEPGSIANLTASIIGNVFGFKPLKALRLEDMRMPV
 AYVKTFDGPSTGIVVERERLDFKFRPLLGGATVVKPKLGLSGRNYGRVVYEALKGGLDFTKDDENINSQPFMHRDR
 FLYCMEAVNRAQAVSGEVKGTYLNVTAGTMEEMYERANFAHELGSTIVMIDLVIYTAIQSMSKWARKHDMILHL
 HRAGHGTYTRHKTHGVSFRVIAKWMRLAGVDHIHAGTVVGKLEGDPLTTRGFYDVLREDYNPMRLEHGIFFEQDW
 AGTRKVMFVASGGIHAGQMHQLLHHLGEDVVLQFGGGTIGHPLGIAAGATANRVALEAMILARNEGRDYREGPD
 ILAQAARHCLPLRQALDWTGVDVTFDYTSTDTPDFVASPMPAY

Acidiphilium rubrum (Accession-Nummer: WP_029311241.1; UniProt-ID: A0A1N6TDA9)

MDTPTPSVADAKTVRGKDRYRSGVMEYSKMGYWEPTYEPKITDVIALFRITPQDGVDAIEAAAAVAGESSTATWT
 VVWTDRLTACEKYRAKAYRVDVVPNGPGQYFAYIAYDLALFEPGSIANLTASIIGNVFGFKPLKALRLEDMRMPV
 AYVKTFDGPSTGIVVERERLDFKFRPLLGGATVVKPKLGLSGRNYGRVVYEALKGGLDFTKDDENINSQPFMHRDR
 FLYCMEAVNRAQAVSGEVKGTYLNVTAGTMEEMYERANFAHELGSTIVMIDLVIYTAIQSMSKWARKHDMILHL
 HRAGHGTYTRHKTHGVSFRVIAKWMRLAGVDHIHAGTVVGKLEGDPLTTRGFYDVLREDYNPMRLEHGIFFEQDW
 AGTRKVMFVASGGIHAGQMHQLLHHLGEDVVLQFGGGTIGHPLGIAAGATANRVALEAMILARNEGRDYREGPD
 ILAQAARHCLPLRQALDWTGVDVTFDYTSTDTPDFVASPMPAY

Gemmatimonas phototrophica (Accession-Nummer: WP_026848175.1; UniProt-ID: A0A143BN93)

MTPQDIDAFFASRDALITDQYIELEFTFECAGDPRAAAHLASEQSTAQWQRIGVAEDFRPQFAARVLSLVSSPR
 PAGFSVPVPAAPAGAVHACRAVIAHPHGNGFPRLPNLI SAVLGEGVFFAPGIPLIRLEDIRFPASYLAAFEQPQF
 GVQGVDRDQLQVYGRPLFFGVIKPNIGLPPEPFAQLGFEGWMGGLDVAKDDEMLADAPYSPLATRAALLGDARRRA
 EVATGVPKGYLANITDEVDALHALHDTAVAAGATMVMVNTMPVGLSGVRALRRHARVPLVTHFPFIASFRLPLH
 GVHSRVIITRLQRLAGADVIMPFGDRMMTPPEHEVMENVQACLEPMGHLKPSLPVPGGSDSAATLEGVYRRIGSV
 DFGFVPGRGVFGHPMGPRGGAASLRQAWDAIAQGI PVREYAQQYAE LRAALR

6.2 Shell-Skript zur Auswertung der LPOR-Aktivität

```
#!/bin/sh
```

```
# Einlesen des gewünschten Schwellenwerts und des Belichtungsintervalls der auszuwertenden Datei
```

```
echo Bitte geben Sie nun den gewünschten Schwellwert ein\:
```

```
read Schwellwert
```

```
echo Bitte geben Sie nun das Belichtungsintervall \in Sekunden ein\:
```

```
read Lichtzeit
```

```
# Programm wird für alle .csv-Dateien im Programmordner ausgeführt
```

```
for datei in *.csv
```

```
do
```

```
touch temp
```

```
awk -v i=$datei 'BEGIN{printf ("%s",substr(i,1,length(i)-4))}' temp > temp2
```

```
datei=$(cat temp2)
```

```
rm temp | rm temp2
```

```
# Anlegen von Unterordnern (sofern noch nicht vorhanden!) um später alle Dateien sortiert abzulegen
```

```
if [ ! -e Filter$Schwellwert ] ; then
```

```
    mkdir Filter$Schwellwert
```

```
fi
```

```
if [ ! -e Formatiert ] ; then
```

```
    mkdir Formatiert
```

```
fi
```

```
if [ ! -e Formatiert_normiert ] ; then
```

```
    mkdir Formatiert_normiert
```

```
fi
```

```
if [ ! -e Kinetikwerte ] ; then
```

```
    mkdir Kinetikwerte
```

```
fi
```

```
if [ ! -e Kinetikwerte_normiert ] ; then
```

```
    mkdir Kinetikwerte_normiert
```

```
fi
```

```
cd Kinetikwerte
```

```
if [ ! -e 672nm ] ; then
```

```
    mkdir 672nm
```

```
fi
```

```
if [ ! -e 670nm ] ; then
```

```
    mkdir 670nm
```

```
fi
```

```
cd ../Kinetikwerte_normiert
```

```
if [ ! -e normiert_672nm ] ; then
```

```
    mkdir normiert_672nm
```

```
fi
```

```
if [ ! -e normiert_670nm ] ; then
```

```
    mkdir normiert_670nm
```

```
fi
```

```
cd ..
```

```
#####
```

```
# Formatierung und Filterung der Daten
```

```
#####
```

```
awk 'BEGIN{Zeile=0;}{Zeile=Zeile+1;if (Zeile <= 53){print$0;}}' ${datei}.csv > ${datei}.txt
```

```

# Ersetzen aller Kommata durch Leerzeichen
tr "," " " < ${datei}.txt >> dat
mv dat ${datei}.txt

# Spalten mit Wellenlängenangaben werden gelöscht
awk -v Schwellwert=${Schwellwert} -v Lichtzeit=${Lichtzeit} 'BEGIN{zaehler=0;Licht_an=0;}

    zaehler=zaehler+1;

# Auslesen aller Zeilen und Spalten mit den Messwerten
# Kopfzeile für die Belichtungszeit wird erstellt
    if (zaehler > 2)
    {
        spalte_max=NF;
        zeile=zaehler-2;
        Feld[zeile+1,1]=$1;
        for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte=spalte+2){Feld[zeile+1,1+(spalte/2)]=$spalte;}
        for (x=2;x<=(NF/2)+1;x++){Feld[1,x]=1;}
        zeile_max=zaehler-1;
    }
}
END{

# Filterung der "Licht-An" Ereignisse
    for (spalte=2;spalte<=(spalte_max/2)+1;spalte++)
    {
        Licht_an=0;
        for (zeile=3;zeile<=zeile_max;zeile++)
        {

# Filterkriterium; Messwerte eines „Licht-An“-Ereignisses werden auf den default-Wert EEE gesetzt
            diff=Feld[zeile,spalte]-Feld[zeile-1,spalte];
            if ((diff > Schwellwert) || (diff < -Schwellwert)){Licht_an=1;}
        }

        if ( Licht_an == "1"){for (i=1;i<=zeile_max;i++){Feld[i,spalte]="EEE";}}
    }

# Beschriftung der Kopfzeile mit der entsprechenden Belichtungszeit
    Gruppe=0;
    for (spalte=2;spalte<=(spalte_max/2)+1;spalte++)
    {
        if ((Feld[1,spalte] == "EEE")&&(Feld[1,spalte-1] != "EEE")){Gruppe=Gruppe+Lichtzeit;}
        if (Feld[1,spalte] != "EEE"){Feld[1,spalte]=Gruppe;}
    }

# Rauschreiben aller Werte, welche keinem „Licht-An“-Ereignis zugeordnet wurden
    printf ("Wellenlänge");
    for (zeile=1;zeile<=zeile_max;zeile++)
    {
        for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++){printf ("%s ",Feld[zeile,spalte]);}
        printf ("\n");
    }
}' ${datei}.txt > ${datei}_formatiert.txt

#####
# Formatierung und Filterung der Daten und zusätzlich Normierung der Spektren auf den Wert bei 720 nm
#####

awk -v Schwellwert=${Schwellwert} -v Lichtzeit=${Lichtzeit} 'BEGIN{zaehler=0;Licht_an=0;}

    zaehler=zaehler+1;

