



**Photochemie, Photophysik und Anwendung von light,
oxygen, voltage (LOV) Domänen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Stefanie Hemmer

aus Neuss

Düsseldorf, 19.07.2023

Aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2024

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation „Photochemie, Photophysik und Anwendung von light, oxygen, voltage (LOV) Domänen“ von mir selbstständig verfasst und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel gemäß den „Grundsätzen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt wurde. Bisher habe ich keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Stefanie Hemmer

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Möglichkeit diese Promotion an seinem Institut durchzuführen. Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für ihre Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Ulrich Krauss, der mich vom Beginn bis zum Ende dieser Dissertation betreut sowie wertvolle Hilfestellungen gegeben hat. Des Weiteren danke ich ihm sowohl für die interessante Themenstellung, als auch für sein professionelles Lektorat. Darüber hinaus möchte ich seiner Arbeitsgruppe Molecular Biophotonics für das herzliche Arbeitsklima und die freundliche Interaktion seit Beginn meiner Bachelorarbeit danken. Für ihre vielfältige Unterstützung während der Corona-Pandemie, während meiner gesamten Promotion und während meiner Schwangerschaft, bin ich besonders der Laboringenieurin Esther Knieps-Grünhagen wie auch den beiden Laborassistentinnen Maja Piqueray und Katharina Range verbunden. Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Enzymtechnologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt all meinen Kooperationspartnern: Insbesondere danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg (RWTH Aachen, M.Sc. Niklas Siedhoff, M.Sc. Khalil Essani, Dr. Volkan Besirlioglu) und Dr. Mehdi D. Davari (IPB Halle) für die Zusammenarbeit im Rahmen des Teilsprojektes zur Anpassung der Dunkelrückkehr von *AsLOV2* mittels Methoden des maschinellen Lernens und des Projektes zur Anpassung der spektralen Eigenschaften von *iLOV* mittels gerichteter Evolution und FACS-basiertem Hochdurchsatzscreening. Dr. Roger-Jan Kutta (Universität Regensburg) danke ich für die Zusammenarbeit und die Untersuchung der Adduktbildungsmechanismen in *AsLOV2* und *DsLOV*. Mein Dank gilt außerdem Dr. Andreas Stadler (JCNS-1 / IBI-8, FZ-Jülich) und Dr. Mona Sarter (STFC Rutherford Appleton Laboratory) für die Durchführung dynamischer Messungen mittels Quasielastischer Neutronenstreuung zur Untersuchung dynamischer Änderungen während der Dunkelrückkehr in *PpSB1-LOV*. Außerdem danke ich meinen Student*innen Sophia Werner und Philipp Elbers für ihre Unterstützung bei der Erzeugung und Charakterisierung einzelner *AsLOV2* und *iLOV*-Varianten.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Mann bedanken, die dieses Studium unterstützt, mich motiviert und mir stets den Rücken freigehalten haben.

Zusammenfassung

Light, Oxygen, Voltage (LOV)-Photorezeptoren sind wichtige Blaulicht-Photorezeptoren, die bei Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Protisten vorkommen und eine Anpassung an Lichtveränderungen ermöglichen. Sie durchlaufen einen reversiblen Photozyklus, der ihre Signalfunktion bestimmt. Im Dunkelzustand bindet ein Flavinmononukleotid-Chromophor nicht-kovalent an die LOV-Domäne(n) des Proteins. Belichtung mit blauem Licht führt zu einer Reihe von photochemischen und photophysikalischen Prozessen, welche zur Bildung eines kovalenten Flavin-Cysteinylthiol-Addukts führen. Die Ausbildung dieses Lichtzustands führt zu strukturellen Veränderungen in der LOV-Domäne, die die Aktivität des Photorezeptors kontrollieren und eine physiologische Reaktion auslösen. Im Dunkeln kehrt das LOV-Protein in seinen Dunkelzustand zurück (Dunkelrückkehr), wobei die Flavin-Cystein-Bindung thermisch gebrochen wird, was je nach Protein Sekunden, bis hin zu Tagen dauern kann. Neben ihrer regulatorischen Funktion werden LOV-Photorezeptoren und isolierte LOV-Domänen weitreichend für die Entwicklung von optogenetischen und biophotonischen Werkzeugen eingesetzt. Optogenetische Werkzeuge ermöglichen die reversible Kontrolle biologischer Prozesse mit hoher Präzision, während LOV-basierte biophotonische Werkzeuge als fluoreszierende Proteine zur Visualisierung biologischer Prozesse oder als Photosensibilisatoren zur irreversiblen Ausschaltung von Zellfunktionen genutzt werden. Ein detailliertes Verständnis der Struktur und Mechanismen von LOV-Photorezeptoren ist entscheidend für das Design und die Optimierung solcher Werkzeuge. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher auf drei Hauptthemen, die das Verständnis und die Optimierung von LOV-Photorezeptoren und LOV-basierten fluoreszierenden Proteinen betreffen.

Im ersten Teilprojekt wurde der LOV-Photozyklus und die Dunkelrückkehr untersucht, wobei mithilfe eines maschinellen Lernansatzes (ML) versucht wurde, Varianten der *Avena sativa* Phototropin-1 LOV2 (*AsLOV2*)-Domäne mit schnellerer und langsamerer Dunkelrückkehr zu erhalten. Über drei Vorhersage-Validierungszyklen wurden eine signifikant schnellere (*AsLOV2*-I427T/L446M/E475T, $\tau_{\text{rec}} = 0,4 \pm 0$ s) und signifikant langsamere Variante (*AsLOV2*-N414L/V416L, $\tau_{\text{rec}} > 103.020$ s) erzeugt. Anschließend wurde eine der schnellen Varianten, *AsLOV2*-V416T, die im Rahmen des ersten Teilprojekts identifiziert wurde, und *DsLOV*-M49S, eine Variante des LOV-Photorezeptors *DsLOV* aus *Dinoroseobacter shibae*, welche ebenfalls eine schnelle Dunkelrückkehr besitzt, mittels transients Absorptionsspektroskopie untersucht, um die Bildung des reaktiven Triplett-Zustands und die Mechanismen der Adduktbildung zu verstehen. Interessanterweise wurde

eine Korrelation zwischen langsamer Adduktbildung und schneller Dunkelrückkehr beobachtet, was auf sterische Wechselwirkungen hindeutet, die den Lichtzustand in LOV-Photorezeptoren stabilisieren. Eine vorläufige Datenanalyse deutet auf das Vorhandensein eines Zwischenprodukts hin, das der Adduktbildung vorausgeht.

Das zweite Teilprojekt befasste sich mit der Anpassung der spektralen Eigenschaften des LOV-basierten, Flavin-bindenden fluoreszierenden Proteins iLOV, das ursprünglich durch *gene-shuffling* der Gene mehrerer pflanzlicher LOV-Domänen erzeugt wurde. Mittels kombinatorischer Sättigungsmutagenese von drei Aminosäurepositionen in der Nähe des Flavin-Chromophors und einem Ultra-Hochdurchsatz-Screening mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (Engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) wurden verschiedene iLOV-Varianten mit rot- und blauverschobenen spektralen Eigenschaften identifiziert. Im Vergleich zum ursprünglichen iLOV-Protein und zu Literaturdaten wurden hier zwei Varianten mit einer signifikanten Blauverschiebung der Absorptions- und der Fluoreszenzemissionsmaxima (iLOV-V392A/Q489A und iLOV-Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493) und eine Variante mit einem deutlich rotverschobenen Fluoreszenzemissionsmaximum, aber einem blauverschobenen Absorptionsmaximum (iLOV-V392C/G487S/Q489L) identifiziert.

Nicht zuletzt wurden im dritten Teilprojekt die strukturellen und dynamischen Veränderungen während der Dunkelrückkehr des LOV-Photorezeptor *PpSB1-LOV* aus *Pseudomonas putida* KT2440 mit einer Kombination aus UV/Vis-, Kernspinresonanz (Engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie und quasielastischen Neutronenstreuungs (QENS)-Messungen untersucht, was neue Einblicke in die Dynamik und die strukturelle Basis der Signalweiterleitung in *PpSB1-LOV* lieferte. Interessanterweise wurde eine Entkopplung des Zerfalls des Adduktzustands (gemessen durch UV/Vis und NMR) und der strukturellen Rückkehr in den Dunkelzustand (bestimmt durch NMR) beobachtet, was auf das Vorhandensein eines zuvor nicht beobachteten strukturellen Zwischenprodukts hindeutet. Dynamische QENS-Studien ergaben, dass die Dynamik der Proteinseitenketten auf der Zeitskala von Pikosekunden bis Nanosekunden von der Bildung des Adduktzustands beeinflusst wird und dass die Reversion dieser Änderungen offenbar dem vollständigen Brechen des Addukts vorausgeht. Zusammenfassend weisen die hier präsentierten Daten auf eine bisher unbekannte globale dynamische, strukturelle und kinetische Komplexität in diesem Photorezeptor hin.

Abstract

Light, oxygen, voltage (LOV)-photoreceptors are vital blue-light photoreceptors found in plants, fungi, bacteria, and protists, enabling physiological adaptation to light changes. These receptors undergo a reversible photocycle, determining their signaling function. In darkness, a flavin mononucleotide chromophore binds non-covalently to the protein. Upon blue-light exposure, a series of photochemical and photophysical steps lead to the formation of a covalent flavin-cysteinyllthiol-adduct. This light-state formation triggers significant structural changes, controlling the photoreceptor's activity and initiating a physiological response. In the dark, the flavin-cysteine bond is thermally broken and LOV-protein returns to its initial dark state (dark recovery), which can take between seconds to days, depending on the LOV-protein. Besides their regulatory role, LOV-photoreceptors and their isolated sensory LOV-domains are widely used for optogenetic and biophotonic tool development. Optogenetic tools enable reversible control of biological processes with high precision, while LOV-based biophotonic tools serve as fluorescent proteins for visualizing biological processes or photosensitizers for the irreversible ablation of cellular functions. To design and optimize such tools, a comprehensive understanding of the structural and mechanistic aspects of LOV-photoreceptors is crucial. Therefore, this thesis focused on three subjects concerning the understanding and optimization of LOV-photoreceptors and LOV-based fluorescent proteins.

The first subproject investigated the LOV-photocycle and dark recovery kinetics using a machine learning (ML) approach to predict variants of the *Avena sativa* phototropin-1 LOV2 domain (*AsLOV2*) with faster and slower dark recovery. Over three prediction-validation cycles a significantly faster (*AsLOV2*-I427T/L446M/E475T, $\tau_{\text{rec}} = 0.4 \pm 0$ sec) and a significantly slower variant (*AsLOV2*-N414L/V416L, $\tau_{\text{rec}} > 103,020$ sec) were generated. Subsequently, a fast reverting variant *AsLOV2*-V416T, identified as part of the first subproject, and *DsLOV*-M49S, a fast reverting variant of a LOV-photoreceptor of *Dinoroseobacter shibae* were studied by transient absorption spectroscopy to understand the formation of the reactive triplet state and the mechanisms of adduct formation. Interestingly, a correlation between slow adduct formation and fast adduct reversion was observed, which hints at steric interactions stabilizing the light state in LOV-photoreceptors. Preliminary data analysis suggests the presence of an intermediate preceding adduct formation, whose nature, however, needs to be determined.

The second subproject dealt with the adaptation of the spectral properties of the LOV-based flavin-binding fluorescent protein iLOV, originally generated by shuffling the genes of

several plant LOV-domains. Using combinatorial site-saturation mutagenesis of three amino acid positions in the vicinity of the flavin chromophore and an ultra-high throughput screen employing *fluorescent activated cell sorting* (FACS), different iLOV variants with red- and blue-shifted spectral properties were identified. Compared to the parent iLOV protein and literature data, two variants with a larger blue shift (iLOV-V392A/Q489A and iLOV-Q489A/L490R/D491W/G492K) in both absorption and fluorescence emission and one with larger red shifted fluorescence emission but blue-shifted absorption (iLOV-V392C/G487S/Q489L/Stop493) were identified.

Last but not least, in the third subproject the structural and dynamic changes during the dark recovery in the LOV-photoreceptor *PpSB1-LOV* of *Pseudomonas putida* KT2440 was studied using a combination of UV/Vis, nuclear magnetic resonance (NMR)-spectroscopy and quasielastic neutron scattering (QENS)-measurements provided new insights into the structure and dynamics of the LOV-proteins to identify signaling mechanisms. Interestingly, a decoupling of adduct-state decay (measured by UV/Vis and NMR) and structural dark-state recovery (as determined by NMR) was observed, which hinted at the presence of a previously not observed structural intermediate. Dynamic QENS studies revealed that protein side chain dynamics on the picosecond to nanosecond time scale are influenced by adduct state formation and reversion apparently precedes complete adduct rupture. In conclusion, the in this subproject presented data hints at a previously unknown global dynamic, structural and kinetic complexity in this photoreceptor.

Publikationen

Liste der Publikationen:

Hemmer S, Schulte M, Knieps-Grünhagen E, Granzin J, Willbold D, Jaeger KE, Batra-Safferling R, Panwalkar V, Krauss U. Residue alterations within a conserved hydrophobic pocket influence light, oxygen, voltage photoreceptor dark recovery. *Photochem Photobiol Sci.* 2023 Apr;22(4):713-727. doi: 10.1007/s43630-022-00346-5. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36480084.

Röllén K, Granzin J, Remeeva A, Davari MD, Gensch T, Nazarenko VV, Kovalev K, Bogorodskiy A, Borshchevskiy V, **Hemmer S**, Schwaneberg U, Gordeliy V, Jaeger KE, Batra-Safferling R, Gushchin I, Krauss U. The molecular basis of spectral tuning in blue- and red-shifted flavin-binding fluorescent proteins. *J Biol Chem.* 2021 Jan-Jun;296:100662. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100662. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33862085; PMCID: PMC8131319.

Hemmer S, Siedhoff NE, Werner S, Schwaneberg U, Jaeger KE, Davari MD, Krauss U. Machine-learning-assisted engineering of photoreceptor kinetics. *JACS Au.* 2023 Nov 21;3(12):3311-3323. doi: 10.1021/jacsau.3c00440. PMID: 38155650; PMCID: PMC10751770.

Sarter M, **Hemmer S**, Schulte M, Panwalkar V, Knieps-Grünhagen E, Haris L, Graf von Westarp I, Seyde T, Möllenhoff K, Willbold D, Jaeger KE, Stadler A, Krauss U. Multiscale relaxation analysis reveals the presence of multiple dynamic and structural intermediates in LOV photoreceptor dark recovery. (unveröffentlicht)

Posterpräsentationen und Vorträge:

Stefanie **Hemmer**, Marianne Schulte, Vineet Panwalkar, Esther Knieps-Grünhagen, Dieter Willbold, Karl-Erich Jaeger, Ulrich Krauss. 2019. Structural and dynamic changes of a LOV photoreceptor during its photocycle. DFG Rundgespräch - “Conformational Dynamics of Photoreceptors at Different Time Scales”. Schloss Ringberg, Germany

Katrin Röllén, Stefanie **Hemmer**, Mehdi D. Davari, Thomas Gensch, Thomas Drepper, Joachim Granzin, Renu Batra-Safferling, Karl-Erich Jaeger and Ulrich Krauss. 2018. Spectral tuning of LOV-based fluorescent proteins. Gordon Research Conference “Photosensory Receptors and Signal Transduction”. Lucca, Italy

Inhaltsverzeichnis

Eigenständigkeitserklärung	IV
Danksagung	V
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
Publikationen	X
Inhaltsverzeichnis	XI
Abbildungsverzeichnis	XV
Tabellenverzeichnis	XVIII
Formelverzeichnis	XIX
Abkürzungen	XX
1. Einleitung	22
1.1. Photorezeptorproteine: Definition, Aufbau und Funktion.....	22
1.2. <i>Light, oxygen, voltage</i> (LOV)-Photorezeptoren.....	27
1.2.1. LOV-Proteine: Multidomänenstruktur und ihre Funktion.....	27
1.2.2. Aufbau und Struktur der konservierten LOV-Sensordomäne.....	31
1.2.3. Der konservierte LOV-Photozyklus.....	32
1.2.4. Mechanismen der Dunkelrückkehrkinetik.....	35
1.3. Lichtabhängige Strukturänderungen in LOV-Proteinen.....	38
1.3.1. Lokale Strukturänderungen in der LOV-Domäne.....	38
1.3.2. Globale Strukturänderungen im Photorezeptor.....	41
1.3.2.1. <i>Dinoroseobacter shibae</i> DsLOV.....	41
1.3.2.2. <i>Pseudomonas putida</i> PpSB1-LOV.....	42
1.3.2.3. <i>Avena sativa</i> AsLOV2.....	45
1.4. LOV-Proteine als Werkzeuge der Optogenetik und Bildgebung.....	47
1.4.1. Kanalrhodopsine als erste optogenetische Anwendung.....	49
1.4.2. Fluoreszenzproteine, Photosensitizer und optogenetische Schalter.....	50
1.4.2.1. Fluoreszenzproteine als Werkzeuge zur Visualisierung biologischer Prozesse.....	50
1.4.2.2. Fluoreszenzreporter als Photosensitizer.....	51
1.4.2.3. Photorezeptoren als reversible optogenetische Schalter.....	51
1.5. Veränderung der Eigenschaften von LOV-basierten optogenetischen Werkzeugen....	53
1.5.1. Gerichtete Evolution und Sättigungsmutagenese.....	55

1.5.2. Herausforderungen des Tunings von LOV-Photorezeptoren mittels gerichteter Evolution.....	57
1.5.3. Maschinelles Lernen.....	59
1.6. Zielsetzung	60
2. Material und Methoden	62
2.1. Material.....	62
2.1.1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide.....	62
2.1.1.1. Bakterienstämme und Plasmide.....	62
2.1.1.2. Oligonukleotide.....	67
2.1.2. Chemikalien und Medien.....	76
2.1.2.1. Chemikalien.....	76
2.1.2.2. Medien	77
2.2. Methoden.....	78
2.2.1. Arbeiten mit Bakterien	78
2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien.....	78
2.2.1.2. Heterologe Genexpression	79
2.2.1.3. Lagerung von Bakterien.....	80
2.2.1.4. Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen...	80
2.2.1.5. Herstellung und Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen zur Herstellung der iLOV-Mutantenbibliothek.....	81
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	82
2.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA	82
2.2.2.2. Langzeitlagerung von Plasmid-DNA.....	82
2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion.....	83
2.2.2.4. Hydrolytische Spaltung von DNA	84
2.2.2.5. Ligation	85
2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	85
2.2.2.7. DNA-Gelextraktion.....	86
2.2.2.8. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	86
2.2.2.9. Konzentrierung von DNA-Lösungen.....	86
2.2.2.10. Erstellung der iLOV Mutantenbibliothek	86
2.2.2.11. Isolation von Plasmid-DNA von Transformationsplatten zur Erstellung einer Mutantenbibliothek	87

2.2.2.12. FACS-Screening, Kultivierung, Lyse der sortierten Zellen und Mikrotiterplatten-Screening	88
2.2.2.13. Sequenzierung	88
2.2.3. Biochemische Methoden	89
2.2.3.1. Proteinreinigung und Probenpräparation für die unterschiedlichen Experimente	89
2.2.3.2. Zellaufschluss	95
2.2.3.3. Proteinreinigung mittels IMAC	95
2.2.3.4. Konzentrierung von Proteinlösung	97
2.2.3.5. Pufferwechsel und Entsalzung	97
2.2.3.6. Gefriertrocknung von Proteinproben	98
2.2.3.7. Dialyse	98
2.2.4. Analytische Verfahren	99
2.2.4.1. Konzentrationsbestimmung von Fraktionen einer Proteinreinigung für SDS-PAGE Analysen	99
2.2.4.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	102
2.2.5. Spektrophotometrische Methoden	104
2.2.5.1. Messung von UV/Vis-Spektren, Flavin-Beladung und Proteinkonzentrationsbestimmung gereinigter LOV-Proteine	104
2.2.5.2. Messungen von Fluoreszenzemissionsspektren zur Charakterisierung der iLOV-Sättigungsmutagenese Varianten	106
2.2.5.3. UV/Vis-Spektrophotometrie zur Untersuchung der Dunkelrückkehrkinetik	106
2.2.5.4. Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie	113
2.2.5.5. <i>Differential Scanning Fluorimetry</i> zur Untersuchung temperaturabhängiger Entfaltungsprozesse	114
2.2.5.6. Zeitaufgelöste quasi-elastische Neutronenstreuung zur dynamischen Charakterisierung des Dunkelrückkehrprozesses	115
2.2.5.7. Zeitaufgelöste strukturelle NMR-Spektroskopie zur strukturellen Charakterisierung des Dunkelrückkehrprozesses	116
2.2.5.8. FACS-Screening	117
2.2.6. Bioinformatische Methoden	118
2.2.6.1. Visualisierung der generierten Dunkelrückkehrkinetik Daten	122
3. Ergebnis und Diskussion	132

3.1. Untersuchungen zum Verständnis der LOV-Photozyklus - Adduktbildung und Dunkelrückkehr	132
3.1.1. Maschinelles Lernen (ML) für das <i>Tuning</i> der Dunkelrückkehr von LOV-Photorezeptoren	132
3.1.2. Erzeugung, Expression, Reinigung und Identifikation funktioneller Varianten ..	134
3.1.3. ML-Vorhersagen erlauben das <i>Tunen</i> der Dunkelrückkehr von LOV-Photorezeptoren	140
3.1.4. Globale Analyse der Dunkelrückkehrkinetik der <i>AsLOV2</i> -Einzelvarianten.....	142
3.1.5. ML-Vorhersagen können kombinatorische Effekte voraussagen.....	149
3.2. Untersuchungen der Mechanismen zur Adduktbildung in LOV-Domänen.....	154
3.2.1. Expression, Reinigung und Probenpräparation	154
3.2.2. Untersuchungen der Adduktbildung in LOV-Photorezeptoren mit schnellem Adduktzerfall	158
3.3. <i>Tuning</i> der spektralen Eigenschaften des Flavin-bindenden iLOV-Fluoreszenzproteins mittels Hochdurchsatz-Screenings	165
3.3.1. Erzeugung der iLOV-SSM-Bibliothek	166
3.3.2. Auswahl der iLOV-Varianten mittels FACS-Screenings.....	167
3.3.3. Expression, Reinigung und Charakterisierung der erhaltenen iLOV-Varianten ..	169
3.4. Untersuchungen struktureller und dynamischer Änderungen während der Dunkelrückkehr von <i>PpSB1-LOV</i>	172
3.4.1. Ziel und Strategie der Arbeit	172
3.4.2. Untersuchung der Adduktlebenszeit unter NMR-Bedingungen und zeitaufgelöste Messung der strukturellen Dunkelrückkehr.....	173
3.4.3. Expression, Reinigung und Dunkelrückkehrkinetik unter QENS-Bedingungen .	179
3.4.4. Untersuchung der dynamischen Erholung mittels QENS-Methode.....	183
3.5. Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	188
4. Literaturverzeichnis.....	189
5. Anhang	203

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SICHTBAREN BEREICHS DES SPEKTRUMS, SOWIE EINORDNUNG DER ABSORPTIONSBEREICHE DER BEKANNTEN PHOTOREZEPTORSYSTEME.	23
ABBILDUNG 2: CHEMISCHE STRUKTUREN DER VERSCHIEDENEN CHROMOPHORE DER 10 PHOTOREZEPTORFAMILIEN.....	26
ABBILDUNG 3: ÜBERSICHT AUSGEWÄHLTER LOV-PHOTOREZEPTOREN, DEREN FUNKTION UND DOMÄNENSTRUKTUR.	28
ABBILDUNG 4: STRUKTUR DER KONSERVIERTEN LOV-SENSORDOMÄNE.	32
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES LOV-PHOTOZYKLUS.	33
ABBILDUNG 6: ABSORPTIONSSPEKTREN DES DUNKEL- UND LICHTZUSTANDES (A) SOWIE DER DUNKELRÜCKKEHRKINETIK (B) AM BEISPIEL DES WILDTYPISCHEN ASLOV2 PHOTOREZEPTORS.....	35
ABBILDUNG 7: ÜBERSICHT ÜBER MUTATIONEN MIT EINFLUSS AUF DIE DUNKELRÜCKKEHR VON LOV-DOMÄNEN.....	37
ABBILDUNG 8: STRUKTUR DER FLAVIN-BINDETASCHEN AUSGEWÄHLTER LOV-SENSORDOMÄNEN IM DUNKEL- UND LICHTZUSTAND. ...	39
ABBILDUNG 9: STRUKTUR DES DsLOV PHOTOREZEPTORS IM DUNKELZUSTAND.	41
ABBILDUNG 10: ÜBERLAGERUNG DER STRUKTUR DES DUNKEL- UND LICHTZUSTANDS VON PpSB1-LOV.....	44
ABBILDUNG 11: CARTOONMODELL DER LICHTABHÄNGIGEN STRUKTURÄNDERUNG DER ASLOV2-DOMÄNE.....	46
ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG AUSGEWÄHLTER OPTOGENETISCHER KONTROLLSTRATEGIEN.....	48
ABBILDUNG 13: SCHEMA ZUR VERANSCHAULICHUNG EINES GERICHTETEN EVOLUTIONSANSATZES.	56
ABBILDUNG 14: PROTEINREINIGUNG UND PROBENPRÄPARATION DER ASLOV2-VARIANTEN FÜR DIE ANALYSE DER DUNKELRÜCKKEHRKINETIK.....	90
ABBILDUNG 15: PROTEINREINIGUNG UND PROBENPRÄPARATION VON DsLOV UND ASLOV2-VARIANTEN ZUR UNTERSUCHUNG DER ADDUKTBILDUNG.....	91
ABBILDUNG 16: PROTEINREINIGUNG UND PROBENPRÄPARATION DER ILOV-VARIANTEN.....	92
ABBILDUNG 17: PROTEINREINIGUNG UND PROBENPRÄPARATION VON PpSB1-LOV FÜR QENS-MESSUNGEN.	94
ABBILDUNG 18: ILLUSTRATION DER EXPERIMENTELLEN STRATEGIE ZUR ML-BASIERTE VORHERSAGE VON LOV-PHOTOREZEPTOREN MIT GEÄNDERTER DUNKELRÜCKKEHR.....	133
ABBILDUNG 19: UV/VIS-ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE AUSGEWÄHLTER ASLOV2-VARIANTEN.....	136
ABBILDUNG 20: FLAVIN-BELADUNGSANALYSE DER ASLOV2-EINzelVARIANTEN.....	139
ABBILDUNG 21: EXEMPLARISCHE DUNKELRÜCKKEHRKINETIK DES WILDTYPISCHEN ASLOV2-PROTEINS.	141
ABBILDUNG 22: STRUKTURFUNKTIONSANALYSE DES ASLOV2-MUTATIONS DATENSATZES.	145
ABBILDUNG 23: STRUKTURFUNKTIONSBEZIEHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG DER DUNKELRÜCKKEHR VON ASLOV2, DIE ANHAND VON EINZELMUTATIONS DATEN (A-D) ERMITTELT WURDEN.....	147
ABBILDUNG 24: MUTATIONSNETZWERK ZUR VERANSCHAULICHUNG VON MULTI-SITE-MUTATIONEN, DIE VARIANTEN MIT SCHNELLERER (A) UND LANGSAMERER (B) DUNKELRÜCKKEHR ERGEBEN.	151
ABBILDUNG 25: ABSORPTIONSSPEKTREN DER „DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE“ VON DsLOV-M49S (A) UND -C72S (B) SOWIE ASLOV2-V416T (C) UND -C450S (D).....	156
ABBILDUNG 26: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VON DsLOV-M49S (A) UND -C72S (B) SOWIE ASLOV2-V416T (C) UND -C450S (D).	158
ABBILDUNG 27: TRANSIENTE ABSORPTIONSDATEN DES THERMISCHEN ADDUKTZERFALLS VON ASLOV2-V416T.	160
ABBILDUNG 28: TRANSIENTE ABSORPTIONSDATEN DES THERMISCHEN ADDUKTZERFALLS VON DsLOV2-M49S.....	161

ABBILDUNG 29: TRANSIENTE ABSORPTIONSSPEKTREN VON ASLOV2-C450S (A) UND ASLOV2-V416T (B) NACH ANREGUNG BEI 450 NM IM NS BIS μ S ZEITBEREICH.....	162
ABBILDUNG 30: TRANSIENTE ABSORPTIONSSPEKTREN DER TRIPLETT/ADDUKTBIKDUNG VON DSLOV-C72S (A) UND DSLOV-M49S (B) NACH ANREGUNG BEI 450 NM IM NS BIS μ S ZEITBEREICH.	164
ABBILDUNG 31: FACS-SCREENING DER ILOV-SSM-BIBLIOTHEK.	167
ABBILDUNG 32: FLUORESZENZEMISSIONSSPEKTREN DER MITTELS FACS SORTIERTEN ILOV-SSM-VARIANTEN.	168
ABBILDUNG 33: ABSORPTIONS- UND FLUORESZENZEMISSIONSSPEKTREN DER ILOV-VARIANTEN.	170
ABBILDUNG 34: PPSB1-LOV-PHOTOZYKLUS UND DUNKELRÜCKKEHR, VERFOLGT MITTELS UV/VIS-SPEKTROPHOTOMETRIE UND NMR-SPEKTROSKOPIE.	175
ABBILDUNG 35: STRUKTURELLE DUNKELRÜCKKEHR UND ADDUKTZERFALL VON PPSB1-LOV, BEOBACHTET MITTELS NMR.	177
ABBILDUNG 36: UV/VIS-TESTSPEKTROSKOPIEMESSUNGEN VON PPSB1-LOV.	179
ABBILDUNG 37: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VON PPSB1-LOV BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN.	181
ABBILDUNG 38: ZEITABHÄNGIGE ENTFALTUNG VON PPSB1-LOV BEI KONstanTER TEMPERATUR VON 40 °C.	182
ABBILDUNG 39: QENS-EXPERIMENTE AN PPSB1-LOV.	184
ABBILDUNG 40: DUNKELRÜCKKEHR DER PPSB1-LOV-PROTEINDYNAMIK, ÜBERWACHT DURCH QENS, UND ADDUKTBRUCH, ÜBERWACHT DURCH UV/VIS-SPEKTROPHOTOMETRIE.	185
ABBILDUNG 41: PHOTOZYKLUS VON PPSB1-LOV MIT DEN NEU IDENTIFIZIERTEN INTERMEDIATEN.	187
ABBILDUNG 42: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER AUSGEWÄHLTEN SCHNELLEN ASLOV2-EINZELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGE-RUNDE.	209
ABBILDUNG 43: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER AUSGEWÄHLTEN LANGSAMEN ASLOV2-EINZELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGE-RUNDE.	210
ABBILDUNG 44: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER VORHERGESAGTEN SCHNELLEN ASLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGE-RUNDE.	211
ABBILDUNG 45: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER VORHERGESAGTEN LANGSAMEN ASLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGE-RUNDE.	212
ABBILDUNG 46: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER AUSGEWÄHLTEN SCHNELLEN UND LANGSAMEN ASLOV2-EINZELVARIANTEN DER ZWEITEN VORHERSAGE-RUNDE.	213
ABBILDUNG 47: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER VORHERGESAGTEN SCHNELLEN ASLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ZWEITEN VORHERSAGE-RUNDE.	214
ABBILDUNG 48: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER VORHERGESAGTEN LANGSAMEN ASLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ZWEITEN ML-RUNDE.	215
ABBILDUNG 49: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE DER VORHERGESAGTEN SCHNELLEN UND LANGSAMEN ASLOV2-VARIANTEN DER DRITTEN VORHERSAGE-RUNDE.....	216
ABBILDUNG 50: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ERSTEN RUNDE AUSGEWÄHLTER SCHNELLER ASLOV2-EINZELVARIANTEN.	221
ABBILDUNG 51: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ERSTEN RUNDE AUSGEWÄHLTER LANGSAMER ASLOV2-EINZELVARIANTEN.	222
ABBILDUNG 52: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ERSTEN RUNDE VORHERGESAGTER SCHNELLER ASLOV2-DOPPELVARIANTEN.	223

ABBILDUNG 53: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ERSTEN RUNDE VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN.	224
ABBILDUNG 54: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ZWEITEN RUNDE AUSGEWÄHLTER SCHNELLER UND LANGSAMER AsLOV2-EINZELVARIANTEN.	225
ABBILDUNG 55: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ZWEITEN RUNDE VORHERGESAGTER SCHNELLER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN.	226
ABBILDUNG 56: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER ZWEITEN RUNDE VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN.	227
ABBILDUNG 57: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER DRITTEN RUNDE VORHERGESAGTER SCHNELLER AsLOV2-VARIANTEN.	228
ABBILDUNG 58: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKEL- UND LICHTZUSTÄNDE DER DRITTEN RUNDE VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-VARIANTEN.	229
ABBILDUNG 59: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK DER AsLOV2-VARIANTEN AUS DER ERSTEN RUNDE AUSGEWÄHLTER SCHNELLER EINZELVARIANTEN.	230
ABBILDUNG 60: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK AUSGEWÄHLTER LANGSAMER AsLOV2-EINZELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGERUNDE.	231
ABBILDUNG 61: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER SCHNELLER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGERUNDE.	232
ABBILDUNG 62: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ERSTEN VORHERSAGERUNDE.	233
ABBILDUNG 63: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK AUSGEWÄHLTER SCHNELLER UND LANGSAMER AsLOV2-EINZELVARIANTEN DER ZWEITEN VORHERSAGERUNDE.	234
ABBILDUNG 64: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER SCHNELLER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ZWEITEN VORHERSAGERUNDE.	235
ABBILDUNG 65: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ZWEITEN VORHERSAGERUNDE.	236
ABBILDUNG 66: BESTIMMUNG DER DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-DOPPELVARIANTEN DER ZWEITEN VORHERSAGERUNDE ÜBER SEQUENTIELLE UV/VIS-SPEKTREN.	237
ABBILDUNG 67: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER SCHNELLER AsLOV2-DOPPEL- UND DREIFACHVARIANTEN DER DRITTEN VORHERSAGERUNDE.	238
ABBILDUNG 68: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VORHERGESAGTER LANGSAMER AsLOV2-DOPPEL- UND DREIFACHVARIANTEN DER DRITTEN VORHERSAGERUNDE.	238
ABBILDUNG 69: REINIGUNGSSCHROMATOGRAMME UND SDS-PAGE ANALYSEN VON <i>DsLOV</i> -M49S (A) UND -C72S (B) SOWIE AsLOV2-V416T (C) UND C450S (D).	241
ABBILDUNG 70: ABSORPTIONSSPEKTREN DER DUNKELZUSTÄNDE VON <i>DsLOV</i> -M49S (A) UND -C72S (B) SOWIE AsLOV2-V416T (C) UND -C450S (D).	242
ABBILDUNG 71: SDS-PAGE ANALYSE DER REINIGUNGSSCHRITTE ALLER lLOV-VARIANTEN.	243
ABBILDUNG 72: REINIGUNGSSCHROMATOGRAMME (A UND CB) UND SDS-PAGE ANALYSE (C) VON <i>PpSB1</i> -LOV.	244

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN BAKTERIENSTÄMME.	62
TABELLE 2: ÜBERSICHT ALLER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN PLASMIDE.	62
TABELLE 3: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN OLIGONUKLEOTIDE MIT IHRER NUKLEOTIDSEQUENZ (5' → 3') UND SCHMELZPUNKT (°C) SOWIE VERWENDUNGSZWECK.	67
TABELLE 4: ÜBERSICHT ÜBER ALLE IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN.	76
TABELLE 5: ÜBERSICHT DER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN CHEMIKALIEN.	76
TABELLE 6: QC-PCR TEMPERATURPROGRAMM ZUR ERZEUGUNG DER ASLOV2-VARIANTEN UND DER DSLOV-C72S VARIANTE SOWIE STANDARD PCR-PROGRAMM ZUR ERSTELLUNG DER ILOV-MUTANTENBIBLIOTHEK.	84
TABELLE 7: DIE IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN EXTINKTIONSKOEFFIZIENTE UND MOLEKULARGEWICHTE.	99
TABELLE 8: ÜBERSICHT ÜBER DIE MESSDAUER (MIN), DIE INTEGRATIONSZEIT (S) UND DIE ZYKLUSZEIT (MIN) DER DUNKELRÜCKKEHRMESSUNGEN BEI EINER ABSORPTION VON 485 NM.	108
TABELLE 9: ÜBERSICHT ÜBER DIE MESSDAUER (MIN), DIE DAUER DER ZEITINTERVALLE (MIN) UND DIE ANZAHL DER GEMESSENEN SPEKTREN DER SEQUENTIELLEN DUNKELRÜCKKEHR.	111
TABELLE 10: ÜBERSICHT ÜBER LITERATURDATEN DER ASLOV2-VARIANTEN.	119
TABELLE 11: ÜBERSICHT ÜBER DIE GEMAPPTEN ASLOV2-VARIANTEN.	124
TABELLE 12: ÜBERSICHT ÜBER DIE GEMAPPTEN $T_{\text{DARK-RECOVERY}}$ (NORM) WERTE DIE MITTELS NMR FÜR DIE JEWEILIGEN PPSB1-LOV AMINOSÄUREPOSITIONEN BESTIMMT WURDEN.	129
TABELLE 13: SCORING DER FLAVIN-BELADUNG VON ASLOV2-VARIANTEN.	138
TABELLE 14: AUSGEWÄHLTE ASLOV2-VARIANTEN MIT SCHNELLER UND LANGSAMER DUNKELRÜCKKEHRKINETIK DER EINZELNEN VORHERSAGERUNDEN.	142
TABELLE 15: ÜBERSICHTSTABELLE ZUM VERGLEICH VON MUTATIONS DATEN.	143
TABELLE 16: KOMBINATORISCHE EFFEKTE DER DUNKELRÜCKKEHRKINTIK.	153
TABELLE 17: ÜBERSICHTSTABELLE DER $OD_{450 \text{ NM}}$ WERTE IM 2 MM LICHTWEG VON DSLOV-M49S UND -C72S SOWIE ASLOV2-V416T UND -C450S.	155
TABELLE 18: ÜBERSICHTSTABELLE ÜBER DIE BERECHNETE PROTEINKONZENTRATION UND FLAVIN-BELADUNG VON DSLOV-M49S UND -C72S SOWIE ASLOV2-V416T UND -C450S.	157
TABELLE 19: ÜBERSICHT ÜBER DIE MITTELS FACS SORTIERTEN ILOV-VARIANTEN.	168
TABELLE 20: ÜBERSICHT DER ABSORPTIONS- UND EMISSIONSMAXIMA DER UNTERSUCHTEN ILOV-VARIANTEN.	172
TABELLE 21: ÜBERSICHTSTABELLE DER ERGEBNISSE AUS DEN UV/VIS-TESTSPEKTROKOPIEMESSUNGEN VON PPSB1-LOV.	180
TABELLE 22: DUNKELRÜCKKEHRKINETIK VON PPSB1-LOV BEI UNTERSCHIEDLICHEN TEMPERATUREN.	182
TABELLE 23: ZEITABHÄNGIGES ENTFALTUNGSVERHALTEN VON PPSB1-LOV BEI 40 °C.	183
TABELLE 24: ÜBERSICHT DER VORHERGESAGTEN UND AUSGEWÄHLTEN ASLOV2-VARIANTEN.	206
TABELLE 25: ÜBERSICHT ÜBER DIE PROTEINKONZENTRATIONEN UND FLAVIN-BELADUNGEN DER ERZEUGTEN ASLOV2-VARIANTEN.	217
TABELLE 26: ÜBERSICHTSTABELLE DER EXPERIMENTELLEN VALIDIERUNG DER DUNKELRÜCKKEHRMESSUNGEN.	239

Formelverzeichnis

FORMEL 1: FORMEL ZUR BERECHNUNG DER GRÖÖE EINER MUTANTENBIBLIOTHEK.	58
FORMEL 2: FORMELN ZUR BERECHNUNG DER PROTEINKONZENTRATION AUS DEM ABSORPTIONSSPEKTRUM DES DUNKELZUSTANDS.	105
FORMEL 3: BERECHNUNG DER FLAVIN-BELADUNG DER UNTERSUCHTEN PROTEINE.	106
FORMEL 4: FORMELN ZUR BESTIMMUNG DER LEBENSZEIT DES LICHTZUSTANDS.....	108
FORMEL 5: POLYNOMISCHE STREUFUNKTION ZUR KORREKTUR DER BASISLINIENVERSCHIEBUNG.	112
FORMEL 6: BERECHNUNG DER ADDUKTAUSBEUTEN VON TRIPLETTREAKTIONEN.....	163

Abkürzungen

Å	Ångström	E _{NTA}	Eluat der Ni-NTA-Säule
AG	Arbeitsgruppe	<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat	etc.	und die übrigen (lat.: <i>et cetera</i>)
AS	Aminosäure(n)	EtOH	Ethanol
<i>As</i>	<i>Avena sativa</i>	evtl.	eventuell
<i>A.thaliana</i>	<i>Arapidosis thaliana</i>	FACS	<i>Fluorescence-Activated-Cell-Sorting</i>
AUREO1/ 2	Aureochrom1/ 2	FAD	Flavinadenindinukleotid
<i>A. victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>	FbFPs	FMN-binding fluorescent protein
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	FMN	Flavinmononukleotid
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	FPLC	<i>Fast-Protein Liquid Chromatography</i>
BLUF	<i>blue-light receptor using FAD</i>	fs	Femtosekunden
Bp	Basenpaar	<i>fw</i>	<i>forward</i>
<i>B. abortus</i>	<i>Brucella abortus</i>	g	Gramm
bZIP	Leucin-Zipper-Domäne	GFP	<i>green fluorescent protein</i>
bzw.	beziehungsweise	ggf.	gegebenenfalls
bzgl.	bezüglich	GZE	Ganzzellextrakt
°C	Grad Celsius	h	Stunde(n)
ca.	zirka (lat.: <i>circa</i>)	HABA	Hydroxy-Azophenyl-Benzoessäure
CaCl ₂	Kalziumchlorid	HB-Netzwerk	Wasserstoffbrücken-Netzwerk
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	H-Brücke	Wasserstoffbrücke
<i>C.crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>	HCl	Salzsäure
c-di-GMP	cyclisches Di-Guanosinmonophosphat	<i>H.halophila</i>	<i>Halorhodospira halophila</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	His ₆ -Tag	Hexahistidin-Tag
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat	HPLC	Hochdurchsatzflüssigkeitschromatographie
cm	Zentimeter	ID	<i>Identity Document</i>
<i>C.reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	i.d.R.	in der Regel
Cys	Cystein	IF	Infrarot
D	Durchfluss	iLOV	<i>flavoprotein improved LOV</i>
Da	Dalton	IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
dd H ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
d.h.	das heißt	ISC	<i>intersystem-crossing</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	Kan	Kanamycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	KCl	Kaliumchlorid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	kDa	Kilodalton
<i>Ds</i>	<i>Dinoroseobacter shibae</i>	K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
<i>D.shibae</i>	<i>Dinoroseobacter shibae</i>	KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
DTT	Dithiothreitol	kHz	Kilohertz
D ₂ O	Deuteriumoxid	L	Liter
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	lat.	lateinisch
ED	Effektordomäne	LB	<i>Lysogeny broth</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EG ₂₅	Eluat der G ₂₅ -Säule		
<i>El</i>	<i>Erythrobacter litoralis</i>		
<i>E.litoralis</i>	<i>Erythrobacter litoralis</i>		
Engl.	englisch		

LOV	<i>Light-Oxygen-Voltage</i>	QENS	<i>Quasi-elastische-Neutronenstreuung</i>
M	Molar	<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
mbar	Millibar	RF	Riboflavin
Mbp	Megabasenpaar(e)	RNA	Ribonukleinsäure
mg	Milligramm	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
MG	Molekulargewicht	<i>Rs</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
MGA	<i>Midori Green Advance</i>	<i>R.sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	RT	Raumtemperatur
MgSO ₄	Magnesiumsulfat	<i>rv</i>	<i>revers</i>
Min	Minute(n)	s	Sekunde(n)
mJ	Megajoule	SDS	Natriumdodecylsulfat
mL	Milliliter	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ML	Maschinelles Lernen	Ser/Thr-Kinase	Serin/Threonin-Kinase
mm	Millimeter	STAS	Sulfat Transporter und anti-Sigmafaktor Antagonist
mM	Millimolar	s.o.	siehe oben
MW	Mittelwert	SOC	<i>Super Optimal Broth-Medium</i>
µg	Mikrogramm	sog.	sogenannt
µL	Mikroliter	S ₀	Grundzustand
µm	Mikrometer	S ₁	Angeregter Zustand
µM	Mikromolar	TA	Transiente Absorption
NaCl	Natriumchlorid	TB	<i>terrific broth</i>
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat	TBE	TRIS-Borat-EDTA
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	TEMED	Tetramethylethylendiamin
NaOH	Natriumhydroxid	TMV	Tobacco Etch Mosaic virus
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>	τ _{rec}	Lebenszeit des Lichtzustands
ng	Nanogramm	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
Ni ²⁺	Nickel	U	Units (µmol min ⁻¹)
nm	Nanometer	UpM	Umdrehung(en) pro Minute
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>	u.s.w.	und so weiter
NTA	Nitrilotriessigsäure	UV	Ultraviolett
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	V	Volumen
OCPs	<i>orange-carotenoid-proteins</i>	<i>V. frigida</i>	<i>Vaucheria frigida</i>
OD	Optische Dichte	v/v	Volumen pro Volumen
P	Pellet	VVD	Vivid
<i>p. A.</i>	durch Analyse (lat.: <i>pro analysis</i>)	W	Waschfraktion
PAS	Per-ARNT-Sim	WC-1/ 2	White-Colar-1/ 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	WCC	White-Colar-Komplex
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	w/v	Gewicht pro Volumen
pH	Potential des Wasserstoffs (lat. <i>pondus hydrogenii</i>)	xg	Gravitation
Phot-1/ 2	Phototropin-1/ 2	YtvA	Protein aus <i>Bacillus subtilis</i>
PHR	<i>photolyase homology region</i>	z.B.	zum Beispiel
pmol L ⁻¹	Pikomol pro Liter	%	Prozent
<i>Pp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	λ	Lambda
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>		
ps	Picosekunde(n)		
<i>P.tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>		
PYP	<i>photoactive yellow protein</i>		
QC-PCR	<i>QuikChange PCR</i>		

1. Einleitung

1.1. Photorezeptorproteine: Definition, Aufbau und Funktion

Sonnenlicht kann direkt, wie im Falle phototropher Organismen, als Energiequelle für die Photosynthese, d.h. die Umwandlung von Lichtenergie in chemische Energie, genutzt werden. Nicht-phototrophe Organismen, wie wir Menschen, sind für ihr Überleben in der Regel vom Konsum organischer Materie, wie z.B. Pflanzen abhängig, die wiederum ihre Energie über Photosynthese gewinnen. Sonnenlicht ist daher einer der wichtigsten direkten und indirekten physikalischen Faktoren für Leben auf unserem Planeten. Neben der Photosynthese, ist Licht essentiell für das Pflanzenwachstum/-entwicklung oder die Regulation zirkadianer Rhythmen, d.h. der Synchronisierung biologischer Prozesse auf eine Periodenlänge von 24 h. Es dient außerdem als sensorischer Reiz und reguliert Stoffwechselprozesse wie z.B. die Biosynthese von Photosynthesepigmenten und Vitaminen oder kann als Informationsquelle zur Steuerung entwicklungsbedingter und physiologischer Reaktionen dienen [1-3]. In annähernd allen, in dieser Weise „lichtabhängigen“ Lebewesen wird Licht über sog. Photorezeptorproteine wahrgenommen. Diese sind in der Lage ein physikalisches Lichtsignal wahrzunehmen, es umzuwandeln und weiterzuleiten um eine physiologische Reaktion auszulösen. Im Laufe der Evolution haben sich unterschiedliche Photorezeptorproteine entwickelt, wobei gegenwärtig zehn Photorezeptorproteinsysteme (Abbildung 1) unterschieden werden: Rhodopsine, Vitamin B12 abhängige Photorezeptoren, *orange-carotenoid-proteins* (OCPs), Xanthopsine, Cyanobacteriochrome, Phytochrome, Photorezeptoren die UV-Strahlung erfassen, wie z.B. UVR8 aus *Arabidopsis thaliana*, sowie Blaulicht Photorezeptoren wie Cryptochrome, *blue-light receptor using FAD* (BLUF) Proteine und *light, oxygen, voltage* (LOV-) Photorezeptoren [4-12]. Mit Ausnahme von UVR8 besitzen alle bekannten Photorezeptoren sog. Sensordomänen in denen ein lichtabsorbierender Chromophor (griechisch *chromo* - Farbe und *phoros* - tragend) gebunden vorliegt, welcher die „Lichtwahrnehmung“ vermittelt [13].

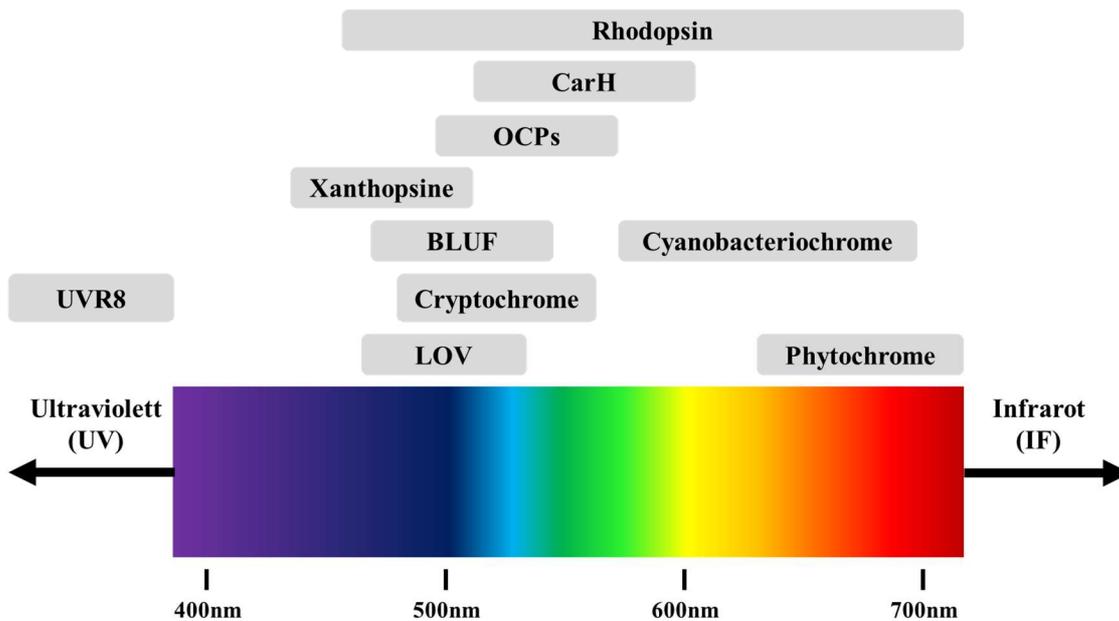


Abbildung 1: Schematische Darstellung des sichtbaren Bereichs des Spektrums, sowie Einordnung der Absorptionsbereiche der bekannten Photorezeptorsysteme. Die einzigen Photorezeptorproteine, die im gesamten Spektralbereich von blau bis rot absorbieren sind Rhodopsine. Vitamin B12 abhängige Photorezeptorproteine (wie z.B. CarH) absorbieren im blauen bis gelben Spektralbereich und die OCPs im blaugrünen. Während LOV-Photorezeptoren (LOV), Cryptochrome, BLUF, sowie Xanthopsine ein Absorptionsmaximum im Blaulichtbereich besitzen, absorbieren Phytochrome im roten und Cyanobacteriochrome im grün-roten Lichtbereich. Im Gegensatz dazu absorbiert der Photorezeptor UVR8 als einziger im UV-Bereich.

Photorezeptorproteine können abhängig von ihrer Sensordomäne und dem gebundenen Chromophor (Abbildung 2) Licht eines spezifischen Wellenlängenbereichs absorbieren (Abbildung 1), wobei die verschiedenen Systeme jeweils charakteristische photophysikalische/photochemische Reaktionen durchlaufen: Rhodopsine werden in mikrobielle (aber auch Algen wie z.B. *Chlamydomonas*) und tierische Rhodopsine unterteilt, die jeweils Retinal als Chromophor kovalent über eine Schiff'sche Base an ein Lysinrest in der Kofaktor-Bindetasche binden [14, 15]. Lichtabsorption führt zu Isomerisierung des Retinals (meistens von einer *all-trans* zu einer *13-cis* Konfiguration) und startet den Photozyklus, eine zyklische Reaktion, die mit der Regeneration des Grundzustands (Dunkelzustands) endet. Die damit verbundenen Konformationsänderungen führen zur Ausdehnung (Öffnung) der Kanalporen innerhalb der Rhodopsine. Rhodopsine absorbieren Licht im gesamten sichtbaren Spektralbereich von blau bis rot. Sie vermitteln hierbei nicht nur das Hell-Dunkel- und Farbsehen bei Tieren und Menschen, sondern dienen auch als lichtaktivierbare Sensorproteine, Ionenpumpen und -kanäle [14-16]. Kanalrhodopsine z.B. fungieren als lichtgesteuerte Ionenkanäle und lösen so verschiedene zelluläre Reaktionen [17, 18], wie Signalkaskaden aus [14, 19]. In *Chlamydomonas reinhardtii*, einer einzelligen Grünalgenart,

befinden sich Kanalrhodopsine im sog. Augenfleck. Dieser Augenfleck besteht aus einer karotinoidreichen Körnerschicht die als Lichtreflektor dient. Dadurch fungiert der Augenfleck als eine Art gerichteter Lichtrezeptor, dient in *C. reinhardtii* der Lichtwahrnehmung und vermittelt die phototaktische Bewegung der einzelligen Alge [20, 21]. Vitamin B12 abhängige Photorezeptoren binden Cobalamine als Chromophor und absorbieren Licht im blauen bis gelben Spektralbereich. Ein bekanntes Beispiel für einen Vitamin B12 Photorezeptor ist das CarH Protein aus *Myxococcus xanthus*. CarH besteht aus mehreren Domänen: einer Adenosylcobalamin-Bindedomäne, einer Oligomerisierungsdomäne sowie einer aminoterminalen DNA-Bindungsdomäne [22]. Im Dunkelzustand bildet CarH ein Tetramer, welches über die Adenosylcobalamin-Bindedomäne ausgebildet wird. In diesem Zustand kann CarH über die DNA-Bindedomäne an ein spezifisches DNA-Motiv binden und unterdrückt so als Repressor die Expression von Genen der Carotinoidbiosynthese. Bei Beleuchtung dissoziiert dieser Komplex und setzt CarH frei [23, 24], wodurch eine Expression der Carotinoidbiosynthese ermöglicht wird. Carotinoide schützen Zellen vor photooxidativen Schäden, indem sie die Bildung von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) und anderen reaktiven Sauerstoffspezies unterdrücken. Durch seine Funktion als lichtabhängiger Repressor der Carotinoidbiosynthese dient CarH dem Schutz der Zelle vor photooxidativen Schäden [4, 25]. Das OCP bindet als einziges photosensorisches Protein ein Carotinoid (3-Hydroxyechinenone) als Chromophor und besteht aus zwei globulären Domänen: einer α -helikalen N-terminalen Domäne und einer α -Helix/ β -Faltblatt C-terminalen Domäne [26, 27]. Im Dunkelzustand liegt das OCP in einer geschlossenen globulären Konformation vor, welche durch Interdomänen-Wechselwirkungen zwischen den Domänen und dem Chromophor, welches Wasserstoffbrückenbindungen mit OCP-Aminosäuren eingeht, stabilisiert wird [26, 27]. Beleuchtung mit blaugrünem Licht induziert Konformationsänderungen im Chromophor, führt zum Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Chromophor und bewirkt so eine Konformationsänderung im Protein [28, 29]. Dadurch verändert sich die geschlossene globuläre orange Form in eine metastabile aktive rote Form [29]. OCP interagiert mit Phycobilisomen und spielt eine wichtige Rolle beim nicht-photochemischen *quenching* (Engl. *non-photochemical quenching*), d.h. einem Prozess zum Schutz vor „Überanregung“ der Photosysteme. Außerdem dient es in verschiedenen Cyanobakterien als Singulett-Sauerstoff *Quencher* und somit ebenfalls dem Schutz vor den negativen Konsequenzen zu starker Strahlung [8, 26, 30]. PYP (Engl. *photoactive yellow protein*), ein Photorezeptor der Xanthopsin-Familie, enthält eine sog. Period-ARNT-SIM-Domäne (PAS-Domäne; abgeleitet von *period clock protein* (PER) aus *Drosophila vertebrate*, *aryl*

hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) Protein der Wirbeltiere und *single-minded protein* (SIM)), bindet als natürlichen Chromophor *p*-Cumarsäure (4-Hydroxycimtsäure) und reguliert z.B. die negative phototaktische Reaktion in dem halophilen photosynthetischen Bakterium *Halorhodospira halophila* [31]. Die Beleuchtung mit Blaulicht induziert eine *trans/cis* Isomerisierung einer Doppelbindung und Protonierung des Chromophors, was zu einer partiellen Entfaltung des Proteins führt [32]. Prototypische, pflanzliche Phytochrome binden kovalent lineare Tetrapyrrole als Chromophor und absorbieren Licht im roten und dunkelroten Spektralbereich [33, 34]. Sie besitzen drei modulare Domänen: eine PAS-Domäne [35], eine Phosphodiesterase/Adenylylcyclase/Fh1A und eine Phytochrom-spezifische Domäne [36]. Bei Beleuchtung mit rotem Licht wird eine *cis/trans*-Isomerisierung einer Doppelbindung des Tetrapyrrolchromophors induziert. Dadurch besitzen Phytochrome zwei Zustände, die Licht im roten bzw. dunkelroten Spektralbereich absorbieren und den beiden Isomeren entsprechen [37-39]. Zum einen steuern sie Wachstums- und Entwicklungsvorgänge von Pflanzen, zum anderen die Regulation von biotischen und abiotischen Stressfaktoren [40]. Ausschließlich in Cyanobakterien vorzufinden sind die mit den pflanzlichen Phytochromen verwandten Cyanobakteriochrome, mit einer Bilin-bindenden GAF-Domäne, welche im grün-roten Spektralbereich absorbieren. Cyanobakteriochrome regulieren die Synthese oder den Abbau von *Secondary Messenger* Molekülen wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und cyclisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP), welche eine wichtige Rolle bei der Biofilmbildung und Phototaxis aber auch bei der Anpassung des Photosyntheseapparates und wechselnden Lichtqualitäten (Eng. *complementary chromatic adaptation*) spielen [7, 41-45]. Das UVR8 Photorezeptorprotein aus *Arabidopsis thaliana* besitzt als einziger Photorezeptor keinen exogenen Chromophor für die Lichtwahrnehmung, sondern ein Cluster bestehend aus mehreren Tryptophanresten, die als Chromophor für die Absorption von UV-B Strahlung genutzt werden [10, 46, 47]. Beleuchtung mit UV-B Licht induziert hierbei die Dissoziation des inaktiven UVR8 Dimers in eine aktive monomere Form [48, 49]. So ermöglicht UVR8 der Pflanze, sich an die UV-Strahlung anzupassen [10]. Cryptochrome, BLUF-Proteine sowie LOV-Photorezeptoren wie Phototropine und Aureochrome besitzen ihr Absorptionsmaximum im blauen Spektralbereich und binden Flavine (Riboflavin (RF); Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD)) als Chromophor. Cryptochrome zeichnen sich durch ihre zwei Domänenstrukturen aus: eine konservierte FAD-bindene Domäne mit Strukturhomologie zu FAD-Bindedomänen aus DNA-Photolyasen (*photolyase homology*

region, PHR-Domäne) und eine divergente C-terminale Verlängerung [50, 51]. Die Beleuchtung mit Blaulicht induziert eine Reduktion von FAD und führt dadurch zu Konformationsänderungen an der FAD-Bindedomäne. Auf diese Weise regulieren Cryptochrome in Pflanzen z.B. die Photomorphogenese, blaulichtinduzierte Stomataöffnung, zirkadiane Rhythmik und die photoperiodische Blütenbildung [12, 52-55].

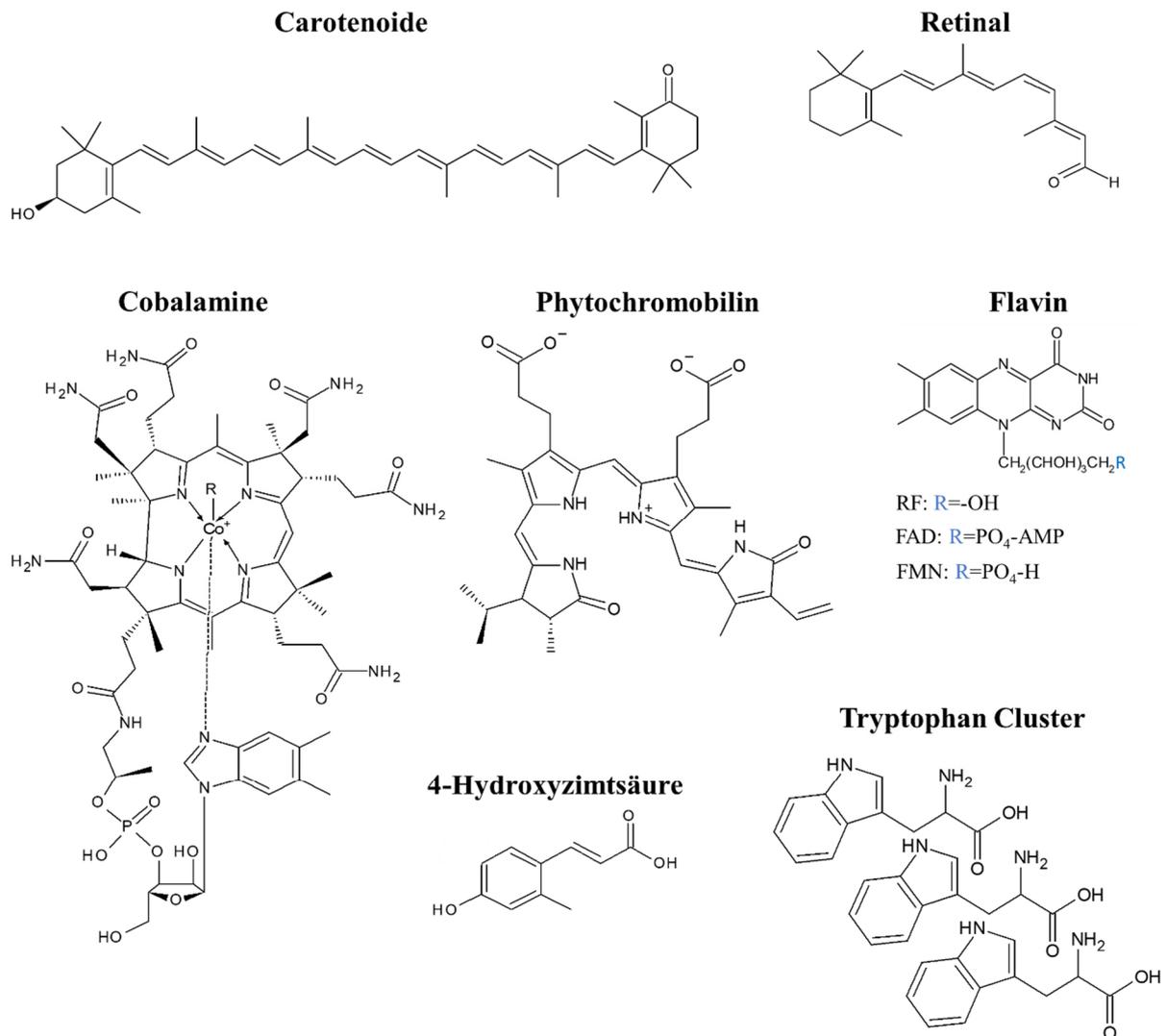


Abbildung 2: Chemische Strukturen der verschiedenen Chromophore der 10 Photorezeptorfamilien. Dargestellt sind Carotenoide, Retinal, Cobalamine, Phytochromobilin, Flavin (RF: Riboflavin, FAD: Flavinadeninukleotid, FMN: Flavinmononukleotid), 4-Hydroxymzimtsäure und ein Tryptophan Cluster.

BLUF-Photorezeptorproteine kommen als Ein- und Mehrdomänenproteine vor [56-58]. Die Lichtabsorption erfolgt hierbei in der FAD-bindenden BLUF-Domäne, wobei das Lichtsignal anschließend über intramolekulare oder intermolekulare Wechselwirkungen entweder direkt in der Zelle (Eindomänenproteine) oder über fusionierte Effektor-domänen (Mehrdomänenproteine) weitergeleitet wird. Hierbei erfolgt in der BLUF-Domäne keine

strukturelle Veränderung des Chromophors, wie es z.B. bei Rhodopsinen und Phytochromen der Fall ist [59, 60]. Beleuchtung mit Blaulicht führt im Fall von BLUF-Domänen lediglich zu einer Tautomerisierung eines Glutamins in der unmittelbaren Umgebung des FAD Chromophors was zu einer Änderung des FAD-Protein-Wasserstoffbrückennetzwerks führt [61]. In phototrophen Bakterien kontrollieren BLUF-Proteine die Expression von Genen, welche für die Synthese der Photosysteme verantwortlich sind, bzw. in einzelligen Eukaryoten, wie z.B. in *Euglena gracilis*, die Phototaxis kontrollieren [5, 62]. LOV-Photorezeptoren sind i.d.R. Mehrdomänenproteine in denen die Lichtwahrnehmung durch konservierte LOV-Sensordomänen vermittelt wird (1.2), welche oxidiertes Flavinmononukleotid (FMN) als Chromophor binden [63]. Durch Beleuchtung mit Blaulicht kommt es zur Ausbildung einer transienten Protein-FMN-Bindung (1.2.3). In Pflanzen, Algen, Pilzen und Bakterien liegen LOV-Sensordomänen mit verschiedenen Effektor-domänen fusioniert vor. Typische Effektor-domänen sind hierbei: Serin/Threonin-Kinasen [64], DNA-bindene Domänen, Phosphodiesterasen oder Histidinkinasen (1.2) [65-68]. Aufgrund dieser Modularität regulieren LOV-Photorezeptoren eine Vielzahl biologischer Funktionen, wie z.B. den pflanzlichen Phototropismus, lichtinduzierte Chloroplastenbewegung, Stomataöffnung sowie weitere zelluläre Adaptionsmechanismen in Pflanzen und Algen [6, 69-73]. Aber auch in Bakterien und Pilzen existieren LOV-Photorezeptoren [74], in welchen sie z.B. Prozesse wie die Photopigmentsynthese, allgemeine Stressantwort, Virulenz oder Zell-Zell-Adhäsion steuern [75, 76]. Da LOV-Photorezeptoren der Hauptfokus dieser Doktorarbeit sind, wird im Folgenden detaillierter auf ihre Struktur und Funktion eingegangen.

1.2. Light, oxygen, voltage (LOV)-Photorezeptoren

1.2.1. LOV-Proteine: Multidomänenstruktur und ihre Funktion

LOV-Proteine sind in Pflanzen, Pilzen, Bakterien und Protisten ubiquitär vorkommende Blaulichtphotorezeptoren, die verschiedenste Reaktionen auf Umweltreize vermitteln (1.1) [74] und eine, maximal zwei sog. LOV-Domänen als Sensordomänen besitzen (Abbildung 3). Diese globulären Sensordomänen gehören der PAS-Familie an, sind ca. 10 kDa groß (1.1) [31] und binden FMN als Chromophor (Abbildung 2). Struktur und Aktivierungsmechanismen von LOV-Photorezeptoren sowie der isolierten LOV-Domäne wurden für viele LOV-Proteine auf molekularer Ebene untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Konformationsänderungen im Protein-Chromophor-Komplex durch die

Absorption von blauem Licht ausgelöst werden (1.2.2). Diese Konformationsänderungen werden an diverse, fusionierte Effektor-domänen (Abbildung 3) „weitergegeben“ [74, 75, 77, 78]. Serin/Threonin-Kinasen (Phototropine), Leucin-Zipper (Aureochrome), Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren (WC-1), Anti-Sigmafaktoren (*Bacillus subtilis* YtvA) und Histidinkinasen (*Caulobacter crescentus* LovK, *Brucella abortus* LOV-HK) sind hier nur einige Beispiele für fusionierte Effektor-domänen (Abbildung 3). Jedoch besitzen nicht alle LOV-Proteine eine fusionierte Effektor-domäne, es existieren eine Reihe von sog. *short* LOV-Proteinen, die anstelle einer fusionierten Effektor-domäne kurze N- und C-terminale (N-terminal: A'α, C-terminal: Ja) Verlängerungen mit α-helikaler Struktur besitzen.

<u>Photorezeptor</u>	<u>Funktion:</u>	<u>Struktur:</u>
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Phot1 & Phot2)	Regulation lichtabhängiger physiologischer Prozesse	LOV1 LOV2 Serin/Threonin-Kinase
<i>Neurospora crassa</i> (WC-1)	Zirkadianes System (WCC); Feedbackregulator (VVD)	LOV PAS PAS Zinkfinger-Protein
<i>Neurospora crassa</i> (VVD)	Feedbackregulator von WCC	LOV
<i>Dinoroseobacter shibae</i> (DsLOV)	Regulation der Photopigmentsynthese	LOV
<i>Pseudomonas putida</i> (PpSB1-LOV & PpSB2-LOV)	Regulation der Transkription von Genen	LOV
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (RsLOV)	Regulation von Chemotaxis, Kohlen-Hydratstoffwechsel & photooxidativer Stress	LOV
<i>Bacillus subtilis</i> (YtvA)	Stressantwort	LOV STAS
<i>Brucella abortus</i> (LOV-HK)	Virulenz	LOV PAS Histidin-Kinase
<i>Caulobacter crescentus</i> (LovK)	Regulator der bakteriellen Zelloberflächenphysiologie	LOV Histidin-Kinase
<i>Vaucheria frigida</i> (AUREO1 & AUREO2)	Transkriptionsregulatoren	bZIP LOV

Abbildung 3: Übersicht ausgewählter LOV-Photorezeptoren, deren Funktion und Domänenstruktur. Schematisch illustriert ist die Domänenstruktur folgender LOV-Photorezeptoren: Phot1 und Phot2, WC-1, DsLOV, PpSB1-LOV und PpSB2-LOV, RsLOV, YtvA, LOV-HK, LovK, AUREO1 und AUREO2 sowie ihre biologische Funktion [68, 75, 79, 80]. Die Domänen sind wie folgt hervorgehoben: LOV-Domäne (blau), Serin/Threonin-Kinase (grau), Sulfat-Transporter-Anti-Sigmafaktor-Antagonist (STAS-Domäne; rot), PAS-Domäne (gelb), Histidin-Kinase (grün), Zinkfinger-Protein-Transkriptionsfaktor (lila) und Leucin-Zipper-Domäne (bZIP; braun). Bei DsLOV, PpSB1- und PpSB2-LOV und RsLOV handelt es sich um sog. *short* LOV-Proteine, die keine fusionierten Effektor-domänen besitzen.

Zum ersten Mal wurden LOV-Domänen als Sensordomänen in zwei pflanzlichen Photorezeptorkinasen (Phototropin: Phot1 und Phot2) in *A. thaliana* entdeckt [64, 69, 73].

Phot1 und Phot2 besitzen Plasmamembran-assoziierte Serin/Threonin-Kinasen, welche nach Beleuchtung mit Blaulicht autophosphoryliert werden [81]. Diese Autophosphorylierung findet an mehreren Stellen im Protein statt [82, 83], wurde jedoch insbesondere im Bereich der sog. „Aktivierungsschleife“ (*activation loop*) der Kinasedomäne nachgewiesen [82, 84]. Die Regulation der Phot-Kinase-Aktivität erfolgt über die sog. N-terminale photosensorische Region, welche zwei LOV-Domänen (LOV1 und LOV2) als Sensordomänen trägt [63, 85]. Hierbei ist LOV2 maßgeblich für die Autophosphorylierung des Photorezeptors und die Signalübertragung verantwortlich [86-88], während LOV1 die Wirkung von LOV2 moduliert und an der Dimerisierung des Proteins beteiligt ist [87, 89-91]. Dadurch können Phot1 und Phot2 eine Vielzahl an lichtabhängigen physiologischen Prozessen regulieren, wie z.B. die lichtabhängige Chloroplastenbewegung, die Öffnung von Stomata, Phototropismus sowie die Blattpositionierung und Blattabflachung [64, 69, 73, 92, 93]. Dadurch können Lichtschäden reduziert, der Gasaustausch reguliert und die Photosynthese-Effizienz verbessert werden [94]. Verwandte LOV-Photorezeptorproteine konnten in Pilzen und Bakterien nachgewiesen werden [72, 95, 96]. In filamentösen Pilzen sind die LOV-Photorezeptoren White-Collar 1 (WC-1) und Vivid (VVD) konserviert [97]. WC-1 ist ein Transkriptionsfaktor mit mehreren Domänen und bildet mit WC-2 den White-Collar-Complex (WCC) [96]. WC-1 setzt sich aus einer lichtsensitiven FAD-bindenden LOV-Domäne, zwei PAS-Domänen und einem Zinkfinger-DNA-Bindungsmotiv zusammen [98-101]. WC-2 besitzt ebenfalls eine Zinkfinger-DNA-Bindedomäne und eine PAS-Domäne, die die Bindung an WC-1 vermittelt und den WCC-Komplex stabilisiert [102, 103]. Der WCC dient in *Neurospora crassa* als Photorezeptor für das zirkadiane System und induziert bei Beleuchtung die lichtabhängige Transkription von Genen [104-108]. Der zweite konservierte LOV-Photorezeptor in Pilzen ist das *short* LOV-Protein VIVID (VVD). Es besteht lediglich aus einer LOV-Domäne und einer kurzen N-terminalen Verlängerung [109, 110], besitzt jedoch wie alle *short* LOV-Proteine keine fusionierte Effektdomäne. Die Expression von VVD wird von WCC nach Beleuchtung induziert und wirkt als Feedbackregulator der Wirkung von WCC entgegen [110, 111]. In Bakterien regulieren LOV-Photorezeptoren eine Reihe von physiologischen Prozessen wie z.B. Virulenz, die generelle Stressantwort, Zell-Zell-Adhäsion oder die Synthese von Photosynthesepigmenten [9, 75, 79]. Beispiele für bakterielle LOV-Photorezeptoren sind das LOV-Protein *DsLOV* aus *Dinoroseobacter shibae* [79], die LOV-Photorezeptoren *PpSB1-LOV* und *PpSB2-LOV* aus *Pseudomonas putida* [112-114], der LOV-Photorezeptor *YtvA* aus *Bacillus subtilis* [72] und das LOV-Protein *RsLOV* aus *Rhodobacter sphaeroides* [75]. *DsLOV* ist ein *short* LOV-Protein aus dem

photoheterotrophen marinen α -Proteobakterium *D. shibae* und ist an der Regulation der Photopigmentsynthese beteiligt. Im Gegensatz zu den meisten anderen LOV-Photorezeptoren ist bei *DsLOV* der Dunkelzustand der aktive Zustand (1.2.3), sodass das Protein die Synthese von Photosynthesepigmenten im Dunkeln positiv reguliert [79]. *PpSB1-LOV* und *PpSB2-LOV* aus *P. putida* KT2240 gehören, zusammen mit *DsLOV* und *RsLOV* zur drittgrößten Gruppe bakterieller LOV-Photorezeptoren, den oben bereits erwähnten *short* LOV-Proteinen, die keine fusionierte Effektor-domäne besitzen. *PpSB1-LOV* und *PpSB2-LOV* sind als Lichtsensoren an der Regulation der Transkription einer Zahl von Genen in *P. putida* KT2440 beteiligt [115]. Clustering-Analysen der Genomregion, in der das *RsLOV* kodierende Gen in *R. sphaeroides* lokalisiert ist, deuten auf eine Funktion des *short* LOV-Photorezeptors bei der Regulation der Chemotaxis, des Kohlenhydratstoffwechsels und der Antwort auf photooxidativen Stress hin [116]. Der bakterielle *short* LOV-Photorezeptor YtvA aus *B. subtilis* besitzt eine konservierte LOV-Domäne, ähnlich der von pflanzlichen Phototropinen, und eine Sulfat-Transporter-Anti-Sigmafaktor-Antagonist (STAS)-Effektor-domäne. Die N-terminale LOV-Domäne bindet FMN als Chromophor und weist die typische konservierte LOV-Photochemie auf (1.2.3) [72, 117]. Die LOV-Domäne ist über eine Linker-Helix ($J\alpha$) mit der STAS-Domäne verbunden [117]. STAS-Domänen kommen in vielen Regulatoren der allgemeinen Stressantwort von *B. subtilis* vor, wobei die entsprechenden Regulatoren (inklusive YtvA) einen Signalintegrations- und Weiterleitungskomplex, das sog. Stressosom bilden [118, 119]. Als Teil des Stressosomes moduliert YtvA die Aktivierung der generellen Stressantwort als Reaktion auf ein Blaulichtsignal [120, 121]. Der LOV-Histidinkinase Photorezeptor LOV-HK aus dem pathogenen α -Proteobakterium *Brucella abortus* dient zur lichtabhängigen Steigerung der Virulenz des Bakteriums und spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation der Bakterium-Wirt-Interaktion [67, 122]. LovK ein weiterer LOV-Histidinkinase Photorezeptor aus dem aquatischen α -Proteobakterium *C. crescentus*, besitzt neben der N-terminal lokalisierten konservierten LOV-Domäne eine fusionierte Histidin-Kinase welche als Regulator der Zelloberflächenphysiologie fungiert und lichtabhängig die Zell-Zell/Zell-Oberflächenadhesion kontrolliert [66]. Als letztes Beispiel zur Veranschaulichung der Multidomänenarchitektur von LOV-Photorezeptoren soll hier der LOV-Photorezeptor Aureochrom (AUREO1 und AUREO2) aus der stramenopilen Alge *Vaucheria frigida* genannt werden, welcher als Transkriptionsregulator dient [68, 123]. Diese LOV-Photorezeptoren besitzen eine Leucin-Zipper, bZIP-DNA-Bindungsdomäne als Effektor-domäne, wobei im Gegensatz zu den meisten anderen LOV-Photorezeptoren die

Effektordomäne am N-Terminus des Proteins liegt, während die LOV-Domäne am C-Terminus lokalisiert ist [68, 124].

1.2.2. Aufbau und Struktur der konservierten LOV-Sensordomäne

Alle LOV-Proteine besitzen eine, maximal zwei konservierte LOV-Sensordomänen (1.2.1), deren Struktur und Aufbau identisch sind. Im Folgenden wird die Struktur der konservierten LOV-Sensordomäne am Beispiel der LOV2-Sensordomäne des Phototropins-1 aus *Avena sativa* erläutert (Abbildung 4). Die strukturell konservierte LOV-Sensordomäne besitzt eine charakteristische α/β -PAS-Topologie ($A\beta$ - $B\beta$ - $C\alpha$ - $D\alpha$ - $E\alpha$ - $F\alpha$ - $G\beta$ - $H\beta$ - $I\beta$), bestehend aus vier α -Helices ($D\alpha$, $E\alpha$, $C\alpha$ und $F\alpha$) und einem antiparallelen β -Faltblattgerüst ($A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$, und $I\beta$; Abbildung 4). Im Zentrum der Struktur befindet sich eine strukturell konservierte Bindetasche für den Flavin-Chromophor welche aus Resten innerhalb der Helices $E\alpha$ und $F\alpha$ und des β -Faltblattgerüsts ausgebildet wird. Neben der LOV-Sensordomäne und fusionierten Effektordomänen (siehe 1.2) besitzen LOV-Photorezeptoren häufig zusätzlich α -helikale Strukturelemente am N- und C-Terminus der LOV-Domäne, welche bei der Signalweiterleitung zwischen Sensordomäne (LOV) und Effektordomäne eine wichtige Rolle spielen. Abbildung 4 B-F zeigt beispielhaft die Struktur einiger LOV-Sensordomänen mit N- und C-terminalen α -helikalen Verlängerungen. Eines dieser Strukturelemente, das bei der Signalweiterleitung zwischen Sensor und Effektor im pflanzlichen Phototropin eine wichtige Rolle spielt, ist die sog. $J\alpha$ -Helix, die C-terminal an der LOV2-Domäne lokalisiert ist und die N-terminale photosensorische Region (LOV1 und LOV2) mit der Ser/Thr-Kinasedomäne verbindet (1.2.1) [125, 126]. Beleuchtung mit Blaulicht induziert in Phot1 eine Entfaltung der $J\alpha$ -Helix der LOV2-Domäne was zu einer Autophosphorylierung der Ser/Thr-Kinase des Volllängen Phototropins und letztendlich zur lichtabhängigen Reaktion des Organismus (z.B. Phototropismus) führt (1.2.1) [5, 127, 128].

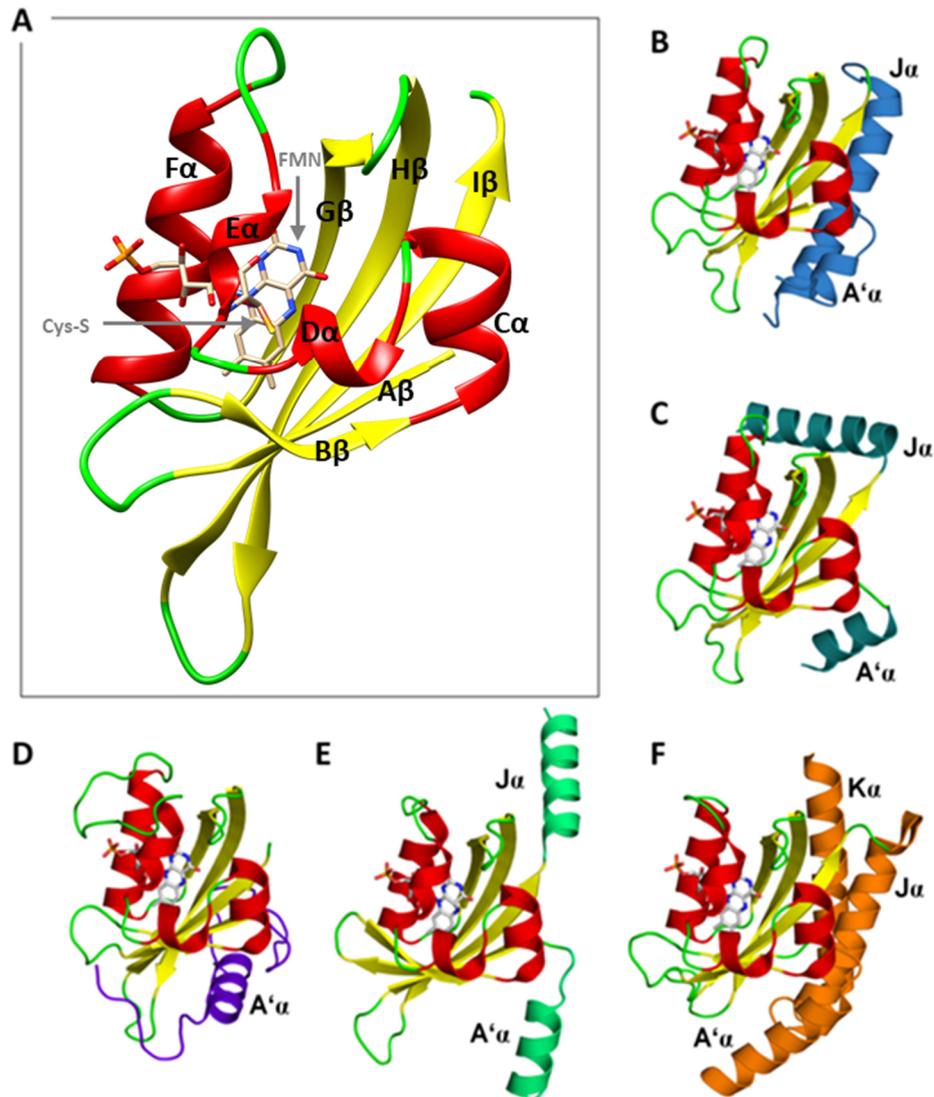


Abbildung 4: Struktur der konservierten LOV-Sensordomäne. A) Struktur der LOV2-Domäne des Phototropin-1 aus *Avena sativa* (PDB-ID: 2V1A). α -Helices sind in Rot, β -Faltblätter in Gelb und Bereiche ohne erkennbare Sekundärstruktur (*random coils*) in Grün als Cartoonmodelle dargestellt. Der Flavinmononucleotid-Chromophor des Proteins und das photoaktive, adduktbildende Cystein sind als Stäbchenmodelle gezeigt. Die verschiedenen Atome sind farblich hervorgehoben: Rot (Sauerstoff), Blau (Stickstoff), Grau (Kohlenstoff), Gelb (Schwefel) und orange (Phosphor). B-F) Neben der konservierten LOV-Domäne besitzen LOV-Photorezeptoren häufig N- und C-terminale α -helikale Verlängerungen. Diese sind in B-F für verschiedene LOV-Proteine beispielhaft gezeigt. B) *Avena sativa* Phot1-LOV2 (PDB-ID: 2V1A; A' α und J α in Blau). C) *Phaeodactylum tricornerutum* Aureochrome (PDB-ID: 5DKK; A' α und J α in Cyan). D) *N. crassa* VVD (PDB-ID: 6CNY; A' α in Violett). E) *P. putida* PpSB1-LOV (PDB-ID: 5J3W, 3SW1; A' α und J α in Hellgrün). F) *R. sphaeroides* LOV (PDB-ID: 4HIA, A' α , J α und K α in Orange) (übernommen und verändert nach Hemmer [129]).

1.2.3. Der konservierte LOV-Photozyklus

Bei Beleuchtung mit Blaulicht durchlaufen alle LOV-Sensordomänen einen sog. Photozyklus (Abbildung 5). Im Dunkelzustand (Abbildung 5, LOV₄₄₇, S₀, schwarzes UV/Vis-Spektrum, Abbildung 6 A), liegt der oxidierte Flavin-Chromophor (RF, FMN oder FAD)

nicht-kovalent im Protein gebunden vor und kann Licht im blauen Bereich des Spektrums ($\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$) absorbieren. Bei Absorption von Blaulicht wird innerhalb von Picosekunden ein angeregter Singulettzustand (Abbildung 5, S_1 ; $^1[\text{FMN}]^*$) des Flavins ausgebildet.