```

```

if (zaehler > 2)
{
    spalte_max=NF;
    zeile=zaehler-2;
    Feld[zeile+1,1]=$1;
    for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte=spalte+2){Feld[zeile+1,1+(spalte/2)]=$spalte;}
    for (x=2;x<=(NF/2)+1;x++){Feld[1,x]=1;}
    zeile_max=zaehler-1;
}
}

END{

    for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte++)
    {
        Licht_an=0;
        for (zeile=3;zeile<=zeile_max;zeile++)
        {
            diff=Feld[zeile,spalte]-Feld[zeile-1,spalte];
            if ((diff > Schwellwert) || (diff < -Schwellwert)){Licht_an=1;}
        }
        if ( Licht_an == "1"){for (i=1;i<=zeile_max;i++){Feld[i,spalte]="EEE";}}
    }
    Gruppe=0;
    for (spalte=2;spalte<=spalte_max/2+1;spalte++)
    {
        if ((Feld[1,spalte] == "EEE")&&(Feld[1,spalte-1] != "EEE")){Gruppe=Gruppe+Lichtzeit;}
        if (Feld[1,spalte] != "EEE"){Feld[1,spalte]=Gruppe;}
    }
    printf ("Wellenlänge");
    for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++)
    {
        if ((spalte == 1) || (Feld[1,spalte] != "EEE")){printf ("%s ",Feld[1,spalte])}
    }
    printf ("\n");

for (zeile=1;zeile<=zeile_max-1;zeile++)
{
    for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++){Feld_normiert[zeile,spalte]=0;}
}

# Normierung der Spektren auf den Wert bei 720 nm
    for (zeile=2;zeile<=zeile_max;zeile++)
    {
        for (spalte=1;spalte<=spalte_max/2+1;spalte++)
        {
            if (spalte == 1){Feld_normiert[zeile,spalte]=Feld[zeile,spalte];}
            else if (Feld[zeile,spalte] != "EEE"){Feld_normiert[zeile,spalte]=Feld[zeile,spalte]-Feld[2,spalte];}
            else if (Feld[zeile,spalte] == "EEE"){Feld_normiert[zeile,spalte]="EEE";}
            if ((spalte == 1) || (Feld_normiert[zeile,spalte] != "EEE")){printf ("%s ",Feld_normiert[zeile,spalte]);}
        }
        printf ("\n");
    }
}' ${datei}.txt > ${datei}_formatiert_normiert.txt

#####
# Messwerte bei 672 nm (672,xx nm oder 671,xx nm) sortiert zur Belichtungszeit herausschreiben
#####

awk -v Lichtzeit=$Lichtzeit 'BEGIN{zaehler=0;}{

```

```

# Feld belegen
  zaehler=zaehler+1;
  spalte_max=NF;
  for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++){Feld[zaehler,spalte]=$spalte;}
  zeile_max=zaehler;
  if ((substr($1,1,3) == "672") || (substr($1,1,3) == "671")){z_672=zaehler;}
}
END{

  Zeitpunkt_alt="DDD";
  spaltenwert=0;
  max_spalten=0;

  for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte++)
  {
  Zeitpunkt=Feld[1,spalte];
  if ((Zeitpunkt != Zeitpunkt_alt)&&(Zeitpunkt != "EEE")){spaltenwert=1;}
  else if (Zeitpunkt == "EEE")
  {
    if (max_spalten < spaltenwert){max_spalten=spaltenwert;}
    spaltenwert=0;
  }
  spaltenwert=spaltenwert+1;
  if (Zeitpunkt_alt == "DDD")
  {
    Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;
    Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
  }
  else if ((Zeitpunkt_alt == Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt != "EEE"))
  {
    if (Zeitpunkt > 0)
    {
      Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;
      Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
    }
    else
    {
      Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;
      Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
    }
  }
  else if ((Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt_alt == "EEE"))
  {
    Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;
    Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
  }
  if ((Zeitpunkt != "EEE")&&(Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt > 0))
  {
    Zeitpunkt_max=Zeitpunkt;
    Anzahl_Belichtungen=Zeitpunkt/Lichtzeit;
  }
  Zeitpunkt_alt=Zeitpunkt;
}
for (i=1;i<=Anzahl_Belichtungen+1;i++)
{
  for (j=1;j<=max_spalten;j++){printf ("%s ",Feld_neu[i,j]);}
  printf ("\n");
}
}

```

```
' ${datei}_formatiert.txt > ${datei}_Kinetikwerte_672.txt
```

```
#####  
# Messwerte bei 670 nm (670,xx nm oder 669,xx nm) sortiert zur Belichtungszeit herauschreiben  
#####
```

```
awk -v Lichtzeit=$Lichtzeit 'BEGIN{zaehler=0;}{  
    zaehler=zaehler+1;  
    spalte_max=NF;  
    for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++){Feld[zaehler,spalte]=$spalte;}  
    zeile_max=zaehler;  
    if ((substr($1,1,3) == "670") || (substr($1,1,3) == "669")){z_670=zaehler;}  
    }  
END{  
  
    Zeitpunkt_alt="DDD";  
    spaltenwert=0;  
    max_spalten=0;  
  
    for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte++)  
    {  
        Zeitpunkt=Feld[1,spalte];  
        if ((Zeitpunkt != Zeitpunkt_alt)&&(Zeitpunkt != "EEE")){spaltenwert=1;}  
        else if (Zeitpunkt == "EEE")  
        {  
            if (max_spalten < spaltenwert){max_spalten=spaltenwert;}spaltenwert=0;}  
        spaltenwert=spaltenwert+1;  
        if (Zeitpunkt_alt == "DDD")  
        {  
            Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;  
            Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];  
        }  
        else if ((Zeitpunkt_alt == Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt != "EEE"))  
        {  
            if (Zeitpunkt > 0)  
            {  
                Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;  
                Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];  
            }  
            else  
            {  
                Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;  
                Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];  
            }  
        }  
        else if ((Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt_alt == "EEE"))  
        {  
            Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;  
            Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];  
        }  
        if ((Zeitpunkt != "EEE")&&(Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt > 0))  
        {  
            Zeitpunkt_max=Zeitpunkt;  
            Anzahl_Belichtungen=Zeitpunkt/Lichtzeit;  
        }  
        Zeitpunkt_alt=Zeitpunkt;  
    }  
    for (i=1;i<=Anzahl_Belichtungen+1;i++)  
    {
```

```

for (j=1;j<=max_spalten;j++){printf ("%s ",Feld_neu[i,j]);
printf ("\n");
}
}' ${datei}_formatiert.txt > ${datei}_Kinetikwerte_670.txt

#####
# normierte Messwerte bei 672 nm (672,xx nm oder 671,xx nm) sortiert zur Belichtungszeit herauschreiben
#####

awk -v Lichtzeit=${Lichtzeit} 'BEGIN{zaehler=0;}{
    zaehler=zaehler+1;
    spalte_max=NF;
    for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++){Feld[zaehler,spalte]=$spalte;}
    zeile_max=zaehler;
    if ((substr($1,1,3) == "672") || (substr($1,1,3) == "671")){z_672=zaehler;}
}
}

END{

Zeitpunkt_alt="DDD";
spaltenwert=0;
max_spalten=0;

for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte++)
{
    Zeitpunkt=Feld[1,spalte];
if (Zeitpunkt != Zeitpunkt_alt)
    {
        if (max_spalten < spaltenwert){max_spalten=spaltenwert;}
        spaltenwert=1;
    }
    spaltenwert=spaltenwert+1;
    if (Zeitpunkt_alt == "DDD")
    {
        Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;
        Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
    }
    else if (Zeitpunkt_alt == Zeitpunkt)
    {
        if (Zeitpunkt > 0)
        {
            Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;
            Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
        }
        else
        {
            Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;
            Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
        }
    }
}
else if (Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)
{
    Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;
    Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_672,spalte];
}
if ((Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt > 0))
{
    Anzahl_Belichtungen=Zeitpunkt/Lichtzeit;
    Zeitpunkt_max=Zeitpunkt;
}
}
}

```

```
    Zeitpunkt_alt=Zeitpunkt;
}
for (i=1;i<=Anzahl_Belichtungen+1;i++)
{
    for (j=1;j<=max_spalten;j++){printf ("%s ",Feld_neu[i,j]);}
    printf ("\n");
}
}' ${datei}_formatiert_normiert.txt > ${datei}_Kinetikwerte_normiert_672.txt

#####
# normierte Messwerte bei 670 nm (670,xx nm oder 669,xx nm) sortiert zur Belichtungszeit herausschreiben
#####

awk -v Lichtzeit=${Lichtzeit} 'BEGIN{zaehler=0;}{
    zaehler=zaehler+1;
    spalte_max=NF;
    for (spalte=1;spalte<=spalte_max;spalte++){Feld[zaehler,spalte]=$spalte;}
    zeile_max=zaehler;
    if ((substr($1,1,3) == "670") || (substr($1,1,3) == "669")){z_670=zaehler;}
}

END{

    Zeitpunkt_alt="DDD";
    spaltenwert=0;
    max_spalten=0;

    for (spalte=2;spalte<=spalte_max;spalte++)
    {
        Zeitpunkt=Feld[1,spalte];
        if (Zeitpunkt != Zeitpunkt_alt)
        {
            if (max_spalten < spaltenwert){max_spalten=spaltenwert;}
            spaltenwert=1;
        }
        spaltenwert=spaltenwert+1;
        if (Zeitpunkt_alt == "DDD")
        {
            Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;
            Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];
        }
        else if (Zeitpunkt_alt == Zeitpunkt)
        {
            if (Zeitpunkt > 0)
            {
                Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;
                Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];
            }
            else
            {
                Feld_neu[1,1]=Zeitpunkt;
                Feld_neu[1,spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];
            }
        }
        else if (Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)
        {
            Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),1]=Zeitpunkt;
            Feld_neu[1+(Zeitpunkt/Lichtzeit),spaltenwert]=Feld[z_670,spalte];
        }
        if ((Zeitpunkt_alt != Zeitpunkt)&&(Zeitpunkt > 0))
```

```
{
  Anzahl_Belichtungen=Zeitpunkt/Lichtzeit;
  Zeitpunkt_max=Zeitpunkt;
}
Zeitpunkt_alt=Zeitpunkt;
}
for (i=1;i<=Anzahl_Belichtungen+1;i++)
{
  for (j=1;j<=max_spalten;j++){printf ("%s ",Feld_neu[i,j]);}
  printf ("\n");
}
}' ${datei}_formatiert_normiert.txt > ${datei}_Kinetikwerte_normiert_670.txt

rm ${datei}.txt

done

#####
# Verschieben der Dateien in die entsprechenden Unterordner.
#####

mv *formatiert.txt Formatiert/.
mv *formatiert_normiert.txt Formatiert_normiert/.
mv *Kinetikwerte_normiert*.txt Kinetikwerte_normiert/.
mv *Kinetikwerte*.txt Kinetikwerte/.

cd Kinetikwerte

mv *672.txt 672nm/.
mv *670.txt 670nm/.

cd ../Kinetikwerte_normiert

mv *672.txt normiert_672nm/.
mv *670.txt normiert_670nm/.

cd ..

mv Formatiert Filter${Schwellwert}/.
mv Formatiert_normiert Filter${Schwellwert}/.
mv Kinetikwerte_normiert Filter${Schwellwert}/.
mv Kinetikwerte Filter${Schwellwert}/.

exit
```

6.3 LPOR-Reinigung

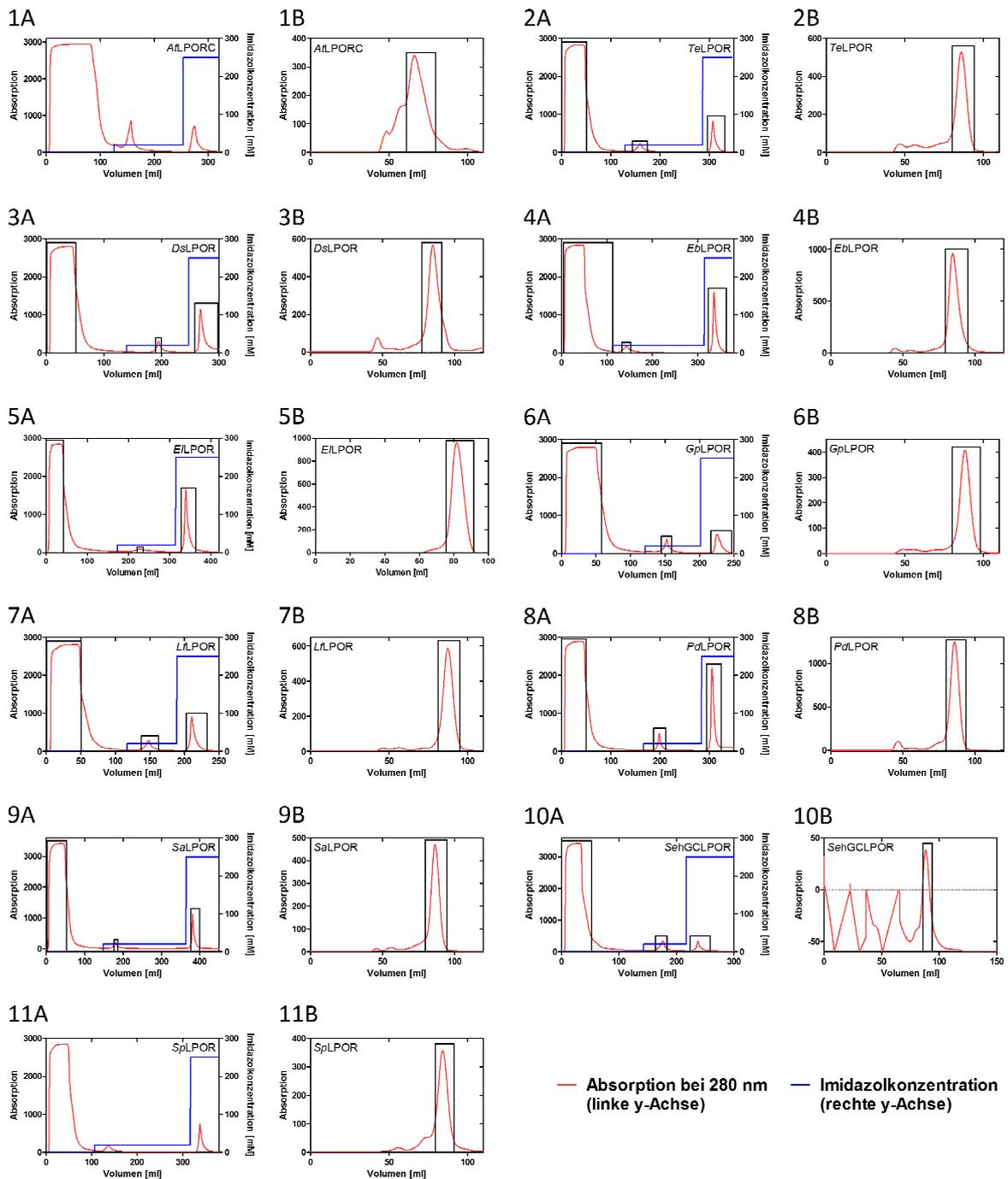


Abbildung 60: Chromatogramme der IMAC und Größenausschlusschromatographie. Alle mit einem (A) beschrifteten Chromatogramme zeigen die Proteinreinigung mittels IMAC an Ni²⁺-NTA-Material. Die mit (B) markierten Chromatogramme zeigen die Reinigung mittels Größenausschlusschromatographie. Die roten Linien zeigen die Absorption bei 280 nm (linke y-Achse) und die blauen Linien zeigen die Imidazolkonzentration, welche auf der rechten y-Achse abgebildet ist.

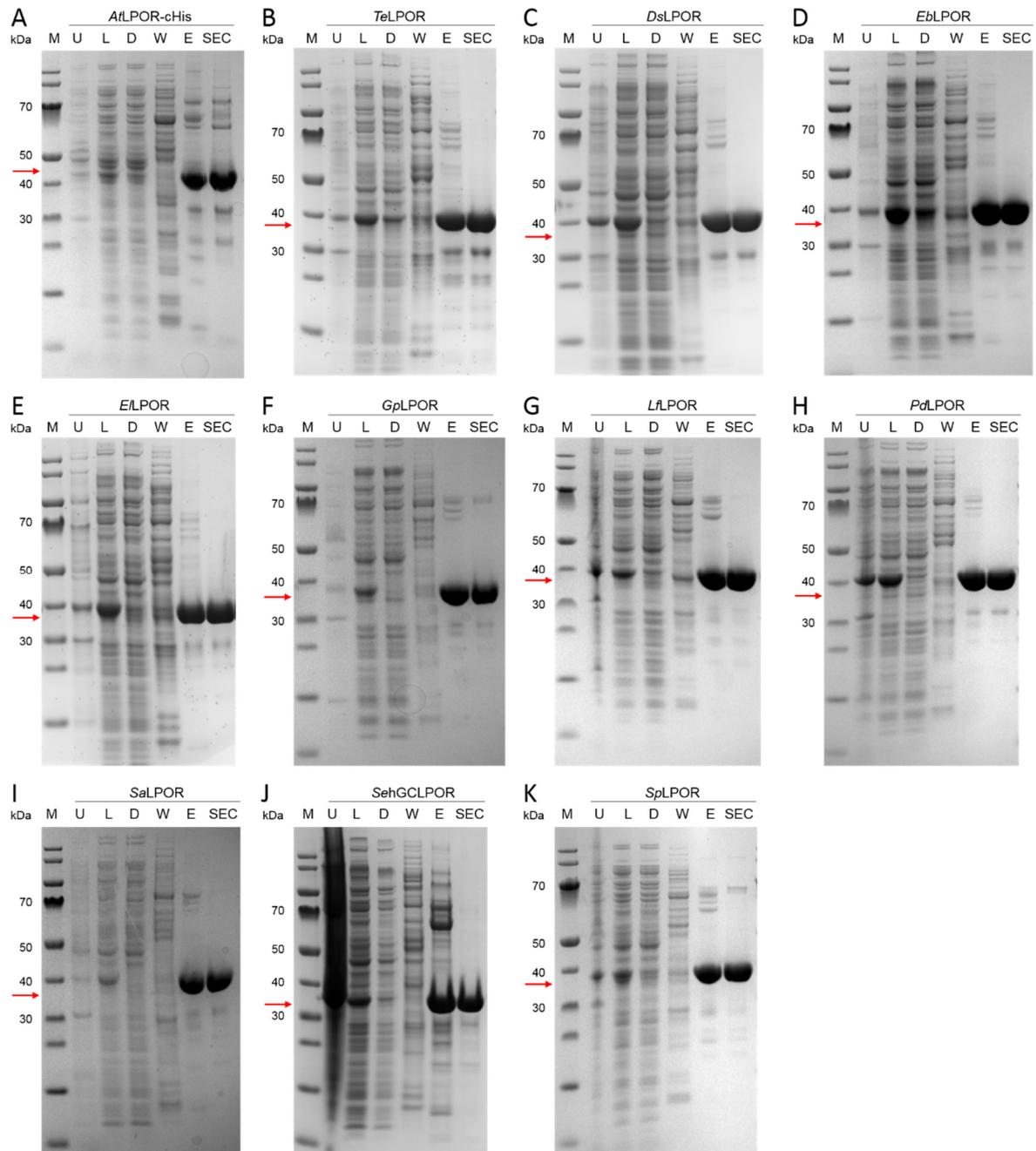
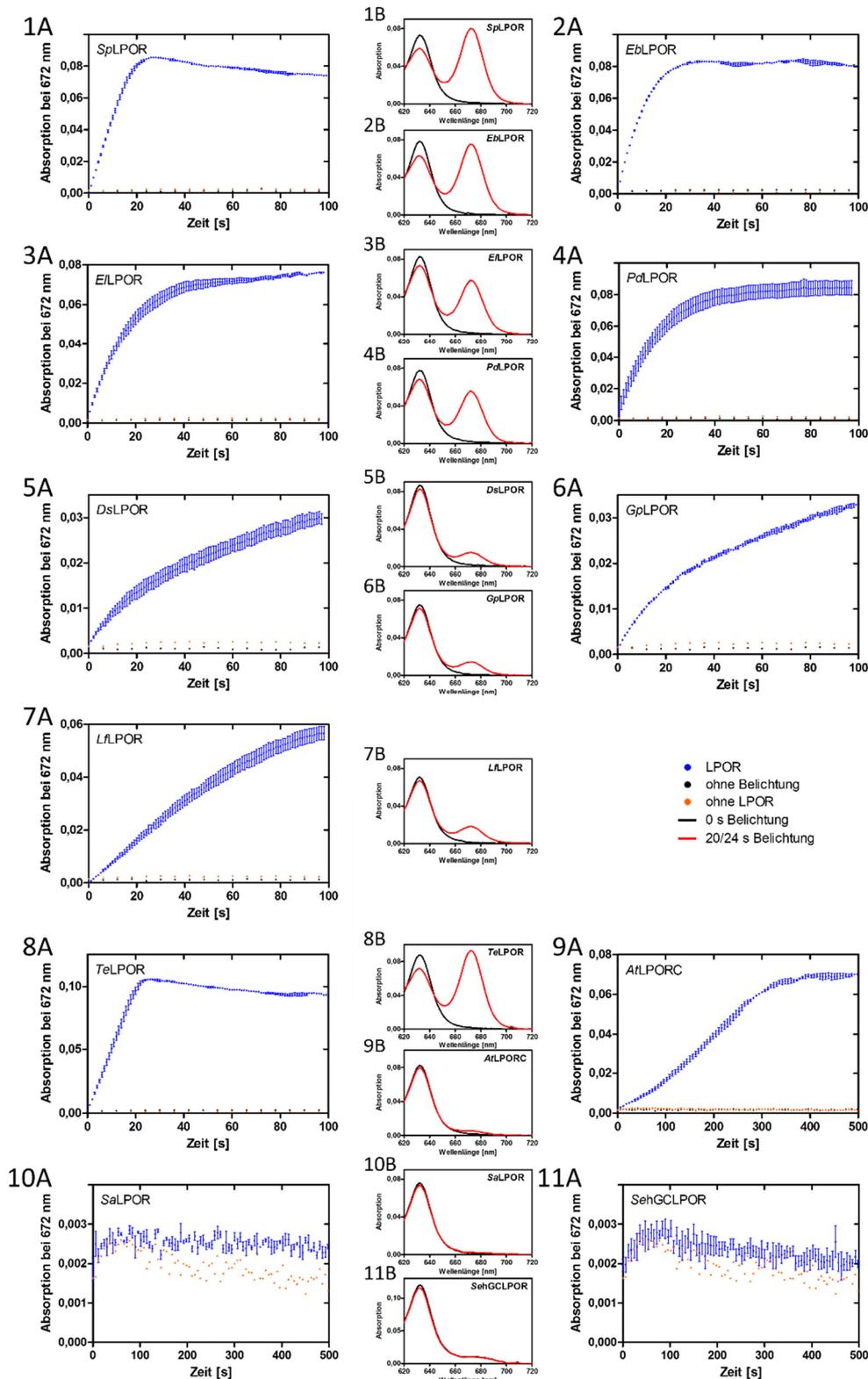