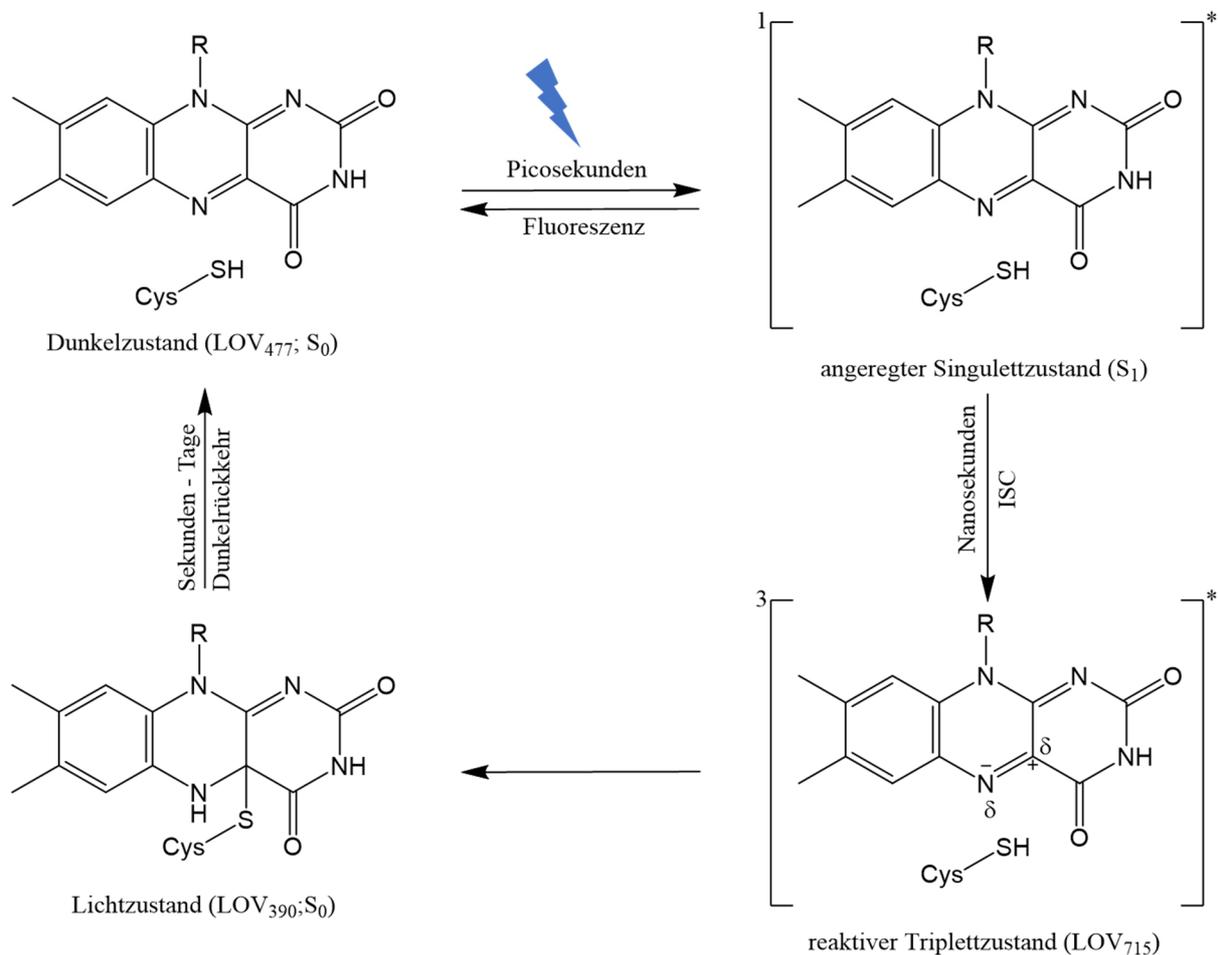


Abbildung 5: Schematische Darstellung des LOV-Photozyklus. Ausgehend vom Dunkelzustand ($\text{LOV}_{447}; S_0$), in welchem der oxidierte Flavin-Chromophor nicht-kovalent im Protein gebunden vorliegt, kommt es bei Beleuchtung mit Blaulicht innerhalb von Picosekunden zur Ausbildung eines angeregten Singulettzustands $^1[\text{FMN}]^*$ (S_1). Ein Teil der Anregungsenergie wird in Form von Fluoreszenz bei der Rückkehr in den Grundzustand (S_0) abgegeben, während ein Teil der angeregten Moleküle durch *intersystem-crossing* (ISC) innerhalb von Nanosekunden in einen angeregten Triplettzustand (LOV_{715} , $^3[\text{FMN}]^*$, T) übergehen. Der Triplettzustand zerfällt innerhalb von Millisekunden, höchstwahrscheinlich über ein radikalisches Flavin-Semichinon-Zwischenprodukt (hier nicht gezeigt) in den Lichtzustand ($\text{LOV}_{390}; S_0$). Dieser metastabile Zustand, als langlebigstes Intermediat des LOV-Photozyklus, auch als Lichtzustand, Signalzustand oder Photoaddukt bezeichnet, zeichnet sich durch eine kovalente FMN-C4a-Cystein-Bindung und Protonierung des N5-Atoms aus. Die Rückkehr in den Dunkelzustand beginnt, sobald die Beleuchtung mit Blaulicht beendet wird und kann von Sekunden bis hin zu Tagen dauern, wobei die kovalente FMN-Cystein-Bindung gebrochen, und das FMN-N5-Atom deprotoniert wird.

Ausgehend von diesem Zustand kann ein Teil der aufgenommenen Energie in Form von Fluoreszenz bei der Rückkehr in den Grundzustand (S_0) abgegeben werden, während ein Teil der angeregten Moleküle innerhalb weniger Nanosekunden durch *intersystem-crossing* (ISC) in einen angeregten Triplettzustand $^3[\text{FMN}]^*$ (LOV_{715})(T) übergeht. Der Triplettzustand

zeichnet sich durch eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei ca. 715 nm aus (LOV_{715}). Der Triplettzustand zerfällt nun innerhalb weniger Millisekunden in den sog. Lichtzustand, wobei es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C4a-Atom des Flavin-Isoalloxazinrings und dem oben erwähnten photoaktiven Cystein (1.2.2) sowie zur Protonierung des FMN-N5-Atoms kommt. Diese Strukturänderung führt zur Ausbildung eines neuen Absorptionsmaximums bei $\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$ (Abbildung 5, LOV_{390} , S_0 , oranges UV/Vis-Spektrum in Abbildung 6 A) welches charakteristisch für den Lichtzustand ist. Der Lichtzustand (LOV_{390}) wird auch als Signalfunktionszustand (*signalling state*) oder Photoaddukt bezeichnet. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass der Übergang zwischen Triplett und Lichtzustand über ein transientes Flavin-Semichinonradikal erfolgt (nicht gezeigt in Abbildung 5) [130-132]. Sobald die Beleuchtung beendet wird, erfolgt die Rückkehr in den ursprünglichen Dunkelzustand (Dunkelrückkehr, LOV_{447} , S_0). Dieser Prozess erfordert einen thermischen Bruch der zuvor gebildeten kovalenten FMN-C4a-Cystein-Bindung sowie die Deprotonierung des N5-Atoms des Flavins. Der letztgenannte Schritt gilt dabei als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt während der Rückkehr vom Lichtzustand (LOV_{390}) in den Dunkelzustand (LOV_{447}) [133]. Die Dunkelrückkehrkinetik (Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec}) kann dabei UV/Vis-spektrophotometrisch untersucht werden, in dem die Rückkehr der 450 nm Absorptionsbande aufgenommen wird. Häufig erfolgt dies nicht am Maximum der Absorptionsbande sondern bei 485 nm, um einen Einfluss des Messlichtes auf die Rückkehr zu minimieren (Abbildung 6 B, 2.2.5.3). Die Geschwindigkeit des Adduktzerfalls ist dabei proteinspezifisch und kann von Sekunden bis hin zu Tagen dauern [79, 112, 134-136]. Darüber hinaus hängt die Geschwindigkeit auch von weiteren Faktoren ab, wie z.B. dem Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk zum Flavin-Chromophor, der Umgebung des Flavins oder dem Zugang des Lösungsmittels zum aktiven Zentrum (1.2.4) [137-141]. Es scheint, dass der Prozess der Dunkelrückkehr noch nicht komplett mechanistisch verstanden wurde, wobei dennoch eine Reihe von verschiedenen Mechanismen postuliert wurden, auf welche im kommenden Abschnitt Bezug genommen wird.

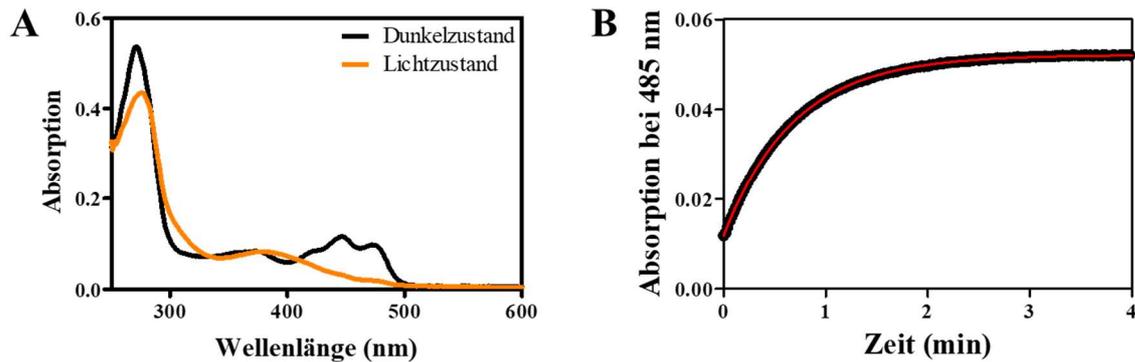


Abbildung 6: Absorptionsspektren des Dunkel- und Lichtzustandes (A) sowie der Dunkelrückkehrkinetik (B) am Beispiel des wildtypischen *AsLOV2* Photorezeptors. Abbildung A zeigt UV/Vis-Spektren des Dunkel- und Lichtzustandes beispielhaft für die LOV-Domäne *AsLOV2*. Im Dunkelzustand (LOV₄₄₇; schwarzes UV/Vis-Spektrum) liegt der oxidierte Flavin-Chromophor nicht-kovalent im Protein gebunden vor und zeigt somit bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 447$ nm sein Absorptionsmaximum. Nach der Beleuchtung mit Blaulicht liegt der Flavin-Chromophor nun kovalent gebunden im Protein vor. Der Lichtzustand (LOV₃₉₀; oranges UV/Vis-Spektrum) besitzt ein neues Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 390$ nm. Dargestellt in Abbildung B ist die Dunkelrückkehrkinetik des wildtypischen *AsLOV2*-Proteins. Diese kann mittels einer zeitaufgelösten Absorptionsmessung bei $\lambda_{\max} = 485$ nm verfolgt werden (2.2.5.3.1), indem die Absorption bei 485 nm gemessen und gegen die Zeit aufgetragen wird. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} (Dunkelrückkehr) ergibt sich durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie).

1.2.4. Mechanismen der Dunkelrückkehrkinetik

Der Photozyklus (1.2.3) ist beendet, sobald das Protein vom Lichtzustand (Abbildung 5, LOV₃₉₀) in den Dunkelzustand (Abbildung 5; LOV₄₄₇) zurückgekehrt ist [5]. Während die Bildung des Photoaddukts innerhalb von Mikro- bis Millisekunden geschieht, kann, je nach Protein, die Rückkehr in den Dunkelzustand Sekunden bis hin zu Tagen dauern [79, 112, 134, 136, 142]. Aufgrund dieser großen Variabilität wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche Theorien zum Mechanismus der Dunkelrückkehr aufgestellt und mittels ortsgerechter Mutagenese und biochemischer Methoden untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Proteinumgebung des Chromophors sowie äußere Einflüsse, wie Temperatur, pH und Puffer etc. eine Auswirkung auf die Dunkelrückkehrkinetik haben können. Strukturell spielt z.B. das Wasserstoffbrückennetzwerk (HB), welches die Bindung des Flavin-Chromophores im Protein vermittelt [143, 144], eine wichtige Rolle bei der Dunkelrückkehr. Das HB-Netzwerk stabilisiert hierbei insbesondere den polaren Teil des Isoalloxazinringsystems des Flavin-Chromophors durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Sauerstoff-, Kohlenstoff- und Stickstoffatomen (FMN C(2)=O, N(3)H, C(4)=O und dem N(5)) des Flavinrings und konservierter, polarer und ungeladener Aminosäuren (Glutamin- und Asparaginreste) innerhalb der Bindetasche (F α & E α mit den β -Faltblättern) (Abbildung 7, dunkelblau hervorgehoben) [143]. Im Lichtzustand kommt es zu einer

Änderung des HB-Brückennetzwerkes zwischen dem Protein und den eben genannten Positionen im Chromophor [145-148], wobei beispielsweise die Wasserstoffbrücken an den Positionen C(2)=O und C(4)=O im Lichtzustand schwächer ausgebildet sind. Mutationen an den entsprechenden Positionen im Protein (N94, N104, Q123; *B. subtilis* YtvA Nummerierung) führen hierbei zu veränderten Triplett-Lebenszeiten, Photozyklus-Quantenausbeuten und Dunkelrückkehrzeiten [143]. Detailliert wurde dies zwar überwiegend für YtvA aus *B. subtilis* untersucht [143], die Vermutung liegt jedoch nahe, dass ähnliche Mechanismen auch in anderen LOV-Proteinen eine Rolle spielen, da das HB-Netzwerk an den entsprechenden Positionen hoch konserviert ist [146, 149-151]. Analog hierzu wurde für das LOV-Protein EL222 aus *Erythrobacter litoralis* HTCC2594 gezeigt, dass ein weiterer Glutaminrest, der mit der FMN C(2)=O Position eine H-Brücke ausbildet und in LOV-Proteinen normalerweise hoch konserviert ist (Q454 in *AsLOV2*), in EL222 durch ein Alanin ersetzt ist (A79 in EL222). Ein Austausch dieser Aminosäure zu Glutamin verlangsamt hierbei die Dunkelrückkehr um einen Faktor von ca. 10 [143, 144]. Weitere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass Mutationen an den entsprechenden Positionen im Protein zu einer Änderung der Kinetik, Effizienz und Energetik des Photozyklus führen [143, 152-156]. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die „Stärkung“ bzw. „Schwächung“ des HB-Netzwerkes, z.B. durch Ausbildung zusätzlicher H-Brücken, einen starken Einfluss auf die Dunkelrückkehr hat. Zusätzlich zum Einfluss des HB-Netzwerkes, konnte außerdem gezeigt werden, dass sterische Wechselwirkungen zwischen Aminosäuren in der Nähe des Flavin-Chromophors einen Einfluss auf die Dunkelrückkehr haben. Hierbei wurde postuliert, dass Aminosäurereste die Konformation des Flavinrings, des Flavin-Phosphatrests oder des adduktbildenden Cysteinrests beeinflussen und so die Dunkelrückkehr der LOV-Sensordomäne verändern (Abbildung 7, dunkelorange hervorgehoben). Dies geschieht z.B. durch Mutationen, die die Konformationsfreiheit des Flavin-Chromophors oder der Bindetasche des LOV-Proteins einschränken. Beispielsweise wurden die Aminosäurereste I427 (I39 in YtvA, M49 in *DsLOV*, I85 in VVD) und V416 in *AsLOV2* (I74 in VVD), welche in van-der-Waals-Kontakt mit einem Schwefelatom des photoreaktiven Cysteinrests stehen, als Schlüsselpositionen für die Beeinflussung der Dunkelrückkehr von LOV-Domänen identifiziert. Mutationen an diesen Positionen, wie z.B. die Mutation des I427 in *AsLOV2* nach Valin beschleunigt die Dunkelrückkehr um das Zehnfache [157]. Außerdem können Aminosäuresubstitutionen (z.B. R66I in *PpSB1-LOV* und I66R in *PpSB2-LOV*, V525R in *A. thaliana* phot1 LOV2) in der Nähe des FMN-Phosphats die Dunkelrückkehr beschleunigen bzw. verlangsamen (Abbildung 7, dunkelgrün hervorgehoben) [134, 158]. Insbesondere

scheint die Stabilisierung des FMN-Phosphats durch Ausbildung von Salzbrücken mit geladenen Resten die Dunkelrückkehr stark zu beeinflussen [134]. Außerdem spielen Aminosäuren, die die Bewegungsfreiheit der Methylgruppen am Dimethylbenzolzringsystems des Flavins beeinflussen, wie z.B. N425 in *AsLOV2* (Abbildung 7, hellorange hervorgehoben), eine wichtige Rolle. So führt z.B. die Mutation N425C zu einer 7-fach schnelleren Dunkelrückkehr [159].

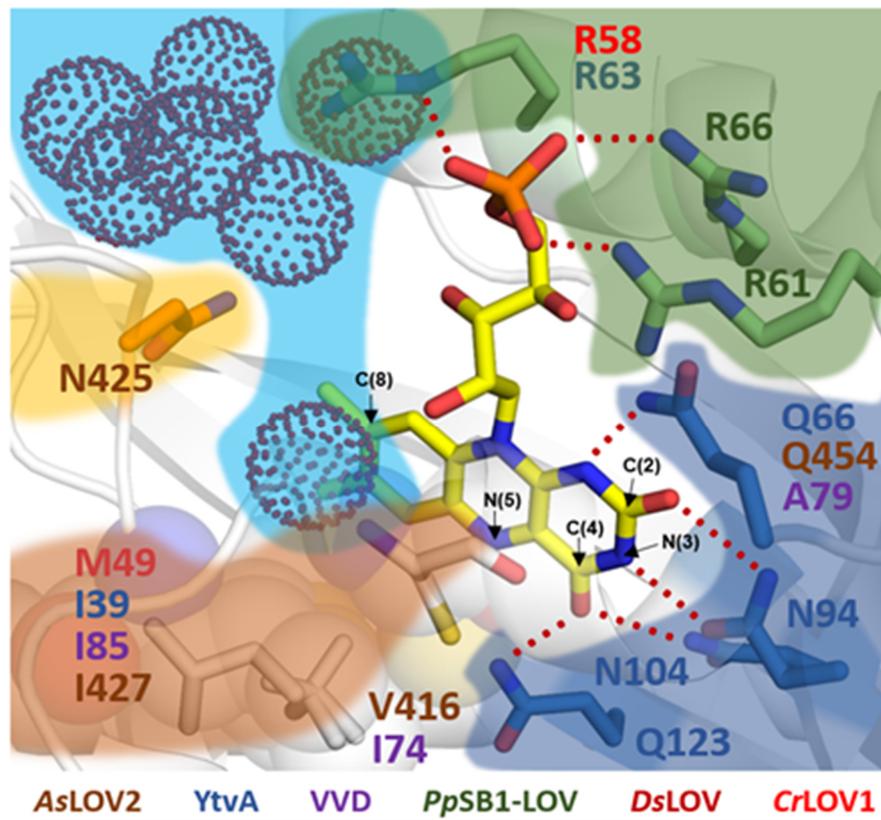


Abbildung 7: Übersicht über Mutationen mit Einfluss auf die Dunkelrückkehr von LOV-Domänen. Dargestellt ist die Superposition der Strukturen der LOV-Domänen *AsLOV2* aus *A. sativa* (PDB: 2V1A), *B. subtilis* YtvA (PDB: 2PR5), *N. crassa* VVD (PDB: 2PD7), *P. putida* PpSB1-LOV (PDB: 5J3W, chain A), *D. shibae* DsLOV (PDB: 4KUK) und *C. reinhardtii* (PDB: 1N9L), wobei Schlüsselreste hauptsächlich in *AsLOV2* (V416, I427, N425, Q454), YtvA (N04, N104, N94, Q66), PpSB1-LOV (R61, R66) und CrLOV1 (R53) als Stäbchenmodell dargestellt sind. Reste/Positionen sind entsprechend des Mechanismus über den sie die Dunkelrückkehr beeinflussen markiert: Reste mit Wasserstoffbrücken (dargestellt als Dunkelrote gestrichelte Linie) zu C(2)=O, C(4)=O, N(3)-H in Dunkelblau, Reste mit Salzbrücken (dargestellt als Dunkelrote gestrichelte Linie) in Dunkelgrüne, Reste die sterisch, über Van-der-Waals-Wechselwirkungen, mit dem photoaktiven Cystein wechselwirken in Dunkelorange, Reste die die Bewegungsfreiheit der C(8) Methylgruppe des Flavins beeinflussen in Hellorange und konservierte Wassermoleküle (als Rote gepunktete Kugeln) in Hellblau. Kohlenstoffatome der Reste sind analog eingefärbt, Sauerstoffatome in Rot, Stickstoffatome in Blau, Phosphor in Orange, Schwefel in Gelb. Aminosäurenummierungen sind entsprechend der Proteine eingefärbt, *AsLOV2* in Braun, YtvA in Blau, VVD in Pink, PpSB1-LOV in Dunkelgrün, DsLOV in Dunkelrot und CrLOV1 in Hellrot.

Des Weiteren zeigten LOV1-LOV2-Tandemkonstrukte aus *Chlamydomonas reinhardtii* eine veränderte Kinetik. Dies legt nahe, dass auch Protein-Protein-Wechselwirkungen von

Bedeutung für die Dunkelrückkehr sind [160]. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein Austausch der C-terminalen Verlängerung zwischen *PpSB1*-LOV und *PpSB2*-LOV ebenfalls einen Einfluss auf die Dunkelrückkehr hat [112]. Als eher globale Faktoren beeinflussen zudem Einflussgrößen wie z.B. der pH, Imidazol (als Base), basische Aminosäuren im Protein sowie die Zusammensetzung des Puffers die Dunkelrückkehr [137, 161]. Mechanistisch scheint hier die Deprotonierung des FMN-N5-Atoms gefördert oder behindert zu werden, was zu einer schnelleren oder langsameren Dunkelrückkehr führt. Als Beispiel kann hier Imidazol aufgeführt werden, da dieses abhängig vom pH als Base fungieren kann und so die Deprotonierung des FMN-N5-Atoms fördert, während die Blockierung von Histidinen durch Diethylpyrocarbonat die Dunkelrückkehr verlangsamt [137, 162]. Es wird vermutet, dass die Basenkatalyse von oberflächenexponierten Histidinresten ausgeht, welche weit entfernt vom FMN-Chromophor liegen und ein Netzwerk aus dem Chromophor, Wassermolekülen und der Base bilden [136, 137], wobei ein solches Netzwerk bisher nicht experimentell nachgewiesen werden konnte. Für die Energetik des Photozyklus ist zu dem der Wassergehalt, d.h. der Hydratisierungsgrad des Proteins von Bedeutung, da beispielsweise dehydrierte Proteinvarianten eine verlangsamte Dunkelrückkehrkinetik aufweisen [161, 162]. In einigen Proteinen, wie z.B. in *DsLOV*, sind dabei konservierte Wassermoleküle in den Strukturen zu identifizieren (Abbildung 7, hellblau hervorgehoben), wenngleich Reste wie M49 in *DsLOV* (I427 in *AsLOV2*) hier auch einen Einfluss auf die Zugänglichkeit des photoaktiven Cysteins zum Lösungsmittel haben können [141, 163]. Ungeachtet all dieser Studien ist der strukturelle und mechanistische Prozess der Dunkelrückkehr weiterhin nicht vollständig verstanden, sodass eine Vorraussage von Mutationen oder kombinatorischer Effekte nach wie vor schwierig ist.

1.3. Lichtabhängige Strukturänderungen in LOV-Proteinen

1.3.1. Lokale Strukturänderungen in der LOV-Domäne

Für das Verständnis dieser Arbeit ist es notwendig neben dem Photozyklus (1.2.3) und den Mechanismen der Dunkelrückkehr (1.2.4) strukturelle Mechanismen der Signalweiterleitung, bedingt durch lokale Strukturänderungen in der LOV-Domäne, zu betrachten. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass bisher in der Literatur nur wenige Kristallstrukturen von LOV-Proteinen im Dunkel-/ und Lichtzustand beschrieben wurden, für die die Struktur des Lichtzustandes durch Kristallisation unter Beleuchtung erhalten wurde [134, 164, 165].

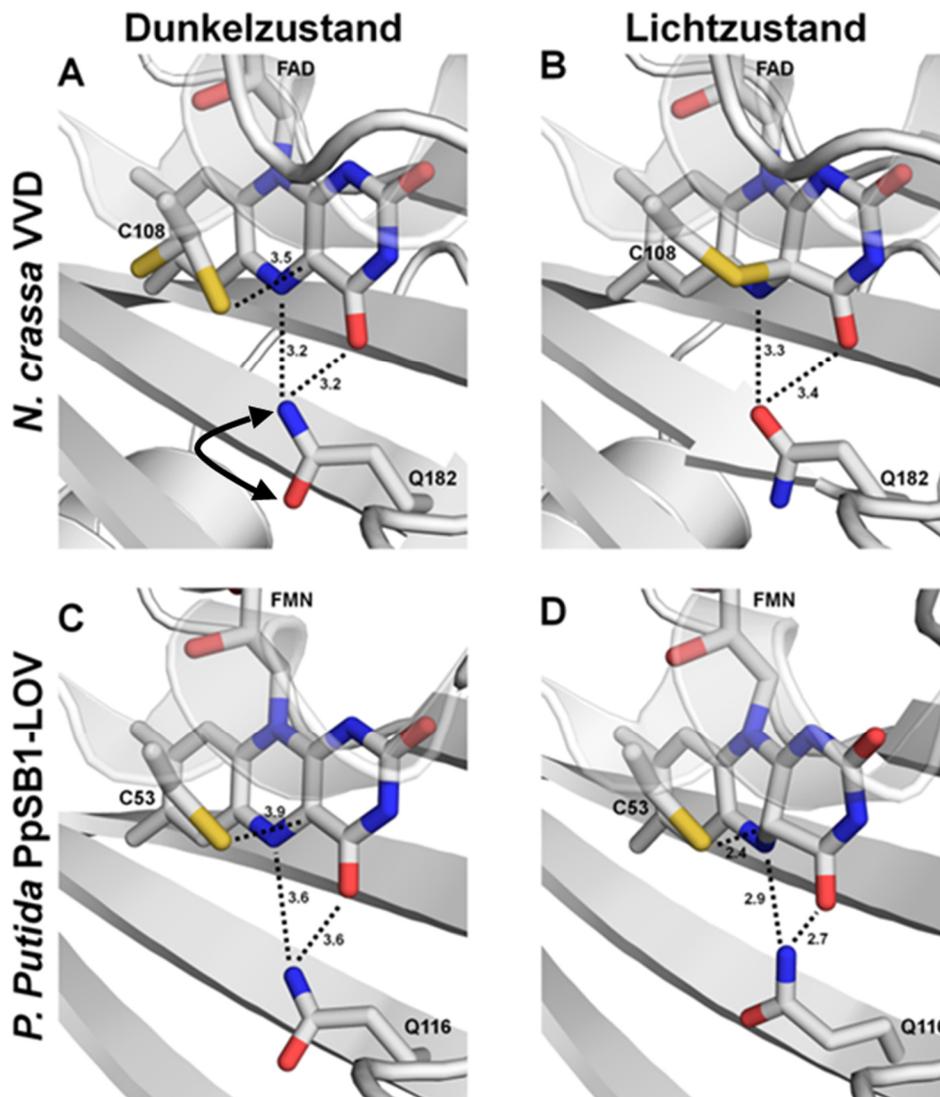


Abbildung 8: Struktur der Flavin-Bindetasche ausgewählter LOV-Sensordomänen im Dunkel- und Lichtzustand. Gezeigt sind die Strukturen der Flavin-Bindetasche der LOV-Domäne des VVD Photorezeptors aus *N. crassa* (A; PDB-ID: 6CNY) und *P. putida* PpSB1-LOV (C; PDB-ID: 5J3W) im Dunkelzustand sowie die korrespondierenden Strukturen im Lichtzustand (B; PDB-ID 3RH8 und D; PDB-ID 3SW1). Sekundärstrukturen sind als Cartoonmodelle in grau dargestellt. Relevante Aminosäureseitenketten sowie der Flavin-Chromophor sind als Stäbchenmodelle gezeigt: Kohlenstoffatome in Grau, Stickstoffatome in Blau, Sauerstoffatome in Rot und Schwefelatome in Gelb. Gestrichelte Linien markieren relevante Abstände zwischen Atomen und die entsprechenden Abstände (in Å) sind angegeben. Der Doppelpfeil (Schwarz) zeigt die Rotation des Glutaminrests (Q182) an (übernommen und verändert nach Hemmer [129]).

In den meisten Studien wurden zur Untersuchung des Lichtzustandes Kristalle, die im Dunklen angezogen wurden, vor oder während der Messung beleuchtet [117, 125, 166]. Da die Proteinmoleküle im Kristallgitter jedoch nur eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit besitzen, ist eine Ausbildung größerer Strukturänderungen in der Regel nicht möglich [117, 125, 166]. Dennoch konnten lokale blaulichtabhängige Prozesse, wie die Ausbildung der kovalenten FMN-C4a-Cystein-Bindung, aufgeklärt werden (1.2.3; Abbildung 5). Zwei der

wenigen Proteine, die sowohl im Dunkel- als auch im Lichtzustand (unter Beleuchtung mit Blaulicht) kristallisiert werden konnten, sind VVD aus *N. crassa* (Abbildung 8 unten A und B) und PpSB1-LOV aus *P. putida* (Abbildung 8 unten C und D) [134, 135, 165]. Aus dem direkten Vergleich der Flavin-Bindetasche beider LOV-Proteine sind lichtabhängige Strukturänderungen ersichtlich, welche im Folgenden erläutert werden. Lichtabhängige lokale Strukturänderungen können sowohl für den bereits beschriebenen hoch konservierten Cysteinrest (1.2.3; C108 in VVD und C53 in PpSB1-LOV) als auch für einen hoch konservierten Glutaminrest (Q182 in VVD und Q116 in PpSB1-LOV) nachgewiesen werden, welcher im Dunkelzustand Wasserstoffbrücken mit dem FMN-Chromophor ausbildet. Während in der Lichtstruktur des VVD Proteins eine deutliche Elektronendichte zwischen dem Flavin-C4a-Atom und der Thiolgruppe von C108 nachgewiesen werden konnte, was auf eine Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen FMN und C108 hindeutet [165], konnte die Bildung der kovalenten Bindung zwischen Protein und FMN im Fall von PpSB1-LOV nur indirekt nachgewiesen werden (kürzerer Abstand zwischen Cys53-SH und FMN-C4a; sp³ Hybridisierung des FMN-C4a Atoms) [135]. Letzteres ist sehr wahrscheinlich auf einen Strahlungsschaden durch die Synchrotron-Röntgenstrahlung zurückzuführen [135]. Gleichzeitig können in VVD weitere Veränderungen in der FMN-Bindetasche beobachtet werden [5, 165]. So führt die Protonierung des FAD-N5-Atoms zur Rotation des Glutaminrests (Q182; vergleiche Abbildung 8 A und B) [5]. Lokal ergibt sich für PpSB1-LOV ein anderes Bild. Im Dunkelzustand bildet das korrespondierende Glutamin (Q116, Abbildung 8 C) keine Wasserstoffbrücken mit dem FMN-Molekül aus (Abbildung 8 C), da eine vom FMN wegzeigende Konformation eingenommen wird (Abstand < 3,2 Å). Beleuchtung mit Blaulicht induziert auch hier eine Konformationsänderung des Glutamins, wobei die Seitenkette näher an den FMN-Chromophor „rückt“, sodass Wasserstoffbrücken mit FMN-N5 und dem Sauerstoffatom der C(4)=O Gruppe ausgebildet werden können.

Die beschriebenen lokalen lichtabhängigen Strukturänderungen in VVD aus *N. crassa* und PpSB1-LOV aus *P. putida* finden sehr wahrscheinlich in ähnlicher Weise in allen LOV-Proteinen statt, da die FMN-Bindetasche in alle Strukturen hoch konserviert ist. Im Gegensatz dazu divergiert in den verschiedenen LOV-Photorezeptoren die intramolekulare Signalweiterleitung von der LOV-Domäne zur Effektdomäne. Im folgenden Kapitel werden diese globalen strukturellen Änderungen für die in dieser Arbeit verwendeten LOV-Photorezeptoren beschrieben (1.3.2).

1.3.2. Globale Strukturänderungen im Photorezeptor

1.3.2.1. *Dinoroseobacter shibae* DsLOV

D. shibae DFL12T ist ein marines, fakultativ anaerobes, anoxygen-phototrophes, gram-negatives α -Proteobakterium. Im Gegensatz zu verwandten phototrophen Purpurbakterien, wie *Rhodobacter capsulatus*, kann *D. shibae* Energie durch anoxygene Photosynthese unter aeroben Bedingungen erzeugen [163, 167]. *D. shibae* DFL12T besitzt drei Gene, Dshi_1135, Dshi_1893 und Dshi_2006, die für LOV-Photorezeptoren kodieren. Dshi_1135 trägt neben der LOV-Sensordomäne eine Histidinkinase-Domäne und Dshi_1893 besteht neben der LOV-Sensordomäne aus zwei PAS-Domänen, einer Histidinkinase- und Response-Regulator-DNA-Bindedomäne [79]. Das Dshi_2006 Gen kodiert für das *short* LOV-Protein DsLOV [79]. Wie VVD und PpSB1-LOV (1.2.2), besitzt es keine fusionierte Effektdomäne, sondern lediglich eine kurze N-terminale α -helikale Verlängerung (Abbildung 9).

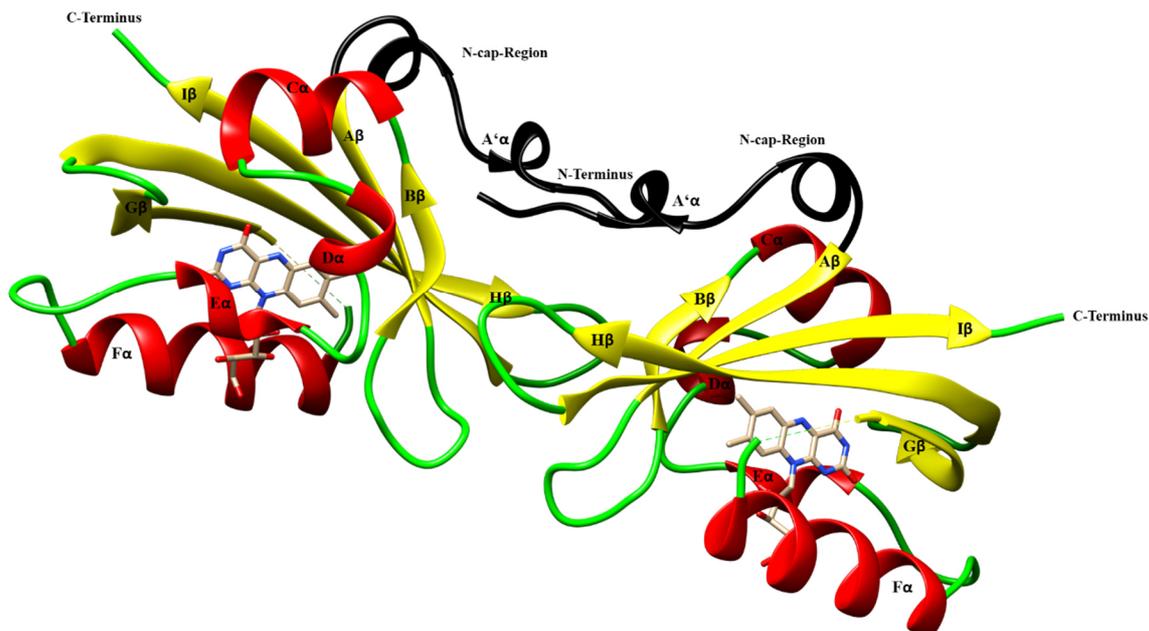


Abbildung 9: Struktur des DsLOV Photorezeptors im Dunkelzustand. Gezeigt ist die Struktur des DsLOV Dimers als Cartoonmodell im Dunkelzustand (PDB: 4KUK). Zur Veranschaulichung der Struktur sind die PAS-Topologie (α -Helices: Rot; β -Faltblätter: Gelb) und die N-cap-Region mit der A' α Helix (Schwarz) farblich hervorgehoben und beschriftet. Der Flavin-Chromophor von DsLOV in Lösung ist FMN, allerdings liegt in der Struktur Riboflavin vor, wahrscheinlich ein Kristallisationsartefakt. Der Chromophor ist als Stäbchenmodell dargestellt: Blau (Stickstoff), Rot (Sauerstoff), Orange (Phosphor) und Gelb (Kohlenstoff).

Mittels kristallographischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass DsLOV neben der konservierten LOV-Domäne mit α/β -PAS-Topologie (A β -B β -C α -D α -E α -F α -G β -H β -I β) (1.2.2) ein nicht-kanonisches N-cap Strukturelement besitzt [79]. Das N-cap Element, mit

A'α-Helix ist hierbei maßgeblich an der Dimerbildung beteiligt. HPLC-Analysen haben gezeigt, dass *DsLOV* in Lösung hauptsächlich FMN als Chromophor bindet, wobei in der Struktur lediglich Riboflavin nachgewiesen werden konnte. Das Protein besitzt eine für LOV-Proteine typische Photochemie und eine für bakterielle LOV-Proteine schnelle Dunkelrückkehrkinetik mit einer Adduktlebenszeit von $\tau_{\text{rec}} = 9,6 \text{ s}$ bei 20 °C [79]. In der Lichtstruktur des Proteins, welche durch Beleuchtung eines im Dunkeln angezogenen Kristalls bestimmt wurde, konnten verschiedene strukturelle Änderungen nachgewiesen werden: Reste der A'α-Aβ-Schleife konnten im Lichtzustand nicht aufgelöst werden, mehrere Reste der FMN-Bindetasche zeigten unterschiedliche Seitenkettenkonformationen im Lichtzustand, Kontaktverluste mehrerer Reste in der hydrophoben Tasche um den Dimethylbenzolring des Chromophors und signifikante Verschiebungen des Cα-Rückgrats des Aβ-Strangs, des Iβ-Strangs und des A'α-Aβ *loops* [79]. Die meisten FMN-Protein-Interaktionen, wie das HB-Netzwerk auf der polaren Seite des Flavin-Isoalloxazinrings, sind zwischen *DsLOV* und anderen LOV-Proteinen konserviert. Als einzigen Unterschied, der gegebenenfalls eine Auswirkung auf die Dunkelrückkehr haben könnte, befindet sich eine Aminosäure-Substitution auf der Dimethylbenzol-Seite des Flavin-Isoalloxazinrings. Während in pflanzlichen und anderen bakteriellen LOV-Proteinen ein Isoleucin (z.B. I427 in *AsLOV2*, I39 in *YtvA* und I85 in *VVD*) an dieser Position zu finden ist, trägt *DsLOV* an der korrespondierenden Position ein Methionin (M49) (Abbildung 7). In anderen LOV-Domänen führt der Austausch dieses Isoleucins (z.B. I427V in *AsLOV2*, I39V in *YtvA* oder I85V in *VVD*) zu einer schnelleren Dunkelrückkehr [134, 141, 157]. Zudem weist der Rest eine gewisse Flexibilität auf, da zwei Konformationen beobachtet wurden, eine bei der das δ-Schwefelatom in Richtung des photoaktiven Cysteins zeigt und eine gespiegelte Variante bei der es vom Cystein wegzeigt [79]. Weiterführende Studien haben dargelegt, dass M49 sowie die korrespondierenden Reste in *YtvA* und *VVD* [141] den Zugang von Basen/Lösungsmitteln zum Flavin-N5-Atom kontrollieren und so Einfluss auf den Adduktzerfall durch N5-Deprotonierung nehmen können [163]. Mikrobiologische Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass Photorezeptoren bisher eine einzigartige Funktion besitzen, da für *DsLOV* der Dunkelzustand der regulatorisch relevante Signalzustand ist.

1.3.2.2. *Pseudomonas putida* PpSB1-LOV

Der LOV-Photorezeptor *PpSB1-LOV* stammt aus dem gram-negativen γ-Proteobakterium *P. putida* KT2440 [112]. *P. putida* ist ein nicht sporenbildendes, nicht phototrophes,

saprotrophes, stäbchenförmiges und aerobes Bodenbakterium, dessen vielfältiger Stoffwechsel das Bakterium dazu befähigt z.B. organische Lösungsmittel wie Toluol abzubauen [168]. Im Jahr 2002 konnte das Genom (6,18 Mbp) komplett sequenziert und zwei Gene identifiziert werden, welche für zwei LOV-Proteine kodieren (*PpSB1-LOV*, UniProt-ID: Q88E39 und *PpSB2-LOV*, UniProt-ID: Q88JB0) [112-114, 169]. Beide LOV-Proteine bilden Dimere in Lösung und gehören ebenso wie *DsLOV* zu den *short* LOV-Proteinen (1.2.1) [112], da sie nur eine LOV-Sensordomäne ohne fusionierte Effektdomäne besitzen. Obwohl die LOV-Domänen eine Sequenzähnlichkeit von 66 % besitzen, unterscheiden sie sich die Proteine enorm hinsichtlich ihre Adduktlebenszeit (*PpSB1-LOV* $\tau_{\text{rec}} \sim 2.500$ min und *PpSB2-LOV* $\tau_{\text{rec}} \sim 140$ s bei 20 °C) [112, 170]. Bis jetzt ist über die genaue Funktion beider LOV-Proteine relativ wenig bekannt. Aktuelle Studien konnten jedoch zeigen, dass beide Photorezeptorproteine gemeinsam mit einem LitR Transkriptionsregulator die lichtabhängige Transkription von Genen kontrollieren können [115]. *PpSB1-LOV* konnte zudem als eines der ersten LOV-Proteine im Dunkelzustand sowie im Lichtzustand und unter kontinuierlicher Beleuchtung kristallisiert werden [135]. *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) spektroskopische Untersuchungen lieferten zudem Einblicke in die globalen lichtabhängigen Strukturänderungen des Proteins in Lösung [135], sodass *PpSB1-LOV* strukturell zu den am besten charakterisierten LOV-Photorezeptoren gehört. Zusätzlich zur konservierten α/β -PAS-Topologie (A β -B β -C α -D α -E α -F α -G β -H β -I β) (1.2.2) besitzt *PpSB1-LOV* zwei nicht-kanonische Strukturelemente: ein N-terminales N-cap Element mit A' α -Helix und eine C-terminale J α -Helix, welche im Dimer mit dem korrespondierenden Strukturelement einen kurzen *coiled-coil* bildet [134]. Darüber hinaus haben Stadler *et al.* gezeigt [171], dass die LOV-Sensordomäne bei Beleuchtung dynamisch stabilisiert wird, wobei basierend auf Molekulardynamik Simulationen vorgeschlagen wurde, dass sich insbesondere die Seitenkettendynamik von Resten im LOV-LOV Dimer Interface (inklusive des J α -J α' *coiled-coils*) ändert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die J α -Helix das Lichtsignal möglicherweise auf weitere Bindungspartner übertragen kann. Im strukturellen Vergleich mit anderen bakteriellen und pflanzlichen LOV-Proteinen fällt zudem auf, dass die größten strukturellen Unterschiede im Bereich des H β -I β loops, des E α -F α loops und der A β und B β -Faltblätter zu finden sind [135]. Darüber hinaus ist *PpSB1-LOV* ein symmetrischer, paralleles Dimer. Im Dunkelzustand wird die Dimerstruktur über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den N- und C-terminalen A' α und J α Strukturelementen der beiden LOV-Untereinheiten stabilisiert. Im Lichtzustand besitzt der Monomer eine identische Struktur, für das Dimer jedoch wurde

eine Rotation der beiden Untereinheiten um ca. 30° beobachtet, dessen Ankerpunkt im Bereich des A' α -A β loops liegt (Abbildung 10, blauer Stern) [134, 135].

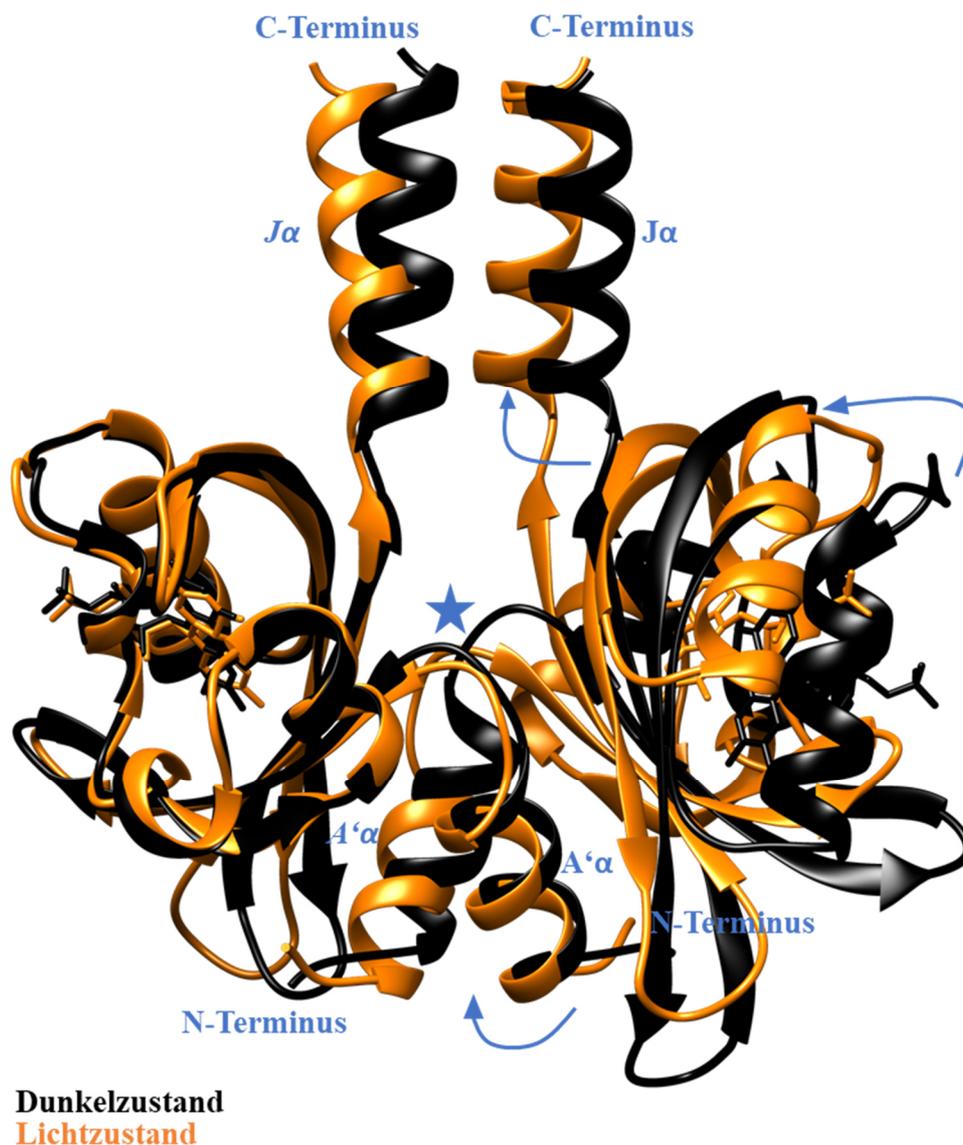


Abbildung 10: Überlagerung der Struktur des Dunkel- und Lichtzustands von *PpSB1-LOV*. Gezeigt ist die Überlagerung des *PpSB1*-Dimers im Dunkelzustand (Untereinheit A und C schwarz; PDB-ID: 5J3W) sowie im Lichtzustand (orange; PDB-ID: 3SW1). Beide Strukturen wurden über die Untereinheit A des Dimers superpositioniert. Der FMN-Chromophor ist als Stäbchenmodell in Schwarz (Dunkelzustand) und Orange (Lichtzustand) dargestellt. Des Weiteren sind die α -helikalen Strukturelemente A' α und J α (kursiv markiert in Kette C) sowie der N- und C-Terminus markiert. Zudem ist der Ankerpunkt der Rotation der Untereinheiten mit einem blauen Stern und die Richtung der Untereinheitenrotation zwischen Dunkel- und Lichtzustand mit einem blauen Pfeil markiert.

Der auffälligste strukturelle Unterschied zwischen *PpSB1-LOV* und anderen LOV-Proteinen, der einen Einfluss auf die Dunkelrückkehr des Proteins haben könnte, findet sich in zwei zusätzlichen Argininen (R61 und R66), die über Salzbrücken mit dem FMN-Phosphat

interagieren (Abbildung 7). In anderen LOV-Proteinen befinden sich an den korrespondierenden Positionen polare oder hydrophobe Reste. R61 befindet sich im E α /F α loop und R66 ist in der F α -Helix lokalisiert. Beide Reste bilden zusammen mit den in den meisten LOV-Proteinen konservierten Argininresten auf E α (R54 in *PpSB1*-LOV, R58 in *CrLOV1*, R63 in *YtvA*; Abbildung 7) auf F α (R70 *PpSB1*-LOV Nummerierung) ein hoch organisiertes Netzwerk, das sog. Arginin-Cluster, welches ein besonderes Merkmal des *PpSB1*-LOV Proteins ist [134]. Zudem spielen die beiden zusätzlichen Reste des Arginin-Clusters (R61 und R66 in *PpSB1*-LOV) für die Dunkelrückkehrkinetik des Proteins eine herausragende Rolle, da in vorherigen Experimenten gezeigt werden konnte, dass der Austausch von R61 gegen Histidin (R61H) bzw. R66 gegen Isoleucin (R66I) in *PpSB1*-LOV zu einer 23-fachen bzw. 417-fachen Beschleunigung der Dunkelrückkehr ($\tau_{\text{rec}} \sim 109$ min bzw. $\tau_{\text{rec}} \sim 6$ min bei 20 °C) führt [112]. Eine *PpSB1*-LOV R61H/R66I Doppelmutante besitzt sogar eine 280-fach beschleunigte Dunkelrückkehr ($\tau_{\text{rec}} = 9$ min bei 20 °C) [134].

1.3.2.3. *Avena sativa* AsLOV2

Eine der am besten untersuchten LOV-Domänen ist die LOV2-Domäne des Vollllängen Photorezeptorproteins Phototropin-1 (*AsPhot1*) aus Hafer (*Avena sativa*) (*AsLOV2*). *AsPhot1* besitzt zwei N-terminale LOV-Domänen (LOV1 und LOV2, Abbildung 3) und eine C-terminal fusionierte Serin/Threonin-Kinase als Effektordomäne (1.2.1, Abbildung 11) [172]. Frühere Studien haben gezeigt, dass *AsPhot1* nach der Beleuchtung mit Blaulicht eine Autophosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase erfährt [173], was wiederum die in 1.2.1 beschriebenen physiologischen Funktionen auslöst. Während LOV1 die Rezeptordimerisierung vermittelt und die Photoreaktivität von LOV2 moduliert [80, 89, 174, 175], ist LOV2 essentiell für die Autophosphorylierung der Kinasedomäne und somit für die Photorezeptorfunktion von *AsPhot1* [87, 176]. In den Kapiteln 1.2.1, 1.2.3 und 1.3.1 wurden bereits ausführlich die Funktion und Bedeutung von pflanzlichen Phototropinen, der konservierte Photozyklus [141, 177] sowie lokale Strukturänderungen beschrieben. Im Folgenden sollen die globalen Strukturänderungen näher betrachtet werden, die für die Signalweiterleitung zwischen Sensor und Effektordomäne von Bedeutung sind. Frühe NMR spektroskopische Analysen, welche später auch durch röntgenkristallographische Untersuchungen bestätigt werden konnten, haben gezeigt, dass *AsLOV2* kurze α -helikale Strukturelemente (A' α - und J α -Helix) an den N- und C-terminalen Enden der konservierten LOV-Sensordomäne besitzen [126]. Im Lichtzustand erfährt die amphipathische J α -Helix,

welche den C-Terminus der LOV2-Domäne flankiert, eine strukturelle Veränderung [126, 127]. Die $J\alpha$ -Helix ist 20 Aminosäurereste lang, mäßig flexibel, befindet sich auf der lösungsmittel-exponierten Seite der $G\beta$ -, $H\beta$ - und $I\beta$ -Stränge (hydrophobe und polare Flächen) des zentralen β -Faltblattgerüsts und liegt somit direkt unterhalb des FMN-Chromophors.

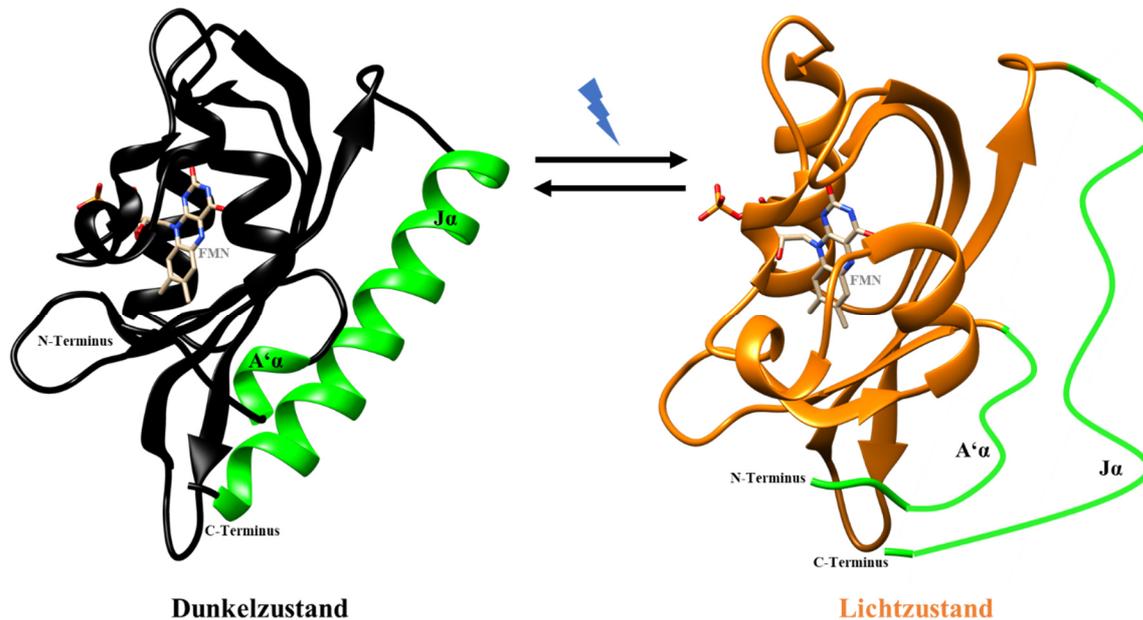


Abbildung 11: Cartoonmodell der lichtabhängigen Strukturänderung der *As*LOV2-Domäne. Dargestellt ist die LOV2-Domäne des Phototropins-1 aus *Avena sativa* mit der LOV2-Domäne im Dunkel- (PDB-ID: 2V1A; linke Seite, Schwarz) und Lichtzustand (rechte Seite, Orange). Des Weiteren sind die am N- und C-Terminus lokalisierten kurzen α -helikalen Strukturelemente $A'\alpha$ und $J\alpha$ gekennzeichnet (Grün). Die Beleuchtung mit blauem Licht (blauer Blitz) induziert eine Entfaltung der $A'\alpha$ - und $J\alpha$ -Helices im Lichtzustand (schematisch in Grün dargestellt). Der FMN-Chromophor ist als Stäbchenmodell dargestellt: Rot (Sauerstoff), Blau (Stickstoff), Gelb (Kohlenstoff) und Orange (Phosphor).

Der amphipathische Charakter der $J\alpha$ -Helix erlaubt eine Faltung über dem β -Faltblatt neben dem N-terminalen Turn-Helix-Turn-Motiv [125, 126]. So können bestimmte Reste ein Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der $J\alpha$ -Helix und der LOV2-Domäne ausbilden, welches auf eine direkte Interaktion zwischen dem N-terminalen Turn-Helix-Turn-Motiv und der C-terminalen $J\alpha$ -Helix mit der LOV-Kerndomäne hinweist. NMR Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Beleuchtung mit Blaulicht zu weitreichenden Änderungen der chemischen Verschiebungen des Rückgrats und einiger Seitenketten führt. Die damit verbundenen strukturellen Veränderungen breiten sich durch die Domäne aus und beeinflussen so die Struktur der $J\alpha$ -Helix, welche bei Beleuchtung von der LOV-Domäne dissoziiert und sich entfaltet. Außerdem erfährt auch die $A'\alpha$ -Helix eine lichtinduzierte Konformationsänderung. Die $A'\alpha$ -Helix steht in Kontakt mit der $J\alpha$ -Helix und liegt ebenfalls gefaltet im Dunkelzustand bzw. entfaltet im Lichtzustand vor [125, 140]. Studien unterstützen zudem die Auffassung,

dass die lichtinduzierte Konformationsänderung der A' α -Helix die Entfaltung der *As*LOV2 J α -Helix fördert und dass die Unterbrechung bzw. Stabilisierung der A' α -Helix sich auf das „Abdocken“ der J α -Helix auswirkt [140]. Einerseits ist die Konformationsänderung der A' α -Helix unabhängig von der Anwesenheit der J α -Helix, andererseits kann keine Konformationsänderung in der J α -Helix stattfinden, wenn die A' α -Helix entfernt wurde [140, 178]. Mit einer Adduktlebenszeit von $\tau_{\text{rec}} = 55\text{-}81$ s besitzt die *As*LOV2 Domäne eine schnelle Dunkelrückkehr [141, 177]. Im Hinblick auf Struktur und Funktion, verbunden mit einer Vielzahl an Mutagenesestudien [112, 134, 143, 179, 180], die zum „Tuning“ der Dunkelrückkehr von *As*LOV2 durchgeführt wurden, gehört das Protein zu den am Besten charakterisierten LOV-Domänen.

Während die Mechanismen der Adduktbildung sowie die strukturellen Änderungen bei der Ausbildung des Lichtzustandes relativ gut untersucht sind, ist bisher nichts zu strukturellen Änderungen während der Dunkelrückkehr bekannt [181]. Insbesondere stellt sich die Frage nach potenziellen Intermediaten und dem Einfluss der Proteindynamik auf den Prozess.

1.4. LOV-Proteine als Werkzeuge der Optogenetik und Bildgebung

Die Optogenetik ist ein junges Forschungsgebiet, welches vor einigen Jahren aus der Neurowissenschaft hervorgegangen ist und sich nun aus unterschiedlichen Methoden der Optik, Biologie und Genetik zusammensetzt. In der Regel werden Photorezeptoren als licht-sensitive, genetisch-kodierte Systeme in der Optogenetik als „Schalter“ für biologische Prozesse eingesetzt. Durch die Kombination aus genetischen und optischen Methoden können optogenetische Werkzeuge zur lichtinduzierten Kontrolle von exakt definierten Ereignissen in Zellen, Geweben oder Lebewesen verwendet werden [62, 182]. Gleichzeitig können einige von Photorezeptoren abgeleitete Systeme auch als biophotonische Werkzeuge bezeichnet, als Fluoreszenzreporterproteine zur Visualisierung zellulärer Vorgänge oder Strukturen eingesetzt werden [62, 177, 183]. Einige dieser Varianten können zudem, aufgrund ihrer Eigenschaft reaktive Sauerstoffspezies (Engl. *reactive oxygen species*, ROS) zu erzeugen, für das irreversible Ausschalten zellulärer Funktionen genutzt werden [184].

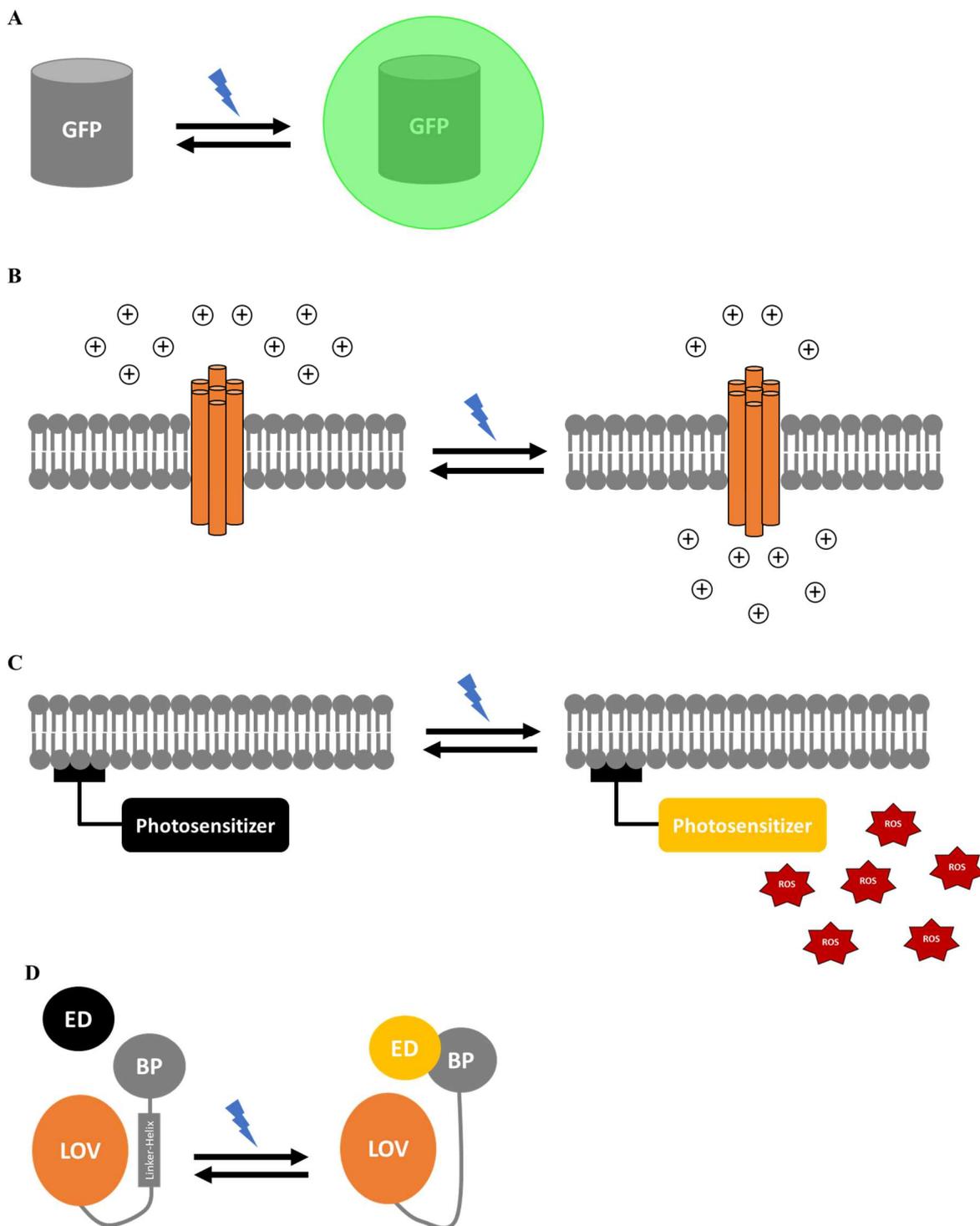


Abbildung 12: Schematische Darstellung ausgewählter optogenetischer Kontrollstrategien. Abbildung A illustriert das Fluoreszenzprotein GFP, welches bei Beleuchtung (blauer Blitz) grün fluoresziert. In Abbildung B dargestellt ist die Funktion des Kanalrhodopsin Photorezeptors (orange), der bei Beleuchtung (blauer Blitz) Ionen durch die Membran transportiert. Abbildung C zeigt einen Photosensitizer, der bei Beleuchtung (blauer Blitz) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugt. In Abbildung D ist die Aktivierung einer Effektor-domäne (ED) dargestellt. Im Dunkelzustand (ED schwarz) ist die Effektor-domäne nicht an die LOV-Domäne angedockt und ist unfähig mit ihrem Bindungspartner (BP; ein weiteres Protein) zu interagieren. Die Beleuchtung mit Blaulicht (blauer Blitz) führt zu einer Freisetzung der Effektor-domäne (ED gelb) und letztendlich zur Interaktion mit dem Bindungspartner.

Der große Vorteil optogenetischer Werkzeuge ist hierbei die hohe räumliche und zeitliche Auflösung, die bei der Kontrolle und Visualisierung biologischer Prozesse erreicht werden kann [62, 185-187]. Der Anwendungsbereich optogenetischer Werkzeuge erstreckt sich dabei über das gesamte Spektrum der Lebenswissenschaften, von der Neuro-, Zell-, Molekular- bis hin zur Verhaltensbiologie und Histologie. Abbildung 12 zeigt eine exemplarische Übersicht über optogenetische Strategien zur Visualisierung und Kontrolle biologischer Prozesse, welche in den folgenden Kapiteln detaillierter beschrieben werden.

1.4.1. Kanalrhodopsine als erste optogenetische Anwendung

Die Grünalge *C. reinhardtii* besitzt zwei Rhodopsin Photorezeptoren (1.1), Kanalrhodopsin-1 und -2 (Engl.: *Channelrhodopsin-1* (ChR1) und *Channelrhodopsin-2* (ChR2)) (Abbildung 12 B) [188, 189]. Die Kernregion des Kanalrhodopsins besteht aus sieben Transmembranhelices, welche eine 15-20%ige Sequenzähnlichkeit zu Bakteriorhodopsin sowie zu den sensorischen Rhodopsinen aus Archaea aufweist [190]. Interessant dabei sind die konservierten Aminosäuren, die die Retinalbindungsstelle und das Protonen transportierende Netzwerk definieren [191, 192]. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass ChR1 und ChR2 als direkte lichtabhängige Ionenpumpen fungieren [188, 189]. Die Aktivierung von ChR1 führt zu einer geänderten Protonenleitfähigkeit der Zellmembran, wobei die Richtung der induzierten Photoströme nicht limitiert, sondern von der elektrischen Spannung und dem Protonengradienten abhängig ist [188]. ChR2 hingegen verändert seine Konformation bei Aktivierung mit Licht und zeigt eine hohe Permeabilität für Protonen sowie für einwertige und zweiwertige Kationen [189]. Diese Eigenschaft macht ChR2 vor allem für die Neurowissenschaften für die nicht-invasive Kontrolle elektrisch erregbarer Zellen, wie Neuronen, interessant. So kann ChR2 in den Neurowissenschaften eingesetzt werden, um über kurze Lichtimpulse Aktionspotentiale in elektrisch erregbaren Zellen auszulösen [193]. Es wurde z.B. gezeigt, dass sogar ganze Organismen, z.B. durch Aktivierung der Motorneuronen oder Muskelzellen, wie in den Fällen von Mäusen und des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* mithilfe von ChR2 beeinflusst/kontrolliert werden können [194]. Heute existiert ein breites Spektrum an Rhodopsin-basierten Tools für optogenetische Anwendungen in den Lebenswissenschaften [195], sodass im Rahmen dieser Arbeit nicht auf alle Anwendungsfelder eingegangen werden kann.

1.4.2. Fluoreszenzproteine, Photosensitizer und optogenetische Schalter

1.4.2.1. Fluoreszenzproteine als Werkzeuge zur Visualisierung biologischer Prozesse

Das als erstes identifizierte, natürlich vorkommende Fluoreszenzreporterprotein (Abbildung 12 A) ist das grünfluoreszierende Protein GFP (Engl. *green fluorescencet protein*), isoliert aus der Qualle *Aequorea victoria*, welches bei der Beleuchtung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert [196, 197]. GFP und dessen Derivate, sowie verwandte Proteine anderer Spezies, welche in diversen Farben fluoreszieren können, werden für die Identifikation von Knock-out-Mutanten, für Promotoraktivitätsstudien, zur Analyse von Biosynthesewegen, als Biosensoren, zur Markierung von Zellkompartimenten und zur Lokalisierung von Proteinen verwendet, um nur einige Anwendungsfelder zu nennen [62, 196-198]. Des Weiteren wurden auch aus LOV-Domänen fluoreszierende Proteine entwickelt. Dazu hat die Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Drepper, basierend auf LOV-Domänen Flavin-Fluoreszenzreporterproteine (FbFPs) generiert, deren Vorteil, im Gegensatz zu GFP, darin besteht, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von molekularem Sauerstoff eingesetzt werden zu können [186]. Diese FbFPs wurden aus den LOV-Photorezeptoren *PpSB2-LOV* aus *P. putida* und *YtvA* aus *B. subtilis* entwickelt [72, 113]. Sie zeichnen sich neben ihrer Sauerstoffunabhängigkeit auch durch ihre geringe Größe (~10-15 kDa) aus. Wie in pflanzlichen Phototropinen durchlaufen auch *YtvA* und *PpSB2-LOV* einen konservierten LOV-Photozyklus (1.2.3) und weisen eine schwache intrinsische Autofluoreszenz auf [72, 113, 136]. Um eine Verbesserung dieser natürlich schwachen Fluoreszenz hervorzubringen, kann der konservierte FMN-bindende Cysteinrest durch ein Alanin ersetzt werden. Da Alanin im Gegensatz zu Cystein keine kovalente Bindung mit dem FMN-Chromophor ausbilden kann, erfolgt bei Anregung mit Blaulicht lediglich eine Anregung des FMN-Chromophors in den ersten angeregten Singulettzustand (S_1) (1.2.3, Abbildung 5) sowie ein Übergang eines Teils der angeregten Moleküle in den Triplettzustand (1.2.3, Abbildung 5). Ausgehend von S_1 wird ein Teil der aufgenommenen Energie in Form von Fluoreszenz bei der Rückkehr in den Grundzustand (S_0 , Abbildung 5) abgegeben. Da in einem so veränderten LOV-Protein kein FMN-Protein Addukt mehr ausgebildet werden kann, wird so ein größerer Teil der Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz wieder abgegeben, was zu einer (bis zu zehnfach) verstärkten Fluoreszenz führt [186]. Die geringe Größe von LOV-Domänen (~10-15 kDa) und ihre Unabhängigkeit von Sauerstoff sind dabei von großem Interesse [62]. Neben den bakteriellen FbFPs basierend auf *YtvA* und *PpSB2-LOV* ist das photoreversible FbFP Protein *iLOV*, ein bekanntes pflanzliches FbFP, welches aus der LOV2-Domäne des Phototropins *Phot2* von *A. thaliana* (*AtPhot2*) entwickelt wurde und aufgrund seiner geringen Größe kann

es als Reporter in einem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierten Biosensor [199] für die Mehrfarbenbildgebung [200] oder für die Analyse von Infektion und Ausbreitung des Tobacco Etch Mosaic Virus (TMV) in *Nicotiana tabacum* eingesetzt werden [201]. iLOV, analog zu bakteriellen FbFPs, trägt hierbei eine Mutation des photoaktiven, adduktbildenden Cysteins (C426A), wurde jedoch mittels DNA-Shuffling mit anderen LOV-kodierenden Sequenzen optimiert, sodass es verbesserte Eigenschaften wie eine erhöhte Fluoreszenz und Stabilität besitzt [201].

Ein weiteres Photorezeptorprotein, das häufig zur Visualisierung biologischer Prozesse verwendet wird, ist der Photorezeptor Phytochrom (1.1). Dieses wird als Fluoreszenzreporter im roten und fernroten sowie im Infrarotbereich zur Entwicklung neuer Biosensoren aber auch in bildgebenden Verfahren eingesetzt [202, 203].

1.4.2.2. Fluoreszenzreporter als Photosensitizer

In den letzten Jahren wurden GFP- und FbFP-Derivate ebenfalls als sog. Photosensitizer etabliert (Abbildung 12 C) [204]. Photosensitizer erzeugen bei Beleuchtung reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), wie z.B. Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) [184, 204]. Ihre Anwendungsmöglichkeiten sind vielfältig, so können sie beispielsweise in der Medizin bei der Tumorbehandlung, zur Fluoreszenzdiagnostik oder in photodynamischen Therapien verwendet werden [79, 205-207]. Hier dienen Photosensitizer als lichtempfindliche Farbstoffe zur Visualisierung von Tumoren in Gewebestrukturen oder zur lichtabhängigen Produktion von ROS. Die Bildung von ROS erfolgt hierbei durch einen Energietransfer im Triplettzustand, dies wiederum löst eine Redox-Kaskade aus, bei der verschiedene ROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2) entstehen. ROS können sich hierbei schädigend auf biologische Makromoleküle wie Proteine, Lipide und DNA auswirken [208], wodurch genetisch kodierte Photosensitizer als optogenetische Werkzeuge zur irreversiblen Inaktivierung von Proteinen oder Zellen eingesetzt werden können.

1.4.2.3. Photorezeptoren als reversible optogenetische Schalter

Außer als Reporter und Photosensitizer wurden photoaktive LOV-Sensordomänen auch als Schalter (Abbildung 12 D) zur Konstruktion optogenetischer Werkzeuge eingesetzt. Ihre Funktionalität beruht hierbei auf der Fähigkeit der jeweiligen LOV-Photorezeptoren eine lichtabhängige Strukturänderung an ein fusioniertes Effektorprotein weiterzuleiten. Die ersten

künstlich erzeugten LOV-basierten optogenetischen Schalter waren die lichtabhängige LOV-Histidin-Kinase YF1, das photoaktivierbare Tryptophan-Repressor-Protein LovTAP oder die lichtabhängige GTPase PaRac1 [209]. Letzteres wurde durch Fusion von *AsLOV2* mit $J\alpha$ als Interdomänen-Linker an die GTPase Rac1 erzeugt und macht so das Protein durch Licht regulierbar [210]. Im Dunkelzustand wird das fusionierte Rac1 sterisch durch die LOV-Domäne gehemmt und blockiert so die Interaktion mit Rac1 „downstream“ Effektorproteinen. Bei Beleuchtung mit Blaulicht dissoziiert die $J\alpha$ -Helix (1.2.2) von der LOV-Domäne und gibt so Rac1 „frei“ wodurch dessen „Aktivität“ erhöht wird. Das System wurde z.B. zur Regulation der Mobilität von Fibroblasten verwendet. Mittlerweile wurde das System weiter adaptiert und wird inzwischen auch zur Steuerung von Bewegungen in anderen Zelltypen verwendet [211]. Der am besten untersuchte, für optogenetische Anwendungen am häufigsten eingesetzte LOV-Photorezeptor ist hierbei *AsLOV2* [212-214], wobei auch andere LOV-Photorezeptoren wie z.B. *RsLOV* [215] und Aureochrome [216] eingesetzt werden. Neben bakteriellen und pflanzlichen LOV-Photorezeptoren werden zudem auch LOV-Photorezeptoren aus Pilzen als optogenetische Schalter verwendet. So werden z.B. VVD und White Collar-1 (WC-1) aus *N. crassa* [95, 96, 217] zur Kontrolle von Genexpression und Proteininstabilität eingesetzt. Heute finden sich LOV-Sensordomänen basierte optogenetische Schalter für ein breites Feld an Anwendungen in allen Bereichen der Lebenswissenschaften. So werden diese z.B. zur lichtabhängigen Kontrolle von Ionenkanälen, zur Steuerung verschiedener zellulärer Prozesse, der Rekonstitution von Proteinaktivitäten zur lichtabhängigen Proteinlokalisierung, für eine lichtabhängige Genexpression und zur Kontrolle der Proteolyse eingesetzt [218-224]. BLUF-Photorezeptoren (1.1) können ebenfalls als optogenetische Schalter verwendet werden. BLUF-Domänen sind für ihre geringe Größe, Reversibilität und Löslichkeit bekannt [225]. Sie werden bevorzugt als optogenetische Werkzeuge zur lichtinduzierten Manipulation von Zellen in Gewebe verwendet. Beispielsweise werden BLUF-Photorezeptoren aus *Beggiatoa sp.* für die Aktivierung von zyklischen Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle in Neuronen eingesetzt [226]. Der Photorezeptor Phytochrom (1.1) findet neben seiner Anwendung als Fluoreszenzprotein (1.4.2.1) auch als optogenetischer Schalter Verwendung. Beispielsweise kann mit ihm eine präzise räumliche und zeitliche Kontrolle der Genexpression in *Drosophila* erreicht werden [227]. Diese und zahlreiche weitere Beispiele [228-230] verdeutlichen das große Interesse an LOV-basierten optogenetischen Werkzeugen in den Lebenswissenschaften. Obgleich natürlich vorkommende LOV-basierte optogenetische Werkzeuge interessante Eigenschaften besitzen, werden dennoch Ansätze zu ihrer Verbesserung oder Weiterentwicklung benötigt,

um z.B. Eigenschaften wie die Sensitivität, die Hintergrundaktivität im Dunkeln, An/Aus Zeiten usw. zu modifizieren und an die jeweilige Anwendung anzupassen.

1.5. Veränderung der Eigenschaften von LOV-basierten optogenetischen Werkzeugen

Wie bereits in Kapitel 1.4.2 erwähnt, können Fluoreszenzreporter sowie optogenetische Schalter für die Bildgebung und/oder optogenetische Steuerung verwendet werden. Dabei ist es unerlässlich, die Eigenschaften von LOV-basierten optogenetischen Werkzeugen zu verstehen, um ihre Eigenschaften künstlich für die Erzeugung verbesserter optogenetischer Werkzeuge verändern zu können. Viele Studien wurden bereits zur Veränderung oder Optimierung von optogenetischen Werkzeugen durchgeführt. Ein Beispiel hierfür ist die Veränderung der spektralen Eigenschaften von Fluoreszenzreporterproteinen wie GFP. So existieren für GFP und verwandte Proteine (1.4.2.1) mittlerweile viele Farbvarianten. Ein Beispiel ist hier das gelb fluoreszierende Protein YFP (*yellow fluorescent protein*), welches die Mutationen T203Y/S65G/V68L sowie S72A trägt, was eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums von GFP in den gelben Spektralbereich zur Folge hat [231]. Dabei verändert sich das Absorptionsmaximum von 395 auf 513 nm und das Emissionsmaximum von 508 auf 527 nm [196, 232]. Der Austausch von Threonin zu Tyrosin (T203Y) ist hierbei maßgeblich für die Rotverschiebung verantwortlich, während die anderen drei Mutationen zu einer verbesserten Helligkeit von YFP gegenüber GFP in lebenden Zellen führen [233]. Heutzutage bilden GFP und seine Farbderivate das Fundament der *in-vitro* Fluoreszenzmarkierung und der *in-vivo* Bildgebung und spielen eine große Rolle in der Analyse zellulärer Prozesse sowie ihrer Anwendungen [234, 235]. Im Gegensatz dazu ist der Einsatz von FbFPs (1.4.2.1), d.h. auf LOV-Proteinen basierenden Fluoreszenzreporterproteinen, weniger weit verbreitet, wobei diese jedoch einige Vorteile im Vergleich zu GFP bieten (1.4.2.1) [186, 201]. Im Gegensatz zu GFPs absorbieren und emittieren FbFPs bei einer Wellenlänge von 450 respektive 495 nm [186]. Eine der wenigen zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannten blauverschobenen FbFP Varianten ist die Q116V Variante des *PpSB2*-FbFP, deren Absorptions- und Emissionsmaxima bei 439 bzw. 485 nm liegen [200]. Neben bakteriellen FbFPs wurde auch für das pflanzliche FbFP iLOV (1.4.2.1) eine blauverschobene Variante, iLOV-Q489K, beschrieben, welche Absorptions- und Emissionsmaxima bei 440, respektive 489 nm aufweist [199]. Das Fehlen von Farbvarianten, insbesondere von rotverschobenen, ist hierbei der entscheidende Nachteil der FbFPs

gegenüber den GFPs, da solche Varianten notwendig wären, um z.B. gleichzeitig Gewebestrukturen markieren zu können. Darüber hinaus wurde zudem nach photostabileren iLOV-Varianten gesucht, die einen Vorteil gegenüber dem wildtypischen iLOV besitzen. Diese verbesserte photostabilere Variante wurde als phiLOV bezeichnet [236], und besitzt im Vergleich zu iLOV eine 10-fach höhere Photostabilität und ist zudem 100% photoreversibel [201, 236].

Neben LOV-basierten Fluoreszenzreportern können LOV-Sensordomänen wie oben erwähnt auch als Schalter für eine optogenetische Steuerung verwendet werden. Eine Möglichkeit, die Schaltbarkeit der Sensordomäne zu verändern, ist den Photozyklus zu modulieren. Dies kann rational bzw. strukturell basiert durch gezielte Mutationen oder zufällig durch Screening geschehen. So sind z.B. Varianten mit einer langsamen Dunkelrückkehr sensitiver, während diese keine hohe Zeitauflösung ermöglichen (langsame Rückkehr in den Dunkelzustand). Im Gegensatz dazu wird für eine vollständige Aktivierung von LOV-Varianten mit schneller Dunkelrückkehr mehr Licht benötigt, gleichzeitig können diese Systeme jedoch nach kurzer Zeit erneut angeregt werden. Um diese Problematik zu adressieren, haben Kawano *et al.* mithilfe eines speziell entwickelten Hochdurchsatz-Screening-Systems und Zufallsmutagenese nach LOV- Photorezeptoren mit einer schnelleren Abschaltkinetik (schnellere Dunkelrückkehr) gesucht [177]. Dieses Screening-System basiert auf Zeitrafferaufnahmen von Agarplatten. Hierzu wurden Agarplatten mit Klonen einer Variantenbibliothek beleuchtet und die Rückkehr der Fluoreszenz des Flavin-Chromophors als Signal für die thermische Reversion, d.h. die Dunkelrückkehr genutzt. So konnten neue Photorezeptoren mit einer schnelleren Abschaltkinetik/Dunkelrückkehr generiert werden, die eine verbesserte Steuerung zellulärer Prozesse mit höherer räumlicher und zeitlicher Auflösung erlauben. Manche *AsLOV2*-basierte optogenetische Schalter besitzen zudem nur einen geringen dynamischen Bereich, d.h. sie zeigen einen geringen Unterschied zwischen Aktivität im Licht- und Dunkelzustand, was auf ein LOV/ α Docking/Undocking Gleichgewicht zurückzuführen ist [210, 214, 237]. Strickland *et al.* haben eine Methode gefunden, die den dynamischen Bereich eines solchen Photoschalters erweitern kann [238] indem sie die α -„gedockte“ Konformation (Dunkelzustand) bzw. die α -„ungedockte“ Konformation (Lichtzustand) gezielt mittels Mutagenese stabilisieren. Hierzu wurden Mutationen in die α -Helix und den interagierenden Bereich der LOV-Domäne eingebaut und so der dynamische Bereich um das 70-fache vergrößert.

All diese Studien unterstreichen die Notwendigkeit, die Eigenschaften von LOV-basierten optogenetischen Werkzeugen zu verändern, um Varianten mit verbesserten oder erweiterten

Eigenschaften zu generieren. Dies kann z.B. durch rationale Methoden und durch ortsgerichtete Mutagenese erreicht werden (s.o.) oder durch Zufallsmutagenese bzw. Sättigungsmutagenese, gekoppelt mit Methoden der gerichteten Evolution und einem Hochdurchsatzscreening (1.5.1). Da diese Methoden in dieser Arbeit von Bedeutung sind, soll im folgenden Abschnitt ein kurzer Überblick über diese Thematik gegeben werden.

1.5.1. Gerichtete Evolution und Sättigungsmutagenese

Es gibt viele unterschiedliche Methoden zur Modifizierung der Eigenschaften von Proteinen, wie z.B. die gerichtete Evolution, semi-rationales Design mittels Sättigungsmutagenese, rationales Proteindesign mittels ortsgerichteter Mutagenese oder *ab initio computational* Design [239]. In diesem Kapitel wird auf zwei dieser Methoden, da sie in dieser Arbeit Anwendung finden, näher eingegangen: die gerichtete Evolution und das semi-rationale Design mittels Sättigungsmutagenese.

Die gerichtete Evolution (Abbildung 13) dient der *in-vitro* Optimierung von Enzymen, Nukleinsäuren und Proteinen [240-242]. Sie wird hauptsächlich in der weißen Biotechnologie und der Biokatalyse zur Verbesserung der industriellen Anwendbarkeit von Enzymen, eingesetzt. Häufig beziehen sich diese Optimierungen auf die Lösungsmittel-/Temperaturstabilität, Regioselektivität, Chemoselektivität, Enantioselektivität bzw. auf die Substratspezifität von Enzymen. Das Verfahren der gerichteten Evolution wird häufig dann verwendet, wenn neue Enzyme, für die es noch keine Strukturdaten gibt, verbessert werden sollen, bzw. wenn der molekulare Mechanismus der zu verbessernden Eigenschaft unklar ist. Der erste Arbeitsschritt bei einem gerichteten Evolutionsansatz ist die Erzeugung einer Mutantenbibliothek, welches häufig durch PCR-basierte Methoden (z.B. fehlerhafte PCR, Engl. *error-prone*-PCR) oder durch DNA-Shuffling erhalten wird [243, 244]. Anschließend erfolgt eine Expression der Mutantenbibliothek im Hochdurchsatzformat, gefolgt von einem Screening auf verbesserte Varianten mittels Hochdurchsatz-Screening-Methoden (z.B. FACS (1.5.2) oder Agarplatten-Assays) [245]. Diese Arbeitsschritte werden dabei so häufig wiederholt bis das gewünschte optimierte Enzym/Protein erhalten wurde [246].

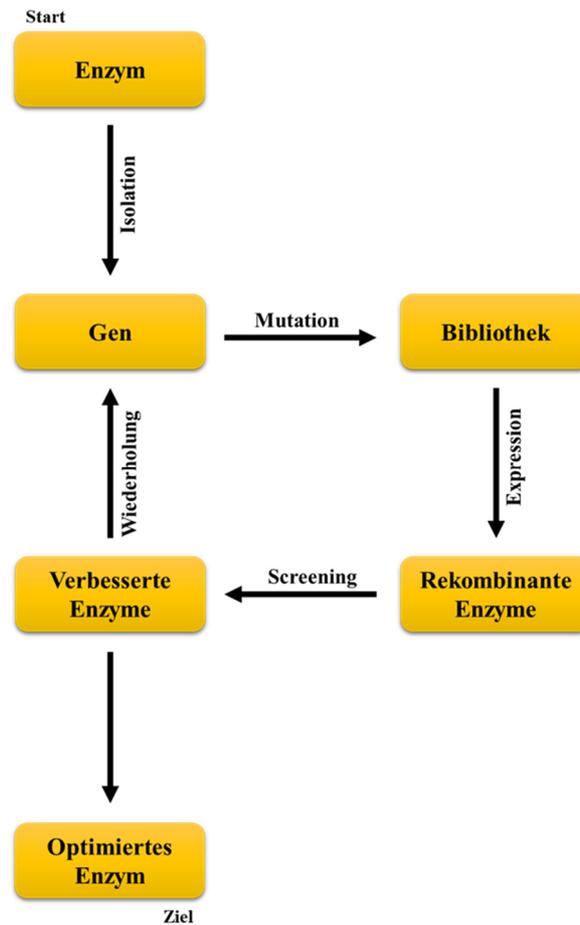


Abbildung 13: Schema zur Veranschaulichung eines gerichteten Evolutionsansatzes. Die gerichtete Evolution beginnt mit der Isolation eines gewünschten Gens aus einem Enzym und der Erzeugung einer Mutantenbibliothek. Die mutierten Gene werden isoliert und in einem Modellorganismus exprimiert. Anschließend werden die rekombinanten Enzyme mithilfe von Screening-Methoden auf verbesserte Eigenschaften untersucht. Enzyme mit unbefriedigenden Eigenschaften werden verworfen, während Enzyme mit potenziell verbesserten Eigenschaften behalten werden. Diese Arbeitsschritte werden solange wiederholt, bis ein optimiertes Enzym gefunden wurde.

Das semi-rationale Design mittels Sättigungsmutagenese basiert auf Methoden der gerichteten Evolution, wobei dieser Ansatz bereits verfügbares Wissen aus vergangenen Experimenten zur rationalen Begrenzung der Mutantenbibliothek nutzt [247]. Dadurch können kleinere Mutantenbibliotheken generiert werden, bei denen die Wahrscheinlichkeit erhöht ist das gewünschte optimierte Enzym zu erhalten [248, 249]. Während also bei einer *error-prone*-PCR Mutationen an zufälligen Positionen des Gens eingefügt werden, wird bei einem semi-rationalen Ansatz mittels Sättigungsmutagenese eine oder mehrere Positionen gezielt „gesättigt“ wobei die entsprechende Aminosäure durch alle möglichen anderen Aminosäuren ausgetauscht wird [249-251]. Hierbei werden die Zielpositionen mittels sog. degenerierter Oligonukleotidprimer mutiert, die ein degeneriertes Codon an der Zielposition (NNK; N = beliebiges Nukleotid, K = G oder T) tragen. Das Verfahren findet als

semirationale Methode des Protein-Engineerings vor allem dann Anwendung, wenn die Zielpositionen rational ausgewählt werden können (z.B. alle Positionen in der Nähe des aktiven Zentrums eines Enzyms), eine rationale Voraussage der einzufügenden Mutation jedoch nicht möglich ist.

Während der Einsatz dieser Methoden für die Optimierung von Enzymen weitverbreitet ist, wurden Methoden der gerichteten Evolution bisher nur vereinzelt für die Verbesserung/Anpassung der Eigenschaften LOV-basierter optogenetischer Schalter und FbFPs eingesetzt. Dies beruht höchstwahrscheinlich auf der Tatsache, dass für die Veränderung der Eigenschaften dieser Proteine besondere Herausforderungen existieren, welche im folgenden Kapitel erläutert werden sollen.

1.5.2. Herausforderungen des Tunings von LOV-Photorezeptoren mittels gerichteter Evolution

Für eine Anpassung der spektralen Eigenschaften von FbFPs wie iLOV, d.h. für die Erzeugung von Farbvarianten, besteht das Hauptproblem in der Tatsache, dass der FbFP Chromophor FMN nicht durch Mutagenese verändert werden kann, wie es z.B. bei GFP der Fall ist. Im Fall von GFP wird der Chromophor autokatalytisch aus drei Aminosäuren gebildet, welche für die Erzeugung von verschiedenen Farbvarianten (z.B. YFP) mutiert werden können (1.5). Es besteht im Fall von FbFPs also lediglich die Möglichkeit Aminosäurereste in der Umgebung des Chromophors (Bindetasche) zu mutieren, um beispielsweise eine blauverschobene Variante (iLOV-Q489K) zu generieren [199]. Wie aktuelle Studien gezeigt haben, sind für die Erzeugung einer rotverschobenen iLOV-Variante nicht eine, sondern mindestens zwei Mutationen notwendig [252]. Im Fall der rotverschobenen iLOV-Q489K/V392T Variante interagiert das eingefügte Lysin im Fall der Einzelmutation (Q489K) nicht direkt mit dem FMN-Chromophor in der Bindetasche, sondern muss mithilfe einer zweiten Mutation (V392T) in der Bindetasche stabilisiert werden, was zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums führt [252]. Durch diese Kombination kann im Fall von iLOV, aus einer blauverschobenen Variante (iLOV-Q489K) eine rotverschobene (iLOV-Q489K/V392T) erhalten werden. Für die Erzeugung weiterer Farbvarianten muss bedacht werden, dass genau diese beiden Positionen (Q489 und V392) gleichzeitig gesättigt werden müssen und ggf. eine dritte Position (G487) randomisiert werden sollte, da diese ebenfalls eine Rotverschiebung zur Folge hat [253]. Aus dieser Tatsache ergeben sich so

beispielsweise für iLOV, im Fall einer randomisierten Dreifachvariante entsprechend folgender Formel $1,7 \times 10^9$ Varianten, die gescreent werden müssten:

Formel 1: Formel zur Berechnung der Größe einer Mutantenbibliothek. Die vorliegende Formel wurde von Frances Arnold etabliert [254]. N gibt die Anzahl aller möglichen Varianten an, M steht für die Anzahl der zu randomisierten Stellen und X repräsentiert die Anzahl der Aminosäuren im Protein. Im Beispiel von iLOV gilt nun folgendes: M = 3 zu randomisierende Stellen und X = 115 Aminosäuren im Protein.

$$N = \frac{19^M * X!}{[(X - M)! * M!]}$$

Der experimentelle Aufwand all diese Varianten mit Mikrotiterplatten-basierten Screening-Methoden zu analysieren wäre also enorm. Daher ist es unumgänglich auf Ultra-Hochdurchsatz-Screening-Methoden zurückzugreifen. Eine solche Methode, welche für das Screening von FbFP Farbvarianten anwendbar wäre, ist das *Fluorescence-Activated-Cell-Sorting* (FACS), welches 1968 von Wolfgang Göhde an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster entwickelt wurde [255, 256]. Die FACS-Methode ist ein Messverfahren, welches zur Analyse von Zellen bei hoher Geschwindigkeit in einem Flüssigkeitsstrom verwendet wird [257]. Die Zellen passieren hierbei sehr schnell einen Laserstrahl mit dessen Hilfe spezifische Fluorophore angeregt werden. Das Screening beruht auf der Fluoreszenzmission der zu untersuchenden Zellen, wobei mithilfe von FACS-Geräten jede einzelne Zelle nacheinander gemessen und anschließend in Mikrotiterplatten sortiert werden kann. So können Zellen mit den gewünschten Eigenschaften sehr schnell und mit extremem Durchsatz identifiziert werden.