Abbildung 61: SDS-PAGE-Analysen aller LPOR-Reinigungen. Es wurden Gradientengele (NuPAGE® 4-15 % Bis-TRIS-Gel) der Firma Thermo Fisher Scientific (Bonn, Deutschland) verwendet. Die Trennung der Moleküle erfolgte für eine Stunde bei 150 V unter Verwendung des MES-Laufpuffers. Zur Abschätzung der Molekülgröße wurde als Referenz der Molekulargewichtsstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet. Die roten Pfeile zeigen das theoretische Molekulargewicht der jeweiligen LPOR an.

6.4 LPOR-Aktivität



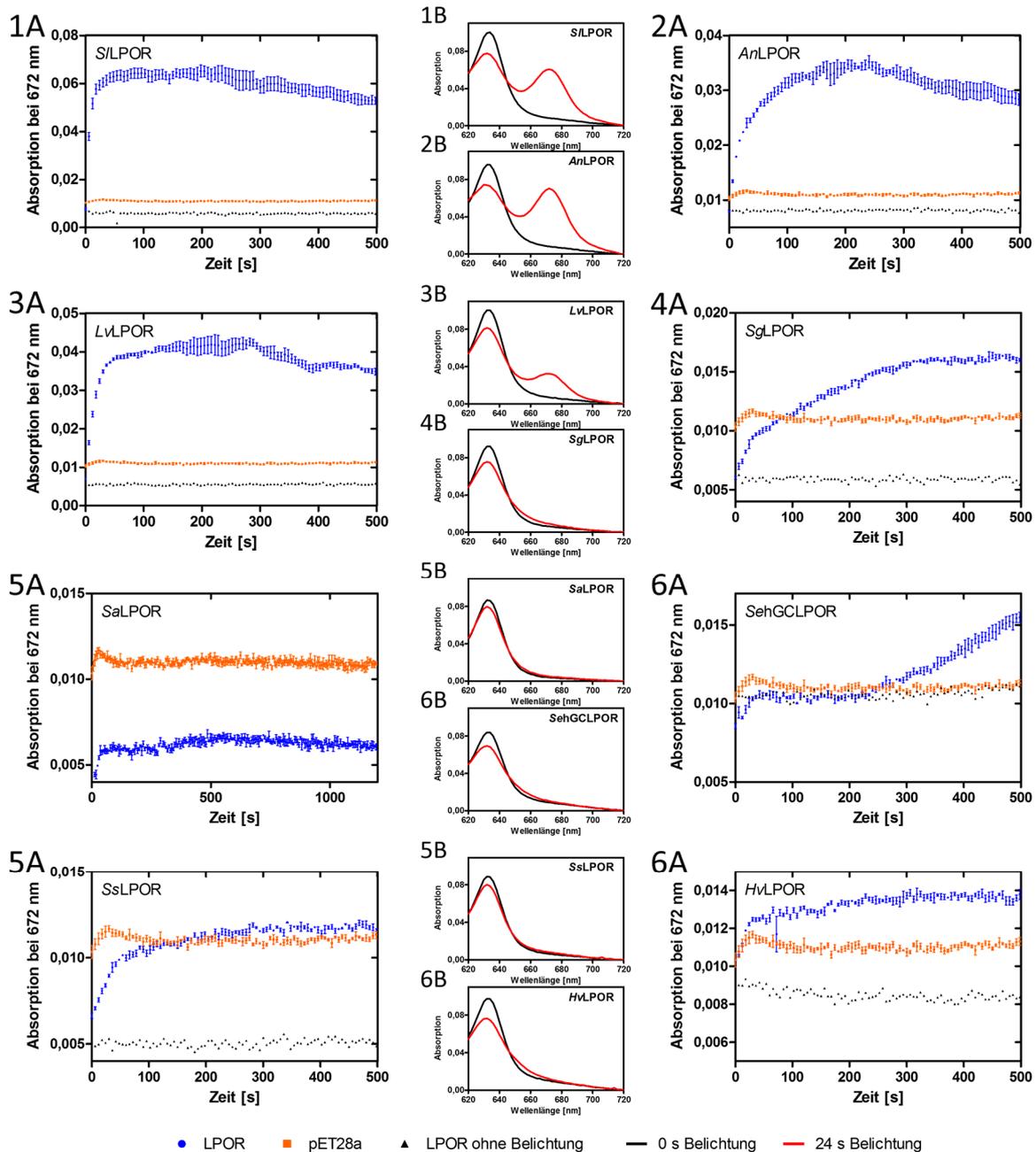


Abbildung 63: Rohextrakt-Aktivität aller LPORs mit allen Kontrollen und Spektren als Aktivitätsnachweis. Die Durchführung der Aktivitätsmessung erfolgte wie in Kapitel 2.17 beschrieben unter Verwendung von 3,5 μ M Pchlid und 250 μ l Rohextrakt. Die mit (A) gekennzeichneten Graphen zeigen die zeitabhängige Absorptionsänderung bei 672 nm. Als Kontrolle der Lichtabhängigkeit wurde unter Verwendung jedes Enzyms eine Kontrolle ohne Belichtung (schwarze Punkte) angefertigt. Des Weiteren wurde eine Kontrolle unter Zugabe von Rohextrakt, gewonnen aus pET28a-Leervektor tragenden Zellen, angefertigt (orange Punkte). In blau ist die Aktivitätsmessung unter Verwendung des Rohextraktes mit der jeweiligen LPOR dargestellt. Die mit einem (B) versehenen Graphen zeigen Absorptionsspektren der unterschiedlichen LPORs vor (schwarze Linie) und nach 24 s Belichtung mit Blaulicht.