Bei Studien zur Veränderung der Dunkelrückkehr von LOV-Proteinen besteht das Hauptproblem für die Anwendung eines gerichteten Evolutionsansatzes darin, dass sehr viele Varianten gescreent werden müssten, entsprechende Experimente jedoch maximal in Mikrotiterplatten-Photometern oder mittels spezieller bildgebender Systeme möglich sind, sodass der Durchsatz an screenbaren Varianten moderat bleibt [177]. Gleichzeitig sind langsamere und schnellere Varianten aufgrund ihrer unterschiedlichen Kinetik, nicht gleich gut untersuchbar; aufgrund der langen Zeit, die ein Mikrotiterplatten-Photometer benötigt um eine komplette Platte zu messen, können schnell zurückkehrende Varianten z.B. gar nicht im Hochdurchsatz gemessen werden. Mit einem rationalen Ansatz ist es zudem oft eine Herausforderung, eine rationale Auswahl der Mutationen zu treffen, da die Datenlage oft begrenzt ist. Außerdem ist die Dunkelrückkehr ein langsamer Prozess und dauert selbst für die schnellsten Varianten mehrere Sekunden, sodass eine Simulation des Prozesses auf

Strukturebene, z.B. mittels Molekulardynamik-Simulationen nicht möglich ist [258]. Eine mögliche Lösung dafür wäre es, mithilfe von maschinellem Lernen (ML; 1.5.3) vorab die zu mutierenden Positionen mit den gewünschten Effekten vorherzusagen/herauszufiltern. Im Folgenden wird daher kurz auf den Einsatz von maschinellem Lernen im *Protein-Engineering* eingegangen.

1.5.3. Maschinelles Lernen

Um den experimentellen Aufwand eines Screenings z.B. mittels gerichteter Evolution zu reduzieren, erscheint die Methode des maschinellen Lernens (ML) besonders geeignet. Das maschinelle Lernen ist ein Teilgebiet der Computerwissenschaften und der künstlichen Intelligenz. Vereinfacht ausgedrückt wird ein sog. ML-Modell erzeugt und genutzt, um Voraussagen über eine Zieleigenschaft zu treffen. Die Voraussetzung für die Erzeugung eines ML-Modells ist ein geeigneter Trainingsdatensatz, welcher aus bereits vorhandenen Literaturdaten und/oder aus vorherigen experimentell gewonnenen Daten besteht [259]. Große komplexe Datensätze können dann mithilfe selbstlernender Algorithmen Korrelationen und/oder Regelmäßigkeiten erkennen und analysieren, um so Vorhersagen über unbeobachtete, versteckte oder begrenzte Daten treffen zu können [259]. Experimentell gestützt kann wie bei einem klassischen gerichteten Evolutionsansatz, zu Beginn eine Mutantenbibliothek erstellt werden. Anschließend werden durch Screening- oder Selektionsverfahren bzw. Testen der Varianten im Labor die neu generierten Varianten auf veränderte/verbesserte Eigenschaften geprüft. Diese Daten werden zum Trainingsdatensatz hinzugefügt und erneut Varianten vorausgesagt und getestet. Dieser Ansatz kann solange wiederholt werden bis das gewünschte Fitnessziel erreicht wurde [259]. Die ML-Methode ist vor allem dann der gerichteten Evolution vorzuziehen, wenn Energie, Zeit und Material limitiert sind. Die gerichtete Evolution benötigt ebenfalls mehrere Generationen um eine Optimierung zu erzielen, wobei mittels der ML-Methode der Screeningaufwand verringert werden kann. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass mit jeder Voraussage-/Screening-Runde, das ML-Modell verbessert werden kann, was zur Beschleunigung der Evolution und höheren Fitnesswerten führen kann [187]. Weitere Vorteile des maschinellen Lernens sind die niedrigeren Kosten, zumindest im Vergleich zu Robotik-gestützten Screeningverfahren [259, 260]. Zusätzliche Kosten entstehen hier nur durch die Aufwände für die Berechnungen (ML-Methoden sind sehr rechenintensiv) und DNA-Sequenzierungen.

Darüber hinaus können ML-Methoden verwendet werden, wenn die Proteinfunktion gar nicht oder nur unvollständig verstanden ist.

1.6. Zielsetzung

Nach wie vor ist die Verwendung von LOV-Sensordomänen als optogenetische Werkzeuge, als Fluoreszenzreporter, Photosensitizer und reversible optogenetische Schalter von großem Interesse. Um die entsprechenden Tools optimieren zu können ist jedoch ein detailliertes Verständnis der lichtinduzierten Photophysik, Photochemie und Signalweiterleitung, d.h. der strukturellen Änderungen während des Photozyklus unabdingbar. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Themengebiete bearbeitet:

Der erste Themenbereich befasst sich mit dem Verständnis des LOV-Photozyklus und der Dunkelrückkehr. Hierzu wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Schwaneberg (RWTH Aachen, M.Sc. Niklas Siedhoff) und Dr. Mehdi D. Davari (IPB Halle) basierend auf Literaturdaten für *AsLOV2* in einem ML-Ansatz Vorhersagen zu kombinatorischen Varianten mit veränderter (schnellerer bzw. langsamerer) Dunkelrückkehr getroffen, welche in dieser Arbeit experimentell validiert werden sollten (0). Mittels dieses Ansatzes wurde eine *AsLOV2*-Variante mit sehr schneller Dunkelrückkehr identifiziert, welche zusammen mit bereits beschriebenen Varianten des *DsLOV* Photorezeptors aus *D. shibae* zur Untersuchung der Bildung des reaktiven Triplettzustands und der Mechanismen der Adduktbildung herangezogen wurde. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Roger-Jan Kutta (Universität Regensburg) durchgeführt (3.2).

Das zweite Themengebiet dieser Arbeit war die Anpassung der spektralen Eigenschaften LOV-basierter Flavin-bindender Fluoreszenzproteine, d.h. die Erzeugung von FbFP Farbvarianten, wobei hier insbesondere semi-rationales Design mittels Sättigungsmutagenese sowie ein Ultrahochdurchsatz-Screeningansatz unter Verwendung von FACS (in Kooperation mit der AG Schwaneberg, M.Sc. Khalil Essani, Dr. Volkan Besirlioglu, Dr. Mehdi D. Davari (IPB Halle)) zur Anwendung kommen sollte (3.3).

In einem dritten großen Themengebiet sollten strukturelle und dynamische Änderungen während der Dunkelrückkehr des bakteriellen LOV-Photorezeptors *PpSB1-LOV* mittels verschiedener biophysikalischer Methoden untersucht werden, um neue Einblicke in die Dynamik und die strukturelle Signalweiterleitung in LOV-Photorezeptoren zu erhalten. Diese Arbeiten beruhen auf vorangegangenen Untersuchungen in Kooperation mit der

Arbeitsgruppe von Prof. Willbold (Dr. Marianne Schulte, Dr. Vineet Panwalkar) und wurden in Kooperation mit Dr. Andreas Stadler (JCNS-1/IBI-8, FZ-Jülich) durchgeführt (3.4).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.1.1.1. Bakterienstämme und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme (Tabelle 1) und Plasmide (Tabelle 2) verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Hersteller/ 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 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompThsdSB</i> (<i>rB⁻mB⁻</i>) <i>gal dem</i> (λ <i>ts857indl Sam7 nin5</i>) P _{lacUV5} -T7 <i>gene1</i>)	Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> CmpX131	Derivat von CmpX13, C41(DE3) <i>manX:ribM</i> Δ <i>ribC</i>	[261]
NEB 10-beta elektrokompetente <i>Escherichia coli</i> (#C3020K)	Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD139 fhuA</i> Δ <i>lacX74 galK16 galE15 e14-</i> ϕ 80 Δ <i>lacZM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>rph spoT1</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

Tabelle 2: Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET-28a(+)	<i>ColE1 lacZ'</i> Kan ^R P _{T7} P _{lac}	Novagen, Merck, Darmstadt, Deutschland
pET28a-AsLOV2	pET-28a(+); 444 bp <i>AsLOV2</i> Wildtyp Fragment aus pMA-RQ- <i>AsLOV2</i> ; NdeI/SalI kloniert	[129]
pET28a-AsLOV2-T406C	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -T406C (T406C: ACT>TGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-T406V	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -T406V (T406V: ACT>GTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-R410P	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -R410P (R410P: CGT>CCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-K413A	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -K413A (K413A: AAG>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-K413C	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -K413C (K413C: AAG>TGC)	Diese Arbeit

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a-AsLOV2-N414C	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414C (N414C: AAC>TGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414E	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414E (N414E: AAC>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414G	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414G (N414G: AAC>GGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414L	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414L (N414L: AAC>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414M	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414M (N414M: AAC>ATG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-V416E	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -V416E (V416E: GTC>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-V416M	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -V416M (V416M: GTC>ATG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-V416T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -V416T (V416T: GTC>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427N	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -I427N (I427N: ATT>AAC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -I427T (I427T: ATT>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L446M	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -L446M (L446M: TTG>ATG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L446Q	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -L446Q (L446Q: TTG>CAG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L446S	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -L446S (L446S: TTG>AGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N449A	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N449A (N449A: AAC>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N449E	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N449E (N449E: AAC>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N449I	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N449I (N449I: AAC>ATT)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N449K	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N449K (N449K: AAC>AAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N449T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N449T (N449T: AAC>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-C450S	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -C450S (C450S: TGC>AGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-E475T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -E475T (E475T: GAG>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L496K	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -L496K (L496K: TTG>AAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-D501G	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -D501G (D501G: GAT>GGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-D501W	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -D501W (D501W: GAT>TGG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-D501Y	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -D501Y (D501Y: GAT>TAT)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-D515L	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -D515L (D515L: GAT>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-Q513H	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -Q513H (Q513H: CAG>CAT)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-Q513P	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -Q513P (Q513P: CAG>CCG)	Diese Arbeit

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a-AsLOV2-Q513R	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-Q513R (Q513R: CAG>CGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-G528E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-G528E (G528E: GGA>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-G528K	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-G528K (G528K: GGA>AAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-G528R	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-G528R (G528R: GGA>CGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-R410P/G528A	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-R410P/G528A (R410P: CGT>CCG; G528A: GGA>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-R410P/G528E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-R410P/G528E (R410P: CGT>CCG; G528E: GGA>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-R410P/G528R	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-R410P/G528R (R410P: CGT>CCG; G528R: GGA>CGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-K413A/N414G	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-K413A/N414G (K413A: AAG>GCG; N414G: AAC>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-K413A/D501G	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-K413A/D501G (K413A: AAG>GCG; D501G: GAT>GGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-K413C/N414C	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-K413C/N414C (K413C: AAG>TGC; N414C: AAC>TGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414A/V416A	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414A/V416A (N414A: AAC>GCG; V416A: GTC>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414A/V416L	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414A/V416L (N414A: AAC>GCG; V416L: GTC>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414C/L496K	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414C/L496K (N414C: AAC>TGC; L496K: TTG>AAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414D/V416A	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414D/V416A (N414D: AAC>GAT; V416A: GTC>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414D/V416T	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414D/V416T (N414D: AAC>GAT; V416T: GTC>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414E/V416E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414E/V416E (N414E: AAC>GAA; V416E: GTC>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414E/V416M	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414E/V416M (N414E: AAC>GAA; V416M: GTC>ATG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414G/L446E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414G/L446E (N414G: AAC>GCG; L446E: TTG>GAG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414G/L446S	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414G/L446S (N414G: AAC>GCG; L446S: TTG>AGC)	Diese Arbeit

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a-AsLOV2-N414G/G528E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414G/G528E (N414G: AAC>GGC; G528E: GGA>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414L/V416L	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414L/V416L (N414L: AAC>CTG; V416L: GTC>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414L/H495L	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414L/H495L (N414L: AAC>CTG; H495L: CAC>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414L/Q513L	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414L/Q513L (N414L: AAC>CTG; Q513L: CAG>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414L/L514A	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414L/L514A (N414L: AAC>CTG; L514A: TTG>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414M/V416E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414M/V416E (N414M: AAC>ATG; V416E: GTC>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414M/V416M	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-N414M/V416M (N414M: AAC>ATG; V416M: GTC>ATG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-V416T/N449T	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-V416T/N449T (V416T: GTC>ACC; N449T: AAC>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427N/N449A	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-I427N/N449A (I427N: ATT>AAC; N449A: AAC>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427N/N449E	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-I427N/N449E (I427N: ATT>AAC; N449E: AAC>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427N/N449I	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-I427N/N449I (I427N: ATT>AAC; N449I: AAC>ATT)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427N/N449K	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-I427N/N449K (I427N: ATT>AAC; N449K: AAC>AAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427T/N449T	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-I427T/N449T (I427T: ATT>ACC; N449T: AAC>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427T/E475T	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-I427T/E475T (I427T: ATT>ACC; E475T: GAG>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-T438V/E475T	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-T438V/E475T (T438V: ACA>GTG; E475T: GAG>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-R442L/D515L	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-R442L/D515L (R442L: CGT>CTG; D515L: GAT>CTG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L446F/E475T	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-L446F/E475T (L446F: TTG>TTT; E475T: GAG>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L446M/D501W	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-L446M/D501W (L446M: TTG>ATG; D501W: GAT>TGG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-L446Q/D501Y	pET-28a(+); PT7>AsLOV2-L446Q/D501Y (L446Q: TTG>CAG; D501Y: GAT>TAT)	Diese Arbeit

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a-AsLOV2-L446S/D501Y	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -L446S/D501Y (L446S: TTG>AGC; D501Y: GAT>TAT)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N449T/Q513P	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N449T/Q513P (N449T: AAC>ACC; Q513P: CAG>CCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-V463W/E475T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -V463W/E475T (V463W: GTG>TGG; E475T: GAG>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-E475T/G528E	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -E475T/G528E (E475T: GAG>ACC; G528E: GGA>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-D501G/G528E	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -D501G/G528E (D501G: GAT>GGC; G528E: GGA>GAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-Q513R/G528R	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -Q513R/G528R (Q513R: CAG>CGC; G528R: GGA>CGC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-Q513R/G528K	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -Q513R/G528R (Q513R: CAG>CGC; G528K: GGA>AAA)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414D/F415E/V416T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414D/F415E/V416T (N414D: AAC>GAT; F415E: TTT>GAA; V416T: GTC>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-N414M/F415E/V416A	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -N414M/F415E/V416A (N414M: AAC>ATG; F415E: TTT>GAA; V416A: GTC>GCG)	Diese Arbeit
pET28a-AsLOV2-I427T/L446M/E475T	pET-28a(+); PT7> <i>AsLOV2</i> -I427T/L446M/E475T (I427T: ATT>ACC; L446M: TTG>ATG; E475T: GAG>ACC)	Diese Arbeit
pET28a-EILPOR	pET-28a(+); 986 bp <i>EILPOR</i> aus <i>Erythrobacter litoralis</i> (Genbank ID: KEO90002.1); NdeI/SalI kloniert	[262]
pRotHi-2_DsLOV	pRhotHi-2 Derivat; 417 bp <i>DsLOV</i> Wildtyp Fragment aus <i>Dinoroseobacter shibae</i> (UniProt ID: UPF0262)	[79]
pRotHi-2_DsLOV-M49S	pRhotHi-2 Derivat, PT7> <i>DsLOV</i> -M49S (M49S: ATG>AGC)	[163]
pRotHi-2_DsLOV-C72S	pRhotHi-2 Derivat, PT7> <i>DsLOV</i> -C72S (C72S: TGC>AGC)	Diese Arbeit
pET28a_PpSB1-LOV	pET-28a(+); 429 bp <i>PpSB1-LOV</i> Wildtyp aus <i>Pseudomonas putida</i> (UniProt-ID: Q88E39), NdeI/XhoI kloniert	[112]
pET28a_PpSB1-LOV-I48T	pET-28a(+); <i>PpSB1-LOV</i> -I48T	[263]
pET28a_iLOV	pET-28a(+); 333 bp <i>iLOV</i> Wildtyp Fragment aus pGEX-iLOV; NdeI/SalI kloniert	[199]
pET28a_iLOV-V392A/Q489A	pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -V392A/Q489A (V392A: GTC>GCT; Q489A: CAG>GCT)	Diese Arbeit

Vektor	Genotyp	Quelle/Referenz
pET28a_iLOV-V392C/G487S/Q489L	pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -V392C/G487S/Q489L (V392C: GTC>TGT; G487S: GGT>TCA Q489L: CAG>TTA)	Diese Arbeit
pET28a_iLOV-V392L/Q489S	pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -V392L/Q489S (V392L: GTC>TTG; Q489S: CAG>TCT)	Diese Arbeit
pET28a_iLOV-V392S/Q489C	pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -V392S/Q489C (V392S: GTC>TCG; Q489C: CAG>TGC)	Diese Arbeit
pET28a_iLOV-V392T/Q489G	pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -V392T/Q489G (V392T: GTC>ACC; Q489G: CAG>GGT)	Diese Arbeit
pET28a_iLOV-G487C/Q489A	pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -G487C/Q489A (G487C: GGT>TGC; Q489A: CAG>GCT)	Diese Arbeit
pET28a_iLOV-Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493	pET-28a(+); pET-28a(+); PT7> <i>iLOV</i> -Q489A/L490R/D491W/G492K + Stoppcodon (Q489A: CAG>GCT; L490R: CTC>CGA; D491W: GAT>TGG; G492K: GGA>AAG; Stoppcodon: AGT>TGA)	Diese Arbeit

2.1.1.2. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden in HPLC gereinigter Form von der Firma MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Oligonukleotide wurden in lyophilisierter Form geliefert und nach Herstellerangaben mit sterilem ddH₂O auf eine Endkonzentration von 100 pmol L⁻¹ eingestellt. Nachfolgend wurde eine 1:10 verdünnte Stammlösung mit ddH₂O angesetzt und in PCR Experimenten verwendet.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Nukleotidsequenz (5' → 3') und Schmelzpunkt (°C) sowie Verwendungszweck.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-T406C_fw</i>	TTG GCT TGC ACA CTT GAA CGT ATT GAG AAG AAC TT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-T406C</i>
<i>AsLOV2-T406C_rev</i>	TTC TTC TCA ATA CGT TCA AGT GTG CAA GCC AAC AT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-T406C</i>
<i>AsLOV2-T406V_fw</i>	TTG GCT GTG ACA CTT GAA CGT ATT GAG AAG AAC TT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-T406V</i>
<i>AsLOV2-T406V_rev</i>	TTC TTC TCA ATA CGT TCA AGT GTC ACA GCC AAC AT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-T406V</i>
<i>AsLOV2-R410P_fw</i>	TTG AAC CGA TTG AGA AGA ACT TTG TCA T	60,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-R410P</i>

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-R410P_rev</i>	CAA TGG GTT CAA GTG TAG TAG CCA ACA T	63,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-R410P</i>
<i>AsLOV2-K413A_fw</i>	TTG AGG CGA ACT TTG TCA TTA CTG ACC	63,4	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413A</i>
<i>AsLOV2-K413A_rev</i>	AAG TTC GGC TCA ATA CGT TCA AGT GTA G	63,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413A</i>
<i>AsLOV2-K413C_fw</i>	ATT GAG TGC AAC TTT GTC ATT ACT GAC CCA AGG TT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413C</i>
<i>AsLOV2-K413C_rev</i>	AAA GTT GCA CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AGC CA	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413C</i>
<i>AsLOV2-N414C_fw</i>	GAG AAG TGC TTT GTC ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	70,6	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414C</i>
<i>AsLOV2-N414C_rev</i>	GAC AAA GCA CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414C</i>
<i>AsLOV2-N414E_fw</i>	GAG AAG GAA TTT GTC ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414E</i>
<i>AsLOV2-N414E_rev</i>	GAC AAA TTC CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414E</i>
<i>AsLOV2-N414G_fw</i>	AGA AGG GCT TTG TCA TTA CTG ACC CAA G	65,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414G</i> und <i>AsLOV2-N414G/G528E</i>
<i>AsLOV2-N414G_rev</i>	ACA AAG CCC TTC TCA ATA CGT TCA AGT G	63,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414G</i> und <i>AsLOV2-N414G/G528E</i>
<i>AsLOV2-N414L_fw</i>	AGA AGC TGT TTG TCA TTA CTG ACC CAA G	63,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414L</i>
<i>AsLOV2-N414L_rev</i>	ACA AAC AGC TTC TCA ATA CGT TCA AGT G	62,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414L</i>
<i>AsLOV2-N414M_fw</i>	GAG AAG ATG TTT GTC ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M</i>
<i>AsLOV2-N414M_rev</i>	GAC AAA CAT CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M</i>
<i>AsLOV2-V416E_fw</i>	AAC TTT GAA ATT ACT GAC CCA AGG TTG CCA GAT AA	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V416E</i>
<i>AsLOV2-V416E_rev</i>	AGT AAT TTC AAA GTT CTT CTC AAT ACG TTC AAG TG	63,6	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V416E</i>

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-V416M_fw</i>	AAC TTT ATG ATT ACT GAC CCA AGG TTG CCA GAT AA	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V416M</i>
<i>AsLOV2-V416M_rev</i>	AGT AAT CAT AAA GTT CTT CTC AAT ACG TTC AAG TG	63,6	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V416M</i>
<i>AsLOV2-V416T_fw</i>	AAC TTT ACC ATT ACT GAC CCA AGG TTG CCA GAT AA	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V416T</i>
<i>AsLOV2-V416T_rev</i>	AGT AAT GGT AAA GTT CTT CTC AAT ACG TTC AAG TG	64,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V416T</i>
<i>AsLOV2-I427N_fw</i>	AAT CCC AAC ATA TTC GCG TCC GAT AGT TTC TTG CA	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-I427N</i>
<i>AsLOV2-I427N_rev</i>	GAA TAT GTT GGG ATT ATC TGG CAA CCT TGG GTC AG	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-I427N</i>
<i>AsLOV2-I427T_fw</i>	AAT CCC ACC ATA TTC GCG TCC GAT AGT TTC TTG CA	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-I427T</i>
<i>AsLOV2-I427T_rev</i>	GAA TAT GGT GGG ATT ATC TGG CAA CCT TGG GTC AG	70,6	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-I427T</i>
<i>AsLOV2-T438V_fw</i>	AGT TGG TGG AAT ATA GCC GTG AAG AAA TTT TGG	65,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-T438V/E475T</i>
<i>AsLOV2-T438V_rev</i>	TAT TCC ACC AAC TGC AAG AAA CTA TCG GAC	65,4	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-T438V/E475T</i>
<i>AsLOV2-R442L_fw</i>	ATA GCC TGG AAG AAA TTT TGG GAA GAA CT	62,4	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-R442L/D515L</i>
<i>AsLOV2-R442L_rev</i>	TCT TCC AGG CTA TAT TCT GTC AAC TGC A	63,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-R442L/D515L</i>
<i>AsLOV2-L446E_fw</i>	AAA TTG AGG GAA GAA ACT GCA GGT TTC T	62,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414G/L446E</i>
<i>AsLOV2-L446E_rev</i>	CTT CCC TCA ATT TCT TCA CGG CTA TAT T	62,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414G/L446E</i>
<i>AsLOV2-L446F_fw</i>	AAA TTT TTG GAA GAA ACT GCA GGT TTC TAC AAG	63,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446F/E475T</i>
<i>AsLOV2-L446F_rev</i>	CTT CCA AAA ATT TCT TCA CGG CTA TAT TCT GTC	64,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446F/E475T</i>
<i>AsLOV2-L446M_fw</i>	GAA ATT ATG GGA AGA AAC TGC AGG TTT CTA CAA GG	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446M</i> und <i>AsLOV2-</i>

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
			I427T/L446M/E475T
<i>AsLOV2-L446M_rev</i>	TCT TCC CAT AAT TTC TTC ACG GCT ATA TTC TGT CA	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446M</i> und <i>AsLOV2-I427T/L446M/E475T</i>
<i>AsLOV2-L446Q_fw</i>	GAA ATT CAG GGA AGA AAC TGC AGG TTT CTA CAA GG	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446Q</i>
<i>AsLOV2-L446Q_rev</i>	TCT TCC CTG AAT TTC TTC ACG GCT ATA TTC TGT CA	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446Q</i>
<i>AsLOV2-L446S_fw</i>	GAA ATT AGC GGA AGA AAC TGC AGG TTT CTA CAA GG	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446S</i> und <i>AsLOV2-N414G/L446S</i>
<i>AsLOV2-L446S_rev</i>	TCT TCC GCT AAT TTC TTC ACG GCT ATA TTC TGT CA	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L446S</i> und <i>AsLOV2-N414G/L446S</i>
<i>AsLOV2-N449A_fw</i>	GGA AGA GCG TGC AGG TTT CTA CAA GGT CC	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449A</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449A</i>
<i>AsLOV2-N449A_rev</i>	CCT GCA CGC TCT TCC CAA AAT TTC TTC ACG G	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449A</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449A</i>
<i>AsLOV2-N449E_fw</i>	GGA AGA GAA TGC AGG TTT CTA CAA GGT CCT GAA A	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449E</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449E</i>
<i>AsLOV2-N449E_rev</i>	CCT GCA TTC TCT TCC CAA AAT TTC TTC ACG GCT AT	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449E</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449E</i>
<i>AsLOV2-N449I_fw</i>	GGA AGA ATT TGC AGG TTT CTA CAA GGT CCT GAA A	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449I</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449I</i>
<i>AsLOV2-N449I_rev</i>	CCT GCA AAT TCT TCC CAA AAT TTC TTC ACG GCT AT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449I</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449I</i>
<i>AsLOV2-N449K_fw</i>	GGA AGA AAA TGC AGG TTT CTA CAA GGT CCT GAA A	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449K</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449K</i>
<i>AsLOV2-N449K_rev</i>	CCT GCA TTT TCT TCC CAA AAT TTC TTC ACG GCT AT	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449K</i> und <i>AsLOV2-I427N/N449K</i>

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-N449T_fw</i>	GGA AGA ACC TGC AGG TTT CTA CAA GGT CCT G	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449T</i> , <i>AsLOV2-V416T/N449T</i> und <i>AsLOV2-I427T/N449T</i>
<i>AsLOV2-N449T_rev</i>	CCT GCA GGT TCT TCC CAA AAT TTC TTC ACG	66,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N449T</i> , <i>AsLOV2-V416T/N449T</i> und <i>AsLOV2-I427T/N449T</i>
<i>AsLOV2-C450S_fw</i>	GAA ACA GCA GGT TTC TAC AAG GTC	61,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV-C450S</i>
<i>AsLOV2-C450S_rev</i>	AAC CTG CTG TTT CTT CCC AAA ATT TC	60,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-C450S</i>
<i>AsLOV2-V463W_fw</i>	CGA CAT GGA GAA AAA TTA GAG ATG CCA TAG ATA	64,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V463W/E475T</i>
<i>AsLOV2-V463W_rev</i>	TTT CTC CAT GTC GCG CGA TCA GTT TCA	65,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-V463W/E475T</i>
<i>AsLOV2-E475T_fw</i>	CAA ACA ACC GTC ACT GTT CAG CTG ATT AAT TAT AC	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-E475T</i> , <i>AsLOV2-I427T/E475T</i> und <i>AsLOV2-E475T/G528E</i>
<i>AsLOV2-E475T_rev</i>	AGT GAC GGT TGT TTG GTT ATC TAT GGC ATC TCT AA	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-E475T</i> , <i>AsLOV2-I427T/E475T</i> und <i>AsLOV2-E475T/G528E</i>
<i>AsLOV2-H495L_fw</i>	TCT TTC TGT TGC AGC CTA TGC GAG ATC A	65,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414L/H495L</i>
<i>AsLOV2-H495L_rev</i>	TGC AAC AGA AAG AGG TTC CAG AAC TTT T	62,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414L/H495L</i>
<i>AsLOV2-L496K_fw</i>	TTT CAC AAA CAG CCT ATG CGA GAT CAG AAG	65,4	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L496K</i> und <i>AsLOV2-N414C/L496K</i>
<i>AsLOV2-L496K_rev</i>	AGG CTG TTT GTG AAA GAG GTT CCA GAA CTT TTT AC	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-L496K</i> und <i>AsLOV2-N414C/L496K</i>
<i>AsLOV2-D501G_fw</i>	TGC GAG GCC AGA AGG GAG ATG TCC AGT A	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-D501G</i> und <i>AsLOV2-K413A/D501G</i>
<i>AsLOV2-D501G_rev</i>	TTC TGG CCT CGC ATA GGC TGC AAG TGA A	68,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-D501G</i> und

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
			AsLOV2-K413A/D501G
AsLOV2-D501W_fw	ATG CGA TGG CAG AAG GGA GAT GTC CAG TA	68,1	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-D501W und AsLOV2-L446M/D501W
AsLOV2-D501W_rev	CTT CTG CCA TCG CAT AGG CTG CAA GT	66,4	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-D501W und AsLOV2-L446M/D501W
AsLOV2-D501Y_fw	ATG CGA TAT CAG AAG GGA GAT GTC CAG TAC TTT AT	67,1	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-D501Y
AsLOV2-D501Y_rev	CTT CTG ATA TCG CAT AGG CTG CAA GTG AAA GAG GT	69,5	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-D501Y
AsLOV2-Q513H_fw	GGG GTT CAT TTG GAT GGA ACT GAG CAT GTC C	69,5	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-Q513H
AsLOV2-Q513H_rev	ATC CAA ATG AAC CCC AAT AAA GTA CTG GAC ATC TC	67,1	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-Q513H
AsLOV2-Q513L_fw	GGG TTC TGT TGG ATG GAA CTG AGC ATG T	66,6	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-N414L/Q513L
AsLOV2-Q513L_rev	TCC AAC AGA ACC CCA ATA AAG TAC TGG A	63,7	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-N414L/Q513L
AsLOV2-Q513P_fw	GGG GTT CCG TTG GAT GGA ACT GAG CAT GTC	70,9	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-Q513P und AsLOV2-N449T/Q513P
AsLOV2-Q513P_rev	ATC CAA CGG AAC CCC AAT AAA GTA CTG GAC ATC	68,2	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-Q513P und AsLOV2-N449T/Q513P
AsLOV2-Q513R_fw	GGG GTT CGC TTG GAT GGA ACT GAG CAT GTC	70,9	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-Q513R
AsLOV2-Q513R_rev	ATC CAA GCG AAC CCC AAT AAA GTA CTG GAC ATC	68,2	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-Q513R
AsLOV2-L514A_fw	TTC AGG CGG ATG GAA CTG AGC ATG T	64,6	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-N414L/L514A
AsLOV2-L514A_rev	CCA TCC GCC TGA ACC CCA ATA AAG TAC T	66,6	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-N414L/L514A
AsLOV2-D515L_fw	AGT TGC TGG GAA CTG AGC ATG TCC GA	66,4	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-D515L
AsLOV2-D515L_rev	GTT CCC AGC AAC TGA ACC CCA ATA AAG T	65,1	QuikChange PCR zur Erzeugung von pET28a-AsLOV2-D515L

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-G528A_fw</i>	GAG AGG CGG TCA TGC TGA TTA AGA AAA C	65,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von <i>AsLOV2-R410P/G528A</i>
<i>AsLOV2-G528A_rev</i>	ATG ACC GCC TCT CTC TCG GC	63,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von <i>AsLOV2-R410P/G528A</i>
<i>AsLOV2-G528E_fw</i>	AGA GAG GAA GTC ATG CTG ATT AAG AAA ACT GCA GA	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-G528E</i> , <i>AsLOV2-R410P/G528E</i> , <i>AsLOV2-N414G/G528E</i> , <i>AsLOV2-E475T/G528E</i> und <i>AsLOV2-D501G/G528E</i>
<i>AsLOV2-G528E_rev</i>	CAT GAC TTC CTC TCT CTC GGC AGC ATC TCG GAC	73,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-G528E</i> , <i>AsLOV2-R410P/G528E</i> , <i>AsLOV2-N414G/G528E</i> , <i>AsLOV2-E475T/G528E</i> und <i>AsLOV2-D501G/G528E</i>
<i>AsLOV2-G528K_fw</i>	AGA GAG AAA GTC ATG CTG ATT AAG AAA ACT GCA GA	66,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-G528K</i>
<i>AsLOV2-G528K_rev</i>	CAT GAC TTT CTC TCT CTC GGC AGC ATC TCG GAC	72,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-G528K</i>
<i>AsLOV2-G528R_fw</i>	AGA GAG CGC GTC ATG CTG ATT AAG AAA ACT GCA	68,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-G528R</i> und <i>AsLOV2-R410P/G528E</i>
<i>AsLOV2-G528R_rev</i>	CAT GAC GCG CTC TCT CTC GGC AGC ATC TC	72,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-G528R</i> und <i>AsLOV2-R410P/G528E</i>
<i>AsLOV2-K413A/N414G_fw</i>	TTG AGG CGG GCT TTG TCA TTA CTG ACC	66,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413A/N414G</i>
<i>AsLOV2-K413A/N414G_rev</i>	ACA AAG CCC GCC TCA ATA CGT TCA AGT GTA G	68,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413A/N414G</i>
<i>AsLOV2-K413C/N414C_fw</i>	ATT GAG TGC TGC TTT GTC ATT ACT GAC CCA AGG TT	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413C/N414C</i>
<i>AsLOV2-K413C/N414C_rev</i>	AAA GCA GCA CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AGC CA	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-K413C/N414C</i>
<i>AsLOV2-N414A/V416A_fw</i>	AGA AGG CGT TTG CGA TTA CTG ACC CAA GGT T	68,2	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414A/V416A</i>
<i>AsLOV2-N414A/V416A_rev</i>	GTA ATC GCA AAC GCC TTC TCA ATA CGT TCA AGT G	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414A/V416A</i>

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-N414A/V416L_fw</i>	AGA AGG CGT TTC TGA TTA CTG ACC CAA GGT T	66,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414A/V416L</i>
<i>AsLOV2-N414A/V416L_rev</i>	GTA ATC AGA AAC GCC TTC TCA ATA CGT TCA AGT G	67,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414A/V416L</i>
<i>AsLOV2-N414D/V416A_fw</i>	AGA AGG ATT TTG CGA TTA CTG ACC CAA GGT TG	66,9	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414D/V416A</i>
<i>AsLOV2-N414D/V416A_rev</i>	GTA ATC GCA AAA TCC TTC TCA ATA CGT TCA AGT GTA GTA	67,4	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414D/V416A</i>
<i>AsLOV2-N414D/V416T_fw</i>	AGA AGG ATT TTA CCA TTA CTG ACC CAA GGT TGC CAG ATA	69,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414D/V416T</i>
<i>AsLOV2-N414D/V416T_rev</i>	GTA ATG GTA AAA TCC TTC TCA ATA CGT TCA AGT GTA GTA	66,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414D/V416T</i>
<i>AsLOV2-N414E/V416E_fw</i>	GAG AAG GAA TTT GAA ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414E/V416E</i>
<i>AsLOV2-N414E/V416E_rev</i>	TTC AAA TTC CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	64,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414E/V416E</i>
<i>AsLOV2-N414E/V416M_fw</i>	GAG AAG GAA TTT ATG ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414E/V416M</i>
<i>AsLOV2-N414E/V416M_rev</i>	CAT AAA TTC CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	64,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414E/V416M</i>
<i>AsLOV2-N414L/V416L_fw</i>	AGA AGC TGT TTC TGA TTA CTG ACC CAA GGT T	65,5	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414L/V416L</i>
<i>AsLOV2-N414L/V416L_rev</i>	GTA ATC AGA AAC AGC TTC TCA ATA CGT TCA AGT G	65,9	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414L/V416L</i>
<i>AsLOV2-N414M/V416E_fw</i>	GAG AAG ATG TTT GAA ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M/V416E</i>
<i>AsLOV2-N414M/V416E_rev</i>	TTC AAA CAT CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	64,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M/V416E</i>
<i>AsLOV2-N414M/V416M_fw</i>	GAG AAG ATG TTT ATG ATT ACT GAC CCA AGG TTG CC	68,3	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M/V416M</i>
<i>AsLOV2-N414M/V416M_rev</i>	CAT AAA CAT CTT CTC AAT ACG TTC AAG TGT AGT AG	64,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M/V416M</i>
<i>AsLOV2-N414D/F415E/V416T_fw</i>	AGA AGG ATG AAA CCA TTA CTG ACC CAA GGT TG	66,9	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414D/F415E/V416T</i>

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Verwendungszweck
<i>AsLOV2-N414D/F415E/V416T_rev</i>	ATG GTT TCA TCC TTC TCA ATA CGT TCA AGT GTA GTA	66,1	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414D/F415E/V416T</i>
<i>AsLOV2-N414M/F415E/V416A_fw</i>	AGA TGG AAG CGA TTA CTG ACC CAA GGT TG	66,7	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M/F415E/V416A</i>
<i>AsLOV2-N414M/F415E/V416A_rev</i>	GTA ATC GCT TCC ATC TTC TCA ATA CGT TCA AGT	65,8	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pET28a- <i>AsLOV2-N414M/F415E/V416A</i>
<i>DsLOV-C72S_fw</i>	CGC AAC AGC CGT TTC CTG CAG GG	68,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pRt_RotHi- <i>DsLOV-C72S</i>
<i>DsLOV-C72S_fw</i>	GAA ACG GCT GTT GCG GCC CAG CA	68,0	<i>QuikChange</i> PCR zur Erzeugung von pRt_RotHi- <i>DsLOV-C72S</i>
<i>iLOV_NNK_fw</i>	CAG CCA TAT GAT AGA GAA GAA TTT CNN KAT CAC TGA TCC TAG GCT TCC C	74,0	PCR zur Erzeugung einer iLOV-Bibliothek (Position 392)
<i>iLOV_NNM_NNM_rev</i>	GCT TGT CGA CTT ATA CAT GAT CAC TTC CAT CGA GNN MCA CNN MAG TGA AGT ATT G	>75	PCR zur Erzeugung einer iLOV-Bibliothek (Position 487 und 489)
T₇	TAATACGACTCACTATAGG	44,5	Standardsequenzierungsprimer von Seqlab (Göttingen, Deutschland) zur Überprüfung der in dieser Arbeit generierten Plasmide
T_{7-term}	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG	55,0	Standardsequenzierungsprimer von Seqlab (Göttingen, Deutschland) zur Überprüfung der in dieser Arbeit generierten Plasmide

2.1.2. Chemikalien und Medien

2.1.2.1. Chemikalien

Tabelle 4: Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen. Angegeben sind die spezifische Erkennungssequenz sowie der Verwendungszweck. Des Weiteren ist die hydrolisierte Position mit einem ^ markiert. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

Bezeichnung	Erkennungssequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
DpnI	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{GA}^{\wedge}\text{TC} \end{array}$	Zur Hydrolyse von (hemi-) methylierter DNA
Sall	G [^] TCGA C	Restriktion des pET28a_E/LPOR Vektors zur Erzeugung der iLOV-Mutantenbibliothek
NdeI	CA [^] TA TG	Restriktion des pET28a_E/LPOR Vektors zur Erzeugung der iLOV-Mutantenbibliothek

Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Firma
Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Ammoniumsulfat	Honeywell Fluka
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Roth
Coomassie-Brillant-Blau G250	Sigma-Aldrich
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific
Desthiobiotin	Iba Solutions For Life Sciences
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Acros Organics
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DNA-Molekulargewichtsstandard: GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
DNA-Probenpuffer: DNA Gel loading dye (6x)	Thermo Fisher Scientific
Ethanol (EtOH)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Glukose	Roth
Glycerin	Roth
HF-Phusion Puffer	Thermo Fisher Scientific
Hydroxy-Azophenyl-Benzoessäure (HABA)	Iba Solutions For Life Sciences
GC-Phusion Puffer	Thermo Fisher Scientific

Chemikalie	Firma
Imidazol	Roth
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	GERBU
Kalziumchlorid (CaCl₂)	Roth
Kanamycin (Kan)	Roth
Lactose	Roth
<i>Lysogeny broth</i>-Medium (LB-Medium)	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Roth
Methanol	J.T. Baker
Midori-Green Advance (MGA)	Nippon Genetics Europe GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)	Acros Organics
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
<i>o</i>-Phosphorsäure	AppliChem
Phusion-DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Protein-Molekulargewichtsstandards: PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
Riboflavin	AppliChem
Rothiphorese® Acrylamid/Bisacrylamid Mix	Carl Roth
Salzsäure (HCl)	Fisher Chemical
<i>Super Optimal Broth</i>-Medium (SOC-Medium)	Qiagen
Tangobuffer	Thermo Fisher Scientific
<i>Terrific Broth</i>-Medium (TB-Medium)	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Amresco
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth
T₄-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific
T₄-Ligasepuffer	Thermo Fisher Scientific

2.1.2.2. Medien

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Medien bei 121 °C und 2 bar für 21 min autoklaviert. Für die Selektion von plasmidkodierten Resistenzen wurde den Medien Kanamycin (Kan) in einer Endkonzentration von 50 µg mL⁻¹ (Kan) zugegeben. Da das Antibiotikum temperaturempfindlich ist, wurde dieses sterilfiltriert (Porendurchmesser: ≤ 0,22 µm) und den Medien nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur ≤ 60 °C hinzugefügt. Zur Herstellung von Autoinduktionsmedium wurden Glukose- und Laktose-Stocklösungen einzeln autoklaviert und erst vor der Verwendung zum TB-Medium hinzugefügt. Dem SOC-Medium wurde nach dem Autoklavieren 20 mM Glukose zugefügt und anschließend sterilfiltriert (Porendurchmesser: ≤ 0,2 µm). Für die Kultivierung von *Escherichia coli* CmpX131 wurde dem LB-Medium kurz vor der Verwendung 50 µM Riboflavin (50 mM Stocklösung Riboflavin gelöst in EtOH abs.) hinzugefügt. Alle Medien

wurden bei Raumtemperatur gelagert. Für die Herstellung von Agar-Platten wurde dem LB-Medium bzw. dem SOC-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar hinzugefügt. Alle Agar-Platten wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

LB-Medium (*lysogeny broth*) [264]

10 g L ⁻¹	NaCl
10 g L ⁻¹	Trypton
5 g L ⁻¹	Hefeextrakt

Autoinduktionsmedium [265]

940 mL	TB-Medium (Endkonzentration: 94 % (w/v))
50 mL	Lactose (Endkonzentration: 5 % (w/v))
10 mL	Glukose (Endkonzentration: 1 % (w/v))

TB-Medium (*terrific broth*) [264]

24 g L ⁻¹	Hefeextrakt
12 g L ⁻¹	Casein, enzymatisch verdaut
54 mM	K ₂ HPO ₄
16 mM	KH ₂ PO ₄
4 mM	Glycerin

SOC-Medium [266]

0,5 %	Hefe-Extrakt
2 %	Trypton
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄

2.2. Methoden**2.2.1. Arbeiten mit Bakterien****2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien**

Die Kultivierung von *E. coli* Zellen erfolgte bei 37 °C und 120 UpM über Nacht. Für eine Kultivierung zur Isolierung von Plasmid-DNA bzw. einer Vorkultur wurden 4-50 mL LB-Medium (2.1.2.2) in 100-500 mL Erlenmeyerkolben (Füllhöhe entsprechend 1/10 des Kolbenvolumens) kultiviert. Alle Stämme besaßen eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz und wurden unter entsprechendem Selektionsdruck kultiviert (2.1.2.2). Alle Kulturen wurden mit einer Einzelkolonie einer frischen Transformationsplatte angeimpft (2.2.1.4 bzw. 2.2.1.5).

Abweichend davon wurden die Varianten der iLOV-Sättigungsmutagenesebibliothek (2.2.2.12) zur Vorbereitung für das FACS-Screening in Reagenzgläsern mit jeweils 4 mL LB-

Medium sowie 4 μL Kanamycin (1000x, Arbeitskonzentration 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) über Nacht inkubiert (37 °C, 250 UpM).

Abweichend davon wurden die potenziell rot/blau verschobenen Varianten der iLOV-Sättigungsmutagenesebibliothek (2.2.2.12), welche mittels FACS-Screenings identifiziert wurden, in Mikrotiterplatten (MTP) angezogen. Je MTP-Well wurden 150 μL LB-Medium versetzt mit 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Kanamycin mit einer FACS-sortierten iLOV-Variante inokkuliert. Expressionskulturen wurden mit 20 μL Vorkultur (2.2.1.1) beimpft und bei einer 70 %igen Luftfeuchtigkeit im MTP-Schüttler bebrütet (37 °C, 900 UpM, 2 h). Die Induktion erfolgte mit 20 μL Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Stammlösung 1:1000; Mastermix: 20 μL IPTG und 1,98 mL ddH₂O). Nach der Zugabe von IPTG wurde die Kultivierung bei 30 °C und 900 Umdrehungen pro Minute (UpM) für 4 h bei einer Luftfeuchtigkeit von 70 % fortgesetzt.

2.2.1.2. Heterologe Genexpression

Für die heterologe Genexpression wurde das T7-Expressionssystem bestehend aus *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* CmpX131(DE3) und pET28a(+) als Expressionsvektor verwendet (Tabelle 1 und Tabelle 2). Die Induktion der Genexpression erfolgte entweder durch Zugabe von IPTG in LB-Medium für alle *AsLOV2*-Varianten oder mittels Autoinduktion im Autoinduktionsmedium (2.1.2.2) für *PpSB1-LOV* sowie *AsLOV2-V416T*, *AsLOV2-C450S* und die *DsLOV*-Varianten. Bei Verwendung von Autoinduktionsmedium erfolgt die Induktion der Genexpression durch Lactose als Induktor automatisch nachdem die Glukose im Medium verbraucht war. Als zusätzliche Kohlenstoffquelle während der Induktionsphase wurde dem Medium Glycerin zugesetzt. Laktose/IPTG induziert hierbei die Expression der genomkodierten T7-RNA-Polymerase von *P_{lacUV5}*, welche wiederum die Transkription der in pET28a(+) bzw. pRhotHi-2 klonierten Zielgene unter Kontrolle des P_{T7}-Promotors erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle *AsLOV2* und *DsLOV*-Proteine in *E. coli* BL21(DE3) (2.2.1.4) bzw. *PpSB1-LOV*, *AsLOV2-V416T*, *AsLOV2-C450S* sowie alle iLOV-Varianten in *E. coli* CmpX131 Zellen (2.2.1.5) produziert. Dazu wurden zunächst chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* CmpX131 Zellen mit Plasmid-DNA (Tabelle 2) transformiert. Expressionskulturen wurden mit zuvor angesetzten Vorkulturen (2.2.1.1) auf eine OD_{600 nm} von 0,05 angeimpft. Anschließend erfolgte die Proteinproduktion für *PpSB1-LOV*, *AsLOV2-V416T*, *AsLOV2-C450S*, *DsLOV*- sowie iLOV-Varianten in 0,5-1 L Autoinduktionsmedium (2.1.2.2) in 5 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 37 °C und

120 UpM bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5 (*AsLOV2* und *DsLOV*) für 3 h (*PpSB1-LOV*) bzw. über Nacht (*iLOV*). Im Anschluss wurden die *PpSB1-LOV*, *AsLOV2-V416T*, *AsLOV2-C450S* und *DsLOV*-Expressionskulturen bei 25 °C und 120 UpM für weitere 72 h über das Wochenende inkubiert. Die Produktion aller anderen *AsLOV2* Varianten (Ausnahmen siehe oben) erfolgte in 500 mL LB-Medium in 5 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen durch Induktion mit 0,1 mM IPTG. Hierzu wurden die Zellen mit einer Vorkultur auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5 inkubiert. Nach Zugabe von IPTG wurde die Kultivierung bei 15 °C und 120 UpM über Nacht fortgesetzt.

Abweichend davon wurden die mittels FACS sortierten *iLOV*-Sättigungsmutagenesevarianten (2.2.2.12) in 100 mL TB-Medium (2.1.2.2) in 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen angesetzt. Expressionskulturen wurden mit 1,5 mL Vorkultur (2.2.1.1) beimpft und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 bei 37 °C und 250 U min⁻¹ inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µL IPTG (Konzentration: Stammlösung 1:1000) wurde die Kultivierung bei 30 °C und 250 UpM für weitere 4 h fortgesetzt.

2.2.1.3. Lagerung von Bakterien

Alle in dieser Arbeit erzeugten Bakterienstämme wurden zur Langzeitlagerung in einer Stammsammlung hinterlegt. Zur Erstellung von Gefrierkulturen wurde ein Einzelklon einer frischen Transformationsplatte (2.2.1.4 bzw. 2.2.1.5) gepickt und in 25 mL LB-Medium in einem 250 mL Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 120 UpM über Nacht inkubiert (2.2.1.1). Am darauffolgenden Tag wurde eine frische Kultur (10 mL LB-Medium (2.1.2.2) in 100 mL Erlenmeyerkolben) mit der Übernachtskultur auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft. Der Rest der Übernachtskultur wurde zur Isolation von Plasmid-DNA zur Langzeitlagerung genutzt (2.2.2.1). Die frische Kultur wurde anschließend bei 37 °C und 120 UpM unter Selektionsdruck bis auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5-0,9 bebrütet. Anschließend wurden 500 µL der frischen Kultur mit 500 µL 50 % (w/v) Glycerin in ein Kryoröhrchen (Avantor, Darmstadt, Deutschland) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.4. Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden nach der Kalziumchlorid-Magnesiumchlorid-Methode hergestellt [264]. Hierzu wurde eine Vorkultur (2.2.1.1) in LB-Medium mit 10 µL *E. coli* Zellen der Stämme DH5α bzw. BL21(DE3) aus einer Gefrierkultur angeimpft und wie

in 2.2.1.1 beschrieben über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine 100 mL Hauptkultur in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,05 angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 120 UpM bis eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,5-0,6 erreicht war. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (4 °C, 2915 xg, 15 min) geerntet und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 5 mL vorgekühlter $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (4 °C, 2915 xg, 15 min) und der Überstand verworfen. Das resultierende Pellet wurde in 8 mL vorgekühlter $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert. Die so erhaltenen chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurden in Aliquots von je 100 μ L bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

100 μ L chemisch kompetente *E. coli* Zellen der jeweiligen Bakterienstämme (Tabelle 1) wurden mit 5-10 μ L der Zielplasmid-DNA (Tabelle 2) versetzt. Alle Ansätze wurden für 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte mithilfe eines Hitzeschocks bei 42 °C für 1,5 min. Anschließend wurde den Zellen 1 mL LB-Medium (2.1.2.2) hinzugefügt und die Transformationsansätze zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz auf einem Überkopfschüttler bei 37 °C für 90 bzw. 60 min inkubiert. Danach wurden 100 μ L der jeweiligen Zellkulturen (*E. coli* DH5 α und BL21(DE3)) auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (2.1.2.2) bzw. bei Transformation von *E. coli* CmpX131(DE3) auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten versetzt mit 50 μ M Riboflavin (2.1.2.2) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

MgCl₂-Lösung zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen	CaCl₂-Lösung zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen
--	--

100 mM $MgCl_2$

100 mM $CaCl_2$

15 % (v/v) Glycerin

2.2.1.5. Herstellung und Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen zur Herstellung der iLOV-Mutantenbibliothek

Für die Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurde eine Vorkultur (2.2.1.1) ohne Selektionsdruck mit 10 μ L *E. coli* NEB 10-beta (Tabelle 1) angesetzt. Am nächsten Tag wurde eine 1 L Hauptkultur mit der Vorkultur (1:500) angeimpft und bei 37 °C und 120 UpM bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,7 bebrütet. Anschließend wurde die Kultur in einem sterilen Zentrifugenbecher sedimentiert (10 °C, 5.000 xg, 10 min). Das resultierende Zellpellet wurde im ursprünglichen Volumen mit 10 %igem sterilem, vorgekühltem Glycerin gewaschen und mittels Zentrifugation sedimentiert (10 °C, 5.000 xg, 10 min). Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und das resultierende Zellpellet wurde in 50 mL 10 %igem Glycerin

resuspendiert, in ein steriles 50 mL Zentrifugationsgefäß überführt und erneut sedimentiert (10 °C, 5.000 xg, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 mL 10 %igem Glycerin resuspendiert. Die elektrokompenten Zellen wurden in Aliquots zu je 50 µL in sterilen 1,5 mL Reaktionsgefäße bei -80 °C gelagert.

Pro Transformationsansatz wurden 50 µL *E. coli* NEB 10-beta Zellen (Tabelle 1) auf Eis aufgetaut (10 min). Anschließend wurden 10 µL des Ligationsansatzes (1:1 verdünnt mit ddH₂O) zur Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek (2.2.2.10) zugesetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden in Elektroporationsküvetten (0,2 cm Spalt, BioRad, Feldkirchen, Deutschland) transferiert und elektroporiert (MicroPulser Electroporator (BioRad, Feldkirchen, Deutschland); 2,5 kV, 3-5 ms). Anschließend wurden zusätzlich 750 µL SOC-Medium (2.1.2.2), vorgewärmt auf 37 °C, in die Elektroporationsküvetten gegeben, die Zellen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, und die Ansätze bei 37 °C für 2-3 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig sedimentiert (RT, 5.000 xg, 1 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 300 µL SOC-Medium resuspendiert. Der Ansatz aus einem Aliquot wurde auf drei antibiotikahaltigen SOC-Agarplatten (2.1.2.2), vorgewärmt auf 37 °C, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Gewinnung von Plasmid-DNA wurde das „innuPREP Plasmid Mini Kit“ der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben, jedoch abweichend davon wurde die Plasmid-DNA mit 50 µL dd H₂O, vortemperiert auf 65 °C, eluiert.

2.2.2.2. Langzeitlagerung von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA zur Langzeitlagerung wurde eine 25 mL Übernachtskultur des gewünschten Stammes angesetzt und wie in 2.2.2.1 beschrieben zur Isolation von Plasmid-DNA genutzt. Hierzu wurde wie in 2.2.2.1 beschrieben vorgegangen, die Plasmid-DNA jedoch mit DNA-Lagerpuffer A eluiert. Anschließend wurden die Plasmide zur Überprüfung sequenziert (2.2.2.13). Bei einem positiven Ergebnis wurden 45 µL der

isolierten Plasmide mit 5 μL DNA-Lagerpuffer B versetzt in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Puffer wurden vor dem Verwenden autoklaviert.

DNA-Lagerpuffer A; pH 8,0

10 mM Tris

DNA-Lagerpuffer B; pH 8,0

10 mM Tris

10 mM EDTA

2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*) ermöglicht die *in-vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten [267]. Für die Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek (iLOV *site-saturation-mutagenesis*; iLOV-SSM) wurde eine Standard PCR zur Amplifikation des mutierten iLOV-kodierenden Gens verwendet. Als Erweiterung der Standard PCR-Methode wurde in dieser Arbeit eine sogenannte *QuikChange-PCR* (QC-PCR) zur Erzeugung aller *AsLOV2*-Varianten und der *DsLOV-C72S* Variante genutzt [268]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die QC-PCR für die ortsgerichtete Mutagenese von ein bis drei Aminosäurepositionen eingesetzt.

Die PCR-Ansätze zur Generierung aller *AsLOV2*-Varianten sowie *DsLOV-C72S* und der iLOV-Mutantenbibliothek (Tabelle 2) enthielten:

0,1	μM	Oligonukleotide
1	μL	Template DNA (c = 51,6-143,6 μL)
0,2	mM	dNTPs (Tabelle 5)
1	U	Phusion-DNA-Polymerase (Tabelle 5)
10	μL	5x HF bzw. GC-Phusion Puffer (Tabelle 5)
1,5	μL	DMSO (Tabelle 5)
ad. 50	μL	dd H ₂ O

Alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit einem Volumen von 50 μl in 200 μl PCR-Reaktionsgefäßen mithilfe eines TProfessional Basic Gradient PCR Cyclers (Analytik Jena, Jena, Deutschland) unter Verwendung der in Tabelle 6 aufgeführten Temperaturprogramme durchgeführt.

Tabelle 6: QC-PCR Temperaturprogramm zur Erzeugung der *AsLOV2*-Varianten und der *DsLOV-C72S* Variante sowie Standard PCR-Programm zur Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek. Für die QC-PCR zur Erzeugung der *AsLOV2* Varianten und *DsLOV-C72S* wurde eine Annealingtemperatur entsprechend der Schmelztemperatur der jeweiligen Oligonukleotide gewählt (XX¹, s. Tabelle 3; *AsLOV2*: 31,45-60,2 °C; *DsLOV-C72S*: 58,0 °C). Zur Amplifikation der iLOV-Varianten zur Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek wurde ein Temperaturgradient von 64-72 °C eingesetzt. Die Dauer des Elongationsschritts wurde entsprechend der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der „Geschwindigkeit“ der verwendeten Phusion-Polymerase ausgewählt.

Schritt	Temperatur (°C)		Zeit (min)		
	<i>QuikChange</i> PCR	Standard PCR	<i>QuikChange</i> PCR	Standard PCR	
Deckel	98	94	Pause	Pause	
Vorheizen	98	94	Pause	Pause	
1. Denaturieren	98	94	00:30	00:10	20x (<i>QC</i> -PCR)
1. Annealing	XX ¹	64-72	01:00	00:30	25x (Standard PCR)
1. Elongation	72	72	04:00	01:00	
2. Elongation	72	72	05:00	05:00	
Final	10	10	Pause	Pause	

2.2.2.4. Hydrolytische Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen können DNA an spezifischen Erkennungssequenzen hydrolytisch spalten (Tabelle 4). In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonukleasen zur Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek und zur Hydrolyse der Template DNA in der QC-PCR eingesetzt.

Im Anschluss an eine QC-PCR (2.2.2.3) erfolgte ein Restriktionsverdau (hemi-) methylierter DNA zur Hydrolyse der eingesetzten Template DNA. Alle Ansätze (V = 30 µL) enthielten ca. 100 ng DNA, 1x Tangobuffer (Tabelle 5) sowie 15 U µl⁻¹ DpnI (Tabelle 4) und wurden bei 37 °C für 3 h bzw. über Nacht inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym erfolgte bei 75 °C für 15 min. Der inaktivierte Restriktionsansatz wurde anschließend direkt für eine Transformation (2.2.1.4) verwendet.

Für die Erzeugung der iLOV-Mutantenbibliothek wurde der Vektor pET28a_EILPOR (Tabelle 2) sowie das aus dem Gel extrahierte (2.2.2.7) iLOV-SSM PCR-Produkt (2.2.2.3) mit NdeI und SalI (Tabelle 4) hydrolysiert. Die Ansätze (V = 60 µL) enthielten ca. 1 µg DNA der jeweiligen 10 U µl⁻¹ Restriktionsendonuklease und 1x Puffer Orange. Die Ansätze wurden bei 37 °C für 3,5 h inkubiert. Anschließend wurde der Restriktionsansatz mittels Agarose-

Gelelektrophorese (2.2.2.6) aufgetrennt und das Vektorfragment sowie das hydrolysierte PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert (2.2.2.7).

2.2.2.5. Ligation

Da bei einem Restriktionsverdau (2.2.2.4) am Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment (*Insert*) am 5'- und 3'-Ende der DNA kompatible, überhängende Enden (*sticky-ends*) gebildet werden, können diese durch eine Ligation, katalysiert durch die T₄-DNA-Ligase, miteinander verknüpft werden.

Ligationsreaktionen (V = 50 µL) enthielten 50 ng Vektor-DNA versetzt mit entsprechender Menge *Insert*-DNA, in einem molaren Verhältnis von 3:1, 5 U T₄-DNA-Ligase und 1x T₄-Ligasepuffer (Tabelle 5). Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert und die Ligasereaktion mittels Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 5 min gestoppt. Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz der ddH₂O anstelle der *Insert*-DNA enthielt. Zur Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek wurden elektrokompente *E. coli* NEB 10-beta Zellen (2.2.1.5) mit 5 µL des Ligationsansatzes transformiert.

2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Reaktionen (2.2.2.3) und Restriktionsansätzen (2.2.2.4) wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Diese dient zur Trennung der Nukleinsäuren entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld. Da Nukleinsäuren gleichmäßig negativ geladen sind, ist das Trennverhalten abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der Agarosekonzentration des Gels, der Konformation der DNA sowie ihres Molekulargewichts. Die gelelektrophoretische Trennung erfolgte in Agarosegelen mit einer Agarosekonzentration von 1 % (w/v) in 0,5x TBE-Puffer. Die DNA im Gel wurde mit 0,005 % (v/v) Midori-Green Advance (MGA, Tabelle 5) gefärbt. Midori-Green ist ein DNA/RNA Fluoreszenzfarbstoff, der weder kanzerogen noch toxisch ist. Er interkaliert in die DNA und emittiert, bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda_{\text{ex}} \sim 300 \text{ nm}$), Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums ($\lambda_{\text{em}} \sim 500 \text{ nm}$). Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden alle Proben mit DNA-Probenpuffer „DNA Gel Loading Dye (6x)“ (Tabelle 5) versetzt. Als DNA-Molekulargewichtsstandard wurden 5 µl „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ (Tabelle 5) verwendet. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese in 0,5x TBE-Puffer bei einer Spannung von 100 V für 30 min. Die Agarosegele wurden mithilfe einer

Videodokumentationsanlage (EagleEye II, Stratagene, Amsterdamm, Niederlande) dokumentiert.

TBE-Puffer (2,5x)			Agarosegel (1x)		
89	mM	Tris	4	g	Agarose
89	mM	Borsäure	400	mL	0,5x TBE-Puffer
2,5	mM	EDTA	5	µL	MGA

2.2.2.7. DNA-Gelextraktion

Für die Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek wurden die PCR amplifizierten (2.2.2.3) iLOV-SSM-DNA-Fragmente aus Agarosegelen (2.2.2.6) mittels Gelextraktion extrahiert. Die entsprechenden DNA-Banden wurden mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und anschließend mit dem „innuPREPDOUBLEpure Kit“ der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte abweichend vom Herstellerprotokoll mit 50 µL 65 °C warmem ddH₂O.

2.2.2.8. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte mit einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm.

2.2.2.9. Konzentrierung von DNA-Lösungen

Wässrige DNA-Lösungen zur Erstellung der iLOV-Mutantenbibliothek wurden bei 30 °C unter Vakuum mithilfe eines Eppendorf® centrifugal vacuum concentrator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) konzentriert.

2.2.2.10. Erstellung der iLOV Mutantenbibliothek

Nach der Erstellung der degenerierten NNK-Primer (Tabelle 3) zur Sättigung der Positionen 392, 487 und 489 wurde die iLOV-SSM-Mutantenbibliothek mittels Standard-PCR (2.2.2.3) erzeugt. Als Template diente der iLOV-Wildtyp (Tabelle 2). Die PCR-Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.6) überprüft und aus dem Gel extrahiert

(2.2.2.7). Die iLOV-SSM-Insert DNA-Lösungen wurden vereinigt und konzentriert (2.2.2.9). Da der iLOV-SSM Genabschnitt in einen pET28a-Zielvektor ligiert werden sollte, wurden das pET28a-*E/LP*OR Plasmid sowie die konzentrierte iLOV-SSM-Insert-DNA-Lösung mit den Restriktionsenzymen SallI und NdeI (Tabelle 4) hydrolysiert (2.2.2.4). Die resultierenden DNA-Fragmente wurden per Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.6) aufgetrennt und überprüft. Das iLOV-SSM-Insert und der pET28a-Zielvektor wurden aus dem Gel extrahiert (2.2.2.7). Anschließend wurden die restrigierten iLOV-SSM DNA-Fragmente mit dem entsprechenden pET28a-Zielvektor ligiert (2.2.2.5). Der Erfolg der Ligation wurde mithilfe einer Testrestriktion (2.2.2.4) überprüft. Der Erfolg der Ligation wurde mithilfe einer Testrestriktion (2.2.2.4) überprüft. Anschließend wurden elektrokompetente beta-10 *E. coli* Zellen mit dem Ansatz transformiert (2.2.1.5), auf SOC-Agarplatten unter Selektionsdruck (K_{50}) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kolonien auf den Agarplatten gezählt, mit LB-Medium von der Platte gewaschen und in sterilen 2 mL Reaktionsgefäßen gesammelt (2.2.2.11). Anschließend wurden alle Zellen geerntet (RT, 12.000 UpM, 1 min) und die iLOV-SSM Plasmide isoliert (2.2.2.1). Die Plasmid-DNA aller Ansätze wurde vereinigt, konzentriert (2.2.2.9) und deren Konzentration bestimmt (2.2.2.8).

2.2.2.11. Isolation von Plasmid-DNA von Transformationsplatten zur Erstellung einer Mutantenbibliothek

Zur Herstellung der iLOV-Mutantenbibliothek wurden die Transformationsplatten (2.2.1.5) geviertelt, das Viertel mit den augenscheinlich wenigsten Kolonien gezählt und das Ergebnis mit vier multipliziert. Auf diese Weise wurde die Anzahl der Kolonien pro Transformationsplatte bestimmt, um eine Schätzung der Bibliotheksgröße vornehmen zu können. Anschließend wurden 1 mL LB-Medium (2.1.2.2) pro Transformationsplatte hinzugegeben, alle Klone mithilfe eines Glasspatels vorsichtig von der Platte gewaschen und die Zellen in sterile 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Dieser Vorgang wurde ein- bis zweimal Mal wiederholt, bis möglichst alle Kolonien von den Platten gewaschen waren. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 16.060 xg für 1 min sedimentiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA wie in 2.2.2.7 beschrieben isoliert. Alle Aliquots wurden vereinigt, konzentriert (2.2.2.9), die Plasmidkonzentration bestimmt (2.2.2.8) und an die AG Schwaneberg der RWTH Aachen für weitere Experimente übergeben.

2.2.2.12. FACS-Screening, Kultivierung, Lyse der sortierten Zellen und Mikrotiterplatten-Screening

Zur Vorbereitung der iLOV-Sättigungsmutagenesevarianten für das FACS-Screening wurde die Mutantenbibliothek vom Kooperationspartner Dr. Volkan Besirlioglu (AG Schwaneberg; RWTH Aachen) wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben angezogen und die Expression des iLOV-kodierenden Gens mittels IPTG induziert (2.2.1.2). Anschließend wurden die Expressionskulturen in einem 50 mL Reaktionsgefäß sedimentiert (4 °C, 3.220 xg, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 mL iLOV-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (4 °C, 11.363 xg, 2 min). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das resuspendierte Pellet wurde dann bis zu einer Ereignisrate von 1.500 Ereignissen pro Sekunde am Durchflusszytometer (Influx, Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) verdünnt und analysiert (2.2.5.8). Die vielversprechendsten Varianten wurden anschließend auf LB_{Kan}-Agarplatten ausplattiert und in Mikrotiterplatten (MTP) inkubiert (2.2.1.1 und 2.2.1.2). Die Zellkulturen wurden sedimentiert (4 °C, 3.220 xg, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet jeweils in 150 µL Lysozymlösung (1 mg mL⁻¹ Lysozym in iLOV-Puffer) suspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte in einem MTP-Schüttler (37 °C, 900 UpM, 1 h) bei 70 % Luftfeuchtigkeit. Anschließend wurden die lysierten Zellsuspensionen zentrifugiert (4 °C, 3.220 xg, 15 min). Für die Fluoreszenzmessungen wurden 20 µL des Überstands mit 80 µL iLOV-Puffer in neue 96-Well-Platten überführt und mithilfe eines MTP-Fluoreszenzspektrophotometers gemessen (2.2.5.8). Die Anregung erfolgte bei 450 nm, mit einem Anregungsspalt bei 16 nm bzw. Emissionsspalt von 10 nm. Die Fluoreszenzspektren wurden im Bereich von 475-650 nm aufgenommen.

iLOV-Puffer, pH 7,0

100	mM	Tris
10	mM	NaCl

PBS-Puffer, pH 7,4

1,06	mM	KH ₂ PO ₄
2,97	mM	Na ₂ HPO ₄
155,17	mM	NaCl

2.2.2.13. Sequenzierung

Alle Zielensequenzen der bestehenden und neu generierten Plasmide (V = 15 µL) wurden mit einer Konzentration von 30-100 ng µL⁻¹ unter Verwendung von Standardsequenzier-Oligonukleotiden (T₇ und T₇-term) (Tabelle 3) von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) sequenziert.

2.2.3. Biochemische Methoden

2.2.3.1. Proteinreinigung und Probenpräparation für die unterschiedlichen Experimente

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Proteine und Proteinvarianten für unterschiedliche Experimente präpariert, auf unterschiedliche Weise gereinigt und für die jeweilige Messung vorbereitet. Im Folgenden wird daher die Präparation der verschiedenen Proteine und Proteinvarianten kurz skizziert und anschließend werden die einzelnen Protokollschritte detaillierter beschrieben.

2.2.3.1.1. Präparation von *AsLOV2*-Varianten zur Analyse der Dunkelrückkehr

Für die Präparation von *AsLOV2* Wildtyp und der *AsLOV2*-Varianten zur Analyse der Dunkelrückkehrkinetik (Abbildung 14) wurden die Expressionskulturen (2.2.1.2) zunächst sedimentiert (4 °C, 6.000 xg, 20 min). Das Zellpellet wurde als 10 %ige Zellsuspension mit Ni-NTA-Lysepuffer A, wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben, resuspendiert und aufgeschlossen. Die zielproteinhaltige Lösung wurde mithilfe von Tropfsäulchen im kleinen Maßstab gereinigt (2.2.3.3.1) und in Ni-NTA-Elutionspuffer A eluiert. Die gereinigte Eluatprobe wurde anschließend auf ein Volumen von 2,5 mL konzentriert (2.2.3.4), mittels einer PD-10 Säule entsalzt (2.2.3.5.1) und in Lagerpuffer A überführt. Als finaler Schritt der Probenpräparation wurden die Proteinproben in ein lichtundurchlässiges 15 mL Reaktionsgefäß überführt. Für den Übergang vom Licht- in den Dunkelzustand wurde das Protein bei RT im Dunkeln für einen Tag gelagert, anschließend mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -18 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (2.2.5).

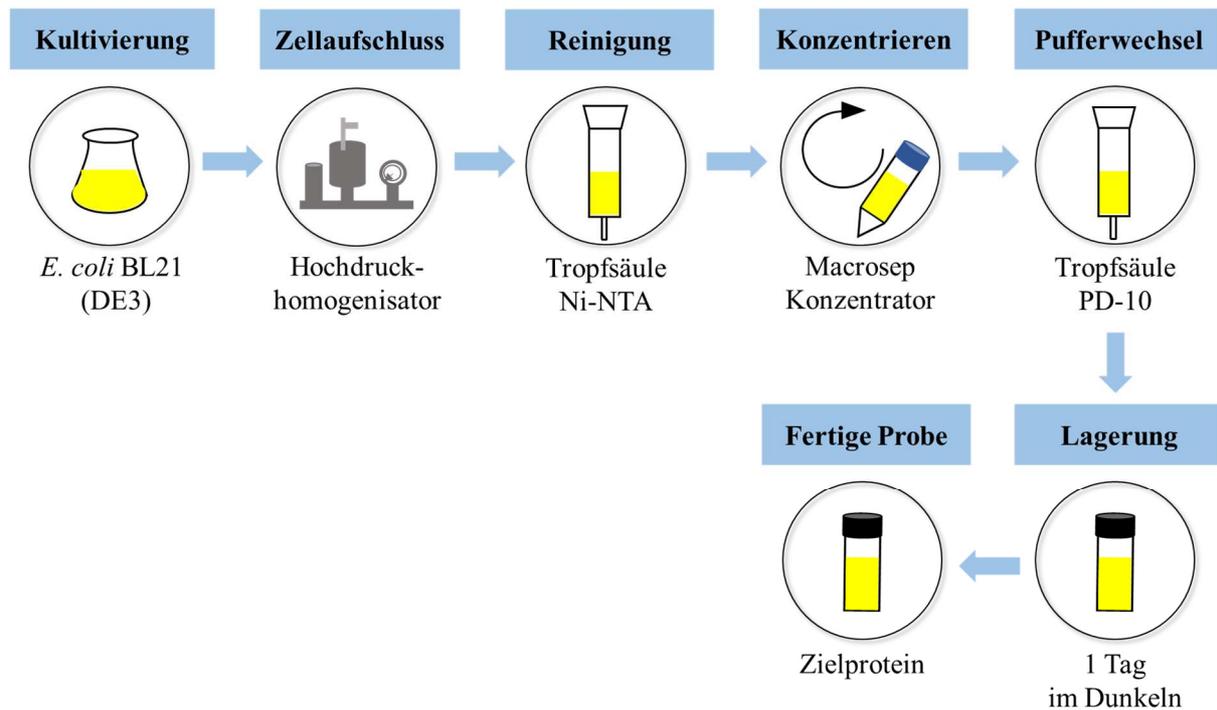


Abbildung 14: Proteinreinigung und Probenpräparation der *AsLOV2*-Varianten für die Analyse der Dunkelrückkehrkinetik. Die Abbildung illustriert schematisch die Schritte der Probenpräparation von Kultivierung, IMAC-Reinigung, Konzentration und Entsalzung bis hin zu Lagerung (übernommen und verändert nach Hemmer [129]).

Ni-NTA Lysepuffer A, pH 8,0

50	mM	Na ₂ HPO ₄
300	mM	NaCl

Ni-NTA Elutionspuffer A, pH 8,0

50	mM	Na ₂ HPO ₄
300	mM	NaCl
250	mM	Imidazol

Lagerpuffer A; pH 8,0

50	mM	Tris
1	mM	EDTA
5	mM	DTT

2.2.3.1.2. Präparation von *DsLOV* und *AsLOV2* zur Untersuchung der Adduktbildung

Für die Präparation der *DsLOV*-M49S, *DsLOV*-C72S sowie der *AsLOV2*-C450S und *AsLOV2*-V416T Varianten zur Untersuchung der Adduktbildung wurden die entsprechenden Expressionskulturen (2.2.1.2) zunächst sedimentiert (4 °C, 6.000 xg, 20 min). Das Zellpellet wurde als 20 %ige Zellsuspension mit Ni-NTA-Lysepuffer A wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben resuspendiert und aufgeschlossen. Die zielproteinhaltige Lösung wurde mittels IMAC-Reinigung an einer FPLC-Anlage (2.2.3.3.2) unter Verwendung des Ni-NTA

Lysepuffers A und Ni-NTA Elutionspuffers A gereinigt. Mit demselben FPLC-System (2.2.3.5.2) erfolgte dann im großen Maßstab der Pufferwechsel in Lagerpuffer C. Anschließend wurden die zielproteinhaltigen Lösungen mittels Macrosep Konzentratoren (2.2.3.4) auf ein Volumen von 5-10 mL konzentriert und für ca. 30 min im Dunkeln bei RT gelagert. Zur Kontrolle, ob die Proben komplett im Dunkelzustand vorlagen wurde eine UV/Vis-spektrophotometrische Testmessung (2.2.5.1) durchgeführt. Anschließend wurden zur Qualitätskontrolle UV/Vis-Spektren des Proteins im Dunkel-/ und Lichtzustand (2.2.5.1) in Lagerpuffer C gemessen. Anhand des UV/Vis-Spektrums des Dunkelzustands wurden die Proteinkonzentration und die Flavin-Beladung (2.2.5.1.1) berechnet. Die Dunkelrückkehr der Proteine wurde durch eine kontinuierliche Absorptionsmessung bei 485 nm (2.2.5.3.1) verfolgt. Alle Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Versendung an den Kooperationspartner Dr. Roger-Jan Kutta (Universität Regensburg) gelagert.

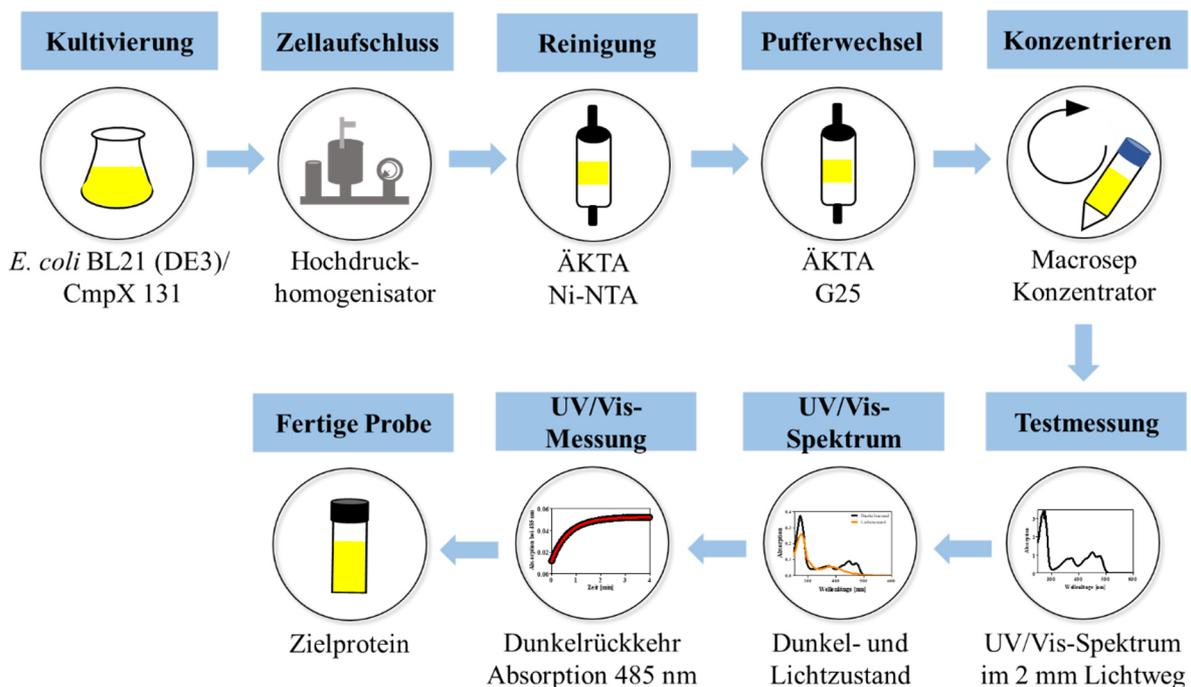


Abbildung 15: Proteinreinigung und Probenpräparation von DsLOV und AsLOV2-Varianten zur Untersuchung der Adduktbildung. Die Abbildung illustriert schematisch die Schritte der Probenpräparation von Kultivierung, IMAC-Reinigung, Entsalzung, Konzentrierung sowie die Schritte zur Qualitätskontrolle mittels UV/Vis-spektrophotometrischer Messung (übernommen und verändert nach Hemmer [129]).

Ni-NTA Lysepuffer A, pH 8,0

50	mM	Na ₂ HPO ₄
300	mM	NaCl

Ni-NTA Elutionspuffer A, pH 8,0

50	mM	Na ₂ HPO ₄
300	mM	NaCl
250	mM	Imidazol

Lagerpuffer C; pH 8,0

50	mM	Tris
10	mM	NaCl

2.2.3.1.3. Präparation der potenziell rot-/ und blauverschobenen iLOV-Varianten aus dem FACS-Screening

Zur Reinigung der mittels FACS-Screenings (2.2.5.8) identifizierten iLOV-Varianten (Abbildung 16) wurden die entsprechenden Expressionskulturen (2.2.1.2) zunächst sedimentiert (4 °C, 6.000 *xg*, 20 min). Das Zellpellet wurde als 20 %ige Zellsuspension mit Ni-NTA-Lysepuffer A wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben resuspendiert und aufgeschlossen. Die zielproteinhaltige Lösung wurde mithilfe von Tropfsäulchen im kleinen Maßstab gereinigt (2.2.3.3.1) und in Ni-NTA-Elutionspuffer A eluiert. Die gereinigte Eluatprobe wurde anschließend auf ein Volumen von 2,5 mL konzentriert (2.2.3.4), mittels einer PD-10 Säule entsalzt (2.2.3.5.1) und in Lagerpuffer D überführt. Als finaler Schritt der Probenpräparation wurden die Proteinproben in ein lichtundurchlässiges 15 mL Reaktionsgefäß überführt und bei -18 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert (2.2.5).

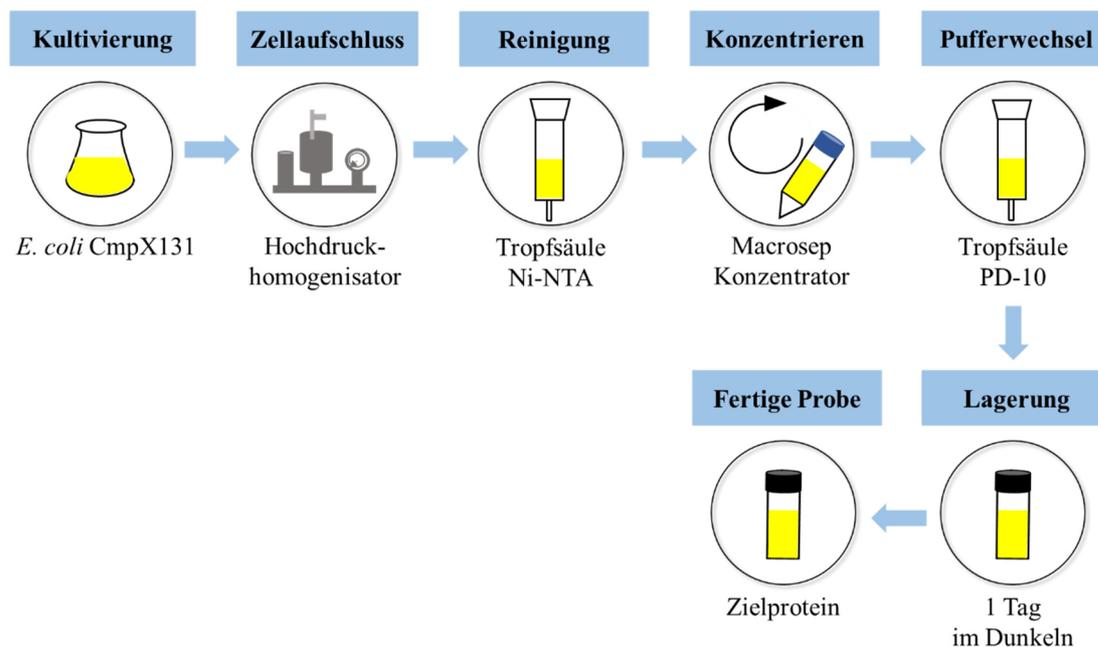


Abbildung 16: Proteinreinigung und Probenpräparation der iLOV-Varianten. Die Abbildung illustriert schematisch die Schritte der Probenpräparation von Kultivierung, IMAC-Reinigung, Konzentration und Entsalzung bis hin zu Lagerung (übernommen und verändert nach Hemmer [129]).

Ni-NTA Lysepuffer A, pH 8,0

50	mM	Na ₂ HPO ₄
300	mM	NaCl

Ni-NTA Elutionspuffer A, pH 8,0

50	mM	Na ₂ HPO ₄
300	mM	NaCl
250	mM	Imidazol

Lagerpuffer D; pH 7,0

10	mM	Tris
10	mM	NaCl

2.2.3.1.4. Präparation von *PpSB1*-LOV für QENS-Analysen

Für die Präparation der *PpSB1*-LOV Probe für QENS-Analysen (Abbildung 17) wurden die Expressionskulturen (2.2.1.2) zunächst sedimentiert (4 °C, 2.900 *xg*, 20 min). Das Zellpellet wurde als 10 %ige Zellsuspension mit Ni-NTA-Lysepuffer B wie in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben resuspendiert und aufgeschlossen. Die zielproteinhaltige Lösung wurde mittels IMAC-Reinigung an einer FPLC-Anlage (2.2.3.3.2) unter Verwendung des Ni-NTA Lysepuffers B und Ni-NTA Elutionspuffers B gereinigt. Mit demselben FPLC-System (2.2.3.5.2) erfolgte im großen Maßstab der Pufferwechsel in Lagerpuffer B. Anschließend wurde die zielproteinhaltige Lösung mittels Macrosep Konzentratoren (2.2.3.4) auf ein Volumen von 7 mL konzentriert. Um die Proteinprobe vom Lichtzustand in den Dunkelzustand zu überführen, wurde die Probe bei RT für 4 Tage im Dunkeln gelagert.

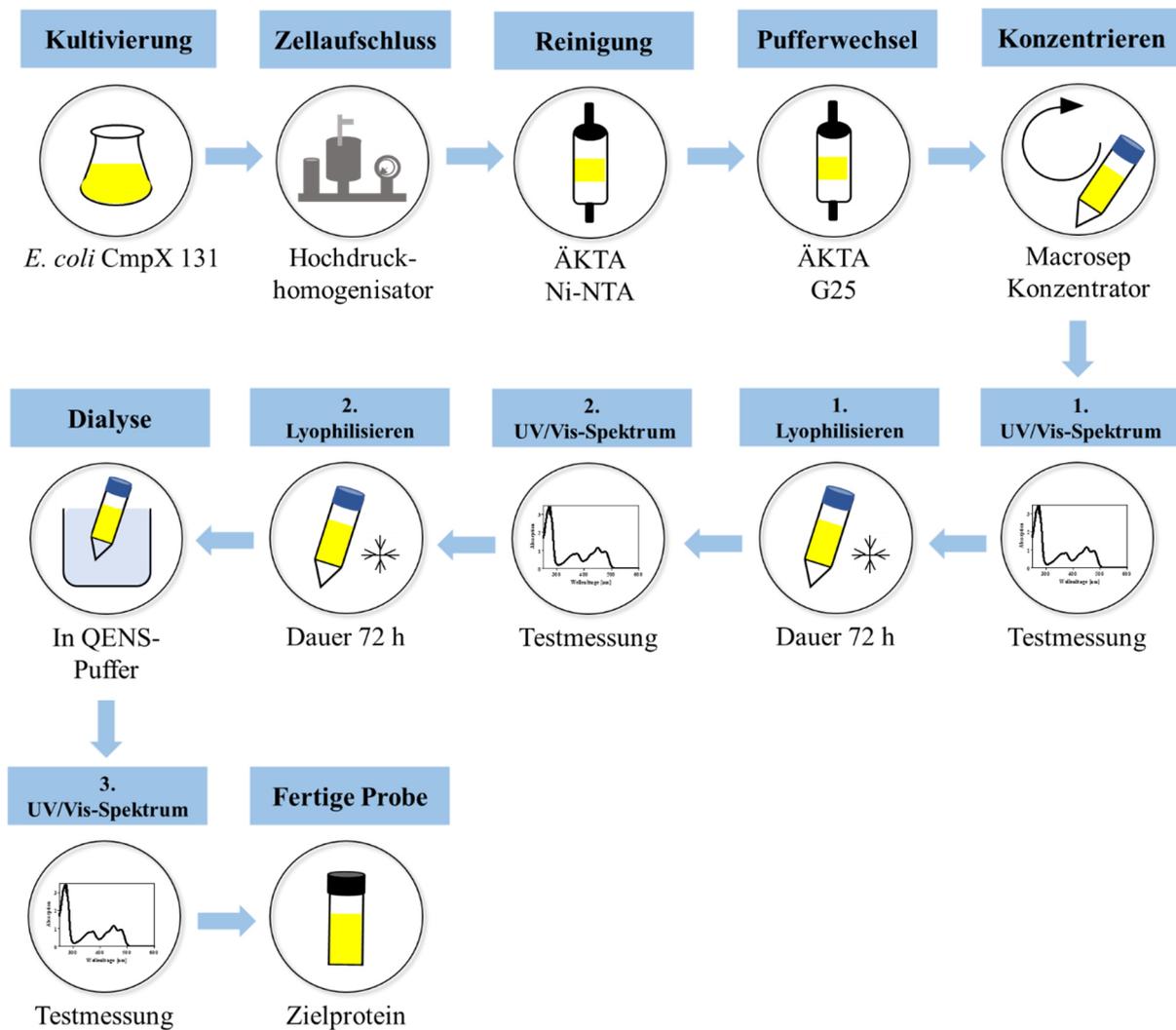


Abbildung 17: Proteinreinigung und Probenpräparation von *PpSB1-LOV* für QENS-Messungen. Die Abbildung illustriert schematisch die Schritte der Probenpräparation von Kultivierung, IMAC-Reinigung, Entsalzung, Konzentrierung, Dialyse, sowie die Lyophilisierungsschritte zur Überführung in D₂O, die Schritte zur Qualitätskontrolle mittels UV/Vis-spektrophotometrischer Messung bis hin zur Präparation der finalen Probe (übernommen und verändert nach Hemmer [129]).

Anschließend wurde mittels UV/Vis-Spektrophotometrie (2.2.5.1) mit Lagerpuffer B kontrolliert, ob das Protein im Dunkelzustand vorlag. Danach wurde die Probe wie in Kapitel 2.2.3.6 beschrieben lyophilisiert und im ursprünglichen Volumen mit D₂O resuspendiert. Die letzten beiden Schritte wurden einmal wiederholt. Danach erfolgte eine Dialyse in QENS-Puffer mittels einer Slide-A-Lyzer Kassette (2.2.3.7), gefolgt von einer dritten UV/Vis-spektrophotometrischen Testmessung in QENS-Puffer. Anhand des aufgenommenen UV/Vis-Spektrums wurde die finale Proteinkonzentration und die Flavin-Beladung (2.2.5.1.1) bestimmt. Die *PpSB1-LOV* Probe wurde schockgefroren und bei -80 °C bis zur Übergabe an den Kooperationspartner Dr. Andreas Stadler (JCNS-1/IBI-8, FZ-Jülich) für weiterführende Experimente (2.2.5.6 und 2.2.5.7) gelagert. Zur Qualitätskontrolle wurde die

Adduktlebenszeit der Probe in QENS-Puffer über Aufnahme sequenzieller UV/Vis-Spektren (2.2.5.3.2.1) sowie die Dunkelrückkehrkinetik bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt (2.2.5.3.2) und das zeitabhängige Entfaltungverhalten mittels nanoDSF (2.2.5.5) untersucht.

Ni-NTA Lysepuffer B, pH 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
300	mM	NaCl
10	mM	Imidazol
1	mM	DTT

Ni-NTA Elutionspuffer B, pH 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
300	mM	NaCl
250	mM	Imidazol
1	mM	DTT

Lagerpuffer B; pH 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT

QENS-Puffer; pD 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT
		add. D ₂ O

2.2.3.2. Zellaufschluss

Alle Expressionskulturen (2.2.1.2) wurden wie in 2.2.3.1 beschrieben mittels Zentrifugation sedimentiert und das Pellet bei -18 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Gefrorene Pellets wurden auf Eis aufgetaut und als 10-20 %ige (w/v) Zellsuspension im jeweiligen Lysepuffer (2.2.3.1) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mithilfe eines Hochdruckhomogenisators EmulsiFlex-C5 (Avestin, Ottawa, Ontario, Kanada) in vier Zyklen bei 1.000-1.500 bar. Unlysierte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (4 °C, 20.000 xg, 25 min) von löslichem Protein getrennt. Das Zielprotein wurde mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) (2.2.3.3.1 bzw. 2.2.3.3.2) aus der löslichen Fraktion gereinigt. Das Pellet wurde im ursprünglichen Volumen des jeweiligen Lysepuffers (2.2.3.1) resuspendiert und ein Aliquot für SDS-PAGE Analysen (2.2.4.2) verwahrt.

2.2.3.3. Proteinreinigung mittels IMAC

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Proteine mittels immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an Ni-NTA-Material gereinigt. Dieses chromatographische Trennverfahren beruht auf der Interaktion eines Analyten (hier:

Hexahistidin His₆-Tag der Zielproteine) mit einem geeigneten Liganden (hier: Nitrilotriessigsäure (NTA) gebundene Nickelionen (Ni²⁺). Das His₆-Tag tragende Zielprotein bindet so an das Säulenmaterial und kann kontrolliert durch Zugabe von Imidazol von der Säule eluiert werden.

2.2.3.3.1. IMAC Reinigung mittels Tropfsäulchen im kleineren Maßstab

Selbstgepackte IMAC-Tropfsäulen (Größe: 1,5 x 2,8 cm, Gelbettvolumen: 5 mL, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) wurden unter Verwendung des Gelmaterials Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden, Deutschland) für die Proteinreinigung von *AsLOV2* und dessen Varianten (2.2.1.2) sowie der *iLOV*-Varianten verwendet. Die Säulen wurden mit drei Säulenvolumen Ni-NTA Lysepuffer A (2.2.3.1.1 bzw. 2.2.3.1.3) vor jeder Reinigung equilibriert. Zu Beginn wurde die zielproteinhaltige Lösung (Ü; 2.2.3.1.1 bzw. 2.2.3.1.3) über die IMAC-Säule gegeben. Der Durchlauf (D) wurde für weitere Analysen aufgefangen. Um unspezifisch gebundene Verunreinigungen/Proteine von der Säule zu entfernen, wurde diese anschließend mit zehn Säulenvolumen 20 mM Imidazol-haltigen Waschpuffers (92 % Ni-NTA Lysepuffer A und 8 % Ni-NTA Elutionspuffer A) (2.2.3.1.1 bzw. 2.2.3.1.3) gewaschen. Die Waschfraktion (W) wurde für weitere Analysen ebenfalls aufgefangen. Am Ende wurden mit sechs Säulenvolumen Ni-NTA Elutionspuffer A die Zielproteine von der Säule eluiert (E_{NTA}).

Nach der Proteinreinigung wurden die Tropfsäulchen mit zwei bis drei Säulenvolumen 0,5 M NaOH gereinigt und in 20 % Ethanol gelagert. Von allen Reinigungsschritten (Ü, D, W und E_{NTA}) wurde ein Aliquot gesammelt und mittels SDS-PAGE (2.2.4.2) analysiert. Die gereinigten Zielproteinfraktionen wurden anschließend konzentriert (2.2.3.4) und entsalzt (2.2.3.5.1).

2.2.3.3.2. IMAC Reinigung mittels FPLC im größeren Maßstab

Die Reinigung der *PpSB1-LOV*, *DsLOV*-Varianten, *AsLOV2-V416T* und *AsLOV2-C450S* erfolgte unter Verwendung des Gelmaterials Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden, Deutschland) und eines XK 26 Säulenkörpers (Größe: 2,6 x 12,0 cm, Gelbettvolumen: 77 mL; GE-Healthcare, Chicago, Illinois, USA) mittels des FPLC-Systems ÄKTA purifier (GE-Healthcare, Chicago, Illinois, USA). Die Säule wurde vor der Verwendung mit dem jeweiligen Lysepuffer (2.2.3.1.2 bzw. 2.2.3.1.4) equilibriert. Mit einem Fluss von 1-10 mL min⁻¹ wurde die zielproteinhaltige Lösung (Ü, 2.2.3.2) auf die Säule aufgetragen und

der Durchfluss (D) in einem separaten Becherglas aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit dem jeweiligen 20 mM Imidazol-haltigen Waschpuffer (2.2.3.1.2 bzw. 2.2.3.1.4), Mischfunktion ÄKTA purifier) und einem Fluss von 10-20 mL min⁻¹ gewaschen, um unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen (Waschfraktion, W). Die Elution des Zielproteins erfolgte mithilfe des jeweiligen Elutionspuffers (2.2.3.1.2 bzw. 2.2.3.1.4) (Elutionsfraktionen, E_{NTA}; Fluss: 10 mL min⁻¹).

Nach der Proteinreinigung wurden alle IMAC-Säulen mit zwei bis drei Säulenvolumen 0,5 M NaOH gereinigt und in 20 % Ethanol gelagert. Von allen Reinigungsschritten (Ü, D, W und E_{NTA}) wurde ein Aliquot gesammelt und mittels SDS-PAGE (2.2.4.2) analysiert. Die gereinigten Zielproteinlösungen wurden anschließend konzentriert (2.2.3.4) und entsalzt (2.2.3.5.2).

2.2.3.4. Konzentrierung von Proteinlösung

Die gereinigten Proteinlösungen (2.2.3.3) wurden mithilfe von Macrosep® Advance Centrifugal Device Zentrifugationskonzentratoren (Pall Corporation, Port Washington, New York, USA; Ausschlussgröße: 10 kDa) konzentriert. Die Zentrifugationskonzentratoren wurden nach Herstellerangaben vor jeder Verwendung gereinigt. Die Proteinlösung wurden nach Herstellerangaben in einem Ausschwingrotor einer Kühlzentrifuge bei 15 °C und 518 *xg* bis zum gewünschten Volumen konzentriert. Für die Konzentration einiger Proben wurden die Konzentratoreinheiten mit Alufolie umwickelt, um sicherzustellen, dass die Proben während des Konzentrationsschrittes nicht in den Lichtzustand übergehen.

2.2.3.5. Pufferwechsel und Entsalzung

2.2.3.5.1. Pufferwechsel und Entsalzung im kleinen Maßstab mittels PD-10 Säulen

Die mittels Tropfsäulchen gereinigten (2.2.3.3) und konzentrierten (2.2.3.4) *AsLOV2* Proteinlösungen zur Analyse der Dunkelrückkehrkinetik (2.2.3.1.1) sowie die *iLOV*-Varianten (2.2.3.1.3) wurden mittels PD-10 Desalting Columns (Größe: 1,4 x 5 cm, Gelbettvolumen: 8,3 mL; GE-Healthcare, Chicago, Illinois, USA) nach Herstellerangaben entsalzt und in Lagerpuffer A (2.2.3.1.1) bzw. in Lagerpuffer D (2.2.3.1.3) überführt. Anschließend wurden alle Proben bei RT für einen proteinspezifischen Zeitraum im Dunkeln gelagert, schockgefrostet und bei -18 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.3.5.2. Pufferwechsel und Entsalzung im großen Maßstab mittels FPLC

Alle gereinigten Proteinproben zur Untersuchung der Adduktbildung (2.2.3.1.2) und für die QENS-Analysen (2.2.3.1.4) wurden mittels eines FPLC-Systems ÄKTA purifier (GE-Healthcare, Chicago, Illinois, USA) unter Verwendung des XK 50-60 Säulenkörpers (Größe: 5 x 32 cm, Gelbettvolumen: 628 mL; GE-Healthcare, Chicago, Illinois, USA) und dem Säulenmaterial Sephadex G-25 M (GE-Healthcare, Chicago, Illinois, USA) entsalzt und in ihre experimentell bedingten Folgepuffer (Details siehe 2.2.3.1.2 bzw. 2.2.3.1.4) überführt. Vor dem Auftrag der gereinigten Proteinlösung (2.2.3.3.2) wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen des entsprechenden Puffers equilibriert und anschließend mit einer Flussrate von 5-10 mL min⁻¹ aufgetragen. Für die Elution des Zielproteins wurde die Säule mit dem entsprechenden Ziel-Puffer gespült (Details siehe 2.2.3.1.2 bzw. 2.2.3.1.4). So konnte das Protein aufgrund seiner Größe vom Salz getrennt werden. Am Ende wurden alle gesammelten proteinhaltigen Fraktionen vereinigt, die Konzentration bestimmt (2.2.4.1) und so weit wie nötig konzentriert (2.2.3.4). Die Säule wurde mit 0,2 M NaOH gereinigt und anschließend in 20 % Ethanol gelagert.

2.2.3.6. Gefriertrocknung von Proteinproben

Die *PpSB1-LOV* Proteinprobe wurde nach der Präparation (2.2.3.1.4) und Lagerung im Dunkeln mittels UV/Vis-Spektrophotometrie auf einen vollständig ausgebildeten Dunkelzustand überprüft (2.2.5.1) und lyophilisiert. Dabei wurde die Proteinprobe in ein 50 mL Reaktionsgefäß überführt, mithilfe von flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80 °C für mindestens einen Tag gelagert. Anschließend wurde die gefrorene Proteinprobe mithilfe der Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2 (Steris GmbH, Hürth, Deutschland) für mindestens 72 h lyophilisiert (Enddruck: 2,4 - 2,7 x 10⁻¹ mbar) und bei -18 °C gelagert.

2.2.3.7. Dialyse

Vor der Dialyse der *PpSB1-LOV* Probe (2.2.3.1.4) wurde die lyophilisierte Probe im ursprünglichen Volumen mit D₂O resuspendiert und bei RT für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (RT, 16.060 xg, 2 min) und der Überstand weiterverwendet. Die Dialyse der Proteinprobe erfolgte mithilfe eines Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices (3,5 K MWCO, 2 mL Probe; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die Probe wurde hierbei nach Herstellerangaben dreimal gegen 50 mL QENS-Puffer dialysiert.

Anschließend wurde die Probe erneut mittels UV/Vis-Spektrophotometrie (2.2.5.1) analysiert, schockgefrostet und bei -18 °C gelagert. Der Puffer des dritten Dialyseschritts wurde für künftige QENS-Analysen als Referenzpuffer ebenfalls bei -18 °C aufbewahrt.

2.2.4. Analytische Verfahren

2.2.4.1. Konzentrationsbestimmung von Fraktionen einer Proteinreinigung für SDS-PAGE Analysen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen zur Analyse von Proteinreinigungsschritten für SDS-PAGE Analysen erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm mithilfe eines NanoDrop 2000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{Protein280 nm}}$) der jeweilige Proteine (Tabelle 7), bestimmt anhand der Aminosäuresequenz mittels des Onlinetools ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) [269]. Die Messung der Proteinkonzentration und Flavin-Beladung gereinigter LOV-Proteine erfolgte durch Aufnahme von UV/Vis-Spektren (siehe 2.2.5.1 für Details).

Tabelle 7: Die in dieser Arbeit verwendeten Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte. Nachfolgend sind alle molaren Extinktionskoeffiziente und Molekulargewichte, berechnet mithilfe des Internettools ProtParam, von allen verwendeten Proteinen aufgelistet.

Bezeichnung	Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Molekulargewicht (Da)
<i>As</i> LOV2	9.970	18.792,20
<i>As</i> LOV2-T406C	10.095	18.794,24
<i>As</i> LOV2-T406V	9.970	18.790,23
<i>As</i> LOV2-R410P	9.970	18.733,13
<i>As</i> LOV2-K413A	9.970	18.735,11
<i>As</i> LOV2-K413C	10.095	18.767,17
<i>As</i> LOV2-N414C	10.095	18.781,24
<i>As</i> LOV2-N414E	9.970	18.807,22
<i>As</i> LOV2-N414G	9.970	18.735,15
<i>As</i> LOV2-N414L	9.970	18.791,26
<i>As</i> LOV2-N414M	9.970	18.809,29
<i>As</i> LOV2-V416E	9.970	18.822,19
<i>As</i> LOV2-V416M	9.970	18.824,26
<i>As</i> LOV2-V416T	9.970	18.794,18
<i>As</i> LOV2-I427N	9.970	18.793,15

Bezeichnung	Extinktionskoeffizient (M⁻¹ cm⁻¹)	Molekulargewicht (Da)
<i>As</i> LOV2-I427T	9.970	18.780,15
<i>As</i> LOV2-L446M	9.970	18.810,24
<i>As</i> LOV2-L446Q	9.970	18.807,17
<i>As</i> LOV2-L446S	9.970	18.766,12
<i>As</i> LOV2-N449A	9.970	18.749,18
<i>As</i> LOV2-N449E	9.970	18.807,22
<i>As</i> LOV2-N449I	9.970	18.791,26
<i>As</i> LOV2-N449K	9.970	18.806,27
<i>As</i> LOV2-N449T	9.970	18.779,20
<i>As</i> LOV2-C450S	9.970	18.776,14
<i>As</i> LOV2-E475T	9.970	18.764,19
<i>As</i> LOV2-L496K	9.970	18.807,22
<i>As</i> LOV2-D501G	9.970	18.734,17
<i>As</i> LOV2-D501W	15.470	18.863,33
<i>As</i> LOV2-D501Y	11.460	18.840,29
<i>As</i> LOV2-D515L	9.970	18.790,27
<i>As</i> LOV2-Q513H	9.970	18.801,21
<i>As</i> LOV2-Q513P	9.970	18.761,19
<i>As</i> LOV2-Q513R	9.970	18.820,26
<i>As</i> LOV2-G528E	9.970	18.864,27
<i>As</i> LOV2-G528K	9.970	18.863,33
<i>As</i> LOV2-G528R	9.970	18.891,34
<i>As</i> LOV2-R410P/G528A	9.970	18.747,16
<i>As</i> LOV2-R410P/G528E	9.970	18.805,20
<i>As</i> LOV2-R410P/G528R	9.970	18.832,27
<i>As</i> LOV2-K413A/N414G	10.095	18.710,12
<i>As</i> LOV2-K413A/D501G	9.970	18.677,07
<i>As</i> LOV2-K413C/N414C	10.095	18.756,2
<i>As</i> LOV2-N414A/V416A	9.970	18.721,12
<i>As</i> LOV2-N414A/V416L	9.970	18.763,21
<i>As</i> LOV2-N414C/L496K	10.095	18.796,25
<i>As</i> LOV2-N414D/V416A	9.970	16.601,81
<i>As</i> LOV2-N414D/V416T	9.970	16.631,84
<i>As</i> LOV2-N414E/V416E	9.970	18.837,2
<i>As</i> LOV2-N414E/V416M	9.970	18.839,28
<i>As</i> LOV2-N414G/L446E	9.970	18.751,11
<i>As</i> LOV2-N414G/L446S	9.970	18.709,07
<i>As</i> LOV2-N414G/G528E	9.970	18.807,22

Bezeichnung	Extinktionskoeffizient (M⁻¹ cm⁻¹)	Molekulargewicht (Da)
<i>As</i> LOV2-N414L/V416L	9.970	18.805,29
<i>As</i> LOV2-N414L/H495L	9.970	18.767,28
<i>As</i> LOV2-N414L/Q513L	9.970	18.776,29
<i>As</i> LOV2-N414L/L514A	9.970	18.749,18
<i>As</i> LOV2-N414M/V416E	9.970	18.839,28
<i>As</i> LOV2-N414M/V416M	9.970	18.841,35
<i>As</i> LOV2-V416T/N449T	9.970	18.781,18
<i>As</i> LOV2-I427N/N449A	9.970	18.750,12
<i>As</i> LOV2-I427N/N449E	9.970	18.808,16
<i>As</i> LOV2-I427N/N449I	9.970	18.792,20
<i>As</i> LOV2-I427N/N449K	9.970	18.807,22
<i>As</i> LOV2-I427T/N449T	9.970	18.767,15
<i>As</i> LOV2-I427T/E475T	9.970	18.752,14
<i>As</i> LOV2-T438V/E475T	9.970	16.598,90
<i>As</i> LOV2-R442L/D515L	9.970	18.747,25
<i>As</i> LOV2-L446F/E475T	9.970	16.634,89
<i>As</i> LOV2-L446M/D501W	15.470	18.881,36
<i>As</i> LOV2-L446Q/D501Y	11.460	18.855,26
<i>As</i> LOV2-L446S/D501Y	11.460	18.814,21
<i>As</i> LOV2-N449T/Q513P	9.970	18.748,19
<i>As</i> LOV2-V463W/E475T	15.470	16.687,95
<i>As</i> LOV2-E475T/G528E	9.970	18.836,26
<i>As</i> LOV2-D501G/G528E	9.970	18.806,23
<i>As</i> LOV2-Q513R/G528R	9.970	18.919,40
<i>As</i> LOV2-Q513R/G528K	9.970	18.891,38
<i>As</i> LOV2-N414D/F415E/V416T	9.970	16.613,78
<i>As</i> LOV2-N414M/F415E/V416A	9.970	16.599,85
<i>As</i> LOV2-I427T/L446M/E475T	9.970	16.606,85
<i>Ds</i> LOV-M49S	7.450	16.793,81
<i>Ds</i> LOV-C72S	7.450	16.821,86
<i>Pp</i> SB1-LOV	14.565	18.587,79
iLOV	9.970	15.039,87
iLOV-Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493	15.470	14.729,65
iLOV-V392L/Q489S	9.970	15.012,84
iLOV-V392A/Q489A	9.970	14.954,76
iLOV-G487C/Q489A	9.970	15.028,90
iLOV-V392T/Q489G	9.970	14.970,76
iLOV-V392S/Q489C	9.970	15.002,82

Bezeichnung	Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Molekulargewicht (Da)
iLOV-V392C/G487S/Q489L	9.970	15.058,93

2.2.4.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode, bei der Proteine in einer Polyacrylamidgelmatrix unter denaturierenden Bedingungen in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichtes getrennt werden. SDS denaturiert die Proteine und bildet einen SDS-Proteinkomplex, dadurch kann die negative Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdecken. Aufgrund des konstanten Masse/Ladungsverhältnisses wandert der denaturierte Protein-SDS-Komplex im elektrischen Feld zur Anode, wodurch eine Trennung entsprechend des jeweiligen Molekulargewichtes erreicht wird.

In dieser Arbeit wurden selbst gegossene diskontinuierliche SDS-Gele mit 5 %igem Sammelgel und 12 %igem Trenngel, verwendet. Dabei dient das Sammelgel zur Fokussierung der Proteinproben und das Trenngel zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.2.4.2.1 beschrieben hergestellt. Pro Gelspur wurden jeweils 10 μL Probe bzw. 5 μL des PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 1x SDS-Laufpuffer zunächst bei einer Spannung von 100 V für 15 min und anschließend bei 150 V für 45 min durchgeführt.

Sammelgelpuffer, pH 6,8

0,5 M Tris-HCl

Trenngelpuffer, pH ,8

1,5 M Tris-HCl

5 %iges Sammelgel

0,83	mL	Rotiphorese Acrylamid/ Bisacrylamid Mix
1,3	mL	Sammelgelpuffer
2,8	mL	ddH ₂ O
50	μL	SDS (Endkonzentration: 10 % (w/v))
50	μL	APS (Endkonzentration: 10 % (w/v))
10	μL	TEMED

12 %iges Trenngel

4	mL	Rotiphorese Acrylamid/ Bisacrylamid Mix
2,5	mL	Trenngelpuffer
3,4	mL	ddH ₂ O
100	μL	SDS (Endkonzentration: 10 % (w/v))
100	μL	APS (Endkonzentration: 10 % (w/v))
10	μL	TEMED

SDS-Laufgelpuffer (10x)

250	mM	Tris-HCl
1	% (w/v)	SDS
1,92	M	Glycerin

2.2.4.2.1. SDS-Probenvorbereitung

Proteinproben der verschiedenen Reinigungsschritte (Ü, W, D, E_{NTA}, E_{G25}) wurden wenn möglich, auf eine Endkonzentration von 1 mg mL⁻¹ verdünnt und mit 1x SDS-Probepuffer angesetzt. Da eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 2000 Spektrophotometer (2.2.4.1) für unlösliche Proben (P) ungeeignet ist, wurden die entsprechenden Proben mit einem identischen Volumen wie die dazugehörigen löslichen Proteinproben (Ü) angesetzt. Deshalb können diese Banden nur relativ zueinander betrachtet werden. Außerdem kann keine Aussagen über die absolute Proteinmenge in der Probe getroffen werden. Vor dem Auftragen wurden alle SDS-Proben bei 99 °C für 5 min inkubiert.

SDS-Probepuffer (5x)

225	mM	Tris-HCl, pH 6,8
250	mM	Dithiothreitol
50	% (v/v)	Glycerin
5	% (v/v)	SDS
0,05	% (v/v)	Bromphenolblau

2.2.4.2.2. Färben von SDS-Gelele

Nach der Beendigung der Gelelektrophorese wurden alle SDS-Gele mit dd H₂O gewaschen. Anschließend erfolgte eine Färbung der Gele über Nacht in kolloidaler Coomassie-Brilliant-Blau G250 Färbelösung. Danach wurden die Gele zur Entfärbung erneut mit dd H₂O gewaschen. Die Dokumentation der SDS-Gele erfolgte mit der Videodokumentationsanlage CAMAG TLC VISUALIZER 2 (MuttENZ, Schweiz).

Kolloidal Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung [270]

10	% (v/v)	85 % <i>o</i> -Phosphorsäure
10	% (w/v)	Ammoniumsulfat
0,12	% (w/v)	Coomassie-Brilliant-Blau G250
5	% (v/v)	Methanol

2.2.5. Spektrophotometrische Methoden

2.2.5.1. Messung von UV/Vis-Spektren, Flavin-Beladung und Proteinkonzentrationsbestimmung gereinigter LOV-Proteine

Die Messung der UV/Vis-Spektren aller Proteine erfolgte unter schwach rotem Sicherheitslicht. Zur Analyse der kanonischen Photochemie der LOV-Proteine wurden UV/Vis-Spektren des jeweiligen gereinigten Proteins im Dunkel- und Lichtzustand aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei 25 °C (RT für iLOV-Varianten) in Quarzküvetten (Hellma Optik GmbH, Jena, Deutschland, UV, *precision glas*, 10x4 mm, 10 mm Lichtweg) mithilfe eines Cary 60 UV/Vis-Spektrophotometers (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) unter Verwendung des Programms *Scan* im Wellenlängenbereich von 250–600 nm (200-600 nm für iLOV-Varianten). Alle Proben wurden vor der Messung bis zur vollständigen Dunkelrückkehr, im Dunkeln gelagert und mit einem proteinspezifischen Lagerpuffer (s.u.) auf eine OD_{450 nm} (OD_{445 nm} für iLOV-Varianten) von 0,1 verdünnt. Dieser Puffer diente ebenfalls als Referenz. Als erstes wurde ein UV/Vis-Spektrum des jeweiligen Proteins im Dunkelzustand aufgenommen, danach die Probe mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440$ nm, 2,6 mW cm⁻² [262], Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) für 1 min beleuchtet und das Spektrum des Proteins im Lichtzustand bestimmt. Für Proteine mit sehr schneller Dunkelrückkehr wurde die Beleuchtung der Probe während der Messung des Lichtzustandsspektrums fortgesetzt.

Lagerpuffer A; pH 8,0

50	mM	Tris
1	mM	EDTA
5	mM	DTT

Lagerpuffer B; pH 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT

Lagerpuffer C; pH 8,0

50	mM	Tris
10	mM	NaCl

Lagerpuffer D; pH 7,0

10	mM	Tris
10	mM	NaCl

QENS-Puffer; pH 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT

Kristallisationspuffer, pH 7,4

20	mM	Tris-HCl
----	----	----------

2.2.5.1.1. Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Absorptionsmessung bei 280 nm und Bestimmung der Flavin-Beladung von LOV-Proteinen

Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind aromatische Aminosäuren, die in Proteinen Licht bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren. Dadurch kann die Proteinkonzentration einer Lösung durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm unter Verwendung des jeweiligen molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm ($\epsilon_{\text{Protein } 280 \text{ nm}}$) bestimmt werden. Da LOV-Proteine einen gebundenen Flavin-Chromophor besitzen, der ebenfalls bei 280 nm absorbiert, ist eine direkte Proteinkonzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm fehlerbehaftet. Dies kann korrigiert werden, indem der Anteil der Absorption, welcher auf den gebundenen Flavin-Chromophor bei 280 nm zurückzuführen ist, von der gemessenen Absorption bei 280 nm (Protein+Flavin) abgezogen wird. Da Flavine bei 450 nm absorbieren, Proteine jedoch nicht, kann die Konzentration an proteingebundenen Flavinen durch Messung der Absorption bei 450 nm erfolgen. Mithilfe dieses Wertes kann die Absorption des proteingebundenen Flavins bei 280 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von FMN (als Näherungswert für Flavinspezies) bei 280 nm abgeschätzt werden. Um nun die Absorption des Apoproteins (ohne Flavin) zu erhalten, muss der zuvor berechnete Wert von der gemessenen Absorption bei 280 nm abgezogen werden. Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins kann dann die Proteinkonzentration individuell berechnet werden (Tabelle 7). Die Extinktionskoeffizienten von FMN bei 280 nm als auch bei 450 nm wurden experimentell bestimmt.

Formel 2: Formeln zur Berechnung der Proteinkonzentration aus dem Absorptionsspektrum des Dunkelzustands. $c_{\text{Flavin } 450 \text{ nm}}$: Flavin-Konzentration (in M), $\epsilon_{\text{FMN } 450 \text{ nm}}$: Molarer Extinktionskoeffizient von FMN bei 450 nm ($1.1765 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), $\text{Abs}_{450 \text{ nm}}$: Gemessene Absorption der Proteinprobe im Dunkelzustand bei 450 nm, d : Schichtdicke der Quarzküvette (1 cm), $\text{Abs}_{\text{Flavin } 280 \text{ nm}}$: Absorption des proteingebundenen Flavins bei 280 nm, $\epsilon_{\text{FMN } 280 \text{ nm}}$: Molarer Extinktionskoeffizient von FMN bei 280 nm ($1.8107 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), $\text{Abs}_{280 \text{ nm}}$: Gemessene Absorption der Proteinprobe im Dunkelzustand bei 280 nm, $\text{Abs}_{\text{Protein}}$: Die um die FMN-Absorption bereinigte Absorption des jeweiligen Proteins, $\epsilon_{\text{Protein } 280 \text{ nm}}$: Molarer Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins bei 280 nm ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tabelle 7) und $c_{\text{Protein } 280 \text{ nm}}$: Konzentration des Proteins (in M).

$$1) c_{\text{Flavin } 450 \text{ nm}} = \frac{\text{Abs}_{450 \text{ nm}}}{(\epsilon_{\text{FMN } 450 \text{ nm}})} * d$$

$$2) \text{Abs}_{\text{Flavin } 280 \text{ nm}} = \epsilon_{\text{FMN } 280 \text{ nm}} * c_{\text{Flavin } 450 \text{ nm}} * d$$

$$3) \text{Abs}_{\text{Protein}} = \text{Abs}_{280 \text{ nm}} - \text{Abs}_{\text{FMN } 280 \text{ nm}}$$

$$4) c_{\text{Protein } 280 \text{ nm}} = \frac{\text{Abs}_{\text{Protein}}}{(\epsilon_{\text{Protein } 280 \text{ nm}})} * d$$

Die Flavin-Beladung des jeweiligen Proteins ergibt sich dann nach:

Formel 3: Berechnung der Flavin-Beladung der untersuchten Proteine. $c_{\text{Flavin } 450\text{nm}}$: Flavin-Konzentration bestimmt aus der Absorption des Flavinchromophores bei 450 nm (M) und $c_{\text{Protein } 280\text{nm}}$: Proteinkonzentration bestimmt aus der Absorption des Proteins bei 280 nm (M).

$$5) \text{ Beladung (\%)} = \frac{c_{\text{Flavin } 450 \text{ nm}}}{c_{\text{Protein } 280 \text{ nm}}} * 100$$

2.2.5.2. Messungen von Fluoreszenzemissionsspektren zur Charakterisierung der iLOV-Sättigungsmutagenese Varianten

Die Messungen zur Verifizierung des FACS-Screenings (2.2.5.8) erfolgte unter Verwendung von Zellrohextrakten in schwarzen 96-Well-Mikrotiterplatten mithilfe eines Cary Eclipse Fluorescence Spektrophotometers (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) bei einer Extinktions- und Emissionswellenlänge von 450/475 nm. Der Anregungsspalt war 16 nm und der Emissionsspalt 10 nm breit. Alle Proben wurden vor der Messung mit iLOV-Puffer auf eine $OD_{450 \text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Dieser Puffer diente ebenfalls als Referenz.

Die Messungen der Emissionsspektren aller gereinigten iLOV-Proteine (2.2.3.1.3) erfolgten in Quarzküvetten (Hellma Optik GmbH, Jena, Deutschland, UV, *precision glas*, 10x4 mm, 10 mm Lichtweg) mithilfe eines Cary Eclipse Fluorescence Spektrophotometers (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) im Wellenlängenbereich von 460–630 nm und einer Anregungswellenlänge von 440 nm. Der Anregungsspalt war 5 nm und der Emissionsspalt 10 nm breit. Alle Proben wurden vor der Messung mit Lagerpuffer D (10 mM Tris, 10 mM NaCl; pH 7,0; 2.2.3.1.3) auf eine $OD_{445 \text{ nm}}$ von 0,1 verdünnt. Dieser Puffer diente ebenfalls als Referenz.

2.2.5.3. UV/Vis-Spektrophotometrie zur Untersuchung der Dunkelrückkehrkinetik

Für die UV/Vis-spektrophotometrische Untersuchung der Dunkelrückkehrkinetik wurden zwei unterschiedliche Messverfahren verwendet. Zum einen die kontinuierliche Messung der Absorption bei 485 nm und zum anderen die Messung über sequenzielle UV/Vis-Spektren. Welche Messmethode bei welchem Protein angewendet wurde hing ab vom Protein, sowie von der Geschwindigkeit der Dunkelrückkehrkinetik und der Tendenz des Proteins während der Messung zu aggregieren. Da Proteine mit einer langsamen Dunkelrückkehr häufiger während der Messung zur Aggregation neigen, wurden diese über sequenzielle UV/Vis-

Spektren gemessen. Proteine mit einer sehr schnellen oder moderaten Dunkelrückkehrkinetik wurden stattdessen bei einer Absorption von 485 nm kontinuierlich gemessen.

2.2.5.3.1. Messung der Dunkelrückkehr durch kontinuierliche Messung der Absorption bei 485 nm

Die Messungen der Dunkelrückkehr aller Proteine erfolgten unter schwach rotem Sicherheitslicht. Die Kinetik der Dunkelrückkehr wurde in Quarzküvetten (Hellma Optik GmbH, Jena, Deutschland, UV, *precision glas*, 10x4 mm, 10 mm Lichtweg) mithilfe eines Cary 60 UV/Vis-Spektrophotometers (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) unter Verwendung des Programs *Kinetics* gemessen. Vor der Messung wurden alle Proben zentrifugiert (RT, 16.060 xg, 3 min), um ggfs. vorhandene Proteinaggregate zu entfernen. Anschließend wurden alle Proben mit einem proteinspezifischen Puffer (2.2.5.1) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von 0,1 angesetzt und für 4 min bei 25 °C im Küvettenhalter vortemperiert. Zur Verfolgung der Dunkelrückkehr wurde die Probe in der Küvette mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$ [262], Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) für 1 min beleuchtet und anschließend die Dunkelrückkehr bei einer Absorption von 485 nm kontinuierlich über einen proteinspezifischen Zeitraum bis zur Rückkehr in den Dunkelzustand (vollständige Rückkehr der ursprünglichen Absorption bei 485 nm), gemessen (Tabelle 8). Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmungen. Für Proteine mit einer schnellen Dunkelrückkehr erfolgte die Beleuchtung mit Blaulicht nach Start der Absorptionsmessung, bis zur Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen Licht- und Dunkelzustand (keine Absorptionsänderung bei 485 nm mehr nachweisbar). Danach wurde die Blaulicht-LED ausgeschaltet und die Messung bis zur Rückkehr in den Dunkelzustand (vollständige Rückkehr der ursprünglichen Absorption bei 485 nm) fortgesetzt. So konnte die vollständige Rückkehr des Proteins in den Dunkelzustand beobachtet werden. Um eine Aggregation des Proteins während der Messung auszuschließen, wurde dieselbe Messung bei einer Absorption von 550 nm durchgeführt. Dabei diente ein Anstieg der Basislinienabsorption als Indikator für eine inkubationszeitabhängige Proteinaggregation. Für alle Messungen wurde der jeweilige Puffer (2.2.5.1) als Referenz genutzt.

Zur Auswertung der Daten wurde die Absorption bei 485 nm gegen die Zeit aufgetragen. Die Lebenszeit des Lichtzustands (Adduktlebenszeit; $\tau_{\text{rec}}(\text{min})$) wurde durch Anpassung einer einfachen Exponentialfunktion (Formel 4) berechnet. Anhand der Diskrepanz zwischen dem

Fit und den experimentellen Daten (Residuen) wurde die Qualität des jeweiligen Fits evaluiert.

Formel 4: Formeln zur Bestimmung der Lebenszeit des Lichtzustands. Die erste Formel ist eine einfache exponentielle Fitfunktion und mit der zweiten Formel kann die Lebenszeit des gemessenen Proteins bestimmt werden. Mit X: Zeit (min), Y0: Startwert konvergiert gegen Endwert (Plateau), Y0 und Plateau: selbe Einheit wie Y. k stellt hier die Geschwindigkeitskonstante dar (Kinetik der Dunkelrückkehr).

$$1) Y = Y0 - \text{Plateau} * \exp^{(-k*X)} + \text{Plateau}$$

$$2) \tau_{rec} = \frac{1}{k}$$

Tabelle 8: Übersicht über die Messdauer (min), die Integrationszeit (s) und die Zykluszeit (min) der Dunkelrückkehrmessungen bei einer Absorption von 485 nm.

Protein	Messdauer (min)	Integrationszeit (s)	Zykluszeit (min)
<i>AsLOV2</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-T406C</i>	5	0,1	0,03
<i>AsLOV2-T406V</i>	5	0,1	0,03
<i>AsLOV2-R410P</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-K413A</i>	5	0,1	0,01
<i>AsLOV2-K413C</i>	10	0,05	0,02
<i>AsLOV2-N414C</i>	90	0,1	0,5
<i>AsLOV2-N414E</i>	30	0,1	0,03
<i>AsLOV2-N414G</i>	20	0,1	0,02
<i>AsLOV2-N414L</i>	120	0,1	0,02
<i>AsLOV2-N414M</i>	90	0,1	0,5
<i>AsLOV2-V416T</i>	3	0,05	0,01
<i>AsLOV2-I427N</i>	5	0,05	0,02
<i>AsLOV2-I427T</i>	3	0,025	0,01
<i>AsLOV2-L446M</i>	5	0,1	0,02
<i>AsLOV2-L446Q</i>	5	0,1	0,02
<i>AsLOV2-L446S</i>	5	0,1	0,02

Protein	Messdauer (min)	Integrationszeit (s)	Zykluszeit (min)
<i>AsLOV2-N449E</i>	5	0,1	0,02
<i>AsLOV2-C450S</i>	2	0,1	0,01
<i>AsLOV2-E475T</i>	4	0,1	0,05
<i>AsLOV2-D501G</i>	5	0,1	0,01
<i>AsLOV2-D501W</i>	5	0,1	0,02
<i>AsLOV2-D501Y</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-D515L</i>	8	0,1	0,01
<i>AsLOV2-Q513H</i>	3	0,025	0,01
<i>AsLOV2-Q513P</i>	60	0,1	0,50
<i>AsLOV2-Q513R</i>	25	0,1	0,05
<i>AsLOV2-G528E</i>	5	0,1	0,02
<i>AsLOV2-G528K</i>	3	0,1	0,03
<i>AsLOV2-G528R</i>	3	0,05	0,02
<i>AsLOV2-R410P/G528A</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-R410P/G528E</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-R410P/G528R</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-K413A/N414G</i>	90	0,1	0,03
<i>AsLOV2-K413A/D501G</i>	5	0,1	0,01
<i>AsLOV2-K413C/N414C</i>	30	0,1	0,02
<i>AsLOV2-N414D/V416T</i>	3	0,1	0,01
<i>AsLOV2-N414G/L446E</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-N414G/L446S</i>	40	0,1	0,05
<i>AsLOV2-N414G/G528E</i>	40	0,1	0,03
<i>AsLOV2-N414L/L514A</i>	120	0,1	0,05
<i>AsLOV2-N414L/H495L</i>	45	0,1	0,05
<i>AsLOV2-I427T/E475T</i>	3	0,03	0,01

Protein	Messdauer (min)	Integrationszeit (s)	Zykluszeit (min)
<i>AsLOV2-T438V/E475T</i>	6	0,1	0,02
<i>AsLOV2-R442L/D515L</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-L446M/D501W</i>	5	0,1	0,02
<i>AsLOV2-L446Q/D501Y</i>	3	0,1	0,01
<i>AsLOV2-L446S/D501Y</i>	5	0,1	0,01
<i>AsLOV2-V463W/E475T</i>	6	0,1	0,02
<i>AsLOV2-E475T/G528E</i>	5	0,1	0,01
<i>AsLOV2-D501G/G528E</i>	5	0,1	0,01
<i>AsLOV2-Q513R/G528K</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-Q513R/G528R</i>	10	0,1	0,02
<i>AsLOV2-N414D/F415E/V416T</i>	3	0,1	0,01
<i>AsLOV2-I427T/L446M/E475T</i>	2	0,1	0,01
<i>DsLOV-M49S</i>	3	0,1	0,01
<i>DsLOV-C72S</i>	2	0,1	0,01

2.2.5.3.2. Messung der Dunkelrückkehr über sequenzielle UV/Vis-Spektren

Für einige *AsLOV2*-Varianten mit sehr langsamer Dunkelrückkehr sowie für das wildtypische *PpSB1-LOV* Protein, welches ebenfalls eine sehr langsame Dunkelrückkehr besitzt, wurde die Dunkelrückkehr durch Messung sequenzieller UV/Vis-Spektren analysiert. Alle Messungen erfolgten unter schwach rotem Sicherheitslicht in Quarzküvetten (Hellma Optik GmbH, Jena, Deutschland, QS, *precision glas*, verschließbare 10x10 mm Küvette mit Schraubdeckel und Septum) mithilfe eines Cary 60 UV/Vis-Spektrophotometers (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA) unter Verwendung des Programs *ScanningKinetics*. Vor der Messung wurden alle Proben zentrifugiert (RT, 16.060 xg , 3 min), um ggfs. vorhandene Proteinaggregate zu entfernen. Anschließend wurden alle Proben mit einem proteinspezifischen Puffer (2.2.5.1) auf ein Volumen von 2,5 mL mit einer Start $OD_{450\text{ nm}}$ von 0,1 angesetzt und für 8 min bei 25 °C im Küvettenhalter vortemperiert. UV/Vis-

Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 250-600 nm aufgenommen. Zu Beginn der Messreihe wurde ein Spektrum der jeweilige Probe im Dunkelzustand aufgenommen, die Probe in der Küvette mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440 \text{ nm}$, $2,6 \text{ mW cm}^{-2}$ [262], Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) für 1 min beleuchtet und anschließend sequenzielle UV/Vis-Spektren bis zur vollständigen Rückkehr des Proteins in den Dunkelzustand aufgezeichnet. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung bzw. als Einzelmessung (Tabelle 9) für *PpSB1-LOV*, welches eine sehr langsame Dunkelrückkehr besitzt.

Tabelle 9: Übersicht über die Messdauer (min), die Dauer der Zeitintervalle (min) und die Anzahl der gemessenen Spektren der sequentiellen Dunkelrückkehr.

Protein	Dauer der Messung (min)	Zeitintervall (min)	Anzahl der Spektren
<i>AsLOV2-N414A/V416A</i>	20	0,2	100
<i>AsLOV2-N414A/V416L</i>	7.200	30	240
<i>AsLOV2-N414L/V416L</i>	7.999	30	266,6
<i>AsLOV2-N414L/Q513L</i>	300	0,5	600

Zur Bestimmung der Lebenszeit des Lichtzustands (τ_{rec}) wurden alle aufgezeichneten UV/Vis-Spektren aufgetragen. Als Indikator für eine etwaige Proteinaggregation diente die Verschiebung der „Basislinie“ im Bereich $\lambda > 500 \text{ nm}$. Im Falle einer sichtbaren Verschiebung dieser „Basislinie“ wurde eine geeignete polynomische Streufunktion (Formel 5) an die Spektren im Bereich $\lambda > 500 \text{ nm}$ angepasst. Zur Korrektur der gemessenen UV/Vis-Spektren, d.h. zur Minimierung des Einflusses von Proteinaggregation auf die Messung, wurden die jeweiligen Fitkurven des Streuteils von den gemessenen Spektren abgezogen. Anschließend wurden aus den so korrigierten Spektren die Absorptionswerte bei 485 nm extrahiert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Lebenszeit des Lichtzustands ($\tau_{\text{rec}}(\text{min})$) wurde wie in Kapitel 2.2.5.3.1 (Formel 4) beschrieben, durch Anpassung einer einfachen Exponentialfunktion an die experimentellen Daten erhalten. Anhand der Diskrepanz zwischen den Fit und den experimentellen Daten (Residuen) wurde die Qualität des jeweiligen Fits evaluiert.

Formel 5: Polynomische Streufunktion zur Korrektur der Basislinienverschiebung. Mithilfe der GraphPad PRISM Software (<https://www.graphpad.com/features>, 08.04.2024, 17:46 Uhr) kann der „Nonlin fit“ der Daten (Werte Y_0 und a) berechnet werden. Der X -Wert steht für die jeweilige Wellenlänge. Je nach Aggregationsstärke der Proteine wurden für n Werte zwischen -1 und -4 verwendet, wobei die Erhaltung typischer isosbestischer Punkte in den Spektralverläufen als Qualitätsmerkmal genutzt wurde um das am besten geeignete n zu ermitteln.

$$Y = Y_0 + ax^n$$

Lagerpuffer A; pH 8,0

50	mM	Tris
1	mM	EDTA
5	mM	DTT

2.2.5.3.2.1. Messungen der Dunkelrückkehr unter QENS-Bedingungen

Die Messung der Dunkelrückkehrkinetik für *PpSB1*-LOV erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3.2 beschrieben, jedoch mit einigen Abweichungen, da die Probe in einem späteren Experiment mittels zeitaufgelöster QENS-Methoden vermessen werden sollte (2.2.5.6).

Zur Überprüfung der Adduktlebenszeit unter QENS-Bedingungen wurde die Dunkelrückkehrkinetik der *PpSB1*-LOV Probe wie folgt gemessen: Die Probe wurde auf ein Volumen von 2,5 mL mit QENS-Puffer verdünnt (1:100) und bei 15 °C für ca. 8 Wochen in einem Wellenlängenbereich von 250-600 nm gemessen. Pro Tag (Montag-Freitag) wurden 3 UV/Vis-Spektren zu fest definierten Zeiten (8-9 Uhr, 12-13 Uhr und 16-17 Uhr) aufgenommen. Die Datenauswertung erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.3.2 beschrieben, wobei die Spektren mit einer polynomischen Streufunktion (Formel 5; $n = -4$) bzgl. der Proteinaggregation korrigiert wurden. Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Dunkelrückkehr unter QENS-Bedingungen wurde dieselbe Messung bei 25, 30 und 40°C für 12.960, 9.270 und 7.999 min. bis zur vollständigen Rückkehr in den Dunkelzustand durchgeführt.

QENS-Puffer; pD 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT
		add. D ₂ O

2.2.5.4. Zeitaufgelöste transiente Absorptionsspektroskopie

Im Gegensatz zur stationären elektronischen Absorptionsspektroskopie im UV/Vis-Spektralbereich können mithilfe der transienten Absorptionsspektroskopie (TA) transiente, d.h. kurzlebige Zustände detektiert werden. Dies geschieht mithilfe eines sog. Anregungs-Abfrage-Experiments (englisch *pump-probe experiment*), d.h. die zu untersuchende Probe wird mithilfe einer gepulsten Lichtquelle, häufig ein gepulster Laser (Anregungspuls, *pump*), in einen höheren elektronischen Zustand angeregt und mit einer zweiten Lichtquelle (Abfrageimpuls, *probe*) werden die Änderungen der Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Zeit ermittelt. Auf diese Weise können die Spektren angeregter Singulett- und Triplett-Zustände sowie deren Lebensdauern ermittelt werden. Findet im untersuchten System Elektronentransfer, Energieübertragung und/oder eine photochemische Umlagerung statt, kann dies verfolgt werden und entsprechend können die Reaktionszeit sowie die dazugehörigen Produktspektren bestimmt werden.

In Kooperation mit Dr. Roger-Jan Kutta (Universität Regensburg) und Dr. Nataliya Archipowa (Universität Regensburg) erfolgten transiente Absorptionsmessungen (TA) im UV/Vis-Spektralbereich. Die Messungen auf der ms-s Zeitskala während der Dunkelrückkehr der untersuchten LOV-Proteine erfolgten mit einem modifizierten referenzierten Einstrahlabsorptionsspektrometer (Cary 60, Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA). Die Proben wurden mit einer gepulsten, Hochleistungsleuchtdiode (LED; M455L3, Thorlabs) mit $\lambda_{\max} = 455 \text{ nm}$ orthogonal zum Detektionsstrahl angeregt (10 ms-Anregungspulse (200 μJ) kollimiert mit asphärischer Linse (Thorlabs), 2 mm Breite). Die Änderung der Absorption nach lichtinduzierter Bildung des Lichtzustands (Cysteinyladdukt am FMN) bis zur Rückkehr in den Dunkelzustand wurde bei verschiedenen Wellenlängen (Schrittweite: siehe entsprechende Datensätze) für einen identischen Zeitbereich verfolgt, so dass die Differenzabsorption $\Delta A(t, \lambda)$ bezüglich des Grundzustandsspektrums als Funktion der Zeit und der Wellenlänge in Form einer Datenmatrix erhalten wurde.

Die Absorptionsänderungen auf der ns- μs Zeitskala wurden mithilfe eines hausinternen experimentellen Aufbaus aufgenommen, in dem die Kombination aus einem Spektrographen und einer *streak camera* als Detektionssystem (Roger Jan Kutta, Universität Regensburg, [271, 272] dient. Alle Proben wurden bei 455 nm angeregt (*pump* pulse; ca. 10 mJ, ca. 10 ns, optisch-parametrischer Oszillator (OPO, Continuum), gepumpt mit der Frequenzverdreifachten (*Third Harmonic Generation*, THG) eines Neodym:Yttrium-Aluminium-Granat (Nd:YAG) Lasers (10 Hz, Surelite II, Continuum)). Als

Abfragelichtquelle (*probe*) wurde eine gepulste 150 W Xe-Blitzlampe (Applied Photophysics) verwendet, welche über torische Spiegel i) vor den Abfrageverschluss ii) in der Probe und iii) auf den Spalt des Spektrographen fokussiert wurde. Eine Kombination aus einem Spektrographen (200is, Bruker) und einer Streak-Kamera (C7700, Hamamatsu Photonics) ermöglichte die Analyse des gesamten Weißlicht-Abfragepulses [271, 273]. Weiterführende Details zur Probenmessung und Auswertung sind an anderer Stelle zu finden [271-273].

2.2.5.5. Differential Scanning Fluorimetry zur Untersuchung temperaturabhängiger Entfaltungsprozesse

Mithilfe des *nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF)* Verfahrens kann das temperaturabhängige bzw. zeitabhängige Entfaltungsverhalten (Entfaltungstemperatur bzw. Zeitpunkt der Präzipitation) von Proteinen untersucht werden. Bei dieser Methode wird das zu untersuchende Protein zunächst in Lösung in eine dünne Quarzkapillare geladen und dann einem Temperaturgradienten oder einer konstanten Temperatur (innerhalb einer temperierbaren Messzelle) über einen definierten Zeitraum bis zur Entfaltung des Proteins ausgesetzt. Während der Inkubation wird kontinuierlich die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren (bei 330 nm und bei 350 nm) detektiert. Da sich bei Entfaltung/Aggregation des Proteins die Umgebung der fluoreszenzaktiven Aminosäuren verändert, was eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften (z.B. Verschiebung des Emissionsmaximums) zur Folge hat, kann durch eine Änderung der Fluoreszenz, Entfaltung/Aggregation nachgewiesen werden.

Um die Stabilität der *PpSB1-LOV* Probe während der langen Messzeiten zu überprüfen, die in quasi-elastischen Neutronenstreuexperimenten (QENS) notwendig sind, wurden in dieser Arbeit nanoDSF Analysen des wildtypischen *PpSB1-LOV* Proteins mithilfe eines Prometheus NT.Plex *nanoDSF* Instruments (NanoTemper Technologies, München, Deutschland) in Quarzkapillaren PR-AC002 (NanoTemper Technologies, München, Deutschland) durchgeführt. Das Entfaltungsverhalten wurde kontinuierlich bei 40 °C über einen Zeitraum von 4 Tagen (5.800 min) untersucht. Dazu wurde die Proteinprobe, welche für die QENS-Messungen vorbereitet wurde (2.2.5.6), vorher zentrifugiert (RT, 16.060 xg, 1 min), mit QENS-Puffer auf eine Konzentration von 4 mg mL⁻¹ verdünnt und in Dreifachbestimmung gemessen. Die verwendete Anregungsenergie des Anregungslasers (*excitation power*) lag bei 55 %.

Zur Analyse des Entfaltungsverhaltens der *PpSB1-LOV* Probe wurden die Fluoreszenzwerte bei F350 nm gegen die Zeit aufgetragen. Ausgehend davon wurde die erste

Ableitung der geglätteten Messwerte zur Bestimmung von $t_{50\%}$ (50% der Moleküle liegen entfaltet vor) und die zweite Ableitung zur Bestimmung von t_{onset} (Beginn der Entfaltung) benutzt. Dabei dient der erste Maximalpunkt der ersten Ableitung als $t_{50\%}$. Der Wendepunkt der ersten Ableitung ist der Maximalpunkt der zweiten Ableitung und ist t_{onset} .

QENS-Puffer; pD 8,0

10	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT
		add. D ₂ O

2.2.5.6. Zeitaufgelöste quasi-elastische Neutronenstreuung zur dynamischen Charakterisierung des Dunkelrückkehrprozesses

Quasi-elastische Neutronenstreuungs-(QENS)-Experimente können wichtige Informationen über die dynamischen Eigenschaften von Proteinen liefern, wobei es die Technik erlaubt, die Bewegungen von Atomen und Molekülen in Proteinen zu untersuchen, indem die Streuung von Neutronen an den Atomen beobachtet wird. QENS-Experimente können beispielsweise genutzt werden, um die Diffusion von Wassermolekülen in Proteinen und deren Hydrathülle zu untersuchen, was Aufschluss über die Flexibilität des Proteins liefert. Zudem können die Bewegungen von Aminosäure-Seitenketten mittels QENS untersucht und Aussagen darüber getroffen werden, wie schnell sich Änderungen in der Struktur des Proteins auf die Umgebung ausbreiten oder wie schnell sich das Protein bewegt. Insgesamt können QENS-Experimente wichtige Einblicke in die Dynamik von Proteinen geben und helfen, grundlegende biologische Prozesse besser zu verstehen.

Alle QENS-Experimente wurden in Kooperation mit und von Dr. Andreas Stadler (JCNS-1/IBI-8, FZ-Jülich) [274] am Institut Laue-Langevin (ILL) in Grenoble, Frankreich, mithilfe des Hochfluss-Rückstreuenspektrometers IN16B durchgeführt. IN16B verwendet eine Neutronenwellenlänge von $\lambda = 6,27 \text{ \AA}$, was zu einer Energieauflösung von $\sim 0,75 \text{ \mu eV}$ bei voller Halbwertsbreite (Engl. *full width at half maximum*; FWHM) führt. Die aufgezeichneten Daten wurden zwischen $q = 0,19 \text{ \AA}^{-1}$ und $1,90 \text{ \AA}^{-1}$ ausgewertet. Die untersuchte PpSB1-LOV Probe ($c = 65 \text{ mg mL}^{-1}$) wurde wie in Kapitel 2.2.3.1.4 beschrieben in D₂O hergestellt. Als Probenzelle wurde ein flaches, rechteckiges Aluminiumprobenbehältnis mit einer inneren Dicke von 1 mm verwendet, wobei der Winkel zum einfallenden Neutronenstrahl 135° betrug. Die PpSB1-LOV-Probe wurden vor Beginn des Experiments in einer dunklen

Umgebung unter schwach rotem Sicherheitslicht in die Probenhalter gefüllt, um einen definierten Dunkelzustand messen zu können. Zunächst wurde der Dunkelzustand von *PpSB1-LOV* als Referenz gemessen. Anschließend wurde die Proteinlösung mit einer durchsichtigen Spritze aus dem Behälter entnommen und zwei 2 min lang mit einer Blaulicht-LED beleuchtet, bevor sie in den Probenhalter zurückgegeben wurde. Insgesamt wurden etwa 15 min benötigt, um den Probenhalter mit der beleuchteten Proteinlösung zu versiegeln, ihn in den Kryostaten des IN16B-Instruments zu stellen und die Aufnahme der QENS-Daten zu starten. Anschließend wurde der Dunkelrückkehrprozess 66 h lang beobachtet. Ein zweites QENS-Experiment wurde am IN16B als Duplikat durchgeführt, um die ersten 10 h genauer aufzulösen und die Beobachtungen zu bestätigen. Zur Subtraktion des Hintergrunds wurde D_2O -Puffer gemessen, während die instrumentelle Auflösung aus einem Vanadium-Standard gewonnen wurde. Die Proben temperatur betrug $15\text{ }^\circ\text{C}$ für alle gemessenen Proben. Die erhaltenen experimentellen Daten wurden von Dr. Andreas Stadler, analog zu Stadler *et. al.* ausgewertet [171], wobei abweichend ein geringfügig anderes theoretisches Model zum Fitten der QENS-Spektren eingesetzt wurde [275].

2.2.5.7. Zeitaufgelöste strukturelle NMR-Spektroskopie zur strukturellen Charakterisierung des Dunkelrückkehrprozesses

Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie ermöglicht die zeitaufgelöste Untersuchung der Struktur und Dynamik von Molekülen in einer Probe. Mit ihr können die elektronische Umgebung einzelner Atomkerne sowie deren Wechselwirkung mit ihren Nachbarkernen untersucht werden. Alle NMR-Experimente wurden in Kooperation mit und von Dr. Marianne Schulte und Dr. Vineet Panwalkar (IBI-7, FZ-Jülich) mithilfe eines 600 MHz NMR-Spektrometers gemessen. Die zu untersuchende Probe *PpSB1-LOV* wurde wie in Kapitel 2.2.3.1.4 beschrieben hergestellt. Zu Beginn wurden $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-HSQC}$ -Referenzspektren (Engl. HSQC; *heteronuclear single quantum coherence*) des Dunkel-/ und Lichtzustands ($c = 500\text{ }\mu\text{M}$) bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ in NMR-Puffer aufgenommen. Die Dunkelrückkehr wurde durch Aufnahme sequentieller $2D\text{-}^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}\text{-HSQC}$ -Spektren mit einer Messzeit von 7 min 22 s pro Spektrum untersucht. Alle Messungen wurden bis zur vollständigen Rückkehr in den Dunkelzustand mit einer frischen Probe in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente bei niedrigerer Konzentration ($c = 120\text{ }\mu\text{M}$) mit einer Messzeit von 18 min 44 s pro Spektrum als Doppelbestimmung aufgenommen. Für die Analyse des Dunkelrückkehrprozesses wurden überlappende Peaks ausgeschlossen. Zur Quantifizierung

der Rückkehr wurden die Peakintensitäten (Volumina) der einzelnen Peaks als Funktion der Zeit verfolgt. Die experimentellen Intensitäten wurden mithilfe von OriginPro 8.5G an eine einfache Funktion angepasst (Formel 4). Darüber hinaus wurde ein identisches Experiment mit der schneller zurückkehrenden *PpSB1-LOV-I48T* Variante zur Verifizierung der Beobachtungen durchgeführt [263].

NMR-Puffer; pH 6,4

20	mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
10	mM	NaCl
1	mM	DTT
0,03	%	NaN ₃
90/10	% (v/v)	H ₂ O/D ₂ O

2.2.5.8. FACS-Screening

Mithilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescent-activated-cell-sorting*; FACS) können fluoreszierende Zellen anhand der gewünschten fluoreszierenden Eigenschaften analysiert und in unterschiedliche Reagenzgefäße sortiert werden.

Zu Beginn wurden die zu analysierenden Zellen für das FACS-Sorting gespült und mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) verdünnt (1:7,5). Anschließend wurde die verdünnte Zellsuspension durch einen 50- μ m-Filter (Sysmex Partec GmbH, Görlitz, Deutschland) filtriert und mithilfe eines Durchflusszytometers (Influx, Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) anhand von Messungen der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{Extinction}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Emission}} = 530 \text{ nm}$) und der Vorwärtsstreuung analysiert. Die Messung wurde mit einer 100- μ m-Düse sowie PBS-Puffer als Mantelflüssigkeit durchgeführt, dabei betragen der Manteldruck sowie der Probedruck 14,6 psi bzw. 15,6 psi. Insgesamt wurden 4.070.721 Ereignisse analysiert, wovon die obersten 0,4 % (10.651 Zellen) mit der höchsten Fluoreszenzintensität in Gate P3 bei 1.500 Ereignissen pro Sekunde sortiert wurden (Sortiermodus: 1,0 Tropfen einzeln). Am Ende wurden die sortierten Zellen in PBS-Puffer gesammelt. Eine erneute Analyse der sortierten Population ergab einen Anreicherungsfaktor von 111,5 für die am stärksten fluoreszierenden Zellen in Gate P3.

PBS-Puffer, pH 7,4

1,06	mM	KH ₂ PO ₄
2,97	mM	Na ₂ HPO ₄

155,17 mM NaCl

2.2.6. Bioinformatische Methoden

Um Vorhersagen kombinatorischer Mutationen für das Tuning der Dunkelrückkehr von *AsLOV2* mit Methoden des maschinellen Lernens (ML) zu ermöglichen (1.5.3), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Literaturrecherche zu bereits publizierten Mutationsstudien durchgeführt, die sich mit dem Tuning der Dunkelrückkehrkinetik von LOV-Proteinen beschäftigen. Wie einleitend erwähnt, wurde als Modellprotein die LOV2-Domäne des *Avena sativa* Phototropins 1 (*AsLOV2*; PDB-ID: 2V0U/2V1A) genutzt. Zum einen besitzt *AsLOV2* einen konservierten LOV-Photozyklus (1.2.3) mit einer schnellen Dunkelrückkehr ($\tau_{\text{rec}} = 55\text{-}81\text{ s}$; [141, 177]), was das Screening von Varianten mit veränderter Dunkelrückkehr vereinfacht und zum anderen existieren bereits eine Reihe von Mutationsstudien zur Analyse und Veränderung der Dunkelrückkehrkinetik dieses Proteins [137, 141, 153, 157, 159, 162, 177, 276], die für das Trainieren des ML-Modells (1.5.3) verwendet werden können. Da die in der Literatur erhältlichen Daten unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen generiert wurden, wurden nur Sequenz-Fitness-Daten [140, 141, 153, 157, 162, 177, 263, 276] aus unterschiedlichen Datenquellen berücksichtigt. Als Fitnessparameter wurde die Adduktlebensdauer (τ_{rec}) verwendet. Der verwendete Datensatz für das Trainieren des ML-Modells enthielt 110 Varianteneinträge (Tabelle 10), die 80 Einzelmutationen an 66 unterschiedliche Aminosäurepositionen enthielten. Basierend auf diesem, für ML-Methoden sehr kleinen Datensatz, wurde von Niklas Siedhoff (RWTH Aachen, AG Schwaneberg) ein ML-Modell trainiert, mit dem ein Set kombinatorischer *AsLOV2*-Varianten mit schnellerer bzw. langsamerer Dunkelrückkehr vorhergesagt werden konnte. ML-Vorhersagen wurden mit dem datenbasierten Protein-Engineering-System PyPEF durchgeführt [277]. Die Vorhersagen wurden im Labor überprüft, durch ortsgerichtete Mutagenese von *AsLOV2* gefolgt von einer Bestimmung der Adduktlebenszeit des jeweiligen gereinigten Proteins. Für weitere Vorhersagerunden wurden dem Trainingsdatensatz experimentelle Daten hinzugefügt, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden und neue kombinatorische Varianten vorhergesagt. Dieser Vorhersage-Überprüfung-Vorhersage-Zyklus wurde insgesamt dreimal wiederholt, bis Varianten mit deutlich schnellerer bzw. deutlich langsamerer Dunkelrückkehr identifiziert waren.

Tabelle 10: Übersicht über Literaturdaten der *AsLOV2*-Varianten. Nr. 1-110 beinhalten die gesammelten Literaturdaten der *AsLOV2*-Varianten. Die experimentell generierten und validierten *AsLOV2*-Daten sind im Ergebnisteil gelistet (0).

Nummerierung	<i>AsLOV2</i> -Variante	τ_{rec} (min)	Quelle
1.1	WT	81	[125]
1.2	WT	80	[162]
1.3	WT	81	[276]
1.4	WT	81	[141]
1.5	WT	55	[177]
1.6	WT	37	[157]
1.7	WT	60	[153]
2	I445T	152	[263]
3	T407P	81	[125]
4	T407W	82	[125]
5	L408D	96	[125]
6	R410P	108	[125]
7	R410G	78	[125]
8	K413A	59	[125]
9	N414V	43.200	[125]
10	F434L	12	[125]
11	E475A	67	[125]
12	Q479L	49	[125]
13	N492A	54	[125]
14	L493A	121	[125]
15	F494L	206	[125]
16	H495L	85	[125]
17	Q497A	74	[125]
18	R500A	57	[125]
19	Q502A	78	[125]
20	Q513A	261	[125]
21	L514A	83	[125]
22	D515V	54	[125]
23	H519A	80	[125]
24	E409P	98	[162]

Nummerierung	AsLOV2-Variante	τ_{rec} (min)	Quelle
25	N414T	892	[162]
26	F415E	65	[162]
27	V416A	22	[162]
28	T418V	56	[162]
29	D419A	77	[162]
30	R421G	82	[162]
31	R421D	58	[162]
32	D424A	194	[162]
33	I427A	6	[162]
34	I427V	6,5	[162]
35	I428M	52	[162]
36	I428T	53	[162]
37	I428V	72	[162]
38	F429Y	66	[162]
39	S431A	65	[162]
40	D432A	54	[162]
41	S433L	48	[162]
42	S433V	64	[162]
43	L435A	263	[162]
44	T438V	32	[162]
45	E439A	71	[162]
46	R442L	121	[162]
47	E443A	58	[162]
48	E444A	75	[162]
49	I445A	336	[162]
50	L446E	42	[162]
51	F452L	300	[162]
52	R460A	78	[162]
53	T462V	57	[162]
54	R467A	96	[162]
55	A469G	40	[162]
56	D471V	68	[162]

Nummerierung	AsLOV2-Variante	τ_{rec} (min)	Quelle
57	V476F	63	[162]
58	T477V	71	[162]
59	L480A	34	[162]
60	T484V	62	[162]
61	K485A	93	[162]
62	K485L	62	[162]
63	F490L	47	[162]
64	W491Y	85	[162]
65	W491K	79	[162]
66	L496F	84	[162]
67	M499A	81	[162]
68	D501G	80	[162]
69	F509Y	66	[162]
70	F509L	181	[162]
71	D515L	56	[162]
72	T517V	76	[162]
73	G528V	103	[162]
74	G528A	38	[162]
75	E541K	87	[162]
76	N414S	685	[162]
77	N414A	1.427	[276]
78	N414D	69	[276]
79	N414G	615	[276]
80	N414L	1.847	[276]
81	N414Q	280	[276]
82	L453V	160	[276]
83	Q513D	5	[276]
84	Q513H	30	[276]
85	Q513L	1.436,5	[276]
86	F494C	282	[276]
87	V416I	821	[141]
88	V416T	2,4	[177]

Nummerierung	AsLOV2-Variante	τ_{rec} (min)	Quelle
89	V416L	4.300	[177]
90	I427T	1,99	[157]
91	K413R	40	[157]
92	N449S	0,99	[157]
93	Q513N	37,3	[153]
94	W491Y/L408W	78	[125]
95	T406A/T407A	56	[125]
96	E412H/Q436H	39	[125]
97	D432A/Q436A	73	[162]
98	S441A/E443A	85	[162]
99	N414A/Q513H	2	[276]
100	N414L/Q513A	1.900	[276]
101	N414A/Q513A	2.081	[276]
102	C450V/F494C	69	[276]
103	C450V/Q513C	44	[276]
104	V416I/L496I	1.009	[141]
105	K413R/I427V	5	[157]
106	K413R/I427L	19	[157]
107	N414G/C450V/Q513C	13	[162]
108	D432A/Q436A/E443A	76	[162]
109	D432A/Q436A/T406A/T407A	62	[162]
110	S441A/E443A/T406A/T407A	70	[162]

2.2.6.1. Visualisierung der generierten Dunkelrückkehrkinetik Daten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden unterschiedliche Daten wie z.B. der Einfluss von Mutationen auf die Dunkelrückkehr (2.2.5.3) bzw. die mittels NMR ermittelte Dunkelrückkehr einzelner Aminosäurepositionen (2.2.5.7) auf die Struktur der jeweiligen Zielproteine gemappt. Hierzu wurden verschiedene bioinformatische Ansätze verfolgt, die im Folgenden zusammengefasst sind.

2.2.6.1.1. B-Faktor Mapping der *AsLOV2*-Daten

Mithilfe eines B-Faktor Mappings ist es möglich die Rückkehrkinetik von LOV-Proteinen grafisch darzustellen, indem der Einfluss der jeweiligen Mutation auf die Adduktlebensdauer (τ_{rec}) als Farbcode (z.B. langsamere Rückkehr in Rot, schnellere Rückkehr in Blau, keine Änderung in Weiß) auf die Proteinstruktur gemappt wird. Dies kann durch Überschreiben des B-Faktor Feldes eines PDB Files erfolgen, wobei die Proteinstruktur dann entsprechend des neu definierten B-Wertes eingefärbt werden kann.

Um ein B-Faktor Mapping zu ermöglichen, müssen die Struktur bzw. das PDB File der Struktur, entsprechend vorbereitet werden. Hierzu wurden in einem ersten Schritt mithilfe der Software Pymol (Version 1.8.2.0; *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.8 Schrödinger, LLC) alle alternativen Seitenkettenkonformationen mithilfe des Python Skriptes *removealt.py* (Autor Jason Vertrees, <https://pymolwiki.org/index.php/Removealt>, 03.07.2022, Skript s. 5) entfernt. Außerdem wurde die *Occupancy* der Aminosäurereste auf 1 gesetzt (Pymol Syntax: *alter all, q = 1.00*). Das so modifizierte PDB-File (s. 5) wurde anschließend für das B-Faktor Mapping verwendet. Für dieses wurden alle im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestimmten Adduktlebenszeiten der jeweiligen Varianten sowie die oben erwähnten Literaturdaten auf die Adduktlebenszeit des Wildtyp *AsLOV2*-Proteins normiert, in dem die Adduktlebenszeit der jeweiligen Variante τ_{rec} durch die Adduktlebenszeit des Wildtyps geteilt wurde, um etwaige experimentelle Unterschiede zu eliminieren. Die resultierenden normierten τ_{rec} Werte wurde als Logarithmus zur Basis 10 (Log_{10}) ($\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$) ausgedrückt. So können schnellere Varianten mit negativen $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werten (farblich codiert in Rot), langsamere Varianten mit positiven $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werten (farblich codiert in Blau) und Varianten mit $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werte die ähnlich oder gleich dem Wildtyp sind als Null (farblich codiert in Weiß) dargestellt werden (Tabelle 11). Da so nur ein einziger Wert pro B-Faktor Feld abgebildet werden kann wurden für identische Aminosäurepositionen die einen ähnlichen τ_{rec} -Trend aufwiesen alle $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werte gemittelt und nur der resultierende Mittelwert visualisiert. Die $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werte für Varianten, die gegensätzliche Mutationseffekte aufwiesen, d.h. wo unterschiedliche Mutationen an derselben Position zu langsameren oder schnelleren τ_{rec} -Werten führten, wurden auf Null gesetzt und in der entsprechenden Abbildung hervorgehoben, indem die unterschiedlichen $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werte als farbcodierte Kreise unter Nennung der eingefügten Aminosäure im Ein-Buchstaben-Code dargestellt wurden. Doppel- und Mehrfachvarianten konnten bei dieser Art der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da diese nicht in einer übersichtlichen Form dargestellt werden konnten. Die Berechnung der $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werte wurde mittels

Microsoft Excel durchgeführt und die resultierenden Daten als CSV-Datei gespeichert. Diese Daten wurden im Anschluss mithilfe des selbstgeschriebenen Perl-Skriptes *perl_map_to_B_vl.pl* (s. 5) auf die Struktur des Dunkelzustands des *AsLOV2*-Proteins (PDB-ID: 2V1A; modifiziert wie oben beschrieben, s. 5) gemappt, indem das B-Faktor Feld mit den $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werten überschrieben wurde.

Strukturabbildungen mit farbcodierten B-Faktoren wurden mithilfe der Software Chimera 1.16 erstellt.

Tabelle 11: Übersicht über die gemappten *AsLOV2*-Varianten. Gelistet sind die Literaturdaten sowie die experimentellen Daten der *AsLOV2*-Varianten zur Dunkelrückkehr ($\tau_{\text{rec}}(\text{s})$) sowie ihre normierten Werte ($\text{norm. } \tau_{\text{rec}}$) wie auch ihre normierten Werte als Logarithmus zur Basis 10 ($\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$)-Werte.

Variante	$\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	WT $\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	norm. τ_{rec}	$\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ - Werte	Referenz
T406C	455	43	10,6	0,76	Diese Arbeit
T406V	43	43	1,0		Diese Arbeit
T407P	81	81	1,0	0,00	[140]
T407W	82	81	1,0		[140]
L408D	96	81	1,2	0,07	[140]
E409P	98	80	1,2	0,09	[162]
R410P	108	81	1,3	0,16	[140]
R410G	78	81	1,0		[140]
R410P	57	43	2,0		Diese Arbeit
K413A	59	81	0,7	-0,15	[140]
K413R	40	60	0,7		[157]
K413A	28	43	0,7		Diese Arbeit
K413C	35	43	0,8		Diese Arbeit
N414V	43.200	81	533,3	1,73	[140]
N414T	892	80	11,2		[162]

Variante	$\tau_{rec}(s)$	WT $\tau_{rec}(s)$	norm. τ_{rec}	log(norm. τ_{rec})- Werte	Referenz
N414S	685	80	8,6	1,73	[162]
N414A	1.427	81	17,6		[276]
N414D	69	81	0,9		[276]
N414G	615	81	7,6		[276]
N414L	1847	81	22,8		[276]
N414Q	280	81	3,5		[276]
N414C	961	43	22,3		Diese Arbeit
N414E	207	43	4,8		Diese Arbeit
N414M	695	43	16,2		Diese Arbeit
N414G	211	43	4,9		Diese Arbeit
N414L	1.641	43	38,2		Diese Arbeit
F415E	65	80	0,8	-0,09	[162]
V416A	22	80	0,3	1,25	[162]
V416I	821	81	10,1		[141]
V416T	2,4	55	0,0		[177]
V416L	4.300	55	78,2		[177]
V416T	2	43	0,0		Diese Arbeit
T418V	56	80	0,7	-0,15	[162]
D419A	77	80	1,0	-0,02	[162]
R421G	82	80	1,0	-0,06	[162]
R421D	58	80	0,7		[162]
D424A	194	80	2,4	0,38	[162]
I427A	6	80	0,1	-1,10	[162]
I427V	9	80	0,1		[162]
I427V	4	60	0,1		[157]

Variante	$\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	WT $\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	norm. τ_{rec}	$\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ - Werte	Referenz
I427T	2	60	0,0	-1,10	[157]
I427N	7	43	0,2		Diese Arbeit
I427T	1	43	0,0		Diese Arbeit
I428M	52	80	0,7	-0,13	[162]
I428T	53	80	0,7		[162]
I428V	72	80	0,9		[162]
F429Y	66	80	0,8	-0,08	[162]
S431A	65	80	0,8	-0,09	[162]
D432A	54	80	0,7	-0,17	[162]
S433L	48	80	0,6	-0,15	[162]
S433V	64	80	0,8		[162]
F434L	12	81	0,1	-0,83	[140]
L435A	263	80	3,3	0,52	[162]
T438V	32	80	0,4	-0,40	[162]
E439A	71	80	0,9	-0,05	[162]
R442L	121	80	1,5	0,18	[162]
E443A	58	80	0,7	-0,14	[162]
E444A	75	80	0,9	-0,03	[162]
I445A	336	80	4,2	0,56	[162]
I445T	152	49	3,1		[129]
L446E	42	80	0,5	-0,02	[162]
L446S	59	43	1,4		Diese Arbeit
L446M	36	43	0,8		Diese Arbeit
L446Q	46	43	1,1		Diese Arbeit
N449S	1	60	0,0	-0,52	[157]
N449E	25	43	0,6		Diese

					Arbeit
Variante	$\tau_{rec}(s)$	WT $\tau_{rec}(s)$	norm. τ_{rec}	log(norm. τ_{rec})- Werte	Referenz
F452L	300	80	3,8	0,57	[162]
L453V	160	81	2,0	0,30	[276]
R460A	78	80	1,0	-0,01	[162]
T462V	57	80	0,7	-0,15	[162]
R467A	96	80	1,2	0,08	[162]
A469G	40	80	0,5	-0,30	[162]
D471V	68	80	0,9	-0,07	[162]
E475A	67	80	0,8	-0,09	[162]
E475A	67	81	0,8		[140]
E475T	33	43	0,8		Diese Arbeit
V476F	63	80	0,8	-0,10	[162]
T477V	71	80	0,9	-0,05	[162]
Q479L	49	81	0,6	-0,22	[140]
L480A	34	80	0,4	-0,37	[162]
T484V	62	80	0,8	-0,11	[162]
K485A	93	80	1,2	-0,01	[162]
K485L	62	80	0,8		[162]
F490L	47	80	0,6	-0,23	[162]
W491Y	85	80	1,1	0,01	[162]
W491K	79	80	1,0		[162]
N492A	54	81	0,7	-0,18	[140]
L493A	121	81	1,5	0,17	[140]
F494L	206	81	2,5	0,48	[140]
F494C	282	81	3,5		[276]
H495L	85	81	1,0	0,02	[140]
H495L	85	80	1,1		[162]
L496F	84	80	1,1	0,02	[162]
Q497A	74	81	0,9	-0,04	[140]
M499A	81	80	1,0	0,01	[162]

Variante	$\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	WT $\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	norm. τ_{rec}	$\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ - Werte	Referenz
R500A	57	81	0,7	-0,15	[140]
D501G	80	80	1,0	-0,04	[162]
D501W	37	43	0,9		Diese Arbeit
D501Y	36	43	0,8	-0,04	Diese Arbeit
D501G	41	43	1,0		Diese Arbeit
Q502A	78	81	1,0	-0,02	[140]
F509Y	66	80	0,8	0,19	[162]
F509L	181	80	2,3		[162]
Q513A	261	81	3,2	0,80	[140]
Q513D	5	81	0,1		[276]
Q513H	30	81	0,4		[276]
Q513L	1793	81	22,1		[276]
Q513N	37,3	68	0,5		[153]
Q513L	1080	68	15,8		[153]
Q513P	420	43	9,8		Diese Arbeit
Q513R	137	43	3,2		Diese Arbeit
Q513H	47	43	1,1		Diese Arbeit
L514A	83	81	1,0		0,01
D515L	40	43	0,9	-0,12	Diese Arbeit
D515V	54	81	0,7		[140]
D515L	56	80	0,7		[162]
T517V	76	80	1,0	-0,02	[162]
H519A	80	81	1,0	-0,01	[140]
G528V	103	80	1,3	-0,14	[162]

Variante	$\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	WT $\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	norm. τ_{rec}	$\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ - Werte	Referenz
G528A	38	80	0,5	-0,14	[162]
G528E	18	43	0,4		Diese Arbeit
G528R	21	43	0,5		Diese Arbeit
G528K	40	43	0,9		Diese Arbeit
E541K	87	80	1,1	0,04	[162]

2.2.6.1.2. B-Faktor Mapping der PpSB1-LOV-Struktur

Das B-Faktor Mapping der Reste-spezifischen Lebenszeiten $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$ wurde wie im oberen Kapitel 2.2.6.1.1 beschrieben mit identischen Methoden auf die PpSB1-LOV Wildtypstruktur (PDB: 5J3W) gemappt. Die mittels NMR bestimmten Reste-spezifischen Lebenszeiten $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$ wurden durch den Mittelwert dieser Werte (gemittelt über alle Reste) geteilt und als $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ auf das B-Faktor Feld gemappt. Alle Reste-spezifischen Werte, die zur Berechnung von $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ verwendet wurden, sind in Tabelle 12 gelistet.

Tabelle 12: Übersicht über die gemappten $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ Werte, die mittels NMR für die jeweiligen PpSB1-LOV Aminosäurepositionen bestimmt wurden. Gelistet sind die Aminosäurepositionen (AS-Position), die Reste-spezifischen Lebenszeiten $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$, Mittelwert aller $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$ Werte (MW: 94,37 min) sowie die daraus resultierenden $\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ Werte für die jeweiligen Aminosäurepositionen.

AS-Position	$\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$ (min) (MW: 94,37 min)	$\tau_{\text{light-decay}}(\text{residue})$ (min) (MW: 80,65 min)	$\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ (min)
9	96,14	73,5	1,02
13	117,74	79,97	1,25
14	115,46	84,05	1,22
15	132,15	75,96	1,40
17	120,45	78,79	1,28
19	99,99	74,97	1,06
21	88,8	76,95	0,94
22	89,11	77,15	0,94

AS-Position	$\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$ (min) (MW: 94,37 min)	$\tau_{\text{light-decay}}(\text{residue})$ (min) (MW: 80,65 min)	$\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ (min)
23	80,55	77,41	0,85
24	92,28	85,1	0,98
28	90,13	80,17	0,95
31	97,42	75,59	1,03
32	106,04	75,16	1,12
33	97,27	78,61	1,03
35	92,81	81,84	0,98
36	98,72	73,73	1,05
41	89,3	82,31	0,95
42	97,71	76,81	1,03
45	100,66	81,71	1,07
46	95,92	86,68	1,02
48	101,47	81,39	1,08
49	98,94	70,28	1,05
51	92,38	86,97	0,98
52	93,01	88,03	0,99
53	92,93	82,39	0,98
54	87,37	81,19	0,93
55	95,45	83,26	1,01
60	89,73	79,3	0,95
63	88,55	76,44	0,94
66	93,74	86,47	0,99
72	89,02	86,02	0,94
73	90,74	79,96	0,96
74	96,57	84,56	1,02
75	96,73	85,24	1,03
76	83,44	82,56	0,88
77	88,74	80,38	0,94
79	99,91	79,38	1,06
80	98,77	76,23	1,05

AS-Position	$\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{residue})$ (min) (MW: 94,37 min)	$\tau_{\text{light-decay}}(\text{residue})$ (min) (MW: 80,65 min)	$\tau_{\text{dark-recovery}}(\text{norm})$ (min)
81	99,02	78,88	1,05
83	102,44	85,86	1,09
84	102,55	90,66	1,09
85	89,91	75,52	0,95
87	91,35	77,42	0,97
96	98,12	86,61	1,04
100	97,74	71,88	1,04
102	90,07	89,32	0,95
104	92,45	90,79	0,98
107	94,37	82,03	1,00
112	82,95	79,72	0,88
114	93,23	66,87	0,99
115	105,06	79,34	1,11
118	108,07	82,79	1,15
120	100,82	76,82	1,07
122	112,07	94,34	1,19

3. Ergebnis und Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten drei Themenbereiche untersucht werden (1.6). Im ersten Themengebiet ging es um das Verständnis des LOV-Photozyklus, wobei sowohl die Mechanismen der Adduktbildung als auch der Dunkelrückkehr untersucht wurden. Das zweite Themengebiet befasste sich mit den spektralen Eigenschaften LOV-basierter Flavin-bindender Fluoreszenzproteine. Im letzten Themengebiet wurden die strukturellen und dynamischen Änderungen eines bakteriellen LOV-Photorezeptors während der Dunkelrückkehr untersucht. Verschiedene Varianten wurden generiert, gereinigt, präpariert und anschließend, in Kooperation mit verschiedenen Partnern, mittels unterschiedlicher biophysikalischer und biochemischer Methoden untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit und deren Diskussion sind im Folgenden entsprechend der genannten Themengebiete geordnet.

3.1. Untersuchungen zum Verständnis der LOV-Photozyklus - Adduktbildung und Dunkelrückkehr

3.1.1. Maschinelles Lernen (ML) für das *Tuning* der Dunkelrückkehr von LOV- Photorezeptoren

ML-Methoden sind, wie bereits in Kapitel 1.5.3 beschrieben, in den letzten Jahren für das Design und *Engineering* von Proteinen immer beliebter geworden [259, 278, 279], was vor allem daran liegt, dass Voraussagen über potenzielle Zieleigenschaften einfacher und schneller zu treffen sind. Dabei können ML-Modelle aus einem vorgegebenen Datensatz Muster ableiten, um über unbeobachtete Daten Vorhersagen treffen zu können. Gleichzeitig kann das ML-Modell mit den vorhergesagten und experimentell validierten Daten trainiert und optimiert werden, um künftig genauere Vorhersagen treffen zu können. Die Verwendung eines ML-Modells stellt vor allem die Voraussetzung eines geeigneten Trainingsdatensatzes dar [259]. Dieser sollte zuvor, wenn möglich, aus zahlreichen Literatur- oder experimentell gewonnenen Daten bzw. aus Datenbanken zusammengestellt werden [259].

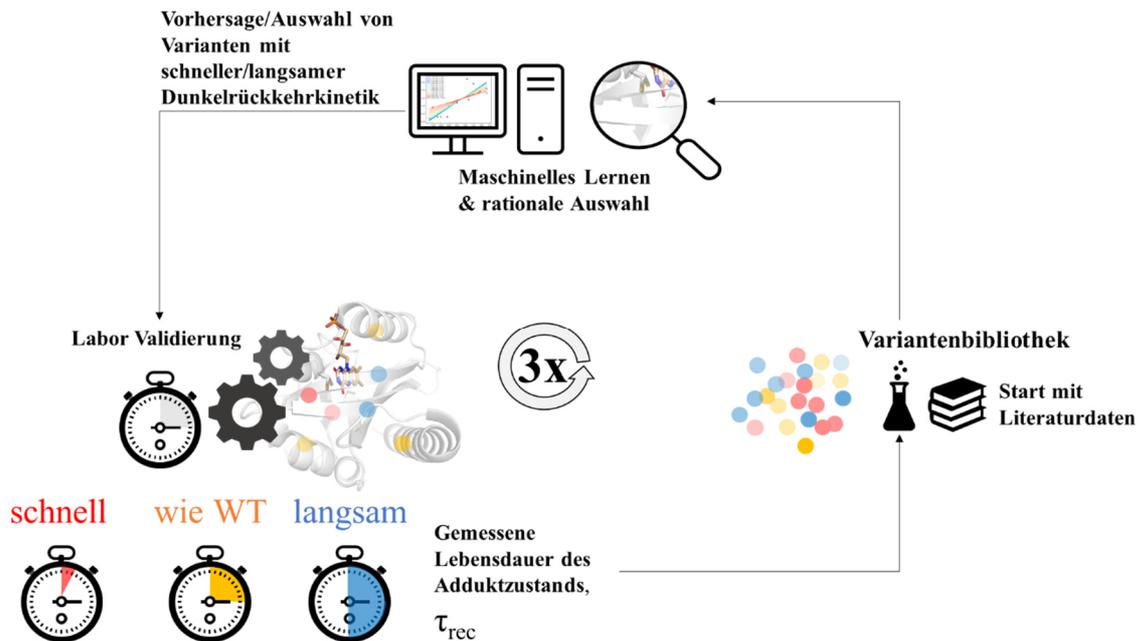


Abbildung 18: Illustration der experimentellen Strategie zur ML-basierten Vorhersage von LOV-Photorezeptoren mit geänderter Dunkelrückkehr. Arbeitsablauf der drei Auswahlrunden und der ML-basierten Vorhersage mittels PyPEF (*pythonic protein engineering framework* [277]). Ausgehend von Literaturdaten, wurden einfach substituierte Varianten mittels ML ausgewählt und doppelt sowie dreifach substituierte Varianten vorhergesagt. Die im Labor validierten Varianten und die jeweils gemessenen „Fitnesswerte“ (= Dunkelrückkehr, Lebensdauer des Adduktzustands) wurden dem Variantenpool für die nächste Runde an ML-Vorhersagen hinzugefügt. Dieser Vorhersage-Validierung-Vorhersage-Zyklus wurde dreimal durchlaufen, bis Varianten mit deutlich schnellerer und langsamerer Dunkelrückkehr identifiziert waren. Abbildung adaptiert nach Hemmer *et al.* [280].