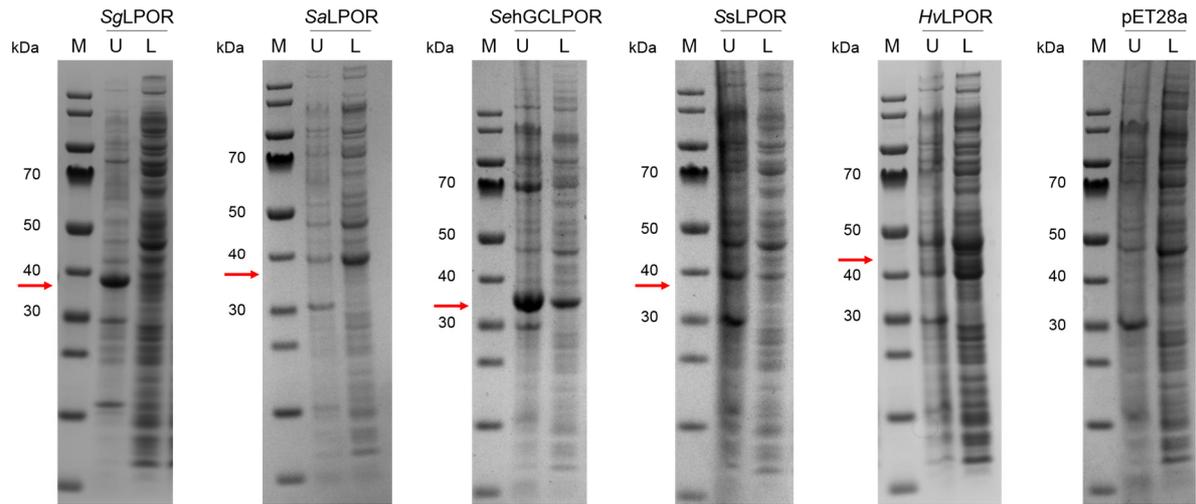


Abbildung 64: SDS-PAGE-Analysen der unlöslichen (U) und löslichen (L) Fraktionen der Proben für die Rohextrakt-Aktivitätsmessungen. Es wurden Gradientengele (NuPAGE® 4-15 % Bis-TRIS-Gel) der Firma Thermo Fisher Scientific (Bonn, Deutschland) verwendet. Die Trennung der Moleküle erfolgte für eine Stunde bei 150 V unter Verwendung des MES-Laufpuffers. Zur Abschätzung der Molekülgröße wurde als Referenz der Molekulargewichtsstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland) verwendet. Die roten Pfeile zeigen das theoretische Molekulargewicht der jeweiligen LPOR an.

6.5 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d

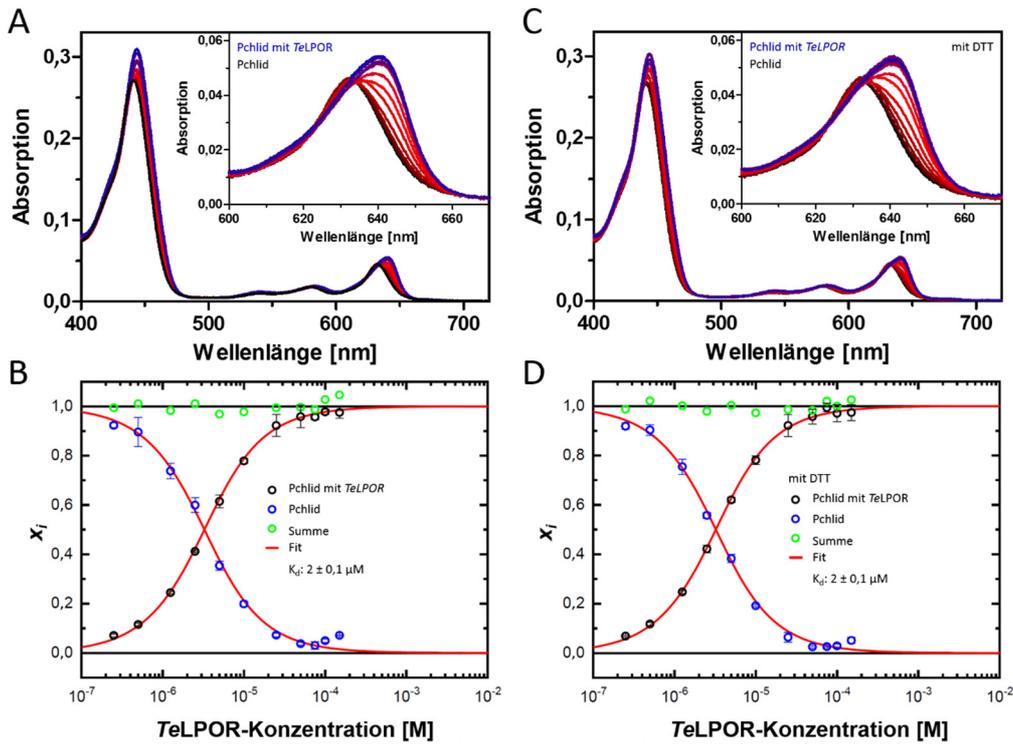


Abbildung 65: K_d -Wert-Bestimmung der TeLPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

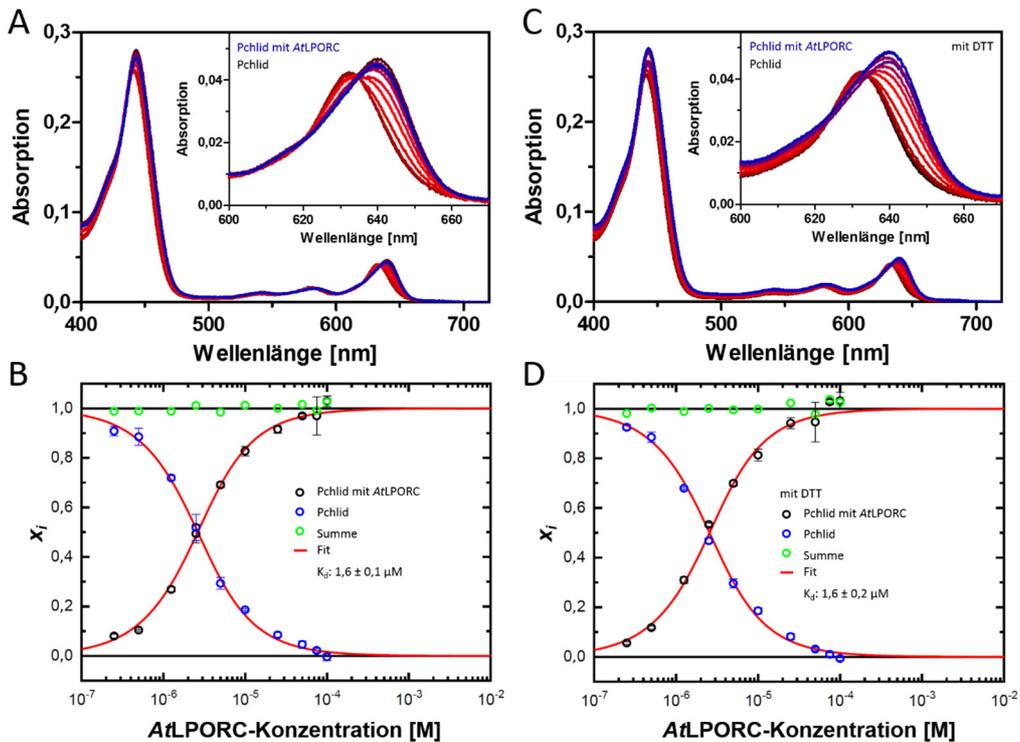


Abbildung 66: K_d -Wert-Bestimmung der AtLPORC. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

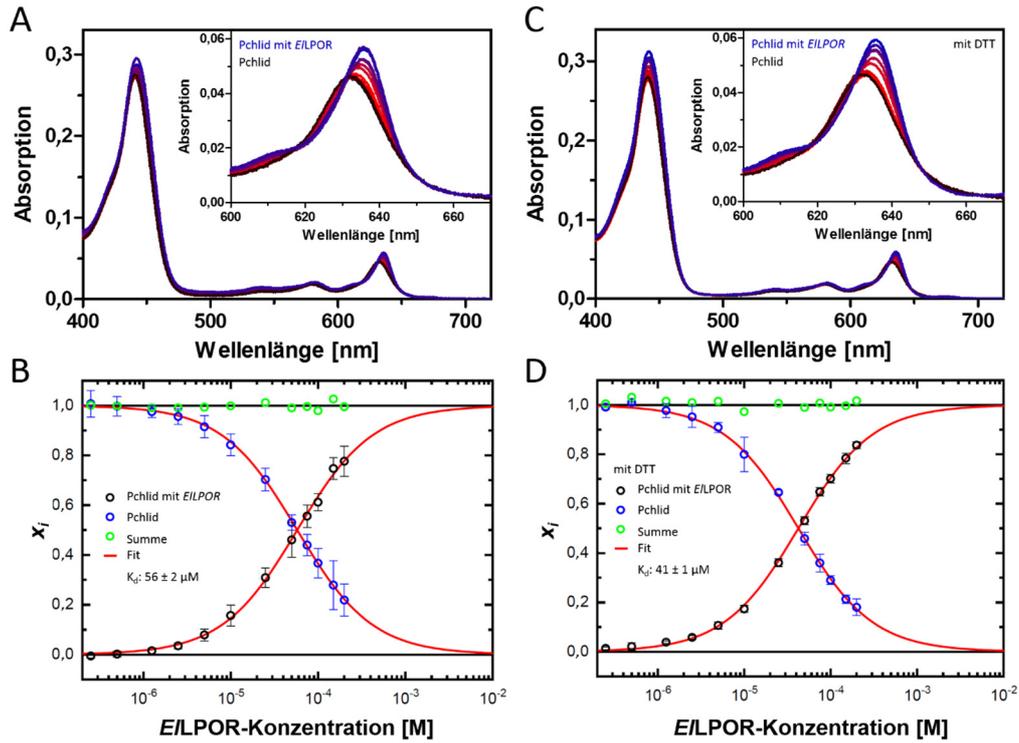


Abbildung 67: K_d -Wert-Bestimmung der EILPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