Als Modellprotein wurde wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben *AsLOV2* ausgewählt. Zusätzlich wurden Literaturdaten gesammelt und kuratiert. Der endgültige Literaturdatensatz für das Trainieren des ML-Modells enthielt 110 Varianten Datensätze. Der gesamte Datensatz bestand am Ende aus 80 Einzelvarianten, die 66 unterschiedliche Aminosäurepositionen abdecken, sowie sechs Doppel-, einer Dreifach- und zwei Vierfachvarianten (Tabelle 10 in 2.2.6). Dieser Datensatz wurde Niklas Siedhoff (AG Schwaneberg, RWTH Aachen) für ML-Vorhersagen zur Verfügung gestellt. Wie in Abbildung 18 illustriert, wurden basierend auf dem Datensatz mittels PyPEF [277, 281], potenzielle Varianten mit einfachen Substitutionen und veränderten Eigenschaften (schnellere oder langsamere Dunkelrückkehr) rational ausgewählt und Varianten mit zwei oder mehreren Substitutionen vorhergesagt, wobei das volle Aminosäurespektrum an den ausgewählten Positionen für die Modellinterferenz genutzt werden konnte. Nach dem Trainieren des ML-Modells wurden verschiedene *AsLOV2*-Varianten vorhergesagt (3.1.2), im Labor validiert, als Datensatz zurück an den Kooperationspartner gesendet und das ML-Modell weiter trainiert. Anschließend wurde eine zweite und dritte Runde von ML-vorhergesagten Varianten, basierend auf den vorherigen

Literatur- und experimentellen Datensätzen der ersten bzw. zweiten Runde, vorhergesagt und erneut validiert (3.1.2).

3.1.2. Erzeugung, Expression, Reinigung und Identifikation funktioneller

Varianten

Nach dem Trainieren des ML-Modells (3.1.1) wurden für die erste Runde 24 Doppelvarianten (12 Varianten mit potenziell schnellerer und 12 Varianten mit potenziell langsamerer Dunkelrückkehr) vorhergesagt (s. Anhang Tabelle 24), die im Labor generiert und validiert wurden. Hier ist anzumerken, dass die meisten ML-vorhergesagten Doppelvarianten mittels PCR-Mutagenese (2.2.2.3) nur auf der Grundlage der entsprechenden Einzelvarianten erzeugt werden konnten. Daher wurden 31 Einzelvarianten (16 Varianten mit potenziell schnellerer und 15 Varianten mit potenziell langsamerer Dunkelrückkehr) (s. Anhang Tabelle 24) ebenfalls auf ihre Dunkelrückkehr getestet. Um diese Einzelvarianten dennoch gruppieren zu können, wurde angenommen, dass beide Einzelmutationen, die in einer vorhergesagten schnelleren/langsameren Doppelvariante vorhanden sind, kooperativ sind, d.h., dass bei einer vorhergesagten schnelleren Doppelvariante beide Einzelvarianten auch eine schnellere Dunkelrückkehr besitzen sollten und umgekehrt bei vorhergesagten langsameren Doppelvarianten. Die entsprechenden Einzelvarianten werden daher unter der Vorhersage als "ausgewählt schnell" bzw. "ausgewählt langsam" aufgeführt, während die vorhergesagten ML-Varianten als "vorhergesagt schnell" bzw. "vorhergesagt langsam" aufgeführt werden. Alle Varianten wurden mittels molekularbiologischer Methoden generiert, exprimiert, gereinigt und analysiert (siehe unten). Die so erhaltenen Validierungsdatensätze wurden an den Kooperationspartner gesendet und in das ML-Modell übertragen. Daraufhin wurde in einer zweiten Runde 6 Einzelvarianten (5 Varianten mit potenziell schnellerer und 1 Varianten mit potenziell langsamerer Dunkelrückkehr) und 17 Doppelvarianten (11 Varianten mit potenziell schnellerer und 6 Varianten mit potenziell langsamerer Dunkelrückkehr) (s. Anhang Tabelle 24), basierend auf den vorherigen Literatur- und experimentellen Datensätzen der ersten Runde, vorhergesagt. In der letzten Runde wurden 6 Doppelvarianten (4 Varianten mit potenziell schnellerer und 2 Varianten mit potenziell langsamerer Dunkelrückkehr) und 3 Dreifachvarianten vorhergesagt (1 Variante mit potenziell schnellerer und 2 Varianten mit potenziell langsamerer Dunkelrückkehr) (s. Anhang Tabelle 24).

Alle ausgewählten und vorhergesagten *AsLOV2*-Varianten wurden mittels *Quikchange*-PCR (*QC*-PCR) (2.2.2.3) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide (Tabelle 3) mit

pET28a-*AsLOV2* bzw. mit korrespondierenden Einzelvarianten bzw. Doppelvarianten zur Generierung der Doppelvarianten/Dreifachvariante (Tabelle 2) als Template erzeugt. Alle PCR-Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.6) analysiert und sequenziert (2.2.2.13). Von den insgesamt 87 vorhergesagten und ausgewählten Varianten konnten 79 mittels PCR erfolgreich erzeugt werden (s. Anhang Tabelle 24). Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit Plasmid-DNA (Tabelle 2) der jeweiligen Variante transformiert (2.2.1.4), die Gene in *E. coli* BL21(DE3) (Tabelle 1) in Autoinduktionsmedium (2.2.1.2) exprimiert und das jeweilige Protein wie in Kapitel 2.2.3.1.1 beschrieben mittels IMAC gereinigt. Während des Zellaufschlusses und der verschiedenen Reinigungsschritte wurden Proteinproben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2, s. Anhang Abbildung 42, Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48 und Abbildung 49). Mit wenigen Ausnahmen, konnten für alle Varianten Protein erhalten werden, nachgewiesen durch leichte bis deutliche Proteinbanden (s. Anhang z.B. Abbildung 46 *AsLOV2*-N414G bzw. Abbildung 42 *AsLOV2*-Q513P) mit der zu erwartenden Größe in den SDS-PAGE Analysen. Nur in wenigen Fällen (14 von 79 *AsLOV2*-Varianten) konnte in den Eluatfraktionen kein Protein nachgewiesen werden, was auf eine fehlende Expression (*AsLOV2*-N414C/L496K und -N414M/F415E/V416A; s. Anhang Abbildung 45 und Abbildung 49) oder, wie hier in den meisten Fällen auf eine Aggregation der Variante (12 von 79; z.B. *AsLOV2*-N449K; s. Anhang Abbildung 42) hindeutet, erkennbar an einer deutlichen Bande der zu erwartenden Größe in der Pelletfraktion (unlösliches Protein) nach dem Zellaufschluss. Die Eluatproben der IMAC Reinigung wurden anschließend konzentriert (2.2.3.4), in Lagerpuffer A überführt und bei RT im Dunkeln für einen Tag gelagert (2.2.3.1.1) und anschließend hinsichtlich ihrer Flavin-Beladung analysiert (2.2.5.1). Anhand der SDS-PAGE Analysen (s. Anhang Abbildung 42, Abbildung 43, Abbildung 44, Abbildung 45, Abbildung 46, Abbildung 47, Abbildung 48 und Abbildung 49) und der gemessenen Proteinkonzentrationen (2.2.4.1) können Rückschlüsse auf den Expressions- und Reinigungserfolg der *AsLOV2*-Varianten im Vergleich zum wildtypischen *AsLOV2* gezogen werden.

Die Funktionalität eines LOV-Photorezeptors ist bedingt durch die Bindung des lichtabsorbierenden Flavin-Chromophors im Protein (1.2.3). Im Dunkeln liegt der Chromophor nicht-kovalent gebunden im Protein vor (Dunkelzustand, LOV₄₄₇; $\lambda_{\text{max}} = 447 \text{ nm}$, 1.2.3). Die Beleuchtung mit Blaulicht induziert die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C4a-Atom des Flavin-Chromophors und einem streng konservierten Cysteinrest im Protein (Lichtzustand, LOV₃₉₀; $\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$, 1.2.3). Mithilfe

der UV/Vis-Spektrophotometrie ist es möglich den Übergang zwischen Dunkel- und Lichtzustand und *vice versa* zu beobachten, da das Protein in beiden Zuständen charakteristische Spektren besitzt (1.2.3).

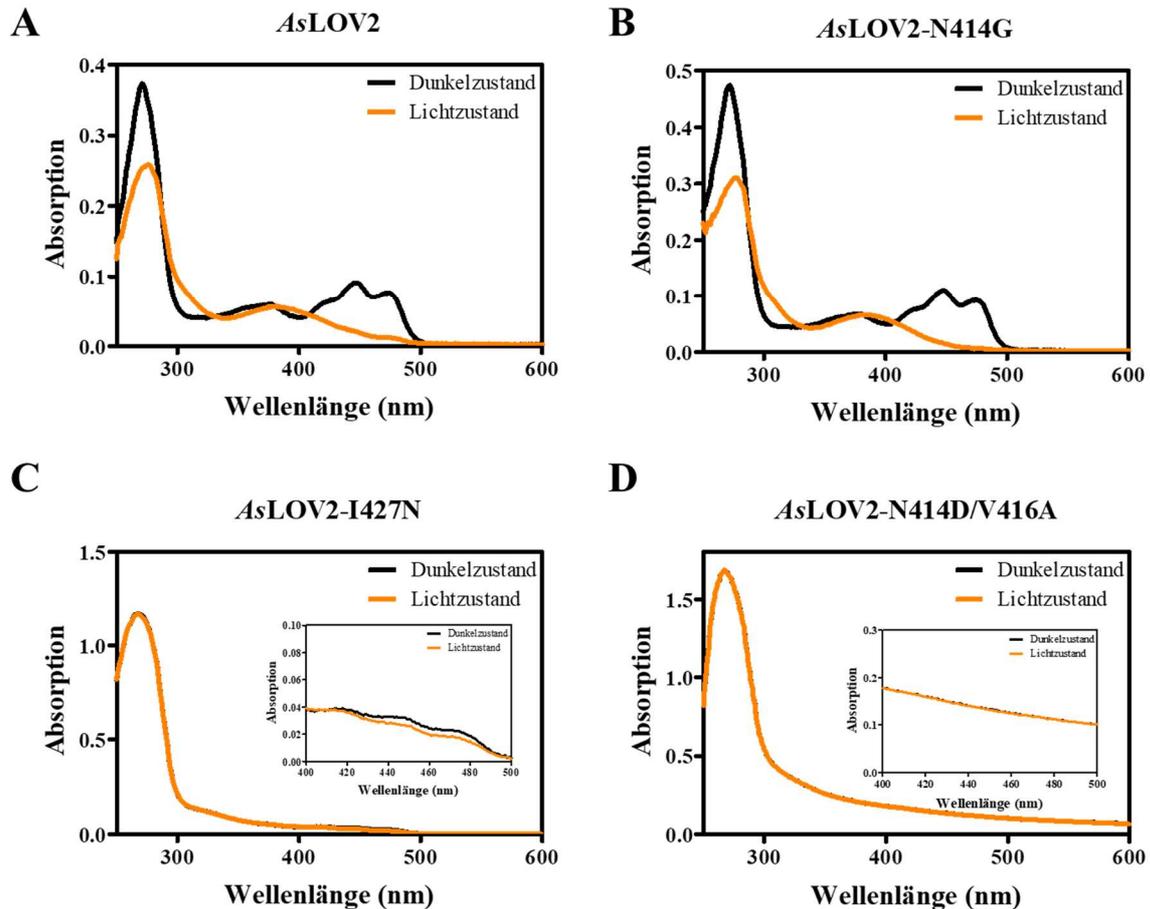


Abbildung 19: UV/Vis-Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände ausgewählter *AsLOV2*-Varianten. Exemplarisch sind hier die UV/Vis-Spektren des wildtypischen *AsLOV2* Proteins (A), eines gut beladenen (B) sowie eines schlecht beladenen (C) und ein Protein ohne Chromophor (D) dargestellt. Für (C) und (D) wurde ein Inset erstellt, sodass der Bereich um 450 nm besser zu erkennen ist. Alle Proben wurden (falls möglich) mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Um die grundlegende Funktionalität und die „Qualität“ der resultierenden Varianten zu untersuchen, wurden UV/Vis-Spektren der jeweiligen Proteine im Dunkel- und Lichtzustand (nach Beleuchtung) aufgenommen (s. Anhang, Abbildung 50, Abbildung 51, Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 54, Abbildung 55, Abbildung 56, Abbildung 57 und Abbildung 58). Auf diese Weise konnten die Flavin-Beladung, die genaue Proteinkonzentration (beides aus

den Spektren des Dunkelzustands) und die grundsätzliche Photoreaktivität (anhand der beobachteten lichtabhängigen spektralen Veränderungen) der Proben beurteilt werden. Alle UV/Vis-spektrophotometrischen Untersuchungen wurden wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die in Abbildung 19 (A und B) dargestellten UV/Vis-Spektren zeigen deutlich die für LOV-Proteine typischen spektralen Veränderung vor und nach Beleuchtung mit Blaulicht. Bei Beleuchtung mit Blaulicht nimmt die Absorption bei 450 nm (Dunkelzustand) ab (Abbildung 19, A und B, schwarze Linie) und es kommt zur Ausbildung eines neuen Maximums bei ca. 390 nm (Lichtzustand) (Abbildung 19 A und B, orangene Linie). So konnte für die meisten Proteine bewiesen werden, dass sie einen Flavin-Chromophor besitzen, nach der Probenpräparation (2.2.3.1.1) im Dunkelzustand vorlagen und durch die Beleuchtung mit Blaulicht in den Lichtzustand übergehen. Darüber hinaus konnten auch Ausnahmen wie beispielsweise die Variante *AsLOV2-I427N* (Abbildung 19 C) und *AsLOV2-N414D/V416A* (Abbildung 19 D) identifiziert werden. Das Spektrum des Dunkelzustands der *AsLOV2-I427N* Variante (Abbildung 19 C, schwarze Linie) zeigt nur eine minimal höhere Absorptionsbande bei 450 nm, im Vergleich zum Lichtspektrum (orangene Linie), wobei die Absorption bei 280 nm (Proteinabsorption und anteilig Absorption des Flavins) relativ zur 450 nm deutlich erhöht ist. Dies lässt auf eine schlechte Flavin-Beladung (s. Anhang Tabelle 25) schließen. Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum des Dunkelzustandes der *AsLOV2-N414D/V416A* Variante (Abbildung 19 D, schwarze Linie), dass in der Probe kein gebundenes und somit messbares Flavin vorlag. Weitere Ausnahmen sind in den Abbildungen im Anhang (Abbildung 50, Abbildung 51, Abbildung 52, Abbildung 53, Abbildung 57 und Abbildung 58) sowie in der Tabelle 25 (s. Anhang) gelistet. Diese Varianten wurden für weitere Untersuchungen verworfen. Darüber hinaus konnten beispielsweise für sechs weitere Varianten (s. Anhang Abbildung 50 für *AsLOV2-V416T*, *-I427T*, *-I427N*, *-Q513H*; Abbildung 52 für *AsLOV2-I427T/E475T* und Abbildung 57 für *I427T/L446M/E475T*) nahezu identische Dunkel- und Lichtspektren (schwarze und orangene Linie liegen aufeinander) beobachtet werden. D.h. die Lichtspektren der jeweiligen Proteine hatten wie ihre korrespondierenden Dunkelspektren ein Absorptionsmaximum bei 450 nm anstatt bei 390 nm. Dies könnte auf eine deutlich schnellere Dunkelrückkehrkinetik hinweisen. Des Weiteren wurde für alle Varianten die Proteinkonzentration und die Flavin-Beladung (2.2.5.1.1, Formel 2 und Formel 3) anhand der UV/Vis-Spektren im Dunkelzustand quantifiziert (s. Anhang Tabelle 25) und für einen besseren Überblick in fünf Kategorien (Tabelle 13) unterteilt: Proteine die eine sehr gute ($\geq 50\%$; 7 Varianten), gute ($\geq 30\%$; 17 Varianten), moderate ($\geq 10\%$; 26 Varianten) und schlechte ($<10\%$; 9 Varianten) Flavin-

Beladung besitzen sowie funktionslose Varianten (-; 21 Varianten; aggregiertes Protein: 12; Protein vorhanden aber nicht messbar: 7; Protein nicht vorhanden: 2) Von insgesamt 80 Varianten (79 Mutanten und 1 Wildtyp) konnten 59 (58 Mutanten und 1 Wildtyp) Varianten in Flavin-beladener Form gereinigt werden.

Tabelle 13: Scoring der Flavin-Beladung von *AsLOV2*-Varianten. Übersichtstabelle über sehr gut beladene ($\geq 50\%$), gut beladene ($\geq 30\%$), moderat beladene ($\geq 10\%$) und schlecht beladene ($< 10\%$) sowie nicht beladene (-) Varianten. Alle Daten zur Flavin-Beladung sind in Tabelle 25 (s. Anhang) gelistet.

Sehr gut beladen ($\geq 50\%$)	Gut beladen ($\geq 30\%$)	Moderat beladen ($\geq 10\%$)	Schlecht beladen ($< 10\%$)	Funktionslos (-)
7	17	26	9	21

Um eine Korrelation zwischen der Flavin-Beladung des jeweiligen Proteins und dem Abstand des Flavin-C4a-Atoms zum C α -Atom des mutierten Rests der jeweiligen *AsLOV2*-Einzelvariante zu untersuchen, wurde eine Flavin-Beladungsanalyse (Abbildung 20) in Form einer Heatmap erstellt. Es konnte beobachtet werden, dass Varianten mit Mutationen der Reste V416, I427, N449, L496 und Q513, welche in einem Abstand von $< 10 \text{ \AA}$ vom Flavin-Chromophors zu finden sind die niedrigste bis keine Flavin-Beladung aufwiesen (Abbildung 20 A und s. Anhang Tabelle 25), mit Ausnahme der Varianten V416T und I427T. Für die Varianten mit Mutationen der Aminosäurepositionen V416M, N449 (A, I, K und T) sowie L496K konnte keine Flavin-Bindung nachgewiesen werden, während für V416T und N449E eine Flavin-Beladung von 70,5 % bzw. 4,7 % (s. Anhang Tabelle 25) vorlag. Die Varianten mit Mutationen der Aminosäurepositionen I427 (N und T) und Q513 (H, P und R) zeigen mit einem Abstand von 9,7 \AA und 7,6 \AA eine schlechte bis moderate FMN-Beladung (s. Anhang Tabelle 25). Im Gegensatz dazu wiesen die Varianten mit Mutationen der Reste T406 (C und V) und D501Y innerhalb von $> 30 \text{ \AA}$ des Flavin-Chromophors die höchste Flavin-Beladung auf (Abbildung 20 A und s. Anhang Tabelle 25). Dies lässt vorsichtige Rückschlüsse zu, dass der Abstand der substituierten Reste vom Flavin-Chromophor einen Einfluss auf die Bindung des Flavins hat, wobei die Mutation von Resten in der Nähe des Chromophors häufiger zu einem Verlust der Flavinbindung zu führen scheint. Aber auch hier konnten Ausnahmen beobachtet werden. Die Reste V416T und E475T sind zwar ca. 8,2-12,7 \AA vom FMN-Chromophor entfernt, besitzen allerdings eine Flavin-Beladung von über 50 % (s. Anhang Tabelle 25). In diesen Fällen wurde jedoch jeweils eine Aminosäure mit kleinerer (E475T) oder ähnlich großer Seitenkette (V416T) eingeführt, was diese Beobachtung erklären könnte.

Die Vermutung, dass eine Korrelation zwischen der Flavin-Beladung und dem Abstand zum Chromophor besteht wird durch eine Korrelationsanalyse belegt. Hier zeigt sich mit einem Pearson Korrelationskoeffizient von $r = 0,4402$ und $p = 0,0169$ eine schwach signifikante positive Korrelation (Abbildung 20 B), welche ebenfalls in der in Abbildung 20 B und C gezeigten Strukturfunktionsanalyse zu sehen ist.

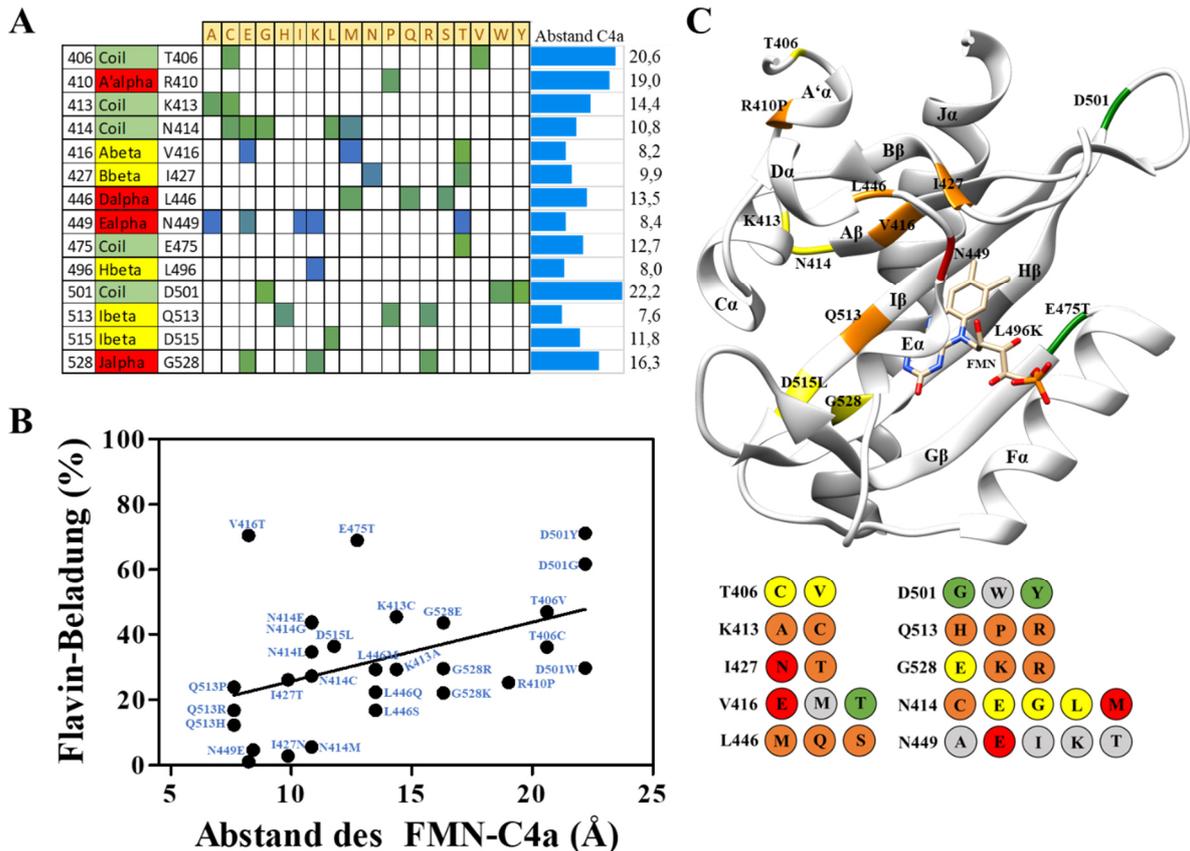


Abbildung 20: Flavin-Beladungsanalyse der *AsLOV2*-Einzelvarianten. Abbildung A zeigt eine Heatmap des gesamten Datensatzes. Zu sehen ist die jeweilige Aminosäureposition, ihre topologische Zuordnung, die jeweilige mutierte Aminosäure, die Flavin-Beladung (farbcodiert für eine sehr gute Flavin-Beladung in Grün bis zu einer schlechten Flavin-Beladung in Blau) sowie der Abstand (Å) des Flavin-C4a-Atoms zum C α -Atom des Aminosäurerests der jeweiligen *AsLOV2*-Variante. In Abbildung B wurde die Flavin-Beladung (%) gegen den Abstand (Å) zwischen dem Flavin-C4a-Atom und dem C α -Atom des Aminosäurerests der jeweiligen *AsLOV2*-Variante aufgetragen. Alle Varianten die eine Flavin-Beladung besaßen wurden beschriftet (blau). Die jeweiligen Einzelvarianten ohne Chromophor (*AsLOV2*-V416E, -V416M, -N449A, -N449I, -N449K, -N449T und -L496K) wurden nicht berücksichtigt. Abbildung C stellt die Mittelwerte der Flavin-Beladung dar (%) (sofern mehr als eine Mutation pro Position vorhanden war) bzw. die Einzelvarianten R410P; L496K, E475T und D515L, die auf die Struktur von *AsLOV2* (PDB-ID: 2V1A) abgebildet sind. Die MW der Flavin-Beladung (%) der jeweiligen Positionen sind farblich markiert: grün ($\geq 50\%$), gelb ($\geq 30\%$), orange ($\geq 10\%$), rot ($< 10\%$) und grau (funktionslos). Der FMN-Chromophor ist als Strichmodell dargestellt. In der unteren rechten Ecke sind die Mutationsdaten für bestimmte Rückstandspositionen hervorgehoben. Die Daten sind als farbcodierte Kreise dargestellt, wobei der Austausch als Aminosäurecode mit einem Buchstaben angegeben ist.

3.1.3. ML-Vorhersagen erlauben das *Tunen* der Dunkelrückkehr von LOV-Photorezeptoren

Wie bereits im Kapitel 1.2.3 erläutert durchlaufen LOV-Photorezeptoren bei Beleuchtung mit Blaulicht einen Photozyklus, in welchem eine kovalente Bindung zwischen dem Flavin-Chromophor und dem Protein ausgebildet wird. Die Adduktbildung, d.h. die Ausbildung des Lichtzustands des Proteins, erfolgt innerhalb von Mikro-/Millisekunden (siehe auch Kapitel 3.2), während das Brechen der kovalenten Flavinproteinbindung, also die Geschwindigkeit der Rückkehr in den Dunkelzustand proteinspezifisch ist. Die Dunkelrückkehr kann zwischen Sekunden bis zu mehreren Tagen andauern (1.2.3).

Die Dunkelrückkehr aller Flavin-beladener *AsLOV2*-Varianten wurde entweder durch eine kontinuierliche Messung der Absorption bei 485 nm (2.2.5.3.1) oder über sequentielle UV/Vis-Spektren (2.2.5.3.2) in einem proteinspezifischen Zeitraum gemessen. Letzteres erfolgte vor allem für Varianten die von einer starken Proteinaggregation während der Messungen betroffen waren. Um den Einfluss der Mutationen auf die Dunkelrückkehr zu bestimmen, wurden die Adduktlebenszeiten (τ_{rec}) durch das Plotten der Absorptionsänderung bei 485 nm gegen die Zeit bestimmt (Abbildung 21 und s. Anhang Abbildung 59, Abbildung 60, Abbildung 61, Abbildung 62, Abbildung 63, Abbildung 64, Abbildung 65, Abbildung 66, Abbildung 67, Abbildung 68 sowie Tabelle 26) und τ_{rec} aus einer Anpassung der experimentellen Daten an eine exponentielle Funktion (Formel 4) ermittelt, während ein Plot der Residuen (Abbildung 21 B) zur Evaluation der Fitqualität herangezogen wurde. Ein Residuen Plot wurde für jede Dunkelrückkehrmessung angefertigt, evaluiert und nur für das wildtypische *AsLOV2*-Protein exemplarisch gezeigt. Um die gemessenen Dunkelrückkehrzeiten im Vergleich zum *AsLOV2*-Wildtyp besser einordnen zu können, wurde die Dunkelrückkehr für drei unabhängig voneinander hergestellte *AsLOV2*-Wildtyp Proteinproben gemessen, was einen $\tau_{\text{rec}}(\text{WT}) = 43 \pm 4,5$ s bei 25 °C ergab (Abbildung 21, s. Anhang Tabelle 26), wobei der Fehler die Standardabweichung (SD; σ) des Mittelwertes darstellt.

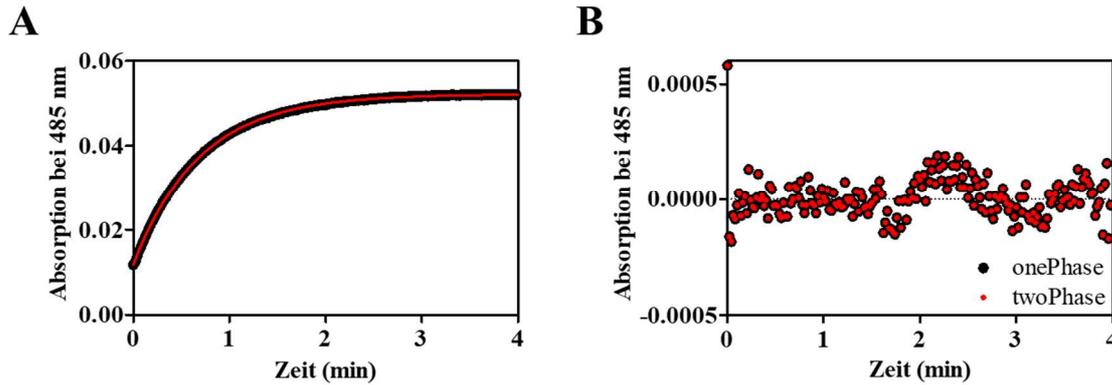


Abbildung 21: Exemplarische Dunkelrückkehrkinetik des wildtypischen *AsLOV2*-Proteins. Die Absorption bei $\lambda = 485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. B) Zur Evaluierung des Fits, wurde die Differenz zwischen der Fitkurve und den experimentellen Daten (Residuen) gegen die Zeit aufgetragen. Ein Fehlen systematischer Abweichungen deutet auf einen guten Fit hin.

Basierend auf diesen Messungen wurden Varianten als schneller/langsamer als der *AsLOV2*-Wildtyp definiert, wenn diese eine Dunkelrückkehr zeigten, die kleiner/größer als $\tau_{\text{rec}}(\text{WT}) \pm 2x \sigma$ war. Varianten mit einer Dunkelrückkehrzeit zwischen 34-52 s wurden demnach als identisch zum Wildtyp eingestuft. Von allen Flavin-beladenen Varianten konnte eine Dunkelrückkehrkinetik gemessen werden. Insgesamt konnten 17 schnellere, 24 langsamere und 16 Varianten mit einer Dunkelrückkehr τ_{rec} wie *AsLOV2*-WT identifiziert werden (s. Anhang Tabelle 26). In der ersten Vorhersagerunde wurde bereits eine deutlich schnellere Variante I427T mit $\tau_{\text{rec}} = 1 \pm 0$ s (Tabelle 14) und eine deutlich langsamere Variante N414C mit $\tau_{\text{rec}} = 961 \pm 80$ s (Tabelle 14) im Vergleich zum Wildtyp ($\tau_{\text{rec}} = 43 \pm 4,5$ s, Tabelle 14) identifiziert. Die zweite und dritte Vorhersagerunde lieferten jedoch die bisher langsamste (N414L/V416L mit $\tau_{\text{rec}} = >103.020$ s; Tabelle 14) und schnellste Variante (I427T/L446M/E475T mit $\tau_{\text{rec}} = 0,4 \pm 0$ s; Tabelle 14). Mittels ML-Vorhersagen konnte also ein breites Spektrum an Varianten vorhergesagt werden, wobei Varianten mit Dunkelrückkehrzeiten über sieben Größenordnungen hinweg (von 0,4 s bis ca. 100×10^3 s) identifiziert werden konnten. Die bisher schnellsten bzw. langsamsten aus der Literatur bekannten *AsLOV2* Varianten waren die N449S Variante mit einem $\tau_{\text{rec}} = 1$ s [157] und die N414V Variante ($\tau_{\text{rec}} = 43.200$ s) [140], welche also lediglich 4 Größenordnungen abdecken.

Tabelle 14: Ausgewählte *AsLOV2*-Varianten mit schneller und langsamer Dunkelrückkehrkinetik der einzelnen Vorhersagerunden. Aufgeführt ist die Vorhersagerunde, ob die Variante für schnell/langsam ausgewählt oder vorhergesagt wurde, die entsprechende *AsLOV2*-Variante und die experimentell bestimmte Dunkelrückkehrzeit ($\tau_{\text{rec}}(\text{s})$) und eine Aussage, ob die Vorhersage korrekt war.

Runde	Auswahl/Vorhersage (schnell/langsam)	<i>AsLOV2</i> -Variante	Dunkelrückkehr $\tau_{\text{rec}}(\text{s})$	Vorhersage korrekt?
-	-	Wildtyp	$43 \pm 4,5$	-
1	Ausgewählt, schnell	I427T	1 ± 0	ja
1	Ausgewählt, schnell	V416T	2 ± 0	ja
1	Ausgewählt, langsam	N414C	961 ± 80	ja
1	Vorhergesagt, schnell	I427T/E475T	2 ± 0	ja
1	Vorhergesagt, langsam	K413C/N414C	173 ± 7	ja
2	Ausgewählt, schnell	K413A	28 ± 1	ja
2	Ausgewählt, langsam	N414L	1.641 ± 46	ja
2	Vorhergesagt, schnell	E475T/G528E	32 ± 1	nein, wie WT
2	Vorhergesagt, langsam	N414L/V416L	>103.020	ja
3	Vorhergesagt, schnell	I427T/L446M/E475T	$0,4 \pm 0$	ja

3.1.4. Globale Analyse der Dunkelrückkehrkinetik der *AsLOV2*-Einzelvarianten

Um eine Korrelation zwischen der Dunkelrückkehrkinetik (3.1.3) der jeweiligen Varianten und dem Abstand des Flavin-C4a-Atoms zum $\text{C}\alpha$ -Atom des mutierten Rests der jeweiligen *AsLOV2*-Einzelvariante zu untersuchen, wurden diese Parameter in einer Strukturfunktionsanalyse (Abbildung 22) miteinander verglichen [280]. Außerdem wurde die Flavin-Beladung (3.1.2) in diese Betrachtung mit einbezogen. Für diese Analyse wurden alle bisher bekannten Literaturdaten, sowie die in dieser Arbeit generierten Daten verwendet (Tabelle 25 und Tabelle 26), um globale Rückschlüsse zu ermöglichen.

Tabelle 15: Übersichtstabelle zum Vergleich von Mutationsdaten. Gelistet ist die jeweilige *AsLOV2*-Einzelvariante, ihr Abstand zum FMN-C4a-Atom (Å), die Flavin-Beladung (%) und ihre Dunkelrückkehrzeit(τ_{rec} (s)). Die Daten sind aus Abbildung 20, Tabelle 25 sowie Tabelle 26 (s. Anhang) abgeleitet.

<i>AsLOV2</i>- Einzelvariante	Abstand zum FMN- C4a-Atom (Å)	Flavin-Beladung (%)	Dunkelrückkehr τ_{rec}(s)
T406C	20,6	39,6	455 ± 1
T406V	20,6	36,1	43 ± 0
R410P	19,0	25,3	58 ± 2
K413C	14,4	45,4	35 ± 3
K413A	14,4	29,3	28 ± 1
N414C	10,8	50,2	961 ± 80
N414E	10,8	43,8	207 ± 9
N414M	10,8	5,6	695 ± 9
N414L	10,8	34,6	1.641 ± 46
N414G	10,8	43,5	211 ± 14
V416E	8,2	1,1	-
V416M	8,2	-	-
V416T	8,2	70,5	2 ± 0
I427N	9,9	5,4	7 ± 1
I427T	9,9	26,1	1 ± 0
L446M	13,5	38,0	36 ± 1
L446Q	13,5	22,4	46 ± 0
L446S	13,5	16,8	59 ± 0
N449A	8,4	-	-
N449E	8,4	4,7	25 ± 2
N449I	8,4	-	-
N449K	8,4	-	-
N449T	8,4	-	-
E475T	12,7	69,0	33 ± 1
L496K	8,0	-	-
D501W	22,2	29,7	37 ± 0
D501Y	22,2	71,2	36 ± 2
D501G	22,2	61,8	41 ± 0
Q513H	7,6	12,3	47 ± 9

AsLOV2- Einzelvariante	Abstand zum FMN- C4a-Atom (Å)	Flavin-Beladung (%)	Dunkelrückkehr $\tau_{rec}(s)$
Q513P	7,6	23,9	420 ± 7
Q513R	7,6	38,9	85 ± 21
D515L	11,8	36,4	39 ± 3
G528E	16,3	43,5	18 ± 1
G528K	16,3	36,1	40 ± 1
G528R	16,3	47,4	21 ± 0

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben konnte ein Zusammenhang zwischen der Flavin-Beladung und dem Abstand des jeweiligen mutierten Aminosäurerests zum FMN-C4a-Atom beobachtet werden, obwohl keine starke statistische Korrelation nachzuweisen war. Ob das ebenfalls für die Dunkelrückkehrkinetik zutrifft wird im Folgenden diskutiert. Auffallend ist zunächst einmal, dass Reste die in einem Abstand von $< 11 \text{ \AA}$ zum Flavin-Chromophor zu finden sind (Tabelle 15; Abbildung 22 A) viel größere Effekte auf die Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Dunkelrückkehrkinetik haben. Die in dieser Arbeit größten validierten Einzelstelleneffekte wurden für I427T mit einer 43-fach schnelleren und für N414L mit einer etwa 38-fach langsameren Rückkehr (Tabelle 15) beobachtet. Erwähnenswert sind zudem die Varianten V416 (E und M), N449 (A, I, K und T) sowie L496K die mit einem Abstand von $< 8,5 \text{ \AA}$ zum Flavin-Chromophor keine Dunkelrückkehrkinetik besitzen, weil sie keinen Chromophor binden (Tabelle 15). Im Gegensatz dazu konnten die größten Einzelstelleneffekte in der Literatur für N449S und N414V gefunden werden (Abbildung 22 A). N449S besitzt eine etwa 60-fach schnellere [157] und N414V eine etwa 530-fach langsamere Dunkelrückkehr [140].

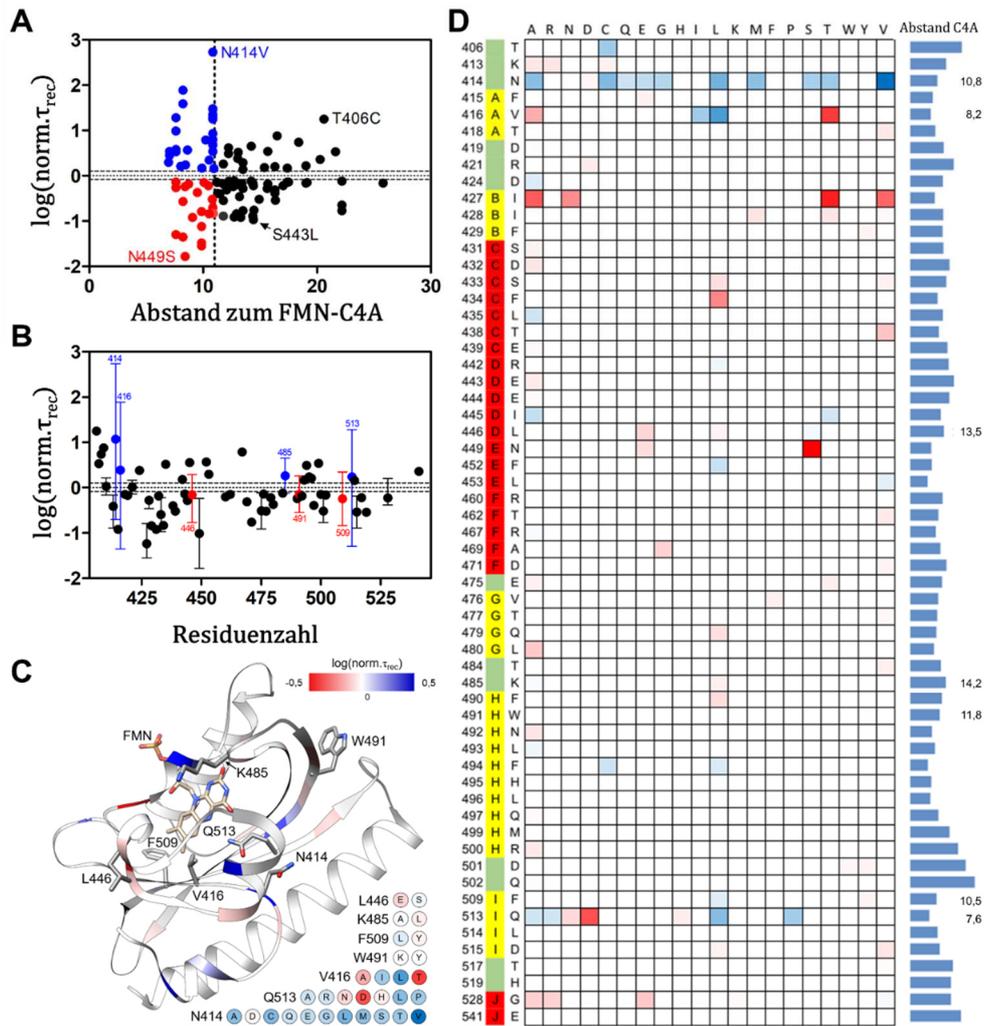


Abbildung 22: Strukturfunktionsanalyse des *AsLOV2*-Mutationsdatensatzes. Alle Dunkelrückkehrkinetik Daten (τ_{rec}) der Varianten wurden relativ zu den Daten des entsprechenden Wildtyps normalisiert und als Log-Werte $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ ausgedrückt, was zu positiven Werten für Varianten mit einer schnelleren τ_{rec} (in Rottönen kodiert) und zu negativen Werten für Varianten mit einer langsameren Dunkelrückkehr τ_{rec} (in Blautönen kodiert) führt. A) Restweise Mutationsdaten ($\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$) aufgetragen gegen den Abstand zwischen dem C α -Atom des jeweiligen Rests und FMN-C4a. Die gefüllten roten und blauen Kreise entsprechen den schnelleren (rot) bzw. langsameren (blau) Varianten mit einem Rest-FMN-Abstand < 11 Å. Alle übrigen Varianten (FMN-C4a ... C α Abstand > 11 Å) sind als schwarze Kreise gezeigt B) Mutationsdaten ($\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$) aufgetragen gegen die Aminosäureposition. Die Fehlerbalken, die den gesamten Datenbereich für bestimmte Reste abdecken, ergeben sich aus den Variationen in τ_{rec} für verschiedene Mutationen an den spezifischen Positionen. Rot und blau gefüllte Kreise markieren Positionen, für die in Abhängigkeit von der eingeführten Mutation sowohl schnellere als auch langsamere Varianten identifiziert wurden, wobei rot und blau gefüllte Kreise veranschaulichen, ob der Mittelwert der jeweiligen Werte negative bzw. positive $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ Werte ergibt. Die gestrichelten Linien in A und B bezeichnen den $\pm 2\sigma$ -Schwellenwert für die Einstufung einer Variante als schneller oder langsamer C) Mutationsdaten ($\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$), die auf die Struktur von *AsLOV2* (PDB-ID: 2V1A) gemappt sind, wobei die Positionen, die im Durchschnitt eine schnellere bzw. langsamere Dunkelrückkehr aufwiesen, rot bzw. blau gefärbt sind. Der FMN-Chromophor und ausgewählte Aminosäurepositionen, bei deren Mutation sowohl schnellere als auch langsamere Varianten erhalten wurden, sind als Stäbchenmodell dargestellt. In der unteren rechten Ecke sind die Mutationsdaten für diese Positionen hervorgehoben. Die Daten sind als farbkodierte Kreise (kodiert nach $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$) dargestellt, wobei der Austausch im Einbuchstabencode angegeben ist. D) Heatmap des gesamten Datensatzes, wobei die $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ -Werte wie zuvor farbkodiert sind. Die zweite Spalte veranschaulicht die Position, an der der jeweilige Rest in N- bis C-terminaler topologischer Reihenfolge zu finden ist, mit Random Coils in Grün, β -Stränge in Gelb und α -Helices in Rot, jeweils markiert in topologischer Reihenfolge A β -B β -C α -D α -E α -F α -G β -H β -I β -Ja. Die letzte Spalte zeigt den Abstand des C α -Atoms des jeweiligen Rests vom FMN-C4a-Atom (Abbildung adaptiert nach [280]).

Darüber hinaus konnten für Reste T406C (ca. 11-fache Verlangsamung, Tabelle 15) und S443L (ca. 2-fache Verlangsamung) mit einem Abstand von $> 11 \text{ \AA}$ zum Flavin-Chromophor ebenfalls größere Einzelstelleneffekte beobachtet werden [162]. Signifikante Effekte konnten bis zu einem Abstand von 22 \AA zum Flavin-Chromophor beobachtet werden (D501-CA \cdots FMN-C4a; D501Y, 1,2-fache Beschleunigung; Tabelle 15). Bezüglich der Varianz der beobachteten Einzelstelleneffekte fällt insbesondere die Position N414 (Abbildung 22 B und C) mit einer der größten mutationsabhängigen Varianzen auf (Ref. 43, 44, 48). Aber auch Reste wie Q513 und V416, sowie W491, F509, K485 und L446 in geringerem Maße [125, 141, 153, 162, 177, 276], umfassen Varianten mit einer schnelleren wie auch langsameren Dunkelrückkehrkinetik (Abbildung 22 B und C). Dies kann jedoch auch damit zusammenhängen, dass diese Reste häufig das Ziel von Mutagenese waren. Von den eben genannten Positionen liegt N414 mit einem Abstand von $10,8 \text{ \AA}$ innerhalb der A' α -A β -Schleife und somit ziemlich weit vom Flavin-Chromophor entfernt. Die langsamste in der Literatur beschriebene Variante ist *As*LOV2-N414V mit $\tau_{\text{rec}} = 43.200 \text{ s}$ [140]. Im Gegensatz dazu liegen die Reste V416 (V416-CA \cdots FMN-C4a, $8,22 \text{ \AA}$) und Q513 (Q513-CA \cdots FMN-C4a, $7,62 \text{ \AA}$) innerhalb der Flavin-Bindetasche und können so direkt mit dem Chromophor interagieren. Der Rest V416 befindet sich an der hydrophoben Seite des Flavin-Isoalloxazinrings und interagiert über van-der-Waals Wechselwirkungen mit dem Flavindimethylbenzol-Teil des Isoalloxazin-Ringsystems [141]. Diese Interaktion wirkt sich vermutlich sterisch auf die Konformation des photoaktiven Cysteins in der LOV-Domäne aus [141], da Aminosäureaustausche in dieser Position Varianten (V416T, Tabelle 15; V416A [162]; V416I [141] bzw. V416L [177]) mit einer schnellen/langsamen Dunkelrückkehrkinetik als auch funktionslose Varianten (V416E bzw. M, Tabelle 15) hervorgebracht hat.

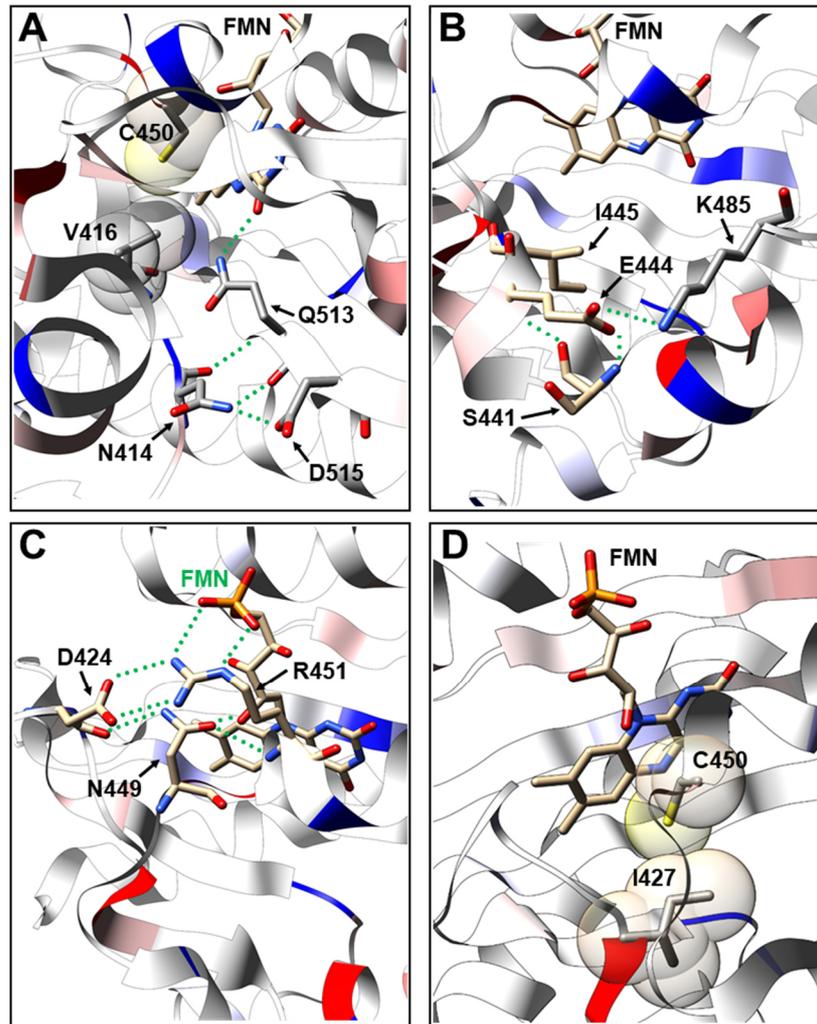


Abbildung 23: Strukturfunktionsbeziehungen zur Beeinflussung der Dunkelrückkehr von *AsLOV2*, die anhand von Einzelmutationsdaten (A-D) ermittelt wurden. Cartoon-Darstellung der *AsLOV2*-Struktur (PDB ID: 2V1A) mit ausgewählten Resten in Stick-Darstellung oder als Van-der-Waals-Kugel. A) V416, Q513, N414, D515, Flavin-Interaktion. B) K485 - E444 - S441 Wechselwirkung, C) N449 FMN-Ribityl-Wechselwirkung und $\epsilon\alpha$ H-Bindungsnetzwerk. D) I427-Rest, der die Ausgangskonformation von C450 im Dunkelzustand sterisch unterstützt. Die Abbildungen in A-D sind farblich kodiert entsprechend $\log(\text{norm. } \tau_{\text{rec}})$ wie in Abbildung 22 beschrieben, wobei die Positionen, die im Durchschnitt eine schnellere bzw. langsamere Dunkelrückkehr aufwiesen, blau bzw. rot gefärbt sind. Wasserstoffbrücken sind als grüne gestrichelte Linien dargestellt (Abbildung adaptiert nach [280]).

Der Rest Q513 ist mit einem Abstand von 7,6 Å zum FMN-C4A-Atom ebenfalls in der FMN-Bindetasche des Proteins lokalisiert, befindet sich an der polaren Seite des Isoalloxaninrings, gleichzeitig ist es in ein H-Brückennetzwerk mit N414 und D515 eingebettet (Abbildung 23 A) und innerhalb der LOV-Domäne an den Aktivierungs- und Signalvermittlungsmechanismen beteiligt [125, 153]. Trotz seiner Lage zur Nähe des Chromophors führt der Austausch dieses Restes in den meisten Fällen zu einer langsameren Dunkelrückkehr [125, 276] (Ausnahmen: Q513H bzw. Q513D [276] sowie Q513P und Q513R Tabelle 15). Dies könnte mit der Interaktion des Restes mit N414 zusammenhängen.

Frühere Studien haben hier gezeigt, dass N414 in einem lichtabhängigen Signalweiterleitungsprozess in *AsLOV2* involviert ist, der an der Photorezeptoraktivierung beteiligt ist [125]. Bei diesem Prozess wird die N414-D515-Wasserstoffbindung gebrochen und eine Verschiebung der N- und vielleicht auch C-terminalen flankierenden Elementen (A' α - und J α -Helix) vermittelt. Darüber hinaus gibt es ebenfalls Reste, die gegensätzliche Mutationseffekte aufweisen wie z.B. K485, E444, S441 und I445. Der Rest K485 ist in der G β -H β -Schleife lokalisiert und bildet dort mit dem Rest E444 eine Salzbrücke zur Stabilisierung der D α -Helix aus, welche über ein Netzwerk von Wasserstoffbindungen (E444-OE1 \cdots S441-N) erfolgt (Abbildung 23 B). Der hydrophobe Rest I445 ist ebenfalls auf der D α -Helix lokalisiert (S441-O \cdots I445-N) und ist, wie kürzlich gezeigt wurde [263], an der Dunkelrückkehr von *AsLOV2* und anderen LOV-Domänen entscheidend beteiligt. Die bisher schnellste identifizierte Einzelvariante in der Literatur ist *AsLOV2*-N449S mit $\tau_{\text{rec}} = 1$ s [157]. Der Rest N449 liegt auf der E' α -Helix, ist dort in ein H-Brückennetzwerk eingebettet und interagiert mit dem Ribitylrest des Flavins (Abbildung 23 C) [157]. In dieser Arbeit konnte nur die Variante N449E ($\tau_{\text{rec}} = 25$ s; Tabelle 15) in chromophorbeladener Form identifiziert werden. Alle anderen N449er-Varianten (A, I, K und T; Tabelle 15) banden nachweislich kein Flavin und besaßen somit auch keine messbare Dunkelrückkehr. Dies lässt darauf schließen, dass der Rest N449 für die Flavin-Bindung in *AsLOV2* essentiell ist. Der Rest I427 ist ebenfalls wichtig zu erwähnen, da er neben anderen schnellen Varianten (A und V; [162]), ebenfalls mit der Mutation I427T eine der größten Beschleunigungen ($\tau_{\text{rec}} = 1$ s; Tabelle 15) der Dunkelrückkehrkinetik in *AsLOV2* bewirkt (Abbildung 22 D). I427 ist in der Flavin-Bindetasche lokalisiert und interagiert über van-der-Waals-Kontakt mit der Sulfhydrylgruppe des photoaktiven Cysteins (C450) (Abbildung 23 D) [157]. Diese sterische Interaktion könnte den Adduktzustand destabilisieren, indem es eine indirekte Auswirkung auf das Brechen des FMN-Protein Adduktes hat und so die Dunkelrückkehr beschleunigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit neu getesteten Einzelvarianten zwar nicht zur Identifizierung neuer Mechanismen geführt hat, aber bereits bekannte mechanistische Vorschläge bestärken. Dies liegt unter anderem daran, dass sich die ML-Vorhersagen auf bereits bekannte Positionen konzentrierten. Zudem konnte durch globale Struktur-Funktions-Analysen eine Korrelation zwischen dem Abstand des FMN-C4a-Atoms und der gemessenen Dunkelrückkehrkinetik festgestellt werden. Darüber hinaus verdeutlichen die Analysen in dieser Arbeit den verzerrten Charakter des aktuellen Datensatzes. Diese Verzerrung wird dadurch verdeutlicht, dass die meisten untersuchten Positionen ebenfalls die größte Varianz aufwiesen. Daher muss hier unbedingt angemerkt werden, dass für eine

unvoreingenommene ML-Vorhersage sehr viel mehr Studien zu ortsgerichteten Varianten erfolgen müsste. D.h. der gesamte Sequenzbereich von *AsLOV2* müsste durch Scanning-Mutagenesestudien untersucht werden, um so ein deutlicheres Bild der Auswirkungen der verschiedensten Mutationen an den einzelnen Positionen in der LOV-Domäne unabhängig darstellen zu können. Solche Untersuchungen würden es außerdem ermöglichen, festzustellen, welche Datensatzgröße für ein gegebenes ML-Modell notwendig ist, um belastbare Vorhersagen zu treffen.

3.1.5. ML-Vorhersagen können kombinatorische Effekte voraussagen

Als letzter Punkt sollen etwaige kombinatorische Effekte der Mutationen bezüglich der Dunkelrückkehrkinetik untersucht werden. Dabei ist zu beachten, dass aus Gründen der Vergleichbarkeit nur die in dieser Arbeit experimentell erfassten Mutationen miteinander verglichen und diskutiert werden können. Die bereits existierenden Literaturdaten können aufgrund der unterschiedlichen Dunkelrückkehrzeiten des wildtypischen *AsLOV2*-Proteins, sowie den unterschiedlichsten verwendeten Puffern und Messbedingungen, nur innerhalb eines Datensatzes, d.h. innerhalb der jeweiligen Publikation diskutiert und somit nicht mit den hier erfassten Daten verglichen werden. Daher entfällt die Diskussion der Literaturdaten, da diese den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Mithilfe der ML-Vorhersagerunden konnten schnelle und langsame Varianten gefunden werden, die in Tabelle 16 gelistet sind. Zu Beginn fällt vor allem auf, dass vorhergesagte schnelle (V416T/N449T; I427N/N449A; I427N/N449I; I427N/N449K; I427N/N449T; N449T/Q513P; L446F/E475T) bzw. langsame (N414C/L496K; N414E/V416E; N414E/V416M; N414M/V416E; N414M/V416M) Doppelvarianten aus jeder Vorhersagerunde, die aus schnellen/langsamen Einzelvarianten in Kombination mit funktionslosen Einzelvarianten (ohne Flavin) (s. Anhang Tabelle 25 und Tabelle 26) entstanden sind, ebenfalls funktionslos bleiben, also keinen Chromophor binden. D.h. kombinatorische Effekte können keinen Funktionsverlust kompensieren, weswegen diese Varianten auch nicht in Tabelle 16 geführt sind. Ebenfalls nicht in dieser Tabelle zu finden sind Varianten, die nur als Doppel- bzw.- Dreifachvarianten gemessen wurden, bei denen aber keine Daten zu den entsprechenden Einzelvarianten vorlagen. Zu diesen Varianten gehören beispielsweise *AsLOV2*-N414L/H495L bzw. -N414A/V416A. Die Variante N414L/H495L wurde mithilfe der Einzelvariante und dem Primer H495L generiert. Dadurch existieren zwar Daten zu N414L (N414L Daten s. Anhang Tabelle 25 und Tabelle 26), aber nicht zu H495L.

Ähnlich verhält es sich z.B. mit N414A/V416A, da diese Doppelvariante mithilfe eines Primers generiert wurde, sodass die jeweiligen dazugehörigen Einzelvarianten (N414A und V416A) nie erzeugt wurden. Außerdem sind Varianten die eine Dunkelrückkehrkinetik wie das wildtypische *As*LOV2-Protein ($\tau_{\text{rec}}(\text{WT}) \pm 34 - 52 \text{ s}$) besitzen und somit keine kombinatorischen Effekte aufweisen könnten, ebenfalls aus der Bewertung ausgeschlossen und deshalb nicht in Tabelle 16 gelistet.

Kombinatorische Effekte unter den schnellen vorhergesagten und ausgewählten Doppelvarianten konnten für I427T/E475T ($\tau_{\text{rec}} = 2 \pm 0 \text{ s}$) und E475T/G528E ($\tau_{\text{rec}} = 23 \pm 1 \text{ s}$) beobachtet werden (Tabelle 16). Beide Varianten bestehen aus der Einzelvariante E475T ($\tau_{\text{rec}} = 33 \pm 1 \text{ s}$) sowie I427T ($\tau_{\text{rec}} = 1 \pm 0 \text{ s}$) und G528E ($\tau_{\text{rec}} = 18 \pm 1 \text{ s}$), hier führen zwei schnelle Einzelvarianten (I427T und G528E) jeweils zu einer schnelleren Doppelvariante. Der größte kombinatorische Effekt konnte hier allerdings für die Dreifachvariante I427T/L446M/E475T ($\tau_{\text{rec}} = 0,4 \pm 0 \text{ s}$) beobachtet werden (Tabelle 16). Hier ist der Einfluss der I427T-Mutation am größten. Die Position I427 ist auf dem B β -Faltblatt (Abbildung 20 A und C) lokalisiert und liegt mit einem Abstand von 9,9 Å am nächsten zum Flavin-Chromophor. Wie bereits in Kapitel 3.1.4 diskutiert besitzt diese Position einen großen Einfluss auf die Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Dunkelrückkehrkinetik. Die Position E475 ist auf der Coil-Verbindung zwischen der F α -Helix und dem G β -Faltblatt lokalisiert (Abbildung 20 A und C) und liegt mit einem Abstand von 12,7 Å zwar weiter weg vom Chromophor als I427, steht aber in einem Netzwerk aus Resten die mutiert wurden (I427-Ca \cdots E475-Ca; Abbildung 24 A) in Verbindung und könnte dadurch ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Beschleunigung der Dunkelrückkehrkinetik haben. Unter den schnellen vorhergesagten und ausgewählten Doppelvarianten sticht ebenfalls die Variante I427N/N449E (keine Flavin-Bindung) heraus (Tabelle 16). Diese Variante besteht aus jeweils einer ausgewählten schnellen und langsamen Einzelvariante mit I427N ($\tau_{\text{rec}} = 7 \pm 1 \text{ s}$) und N449E ($\tau_{\text{rec}} = 207 \pm 9 \text{ s}$) resultiert jedoch in einer funktionslosen Doppelmutante. Hier kommt es also nur bei Kombination der beiden Einzelvarianten zu einem Funktionsverlust (keine Flavin-Bindung). Es ist jedoch anzumerken, dass beide Einzelvarianten bereits eine schlechte Flavinbeladung besitzen (Tabelle 15) und daher deren Kombination zu einem kompletten Funktionsverlust führen könnte. Dies bestärkt die Vermutung, dass der Rest N449, aber auch I427 für die Flavin-Bindung in *As*LOV2 essentiell ist.

Kombinatorische Effekte unter den langsamen vorhergesagten und ausgewählten Varianten konnten für K413C/N414C ($\tau_{\text{rec}} = 173 \pm 7 \text{ s}$) beobachtet werden (Tabelle 16). Diese Doppelvariante besteht aus der sehr langsamen Einzelvariante N414C mit $\tau_{\text{rec}} = 961 \pm 80 \text{ s}$

und die im Vergleich zum Wildtyp schnelleren Variante K413C mit $\tau_{\text{rec}} = 35 \pm 3$ s, was in Kombination in einer Variante resultiert, die langsamer als der WT zurückkehrt, wobei die K413C Variante den Effekt der N414C Mutation kompensiert. Im Gegensatz dazu resultierten die langsamen vorhergesagten Doppelvarianten L446M/D501W ($\tau_{\text{rec}} = 30 \pm 1$ s), L446Q/D501Y ($\tau_{\text{rec}} = 14 \pm 0$ s) und L446S/D501Y ($\tau_{\text{rec}} = 7 \pm 1$ s) in einer schnelleren Dunkelrückkehr als der Wildtyp (Tabelle 16). Dies ist eine interessante Beobachtung, da die individuelle Einzelmutationen an diesen Stellen zu Dunkelrückkehrzeiten wie beim Wildtyp führen und eine Beschleunigung der Dunkelrückkehr erst bei Kombination der beiden Mutationen erfolgt, wobei der Effekt im Falle der L446S/D501Y Mutation am ausgeprägtesten ist. Dieser kombinatorische Effekt ist umso überraschender, da beide Reste oberflächenlokalisiert an unterschiedlichen Enden der *As*LOV2-Domäne zu finden sind (L446-Ca \cdots D501-Ca Abstand: 23 Å). L446 ist am Ende der D α -Helix lokalisiert, während D501 Teil des H β -I β loops ist und mit dem Backbone von D505 eine H-Brücke bildet (D501-OD1 \cdots D505-N: 2.9 Å). Eine strukurelle Erklärung dafür, dass die Kombination von Mutationen der Positionen L446 und D501 zu einer schnelleren Dunkelrückkehr führt, liegt also nicht direkt auf der Hand. Eventuell könnten die Mutationen die Dynamik der beiden Regionen beeinflussen und so additiv auf die Dunkelrückkehr wirken.

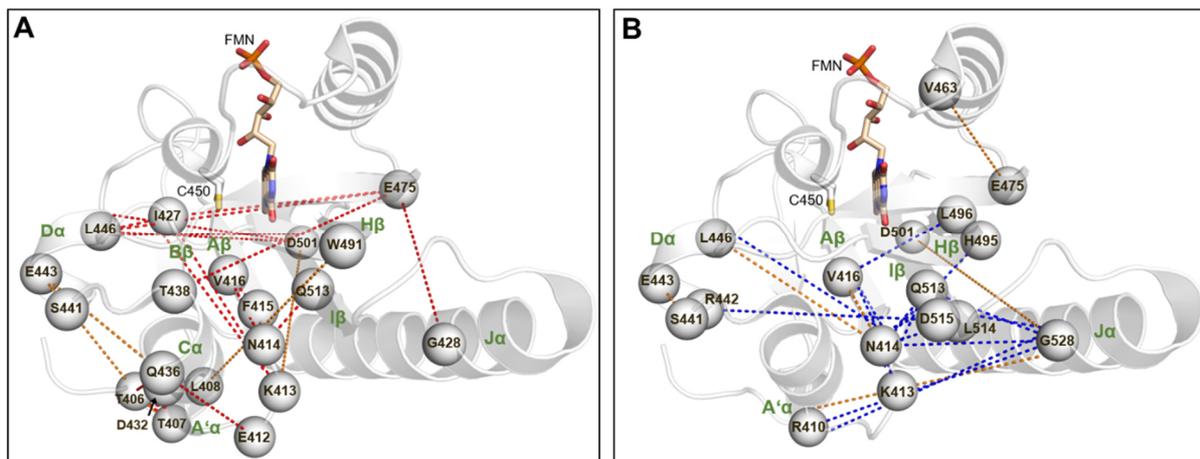


Abbildung 24: Mutationsnetzwerk zur Veranschaulichung von Multi-Site-Mutationen, die Varianten mit schnellerer (A) und langsamerer (B) Dunkelrückkehr ergeben. Die *As*LOV2-Struktur ist als transparenter Cartoon dargestellt und die Positionen der relevanten Reste sind durch eine Van-der-Waals-Kugel hervorgehoben, die am jeweiligen Ca-Atom positioniert ist. Farbcodierte gestrichelte Linien markieren das Mutationsnetzwerk, wobei rote, blaue und orange gestrichelte Linien für schneller und langsamer revertierende Varianten bzw. für Varianten stehen, die eine dem Wildtyp ähnliche Dunkelrückkehr besitzen (adaptiert nach [280]).

Um globale kombinatorische Mutationseffekte zu visualisieren, wurden alle bisher bekannten Literaturdaten sowie die hier generierten experimentellen Daten als Netzwerk auf

die Struktur des *AsLOV2* Proteins gemappt (Abbildung 24). Unterschiedliche Effekte unter den langsamen vorhergesagten und ausgewählten Varianten, die ebenfalls eine experimentell validierte langsamere Dunkelrückkehr besaßen, konnten für Q513R/G528R, Q513R/G528K, R410P/G528E, K413A/N414G, N414G/L446S und N414G/G528E gezeigt werden (Tabelle 16). Die Doppelvarianten Q513R/G528R ($\tau_{\text{rec}} = 60 \pm 5$ s) und Q513R/G528K ($\tau_{\text{rec}} = 54 \pm 11$ s) setzen sich jeweils aus den Einzelvarianten Q513R ($\tau_{\text{rec}} = 85 \pm 21$ s), G528R ($\tau_{\text{rec}} = 21 \pm 0$ s) und G528K ($\tau_{\text{rec}} = 40 \pm 1$ s) zusammen (Tabelle 16). Der Rest Q513 ist auf dem I β -Faltblatt mit einem Abstand zum Flavin-Chromophor von 7,6 Å entfernt während G528 auf der J α -Helix lokalisiert ist und 16,3 Å entfernt liegt (Abbildung 20 A). Beide Reste stehen in einem Netzwerk aus Resten die mutiert wurden zusammen (Abbildung 24 B) allerdings beschleunigt der Rest G528 (R und K) die Variante Q513R anstatt sie zu verlangsamen. Gegensätzlich dazu verhält es sich mit der Doppelvariante R410P/G528E ($\tau_{\text{rec}} = 58 \pm 1$ s), welche aus den Einzelvarianten R410P ($\tau_{\text{rec}} = 58 \pm 2$ s) und G528E ($\tau_{\text{rec}} = 18 \pm 1$ s) besteht (Tabelle 16). Hier beschleunigt der Rest G528 nicht die Dunkelrückkehr der Doppelvariante, sondern hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Dunkelrückkehrkinetik. Abschließend wären noch die Doppelvarianten K413A/N414G ($\tau_{\text{rec}} = 265 \pm 34$ s), N414G/L446S ($\tau_{\text{rec}} = 520 \pm 26$ s) und N414G/G528E ($\tau_{\text{rec}} = 243 \pm 5$ s) zu diskutieren (Tabelle 16). Sie setzen sich aus den Einzelvarianten K413A ($\tau_{\text{rec}} = 28 \pm 1$ s), N414G ($\tau_{\text{rec}} = 211 \pm 14$ s), L446S ($\tau_{\text{rec}} = 59 \pm 0$ s) und G528E ($\tau_{\text{rec}} = 18 \pm 1$ s) zusammen (Tabelle 16). Die Reste K413 und N414 sind in der A' α -A β -Schleife lokalisiert, während der Rest L446 auf der D α -Helix und G528 auf der J α -Helix lokalisiert sind, mit einem Abstand zum Flavin-Chromophor von 10,8-16,3 Å (Abbildung 20 A). Hier wirken sich die Reste K413A, L446S und G528E additiv auf N414G aus, indem sie Dunkelrückkehrkinetik weiter verlangsamen. Auffällig ist hier, dass Varianten mit einer langsamen Dunkelrückkehr häufiger am I β - und H β -Strang (z.B. Q513) bzw. der A' α -A β -Schleife (N414 und K413) lokalisiert sind. Interessanterweise handelt es sich bei den Positionen, deren Austausch zu den größten kombinatorischen Effekten führen, um Varianten in den Positionen N414 und Q513. Diese Reste sind Teil eines H-Brückennetzwerks und verbinden den FMN-Chromophor mit der A' α - und J α -Helix (Abbildung 24), welche ihrerseits ebenfalls Positionen besitzen, die einen großen Einfluss auf die Dunkelrückkehr haben (z.B. G528 auf J α -Helix). Während es also auf den ersten Blick so erscheint, als ob Positionen, die für die Signalweiterleitung von Bedeutung sind auch einen großen Einfluss auf die Dunkelrückkehr haben, können wir nicht ausschließen, dass diese Beobachtung auch mit der Einseitigkeit des zugrundeliegenden Datensatzes zusammenhängt.

Tabelle 16: Kombinatorische Effekte der Dunkelrückkehrkintik. Aufgelistet ist die jeweilige Vorhersagerunde, die *AsLOV2*-Variante, die Information ob diese Variante vorhergesagt/ausgewählt bzw. schnell/langsam ist und deren Dunkelrückkehr ($\tau_{\text{rec}}(\text{s})$). *: Variante neigt zur Aggregation.

Runde	<i>AsLOV2</i> -Variante	Ausgewählt/ vorhergesagt	$\tau_{\text{rec}}(\text{s})$
-	Wildtyp	-	43 ± 4,5
1	K413C/N414C	Vorhergesagt, langsam	173 ± 7
1	K413C	Ausgewählt, langsam	35 ± 3
1	N414C*	Ausgewählt, langsam	961 ± 80
1	I427N/N449E	Vorhergesagt, schnell	-
1	I427N	Ausgewählt, schnell	7 ± 1
1	N449E	Ausgewählt, schnell	207 ± 9
1	I427T/E475T	Vorhergesagt, schnell	2 ± 0
1	I427T	Ausgewählt, schnell	1 ± 0
1	E475T	Ausgewählt, schnell	33 ± 1
1	L446M/D501W	Vorhergesagt, langsam	30 ± 1
1	L446M	Ausgewählt, langsam	36 ± 1
1	D501W	Ausgewählt, langsam	37 ± 0
1	L446Q/D501Y	Vorhergesagt, langsam	14 ± 0
1	L446Q	Ausgewählt, langsam	46 ± 0
1	D501Y	Ausgewählt, langsam	36 ± 2
1	L446S/D501Y	Vorhergesagt, langsam	7 ± 1
1	L446S	Ausgewählt, langsam	59 ± 0
1	D501Y	Ausgewählt, langsam	36 ± 2
1	Q513R/G528R *	Vorhergesagt, schnell	60 ± 5
1	Q513R*	Ausgewählt, schnell	85 ± 21
1	G528R	Ausgewählt, schnell	21 ± 0
1	Q513R/G528K *	Vorhergesagt, schnell	54 ± 11
1	Q513R*	Ausgewählt, schnell	85 ± 21
1	G528K	Ausgewählt, schnell	40 ± 1
2	R410P/G528E	Vorhergesagt, schnell	58 ± 1
2	R410P	Ausgewählt, schnell	58 ± 2
1	G528E	Ausgewählt, schnell	18 ± 1
2	K413A/N414G	Vorhergesagt, schnell	265 ± 34

Runde	<i>As</i> LOV2-Variante	Ausgewählt/ vorhergesagt	τ_{rec} (s)
2	K413A	Ausgewählt, schnell	28 ± 1
2	N414G	Ausgewählt, schnell	211 ± 14
2	N414G/L446S	Vorhergesagt, schnell	520 ± 26
2	N414G	Ausgewählt, schnell	211 ± 14
1	L446S	Ausgewählt, langsam	59 ± 0
2	N414G/G528E	Vorhergesagt, schnell	243 ± 5
2	N414G	Ausgewählt, schnell	211 ± 14
1	G528E	Ausgewählt, schnell	18 ± 1
2	E475T/G528E	Vorhergesagt, schnell	32 ± 1
1	E475T	Ausgewählt, schnell	33 ± 1
1	G528E	Ausgewählt, schnell	18 ± 1
3	I427T/L446M/E475T	Vorhergesagt, schnell	0,4 ± 0
1	I427T	Ausgewählt, schnell	1 ± 0
1	L446M	Ausgewählt, langsam	36 ± 1
1	E475T	Ausgewählt, schnell	33 ± 1

3.2. Untersuchungen der Mechanismen zur Adduktbildung in LOV-Domänen

3.2.1. Expression, Reinigung und Probenpräparation

Wie bereits oben beschrieben kann der Mechanismus der Dunkelrückkehr (Dauer: Sekunden bis Tage) (1.2.3), also die Rückkehr des Proteins aus dem Lichtzustand in den Dunkelzustand, von LOV-Photorezeptoren verändert und untersucht werden. Um zu überprüfen, ob es zwischen der Dunkelrückkehr und der Adduktbildung einen Zusammenhang bzgl. deren Kinetik gibt, wurden in Kooperation mit Dr. Roger-Jan Kutta (Universität Regensburg) der Mechanismus und die Kinetik der Photoadduktbildung (Dauer: Nano- bis Mikrosekunden) untersucht, also der Übergang vom Dunkelzustand in den Lichtzustand. Hierzu wurden zwei schnell zurückkehrende Varianten (*Ds*LOV-M49S [282] und *As*LOV2-V416T) untersucht, also ein bakterielles und ein pflanzliches LOV-Protein. Der Fokus liegt hier auf der Bildung des reaktiven Tripletzustands, dem Mechanismus der Adduktbildung und der assoziierten Kinetik dieser Prozesse. Als Kontrollkonstrukte wurden

zwei Varianten verwendet, die keine Adduktbildung zeigen, da das photoaktive Cystein gegen Serin ausgetauscht wurde (*DsLOV-C72S* und *AsLOV2-C450S*). Diese sollten also lediglich Fluoreszenzemission und Triplettbildung zeigen.

Die Varianten *AsLOV2-C450S* und *DsLOV-C72S* wurden mittels *QC*-PCR (2.2.2.3) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide (Tabelle 3) erzeugt. Alle PCR-Ansätze wurden per Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.6) analysiert, mittels *DpnI* verdaut (2.2.2.4) und in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (2.2.1.4). Nach der Inkubation der Agarplatten wurden eine Reihe von Klonen gepickt und in Flüssigkulturen (2.2.1.1) angezogen. Die Plasmid-DNA wurde isoliert (2.2.2.1). Unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide (Tabelle 3) wurde der Erfolg der *QC*-PCR durch die Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) mittels Sequenzierung (2.2.2.13) überprüft. Darüber hinaus wurde die Variante *AsLOV2-V416T* bereits in einem vorherigen Projekt (3.1) dieser Arbeit generiert. Die Variante *DsLOV-M49S* wurde von der AG Krauss zur Verfügung gestellt. Für die Kultivierung wurden *E. coli* CmpX 131 Zellen mit den *AsLOV2*-Konstrukten und *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit den *DsLOV*-Konstrukten transformiert (2.2.1.4, Tabelle 2). Anschließend erfolgte die heterologe Genexpression in 500 mL Autoinduktionsmedium bei 25 °C über das Wochenende (2.2.1.2). Die Proteinreinigung aller Varianten erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben. Der Erfolg der Reinigung ist in Abbildung 69 illustriert. Nach der Proteinreinigung wurde die Probenpräparation wie in Kapitel 2.2.3.1.2 beschrieben fortgesetzt und konzentriert, bis die für die transienten absorptionsspektroskopischen Messungen notwendigen Konzentrationen erreicht waren ($OD_{450\text{nm}}$ von 0,9 - 1,7). Die UV/Vis-Dunkelspektren der Testmessungen (Abbildung 70) zeigen, dass alle vier Zielproteine in ihrem Dunkelzustand vorlagen. Die benötigten $OD_{450\text{nm}}$ Werte im 2 mm Lichtweg konnten aus den experimentellen Daten erhalten werden (Tabelle 17). Es konnten Werte zwischen 0,93-1,76 gemessen werden. Diese entsprechen den vom Kooperationspartner geforderten Bedingungen.

Tabelle 17: Übersichtstabelle der $OD_{450\text{ nm}}$ Werte im 2 mm Lichtweg von *DsLOV-M49S* und *-C72S* sowie *AsLOV2-V416T* und *-C450S*. Dargestellt sind die jeweilige Variante, ihr Volumen (mL) nach dem Probenpräparationsschritt Konzentrieren (Konz.) und die $OD_{450\text{nm}}$ Werte im 2 mm Lichtweg.

Variante	Volumen (mL) nach Konz.	$OD_{450\text{ nm}}$ im 2 mm Lichtweg
<i>DsLOV-M49S</i>	10	1,16
<i>DsLOV-C72S</i>	7	0,93
<i>AsLOV2-V416T</i>	10	1,76
<i>AsLOV2-C450S</i>	10	1,40

Darüber hinaus wurden Dunkel-/ und Lichtspektren der Zielproteine gemessen (2.2.5.1).

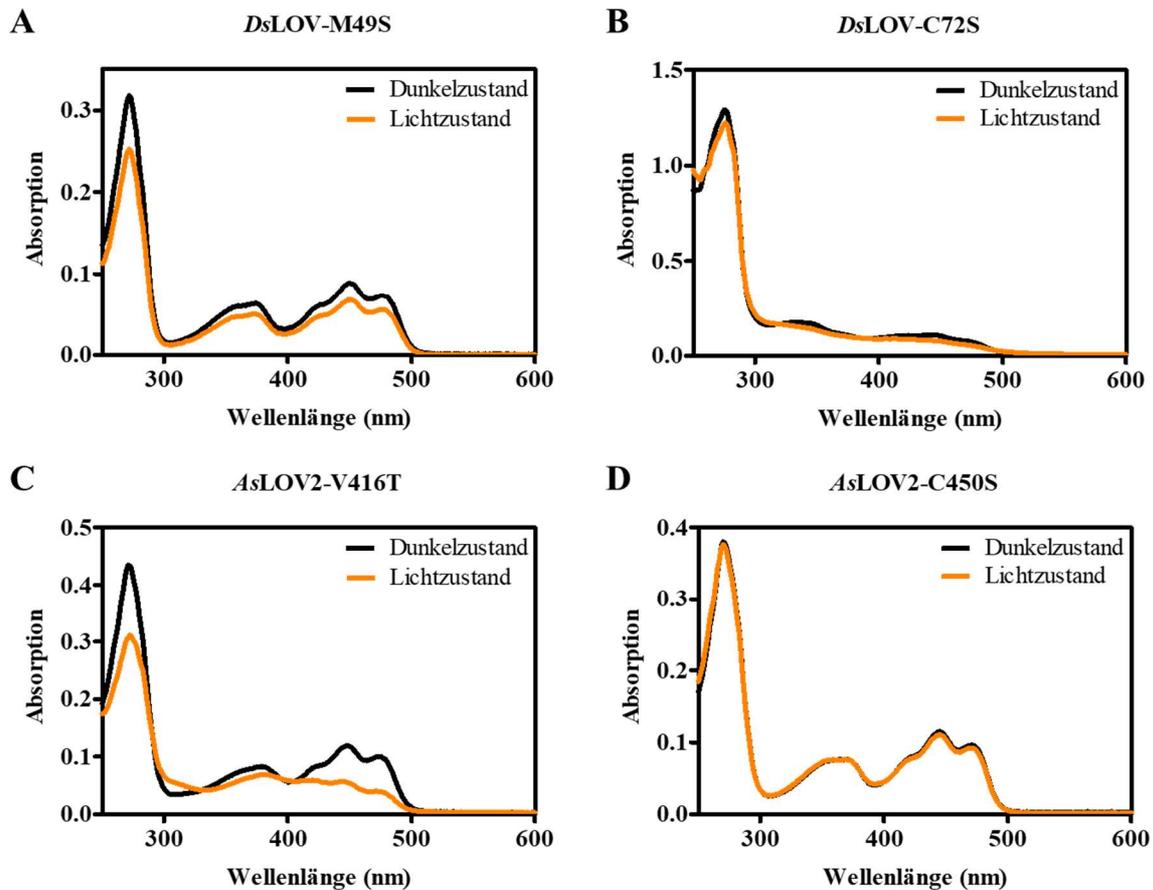


Abbildung 25: Absorptionsspektren der „Dunkel- und Lichtzustände“ von *DsLOV*-M49S (A) und -C72S (B) sowie *AsLOV2*-V416T (C) und -C450S (D). Alle Proben wurden mit Lagerpuffer C (2.2.3.1.2) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Die in Abbildung 25 dargestellten UV/Vis-Spektren zeigen für die Varianten *DsLOV*-M49S (A) und *AsLOV2*-V416T (C) eine spektrale Veränderung nach Beleuchtung mit Blaulicht. Bei Beleuchtung mit Blaulicht nimmt die Absorption bei 450 nm (Dunkelzustand) ab (schwarze Linie) und es kommt zur Ausbildung eines neuen Maximums bei 390 nm (Lichtzustand) (orangene Linie), was typisch für die Ausbildung eines kovalenten Flavin-Protein-Addukts ist (1.2.3). Für das *DsLOV* bzw. *AsLOV2* Kontrollkonstrukt, mit substituiertem photoaktiven Cystein (*DsLOV*-C72S und *AsLOV2*-C450S) (Abbildung 25, B und D) ist dies, wie zu erwarten, auch nicht der Fall. Das Lichtspektrum liegt exakt über dem jeweiligen Dunkelspektrum, etwaige minimale Abweichungen sind eventuell durch Photobleaching zu erklären. Für alle vier Varianten wurden die Flavin-Beladung und die

Proteinkonzentration anhand der UV/Vis-Spektren im Dunkelzustand quantifiziert. Mithilfe der in 2.2.5.3.2 beschriebenen Formeln kann aus den gemessenen Absorptionswerten bei 280 nm und 450 nm die Konzentration des Proteins ($c_{\text{Protein } 280 \text{ nm}}$) (Formel 2) und die Flavin-Beladung ($c_{\text{Flavin } 450 \text{ nm}}$) (Formel 3) abgeleitet werden.

Tabelle 18: Übersichtstabelle über die berechnete Proteinkonzentration und Flavin-Beladung von *DsLOV-M49S* und *-C72S* sowie *AsLOV2-V416T* und *-C450S*. Dargestellt sind die Zielproteine, die berechnete Proteinkonzentration (mg mL^{-1}) und die Flavin-Beladung (%).

Variante	Proteinkonzentration (mg mL^{-1})	FMN (%)
<i>DsLOV-M49S</i>	13,1	56,5
<i>DsLOV-C72S</i>	19,3	39,3
<i>AsLOV2-V416T</i>	28,1	61,9
<i>AsLOV2-C450S</i>	22,6	77,5

Die Quantifizierung der Flavin-Beladung ergab Werte zwischen 39,3 und 77,5 % (Tabelle 18), alle Proteine können also als gut bis sehr gut mit Flavin beladen angesehen werden. Darüber hinaus wurde die Dunkelrückkehrkinetik der Varianten *DsLOV-M49S* und *AsLOV2-V416T* untersucht, um ihre schnelle Dunkelrückkehr, welche für die transienten Absorptionsmessungen wichtig sind, zu verifizieren. Die Kontrollkonstrukte (*DsLOV-C72S* und *AsLOV2-C450S*) wurden der Vollständigkeit halber mitgemessen, sollten aber, nach Beleuchtung, keine Rückkehr in den Dunkelzustand zeigen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung kontinuierlich in einem proteinspezifischen Zeitraum durchgeführt und die Dunkelrückkehr der Proteine bei einer Absorption von 485 nm wie in Kapitel 2.2.5.3.1 beschrieben spektrophotometrisch verfolgt. Um den Einfluss der Mutationen auf die Dunkelrückkehr zu bestimmen, wurden die Adduktlebenszeiten (τ_{rec}) durch das Plotten der Absorptionsänderung bei 485 nm gegen die Zeit bestimmt (Abbildung 26). Unter den experimentell getesteten Varianten konnte, für *DsLOV-M49S* und *AsLOV2-V416T* (Abbildung 26, A und C) eine Adduktlebenszeit von $\tau_{\text{rec}} = 0,9 \pm 0,1 \text{ s}$ sowie $\tau_{\text{rec}} = 7,8 \pm 0,3 \text{ s}$ beobachtet werden. Für *DsLOV-C72S* und *AsLOV2-C450S* (Abbildung 26AM, B und D) konnte in der ersten Minute der Messung eine Absorptionsschwankung detektiert werden. Diese resultiert aus der Beleuchtung mit Blaulicht. Für die Variante *DsLOV-C72S* ist die Absorptionsminderung stärker, was durch Photobleaching erklärt werden könnte. Beide Varianten zeigten jedoch, wie zu erwarten, keine messbare Dunkelrückkehr.

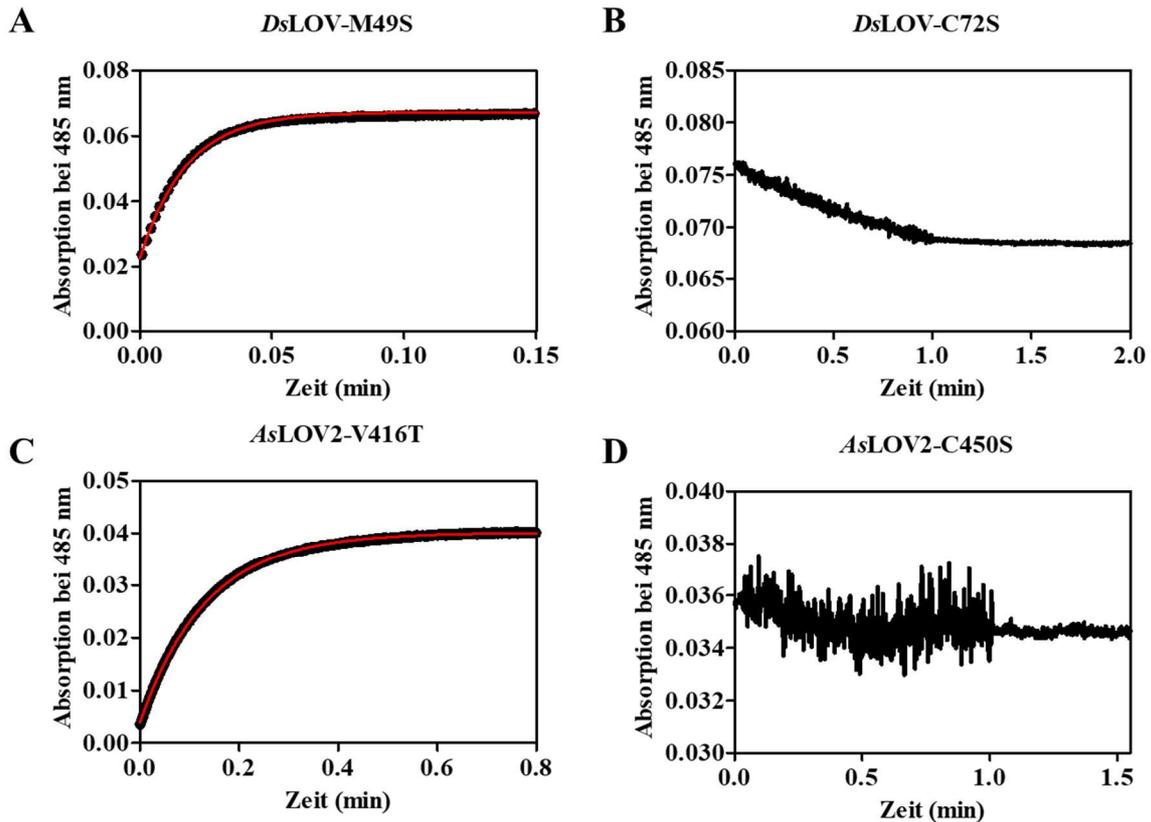


Abbildung 26: Dunkelrückkehrkinetik von DsLOV-M49S (A) und -C72S (B) sowie AsLOV2-V416T (C) und -C450S (D). Die Absorption bei $\lambda = 485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt ist eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung aus einem Satz von Dreifachmessungen (2.2.5.3.1). Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Für die Varianten DsLOV-C72S und AsLOV2-C450S konnte, wie erwartet, keine Dunkelrückkehr nachgewiesen werden. Die leichte Abnahme der Absorption, während der einminütigen Belichtungsphase, resultiert in beiden Fällen sehr wahrscheinlich durch Photobleaching des Flavins.

Nach der Probenpräparation (2.2.3.1.2) wurden alle Varianten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Probenversendung an das Institut für Physikalische und Theoretische Chemie der Universität Regensburg gelagert.

3.2.2. Untersuchungen der Adduktbildung in LOV-Photorezeptoren mit schnellem Adduktzerfall

Nach der Expression, Reinigung und Probenpräparation (3.2.1) wurden die zu untersuchenden Proben (AsLOV2-V416T und DsLOV-M49S) sowie die Kontrollkonstrukte (AsLOV-C450S und DsLOV-C72S) an den Kooperationspartner Dr. Roger Jan Kutta (Universität Regensburg) versendet. Alle Messungen zur Untersuchung der Adduktbildung und des Adduktzerfalls erfolgten durch Dr. Kutta und Dr. Nataliya Archipowa (Universität

Regensburg) mithilfe der transienten Absorptionsspektroskopie (TA) (2.2.5.4). Ziel der Messungen war hierbei die Aufklärung des immer noch diskutierten Reaktionsmechanismus der Adduktbildung. Bislang konnten weder ein radikalischer noch ein ionischer Mechanismus eindeutig identifiziert werden. Es wurden lediglich Indizien dafür gefunden, dass der Mechanismus womöglich über ein Radikalpaar nach einem Elektronentransfer vom Cystein zum FMN stattfindet, welches dann über eine Radikalpaarrekombination schließlich das Addukt bildet [130, 271, 283, 284]. Es wurde die Idee verfolgt, dass, wenn der Adduktzerfall schneller abläuft als im Wildtypen der entsprechenden LOV-Domäne, dies durch eine stark gespannte Proteinkonfiguration begründet, welche dann nach Zerfall in einer signifikant entspannten Proteinstruktur mit einem größeren mittleren Abstand zwischen dem C4a-Atom des FMN und dem S-Atom des Cysteins endet. Im Umkehrschluss sollte die Adduktbildung deutlich langsamer erfolgen als im Wildtyp, da die Adduktbildung aus einem deutlich größeren mittleren Abstand der beiden zusammenkommenden molekularen Komponenten, dem S-Atom des Cysteins und dem C4a-Atom des FMNs, heraus erfolgt. Dies sollte es ermöglichen etwaige Intermediate zu detektieren und somit den genauen Reaktionsmechanismus vollständig zu charakterisieren. In einem ersten Schritt wurden TA-Messungen des thermischen Adduktzerfalls nach Anregung bei 450 nm und Adduktbildung von *AsLOV2-V416T* und *DsLOV-M49S* mithilfe eines modifizierten Cary-60 Photometers (2.2.5.4) durchgeführt (Abbildung 27 und Abbildung 28).

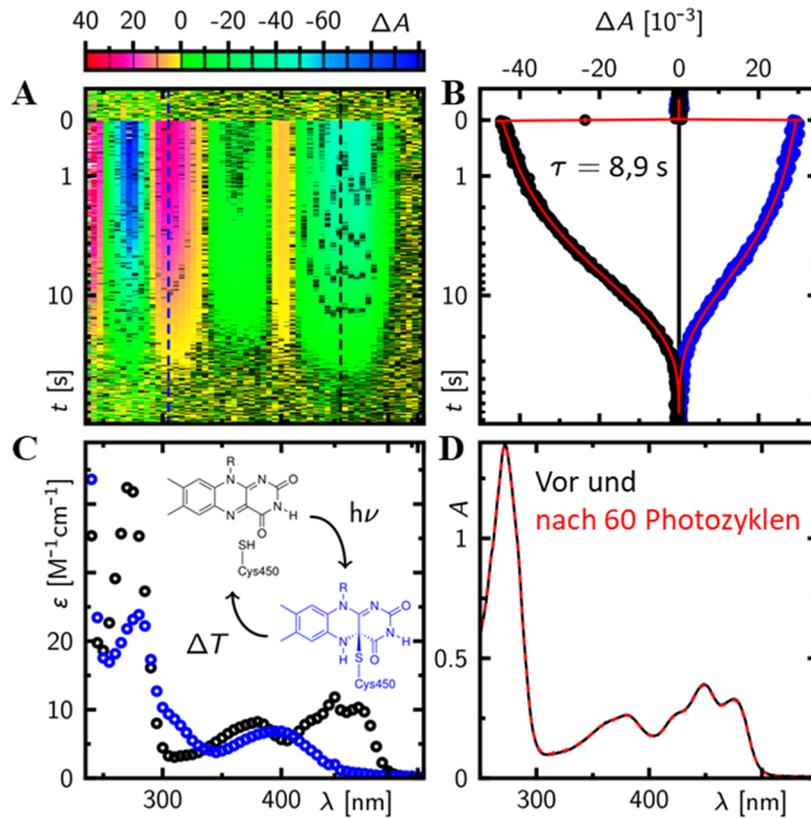


Abbildung 27: Transiente Absorptionsdaten des thermischen Adduktzerfalls von *AsLOV2-V416T*. A) TA-Spektren in einer Falschfarbendarstellung nach Anregung mit einem 10 ms Blaulichtpuls (2.2.5.4). B) Dargestellt sind zwei exemplarische Zeitschnitte (bei 310 nm (blau) und 450 nm (schwarz) inklusive mono-exponentiellem globalem Fit mit einer Lebensdauer von $\tau_{\text{rec}} = 8,9$ s (rote Linie), wie in A durch die gestrichelten Linien angegeben. C) Aus den Daten in A extrahierte Speziesspektren für das oxidierte FMN in der Proteintasche (Spektrum des Dunkelzustands, schwarz) und das Addukt in der Proteintasche (Spektrum des Lichtzustands, blau). D) Absorptionsspektren der Probe vor und nach 60 Anregungszyklen mit blauem Licht.

In den Abbildung 27 und Abbildung 28 sind die Daten der transienten Absorptionsmessungen der Dunkelrückkehr von *AsLOV2-V416T* und *DsLOV-M49S* dargestellt. Die 2D TA-Daten in Falschfarbendarstellung (V416T: Abbildung 27 A; M49S: Abbildung 28 A) zeigen den intrinsischen Zerfall des Addukts, wobei rote Töne für ein positives ΔA und blaue Töne für ein negatives ΔA Signal stehen. Aus den 2D TA-Daten konnte bei geeigneten Wellenlängen (Abnahme der Absorption bei 310 nm und Zunahme der Absorption bei 450 nm) die Kinetik des Adduktzerfalls abgeleitet werden (310 nm, Abbildung 27 B bzw. Abbildung 28 B, blau; 450 nm, Abbildung 27 B bzw. Abbildung 28 B, schwarz). Außerdem wurden aus dem Datensatz die Spektren des Licht- und Dunkelzustands der Proteine (Abbildung 27 C bzw. Abbildung 28 C) extrahiert. Für beide Varianten wurde die Kinetik des Adduktzerfalls bestimmt, wobei eine Adduktlebenszeit von $\tau_{\text{rec}} = 8,9$ s (*AsLOV2-V416T*; Abbildung 27 B) bzw. $\tau_{\text{rec}} = 755$ ms (*DsLOV-M49S*; Abbildung 28 B) erhalten wurde. Dies stimmt sehr gut mit den korrespondierenden Messungen die bei 485 nm

durchgeführt wurden, überein (Abbildung 26), welche Adduktlebenszeiten von $\tau_{\text{rec}} = 7,8 \pm 0,3$ s (*AsLOV2-V416T*; Abbildung 26C) und $\tau_{\text{rec}} = 0,9 \pm 0,1$ s (*DsLOV-M49S*; Abbildung 26A) lieferten. Zudem konnten für beide Varianten die typischen Spektren des Licht- und Dunkelzustands extrahiert werden (Abbildung 27 C bzw. Abbildung 28 C). Darüber hinaus wurde für beide Proteine eine hohe Photostabilität nachgewiesen, da selbst nach 60 bzw. 72 Anregungszyklen (Abbildung 27 D und Abbildung 28 D) eine vollständige Rückkehr in den Dunkelzustand beobachtet werden konnte.

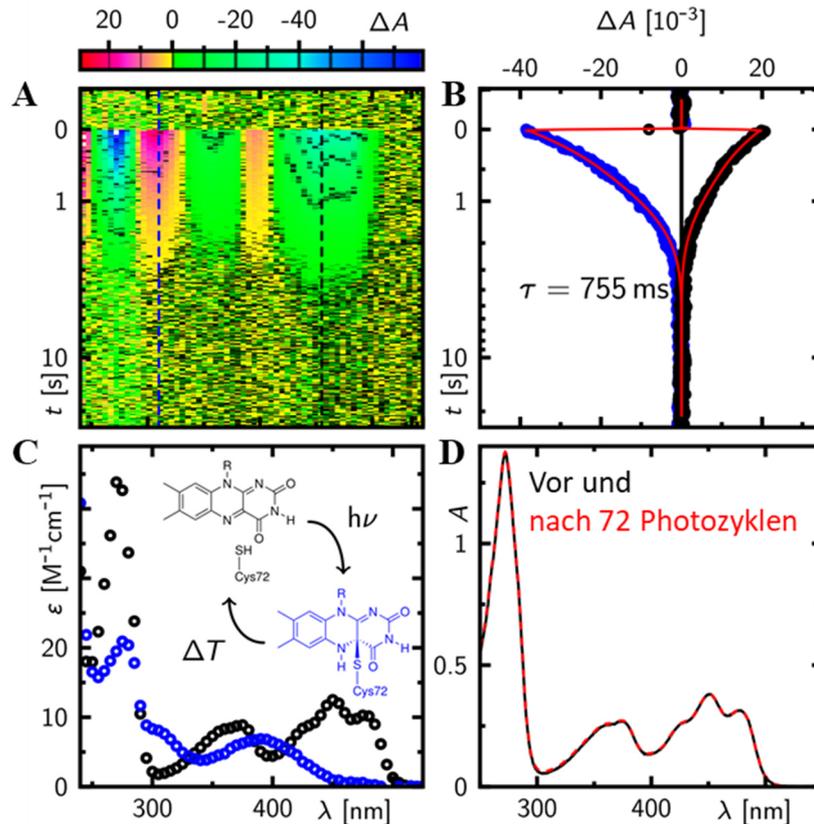


Abbildung 28: Transiente Absorptionsdaten des thermischen Adduktzerfalls von *DsLOV-M49S*. A) TA-Spektren in einer Falschfarbendarstellung nach Anregung mit einem 10 ms Blaulichtpuls (2.2.5.4). B) Dargestellt sind zwei exemplarische Zeitschnitte (bei 310 nm (blau) und 450 nm (schwarz) inklusive monoexponentiellem globalem Fit mit einer Lebensdauer von $\tau_{\text{rec}} = 755$ ms (rote Linie), wie in A durch die gestrichelten Linien angegeben. C) Aus den Daten in A extrahierte Speziesspektren für das oxidierte FMN in der Proteintasche (Spektrum des Dunkelzustands, schwarz) und das Addukt in der Proteintasche (Spektrum des Lichtzustands, blau). D) Absorptionsspektren der Probe vor und nach 72 Anregungszyklen mit blauem Licht.

Zur Untersuchung der Adduktbildung in beiden Varianten wurden TA-Messungen im ns-Zeitfenster mithilfe eines Aufbaus bestehend aus einer Kombination eines Spektrographen und einer *Streak* Kamera (Dr. Kutta, Universität Regensburg) durchgeführt (2.2.5.4). Zur Ermittlung der intrinsischen und nur durch molekularen Sauerstoff gelöschten Triplettlebensdauer wurden die TA-Daten von *AsLOV2-V416T* (Abbildung 29 B) und

DsLOV-M49S (Abbildung 30 B) und mit ihren korrespondierenden Varianten *AsLOV2-C450S* (Abbildung 29 A) bzw. *DsLOV-C72S* (Abbildung 30 A) verglichen.

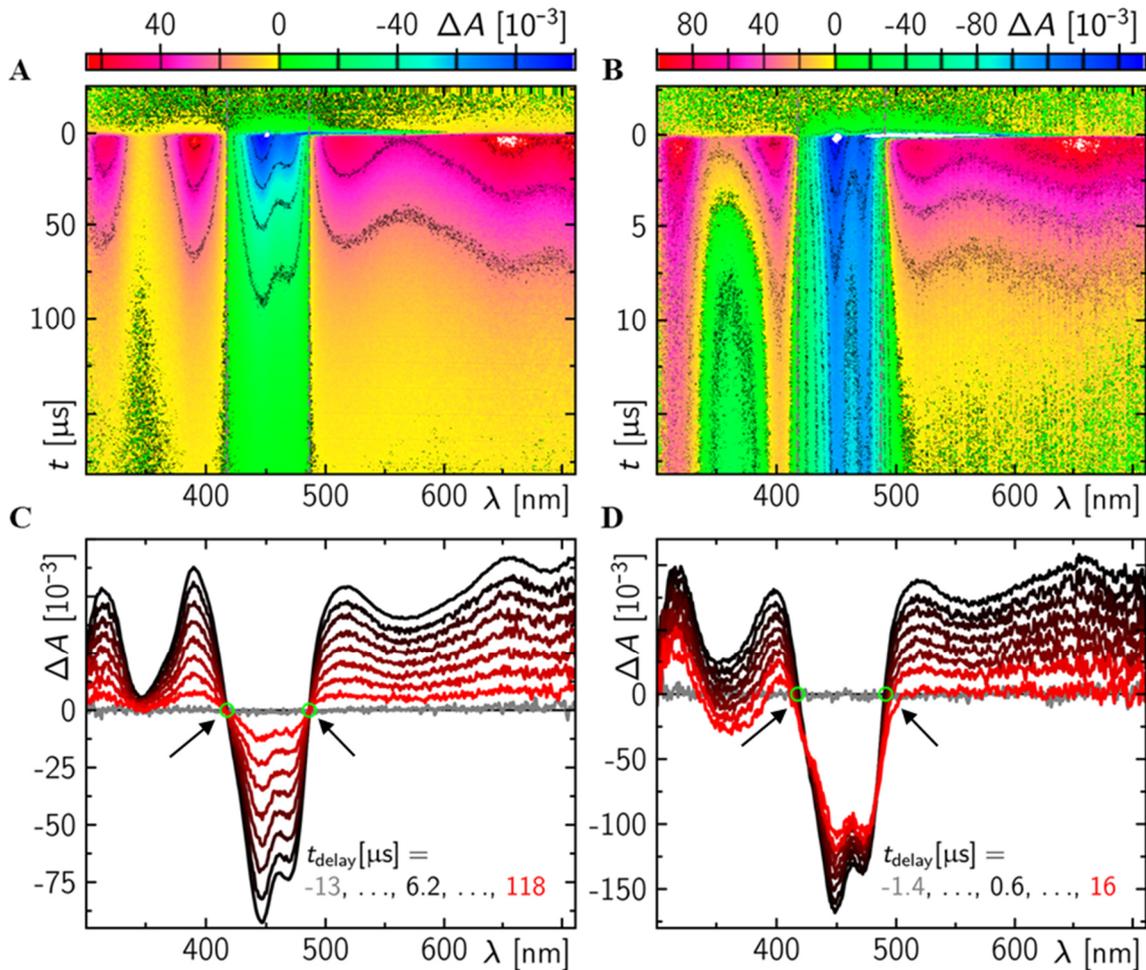


Abbildung 29: Transiente Absorptionsspektren von *AsLOV2-C450S* (A) und *AsLOV2-V416T* (B) nach Anregung bei 450 nm im ns bis μ s Zeitbereich. In Abbildung A und B sind die TA-Daten als Falschfarbendarstellung dargestellt, während in C und D die entsprechenden Differenzspektren bei ausgewählten Verzögerungszeiten (t_{delay}) nach dem Blaulichtanregungspuls (schwarz nach rot) gezeigt werden. Im Fall von *AsLOV2-C450S* verläuft der Triplettzerfall des FMNs unter Erhalt zweier isosbestischer Punkte (markiert durch grüne Kreise in C, hervorgehoben durch schwarze Pfeile) vollständig zurück in den Grundzustand. Im Fall von *AsLOV2-V416T* verläuft der Triplettzerfall des FMNs nicht unter Erhalt von isosbestischen Punkten (erwartete isosbestische Punkte für eine vollständige Umsetzung des Triplets in das FMN-Cys-Addukt sind markiert durch grüne Kreise in D, hervorgehoben durch schwarze Pfeile) vollständig in das FMN-Cys-Addukt. Das starke negative Signal innerhalb der zeitlichen Anregungsbreite bei $t_{\text{delay}} \approx 0$ entspricht der Fluoreszenz des proteingebundenen Flavin-Chromophors, was darauf hindeutet, dass die Triplettquantenausbeute unter 100% liegt.

In Abbildung 29 sind die spektralen Entwicklungen über die Zeit nach Anregung bei 450 nm für die LOV-Proteine *AsLOV2-C450S* und *-V416T* dargestellt. In beiden Fällen wird mit der Anregung direkt das Triplett-Absorptionsspektren abzüglich des Grundzustandsspektrums des sich in den jeweiligen LOV-Proteinen befindenden FMNs beobachtet. Im Fall der *AsLOV2-C450S* Variante erfolgt dann der Triplettzerfall des Flavins

unter Erhalt zweier isosbestischer Punkte vollständig zurück in den Grundzustand (markiert durch grüne Kreise in Abbildung 29 C). Im Gegensatz dazu erfolgt im Fall der *AsLOV2-V416T* Variante der Tripletzerfall des FMNs nicht unter Erhalt von isosbestischen Punkten (erwartete isosbestische Punkte für eine vollständige Umsetzung des Triplets in das FMN-Cys-Addukt sind durch grüne Kreise in Abbildung 29 D markiert). Dies deutet bereits darauf hin, dass entweder der Tripletzustand nicht vollständig ins Addukt zerfällt, dass sich zusätzlich ein weiteres Intermediat bildet, oder dass beide Szenarien beobachtet werden. Des Weiteren ist der Tripletzerfall mit $5,1 \mu\text{s}$ deutlich langsamer als im Fall des wildtypischen *AsLOV2* Proteins (Zeitkonstante für Tripletzerfall $2 \mu\text{s}$, [136]. Im Fall des *AsLOV2* Wildtyps wurde eine Adduktbildung zu nur 50 % berechnet, und die Zeitkonstante der Adduktbildung entspricht dann $4 \mu\text{s}$ [136]. Selbst bei der Annahme einer Adduktausbeute von 100 % aus dem Tripletzustand wäre die Adduktbildung in der *AsLOV2-V416T* Variante bereits um $1 \mu\text{s}$ langsamer. Aufgrund der fehlenden isosbestischen Punkte in der Höhe von $\Delta A = 0$ in den Rohdaten sowie der leichten Abnahme des negativen Grundzustandsausbleichens um 450 nm , ist davon auszugehen, dass die Adduktausbeute bei $< 100 \%$ liegt und entsprechend die Zeitkonstante der Adduktbildung bei deutlich $> 5,1 \mu\text{s}$ liegt. Unter der Annahme, dass sich die Photophysik des intrinsischen Tripletzerfalls über *intersystem-crossing* und Löschung durch molekularen Sauerstoff in beiden LOV-Varianten, d.h. *AsLOV2-C450S* und *-V416T*, identisch ist, lässt sich die Adduktausbeute gemäß Formel 6 in erster Näherung abschätzen. Im Fall von *AsLOV2-V416T* ergibt sich entsprechend eine abgeschätzte Adduktausbeute von 91% und damit eine Zeitkonstante für die Adduktbildung von $5,6 \mu\text{s}$. Abschließend liegt die Vermutung nahe, dass der Adduktzustand in einer „gespannten“ Konformation vorliegt, was den schnellen Zerfall des Addukts erklärt. Gegebenenfalls führt die eingeführte Mutation dazu, dass im Dunkelzustand der mittlere Abstand zwischen dem Flavin-C4a-Atom und der Cysteinseitenkette vergrößert ist, was ineffizientere Adduktbildung im Vergleich zum Wildtyp erklären würde.

Formel 6: Berechnung der Adduktausbeuten von Tripletreaktionen. Mit $k(T_1)$: Zeitkonstante, T_1 : Decay ohne Adduktbildung, T_2 : Decay mit Adduktbildung.

$$1 - \frac{k(T_1)}{k(T_2)} * 100 \%$$

In Abbildung 30 sind die TA-Daten der LOV-Proteine *DsLOV-C72S* sowie *-M49S* dargestellt. Während die Signalintensitäten für beide Varianten aufgrund einer geringeren

Probenkonzentration geringer ausfallen als bei den korrespondierenden *AsLOV2*-Varianten, sind dennoch ähnliche zeitliche spektrale Änderungen zu beobachten (Tripletzerfall nicht unter Erhalt von isosbestischen Punkten im Fall der *DsLOV-M49S* Variante, langsamer Tripletzerfall) (Abbildung 30). Für *DsLOV-M49S* liegt die abgeschätzte Adduktausbeute bei 96 %.

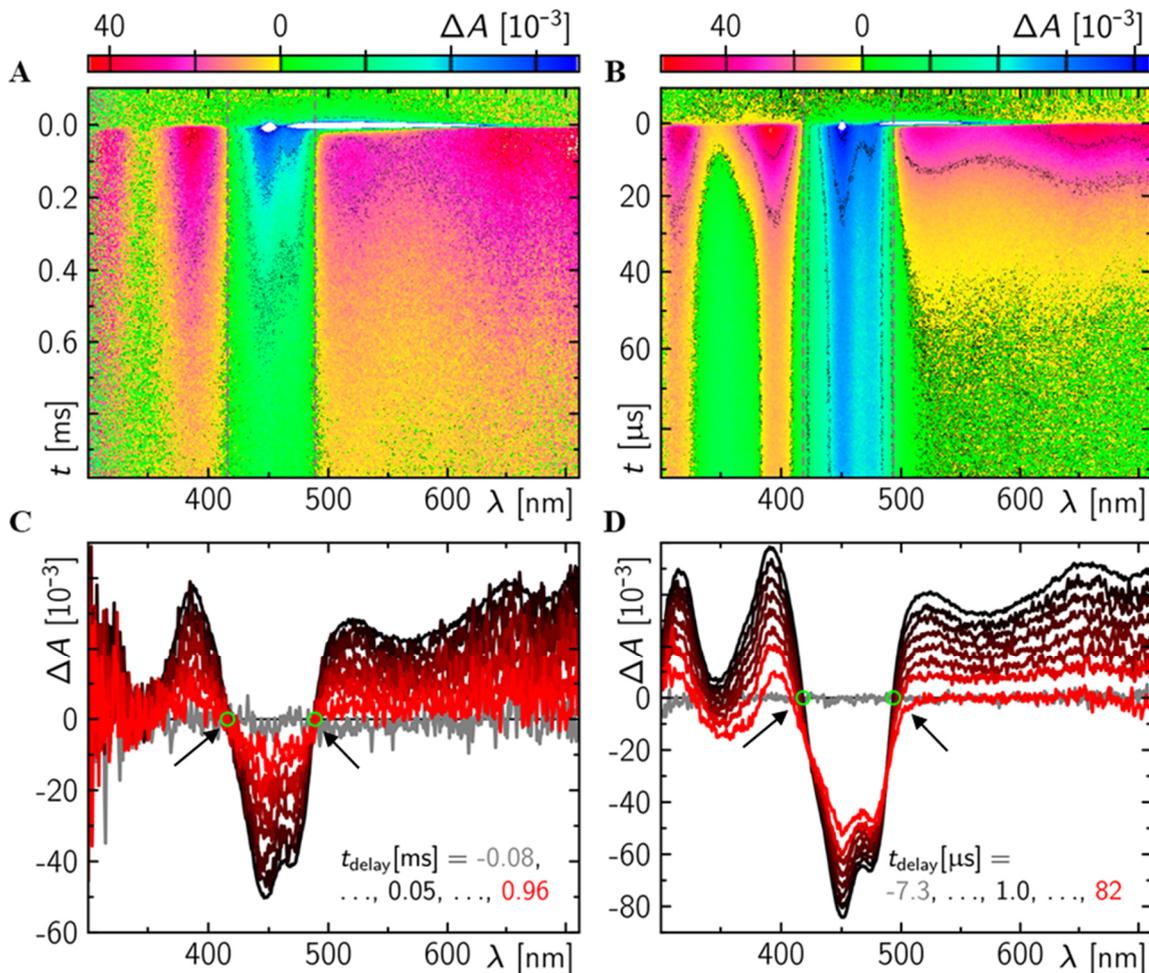


Abbildung 30: Transiente Absorptionsspektren der Triplet/ Adduktbildung von *DsLOV-C72S* (A) und *DsLOV-M49S* (B) nach Anregung bei 450 nm im ns bis μ s Zeitbereich. In Abbildung A und B sind TA-Daten als Falschfarbendarstellung dargestellt, während in C und D die entsprechenden Differenzspektren bei ausgewählten Verzögerungszeiten (t_{delay}) nach dem Blaulichtanregungspuls (schwarz nach rot) gezeigt werden. Im Fall von *DsLOV-C72S* verläuft der Tripletzerfall des FMNs unter Erhalt zweier isosbestischer Punkte (markiert durch grüne Kreise in C, hervorgehoben durch schwarze Pfeile) vollständig zurück in den Grundzustand. Bei *DsLOV-M49S* verläuft der Tripletzerfall des FMNs nicht unter Erhalt von isosbestischen Punkten (erwartete isosbestische Punkte für eine vollständige Umsetzung des Triplets in das FMN-Cys-Addukt sind markiert durch grüne Kreise in D, hervorgehoben durch schwarze Pfeile) vollständig in das FMN-Cys-Addukt. Das starke negative Signal innerhalb der zeitlichen Anregungsbreite bei $t_{\text{delay}} \approx 0$ entspricht der Fluoreszenz des proteingebundenen Flavin-Chromophors, was darauf hindeutet, dass die Tripletquantenausbeute unter 100% liegt.

Generell lassen sich die Dynamiken der Addukt-bildenden LOV-Domänen grob mit zwei exponentiellen Funktionen im globalen Fit erfassen, was auf mindestens zwei gleichzeitig

stattfindende Zerfallsprozesse hindeutet (Tripletzerfall in den Grundzustand und Tripletzerfall in den Adduktzustand). Eine genauere Betrachtung zeigt jedoch, dass erst durch eine weitere dritte Exponentialfunktion eine sehr gute Beschreibung erhalten wird. Entsprechend liefert ein einfaches Model, das ausschließlich einen Tripletzerfall zu Teilen in den Grundzustand und zu Teilen in den Adduktzustand vorsieht, zur Literatur abweichende Speziesspektren. Dies deutet somit darauf hin, dass in der Tat ein weiteres Intermediat beobachtet wird, dessen Spektrum und Identität allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt ist.

3.3. *Tuning* der spektralen Eigenschaften des Flavin-bindenden iLOV-Fluoreszenzproteins mittels Hochdurchsatz-Screenings

Bei Beleuchtung mit Blaulicht durchlaufen alle LOV-Photorezeptoren einen konservierten Photozyklus (1.2.3). Bei Beleuchtung mit Blaulicht wird innerhalb von ps ein angeregter Singulettzustand (S_1) besetzt. Innerhalb weniger ns kehrt ein Teil der angeregten Moleküle in den Grundzustand (S_0) zurück, wobei Licht in Form von Fluoreszenz emittiert wird. Ein anderer Teil der angeregten Moleküle geht durch *intersystem-crossing* (ISC) in einen angeregten Tripletzustand über, bei dem es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem C4a-Atom des LOV-Flavin-Chromophors und einem streng konservierten Cysteinrest im Protein kommt (Lichtzustand, LOV₃₉₀; $\lambda_{\max} = 390$ nm, 1.2.3). Wildtypische LOV-Photorezeptoren zeigen daher nur eine geringe Fluoreszenz, da innerhalb kurzer Zeit alle Moleküle in den Lichtzustand übergehen. Um die Fluoreszenzeigenschaften (insbesondere die Fluoreszenzquantenausbeute) eines LOV-Photorezeptors zu verbessern, kann das konservierte Cystein z.B. durch Alanin ersetzt werden. Bei Beleuchtung mit Blaulicht kann nun das Alanin keine kovalente Bindung zum Flavin-Chromophor ausbilden, wodurch das Flavin nur in seinen ersten angeregten Singulettzustand (1.2.3; S_1) und Tripletzustand (1.2.3; T) übergehen kann. Danach wird aufgenommene Energie teilweise in Form von Fluoreszenz freigesetzt und das Flavin kehrt in seinen Grundzustand (S_0) zurück. Dieser Effekt wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Thomas Drepper genutzt [186], um sauerstoffunabhängige Fluoreszenzreporter auf der Basis von LOV-Photorezeptoren zu entwickeln. Diese werden Flavin-basierte Fluoreszenzproteine, kurz FbFPs genannt (1.4.2.1). Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Austausch eines konservierten Glutamins gegen ein Lysin (Q148K) im LOV-basierten FbFP iLOV (1.4.2.1) eine Blauverschiebung des Absorptions- sowie des Fluoreszenzemissionsmaximums zur Folge hat [199].

Kristallographische Untersuchungen der iLOV-Q489K Variante haben zudem gezeigt, dass das eingeführte Lysin sich vollständig aus der FMN-Bindungstasche herausbewegt und nicht mehr, wie das ursprünglich vorhandene Glutamin, an der FMN-Bindung beteiligt ist. Somit gibt es keine Wechselwirkung zwischen dem Lysin und dem Flavin, was die Blauverschiebung im Vergleich zum wildtypischen iLOV-Protein erklärt [252]. Außerdem wurde von Röllen *et al.* [252] nachgewiesen, dass durch Stabilisierung des Lysins in der Chromophorbindetasche eine Rotverschiebung der spektralen Eigenschaften des Proteins möglich wird. Beim Screening einer kleinen Sättigungsmutagenesebibliothek wurde die Variante iLOV-Q489K/V392T identifiziert, welche im Vergleich zu iLOV-Q489K bzw. dem wildtypischen iLOV ein um 15 nm bzw. 6 nm rotverschobenes Emissionsmaximum besitzt. Die Kristallstruktur dieser Variante zeigte, dass das Lysin in der Nähe des Flavins, durch die Interaktion mit dem eingeführten Threonin stabilisiert wird [252]. Die beobachtete Rotverschiebung ist noch recht gering, daher stellt sich die Frage, ob es möglich ist, Varianten mit einer größeren Rot- bzw. Blauverschiebung zu erzeugen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Dr. Volkan Besirlioglu aus der AG Schwaneberg der RWTH Aachen mithilfe von *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS)-Methoden nach neuen rot- und blauverschobenen Varianten gesucht. Um bereits vorhandene Varianten zu verbessern, wurden mittels Sättigungsmutagenese (SSM) kombinatorische Dreifachmutanten des iLOV-Proteins erzeugt. Um eine komplette Abdeckung des Sequenzraumes zu erreichen, sollte für die iLOV-SSM-Bibliothek bei kombinatorischer Sättigung von drei Positionen $1,48 \times 10^9$ einzigartige Varianten gescreent werden (ohne *Oversampling*) (1.5.2), was den Einsatz von Ultrahochdurchsatz-Screening Verfahren wie FACS bedingt.

3.3.1. Erzeugung der iLOV-SSM-Bibliothek

Mittels degenerierter Nukleotide (NNK-Primer) (Tabelle 3) wurde eine iLOV-SSM-Bibliothek generiert (2.2.2.10), welche eine kombinatorische Sättigung an den Positionen 392, 487 und 489 besitzt. Die Probe wurde schockgefrostet und bei -18 °C bis zur Übergabe an den Kooperationspartner AG Schwaneberg (RWTH Aachen), M.Sc. Khalil Essani, Dr. Volkan Besirlioglu und Dr. Mehdi D. Davari (IPB Halle) gelagert.

Die komplette iLOV-SSM-Plasmidsammlung bestand aus insgesamt 277.840 gezählten Klonen, wobei die Plasmid-DNA in einem Volumen von $550\ \mu\text{L}$ und einer DNA-Konzentration von $551\ \text{ng}\ \mu\text{L}^{-1}$ vorlag. Der Ansatz wurde für FACS-Analysen an Dr. Vulkan Besirlioglu (AG Schwaneberg, RWTH Aachen) gesendet.

3.3.2. Auswahl der iLOV-Varianten mittels FACS-Screenings

Das FACS-Screening erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.8 beschrieben, wobei mit einem 488 nm Laser angeregt und die Fluoreszenz der Klone bei 530 ± 40 nm detektiert wurde (Abbildung 31). Da das Emissionsmaximum des wildtypischen iLOV-Proteins bei 496 nm [199, 252] liegt, können in dieser Weise Klone mit einer höheren Fluoreszenz bei 530 nm (als ggfs. rotverschobene Varianten) identifiziert werden. Typischerweise wird in FACS-Analysen das Vorwärtsstreulicht (Engl. *Forward Scatter*, Anregungslicht in Richtung des Strömungskanals) gebrochen und die Fluoreszenzemission der Zellen als Seitenstreulicht (Engl. *Side Scatter*, gemessen in einer Richtung welche außerhalb der Strömungsrichtung bzw. des Anregungslichtwegs liegt) eingefangen. Während die Messung des Vorwärtsstreulichts zur Identifizierung der Partikelgröße und Homogenität dient, erlaubt die Messung der Fluoreszenzemission eine Quantifizierung der Fluoreszenzemission der Varianten. Anhand dieser Parameter wird ein sog. Gate (ein Vorwärtsstreulicht \times Seitenstreulicht Bereich) identifiziert, aus welchem Zellen in Mikrotiterplatten sortiert werden. Eine typische FACS-Analyse von iLOV-Wildtyp produzierenden Zellen ist in Abbildung 31 A zu sehen.

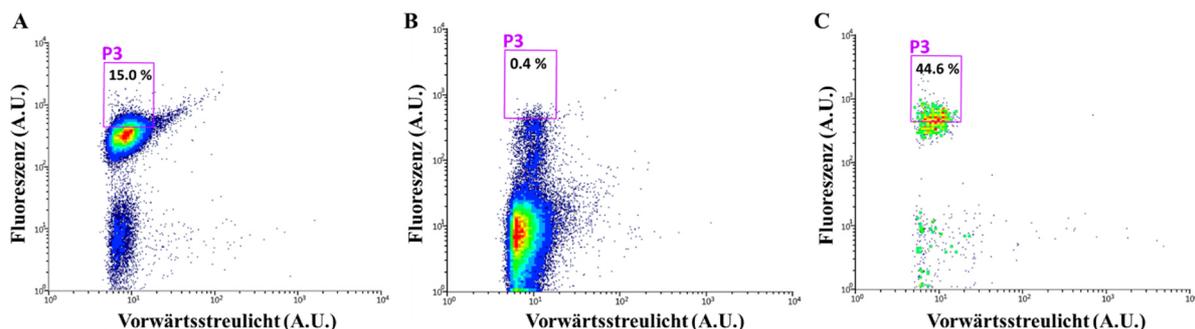


Abbildung 31: FACS-Screening der iLOV-SSM-Bibliothek. In Abbildung A ist die FACS-Analyse von *E. coli* BL21(DE3) Zellen dargestellt, die das wildtypische iLOV-Protein produzieren. Das lilafarbene Viereck markiert den Sortierbereich (Gate P3) in dem 15 % der Zellen zu finden sind. Abbildung B zeigt eine exemplarische FACS-Analyse der iLOV-SSM-Variantenbibliothek in *E. coli* BL21(DE3) (2.2.2.10). Insgesamt wurden 4.070.721 Events sortiert wovon rund 0,4 % der Varianten im Sortierbereich (10.651 Zellen) lagen. In Abbildung C ist die Resortierung der Varianten des ersten Screens (Panel B) gezeigt. Hier lagen 44,6 % der iLOV-Varianten im Sortierbereich, was einem Anreicherungsfaktor von 112 entspricht. Die Anregung erfolgte mithilfe eines 488 nm Lasers. Fluoreszenzemission wurde bei 530 ± 40 nm detektiert.

Insgesamt wurden 4.070.721 Events (= fluoreszente Zellen) der iLOV-SSM-Bibliothek mittels FACS (2.2.5.8) analysiert, wovon rund 0,4 % (10.651 Zellen) (Abbildung 31 A) der am stärksten fluoreszierenden Varianten aussortiert wurden. Eine Resortierung dieser einmal sortierten Population ergab einen Anreicherungsfaktor von 112 (Abbildung 31 C). Alle

aussortierten Varianten wurden in Mikrotiterplatten inkubiert (2.2.2.12) und analysiert (2.2.5.8, Abbildung 32).

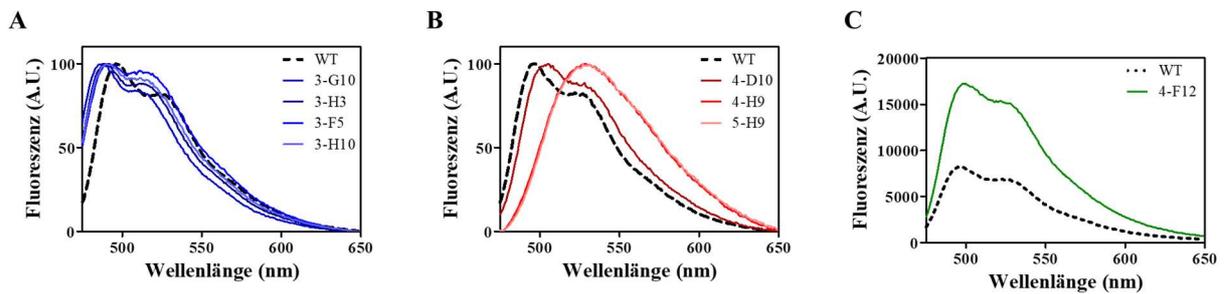


Abbildung 32: Fluoreszenzemissionsspektren der mittels FACS sortierten iLOV-SSM-Varianten. In Abbildung A sind ausgewählte potenziell rot und blau verschobene iLOV-Varianten sowie das Fluoreszenzemissionsspektrum des wildtypischen iLOV-Proteins (schwarz gestrichelt, fett) dargestellt. Die Abbildungen B-D illustrieren die potenziell blau (B) und rot (C) verschobenen Varianten sowie eine Variante, die anhand ihrer erhöhten Fluoreszenzintensität (D) identifiziert wurde. Alle Proben (zellfreie Rohextrakte, siehe 2.2.2.12) wurden mit iLOV-Puffer auf eine OD_{450nm} von etwa 0,1 verdünnt und mithilfe eines Mikrotiterplatten Fluoreszenzspektrophotometer ein Fluoreszenzemissionsspektrum (2.2.5.8) aufgezeichnet. Alle Proben wurden bei 440 nm angeregt.

Basierend auf dieser Vorauswahl wurden die acht besten Varianten ausgewählt und sequenziert. Von diesen acht Varianten waren vier potenziell blau- bzw. drei rotverschoben (Abbildung 32 A und B), während eine Variante basierend auf ihrer erhöhten Fluoreszenz identifiziert wurde (Abbildung 32 C und Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht über die mittels FACS sortierten iLOV-Varianten. Angegeben sind die Variantenbezeichnung, die erste Einschätzung anhand des Mikrotiterplatten-basierten Screens durch Dr. Besirlioglu, sowie die mittels Sequenzierung nachgewiesenen Mutationen.

Variantenbezeichnung	Ergebnis des MTP-basierten Screens an zellfreien Rohextrakten	Mutationen
3-G10	blauverschoben	Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493
3-H3	blauverschoben	V392L/Q489S
3-H10	blauverschoben	V392A/Q489A
3-F5	blauverschoben	G487C/Q489A
5-H9	rotverschoben	V392Y/Q489F (ohne His ₆ -Tag)
4-H9	rotverschoben	Nicht sequenzierbar
4-D10	rotverschoben	V392T/Q489G
4-F12	hohe Intensität	V392T (ohne His ₆ -Tag)

Variantenbezeichnung	Ergebnis des MTP-basierten Screens an zellfreien Rohextrakten	Mutationen
4-H9b	rotverschoben	V392S/Q489C
EH9-C4	rotverschoben	V392C/G487S/Q489L
EH9-E5	rotverschoben	V392C/G487S/Q489L

Anschließend wurden alle acht Varianten sequenziert (2.2.2.13). Dabei fiel auf, dass zwei Varianten 5-H9 und 4-F12 (iLOV-V392Y/Q489F und iLOV-V392T; Tabelle 19) keinen His₆-Tag am N-Terminus besaßen und die Variante 4-H9 (Tabelle 19) nicht sequenzierbar war, da in allen Versuchen immer Mischsequenzen erhalten wurden. Da die 5-H9 sowie die 4-F12 Variante nicht gereinigt werden konnten und die 4-H9 Variante anscheinend als Mischklon vorlag, wurden diese drei iLOV-Varianten für weitere Untersuchungen verworfen. Basierend auf diesem Sequenzierergebnis wurde von unserem Kooperationspartner für den Mischklon ein erneutes MTP-basiertes Screening durchgeführt und die drei besten Varianten (4-H9b, EH9-C4 und EH9-E5; Tabelle 19) identifiziert. Diese wurden im Anschluss erneut sequenziert (2.2.2.13), wobei nachgewiesen wurde, dass EH9-C4 und EH9-E5 identische Mutationen V392C/G487S/Q489L trugen und in 4-H9b die Mutationen V392S/Q489C vorlag. Aus dem Sequenzierergebnis ist ersichtlich, dass sowohl Doppel- als auch Dreifachvarianten erhalten wurden.

3.3.3. Expression, Reinigung und Charakterisierung der erhaltenen iLOV-Varianten

E. coli CmpX 131 wurde mit Plasmid-DNA aller ausgewählter iLOV-Varianten (Tabelle 19) transformiert (2.2.1.4, Tabelle 2). Anschließend erfolgte die heterologe Genexpression in 1 L Autoinduktionsmedium bei 37 °C über Nacht (2.2.1.2). Die Proteinreinigung und Probenpräparation aller iLOV-Varianten erfolgte wie in Kapitel 2.2.3.1.3 beschrieben. Der Erfolg der Reinigung sowie die dazugehörigen SDS-PAGE Analysen sind in Abbildung 71 (s. Anhang) gezeigt. Die SDS-PAGE Analysen der jeweiligen Reinigungen zeigten, dass die größte Menge an Zielproteinen in der Eluatfraktion (E_{NTA}: Eluat nach IMAC) vorlag, was den Reinigungserfolg in allen Fällen verdeutlicht. Zur weiterführenden Charakterisierung der iLOV-Varianten wurden Absorptions- (2.2.5.1) und Emissionsspektren (2.2.5.2)

aufgenommen (Abbildung 33). Die Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaxima der Varianten sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Anhand der Absorptionsspektren kann zudem die Flavin-Beladung der Varianten abgeschätzt werden (Tabelle 20).

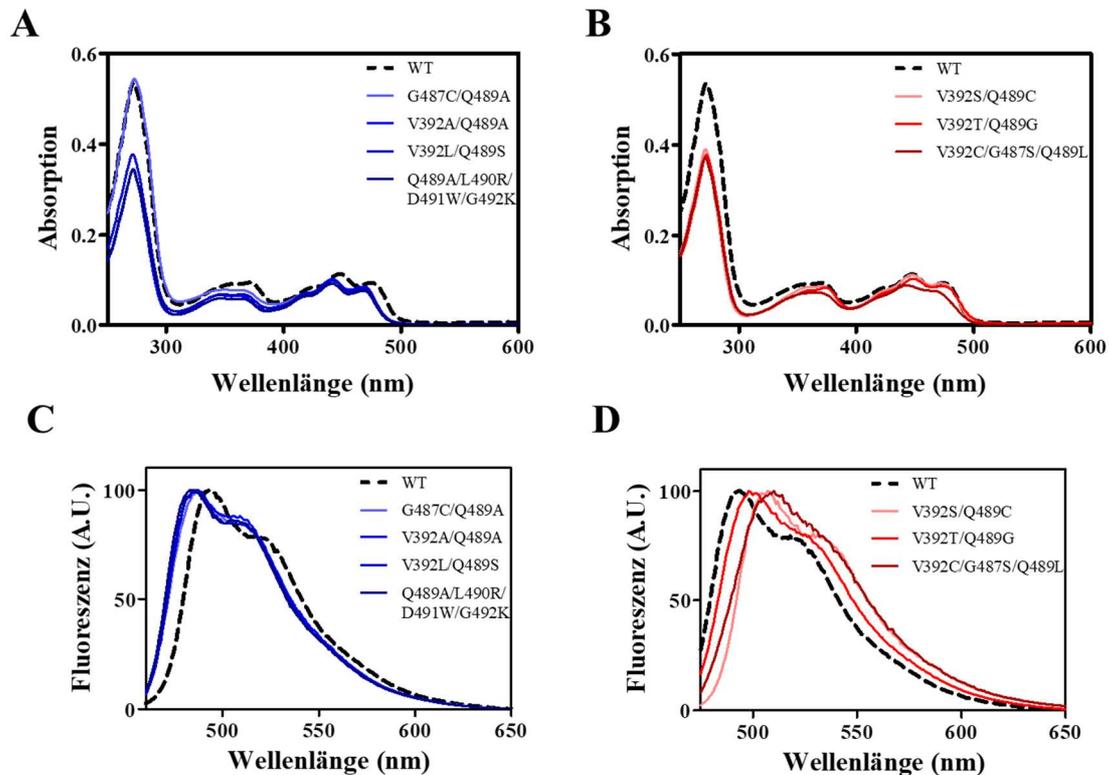


Abbildung 33: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren der iLOV-Varianten. In Abbildung A und B sind die potenziell blau (A) und rot (B) verschobenen Absorptionsspektren der iLOV-Varianten dargestellt. Die Fluoreszenzemissionsspektren der blau (C) und rot (D) verschobenen Varianten sind in Abbildung C und D illustriert. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer D (10 mM Tris, 10 mM NaCl; pH-Wert 7,0) auf eine $OD_{445\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Absorptionsspektrum (2.2.5.1) bzw. das Fluoreszenzemissionsspektrum (2.2.5.2) aufgezeichnet. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt.

Die in Abbildung 33 dargestellten Absorptionsspektren (A und B) zeigen für die blauverschobenen Varianten (Abbildung 33 A) im Vergleich zu ihren Fluoreszenzemissionsspektren (Abbildung 33 C), ebenfalls eine Blauverschiebung im Absorptionsspektrum. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden rotverschobenen Varianten iLOV-V392S/Q489C und iLOV-V392T/Q489G (Abbildung 33 B) im Vergleich zu ihren Fluoreszenzemissionsspektren (Abbildung 33 D) keine Rotverschiebung im Absorptionsspektrum. Lediglich iLOV-V392C/G487S/Q489L zeigt eine Rotverschiebung im Absorptions- sowie eine Blauverschiebung im Emissionsspektrum. Alle iLOV-Varianten, mit Ausnahme von iLOV-G487C/Q489A (19,9 %), waren mit einer Beladung zwischen 48,2 bis 90,6 % besser beladen als das wildtypische iLOV-Protein (33,6 %) (Tabelle 20), wobei eine

100 %ige Beladung anzeigt, dass alle Proteinmoleküle mit einem FMN beladen sind. Die in Abbildung 33 dargestellten Fluoreszenzemissionsspektren (C und D) zeigen für alle Varianten eine deutliche Blau- bzw. Rotverschiebung des Emissionsmaximums im Vergleich zum wildtypischen iLOV (schwarze gestrichelte Linie). Die größte Blauverschiebung (-10 nm) konnte für iLOV-V392A/Q489A sowie iLOV-Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493 (-10 nm) bzw. die größte Rotverschiebung (+16 nm) für iLOV-V392C/G487S/Q489L gemessen werden (Tabelle 20).

Im Vergleich zu den Literaturdaten fällt auf, dass die in dieser Arbeit identifizierten iLOV-V392A/Q489A und iLOV-Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493 Varianten (-10 nm, Tabelle 20) eine größere Blauverschiebung aufwiesen als die bereits beschriebene iLOV-Q489K Variante (-8 nm; [199]). Sie liegen damit im Bereich der Q116V Variante des *Pp2FbFP* Proteins [200] für welche jeweils eine 10 nm Blauverschiebung des Absorptions- und Fluoreszenzemissionsmaximums nachgewiesen wurde [200]. Da beide der hier identifizierten iLOV-Varianten ein hydrophobes Alanin an der Position von Q489 tragen, und in *Pp2FbFP* das korrespondierende Glutamin (Q116) ebenfalls durch eine hydrophobe Aminosäure substituiert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass das Einführen einer hydrophoben Aminosäure an der Position des Glutamins zu einer Blauverschiebung führt.

Darüber hinaus konnte ebenfalls eine verbesserte rotverschobene Variante (iLOV-V392C/G487S/Q489L; +16 nm, Tabelle 20) im Vergleich zu der bereits existierenden rotverschobenen iLOV-Q489K/V392T Variante (+6 nm; [252]) identifiziert werden. Außerdem besitzt dieselbe Variante (iLOV-V392C/G487S/Q489L) im Vergleich zum wildtypischen iLOV-Protein ein leicht blauverschobenes Absorptionsspektrum (443 vs. 448 nm; Tabelle 20), d.h. eine größere Stokes Verschiebung von 67 nm (Vergleich wildtypisches iLOV, 46 nm; Tabelle 20). Selbst die zweitbeste in dieser Arbeit identifizierte rotverschobene Variante (iLOV-V392S/Q489C) zeigt mit einer Rotverschiebung von +13 nm eine deutlich stärkere Rotverschiebung als die bereits bekannte iLOV-Q489K/V392T Variante (+6 nm; [252]). Auffällig ist hier, dass alle rotverschobenen Varianten eine polare Aminosäure an Position V392 tragen (Ser/Thr/Cys), während in diesen Varianten polare (Ser, Cys), kleine (Gly) oder hydrophobe Aminosäuren (Leu) an Position Q489 zu finden sind.

Interessanterweise zeigt die rotverschobene Variante iLOV-V392C/G487S/Q489L eine weniger ausgeprägte Feinstruktur der S_0 - S_1 Absorptionsbande sowie eine Emissionsbande mit weniger stark ausgeprägter Schulter bei ca. 530 nm. Dies könnte auf eine lockere Bindung des Flavins oder auf eine geringere Thermostabilität des Proteins zurückzuführen sein. Um dieser

Problematik nachzugehen, müssten *nanoDSF* Untersuchungen der iLOV-Proteine durchgeführt werden.

Tabelle 20: Übersicht der Absorptions- und Emissionsmaxima der untersuchten iLOV-Varianten. Dargestellt sind die jeweilige iLOV-Variante mit ihrer Flavin-Beladung (%), dem Absorptionsmaximum ($\lambda_{\text{max-Absorption}}$ (nm)), dem Emissionsmaximum ($\lambda_{\text{max-Emission}}$ (nm)), die Differenz zum WT ($\lambda_{\text{Emission-Variante}} - \lambda_{\text{Emission-WT}}$ (nm)), die Stokes-Verschiebung (nm) und ob die Variante blau-/ oder rotverschoben ist. -: Keine Angabe für iLOV-WT.

iLOV-Variante	Flavin-Beladung (%)	$\lambda_{\text{max-Absorption}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max-Emission}}$ (nm)	$\lambda_{\text{Emission-Variante}} - \lambda_{\text{Emission-WT}}$ (nm)	Stokes-Verschiebung (nm)	Blau-/ Rotverschoben
Wildtyp	33,6	448	494	-	46	-
G487C/Q489A	19,9	440	486	-8	46	Blau
V392A/Q489A	63,1	442	484	-10	42	Blau
V392L/Q489S	48,2	442	485	-9	43	Blau
V392S/Q489C	90,6	448	507	+13	59	Rot
V392T/Q489G	61,5	449	498	+4	49	Rot
V392C/G487S/Q489L	49,2	443	510	+16	67	Rot
Q489A/L490R/D491W/G492K/Stop493	73,7	441	484	-10	43	Blau

Weiterführende strukturelle Untersuchungen mittels Röntgenkristallographie, Molekulardynamiksimulationen und *Quantum Mechanics Molecular Mechanics* (QM/MM) Berechnungen wären notwendig, um die strukturelle Basis der beobachteten Änderungen zu analysieren.

3.4. Untersuchungen struktureller und dynamischer Änderungen während der Dunkelrückkehr von *PpSB1-LOV*

3.4.1. Ziel und Strategie der Arbeit

Der Blaulichtphotorezeptor *PpSB1-LOV* aus *Pseudomonas putida* KT2440 zeigt einen konservierten LOV-Photozyklus (siehe 1.2.3) mit einer langsamen Dunkelrückkehr (Adduktlebenszeit; $\tau_{\text{rec}} \approx 2.500$ min bei 20 °C [112]). *PpSB1-LOV* gehört zu den am besten strukturell charakterisierten Vollängen LOV-Proteinen (siehe Kapitel 1.3.2.2 für Details), wobei für das Protein sowohl eine Struktur im Dunkelzustand [135] als auch eine Lichtzustandsstruktur [134] für einen Kristall, welcher unter kontinuierlicher Beleuchtung angezogen wurde, aufgelöst werden konnten. Die in den Kristallstrukturen beobachteten Änderung wurden außerdem mittels NMR Spektroskopie verifiziert [135]. Ferner wurden

quasi-elastische Neutronenstreuexperimente genutzt, um Seitenkettendynamiken im Dunkel- und Lichtzustand zu untersuchen, wobei eine Rigidifizierung im Lichtzustand beobachtet werden konnte [171]. Interessanterweise konnte in Röntgenkleinwinkelstudien (Engl. *small angle X-ray scattering, SAXS*) an der *PpSB1-LOV-R66I* Variante des Proteins beobachtet werden, dass die Wiederherstellung der globalen Proteinstruktur des Dunkelzustands langsamer geschieht als das Brechen der kovalenten Flavin-Protein-Bindung, beobachtet mittels UV/Vis-Spektroskopie [285]. Dies deutet auf die Existenz eines bisher nicht beobachteten Zwischenprodukts hin, dessen Struktur jedoch mit der in dieser Studie verwendeten SAXS-Methode nicht genau untersucht werden konnte. Während ähnliche Beobachtungen für den dimeren Aureochrom LOV-Photorezeptor *PtAureo1c* aus *Phaeodactylum tricornutum* gemacht wurden [286], konnte für monomere LOV-Proteine wie *AsLOV2* keine Entkopplung der strukturellen und der spektroskopisch beobachtbaren Dunkelrückkehr festgestellt werden [181]. Zur strukturellen Untersuchung der Dunkelrückkehr des *PpSB1-LOV* Photorezeptors sind in dieser Arbeit zeitaufgelöste NMR und QENS-Untersuchungen des Proteins dargestellt, welche in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dieter Willbold (IBI-7, FZ-Jülich, Vineet Panwalkar, Marianne Schulte) und Dr. Andreas Stadler (JCNS-1/IBI-8, FZ-Jülich) durchgeführt wurden. Mithilfe dieser Methoden, unterstützt durch UV/Vis-spektroskopische Untersuchungen, sollten die strukturellen und dynamischen Übergänge während der Dunkelrückkehr analysiert werden.

3.4.2. Untersuchung der Adduktlebenszeit unter NMR-Bedingungen und zeitaufgelöste Messung der strukturellen Dunkelrückkehr

Mithilfe der UV/Vis-Spektrophotometrie ist es möglich, den thermischen Bruch der kovalenten Bindung zwischen dem Schwefelatom des photoaktiven Cysteins eines LOV-Proteins (C53 in *PpSB1-LOV*) und dem Isoalloxazinring des FMN-Chromophors zu verfolgen, da das Protein im Licht- und Dunkelzustand charakteristische Spektren besitzt (Abbildung 34 B). Darüber hinaus kann die Dunkelrückkehr des Proteins bei einer Absorption von 485 nm verfolgt werden (Abbildung 34 B Einschub) und mithilfe einer einfachen Exponentialfunktion (Abbildung 34 B Einschub, rote Linie) die Adduktlebenszeit τ_{rec} des LOV-Proteins bestimmt werden. Um zu untersuchen, ob es auch für *PpSB1-LOV* eine Entkopplung der spektroskopisch beobachtbaren Adduktlebenszeit τ_{rec} (gemessen mit UV/Vis-Spektroskopie) und der strukturellen Dunkelrückkehr des Proteins (gemessen mittels NMR-Spektroskopie) gibt, wurde zunächst die Adduktlebenszeit des Proteins unter NMR-

Bedingungen bestimmt. Unter diesen Bedingungen beträgt $\tau_{\text{rec}} = 78,7 \pm 2,1$ min bei 40 °C [129]. Allerdings können diese Messungen keinen Einblick in die globalen strukturellen Veränderungen im Protein geben. Diese Möglichkeit bietet allerdings die NMR-Spektroskopie, indem der Übergang zwischen Licht- und Dunkelzustand in ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren (*Engl. heteronuclear single quantum coherence, HSQC*) beobachtet wird [181]. Zur Charakterisierung der strukturellen Dunkelrückkehr von *PpSB1-LOV* wurden von Vineet Panwalkar und Marianne Schulte (IBI-7, FZ-Jülich) 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren des Lichtzustands [274] aufgenommen. Im Anschluss wurde die Lichtquelle (LED mittels Glasfaser in NMR gekoppelt) ausgeschaltet und zeitaufgelöst die Rückkehr in den Dunkelzustand verfolgt. Da in vorherigen Arbeiten die Peaks des Licht- und Dunkelzustands in 2D ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren zugeordnet wurden [135], kann so die strukturelle Dunkelrückkehr, aufgelöst für die beteiligten Seitenketten im Protein, beobachtet werden (exemplarisch gezeigt in Abbildung 34 C). Dargestellt ist hier die Abnahme der Resonanzen im Lichtzustand für Ala21 und Glu96 (rot) bei gleichzeitiger Zunahme der Intensitäten der entsprechenden Resonanzen im Dunkelzustand (schwarz). Aus dem Plot der Peakintensität gegen die Zeit und Anpassung dieser Daten mittels einer einfachen Exponentialfunktion, kann sowohl der Adduktzerfall (Abbildung 34 D, rot) als auch die gleichzeitige Bildung des Dunkelzustands (Abbildung 34 D, schwarz) verfolgt werden. Zur Untersuchung des strukturellen Adduktzerfalls ($\tau_{\text{Adduktzerfall}}$) (Abbildung 34 D, rote Kurve) sowie der strukturellen Dunkelrückkehr ($\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$) wurden die entsprechenden Werte für jeden zugeordneten Rest des Proteins durchgeführt und resteaufgelöst aufgetragen (Abbildung 35 A). Durch Mittelung der erhaltenen Werte über alle Reste wird die mittlere strukturelle Dunkelrückkehr mit einer Lebenszeit $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}} = 95,9 \pm 9,5$ min und ein mittlerer struktureller Adduktzerfall von $\tau_{\text{Adduktzerfall}} = 80,5 \pm 5,9$ min erhalten (Abbildung 35 A). Interessanterweise stimmt der Wert des mittleren strukturellen Adduktzerfalls $\tau_{\text{Adduktzerfall}} = 80,5 \pm 5,9$ min sehr gut mit der mittels UV/Vis-Spektrophotometrie ermittelten Dunkelrückkehr von $\tau_{\text{rec}} = 78,7 \pm 2,1$ min (Abbildung 34 B) überein. Gleichzeitig zeigt die im Mittel langsamere mittlere strukturelle Dunkelrückkehr mit einer Lebenszeit von $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}} = 95,9 \pm 9,5$ min, dass in *PpSB1-LOV* die strukturelle Dunkelrückkehr von der mittels UV/Vis spektroskopisch beobachtbaren Adduktlebenszeit (Bruch der kovalenten Flavin-Protein-Bindung) entkoppelt ist. Eine genauere Analyse der $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ und $\tau_{\text{Adduktzerfall}}$ -Werte der einzelnen Reste zeigt, dass für die meisten Reste die Dunkelrückkehr (Abbildung 35 A, schwarze Punkte) langsamer als der Adduktzerfall (Abbildung 35 A, rote Punkte) verläuft.

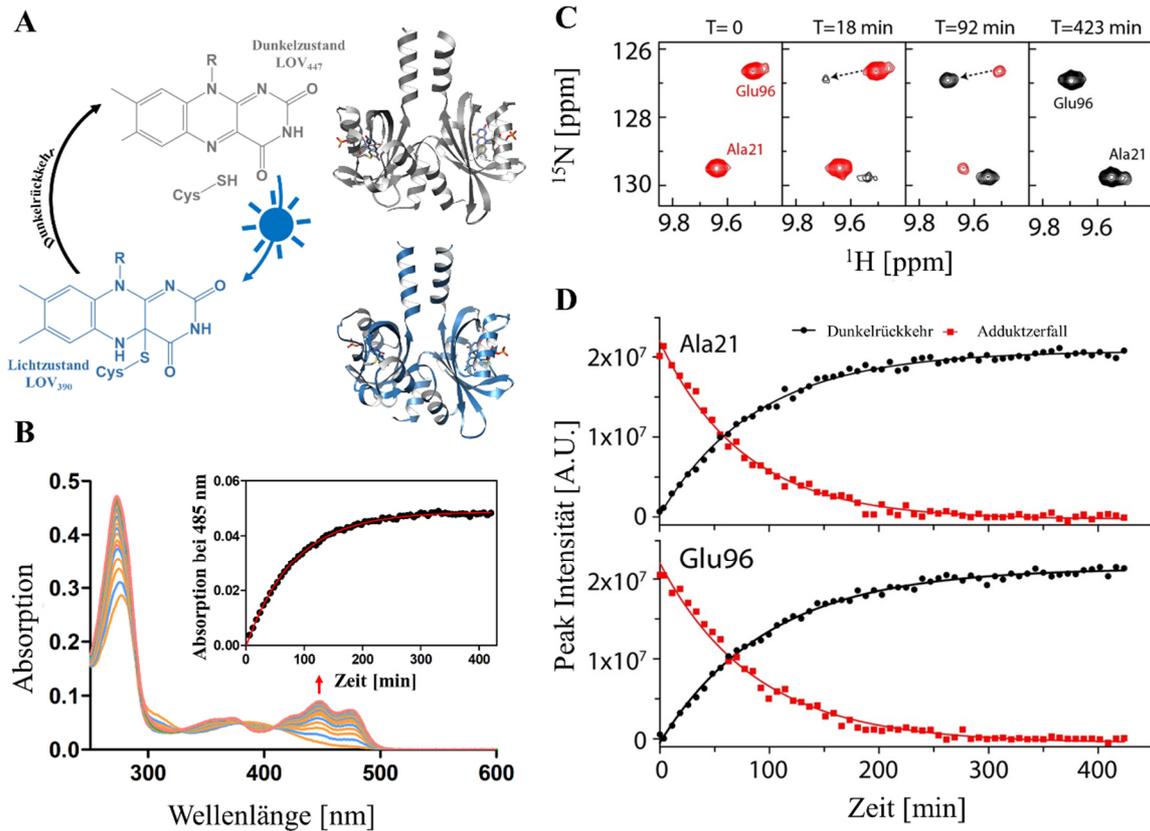


Abbildung 34: *PpSB1*-LOV-Photozyklus und Dunkelrückkehr, verfolgt mittels UV/Vis-Spektrophotometrie und NMR-Spektroskopie. (A) Im Dunkelzustand bindet die LOV-Domäne nicht-kovalent ein oxidiertes Flavin-Chromophor (FMN: R: C₅H₁₂O₇P), wobei der Komplex maximal bei $\lambda_{\text{max}} = 447$ nm absorbiert (LOV₄₄₇). Beleuchtung mit Blaulicht löst eine Kette von photophysikalischen und photochemischen Prozessen aus, die zur Bildung eines kovalenten Addukts zwischen einem streng konservierten Cysteinrest (C53 in *PpSB1*-LOV) und dem C4a-Atom des FMN-Chromophors führen. Die Bildung des Addukts (auch als Adduktzustand, Licht- oder Signalzustand bezeichnet) geht mit der Protonierung des FMN-N5-Atoms einher, wobei der Komplex im Lichtzustand bei $\lambda_{\text{max}} = 390$ nm (LOV₃₉₀) absorbiert. Strukturell führt die Ausbildung des Lichtzustands in *PpSB1*-LOV zu einer Rotationsbewegung der beiden LOV-Domänen des LOV-LOV-Homodimers relativ zueinander (linke Seite von Abbildung A, oben: Dunkelzustand, PDB-ID: 5J3W, Kette A und C; und unten: Lichtzustand, PDB-ID: 3SW1). Nach Beendigung der Beleuchtung kehrt das Protein in den Dunkelzustand zurück, wobei alle strukturellen Veränderungen innerhalb einer proteinspezifischen Zeitspanne rückgängig gemacht werden; dieser Prozess wird als "Dunkelrückkehr" bezeichnet. (B) Die Dunkelrückkehr des Proteins kann mittels Aufnahme sequentieller Absorptionsspektren verfolgt werden und ist hier für eine *PpSB1*-LOV-Probe exemplarisch gezeigt. Der rote Pfeil markiert die spektrale Entwicklung in Abhängigkeit von der Zeit. Einschub: Aus (B) extrahierte Kinetik, die die Rückkehr der Absorption des Dunkelzustandes bei 485 nm zeigt. Durch Anpassen einer einfachen exponentiellen Abklingfunktion (rote Linie) an die experimentellen Daten (schwarze Kreise) kann die Addukt-Lebenszeit (auch Dunkelrückkehrzeit) τ_{rec} bestimmt werden. (C) Die strukturelle Dunkelrückkehr des Proteins kann durch Aufnahme sequentieller 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-NMR-Spektren verfolgt werden und ist hier exemplarisch für die Resonanzen der NH-Gruppen des Proteinrückgrats von Ala21 und Glu96 einer *PpSB1*-LOV-Probe gezeigt. Die Boxen zeigen den jeweiligen Bereich des Spektrums zu verschiedenen Zeitpunkten während der Dunkelrückkehr des Proteins. Es wird eine Abnahme der Peakintensität im Lichtzustand für Ala21 und Glu96 (rot) bei gleichzeitiger Zunahme der Intensitäten der entsprechenden Resonanzen im Dunkelzustand (schwarz) beobachtet. (D) Die Kinetik der jeweiligen Prozesse kann in Form der Intensitätsabnahme der Peaks im Lichtzustand und Zunahme der Peaks des Dunkelzustands für Ala21 und Glu96 verfolgt werden. Durch Anpassen einer einfachen exponentiellen Abklingfunktion kann die Lebenszeit der Prozesse als $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ (schwarz) bzw. $\tau_{\text{Adduktzerfall}}$ (rot) erhalten werden. Messbedingungen: 40 °C, 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer (pH 6,4), ergänzt mit 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,03 % (w/v) NaN₃ in einer 90 %/10 % (v/v) H₂O/D₂O-Mischung (Abbildung übernommen und ins Deutsche übersetzt [274]).

Ausnahmen sind hierbei die N-terminalen Reste 12-17, welche die in der A' α -Helix bzw. im A' α -A α -Loop liegen sowie die Reste 108 und 112 im H β -I β -Loop (Abbildung 35 A). Besonders ausgeprägt ist diese Enkopplung dabei für die Reste 12-17 des A' α -A α -Loops, welche eine deutlich langsamere strukturelle Dunkelrückkehr zeigen und für die Resten 108-112, welche interessanter Weise anscheinend eine im Mittel schnellere Dunkelrückkehr aufweisen.

Um diese Beobachtung zu überprüfen wurde ein identisches Experiment (Abbildung 35 B) mit *PpSB1-LOV-I48T* durchgeführt, einer Variante mit schnellerer Dunkelrückkehr [263]. *PpSB1-LOV-I48T* wurde ausgewählt, da diese Variante trotz der schnelleren Dunkelrückkehr unter NMR-Bedingungen ($\tau_{\text{rec}} = 30,6 \pm 0,2$ min) ähnliche lichtabhängige Strukturänderungen aufweist [263]. Mittels dieses Experiments konnte für *PpSB1-LOV-I48T* ein nahezu identisches Muster in der resteaufgelösten strukturellen Dunkelrückkehrmessung beobachtet werden, wobei auch hier $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}} = 33,3 \pm 3,6$ min und der strukturelle Adduktzerfall von $\tau_{\text{Adduktzerfall}} = 27,8 \pm 2,1$ min [274] entkoppelt vorliegen. Dies verifiziert, dass in *PpSB1-LOV* (Abbildung 35 A) und *PpSB1-LOV-I48T* (Abbildung 35 B) ähnliche strukturelle Prozesse ablaufen. Die einzige Erklärung für die Entkopplung der strukturellen Dunkelrückkehr von der Kinetik des Brechens des Flavin-Protein-Adduktes ist das Vorhandensein eines strukturellen Intermediates. Da für das monomere *AsLOV2* zwar keine solche Entkopplung beobachtet wurde [181], jedoch ähnliche Effekt, wenngleich nur auf globaler Ebene (mittels SAXS) für den dimeren *PtAUREO1c* Photorezeptor erkennbar waren [286], ist zu vermuten, dass dimere LOV-Photorezeptoren im Gegensatz zu monomeren ein Zwischenprodukt für die Umlagerung des Dimers von seiner Struktur vom Dunkel- in den Lichtzustand benötigen.

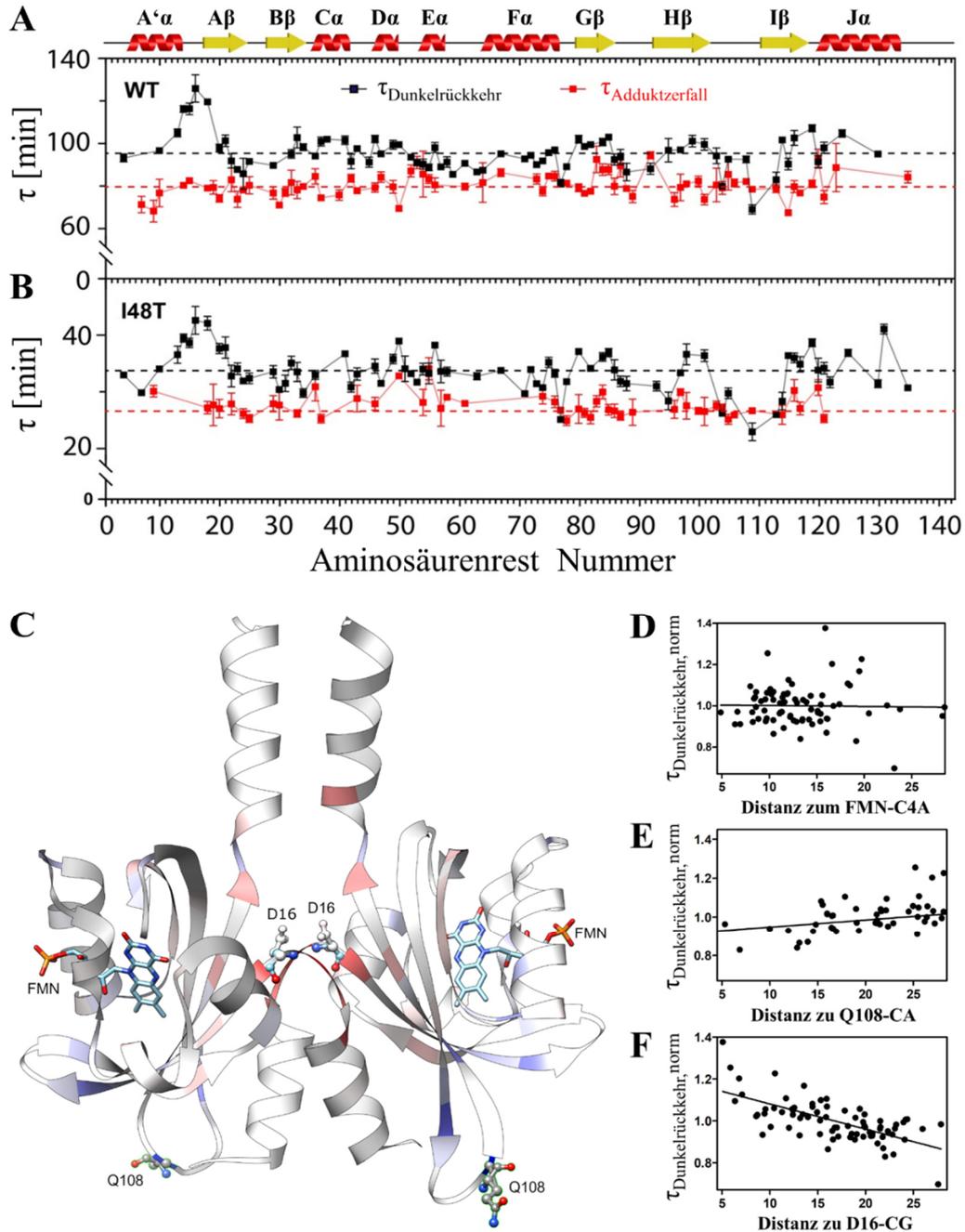


Abbildung 35: Strukturelle Dunkelrückkehr und Adduktzerfall von *PpSB1-LOV*, beobachtet mittels NMR. (A, B) Dargestellt sind die restaufgelösten Lebenszeiten des Dunkelrückkehr- bzw. des Adduktzerfallprozesses für *PpSB1-LOV* (A) und *PpSB1-LOV-I48T* (B), welche aus sequentiell aufgenommenen 2D- ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren extrahiert wurden. Die mittleren $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ und $\tau_{\text{Adduktzerfall}}$ Werte, erhalten durch Mittelwertbildung über alle Reste, sind durch die schwarze bzw. rote gestrichelte Linie gekennzeichnet (Wildtyp *PpSB1-LOV*: mittlere $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}} = 95,7 \pm 2,0$ min, mittlerer $\tau_{\text{Adduktzerfall}} = 80,5 \pm 3,0$ min) *PpSB1-LOV-I48T*: $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}} = 33,6 \pm 0,9$ min, $\tau_{\text{Adduktzerfall}} = 27,6 \pm 2,0$ min). Die Position der Sekundärstrukturelemente, in topologischer Reihenfolge von A' α bis J α ist oberhalb der Grafik angegeben. (C) Zur Visualisierung der strukturellen Prozesse wurden die $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ der einzelnen Reste auf den jeweiligen Mittelwert $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ normiert und als $\tau_{\text{Dunkelrückkehr, norm}}$ -Werte auf die Röntgenstruktur des *PpSB1-LOV*-Dimers im Dunkelzustand (PDB-ID: 3SW1) gemappt. Der FMN-Chromophor und ausgewählte Reste sind als Stäbchenmodell gezeigt, mit Kohlenstoffatomen in Cyan und Grau, Stickstoff in Blau, Sauerstoff in Rot und Phosphor in Orange. Restepositionen mit $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ -Werten über und unter dem durchschnittlichen $\tau_{\text{Dunkelrückkehr}}$ sind farblich in Rot (langsamerer Dunkelrückkehr) bzw. Blau (schnellere Dunkelrückkehr) kodiert. (D-F) Analyse der Korrelation zwischen dem Abstand des CA-Atoms eines jeden Rests und (D) dem FMN-C4a-Atom, (E) dem Q108-CA-Atom und (F) dem D16-CG-Atom.

Durch Einfärben der entsprechenden Strukturpositionen, entsprechend einer τ_{recnorm} -Skala, wurden die $\tau_{\text{Dunkelrückkehrnorm}}$ -Werte auf der Struktur direkt ersichtlich, also das Aminosäurereste im I β -H β -Loop die schnellste Dunkelrückkehr und Reste in der A' α -Helix bzw. im A' α -A α -Loop, also an der LOV-LOV Dimerrenzfläche, die langsamste Dunkelrückkehr zeigen (Abbildung 35 C). Um zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen z.B. dem Abstand vom Chromophor und der Geschwindigkeit der Dunkelrückkehr des jeweiligen Restes gibt, wurden die interatomaren Abstände zwischen dem C α -Atom jedes Aminosäurerestes und dem FMN-Chromophor (C4a-Atom) extrahiert (Abbildung 35 D). Außerdem wurden die Abstände zwischen dem C4a-Atom jedes Aminosäurerestes und dem Rest mit der schnellsten (Abbildung 35 E) bzw. der langsamsten strukturellen Dunkelrückkehr (Abbildung 35 F) berechnet und die jeweiligen normierten $\tau_{\text{Dunkelrückkehrnorm}}$ -Werte gegen diese Abstände aufgetragen. Werden die entsprechenden Korrelationsanalysen betrachtet, so zeigt sich, dass es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den $\tau_{\text{Dunkelrückkehrnorm}}$ -Werten und dem Abstand vom FMN-C4a-Atom gibt (Abbildung 35 D, Pearson Korrelationskoeffizient $r = -0,021$ und $p = 0,857$). Dies spricht gegen ein Szenario, in dem zuerst der Bruch der kovalenten Flavin-Protein-Bindung erfolgt und Reste in der Nähe des Flavins die schnellste Rückkehr zeigen, während proximale Reste am langsamsten zurückkehren. Gegen dieses Szenario spricht ebenfalls, dass nur vier von den 15 Aminosäureresten mit einer schnellen Dunkelrückkehr in der Nähe des FMN-Chromophors liegen und nur ein Rest über eine Wasserstoffbindung direkt mit dem Chromophor interagiert.

Interessanterweise gibt es eine signifikante Korrelation zwischen den $\tau_{\text{Dunkelrückkehrnorm}}$ -Werten und dem Abstand vom Q108 (dem Rest mit der schnellsten Dunkelrückkehr, Abbildung 35 E, Pearson Korrelationskoeffizient $r = 0,34$ und $p = 0,003$) bzw. dem Abstand zu D16 (dem Rest mit der langsamsten Dunkelrückkehr; Abbildung 35 F; Pearson Korrelationskoeffizient $r = -0,665$, $p < 0,001$). Dieses Szenario, deutet darauf hin, dass es Relay-Prozesse im Protein geben muss, die mittels NMR nicht aufgelöst werden können und die zu einer schnellen Rückkehr der Reste im I β -H β -Loop und zu einer drastisch langsameren Rückkehr der Reste in der A' α -Helix bzw. im A' α -A α -Loop führen.

All diese Beobachtungen und Vermutungen werfen die Frage nach der Art der Prozesse auf, die das Relay auslösen. Alternativ könnten die beobachteten Prozesse auch auf global oder lokal veränderte Proteindynamiken zurückzuführen sein. Interessanterweise konnte in QENS-Experimente mit *PpSB1*-LOV eine lichtabhängige Änderung der Seitenkettendynamik beobachtet werden, wobei das Protein im Lichtzustand rigider erscheint [171]. Um diese

Möglichkeit zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Andreas Stadler zeitaufgelöste QENS-Experimente (3.4.3 und 3.4.4) an *PpSB1-LOV* durchgeführt.

3.4.3. Expression, Reinigung und Dunkelrückkehrkinetik unter QENS-Bedingungen

Für die Charakterisierung der *PpSB1-LOV* Variante wurde diese zunächst exprimiert, gereinigt und in geeigneter Weise für die Messungen präpariert. Für die Kultivierung wurden *E. coli* CmpX 131 Zellen mit *PpSB1-LOV* transformiert (2.2.1.4, Tabelle 2). Anschließend erfolgte die heterologe Genexpression in 1 L Autoinduktionsmedium bei 25 °C über das Wochenende (2.2.1.2). Die Proteinreinigung und Probenpräparation erfolgten wie in Kapitel 2.2.3.1.4 beschrieben. Während des Zellaufschlusses, der verschiedenen Reinigungsschritte und des Pufferwechsels wurden Proteinproben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (s. Anhang Abbildung 72). Nach erfolgter Reinigung mussten für die QENS-Messung alle austauschbaren Protonen gegen Deuterium ausgetauscht werden, um den Kontrast zwischen dem Protein und dem Lösungsmittel zu erhöhen. Hierzu musste die Proteinprobe wiederholt lyophilisiert und in D₂O aufgenommen werden. Um zu überprüfen, ob das Protein durch diese Präparationsschritte Schaden nimmt, und ob das Protein vor der QENS-Messung im Dunkelzustand vorlag, wurden Spektren des Dunkelzustandes mittels UV/Vis-Spektrophotometrie wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben aufgezeichnet (Abbildung 36).

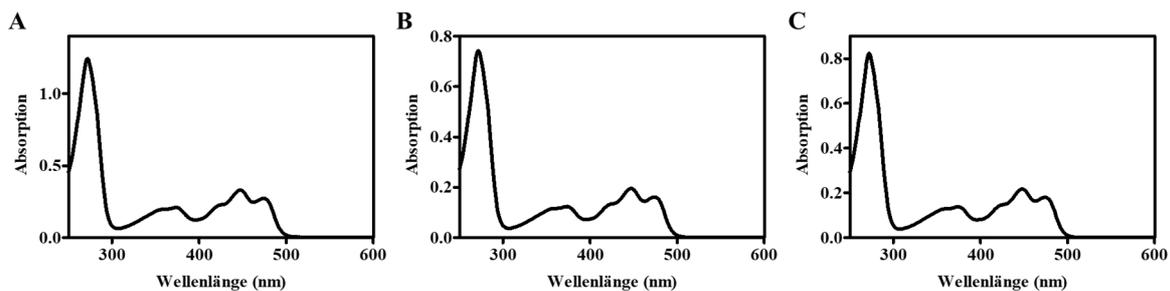


Abbildung 36: UV/Vis-Testspektroskopiemessungen von *PpSB1-LOV*. Die Testmessungen erfolgten vor dem ersten Lyophilisieren (A), nach dem ersten Lyophilisieren (B) und nach dem zweiten Lyophilisieren/Dialysieren (C) (schwarze Linie) (2.2.3.1.4). Die erste Messung wurde in Lagerpuffer B und die letzten beiden in QENS-Puffer bei 25 °C durchgeführt.

Aus den Messungen vor dem Lyophilisieren (A) nach dem ersten (B) und nach dem zweiten Lyophilisierungsschritt (C) ist ersichtlich, dass das Protein in allen Schritten intakt im Dunkelzustand vorlag. Aus diesen Spektren konnten zudem die Flavin-Beladung und die

Proteinkonzentration der Probe quantifiziert werden. Mithilfe der in 2.2.5.1.1 beschriebenen Formeln konnte aus den gemessenen Absorptionen bei 280 nm und 450 nm die Konzentration des Proteins ($c_{\text{Protein } 280\text{nm}}$) und die Flavinkonzentration ($c_{\text{Flavin } 450\text{nm}}$) berechnet werden (Tabelle 21). Die finale Probe (*PpSB1-LOV*, Spektrum siehe Abbildung 36 C) hatte eine Flavin-Beladung von 93,1 % und eine Proteinkonzentration von 65,0 mg mL⁻¹. Sie wurde an Dr. Andreas Stadler (JCNS-1/IBI-8, FZ-Jülich) für QENS-Messungen (3.4.4) übergeben.

Tabelle 21: Übersichtstabelle der Ergebnisse aus den UV/Vis-Testspektroskopiemessungen von *PpSB1-LOV*. Dargestellt sind die Flavin-Beladung (%), die berechnete Proteinkonzentration (mg mL⁻¹), die Probenvolumina (mL) sowie die Proteinausbeute (mg) von *PpSB1-LOV* nach der 4 Tages Inkubation im Dunkeln, nach dem ersten Lyophilisieren sowie nach dem zweiten Lyophilisieren (2.2.3.1.4).

	<i>PpSB1-LOV</i> vor Lyophilisieren	<i>PpSB1-LOV</i> nach 1. Lyophilisieren	<i>PpSB1-LOV</i> nach 2. Lyophilisieren
FMN (%)	95,1	95,4	93,1
Proteinkonzentration (mg mL⁻¹)	55,1	62,3	65,0
Volumen (mL)	6,0	5,2	4,0
Proteinausbeute (mg)	330,6	324,0	260,0

Darüber hinaus wurden zur weiteren Charakterisierung des *PpSB1-LOV* Proteins die Dunkelrückkehrkinetik bei unterschiedlichen Temperaturen (2.2.5.3.2.1) sowie das zeitabhängige Entfaltungverhalten bei einer konstanten Temperatur (2.2.5.5) untersucht. Da die Messzeiten der Dunkelrückkehr zwischen 8.000 min und 8 Wochen lagen, wurde die Kinetik mithilfe von sequentiell aufgenommenen UV/Vis-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 250-600 nm verfolgt (2.2.5.3.2.1). Dies erlaubte gleichzeitig eine Streukorrektur anhand eines potenziellen Basisliniendriffs im Bereich von > 500 nm (2.2.5.3.2.1). Um den Einfluss der Temperatur auf die Dunkelrückkehr zu bestimmen, wurden die Adduktlebenszeiten (τ_{rec}) durch das Plotten der Absorptionsänderung bei 485 nm gegen die Zeit bestimmt (Abbildung 37 und Tabelle 21).

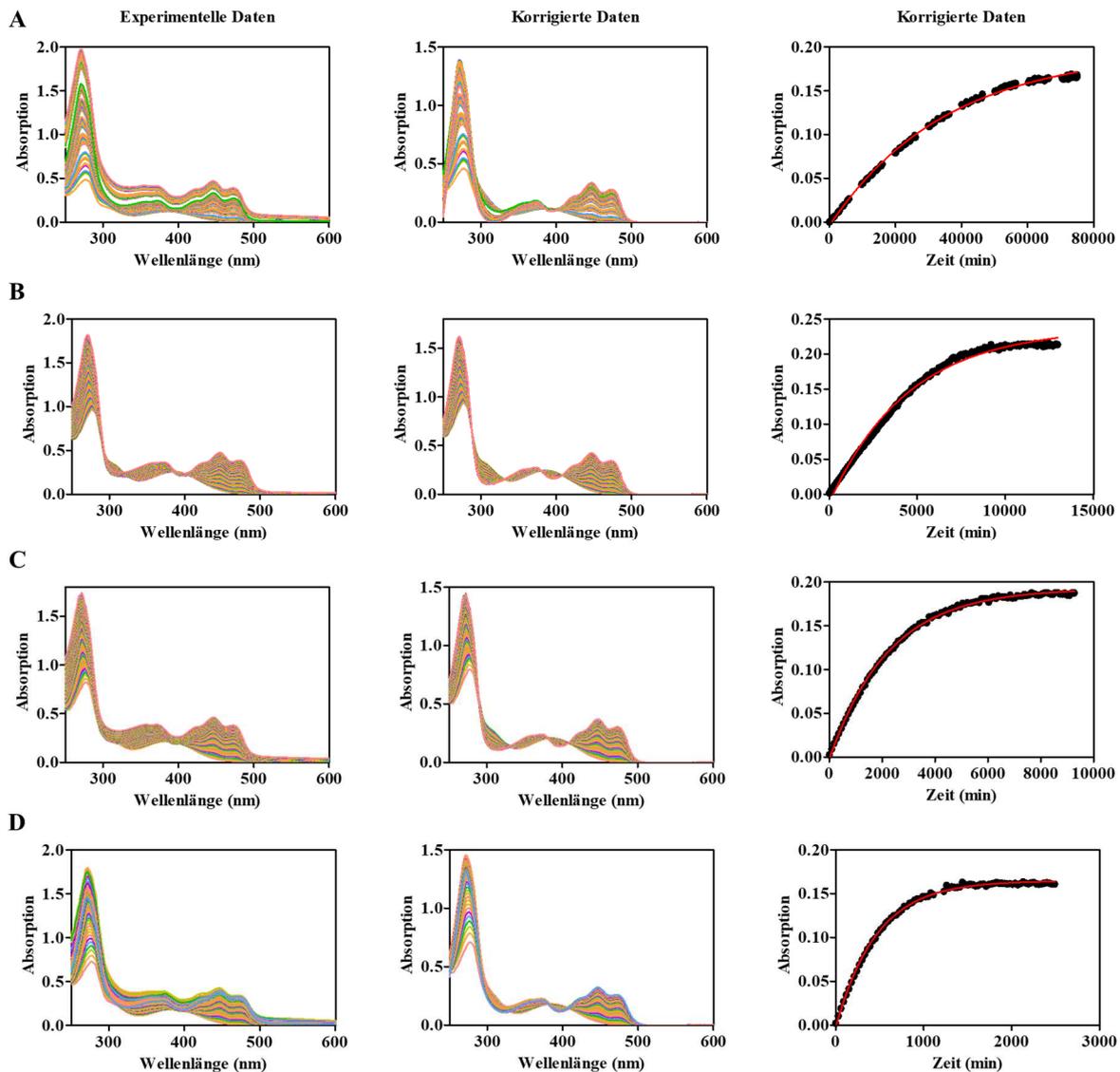


Abbildung 37: Dunkelrückkehrkinetik von *PpSB1-LOV* bei verschiedenen Temperaturen. Auf der linken Seite sind die Daten der unkorrigierten experimentellen Messungen von *PpSB1-LOV* nach Beleuchtung mit Blaulicht abgebildet. In der Mitte sind die streukorrigierten UV/Vis-Spektren und rechts die Dunkelrückkehrkinetik dargestellt. Die Absorption bei $\lambda = 485$ nm wurde aus den streukorrigierten Spektren extrahiert und gegen die Zeit aufgetragen. Aufgrund der langen Messzeiten wurden lediglich Einfachmessungen durchgeführt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) ermittelt. Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt: 15 °C (A), 25 °C (B), 30 °C (C) und 40 °C (D). In der Dunkelrückkehrkurve in Abbildung D (rechts) wurden drei Datenpunkte exkludiert.