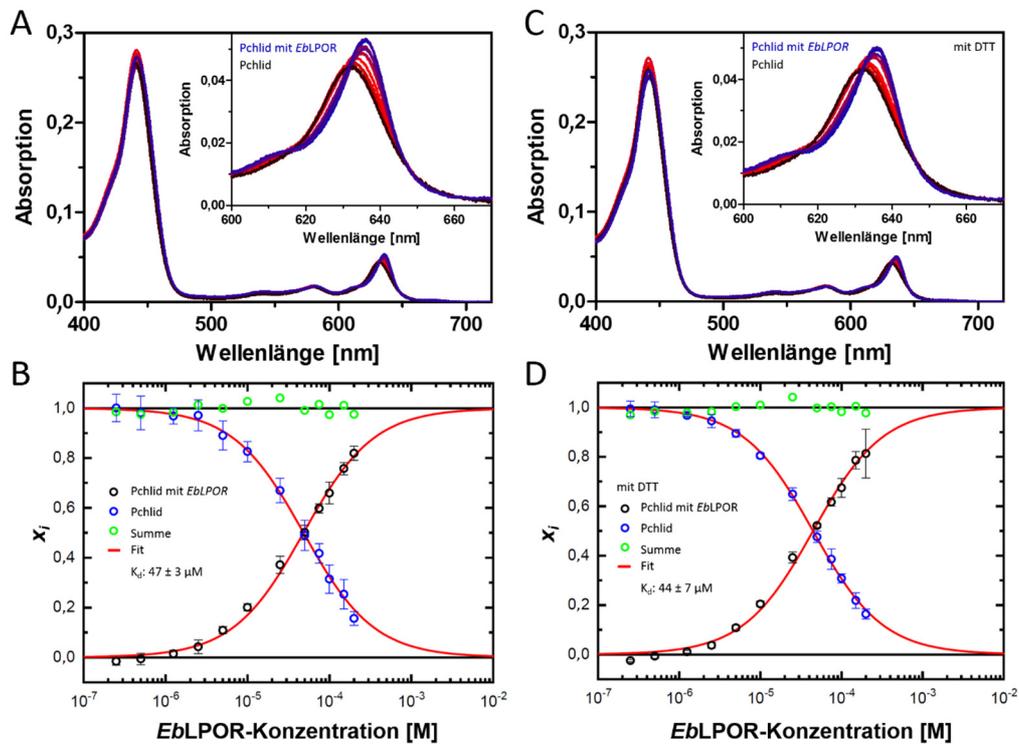


Abbildung 68: K_d -Wert-Bestimmung der EbLPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

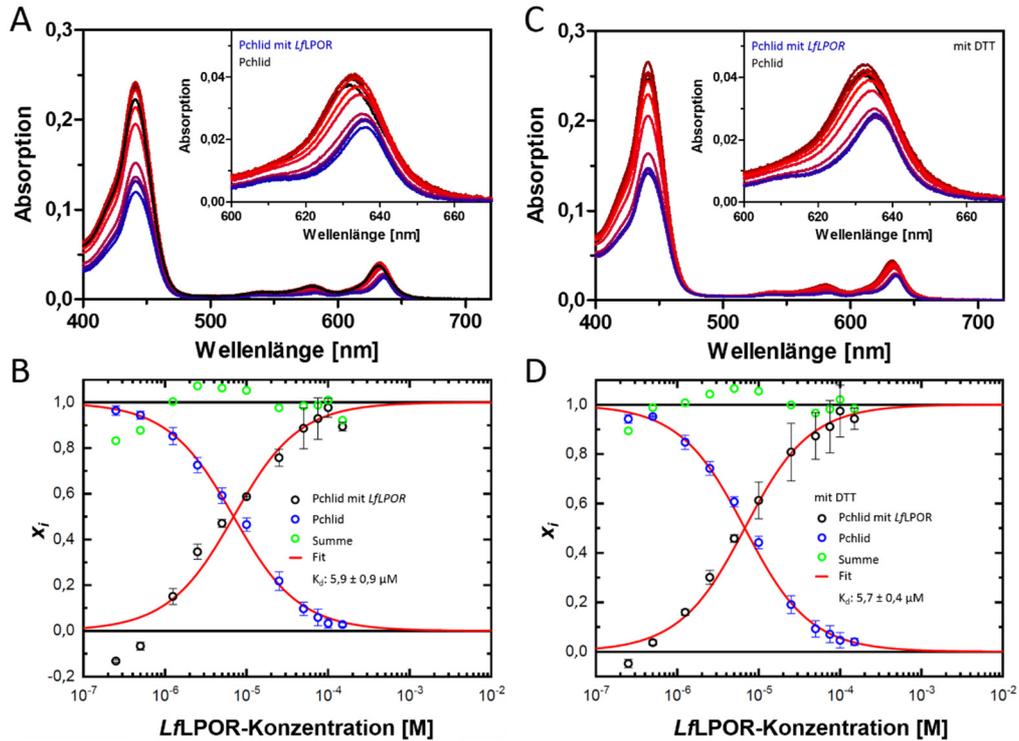


Abbildung 69: K_d -Wert-Bestimmung der LfLPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

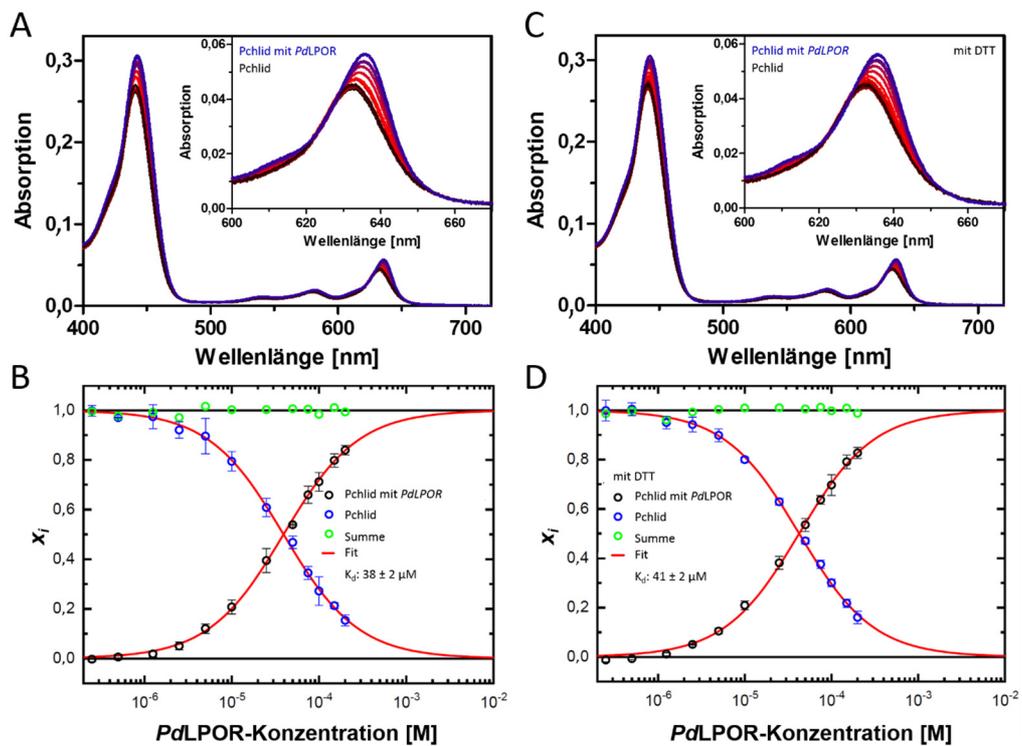


Abbildung 70: K_d -Wert-Bestimmung der PdLPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

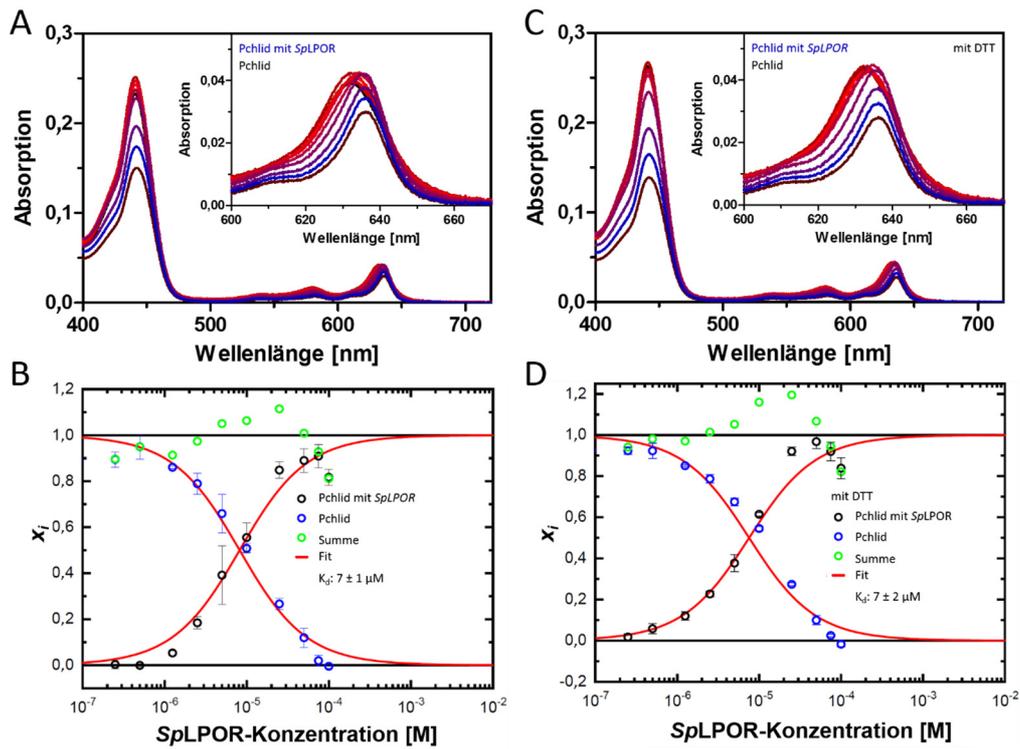


Abbildung 71: K_d -Wert-Bestimmung der SpLPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