Wie zu erwarten wurde die langsame Dunkelrückkehr mit $\tau_{\text{rec}} = 35.220$ min (Tabelle 22) bei einer Temperatur von 15 °C gemessen. Bei 25 °C und 30 °C wurden Werte von $\tau_{\text{rec}} = 4.486$ min und $\tau_{\text{rec}} = 2.244$ min erhalten. Die schnellste Dunkelrückkehr wurde bei 40 °C mit $\tau_{\text{rec}} = 463,5$ min (Tabelle 22) beobachtet. Bei allen Messungen konnte ein Basisliniendrift aufgrund der langen Messdauer bzw. der erhöhten Temperatur festgestellt werden. *PpSB1-*

LOV ist unter den angegebenen Messbedingungen somit weder über lange Messzeiten noch bei einer Temperatur von 40 °C über lange Zeit stabil.

Tabelle 22: Dunkelrückkehrkinetik von *PpSB1*-LOV bei unterschiedlichen Temperaturen.

	15 °C	25 °C	30 °C	40 °C
τ_{rec} (min)	35.220,0	4.486,0	2.244,0	463,5

Des Weiteren wurde das zeitabhängige Entfaltungsverhalten bei konstanter Temperatur mittels *nano differential scanning fluorimetry (nanoDSF)* Analyse untersucht (2.2.5.5). Die Messungen erfolgten hier bei 40 °C, um die minimale Zeit abschätzen zu können über die eine QENS-Probe bei 40°C stabil wäre.

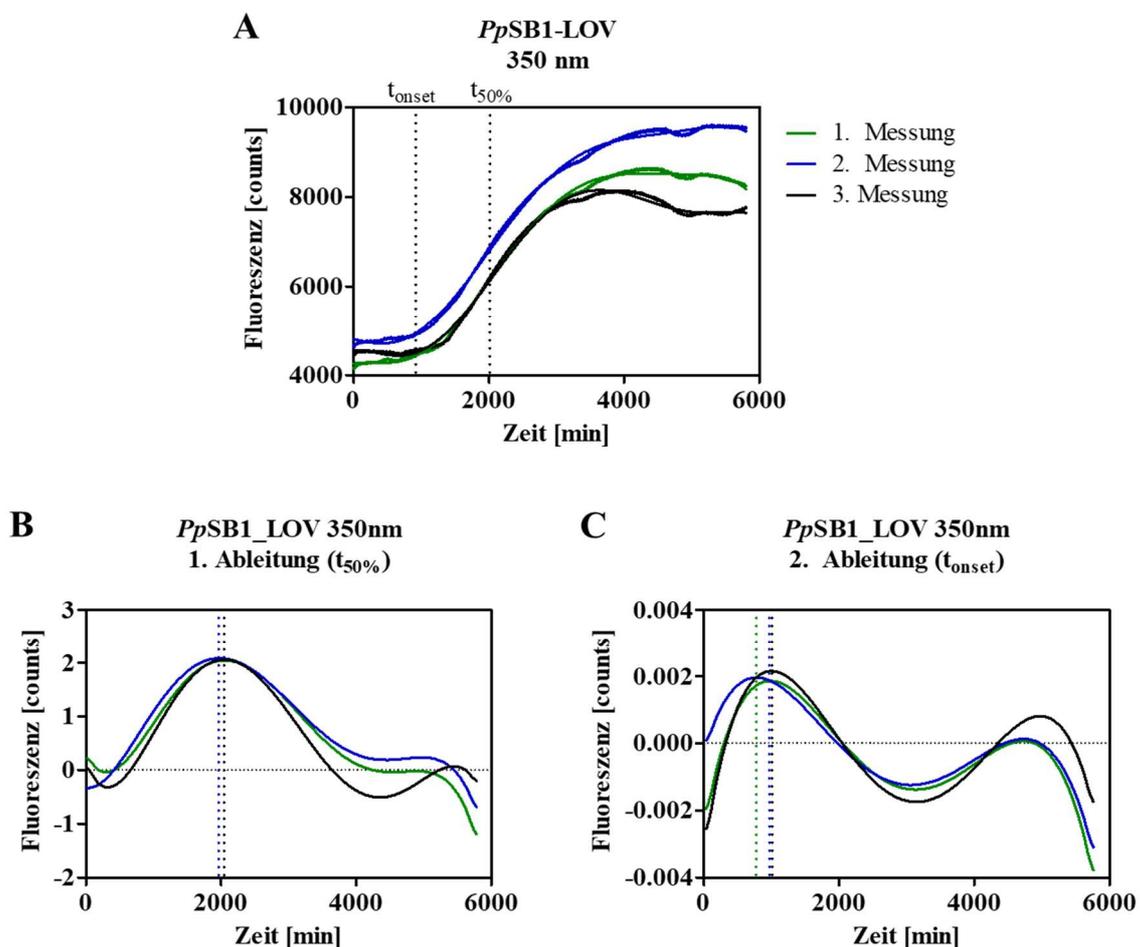


Abbildung 38: Zeitabhängige Entfaltung von *PpSB1*-LOV bei konstanter Temperatur von 40 °C. In Abbildung A sind drei *nanoDSF* Messungen dargestellt, wobei die Fluoreszenzemission bei 350 nm gegen die Zeit aufgetragen ist. Abbildung B zeigt die erste Ableitung der Messwerte aus der die Halbwertszeit $t_{50\%}$ erhalten werden kann und Abbildung C die zweite Ableitung, aus der der Beginn des Entfaltungsprozesses t_{onset} hervorgeht. Die gestrichelten Linien markieren in B und C die Triplikatwerte von $t_{50\%}$ und t_{onset} und in A den jeweiligen Mittelwert, welcher aus B und C erhalten wurde. Die Probe wurde auf eine Konzentration von 4 mg mL⁻¹ mit QENS-Puffer verdünnt. Die *nanoDSF* Messung erfolgte in Triplikaten in einem Zeitraum von 4 Tagen bei einer konstanten Temperatur von 40 °C (2.2.5.5).

Abbildung 38 illustriert das zeitabhängige Entfaltungsverhalten des wildtypischen *PpSB1-LOV* Proteins bei einer Konzentration von 4 mg mL^{-1} in QENS-Puffer und einer konstanten Temperatur von $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Aufgetragen ist hierbei die Fluoreszenzemission der aromatischen Aminosäuren bei 350 nm gegen die Zeit. Ausgehend davon wurde die erste und zweite Ableitung berechnet, um $t_{50\%}$ und t_{onset} zu erhalten (2.2.5.5). t_{onset} gibt mit $921,3 \text{ min}$ den Beginn des Entfaltungsprozesses und $t_{50\%}$ mit $2017,7 \text{ min}$ den Zeitpunkt $t_{50\%}$ an, an dem 50% der Probe entfaltet vorliegen (Tabelle 23). Aus diesen Daten ist ersichtlich, dass *PpSB1-LOV* bei den künftigen QENS-Messungen (3.4.4) bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ für ca. 920 min stabil bleibt. Bei niedrigeren Temperaturen ist mit deutlich höherer Stabilität zu rechnen.

Tabelle 23: Zeitabhängiges Entfaltungsverhalten von *PpSB1-LOV* bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ Dargestellt sind die jeweiligen Werte aus Dreifachmessungen von $t_{50\%}$ und T_{onset} sowie deren Mittelwert (MW in min), Standardabweichung (StabW in min) und der prozentuale Fehler (%).

	1. Messung (min)	2. Messung (min)	3. Messung (min)	MW (min)	StabW (min)	Fehler (%)
$t_{50\%}$	2043,6	1965,8	2043,6	2017,7	36,7	1,8
T_{onset}	973,2	778,5	1012,1	921,3	102,2	11,1

3.4.4. Untersuchung der dynamischen Erholung mittels QENS-Methode

QENS-Experimente können wichtige Informationen über die dynamischen Eigenschaften von Proteinen liefern, wobei es die Technik erlaubt die Bewegungen von Atomen und Molekülen in Proteinen zu untersuchen, indem die Streuung von Neutronen an den Atomen beobachtet wird. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die QENS-Experimente lange Messzeiten haben. Daher mussten die Untersuchungen der *PpSB1-LOV* Variante bei $15 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt werden, um so die Dunkelrückkehr zu verlangsamen und das Protein zu stabilisieren. Aus diesem Grund kann zwar kein direkter Vergleich zwischen diesen Messungen und den vorherigen NMR-Messungen (3.4.2) gezogen werden, allerdings konnte so eine dynamische Veränderung im Protein besser beobachtet und analysiert werden [274]. Die in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen QENS-Daten decken aufgrund des verwendeten IN16B-Neutronenspektrometers (Institut Laue-Langevin, Grenoble, France) den Zeitbereich von 100 ps bis ns und die Å -Längenskala ab. Da sich das Protein in Lösung befand, liefern die erhaltenen experimentellen QENS-Daten sowohl Informationen über die globale Diffusion des gesamten Biomakromoleküls als auch für dessen interne Proteindynamik.

Aus den experimentellen QENS-Daten (exemplarisch in Abbildung 39 A gezeigt) wurden eine Reihe von Kenngrößen extrahiert, die über die Diffusion und die Dynamik des Proteins Aufschluss geben, wobei hierzu die erhaltenen Daten mit mehreren Lorentzfunktionen gefittet wurden. Für die Diskussion im Rahmen dieser Arbeit ist insbesondere die interne Proteindynamik von Bedeutung, welche als mittleres Abweichungsquadrat (MSD, Engl. *mean square displacement*) aus den elastischen inkohärenten Strukturfaktoren (EISF) (Abbildung 39 B) erhalten werden kann.

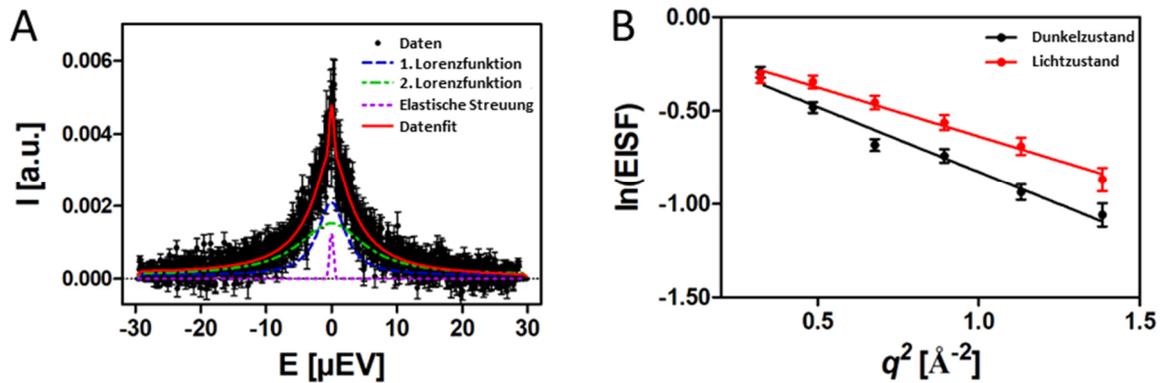


Abbildung 39: QENS-Experimente an *PpSB1-LOV*. (A) Experimentelles QENS-Spektrum von *PpSB1-LOV* im Dunkelzustand. Die beiden Lorentzfunktionen (gestrichelte blaue und grüne Linie) enthalten Informationen über die globale Proteindiffusion bzw. die Konvolution der globalen und internen Proteindynamik. In den Daten ist zudem ein Anteil elastischer Streuung (gestrichelte lilane Linie), die durch den Probenhalter verursacht wird, zu erkennen. Die Konvolution dieser Funktionen liefert den Datenfit (rote Linie). (B) Elastische inkohärente Strukturfaktoren (EISF) von *PpSB1-LOV* im Dunkel- und Lichtzustand bei $t = 1,5$ h nach Blaulicht Beleuchtung. Eine lineare Anpassung von $\ln(\text{EISF})$ gegen q^2 wurde verwendet, um die anfängliche Steigung zu erhalten und das mittlere Abweichungsquadrat (MSD) als Funktion der Zeit im Rahmen einer Gaußschen Näherung zu ermitteln (übernommen und ins Deutsche übersetzt [274]).

Die Kinetik der Rückkehr der Dynamik von *PpSB1-LOV* vom Licht- in den Dunkelzustand wurde durch Plotten des MSD über die Zeit verfolgt (Abbildung 40 A). Für den Dunkelzustand von *PpSB1-LOV* wurde ein MSD von $\text{MSD}_{\text{Dunkel}} = 3,69 \pm 0,10 \text{ \AA}^2$ gemessen, welches innerhalb der Fehlergrenzen gut mit zuvor gemessenen QENS-Daten übereinstimmt [171]. Die Beleuchtung mit Blaulicht führt zu einer verringerten Proteindynamik mit einem $\text{MSD}_{\text{Licht}} = 1,85 \pm 0,28 \text{ \AA}^2$. Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit zuvor berichteten QENS-Experimenten [171]. Größenordnungsmäßig konnte eine ähnliche Verringerung der Proteindynamik für die Bindung von Biotin an Streptavidin beobachtet werden [287]. In einer weiteren Studie konnte zudem für den *Orange Carotenoid Protein* (OCP) Photorezeptor eine leicht erhöhte Flexibilität des Licht- im Vergleich zum Dunkelzustand festgestellt werden [288]. ^{15}N Nuclear Spin Relaxation NMR-Untersuchungen des *PpSB1-LOV* Proteins im Licht- und Dunkelzustand haben zudem gezeigt, dass die

Beleuchtung mit blauem Licht zu einer Verringerung der Bewegungen auf der Pikosekunden- bis Nanosekunden Zeitskala im Proteinrückgrat führt, d.h. diese Experimente belegen die hier mittels QENS gemachten Beobachtungen.

Zur Verfolgung der dynamischen Rückkehr des MSD in den Dunkelzustand wurden die MSD-Daten über die Zeit aufgetragen (Abbildung 40 A) und aus dem Fit der Daten die Dunkelrückkehrzeit $\tau = 12,3 \pm 2,3$ h bestimmt.

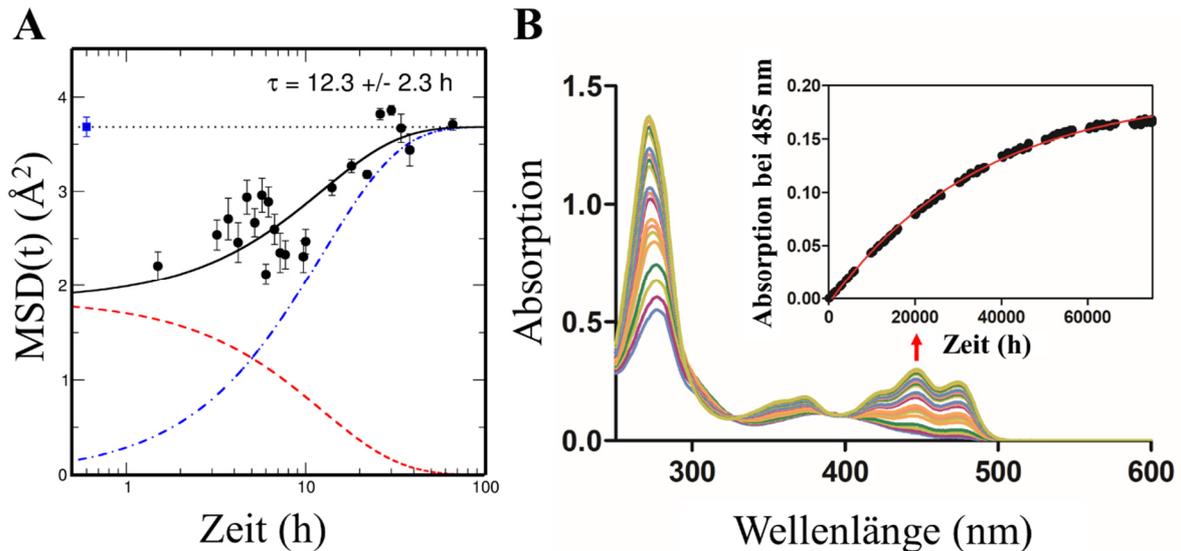


Abbildung 40: Dunkelrückkehr der *PpSB1*-LOV-Proteindynamik, überwacht durch QENS, und Adduktbruch, überwacht durch UV/Vis-Spektrophotometrie. (A) MSD gegen die Zeit von *PpSB1*-LOV für bis zu 70 h nach Blaulicht-Beleuchtung (schwarze Symbole). Der blaue Messpunkt (blaues Quadrat) zeigt die MSD des *PpSB1*-LOV-Dunkelzustandes unter stationären Bedingungen. Die durchgezogene schwarze Linie zeigt den Fit der experimentellen Daten unter Verwendung eines kinetischen Modells für einen Übergang erster Ordnung. Die erhaltene Dunkelrückkehrzeit beträgt $\tau = 12,3 \pm 2,3$ h. Die rot gestrichelten und blau gestricheltgepunkteten Linien illustrieren die zeitliche Entwicklung der Komponenten des Licht- und Dunkelzustandes. (B) Sequentielle Absorptionsspektren (roter Pfeil zur Kennzeichnung der spektralen Entwicklung) einer *PpSB1*-LOV-Probe, aufgenommen während der Dunkelrückkehr des Proteins. Einschub: Aus (B) extrahierte kinetische Zeitspur, die die Rückkehr des Absorptionsmaximums des Dunkelzustandes zeigt. Durch Anpassung einer einfachen exponentiellen Abklingfunktion (rote Linie) an die experimentellen Daten (schwarze Kreise) kann τ_{rec} bestimmt werden. Messbedingungen: T = 289 K (15,85 °C), 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, 10 mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol, pH 8,0, 99,9 Atom-% D_2O (übernommen und ins Deutsche übersetzt [274]).

Zum Vergleich wurde die Dunkelrückkehr derselben *PpSB1*-LOV Probe mittels UV/Vis-Spektrophotometrie unter den exakt gleichen Bedingungen wie in den QENS-Experimenten (Proben-, Puffer- und Messbedingungen) durchgeführt. Da in früheren Experimenten herausgefunden wurde, dass niedrige Temperaturen und der Zusatz von D_2O zu einer langsameren Dunkelrückkehr führen [141, 163], wurde dies in den aktuellen Messungen berücksichtigt. Die Dunkelrückkehr der *PpSB1*-LOV Probe wurde mittels sequentieller UV/Vis-Spektren über einen Zeitraum von 52 Tagen bei 15 °C gemessen (3.4.3 bzw.

Abbildung 40 B) und betrug $\tau_{\text{rec}} = 35.220 \text{ min}$ (ca. 24,5 Tage). Diese Daten zeigen, dass in den 66 h der QENS-Messzeit lediglich 11 % der Probe in den Dunkelzustand übergehen. Es ist daher zu vermuten, dass die beobachteten dynamischen Änderungen unabhängig vom Adduktbruch sein sollten, da eine Rückkehr von nur 11% der Moleküle nicht zu den beobachteten MSD Änderungen führen können. Diese Beobachtung, insbesondere die kürzere Lebenszeit der mittels QENS beobachteten Änderung, deutet auf das Vorhandensein eines dynamischen Zwischenzustands im Dunkelrückkehr-Halbzyklus des *PpSB1-LOV* Photozyklus hin.

Betrachtet man die oben erwähnten Spin-Relaxation-NMR-Messungen im Detail [287] ist zu erkennen, dass die stärkste Änderung des Ordnungsparameters (δS^2) als Maß für eine Zunahme an Rigidität für die Reste Y32 (B β), L83–N85 (G β), N95–L97 (H β), F112, G114, Q116, D118 (I β) und S120 (J α) zu beobachten ist. Da die meisten dieser Reste entweder direkt mit dem FMN-Chromophor interagieren (N85, N95, L97, F112, Q116) oder sich in unmittelbar angrenzenden Bereichen befinden, liegt also die Schlussfolgerung nahe, dass die verringerte Proteindynamik des Proteins im Lichtzustand auf eine lokal verringerte Seitenkettendynamik für Reste in der FMN-Bindetasche zurückzuführen ist. Die Dunkelrückkehrzeit der dynamischen Änderung von $\tau = 12,3 \pm 2,3 \text{ h}$ (bei 15°C) lässt zudem die Vermutung zu, dass die dynamischen Änderungen maßgeblich vor oder zumindest unmittelbar mit dem Bruch der kovalenten FMN-Protein-Bindung stattfinden.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Kombination von UV/Vis-spektroskopischen, NMR- und QENS-Experimenten auf zwei bisher nicht entdeckte Intermediate innerhalb der Dunkelrückkehr von *PpSB1-LOV* schließen lässt (Abbildung 41). Der erste Zwischenzustand (Abbildung 41; LOV_{Dyn}) entsteht unmittelbar nach Ende der Beleuchtung (Abbildung 41, LOV_{390}) vor dem oder in Folge des Adduktbruchs und resultiert in einer Veränderung der lokalisierten Dynamik in der Nähe des Flavin-Chromophors. Seine dynamischen Eigenschaften (LOV_{Dyn}) sind identisch mit denen des Dunkelzustands. In diesem Zustand ist von keiner globalen Änderung der Quartärstruktur (LOV-LOV Dimer Rotation) auszugehen. Aus diesem dynamischen Intermediat erfolgt der Bruch der FMN-Protein-Bindung, welche in einem Intermediat $\text{LOV}_{447, \text{lokal}}$ kulminiert, in dem lokale Strukturänderungen auf dem Weg zum Dunkelzustand, wie der FMN-Protein Bindungsbruch, bereits abgeschlossen sind. Zur vollständigen Rückkehr des Proteins in den spektroskopischen und strukturellen Dunkelzustand erfolgt zuletzt eine Umordnung des LOV-LOV Dimer Interfaces.

Abschließend zeigen diese Arbeiten eine bis jetzt unbekannte globale dynamische, strukturelle und kinetische Komplexität der Dunkelrückkehrkinetik des *PpSB1*-LOV Photorezeptors. Diese Ergebnisse sind vorallem für das Verständnis [158] und *Tuning* von natürlichen bzw. künstlich erstellten optogenetischen Werkzeugen [226] von enormer Bedeutung.

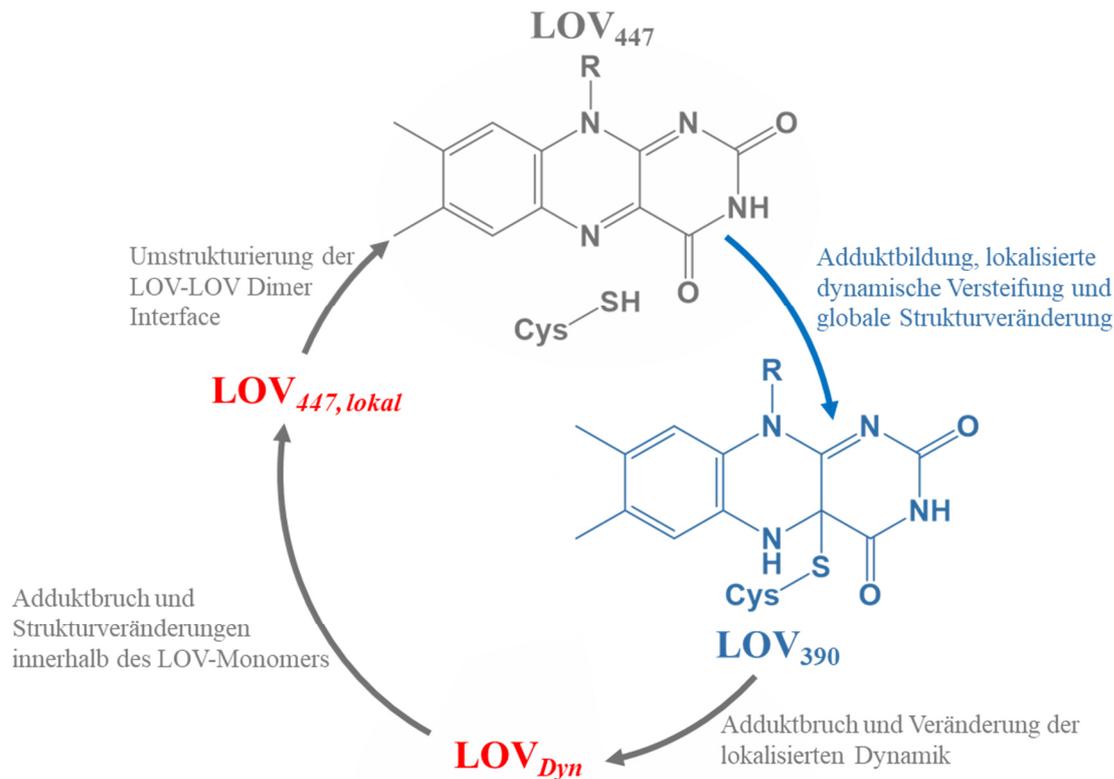


Abbildung 41: Photozyklus von *PpSB1*-LOV mit den neu identifizierten Intermediaten. Die Beleuchtung des Photorezeptors im Dunkelzustand (LOV₄₄₇, dunkelgrau hervorgehoben) führt zur Bildung des Protein-Flavin-Addukts (LOV₃₉₀, blau hervorgehoben), das von einer dynamischen Versteifung und globalen strukturellen Veränderungen begleitet wird, wie zuvor durch QENS, NMR und Röntgenkristallographie gezeigt [135, 171]. Nach Beendigung der Beleuchtung führt der Adduktbruch in Verbindung mit einer Änderung der Dynamik der lokalen Seitenketten zur Bildung eines UV/Vis- und NMR-spektroskopisch stillen dynamischen Zwischenzustands (LOV_{Dyn}). Nach vollständigem Adduktbruch bildet sich ein weiteres UV/Vis-spektroskopisch nicht nachweisbares Intermediat (LOV_{447,lokal}; rot hervorgehoben), das möglicherweise mit der Umkehrung lokaler struktureller Veränderungen im LOV-Monomer zusammenhängt, worauf die vollständige Umstrukturierung globaler struktureller Veränderungen folgt, die wahrscheinlich die Umstrukturierung des LOV-LOV Dimer Interfaces einschließt, was zu einer vollständigen strukturellen Erholung führt (LOV₄₄₇, dunkelgrau hervorgehoben) (übernommen und ins Deutsche übersetzt [274]).

3.5. Zusammenfassende Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte wie die Lebensdauer des Adduktzustandes (3.1), die photochemischen Mechanismen der Adduktbildung (3.2), die spektralen Eigenschaften von Protein-gebundenen Flavinen (3.3) und die strukturellen Mechanismen der Photoaktivierung (3.4) am Beispiel unterschiedlicher LOV-Proteine untersucht. Dies wirft wichtige Fragen bzgl. der Übertragbarkeit der entsprechenden Effekte auf, z.B. lassen sich die Mutationen, die in *AsLOV2* als maßgeblich für die Beschleunigung des Adduktzerfalls, auf *PpSB1-LOV*, welches eine sehr langsame Dunkelrückkehr besitzt übertragen. In gleicher Weise stellt sich die Frage, ob Mutationen, die zu Veränderungen der spektralen Eigenschaften von iLOV führen, genutzt werden könnten um LOV-Photorezeptoren (z.B. *AsLOV2*) mit geänderten Absorptionseigenschaften zu erzeugen, sodass z.B. eine Photoaktivierung bei anderen Wellenlängen als bei 450 nm möglich wird.

4. Literaturverzeichnis

1. de Wit, M., V.C. Galvao, and C. Fankhauser, *Light-Mediated Hormonal Regulation of Plant Growth and Development*. *Annu Rev Plant Biol*, 2016. **67**: p. 513-37.
2. Franklin, K.A., V.S. Lerner, and G.C. Whitelam, *The signal transducing photoreceptors of plants*. *Int J Dev Biol*, 2005. **49**(5-6): p. 653-64.
3. Kami, C., et al., *Light-regulated plant growth and development*. *Curr Top Dev Biol*, 2010. **91**: p. 29-66.
4. Cheng, Z., H. Yamamoto, and C.E. Bauer, *Cobalamin's (Vitamin B12) Surprising Function as a Photoreceptor*. *Trends Biochem Sci*, 2016. **41**(8): p. 647-650.
5. Conrad, K.S., C.C. Manahan, and B.R. Crane, *Photochemistry of flavoprotein light sensors*. *Nat Chem Biol*, 2014. **10**(10): p. 801-9.
6. Crosson, S., S. Rajagopal, and K. Moffat, *The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains*. *Biochemistry*, 2003. **42**(1): p. 2-10.
7. Fushimi, K. and R. Narikawa, *Cyanobacteriochromes: photoreceptors covering the entire UV-to-visible spectrum*. *Curr Opin Struct Biol*, 2019. **57**: p. 39-46.
8. Kirilovsky, D. and C.A. Kerfeld, *The Orange Carotenoid Protein: a blue-green light photoactive protein*. *Photochem Photobiol Sci*, 2013. **12**(7): p. 1135-43.
9. Moglich, A. and K. Moffat, *Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools*. *Photochem Photobiol Sci*, 2010. **9**(10): p. 1286-300.
10. Rizzini, L., et al., *Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein*. *Science*, 2011. **332**(6025): p. 103-6.
11. Schreiber, M., et al., *Quantum mechanical studies on the crystallographic model of bathorhodopsin*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(26): p. 4274-7.
12. van der Horst, M.A. and K.J. Hellingwerf, *Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families*. *Acc Chem Res*, 2004. **37**(1): p. 13-20.
13. Kottke, T., et al., *Photoreceptors Take Charge: Emerging Principles for Light Sensing*. *Annu Rev Biophys*, 2018. **47**: p. 291-313.
14. Kandori, H., *Retinal Proteins: Photochemistry and Optogenetics*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2020. **93**(1): p. 76-85.
15. Rozenberg, A., et al., *Microbial Rhodopsins: The Last Two Decades*. *Annu Rev Microbiol*, 2021. **75**: p. 427-447.
16. Govorunova, E.G., et al., *Microbial Rhodopsins: Diversity, Mechanisms, and Optogenetic Applications*. *Annu Rev Biochem*, 2017. **86**: p. 845-872.
17. Deisseroth, K. and P. Hegemann, *The form and function of channelrhodopsin*. *Science*, 2017. **357**(6356).
18. Kateriya, S., et al., *"Vision" in single-celled algae*. *News Physiol Sci*, 2004. **19**: p. 133-7.
19. Mukherjee, S., P. Hegemann, and M. Broser, *Enzymerhodopsins: novel photoregulated catalysts for optogenetics*. *Curr Opin Struct Biol*, 2019. **57**: p. 118-126.
20. Foster, K.W. and R.D. Smyth, *Light Antennas in phototactic algae*. *Microbiol Rev*, 1980. **44**(4): p. 572-630.
21. Ueki, N., et al., *Eyespot-dependent determination of the phototactic sign in Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(19): p. 5299-304.
22. Jost, M., et al., *Structural basis for gene regulation by a B12-dependent photoreceptor*. *Nature*, 2015. **526**(7574): p. 536-41.
23. Kainrath, S., et al., *Green-Light-Induced Inactivation of Receptor Signaling Using Cobalamin-Binding Domains*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017. **56**(16): p. 4608-4611.

24. Ortiz-Guerrero, J.M., et al., *Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(18): p. 7565-70.
25. Padmanabhan, S., et al., *A New Facet of Vitamin B(12): Gene Regulation by Cobalamin-Based Photoreceptors*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 485-514.
26. Kerfeld, C.A., et al., *The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein*. Structure, 2003. **11**(1): p. 55-65.
27. Wilson, A., et al., *Structural determinants underlying photoprotection in the photoactive orange carotenoid protein of cyanobacteria*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18364-75.
28. Konold, P.E., et al., *Photoactivation Mechanism, Timing of Protein Secondary Structure Dynamics and Carotenoid Translocation in the Orange Carotenoid Protein*. J Am Chem Soc, 2019. **141**(1): p. 520-530.
29. Wilson, A., et al., *A photoactive carotenoid protein acting as light intensity sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p. 12075-80.
30. Sedoud, A., et al., *The Cyanobacterial Photoactive Orange Carotenoid Protein Is an Excellent Singlet Oxygen Quencher*. Plant Cell, 2014. **26**(4): p. 1781-1791.
31. Taylor, B.L. and I.B. Zhulin, *PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(2): p. 479-506.
32. Genick, U.K., et al., *Structure of a protein photocycle intermediate by millisecond time-resolved crystallography*. Science, 1997. **275**(5305): p. 1471-1475.
33. Rockwell, N.C. and J.C. Lagarias, *A brief history of phytochromes*. Chemphyschem, 2010. **11**(6): p. 1172-80.
34. Rockwell, N.C. and J.C. Lagarias, *Phytochrome evolution in 3D: deletion, duplication, and diversification*. New Phytologist, 2020. **225**(6): p. 2283-2300.
35. Nambu, J.R., et al., *The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1157-67.
36. Tan, P., et al., *Optophysiology: Illuminating cell physiology with optogenetics*. Physiol Rev, 2022. **102**(3): p. 1263-1325.
37. Takala, H., et al., *Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors*. Nature, 2014. **509**(7499): p. 245-248.
38. Ulijasz, A.T., et al., *Structural basis for the photoconversion of a phytochrome to the activated Pfr form*. Nature, 2010. **463**(7278): p. 250-4.
39. Wagner, J.R., et al., *A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome*. Nature, 2005. **438**(7066): p. 325-31.
40. Carvalho, R.F., M.L. Campos, and R.A. Azevedo, *The role of phytochrome in stress tolerance*. J Integr Plant Biol, 2011. **53**(12): p. 920-9.
41. Blain-Hartung, M., et al., *Cyanobacteriochrome-based photoswitchable adenylyl cyclases (cPACs) for broad spectrum light regulation of cAMP levels in cells*. J Biol Chem, 2018. **293**(22): p. 8473-8483.
42. Enomoto, G., et al., *Three cyanobacteriochromes work together to form a light color-sensitive input system for c-di-GMP signaling of cell aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(26): p. 8082-7.
43. Enomoto, G., et al., *Cyanobacteriochrome SesA is a diguanylate cyclase that induces cell aggregation in Thermosynechococcus*. J Biol Chem, 2014. **289**(36): p. 24801-9.
44. Ikeuchi, M. and T. Ishizuka, *Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria*. Photochem Photobiol Sci, 2008. **7**(10): p. 1159-67.
45. Wiltbank, L.B. and D.M. Kehoe, *Diverse light responses of cyanobacteria mediated by phytochrome superfamily photoreceptors*. Nat Rev Microbiol, 2019. **17**(1): p. 37-50.

46. Christie, J.M., et al., *Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges*. Science, 2012. **335**(6075): p. 1492-6.
47. Wu, D., et al., *Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8*. Nature, 2012. **484**(7393): p. 214-9.
48. Heijde, M. and R. Ulm, *Reversion of the Arabidopsis UV-B photoreceptor UVR8 to the homodimeric ground state*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(3): p. 1113-8.
49. Moriconi, V., et al., *Perception of Sunflecks by the UV-B Photoreceptor UV RESISTANCE LOCUS8*. Plant Physiol, 2018. **177**(1): p. 75-81.
50. Partch, C.L., et al., *Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor*. Biochemistry, 2005. **44**(10): p. 3795-805.
51. Uversky, V.N., *Intrinsically Disordered Proteins and Their "Mysterious" (Meta)Physics*. Frontiers in Physics, 2019. **7**.
52. Ahmad, M. and A.R. Cashmore, *HY4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor*. Nature, 1993. **366**(6451): p. 162-6.
53. Briggs, W.R. and E. Huala, *Blue-light photoreceptors in higher plants*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 33-62.
54. Mao, J., et al., *From The Cover: A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12270-5.
55. Sancar, A., *Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors*. Chem Rev, 2003. **103**(6): p. 2203-37.
56. Barends, T.R., et al., *Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1015-8.
57. Iseki, M., et al., *A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in Euglena gracilis*. Nature, 2002. **415**(6875): p. 1047-51.
58. Park, S.Y. and J.R.H. Tame, *Seeing the light with BLUF proteins*. Biophys Rev, 2017. **9**(2): p. 169-176.
59. Fujisawa, T. and S. Masuda, *Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins*. Biophys Rev, 2018. **10**(2): p. 327-337.
60. Moglich, A., et al., *Structure and function of plant photoreceptors*. Annu Rev Plant Biol, 2010. **61**: p. 21-47.
61. Hontani, Y., et al., *Spectroscopic and Computational Observation of Glutamine Tautomerization in the Blue Light Sensing Using Flavin Domain Photoreaction*. J Am Chem Soc, 2023. **145**(2): p. 1040-1052.
62. Shcherbakova, D.M., et al., *Natural photoreceptors as a source of fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 519-50.
63. Zoltowski, B.D. and K.H. Gardner, *Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein-protein interactions*. Biochemistry, 2011. **50**(1): p. 4-16.
64. Huala, E., et al., *Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain*. Science, 1997. **278**(5346): p. 2120-3.
65. Nash, A.I., et al., *Structural basis of photosensitivity in a bacterial light-oxygen-voltage/helix-turn-helix (LOV-HTH) DNA-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9449-54.
66. Purcell, E.B., et al., *A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(46): p. 18241-6.
67. Swartz, T.E., et al., *Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria*. Science, 2007. **317**(5841): p. 1090-3.

68. Takahashi, F., et al., *AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19625-30.
69. Kagawa, T., et al., *Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response*. Science, 2001. **291**(5511): p. 2138-41.
70. Kinoshita, T., et al., *Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening*. Nature, 2001. **414**(6864): p. 656-60.
71. Kroth, P.G., C. Wilhelm, and T. Kottke, *An update on aureochromes: Phylogeny - mechanism - function*. J Plant Physiol, 2017. **217**: p. 20-26.
72. Losi, A., et al., *First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes*. Biophys J, 2002. **82**(5): p. 2627-34.
73. Sakai, T., et al., *Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6969-74.
74. Krauss, U., et al., *Distribution and phylogeny of light-oxygen-voltage-blue-light-signaling proteins in the three kingdoms of life*. J Bacteriol, 2009. **191**(23): p. 7234-42.
75. Herrou, J. and S. Crosson, *Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(10): p. 713-23.
76. Yu, Z. and R. Fischer, *Light sensing and responses in fungi*. Nat Rev Microbiol, 2019. **17**(1): p. 25-36.
77. Losi, A., *Flavin-based Blue-Light photosensors: a photobiophysics update*. Photochem Photobiol, 2007. **83**(6): p. 1283-300.
78. Losi, A. and W. Gartner, *Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors*. Photochem Photobiol Sci, 2008. **7**(10): p. 1168-78.
79. Endres, S., et al., *Structure and function of a short LOV protein from the marine phototrophic bacterium Dinoroseobacter shibae*. BMC Microbiol, 2015. **15**: p. 30.
80. Matsuoka, D. and S. Tokutomi, *Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13337-42.
81. Christie, J.M., et al., *Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism*. Science, 1998. **282**(5394): p. 1698-701.
82. Inoue, S., et al., *Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5626-31.
83. Sullivan, S., et al., *In vivo phosphorylation site mapping and functional characterization of Arabidopsis phototropin 1*. Mol Plant, 2008. **1**(1): p. 178-94.
84. Inoue, S., et al., *Functional analyses of the activation loop of phototropin2 in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2011. **156**(1): p. 117-28.
85. Christie, J.M., et al., *LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8779-83.
86. Cho, H.Y., et al., *Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2007. **143**(1): p. 517-29.
87. Christie, J.M., et al., *Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function*. Plant J, 2002. **32**(2): p. 205-19.
88. Kaiserli, E., et al., *Domain swapping to assess the mechanistic basis of Arabidopsis phototropin 1 receptor kinase activation and endocytosis by blue light*. Plant Cell, 2009. **21**(10): p. 3226-44.
89. Nakasako, M., et al., *Light-induced structural changes of LOV domain-containing polypeptides from Arabidopsis phototropin 1 and 2 studied by small-angle X-ray scattering*. Biochemistry, 2004. **43**(47): p. 14881-90.

90. Okajima, K., et al., *Light-induced conformational changes of LOV1 (light oxygen voltage-sensing domain 1) and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in Chlamydomonas phototropin*. J Biol Chem, 2014. **289**(1): p. 413-22.
91. Sullivan, S., et al., *Interaction specificity of Arabidopsis 14-3-3 proteins with phototropin receptor kinases*. FEBS Lett, 2009. **583**(13): p. 2187-93.
92. Inoue, S., et al., *Leaf positioning of Arabidopsis in response to blue light*. Mol Plant, 2008. **1**(1): p. 15-26.
93. Kinoshita, T. and K. Shimazaki, *Blue light activates the plasma membrane H(+)-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells*. EMBO J, 1999. **18**(20): p. 5548-58.
94. Christie, J.M., et al., *Plant flavoprotein photoreceptors*. Plant Cell Physiol, 2015. **56**(3): p. 401-13.
95. Froehlich, A.C., et al., *White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter*. Science, 2002. **297**(5582): p. 815-9.
96. He, Q., et al., *White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor*. Science, 2002. **297**(5582): p. 840-3.
97. Dunlap, J.C. and J.J. Loros, *How fungi keep time: circadian system in Neurospora and other fungi*. Curr Opin Microbiol, 2006. **9**(6): p. 579-87.
98. Ballario, P., et al., *White collar-1, a central regulator of blue light responses in Neurospora, is a zinc finger protein*. EMBO J, 1996. **15**(7): p. 1650-7.
99. Lee, K., J.J. Loros, and J.C. Dunlap, *Interconnected feedback loops in the Neurospora circadian system*. Science, 2000. **289**(5476): p. 107-10.
100. Talora, C., et al., *Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction*. EMBO J, 1999. **18**(18): p. 4961-8.
101. Wang, B., et al., *Neurospora WC-1 recruits SWI/SNF to remodel frequency and initiate a circadian cycle*. PLoS Genet, 2014. **10**(9): p. e1004599.
102. Collett, M.A., et al., *Light and clock expression of the Neurospora clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2*. Genetics, 2002. **160**(1): p. 149-58.
103. Linden, H. and G. Macino, *White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in Neurospora crassa*. EMBO J, 1997. **16**(1): p. 98-109.
104. Chen, C.H., et al., *Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in Neurospora*. EMBO J, 2009. **28**(8): p. 1029-42.
105. Dunlap, J.C. and J.J. Loros, *The neurospora circadian system*. J Biol Rhythms, 2004. **19**(5): p. 414-24.
106. He, Q. and Y. Liu, *Molecular mechanism of light responses in Neurospora: from light-induced transcription to photoadaptation*. Genes Dev, 2005. **19**(23): p. 2888-99.
107. Heintzen, C. and Y. Liu, *The Neurospora crassa circadian clock*. Adv Genet, 2007. **58**: p. 25-66.
108. Liu, Y., Q. He, and P. Cheng, *Photoreception in Neurospora: a tale of two White Collar proteins*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(10): p. 2131-8.
109. Cheng, P., et al., *Functional conservation of light, oxygen, or voltage domains in light sensing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5938-43.
110. Heintzen, C., J.J. Loros, and J.C. Dunlap, *The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting*. Cell, 2001. **104**(3): p. 453-64.
111. Chen, C.H., et al., *Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in Neurospora*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(38): p. 16715-20.

112. Jentsch, K., et al., *Mutual exchange of kinetic properties by extended mutagenesis in two short LOV domain proteins from Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 2009. **48**(43): p. 10321-33.
113. Krauss, U., et al., *Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from Pseudomonas putida: a paradigm for an extended LOV construct*. *Phys Chem Chem Phys*, 2005. **7**(14): p. 2804-11.
114. Losi, A., *The bacterial counterparts of plant phototropins*. *Photochem Photobiol Sci*, 2004. **3**(6): p. 566-74.
115. Sumi, S., et al., *Light Response of Pseudomonas putida KT2440 Mediated by Class II LitR, a Photosensor Homolog*. *J Bacteriol*, 2020. **202**(20).
116. Conrad, K.S., A.M. Bilwes, and B.R. Crane, *Light-induced subunit dissociation by a light-oxygen-voltage domain photoreceptor from Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, 2013. **52**(2): p. 378-91.
117. Moglich, A. and K. Moffat, *Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA*. *J Mol Biol*, 2007. **373**(1): p. 112-26.
118. Akbar, S., et al., *New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma(B) of Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(4): p. 1329-38.
119. Aravind, L. and E.V. Koonin, *The STAS domain - a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists*. *Curr Biol*, 2000. **10**(2): p. R53-5.
120. Avila-Perez, M., K.J. Hellingwerf, and R. Kort, *Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of Bacillus subtilis via YtvA*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(17): p. 6411-4.
121. Gaidenko, T.A., et al., *The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(17): p. 6387-95.
122. Gourley, C.R., et al., *Decreased in vivo virulence and altered gene expression by a Brucella melitensis light-sensing histidine kinase mutant*. *Pathog Dis*, 2015. **73**(2): p. 1-8.
123. Toyooka, T., et al., *Photoreactions of aureochrome-I*. *Biophys J*, 2011. **100**(11): p. 2801-9.
124. Hisatomi, O., et al., *Blue light-induced conformational changes in a light-regulated transcription factor, aureochrome-I*. *Plant Cell Physiol*, 2013. **54**(1): p. 93-106.
125. Halavaty, A.S. and K. Moffat, *N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from Avena sativa*. *Biochemistry*, 2007. **46**(49): p. 14001-9.
126. Harper, S.M., L.C. Neil, and K.H. Gardner, *Structural basis of a phototropin light switch*. *Science*, 2003. **301**(5639): p. 1541-4.
127. Harper, S.M., J.M. Christie, and K.H. Gardner, *Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity*. *Biochemistry*, 2004. **43**(51): p. 16184-92.
128. Swartz, T.E., et al., *Vibration spectroscopy reveals light-induced chromophore and protein structural changes in the LOV2 domain of the plant blue-light receptor phototropin I*. *Biochemistry*, 2002. **41**(23): p. 7183-9.
129. Hemmer, S., *Photozyklus und Signaltransduktion in light, oxygen, voltage (LOV) Photorezeptoren*, Masterthesis. 2019.
130. Bauer, C., et al., *Indication for a radical intermediate preceding the signaling state in the LOV domain photocycle*. *Photochem Photobiol*, 2011. **87**(3): p. 548-53.
131. Bonetti, C., et al., *The role of key amino acids in the photoactivation pathway of the Synechocystis Slr1694 BLUF domain*. *Biochemistry*, 2009. **48**(48): p. 11458-69.
132. Kennis, J.T., et al., *Primary reactions of the LOV2 domain of phototropin, a plant blue-light photoreceptor*. *Biochemistry*, 2003. **42**(12): p. 3385-92.

133. Lokhandwala, J., et al., *A Native Threonine Coordinates Ordered Water to Tune Light-Oxygen-Voltage (LOV) Domain Photocycle Kinetics and Osmotic Stress Signaling in Trichoderma reesei ENVOY*. J Biol Chem, 2016. **291**(28): p. 14839-50.
134. Circolone, F., et al., *Structural basis for the slow dark recovery of a full-length LOV protein from Pseudomonas putida*. J Mol Biol, 2012. **417**(4): p. 362-74.
135. Rollen, K., et al., *Signaling States of a Short Blue-Light Photoreceptor Protein PpSBI-LOV Revealed from Crystal Structures and Solution NMR Spectroscopy*. J Mol Biol, 2016. **428**(19): p. 3721-36.
136. Swartz, T.E., et al., *The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin*. J Biol Chem, 2001. **276**(39): p. 36493-500.
137. Alexandre, M.T., et al., *A base-catalyzed mechanism for dark state recovery in the Avena sativa phototropin-1 LOV2 domain*. Biochemistry, 2007. **46**(11): p. 3129-37.
138. Losi, A. and W. Gartner, *Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors*. Photochem Photobiol, 2011. **87**(3): p. 491-510.
139. Losi, A. and W. Gartner, *The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors*. Annu Rev Plant Biol, 2012. **63**: p. 49-72.
140. Zayner, J.P., C. Antoniou, and T.R. Sosnick, *The amino-terminal helix modulates light-activated conformational changes in AsLOV2*. J Mol Biol, 2012. **419**(1-2): p. 61-74.
141. Zoltowski, B.D., B. Vaccaro, and B.R. Crane, *Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(11): p. 827-34.
142. Kottke, T., et al., *Phot-LOV1: photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Biophys J, 2003. **84**(2 Pt 1): p. 1192-201.
143. Raffelberg, S., et al., *Modulation of the photocycle of a LOV domain photoreceptor by the hydrogen-bonding network*. J Am Chem Soc, 2011. **133**(14): p. 5346-56.
144. Zoltowski, B.D., A.I. Nash, and K.H. Gardner, *Variations in protein-flavin hydrogen bonding in a light, oxygen, voltage domain produce non-Arrhenius kinetics of adduct decay*. Biochemistry, 2011. **50**(41): p. 8771-9.
145. Alexandre, M.T., et al., *Primary reactions of the LOV2 domain of phototropin studied with ultrafast mid-infrared spectroscopy and quantum chemistry*. Biophys J, 2009. **97**(1): p. 227-37.
146. Alexandre, M.T., et al., *Conformational heterogeneity and propagation of structural changes in the LOV2/Jalpha domain from Avena sativa phototropin 1 as recorded by temperature-dependent FTIR spectroscopy*. Biophys J, 2009. **97**(1): p. 238-47.
147. Nozaki, D., et al., *Role of Gln1029 in the photoactivation processes of the LOV2 domain in adiantum phytochrome3*. Biochemistry, 2004. **43**(26): p. 8373-9.
148. Pfeifer, A., et al., *Time-resolved Fourier transform infrared study on photoadduct formation and secondary structural changes within the phototropin LOV domain*. Biophys J, 2009. **96**(4): p. 1462-70.
149. Alexandre, M.T., et al., *Electronic and protein structural dynamics of a photosensory histidine kinase*. Biochemistry, 2010. **49**(23): p. 4752-9.
150. Eisenreich, W., et al., *¹³C Isotopologue editing of FMN bound to phototropin domains*. FEBS J, 2007. **274**(22): p. 5876-90.
151. Iwata, T., et al., *Identification of the C=O stretching vibrations of FMN and peptide backbone by ¹³C-labeling of the LOV2 domain of Adiantum phytochrome3*. Biochemistry, 2006. **45**(51): p. 15384-91.
152. Kotaki, A., M. Naoi, and K. Yagi, *Effect of proton donors on the absorption spectrum of flavin compounds in apolar media*. J Biochem, 1970. **68**(3): p. 287-92.

153. Nash, A.I., et al., *A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration*. Biochemistry, 2008. **47**(52): p. 13842-9.
154. Salzmann, S., et al., *Influence of the LOV domain on low-lying excited states of flavin: a combined quantum-mechanics/molecular-mechanics investigation*. J Phys Chem B, 2009. **113**(47): p. 15610-8.
155. Yagi, K., et al., *Effect of hydrogen bonding on electronic spectra and reactivity of flavins*. Biochemistry, 1980. **19**(8): p. 1553-7.
156. Yamamoto, A., et al., *Light signal transduction pathway from flavin chromophore to the J alpha helix of Arabidopsis phototropin I*. Biophys J, 2009. **96**(7): p. 2771-8.
157. Christie, J.M., et al., *Steric interactions stabilize the signaling state of the LOV2 domain of phototropin I*. Biochemistry, 2007. **46**(32): p. 9310-9.
158. Hart, J.E., et al., *Engineering the phototropin photocycle improves photoreceptor performance and plant biomass production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(25): p. 12550-12557.
159. Brosi, R., et al., *Hindered rotation of a cofactor methyl group as a probe for protein-cofactor interaction*. J Am Chem Soc, 2010. **132**(26): p. 8935-44.
160. Guo, H., et al., *The phot LOV2 domain and its interaction with LOV1*. Biophys J, 2005. **89**(1): p. 402-12.
161. Pennacchiotti, F., et al., *The dark recovery rate in the photocycle of the bacterial photoreceptor YtvA is affected by the cellular environment and by hydration*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e107489.
162. Zayner, J.P., et al., *Investigating models of protein function and allostery with a widespread mutational analysis of a light-activated protein*. Biophys J, 2013. **105**(4): p. 1027-36.
163. Fettweiss, T., et al., *Mechanistic Basis of the Fast Dark Recovery of the Short LOV Protein DsLOV from Dinoroseobacter shibae*. Biochemistry, 2018. **57**(32): p. 4833-4847.
164. Pudasaini, A., et al., *Kinetics of the LOV domain of ZEITLUPE determine its circadian function in Arabidopsis*. Elife, 2017. **6**.
165. Vaidya, A.T., et al., *Structure of a light-activated LOV protein dimer that regulates transcription*. Sci Signal, 2011. **4**(184): p. ra50.
166. Fedorov, R., et al., *Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch: The Phot-LOV1 domain from Chlamydomonas reinhardtii*. Biophys J, 2003. **84**(4): p. 2474-82.
167. Biebl, H., et al., *Dinoroseobacter shibae gen. nov., sp. nov., a new aerobic phototrophic bacterium isolated from dinoflagellates*. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 3): p. 1089-1096.
168. Marques, S. and J.L. Ramos, *Transcriptional control of the Pseudomonas putida TOL plasmid catabolic pathways*. Mol Microbiol, 1993. **9**(5): p. 923-9.
169. Nelson, K.E., et al., *Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile Pseudomonas putida KT2440*. Environ Microbiol, 2002. **4**(12): p. 799-808.
170. Röllén, K., *Structure Based Studies on FMN-Binding Fluorescent LOV Proteins and Their Application as Optogenetic Tools*. 2016.
171. Stadler, A.M., et al., *Photoactivation Reduces Side-Chain Dynamics of a LOV Photoreceptor*. Biophys J, 2016. **110**(5): p. 1064-74.
172. Briggs, W.R. and J.M. Christie, *Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors*. Trends Plant Sci, 2002. **7**(5): p. 204-10.
173. Reymond, P., T.W. Short, and W.R. Briggs, *Blue light activates a specific protein kinase in higher plants*. Plant Physiol, 1992. **100**(2): p. 655-61.

174. Kagawa, T., et al., *Function analysis of phototropin2 using fern mutants deficient in blue light-induced chloroplast avoidance movement*. Plant Cell Physiol, 2004. **45**(4): p. 416-26.
175. Salomon, M., U. Lempert, and W. Rudiger, *Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain*. FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 8-10.
176. Jones, M.A., et al., *Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6405-14.
177. Kawano, F., et al., *Fluorescence imaging-based high-throughput screening of fast- and slow-cycling LOV proteins*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82693.
178. Zayner, J.P., et al., *Helical Contributions Mediate Light-Activated Conformational Change in the LOV2 Domain of Avena sativa Phototropin 1*. ACS Omega, 2019. **4**(1): p. 1238-1243.
179. Losi, A., T. Kottke, and P. Hegemann, *Recording of blue light-induced energy and volume changes within the wild-type and mutated phot-LOV1 domain from Chlamydomonas reinhardtii*. Biophys J, 2004. **86**(2): p. 1051-60.
180. Tang, Y., et al., *Interdomain signalling in the blue-light sensing and GTP-binding protein YtvA: a mutagenesis study uncovering the importance of specific protein sites*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(1): p. 47-56.
181. Harper, S.M., et al., *Conformational changes in a photosensory LOV domain monitored by time-resolved NMR spectroscopy*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(11): p. 3390-1.
182. Deisseroth, K., *Controlling the brain with light*. Sci Am, 2010. **303**(5): p. 48-55.
183. Fenno, L., O. Yizhar, and K. Deisseroth, *The development and application of optogenetics*. Annu Rev Neurosci, 2011. **34**: p. 389-412.
184. Torra, J., et al., *Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent protein Pp2FbFP L30M, a novel derivative of Pseudomonas putida flavin-binding Pp2FbFP*. Photochem Photobiol Sci, 2015. **14**(2): p. 280-7.
185. Deisseroth, K., *Optogenetics*. Nat Methods, 2011. **8**(1): p. 26-9.
186. Drepper, T., et al., *Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(4): p. 443-5.
187. Pudasaini, A., K.K. El-Arab, and B.D. Zoltowski, *LOV-based optogenetic devices: light-driven modules to impart photoregulated control of cellular signaling*. Front Mol Biosci, 2015. **2**: p. 18.
188. Nagel, G., et al., *Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae*. Science, 2002. **296**(5577): p. 2395-8.
189. Nagel, G., et al., *Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 13940-5.
190. Bieszke, J.A., et al., *The nop-1 gene of Neurospora crassa encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8034-9.
191. Henderson, R., et al., *Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy*. J Mol Biol, 1990. **213**(4): p. 899-929.
192. Lanyi, J.K. and H. Luecke, *Bacteriorhodopsin*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(4): p. 415-9.
193. Boyden, E.S., et al., *Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity*. Nat Neurosci, 2005. **8**(9): p. 1263-8.
194. Nagel, G., et al., *Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of Caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses*. Curr Biol, 2005. **15**(24): p. 2279-84.

195. Liske, H., et al., *Optical control of neuronal excitation and inhibition using a single opsin protein, ChR2*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 3110.
196. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
197. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. J Microsc, 2005. **217**(Pt 1): p. 1-15.
198. Remington, S.J., *Green fluorescent protein: a perspective*. Protein Sci, 2011. **20**(9): p. 1509-19.
199. Davari, M.D., et al., *Photophysics of the LOV-Based Fluorescent Protein Variant iLOV-Q489K Determined by Simulation and Experiment*. J Phys Chem B, 2016. **120**(13): p. 3344-52.
200. Wingen, M., et al., *The photophysics of LOV-based fluorescent proteins--new tools for cell biology*. Photochem Photobiol Sci, 2014. **13**(6): p. 875-83.
201. Chapman, S., et al., *The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(50): p. 20038-43.
202. Adrian, M., et al., *A Phytochrome-Derived Photoswitch for Intracellular Transport*. ACS Synth Biol, 2017. **6**(7): p. 1248-1256.
203. Nagano, S., et al., *Improved fluorescent phytochromes for in situ imaging*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 5587.
204. Shu, X., et al., *A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms*. PLoS Biol, 2011. **9**(4): p. e1001041.
205. Endres, S., et al., *An optogenetic toolbox of LOV-based photosensitizers for light-driven killing of bacteria*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15021.
206. Kwiatkowski, S., et al., *Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations*. Biomed Pharmacother, 2018. **106**: p. 1098-1107.
207. Losi, A. and W. Gartner, *Solving Blue Light Riddles: New Lessons from Flavin-binding LOV Photoreceptors*. Photochem Photobiol, 2017. **93**(1): p. 141-158.
208. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense*. World Allergy Organ J, 2012. **5**(1): p. 9-19.
209. Moglich, A., R.A. Ayers, and K. Moffat, *Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases*. J Mol Biol, 2009. **385**(5): p. 1433-44.
210. Wu, Y.L., et al., *A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 104-8.
211. Yoo, S.K., et al., *Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish*. Dev Cell, 2010. **18**(2): p. 226-36.
212. Guntas, G., et al., *Engineering an improved light-induced dimer (iLID) for controlling the localization and activity of signaling proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(1): p. 112-7.
213. Lungu, O.I., et al., *Designing photoswitchable peptides using the AsLOV2 domain*. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 507-17.
214. Strickland, D., K. Moffat, and T.R. Sosnick, *Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10709-14.
215. Li, X., et al., *A single-component light sensor system allows highly tunable and direct activation of gene expression in bacterial cells*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(6): p. e33.
216. Grusch, M., et al., *Spatio-temporally precise activation of engineered receptor tyrosine kinases by light*. EMBO J, 2014. **33**(15): p. 1713-26.
217. Xu, X., et al., *A Single-Component Optogenetic System Allows Stringent Switch of Gene Expression in Yeast Cells*. ACS Synth Biol, 2018. **7**(9): p. 2045-2053.

218. Carrasco-Lopez, C., et al., *Optogenetics and biosensors set the stage for metabolic cybergenetics*. *Curr Opin Biotechnol*, 2020. **65**: p. 296-309.
219. Delacour, Q., et al., *Light-Activated Proteolysis for the Spatiotemporal Control of Proteins*. *ACS Chem Biol*, 2015. **10**(7): p. 1643-7.
220. Figueroa, D., et al., *The rise and shine of yeast optogenetics*. *Yeast*, 2021. **38**(2): p. 131-146.
221. Jerng, H.H., et al., *Light-regulated voltage-gated potassium channels for acute interrogation of channel function in neurons and behavior*. *PLoS One*, 2021. **16**(3): p. e0248688.
222. Renicke, C., et al., *A LOV2 domain-based optogenetic tool to control protein degradation and cellular function*. *Chem Biol*, 2013. **20**(4): p. 619-26.
223. Salinas, F., et al., *Optogenetic switches for light-controlled gene expression in yeast*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017. **101**(7): p. 2629-2640.
224. Spiltoir, J.I. and C.L. Tucker, *Photodimerization systems for regulating protein-protein interactions with light*. *Curr Opin Struct Biol*, 2019. **57**: p. 1-8.
225. Christie, J.M., et al., *LOV to BLUF: flavoprotein contributions to the optogenetic toolkit*. *Mol Plant*, 2012. **5**(3): p. 533-44.
226. Losi, A., K.H. Gardner, and A. Moglich, *Blue-Light Receptors for Optogenetics*. *Chem Rev*, 2018. **118**(21): p. 10659-10709.
227. de Mena, L. and D.E. Rincon-Limas, *PhotoGal4: A Versatile Light-Dependent Switch for Spatiotemporal Control of Gene Expression in Drosophila Explants*. *iScience*, 2020. **23**(7): p. 101308.
228. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. *Nature*, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
229. Frankel, A.D. and P.S. Kim, *Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation*. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 717-9.
230. Romero, A., et al., *Modular and Molecular Optimization of a LOV (Light-Oxygen-Voltage)-Based Optogenetic Switch in Yeast*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).
231. Wachter, R.M., et al., *Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein*. *Structure*, 1998. **6**(10): p. 1267-77.
232. <https://www.fpbases.org/protein/eyfp/>. 12.05.2023.
233. Cormack, B.P., R.H. Valdivia, and S. Falkow, *FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)*. *Gene*, 1996. **173**(1 Spec No): p. 33-8.
234. Chudakov, D.M., S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov, *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*. *Trends Biotechnol*, 2005. **23**(12): p. 605-13.
235. March, J.C., G. Rao, and W.E. Bentley, *Biotechnological applications of green fluorescent protein*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003. **62**(4): p. 303-15.
236. Christie, J.M., et al., *Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(26): p. 22295-304.
237. Lee, J., et al., *Surface sites for engineering allosteric control in proteins*. *Science*, 2008. **322**(5900): p. 438-42.
238. Strickland, D., et al., *Rationally improving LOV domain-based photoswitches*. *Nat Methods*, 2010. **7**(8): p. 623-6.
239. Lutz, S., *Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design*. *Curr Opin Biotechnol*, 2010. **21**(6): p. 734-43.
240. Li, X., Z. Zhang, and J. Song, *Computational enzyme design approaches with significant biological outcomes: progress and challenges*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2012. **2**: p. e201209007.
241. Reetz, M.T. and J.D. Carballeira, *Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(4): p. 891-903.

242. Yuan, L., et al., *Laboratory-directed protein evolution*. Microbiol Mol Biol Rev, 2005. **69**(3): p. 373-92.
243. Esvelt, K.M., J.C. Carlson, and D.R. Liu, *A system for the continuous directed evolution of biomolecules*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 499-503.
244. Harayama, S., *Artificial evolution by DNA shuffling*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(2): p. 76-82.
245. Santoro, S.W. and P.G. Schultz, *Directed evolution of the site specificity of Cre recombinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4185-90.
246. Jaeger, K.E. and T. Eggert, *Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution*. Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 305-13.
247. Turner, N.J., *Directed evolution drives the next generation of biocatalysts*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(8): p. 567-73.
248. Lutz, S. and W.M. Patrick, *Novel methods for directed evolution of enzymes: quality, not quantity*. Curr Opin Biotechnol, 2004. **15**(4): p. 291-7.
249. Reetz, M.T., D. Kahakeaw, and R. Lohmer, *Addressing the numbers problem in directed evolution*. Chembiochem, 2008. **9**(11): p. 1797-804.
250. Patrick, W.M. and A.E. Firth, *Strategies and computational tools for improving randomized protein libraries*. Biomol Eng, 2005. **22**(4): p. 105-12.
251. Schultz, S.C. and J.H. Richards, *Site-saturation studies of beta-lactamase: production and characterization of mutant beta-lactamases with all possible amino acid substitutions at residue 71*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(6): p. 1588-92.
252. Rollen, K., et al., *The molecular basis of spectral tuning in blue- and red-shifted flavin-binding fluorescent proteins*. J Biol Chem, 2021. **296**: p. 100662.
253. Kabir, M.P., et al., *Alternative Strategy for Spectral Tuning of Flavin-Binding Fluorescent Proteins*. J Phys Chem B, 2023. **127**(6): p. 1301-1311.
254. Arnold, F.H., *Directed evolution: Creating biocatalysts for the future*. Chemical Engineering Science, 1996. **51**(23): p. 5091-5102.
255. Sack, U., Tarnok, A., Rothe, G., *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2006: Karger.
256. Dittrich, W., Göhde, W., *Patent DE1815352: FLOW-THROUGH CHAMBER FOR PHOTOMETERS TO MEASURE AND COUNT PARTICLES IN A DISPERSION MEDIUM*. 18. Dezember 1968.
257. Herzenberg, L.A., R.G. Sweet, and L.A. Herzenberg, *Fluorescence-activated cell sorting*. Sci Am, 1976. **234**(3): p. 108-17.
258. Schlick, T., *Pursuing Laplace's Vision on Modern Computers*. Mesirov, J.P., Schulten, K., Sumners, D.W. (eds) Mathematical Approaches to Biomolecular Structure and Dynamics ed. Vol. 82. 1996: Springer, New York, NY.
259. Yang, K.K., Z. Wu, and F.H. Arnold, *Machine-learning-guided directed evolution for protein engineering*. Nat Methods, 2019. **16**(8): p. 687-694.
260. Arinkin, V., et al., *Structural determinants underlying the adduct lifetime in the LOV proteins of Pseudomonas putida*. FEBS J, 2021. **288**(16): p. 4955-4972.
261. Mathes, T., et al., *In vivo generation of flavoproteins with modified cofactors*. J Mol Biol, 2009. **385**(5): p. 1511-8.
262. Chernomor, O., et al., *Complex Evolution of Light-Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductases in Aerobic Anoxygenic Phototrophs: Origin, Phylogeny, and Function*. Mol Biol Evol, 2021. **38**(3): p. 819-837.
263. Hemmer, S., et al., *Residue alterations within a conserved hydrophobic pocket influence light, oxygen, voltage photoreceptor dark recovery*. Photochem Photobiol Sci, 2023. **22**(4): p. 713-727.
264. Sambrook J, F.E., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second Edition*. Vol. 1, 2 and 3. 1989: New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

265. Studier, F.W., *Protein production by auto-induction in high density shaking cultures*. *Protein Expr Purif*, 2005. **41**(1): p. 207-34.
266. <https://www.qiagen.com/de-us/resources/faq?id=d3be05d0-ec02-4ced-aabe-dcd2a1061920&lang=en>. 12.05.2023.
267. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
268. Ishii, T.M., et al., *Site-directed mutagenesis*. *Methods Enzymol*, 1998. **293**: p. 53-71.
269. Wilkins, M.R., et al., *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server*. *Methods Mol Biol*, 1999. **112**: p. 531-52.
270. Candiano, G., et al., *Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis*. *Electrophoresis*, 2004. **25**(9): p. 1327-33.
271. Kutta, R.-J., *Blitzlichtphotolyse - Untersuchung zu LOV-Domänen und Photochromen Systemen*. Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät IV - Chemie und Pharmazie - der Universität Regensburg, 2012.
272. Kutta, R.-J., et al., *Setup and performance of a streak camera apparatus for transient absorption measurements in the ns to ms range*. *Applied Physics B*, 2013. **111**(2): p. 203-216.
273. Pavlovska, T., et al., *Tuning Deazaflavins Towards Highly Potent Reducing Photocatalysts Guided by Mechanistic Understanding - Enhancement of the Key Step by the Internal Heavy Atom Effect*. *Chemistry*, 2022. **28**(46): p. e202200768.
274. Sarter, M., Hemmer, S., et al., *Multiscale relaxation analysis reveals the presence of multiple dynamic and structural intermediates in LOV photoreceptor dark recovery*. manuscript in preparation (see X).
275. Grimaldo, M., et al., *Dynamics of proteins in solution*. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2019. **52**.
276. Zayner, J.P. and T.R. Sosnick, *Factors that control the chemistry of the LOV domain photocycle*. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e87074.
277. Siedhoff, N.E., et al., *PyPEF-An Integrated Framework for Data-Driven Protein Engineering*. *J Chem Inf Model*, 2021. **61**(7): p. 3463-3476.
278. Ferguson, A.L. and R. Ranganathan, *100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Data-Driven Protein Design*. *ACS Macro Lett*, 2021. **10**(3): p. 327-340.
279. Siedhoff, N.E., U. Schwaneberg, and M.D. Davari, *Machine learning-assisted enzyme engineering*. *Methods Enzymol*, 2020. **643**: p. 281-315.
280. Hemmer, S., et al., *Machine-learning-assisted engineering of photoreceptor kinetics*. *JACS Au*, 2023.
281. Illig, M.A., et al., *A hybrid model combining evolutionary probability and machine learning leverages data-driven protein engineering*. *bioRxiv* 2022.06.07.495081; , 2022.
282. Maia, R.N.A., et al., *Real-Time Tracking of Proton Transfer from the Reactive Cysteine to the Flavin Chromophore of a Photosensing Light Oxygen Voltage Protein*. *J Am Chem Soc*, 2021. **143**(32): p. 12535-12542.
283. Kutta, R.J., et al., *A search for radical intermediates in the photocycle of LOV domains*. *Photochem Photobiol Sci*, 2015. **14**(2): p. 288-99.
284. Lanzl, K., et al., *Photoreaction of mutated LOV photoreceptor domains from *Chlamydomonas reinhardtii* with aliphatic mercaptans: implications for the mechanism of wild type LOV*. *Phys Chem Chem Phys*, 2010. **12**(25): p. 6594-604.
285. Rollen, K., et al., *Small-angle X-ray scattering study of the kinetics of light-dark transition in a LOV protein*. *PLoS One*, 2018. **13**(7): p. e0200746.
286. Bannister, S., et al., *Arguments for an additional long-lived intermediate in the photocycle of the full-length aureochrome 1c receptor: A time-resolved small-angle X-ray scattering study*. *Struct Dyn*, 2019. **6**(3): p. 034701.

287. Sarter, M., et al., *Strong Adverse Contribution of Conformational Dynamics to Streptavidin-Biotin Binding*. J Phys Chem B, 2020. **124**(2): p. 324-335.
288. Golub, M., et al., *Light-Induced Conformational Flexibility of the Orange Carotenoid Protein Studied by Quasielastic Neutron Scattering with In Situ Illumination*. J Phys Chem Lett, 2023. **14**(1): p. 295-301.

5. Anhang

Removealt.py Skript:

```
import removealt

fetch 1hxb, async=0

select ligA, alt a

select ligB, alt b

count_atoms ligA # 49 atoms

count_atoms ligB # 49 atoms

removealt 1hxb, b

count_atoms ligA # 0 atoms

count_atoms ligB # 49 atoms
```

Modifiziertes Removealt.py Skript:

```
import removealt

fetch 1hxb, async=0 # change 1hxb for the pdb ID you want to analyse and alter

select ligA, alt a

select ligB, alt b

count_atoms ligA # 49 atoms

count_atoms ligB # 49 atoms

removealt 1hxb, b

count_atoms ligA # 0 atoms

count_atoms ligB # 49 atoms

alter all, q = 1.00
```

perl map to B vl.pl Skript:

```

#!/usr/bin/perl
# map_to_B_v1.pl
# MODIFIED FROM: map_conservation_to_B.pl ; Cameron Mura (07/2001).
# AUTHOR: Ulrich Krauss (07/2011)
# LAST MODIFIED: 22/07/2011
#
# USAGE:
#     map_to_B_v1.pl PDB-File.pdb SITES-File.txt
#
# DESCRIPTION:
# This Perl script takes 2 input files: argv[0] ("PDB_File.pdb") is the PDB file
# and argv[1] ("SITES-File.txt") is a file tabulating the values which should
# be mapped to the B-factor field (i.e. conservation scores, NMR chemical shift
# changes, hydrophobicity values etc. ...)
#
# FORMAT of SITES-File:
#
# "res#,ss,value"
#
# e.g.
# 1,ss,0.501
# 2,ss,1.011
# ...
# 140,22,20.00
#
# where "res#" is the residue #, ss is used as a necessary identifier and value can be any
# number. The script will read in the values from the SITES-File and replace the
# B-factor of the corresponding residue with the listed value. For missing
# residues the B-factor field will be filled with zeros.
#
# The output is a PDB file (named mapped.pdb) with all of the B-factors
# flattened to 0.00, except for those residues for which a value has been
# provided in the SITES-file.
#
# NOTE1: make sure all occupancies are 1.00 for any atoms with B-factors you
# want changed.
#
# NOTE2: please be aware that all heteroatoms will be removed from the output

```

```

$pdb_in = $ARGV[0];
$site_file = $ARGV[1];
$value="23.00";
$bfac = "";
@cons = "";
$site_line = "";
open (MYFILE, ">mapped.pdb");
open (PDB, $pdb_in) || die "Cannot open file \"$pdb_in\"\n";
while (<PDB>)
{
  $line = $_;
  chomp ($line);
  $resnum = ""; $bfac = "";
  if ($line =~ /^(^ATOM|HET)\s+\d+\s+[\w\*]+\s+\w\w\w [A-Z]\s+(\d+)(\d+)(1\.\d+)\s+(\d+\.\d+)(.*)/
  or $line =~ /^(^ATOM|HET)\s+\d+\s+[\w\*]+\s+\w\w\w [A-Z]\s+(\d+)(\d+)(1\.\d+)\s+(\d+\.\d+)(.*)/)
  {
    $resnum = $3; $bfac = "0.00";
    $counter = 0;
    open (SITES, $site_file) || die "Cannot open file \"$site_file\"\n";
    while (<SITES>)
    {if ($counter == 0)
      {
        $site_line = $_; chomp ($site_line); @cons = ""; $abs = ""; chomp ($abs);
        @cons = split(/,/ , $site_line);
        if ($cons[0] == $resnum and $cons[1] eq "ss")      {$bfac = "@cons[2]";
$resnum++; last;}
        next;
      }
    }
    close (SITES);
    if ($bfac eq "") { $bfac = "0.00";}
    $shit = $5 . " " . $bfac;
    print "$1$3$4$shit$7\n";
    print MYFILE "$1$3$4$shit$7\n";
  }
}
close (MYFILE);
exit;

```

Tabelle 24: Übersicht der vorhergesagten und ausgewählten *AsLOV2*-Varianten. Aufgelistet sind alle vorhergesagten bzw. ausgewählten *AsLOV2*-Varianten mit ihrer Mutationsstelle, der dazugehörigen Vorhersagerunde und der Hinweis ob diese mittels QC-PCR generierbar waren (2.2.2.3). Ausgewählte *AsLOV2*-Varianten sind durch einen * gekennzeichnet. Ausgewählte und vorhergesagte schnelle Varianten sind mit (s) bzw. langsame mit (l) gekennzeichnet.

<i>AsLOV2</i>-Variante	Mutation I	Mutation II	Mutation III	ML-Runde	Generierbar
T406C* (l)	ACT → TGC	-	-	1	Ja
T406V* (l)	ACT → GTG	-	-	1	Ja
K413C* (l)	AAG → TGC	-	-	1	Ja
N414C* (l)	AAC → TGC	-	-	1	Ja
N414E* (l)	AAC → GAA	-	-	1	Ja
N414M* (l)	AAC → ATG	-	-	1	Ja
V416E* (l)	GTC → GAA	-	-	1	Ja
V416M* (l)	GTC → ATG	-	-	1	Ja
V416T* (s)	GTC → ACC	-	-	1	Ja
I427N* (s)	ATT → AAC	-	-	1	Ja
I427T* (s)	ATT → ACC	-	-	1	Ja
L446C* (l)	TTG → TGC	-	-	1	Nein
L446M* (l)	TTG → ATG	-	-	1	Ja
L446Q* (l)	TTG → CAG	-	-	1	Ja
L446S* (l)	TTG → AGC	-	-	1	Ja
N449A* (s)	AAC → GCG	-	-	1	Ja
N449E* (s)	AAC → GAA	-	-	1	Ja
N449I* (s)	AAC → ATT	-	-	1	Ja
N449K* (s)	AAC → AAA	-	-	1	Ja
N449T* (s)	AAC → ACC	-	-	1	Ja
E475T* (s)	GAG → ACC	-	-	1	Ja
L496K* (l)	TTG → AAA	-	-	1	Ja
D501W* (l)	GAT → TGG	-	-	1	Ja
D501Y* (l)	GAT → TAT	-	-	1	Ja
Q513H* (s)	CAG → CAT	-	-	1	Ja
Q513P* (s)	CAG → CCG	-	-	1	Ja
Q513R* (s)	CAG → CGC	-	-	1	Ja
G528E* (s)	GGA → GAA	-	-	1	Ja

AsLOV2-Variante	Mutation I	Mutation II	Mutation III	ML-Runde	Generierbar
G528H* (s)	GGA → CAT	-	-	1	Nein
G528K* (s)	GGA → AAA	-	-	1	Ja
G528R* (s)	GGA → CGC	-	-	1	Ja
T406C/N414C (l)	ACT → TGC	AAC → TGC	-	1	Nein
T406V/N414C (l)	ACT → GTG	AAC → TGC	-	1	Nein
K413C/N414C (l)	AAG → TGC	AAC → TGC	-	1	Ja
N414C/L496K (l)	AAC → TGC	TTG → AAA	-	1	Ja
N414E/V416E (l)	AAC → GAA	GTC → GAA	-	1	Ja
N414E/V416M (l)	AAC → GAA	GTC → ATG	-	1	Ja
N414M/V416E (l)	AAC → ATG	GTC → GAA	-	1	Ja
N414M/V416M (l)	AAC → ATG	GTC → ATG	-	1	Ja
V416T/N449T (s)	GTC → ACC	AAC → ACC	-	1	Ja
I427N/N449A (s)	ATT → AAC	AAC → GCG	-	1	Ja
I427N/N449E (s)	ATT → AAC	AAC → GAA	-	1	Ja
I427N/N449I (s)	ATT → AAC	AAC → ATT	-	1	Ja
I427N/N449K (s)	ATT → AAC	AAC → AAA	-	1	Ja
I427T/N449T (s)	ATT → ACC	AAC → ACC	-	1	Ja
I427T/E475T (s)	ATT → ACC	GAG → ACC	-	1	Ja
N449T/Q513P (s)	AAC → ACC	CAG → CCG	-	1	Ja
L446C/D501Y (l)	TTG → TGC	GAT → TAT	-	1	Nein
L446M/D501W (l)	TTG → ATG	GAT → TGG	-	1	Ja
L446Q/D501Y (l)	TTG → CAG	GAT → TAT	-	1	Ja
L446S/D501Y (l)	TTG → AGC	GAT → TAT	-	1	Ja
Q513H/G528H (s)	CAG → CAT	GGA → CAT	-	1	Nein
Q513R/G528E (s)	CAG → CGC	GGA → GAA	-	1	Nein
Q513R/G528R (s)	CAG → CGC	GGA → CGC	-	1	Ja
Q513R/G528K (s)	CAG → CGC	GGA → AAA	-	1	Ja
R410P* (s)	CGT → CCG	-	-	2	Ja
K413A* (s)	AAG → GCG	-	-	2	Ja
N414G* (s)	AAC → GGC	-	-	2	Ja
N414L* (l)	AAC → CTG	-	-	2	Ja

AsLOV2-Variante	Mutation I	Mutation II	Mutation III	ML-Runde	Generierbar
D501G* (s)	GAT → GGC	-	-	2	Ja
D515L* (s)	GAT → CTG	-	-	2	Ja
N414A/V416A (l)	AAC → GCG	GTC → GCG	-	2	Ja
N414A/V416L (l)	AAC → GCG	GTC → CTG	-	2	Ja
N414L/V416L (l)	AAC → CTG	GTC → CTG	-	2	Ja
N414L/H495L (l)	AAC → CTG	CAC → CTG	-	2	Ja
N414L/Q513L (l)	AAC → CTG	CAG → CTG	-	2	Ja
N414L/L514A (l)	AAC → CTG	TTG → GCG	-	2	Ja
R410P/G528A (s)	CGT → CCG	GAA → GCG	-	2	Ja
R410P/G528E (s)	CGT → CCG	GGA → GAA	-	2	Ja
R410P/G528R (s)	CGT → CCG	GGA → CGC	-	2	Ja
K413A/N414G (s)	AAG → GCG	AAC → GGC	-	2	Ja
K413A/D501G (s)	AAG → GCG	GAT → GGC	-	2	Ja
N414G/L446E (s)	AAC → GGC	TTG → GAG	-	2	Ja
N414G/L446S (s)	AAC → GGC	TTG → AGC	-	2	Ja
N414G/G528E (s)	AAC → GGC	GGA → GAA	-	2	Ja
R442L/D515L (s)	CGT → CTG	GAT → CTG	-	2	Ja
E475T/G528E (s)	GAG → ACC	GGA → GAA	-	2	Ja
D501G/G528E (s)	GAT → GGC	GGA → GAA	-	2	Ja
N414D/V416A (l)	AAC → GAT	GTC → GCG	-	3	Ja
N414D/V416T (l)	AAC → GAT	GTC → ACC	-	3	Ja
T438V/E475T (s)	ACA → GTG	GAG → ACC	-	3	Ja
L446F/E475T (s)	TTG → TTT	GAG → ACC	-	3	Ja
V463W/E475T (s)	GTG → TGG	GAG → ACC	-	3	Ja
E475T/L480A (s)	GAG → ACC	CTG → GCG	-	3	Nein
N414D/F415E/V416T (l)	AAC → GAT	TTT → GAA	GTC → ACC	3	Ja
N414M/F415E/V416A (l)	AAC → ATG	TTT → GAA	GTC → GCG	3	Ja
I427T/L446M/E475T (s)	ATT → ACC	TTG → ATG	GAG → ACC	3	Ja

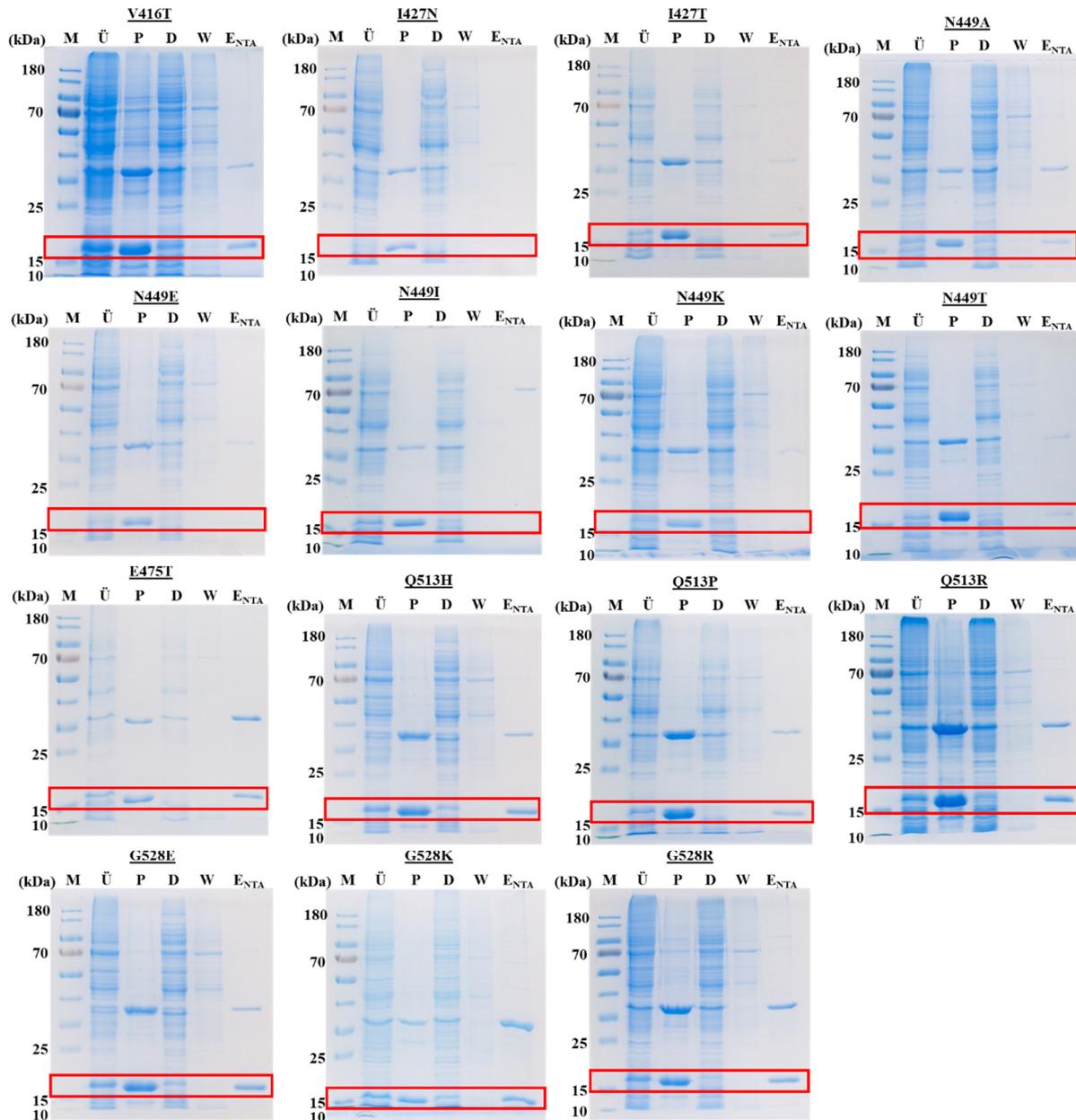


Abbildung 42: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der ausgewählten schnellen *AsLOV2*-Einzelvarianten der ersten Vorhersagrunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraktion nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraktion und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraktion (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraktion (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

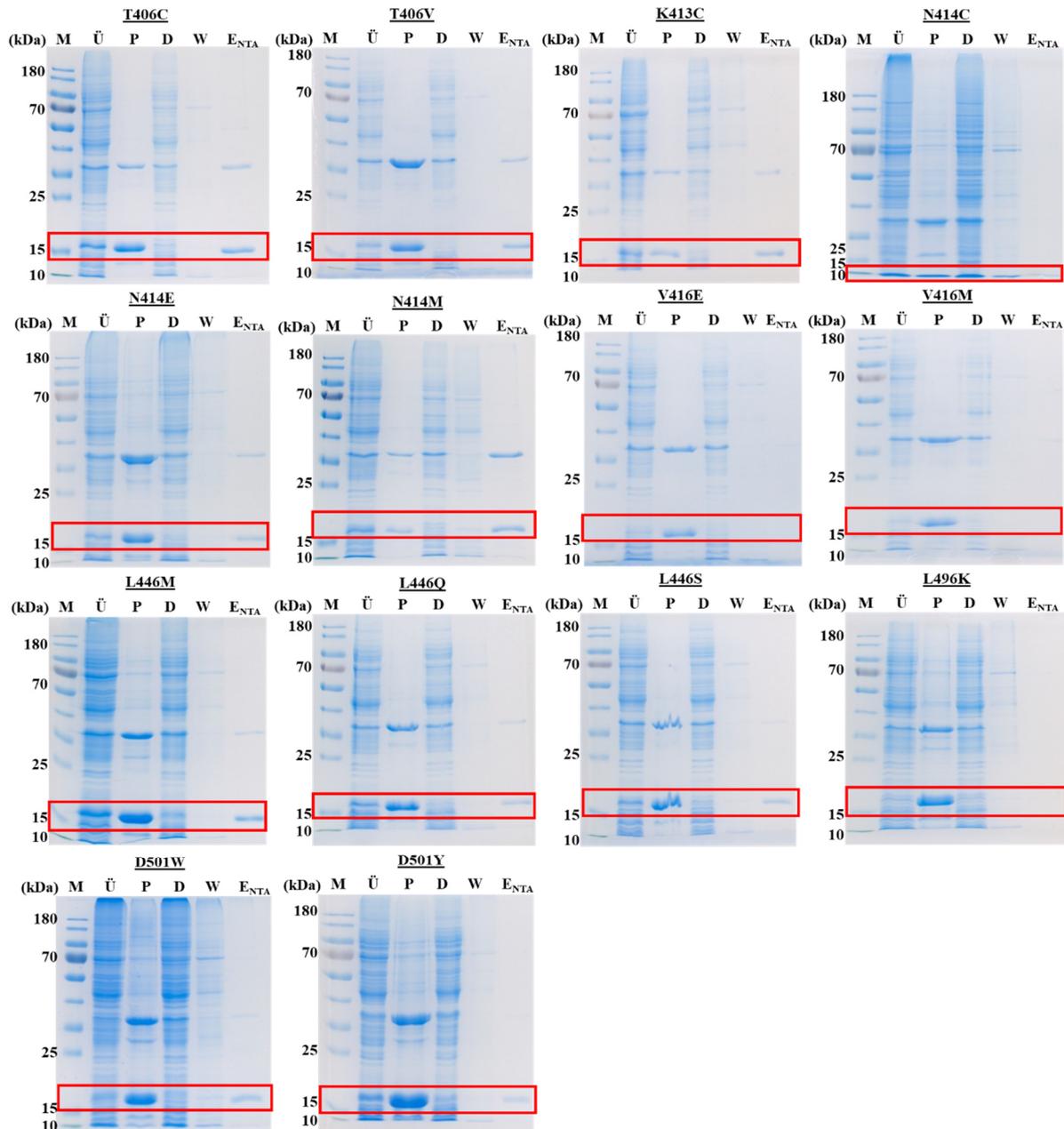


Abbildung 43: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der ausgewählten langsamen *AsLOV2*-Einzelvarianten der ersten Vorhersagerunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraction und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraction (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraction (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