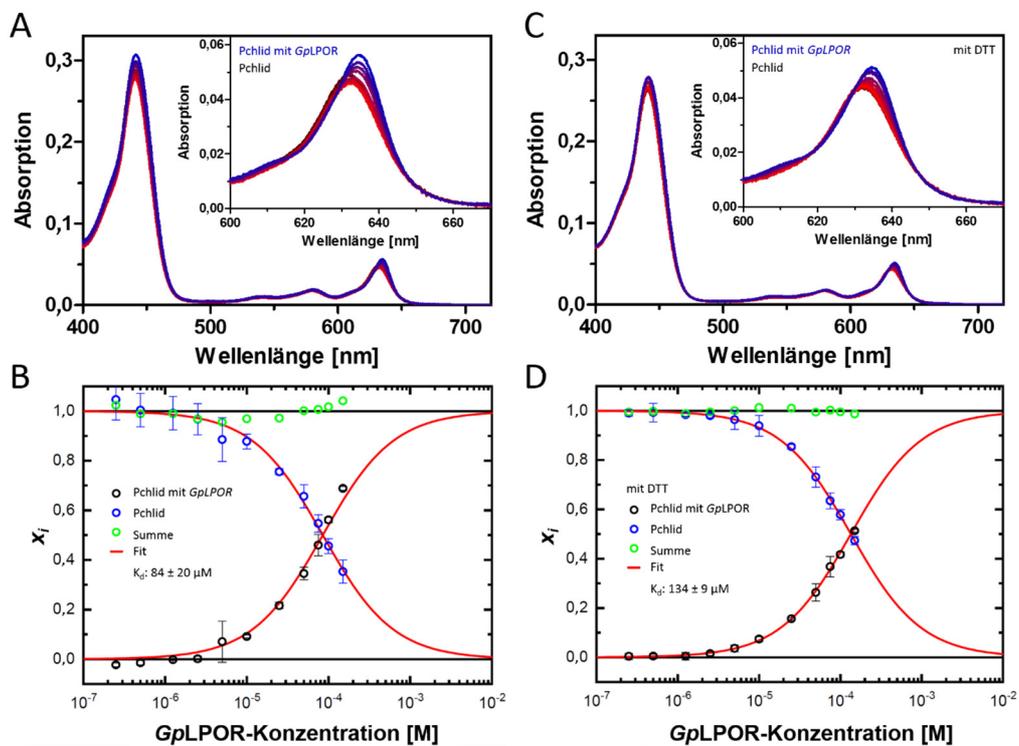


Abbildung 72: K_d -Wert-Bestimmung der GpLPOR. (A) Auswertung der Absorptionsmessung (B) ohne Zugabe von DTT. (C) Auswertung der Absorptionsmessung (D) unter Zugabe von DTT. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Roger J. Kutta (Universität Regensburg) mittels LabView (National Instruments, Austin, Texas, USA) und selbstgeschriebener Skripte in C.

6.6 Substratspezifität

Tabelle 32: Übersicht über die enzymkinetischen Parameter in Abhängigkeit vom Substrat unter Verwendung der „Substrat Inhibition“-Funktion.

LPOR	K_m [μM]	V_{\max} [mU/mg]	K_i [μM]	R^2
MV-Pchlid				
<i>Te</i> LPOR	$0,60 \pm 0,06$	769 ± 29	$11,82 \pm 1,46$	0,97
<i>At</i> LPORC	$0,58 \pm 0,07$	437 ± 21	$6,89 \pm 0,82$	0,96
<i>E</i> LPOR	$8,54 \pm 3,05$	1.407 ± 433	$2,55 \pm 1,08$	0,98
<i>Ds</i> LPOR	$0,84 \pm 0,29$	20 ± 3	$2,79 \pm 0,84$	0,80
<i>Eb</i> LPOR	$3,85 \pm 1,30$	1.031 ± 276	$1,52 \pm 0,53$	0,95
<i>Lf</i> LPOR	$1,06 \pm 0,17$	764 ± 64	$5,40 \pm 0,92$	0,95
<i>Pd</i> LPOR	$13,39 \pm 7,96$	2.648 ± 1.435	$1,04 \pm 0,65$	0,98
<i>Sp</i> LPOR	$4,69 \pm 1,78$	867 ± 272	$1,37 \pm 0,54$	0,96
<i>Gp</i> LPOR	uneindeutig			0,90
DV-Pchlid				
<i>Te</i> LPOR	$0,37 \pm 0,05$	863 ± 38	$11,06 \pm 1,73$	0,95
<i>At</i> LPORC	$0,75 \pm 0,10$	528 ± 34	$5,34 \pm 0,70$	0,95
<i>E</i> LPOR	$0,85 \pm 0,21$	213 ± 25	$6,63 \pm 1,79$	0,87
<i>Ds</i> LPOR	$4,29 \pm 2,91$	139 ± 77	$1,18 \pm 0,79$	0,83
<i>Eb</i> LPOR	uneindeutig			0,96
<i>Lf</i> LPOR	$3,23 \pm 0,84$	2.688 ± 534	$1,83 \pm 0,49$	0,96
<i>Pd</i> LPOR	$0,96 \pm 0,31$	344 ± 64	$2,58 \pm 0,77$	0,81
<i>Sp</i> LPOR	$0,90 \pm 0,11$	488 ± 30	$6,31 \pm 0,92$	0,97
<i>Gp</i> LPOR	$8,92 \pm 7,22$	785 ± 557	$1,04 \pm 0,86$	0,90

6.7 Messung der Temperaturstabilität und des Schmelzpunktes

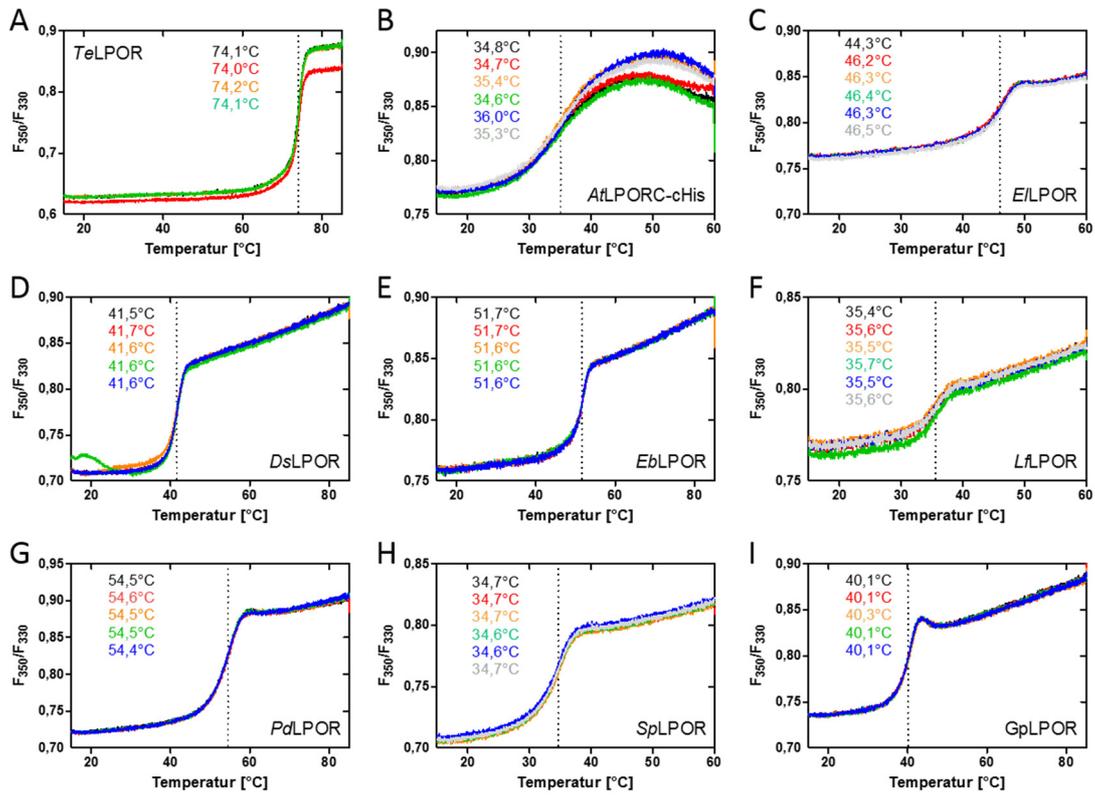


Abbildung 73: Schmelzkurven zur Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m). Die schwarze gestrichelte Linie zeigt den Mittelwert der angegebenen Schmelztemperaturen an.

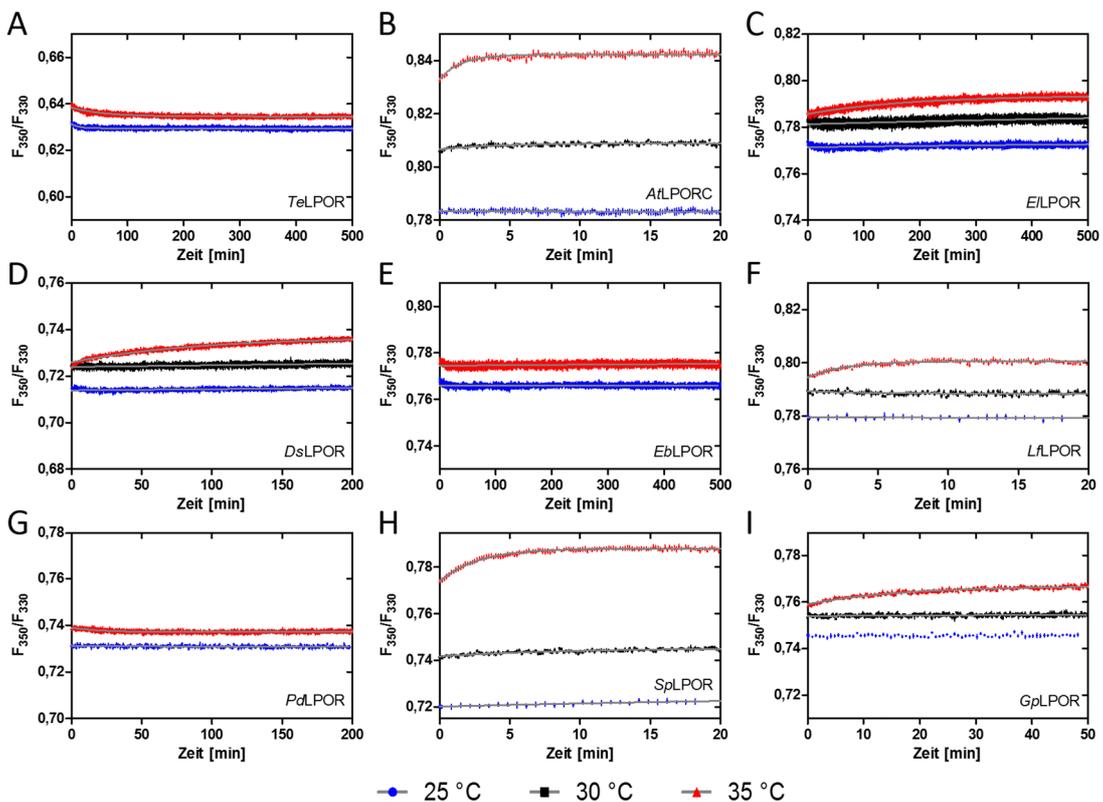


Abbildung 74: Messung der Thermostabilität bei verschiedenen Temperaturen.

6.8 Kristallisationscreens

Tabelle 33: Eigener Kristallisationscreen 1.

PEG	6 %	8 %	10 %	12 %	14 %	16 %	18 %	20 %	22 %	24 %	26 %	28 %
400												
200MME												
3.350												
4.000												
6.000												
8.000												
10.000												
20.000												
Puffer	100 mM TRIS, pH 8,5											

Tabelle 34: Eigener Kristallisationsscreen 2.

PEG	10 %			12 %			14 %			16 %		
4.000												
6.000												
8.000												
10.000												
PEG	18 %			20 %			22,5 %			25 %		
4.000												
6.000												
8.000												
10.000												
Puffer	100 mM HPES pH 7,5	100 mM TRIS pH 7,5	100 mM TRIS pH 8,5	100 mM HPES pH 7,5	100 mM TRIS pH 7,5	100 mM TRIS pH 8,5	100 mM HPES pH 7,5	100 mM TRIS pH 7,5	100 mM TRIS pH 8,5	100 mM HPES pH 7,5	100 mM TRIS pH 7,5	100 mM TRIS pH 8,5

Tabelle 35: Eigener Kristallisationsscreen 3.

PEG	15 %				20 %				25 %			
400												
200MME												
3.350												
4.000												
6.000												
8.000												
10.000												
20.000												
Puffer	200 mM Kalium- iodid	200 mM Lithium- acetat	200 mM Ammonium- nitrat	100 mM MES, pH 6,6 100 mM Natrium- acetat	200 mM Kalium- iodid	200 mM Lithium- acetat	200 mM Ammonium- nitrat	100 mM MES, pH 6,6 100 mM Natrium- acetat	200 mM Kalium- iodid	200 mM Lithium- acetat	200 mM Ammonium- nitrat	100 mM MES, pH 6,6 100 mM Natrium- acetat

Tabelle 36: Eigener Kristallisationsscreen 4.

PEG	8 %				10 %				12 %			
400												
3.350												
PEG	14 %				16 %				18 %			
400												
3.350												
PEG	20 %				22 %				24 %			
400												
3.350												
PEG	26 %				28 %				30 %			
400												
3.350												
Puffer	200 mM Kalium- iodid	200 mM Lithium- acetat	200 mM Ammonium- nitrat	100 mM MES, pH 6,6 100 mM Natrium- acetat	200 mM Kalium- iodid	200 mM Lithium- acetat	200 mM Ammonium- nitrat	100 mM MES, pH 6,6 100 mM Natrium- acetat	200 mM Kalium- iodid	200 mM Lithium- acetat	200 mM Ammonium- nitrat	100 mM MES, pH 6,6 100 mM Natrium- acetat

6.9 SAXS

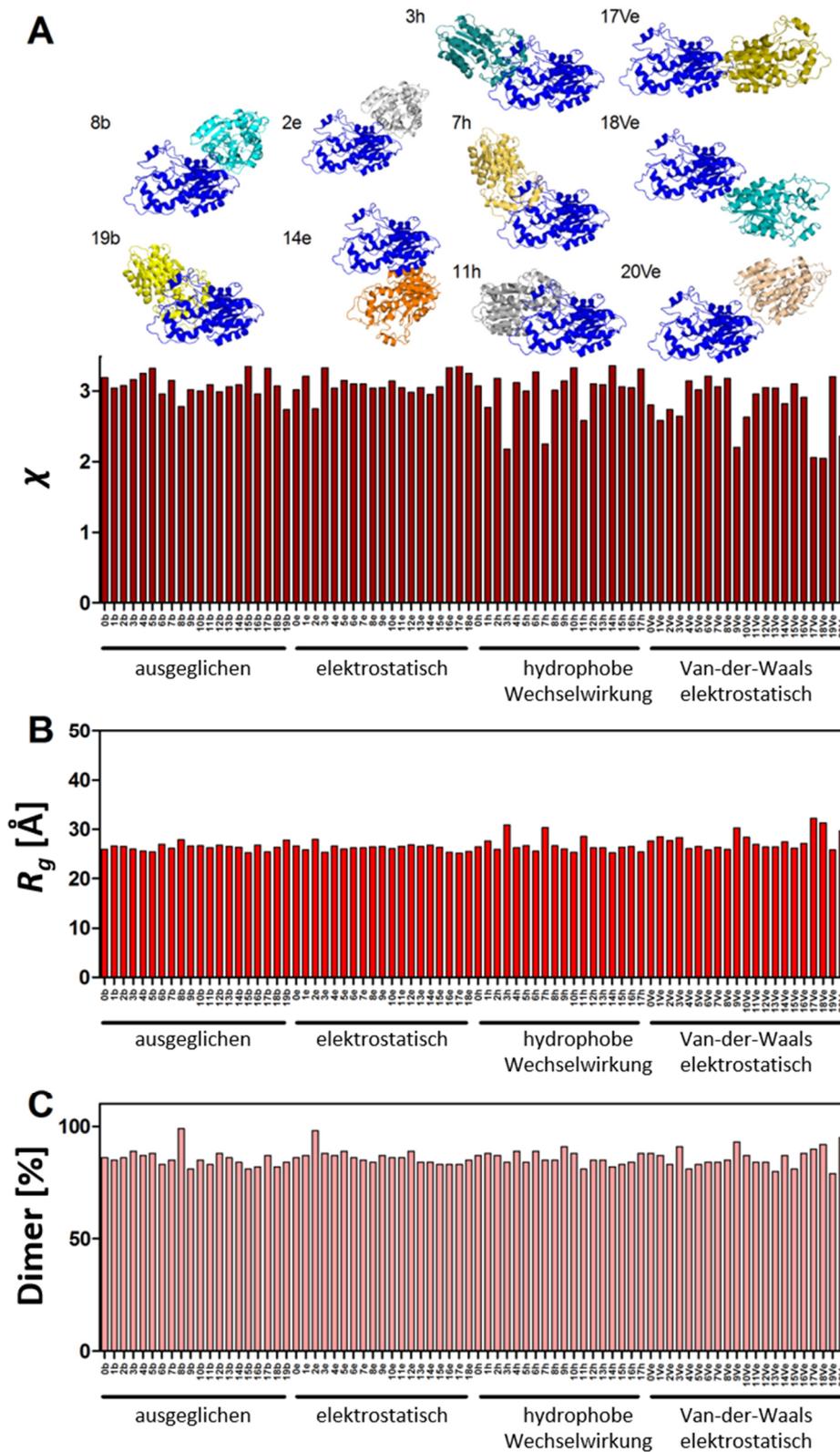


Abbildung 75: TeLPOR-Holoprotein-Dimermodellierung. Bewertung der TeLPOR-Holoprotein-Modelle anhand des χ -Werts (A), des Streumasseradius (B) und des Dimeranteils (C). Die TeLPOR-Holoprotein-Dimermodelle wurden über Homo-Multimer Protein-Protein *docking* unter Verwendung des ClusPro-Webservices generiert. Hierbei wurde als Monomermodell das TeLPOR-Hauptdomäne-Modell verwendet. Alle Modelle wurden mit der experimentellen Streukurve des Holoproteins (5,0 mg/ml Datensatz) unter Verwendung des Programms OLIGOMER verglichen. Die benötigten Formfaktor-Dateien wurden unter Verwendung von FFMAKER aus der jeweiligen PDB-Datei erzeugt. *R_g*: Streumasseradius.

7 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die vorgelegte Dissertation wurde in dieser oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Judith Schneidewind