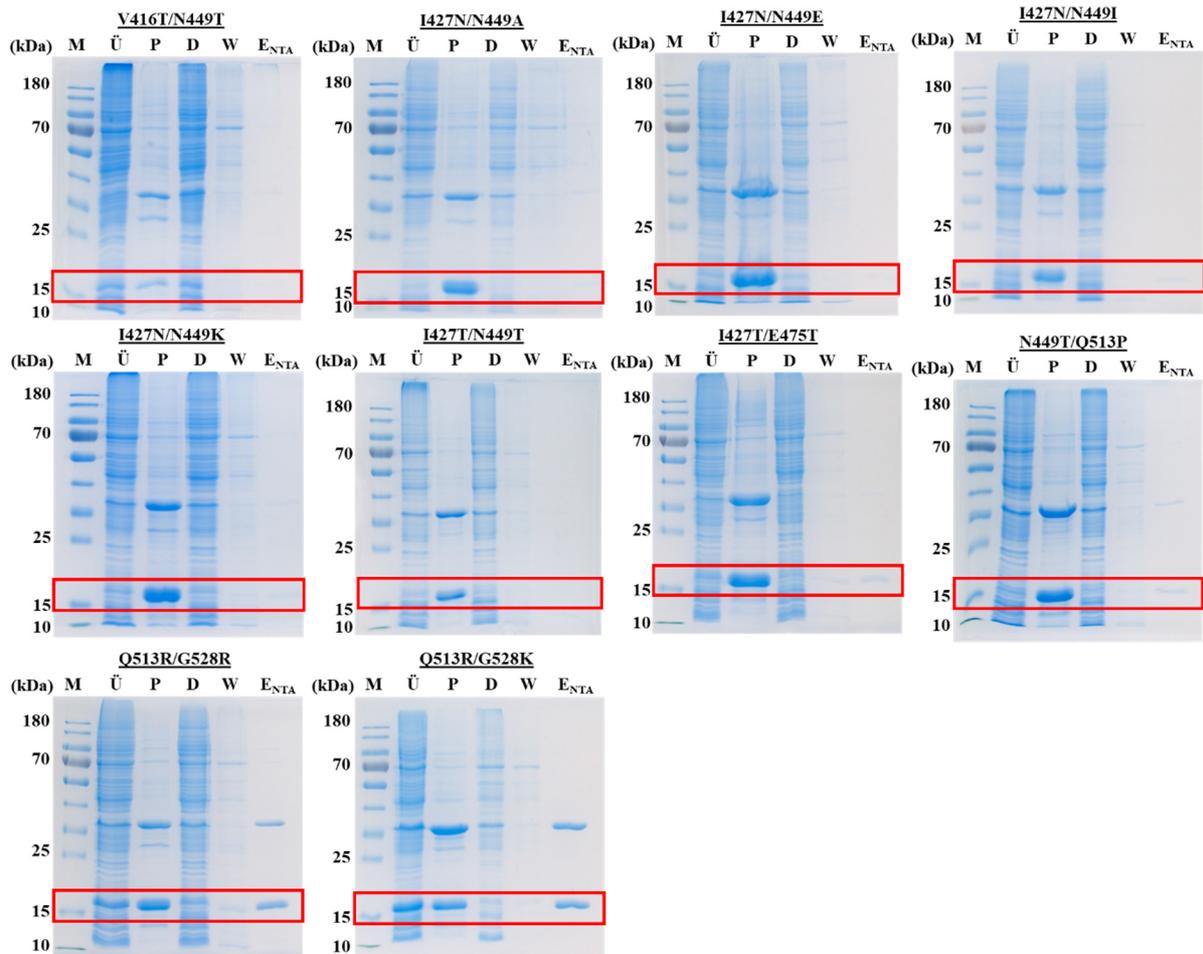


Abbildung 44: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der vorhergesagten schnellen *AsLOV2*-Doppelvarianten der ersten Vorhersagerunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraktion nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraktion und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraktion (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraktion (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

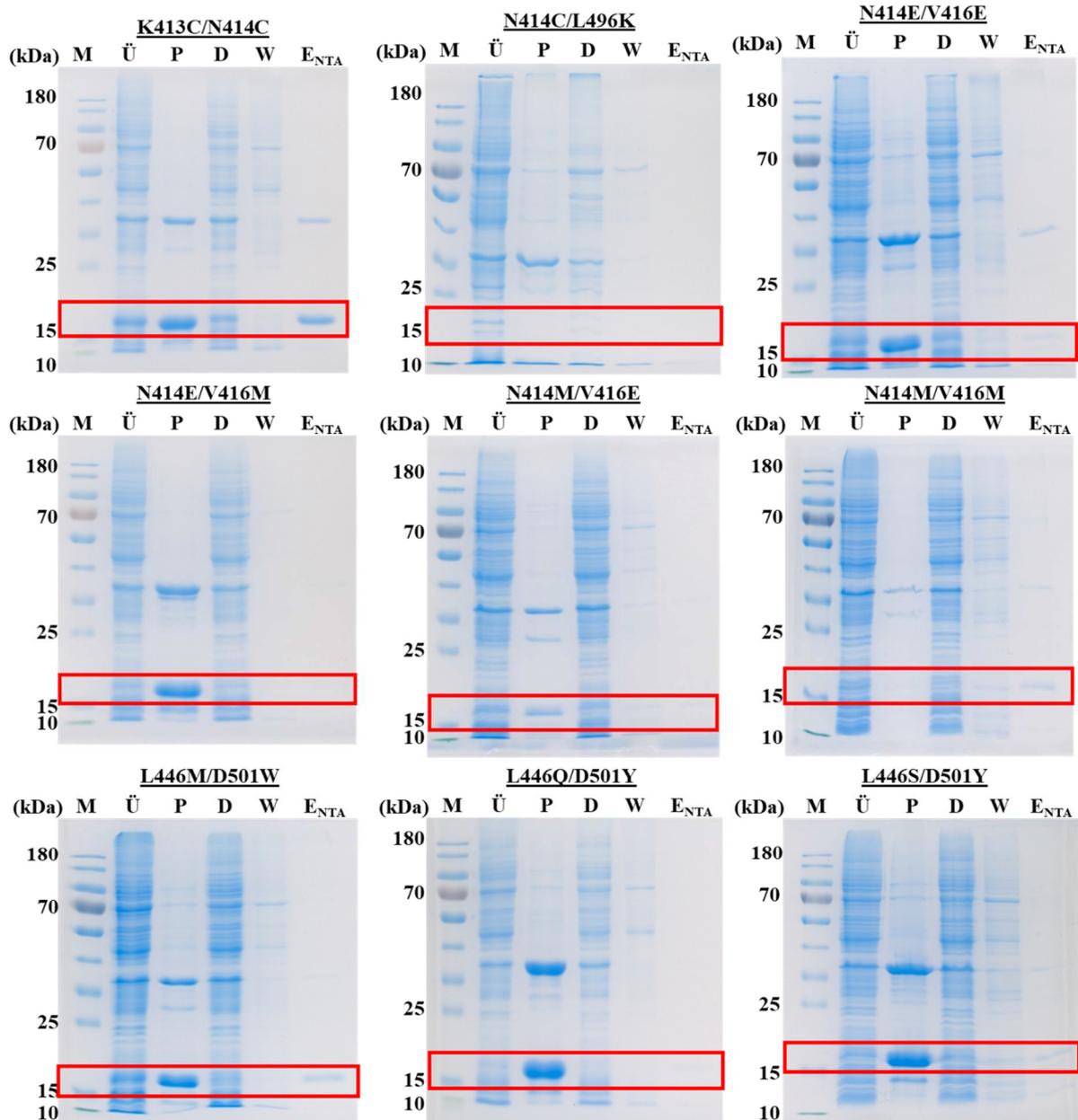


Abbildung 45: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der vorhergesagten langsamen *AsLOV2*-Doppelvarianten der ersten Vorhersagerunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraction und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraction (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraction (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

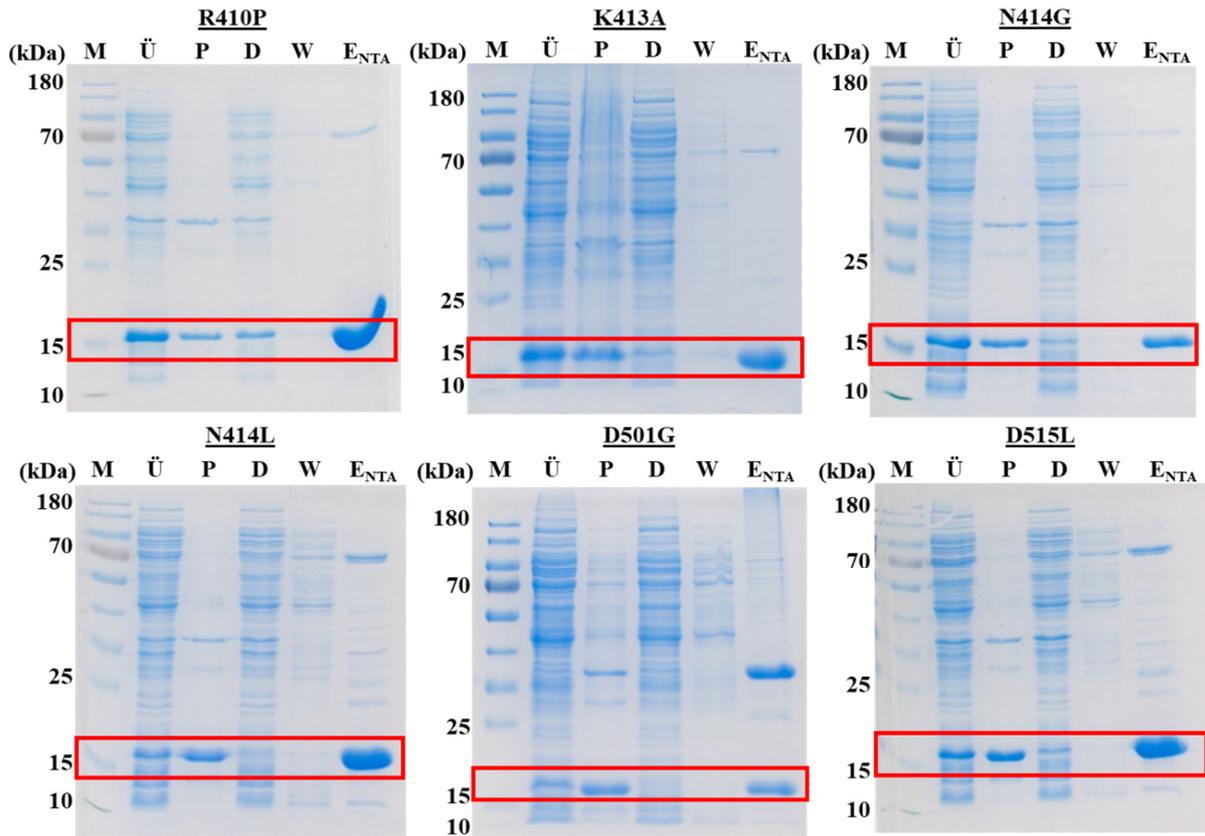


Abbildung 46: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der ausgewählten schnellen und langsamen *AsLOV2*-Einzelvarianten der zweiten Vorhersagerunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraction und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraction (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraction (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

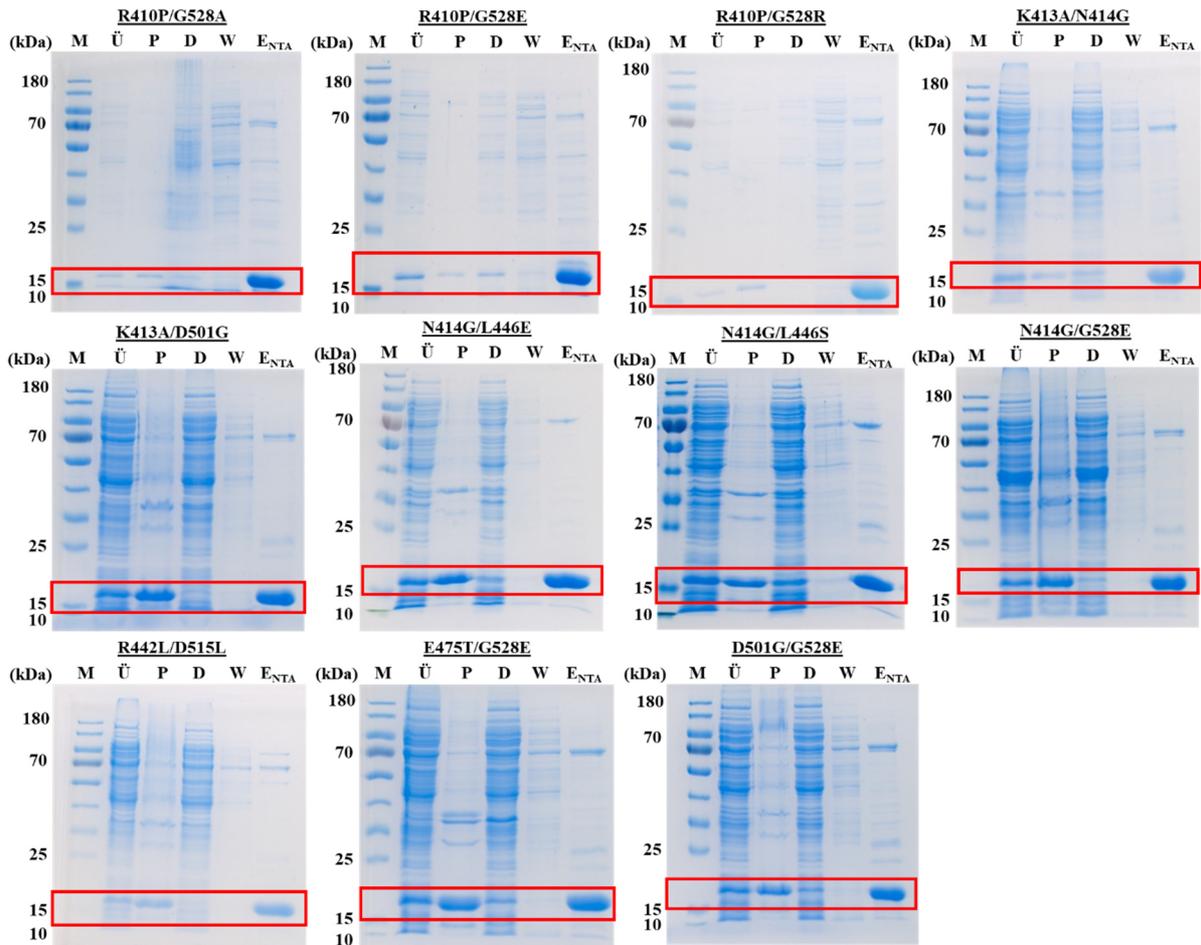


Abbildung 47: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der vorhergesagten schnellen *AsLOV2*-Doppelvarianten der zweiten Vorhersagerunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.5.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraktion nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraktion und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraktion (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraktion (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

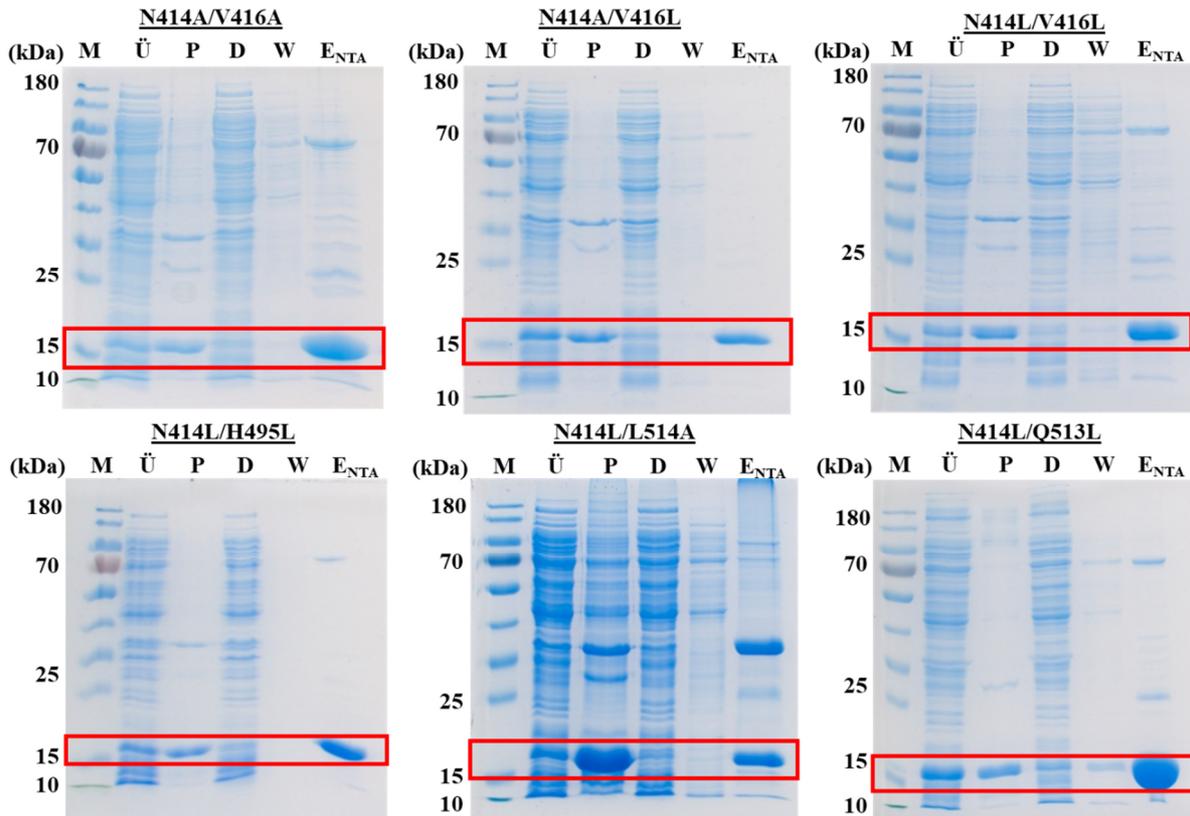


Abbildung 48: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der vorhergesagten langsamen *AsLOV2*-Doppelvarianten der zweiten ML-Runde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraktion nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraktion und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraktion (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraktion (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

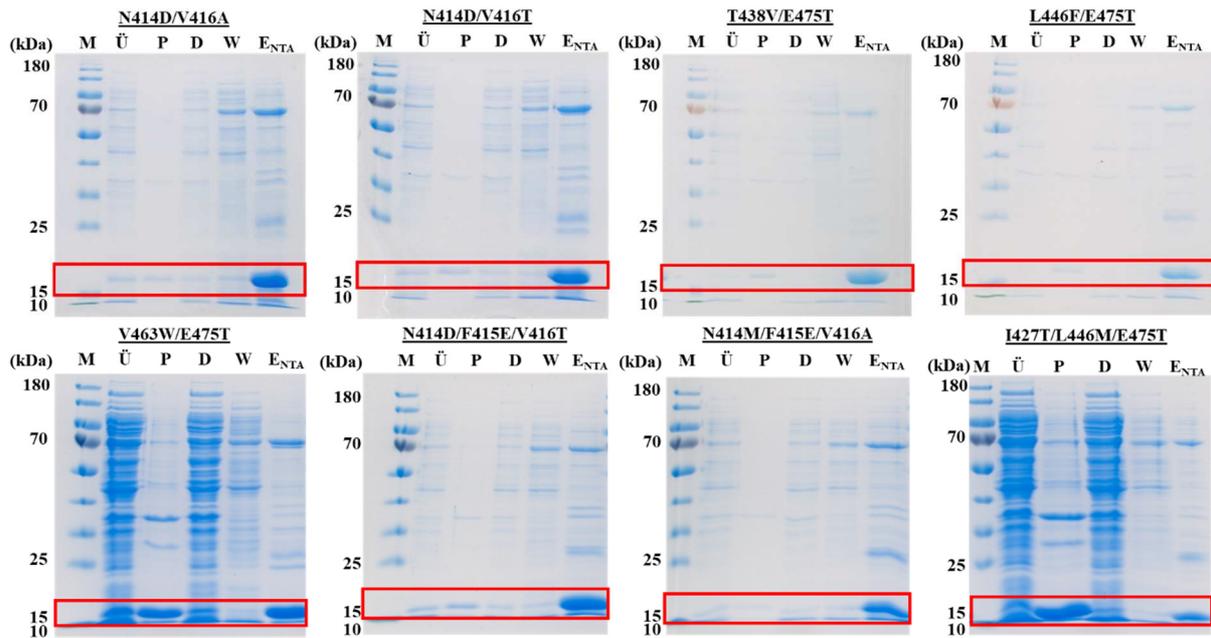


Abbildung 49: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte der vorhergesagten schnellen und langsamen *AsLOV2*-Vvarianten der dritten Vorhersagerunde. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraction und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraction (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 μ L Marker und 10 μ g der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraction (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 25: Übersicht über die Proteinkonzentrationen und Flavin-Beladungen der erzeugten *AsLOV2*-Varianten. Aufgeführt sind die unterschiedlichen Varianten, die Auswahl-/Vorhersagerunde, die Proteinkonzentration (mg mL^{-1}) und die Flavin-Beladung (%). Ausgewählte *AsLOV2*-Varianten sind durch einen * gekennzeichnet. Ausgewählte und vorhergesagte schnelle Varianten sind mit (s) bzw. langsame mit (l) gekennzeichnet. -: Funktionslose Varianten.

<i>AsLOV2</i> -Variante	Runde	Proteinkonzentration (mg mL^{-1})	Flavin (%)
wildtypisch	0	3,00	39,6
T406C* (l)	1	2,57	36,1
T406V* (l)	1	4,95	46,9
K413C* (l)	1	3,59	45,4
N414C* (l)	1	1,46	27,3
N414E* (l)	1	1,28	43,8
N414M* (l)	1	2,19	5,6
V416E* (l)	1	2,21	1,1
V416M* (l)	1	2,15	–
V416T* (s)	1	0,81	70,5
I427N* (s)	1	1,79	2,9
I427T* (s)	1	0,60	26,1
L446M* (l)	1	3,28	29,3
L446Q* (l)	1	1,68	22,4
L446S* (l)	1	1,45	16,8
N449A* (s)	1	1,82	–
N449E* (s)	1	1,47	4,7
N449I* (s)	1	2,09	–
N449K* (s)	1	1,83	–
N449T* (s)	1	0,49	–

AsLOV2-Variante	Runde	Proteinkonzentration (mg mL⁻¹)	Flavin (%)
E475T* (s)	1	0,84	69,0
L496K* (l)	1	1,50	–
D501W* (l)	1	1,59	29,7
D501Y* (l)	1	0,74	71,2
Q513H* (s)	1	7,54	12,3
Q513P* (s)	1	0,40	23,9
Q513R* (s)	1	5,00	16,8
G528E* (s)	1	2,14	43,5
G528K* (s)	1	2,89	22,1
G528R* (s)	1	3,58	29,5
K413C/N414C (l)	1	5,25	40,0
N414C/L496K (l)	1	1,42	–
N414E/V416E (l)	1	2,31	–
N414E/V416M (l)	1	1,92	–
N414M/V416E (l)	1	1,71	–
N414M/V416M (l)	1	1,71	–
V416T/N449T (s)	1	1,87	–
I427N/N449A (s)	1	1,15	–
I427N/N449E (s)	1	1,75	–
I427N/N449I (s)	1	1,18	–
I427N/N449K (s)	1	0,94	–
I427T/N449T (s)	1	0,88	–

AsLOV2-Variante	Runde	Proteinkonzentration (mg mL⁻¹)	Flavin (%)
I427T/E475T (s)	1	1,38	13,5
N449T/Q513P (s)	1	0,98	—
L446M/D501W (l)	1	0,72	52,9
L446Q/D501Y (l)	1	1,17	7,6
L446S/D501Y (l)	1	2,40	3,5
Q513R/G528R (s)	1	2,46	15,5
Q513R/G528K (s)	1	6,15	18,8
R410P* (s)	2	7,23	25,3
K413A* (s)	2	4,78	29,3
N414G* (s)	2	4,16	43,5
N414L* (l)	2	2,57	34,6
D501G* (s)	2	1,37	61,8
D515L* (s)	2	3,59	36,4
N414A/V416A (l)	2	4,80	21,0
N414A/V416L (l)	2	4,64	17,6
N414L/V416L (l)	2	2,61	2,2
N414L/H495L (l)	2	2,92	23,6
N414L/Q513L (l)	2	5,70	12,2
N414L/L514A (l)	2	1,76	65,5
R410P/G528A (s)	2	6,14	17,0
R410P/G528E (s)	2	4,71	15,0
R410P/G528R (s)	2	2,60	31,7

AsLOV2-Variante	Runde	Proteinkonzentration (mg mL⁻¹)	Flavin (%)
K413A/N414G (s)	2	5,01	32,5
K413A/D501G (s)	2	2,67	28,6
N414G/L446E (s)	2	4,81	27,8
N414G/L446S (s)	2	5,68	32,3
N414G/G528E (s)	2	3,89	30,2
R442L/D515L (s)	2	3,38	29,1
E475T/G528E (s)	2	3,41	32,8
D501G/G528E (s)	2	3,96	30,6
N414D/V416A (I)	3	2,06	–
N414D/V416T (I)	3	2,10	1,4
T438V/E475T (s)	3	3,27	40,5
L446F/E475T (s)	3	-8909,68	–
V463W/E475T (s)	3	2,02	50,7
N414D/F415E/V416T (I)	3	2,03	0,4
N414M/F415E/V416A (I)	3	1,09	–
I427T/L446M/E475T (s)	3	0,56	12,2

Legende:

	Sehr gut beladen (> = 50 %)
	Gut beladen (> = 30 %)
	Moderat beladen (> = 10 %)
	Schlecht beladen (< 10 %)
	Funktionslos (-)

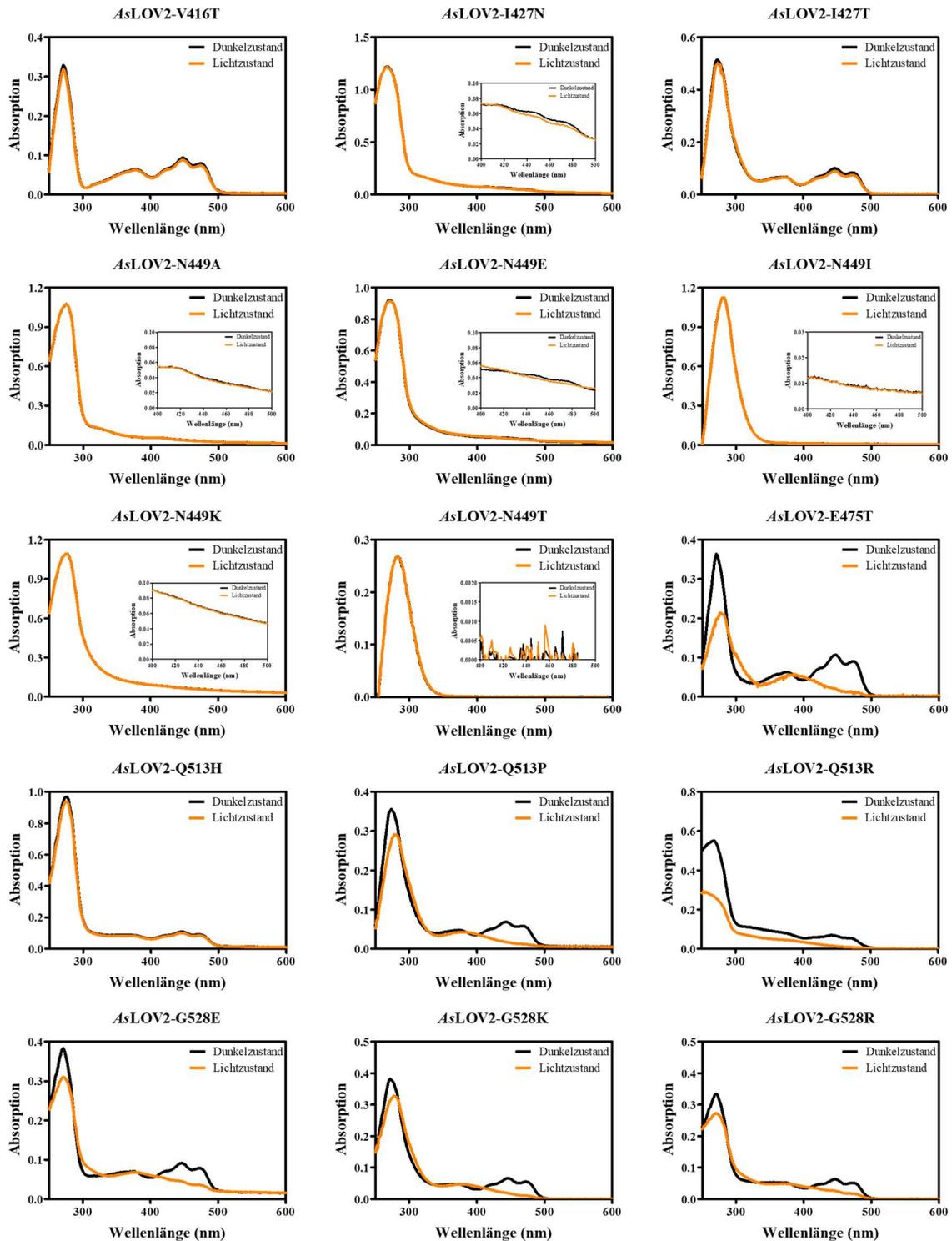


Abbildung 50: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der ersten Runde ausgewählter schneller *AsLOV2*-Einzelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda=440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Insets zeigen den Spektralbereich zwischen 400-500 nm in Vergrößerung.

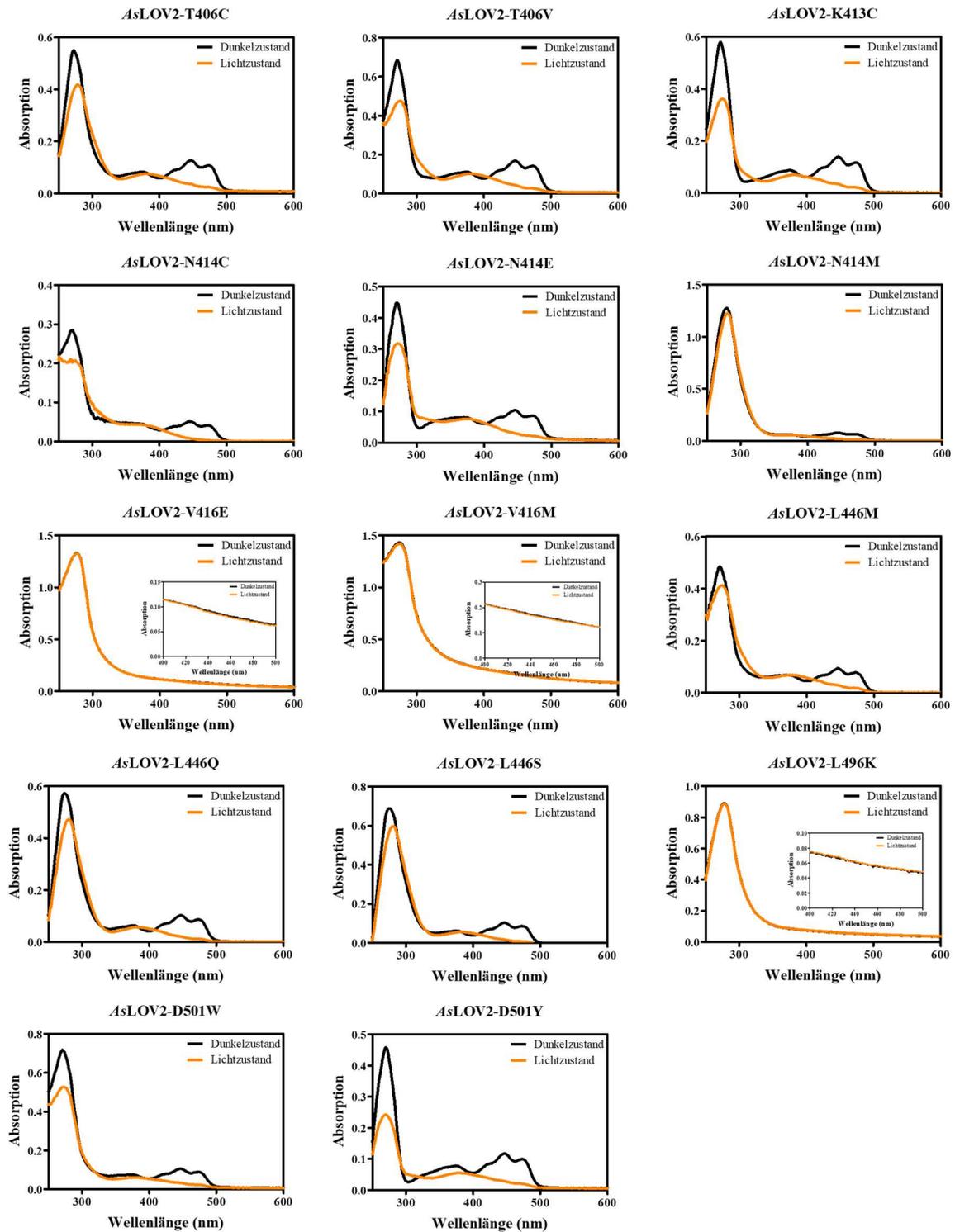


Abbildung 51: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der ersten Runde ausgewählter langsamer *AsLOV2*-Einzelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda=440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Insetts zeigen den Spektralbereich zwischen 400-500 nm in Vergrößerung.

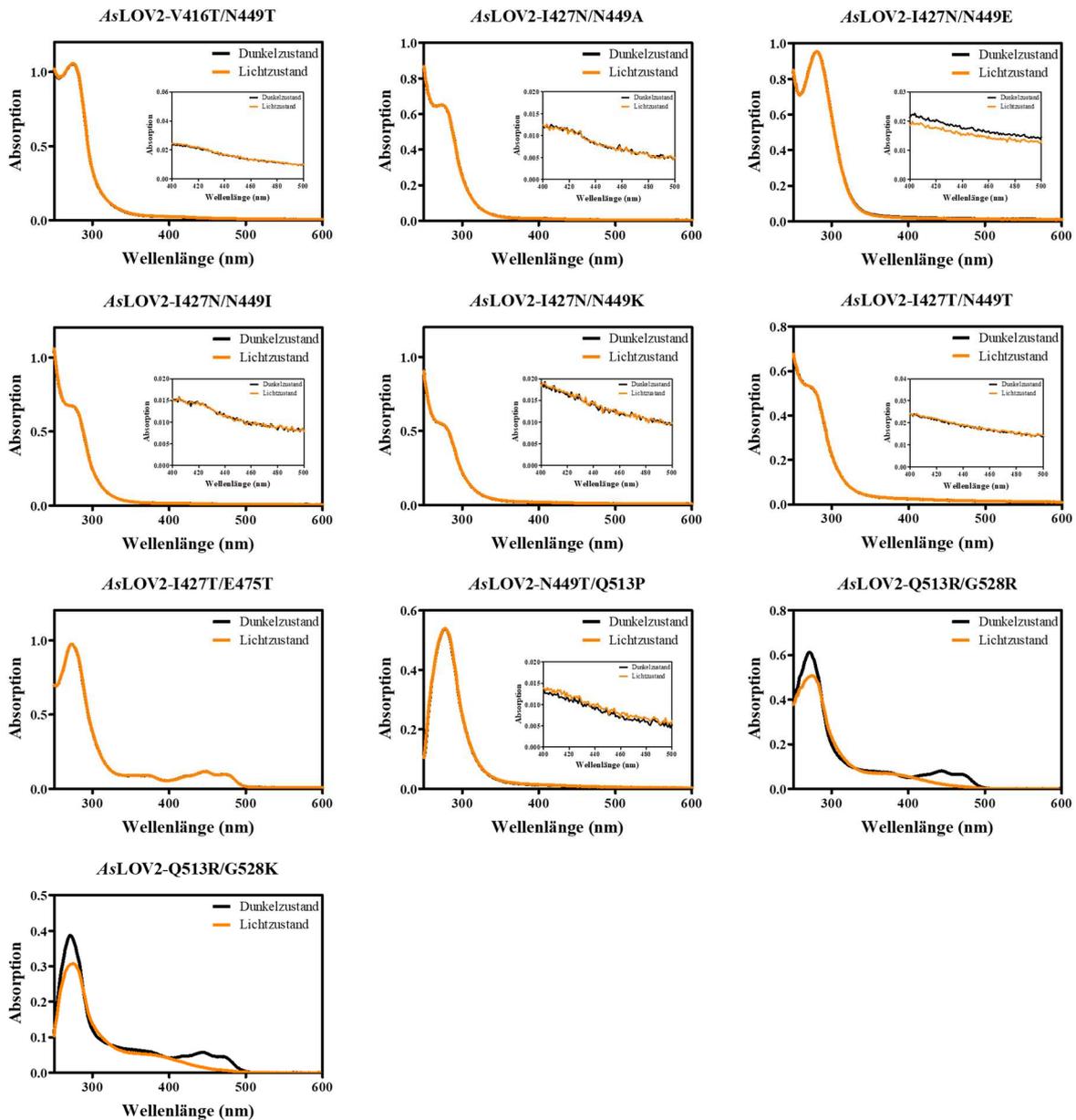


Abbildung 52: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der ersten Runde vorhergesagter schneller *AsLOV2*-Doppelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda=440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Insets zeigen den Spektralbereich zwischen 400-500 nm in Vergrößerung.

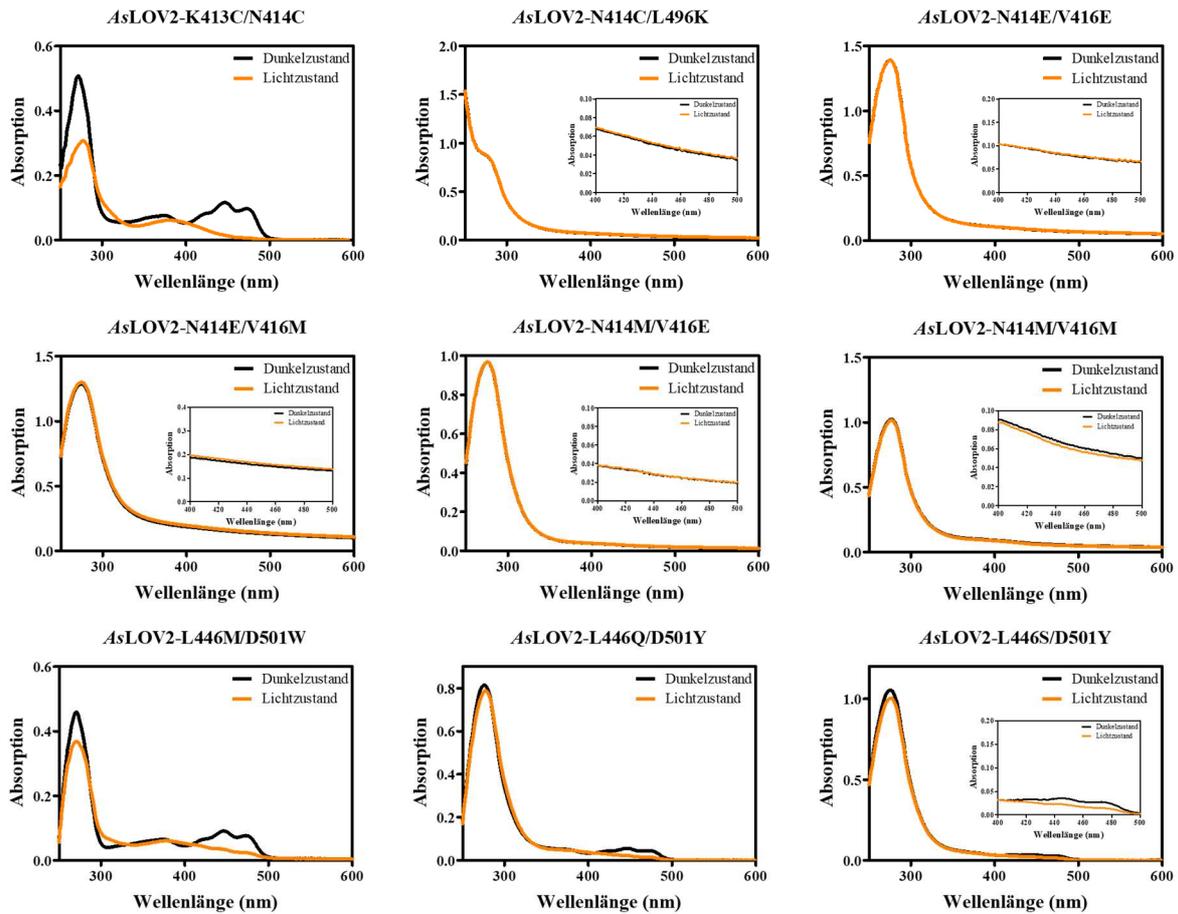


Abbildung 53: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der ersten Runde vorhergesagter langsamer AsLOV2-Doppelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda=440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Insets zeigen den Spektralbereich zwischen 400-500 nm in Vergrößerung.

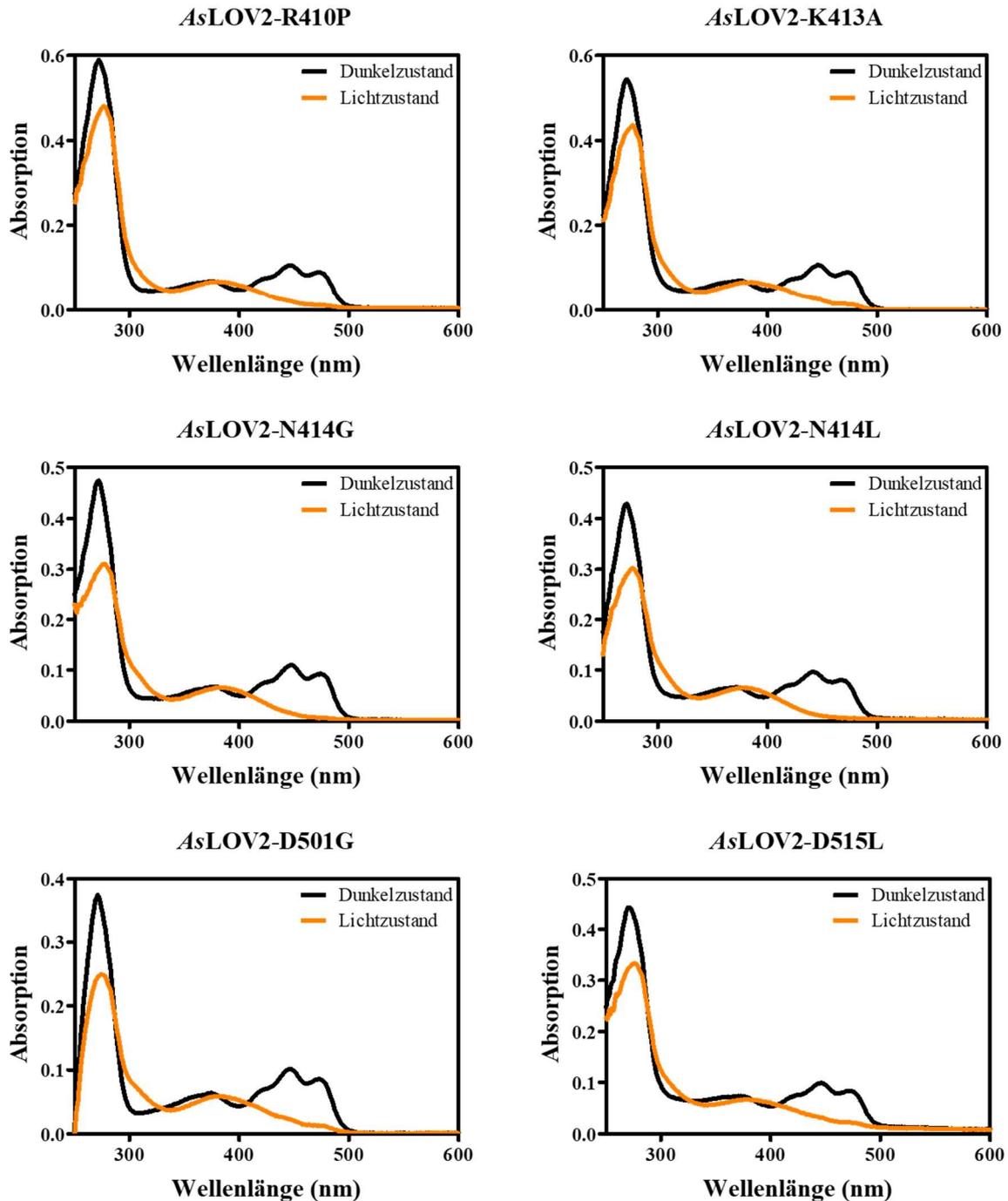


Abbildung 54: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der zweiten Runde ausgewählter schneller und langsamer AsLOV2-Einzelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

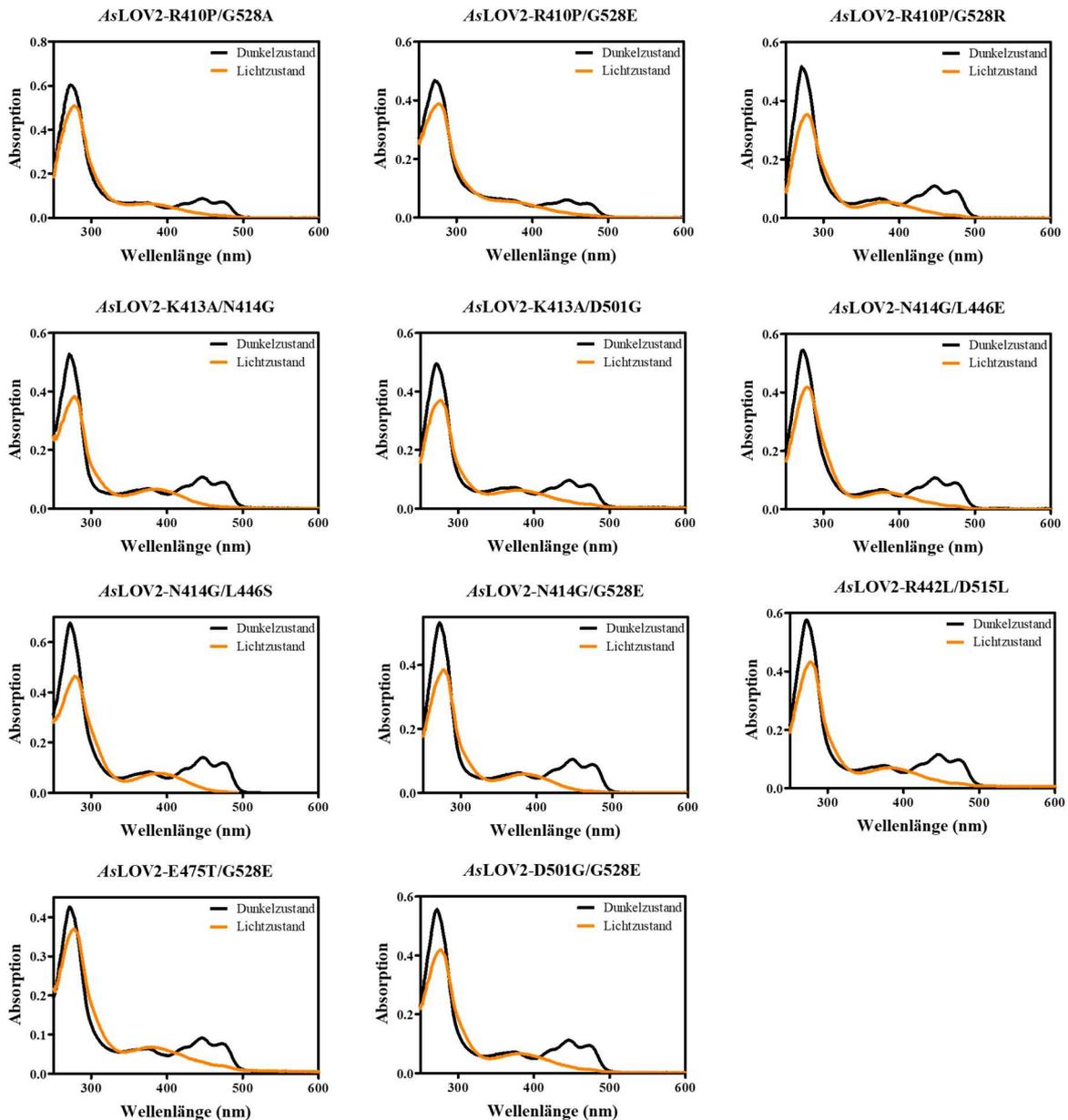


Abbildung 55: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der zweiten Runde vorhergesagter schneller *AsLOV2*-Doppelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

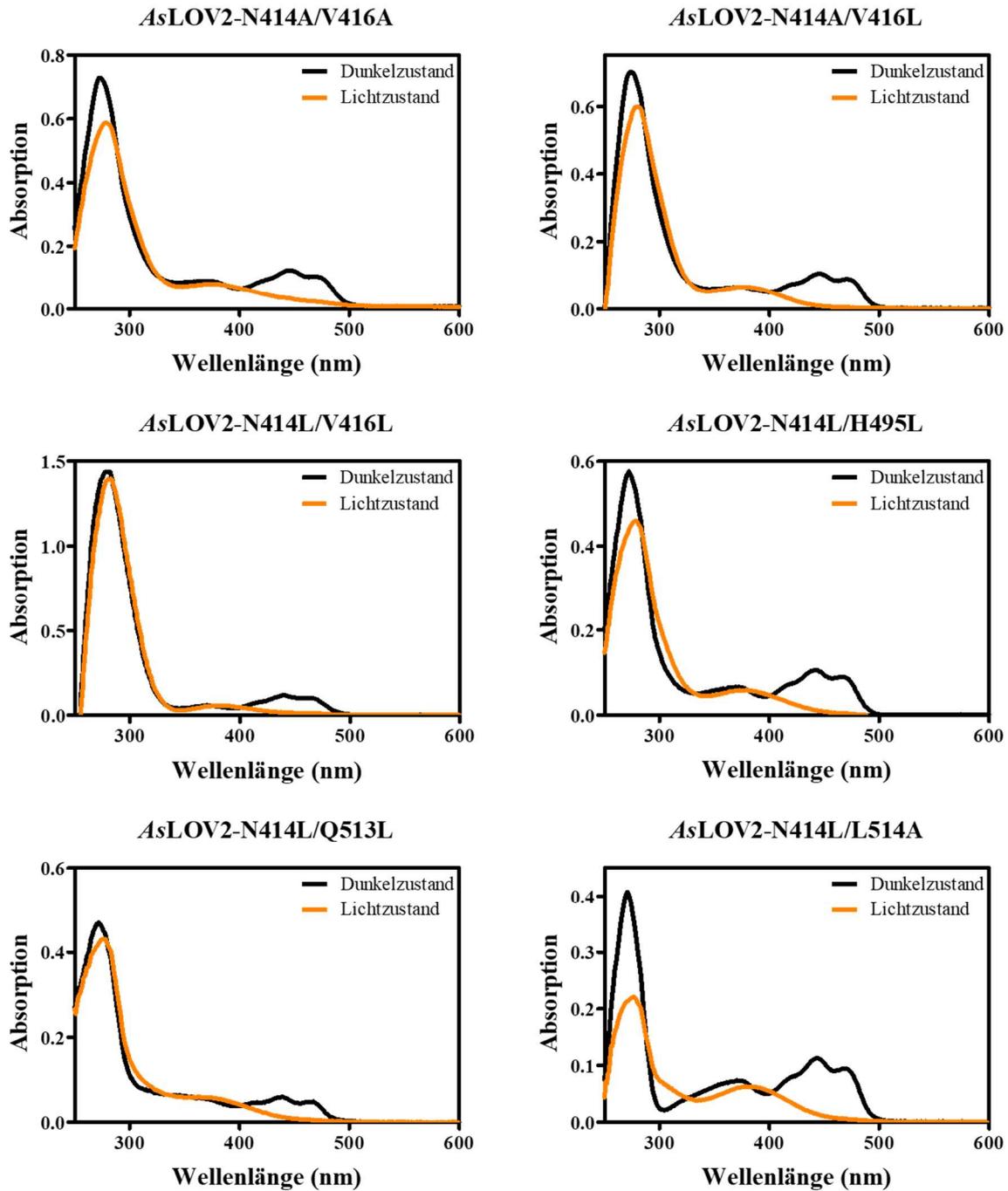


Abbildung 56: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der zweiten Runde vorhergesagter langsamer AsLOV2-Doppelvarianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

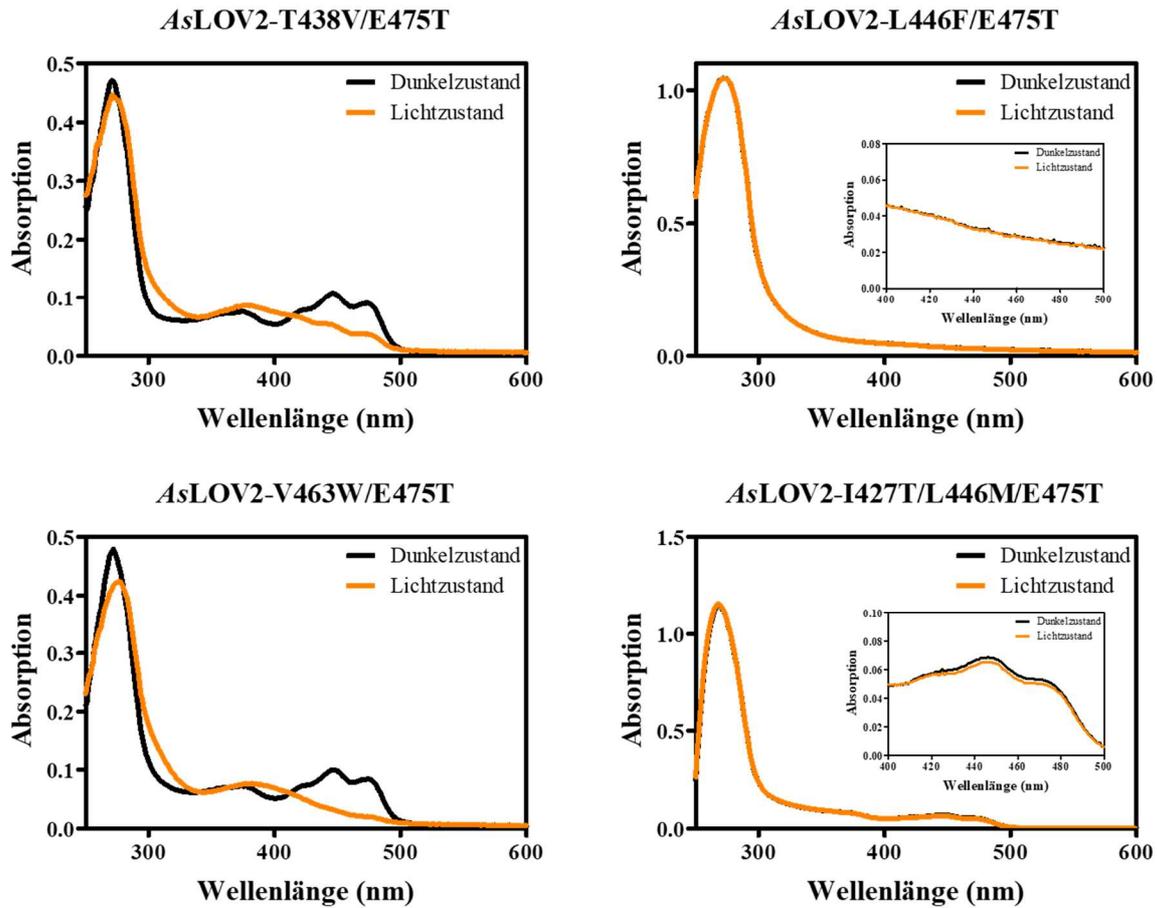


Abbildung 57: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der dritten Runde vorhergesagter schneller *AsLOV2*-Varianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Da einigen Proben aggregieren sollen die eingefügten Insets den Bereich zwischen 400-500 nm für eine genauere Analyse anzeigen.

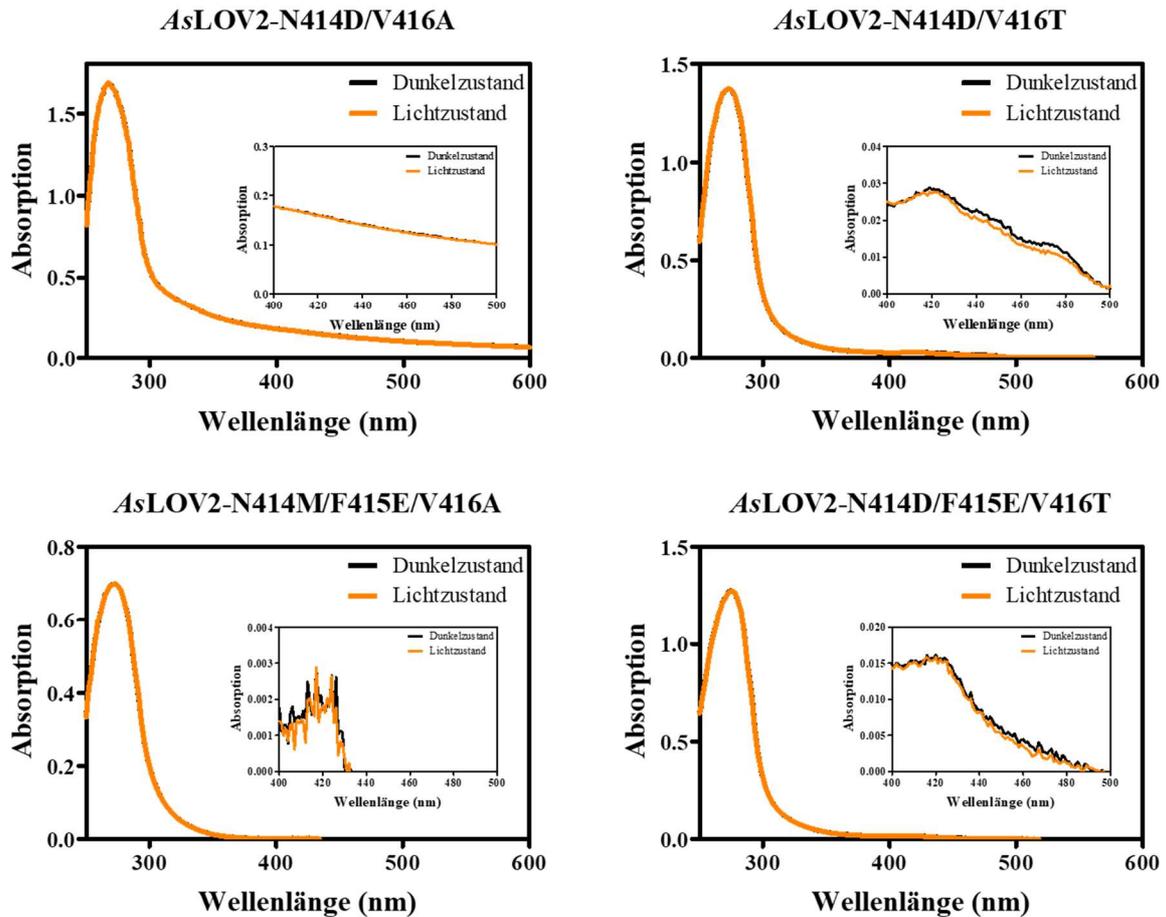


Abbildung 58: Absorptionsspektren der Dunkel- und Lichtzustände der dritten Runde vorhergesagter langsamer *AsLOV2*-Varianten. Alle Proben wurden mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) auf eine $OD_{450\text{ nm}}$ von etwa 0,1 verdünnt und das Dunkelzustandsspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie). Anschließend wurden die Proben 1 min lang mit einer Blaulicht-LED ($\lambda = 440\text{ nm}$, $2,6\text{ mW cm}^{-2}$, Luxeon Lumileds, Philips; Aachen, Deutschland) beleuchtet und das Spektrum des Lichtzustands aufgenommen (orange Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Insets zeigen den Spektralbereich zwischen 400-500 nm in Vergrößerung.

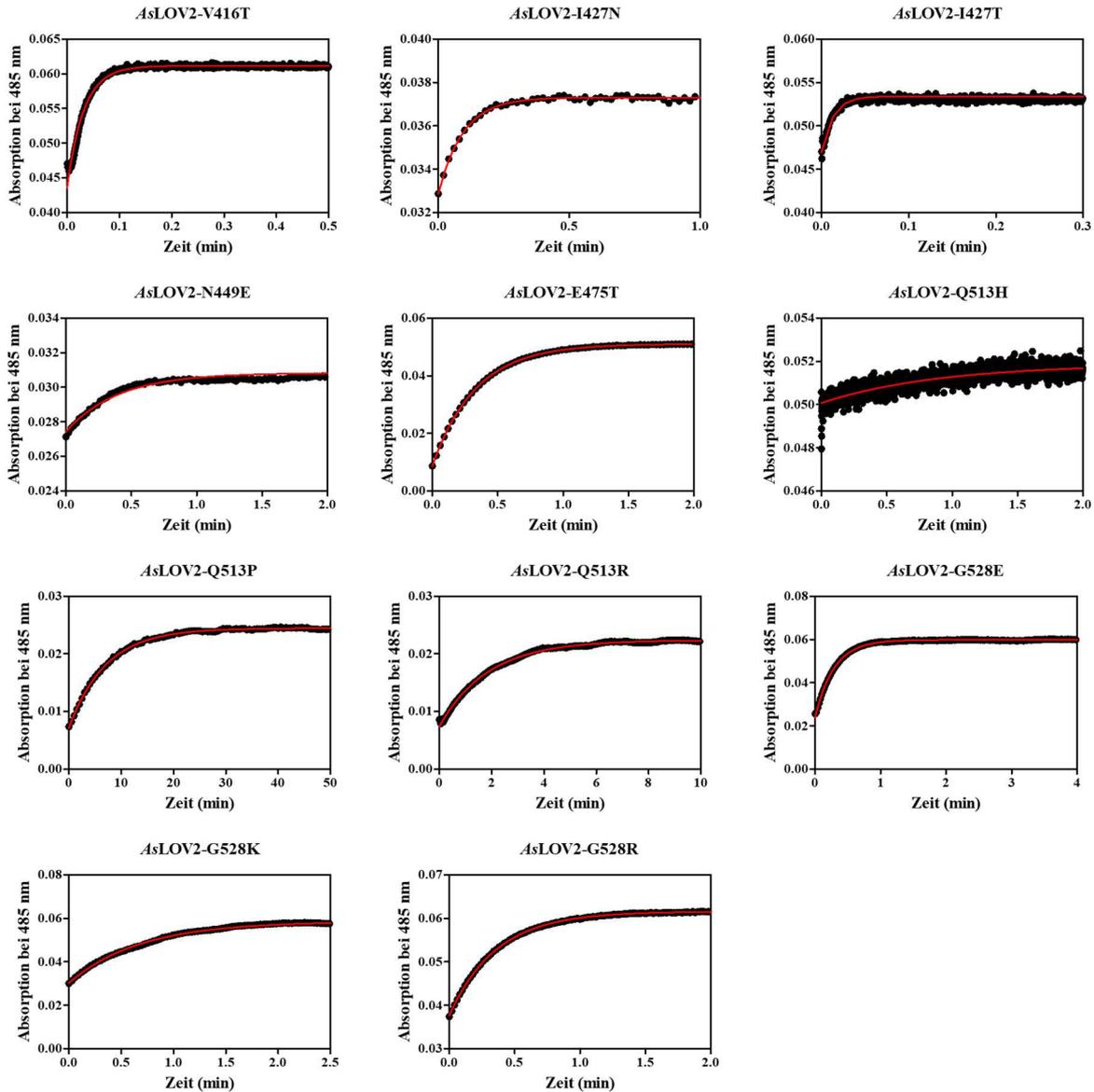


Abbildung 59: Dunkelrückkehrkinetik der AsLOV2-Varianten aus der ersten Runde ausgewählter schneller Einzelvarianten. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

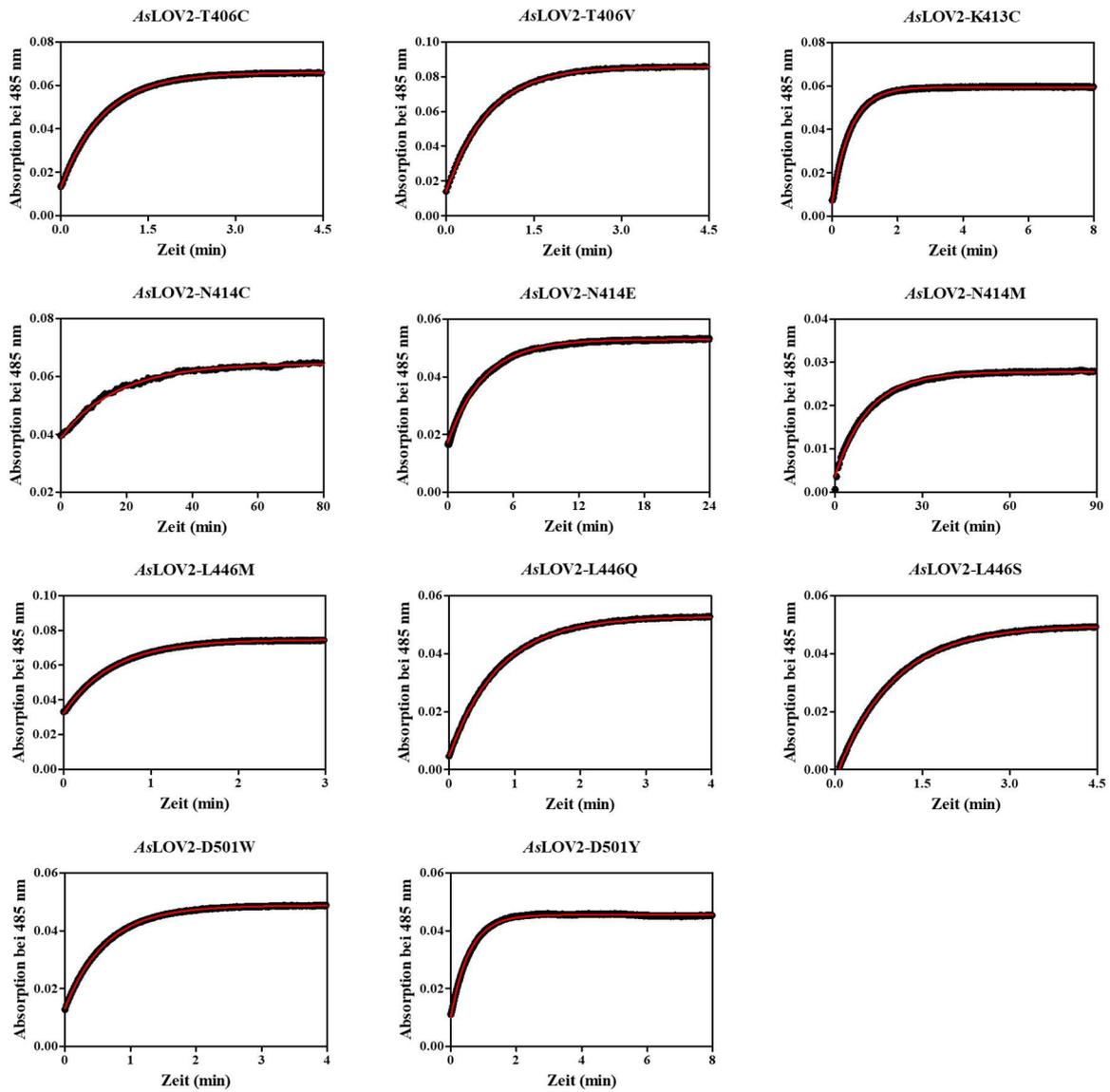


Abbildung 60: Dunkelrückkehrkinetik ausgewählter langsamer *AsLOV2*-Einzelvarianten der ersten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

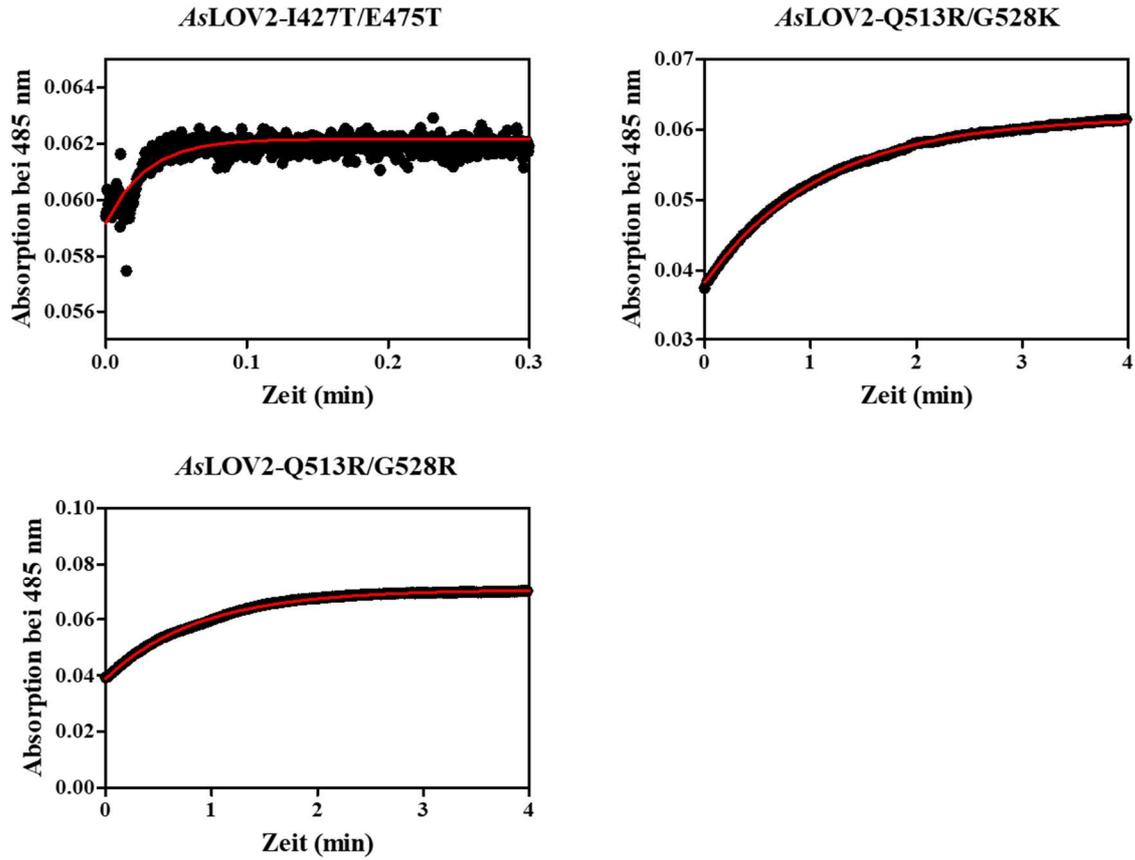


Abbildung 61: Dunkelrückkehrkinetik vorhergesagter schneller *AsLOV2*-Doppelvarianten der ersten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt

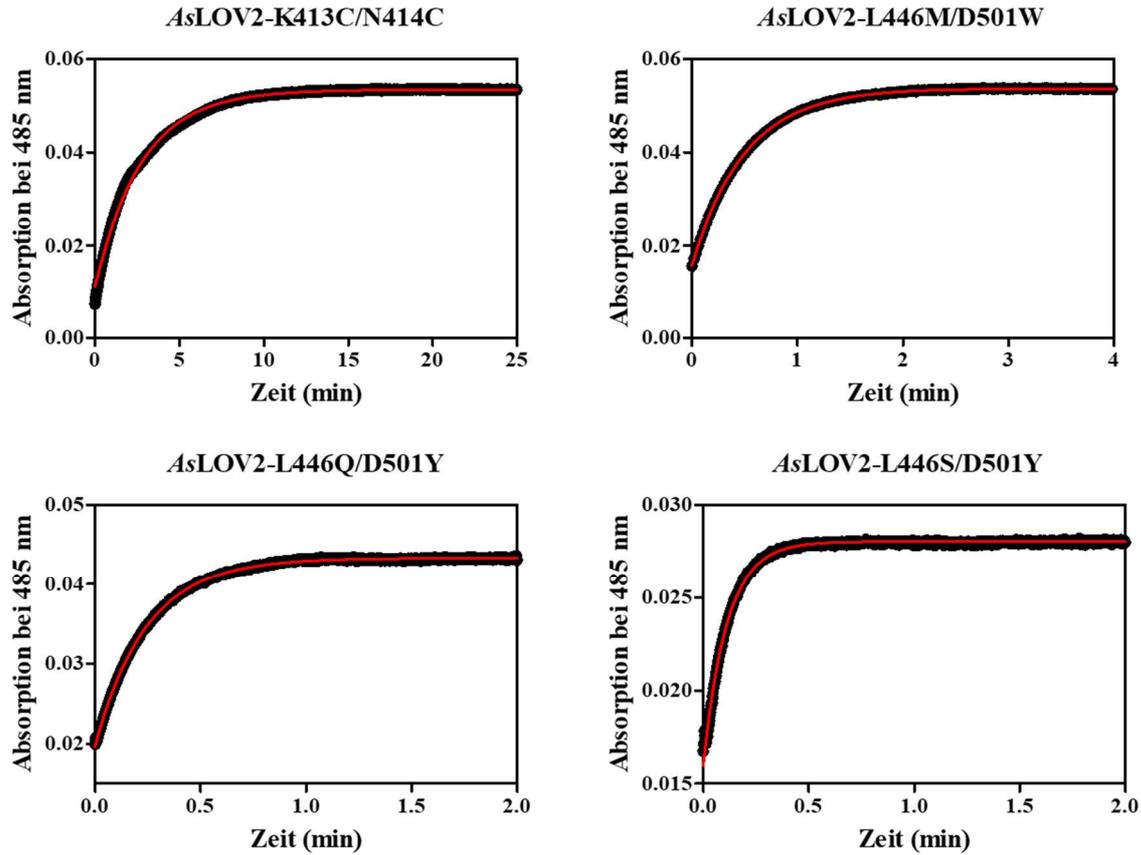


Abbildung 62: Dunkelrückkehrkinetik vorhergesagter langsamer *AsLOV2*-Doppelvarianten der ersten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

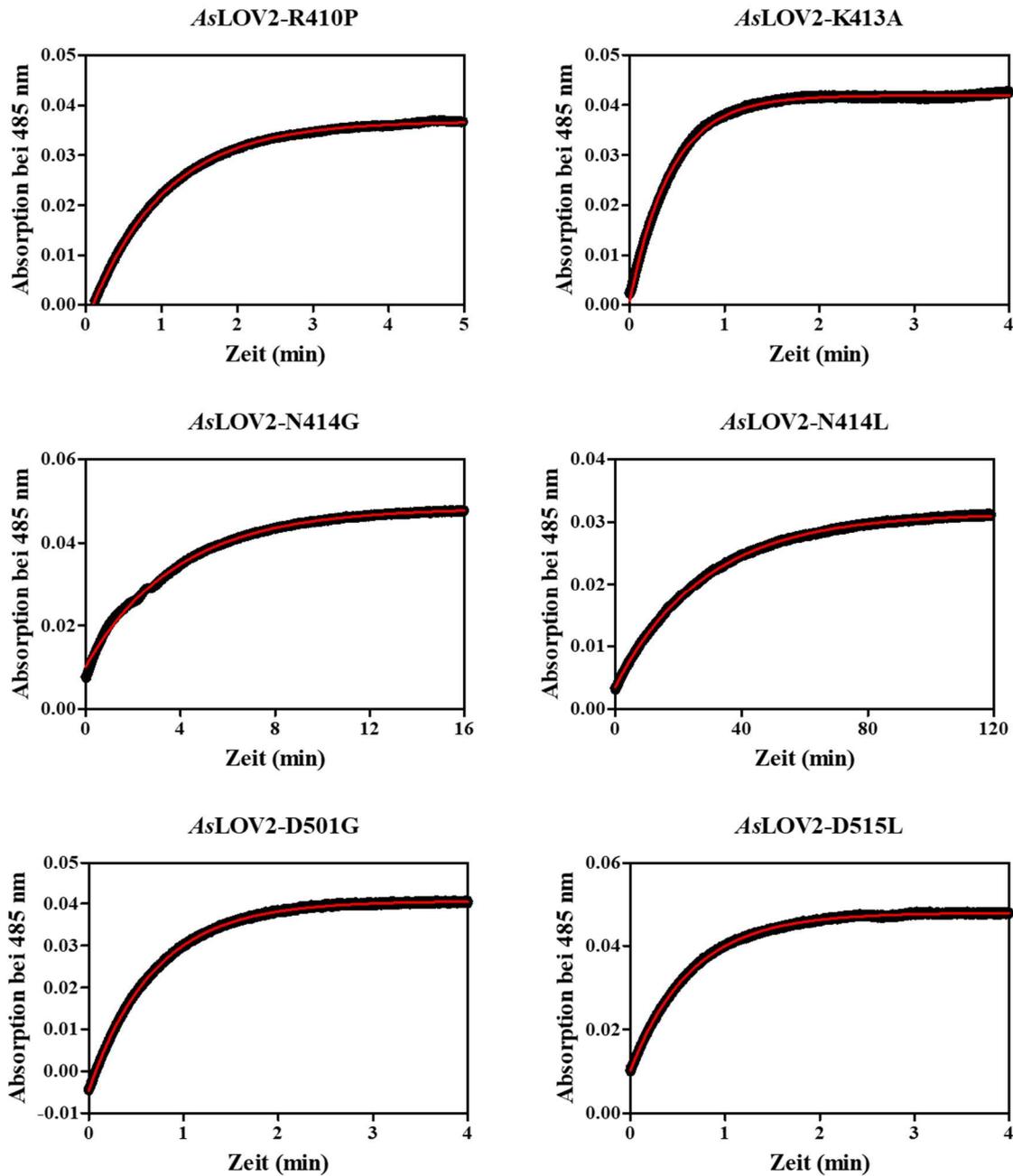


Abbildung 63: Dunkelrückkehrkinetik ausgewählter schneller und langsamer AsLOV2-Einzelvarianten der zweiten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

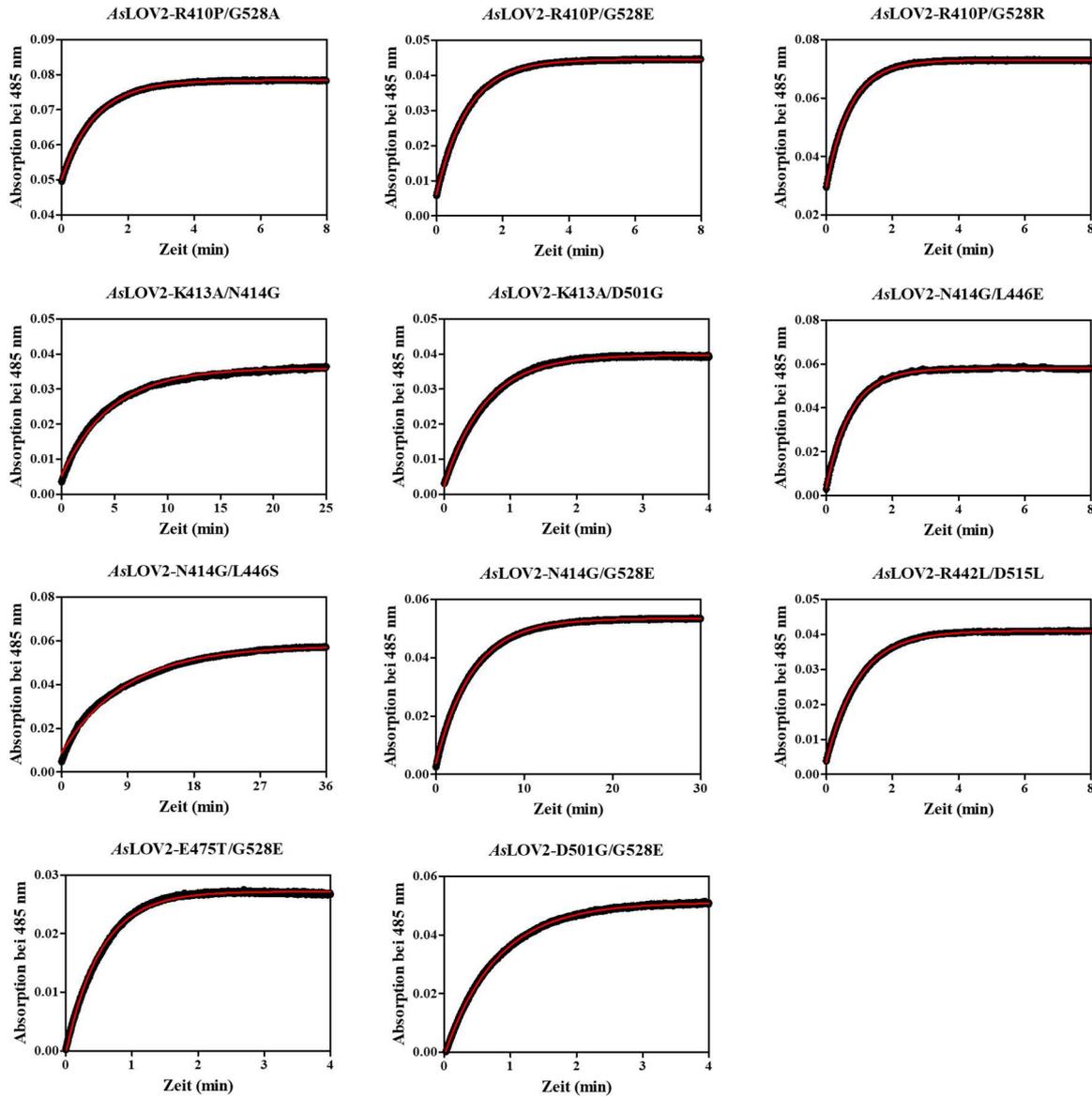


Abbildung 64: Dunkelrückkehrkinetik vorhergesagter schneller AsLOV2-Doppelvarianten der zweiten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

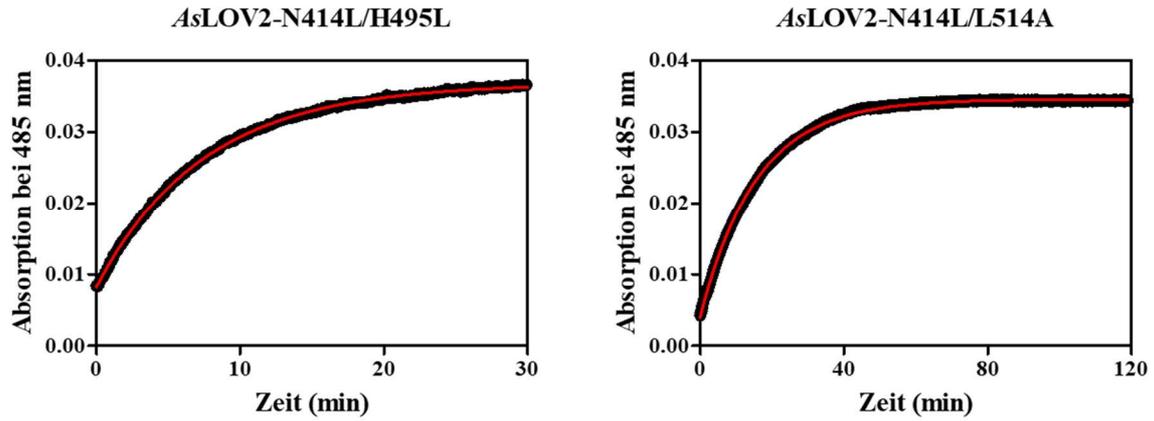


Abbildung 65: Dunkelrückkehrkinetik vorhergesagter langsamer AsLOV2-Doppelvarianten der zweiten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

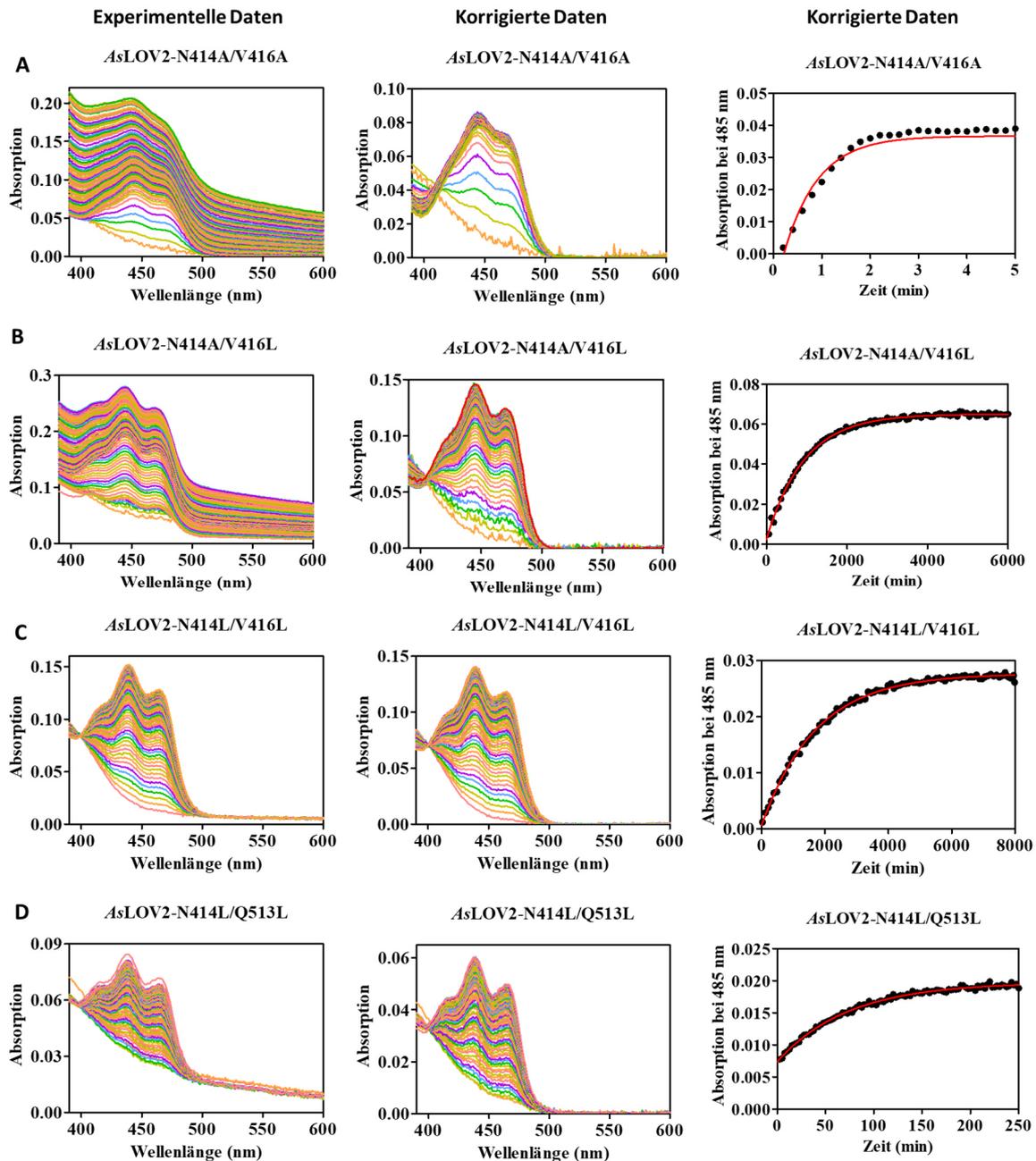


Abbildung 66: Bestimmung der Dunklrückkehrkinetik vorhergesagter langsamer AsLOV2-Doppelvarianten der zweiten Vorhersagerunde über sequentielle UV/Vis-Spektren. Abgebildet sind Absorptionsspektren der jeweiligen Proteinprobe, die während der Dunklrückkehr (2.2.5.3.2) des Proteins nach der Beleuchtung aufgenommen wurden. Für jedes Protein sind die unkorrigierten, experimentellen (links) und die streukorrigierten (mitte) UV/Vis-Spektren dargestellt. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde aus den streukorrigierten Spektren extrahiert und gegen die Zeit aufgetragen (rechts). Abgebildet ist nur eine exemplarische Kurve der Dunklrückkehr aus einem Satz von Dreifachmessungen. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) ermittelt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

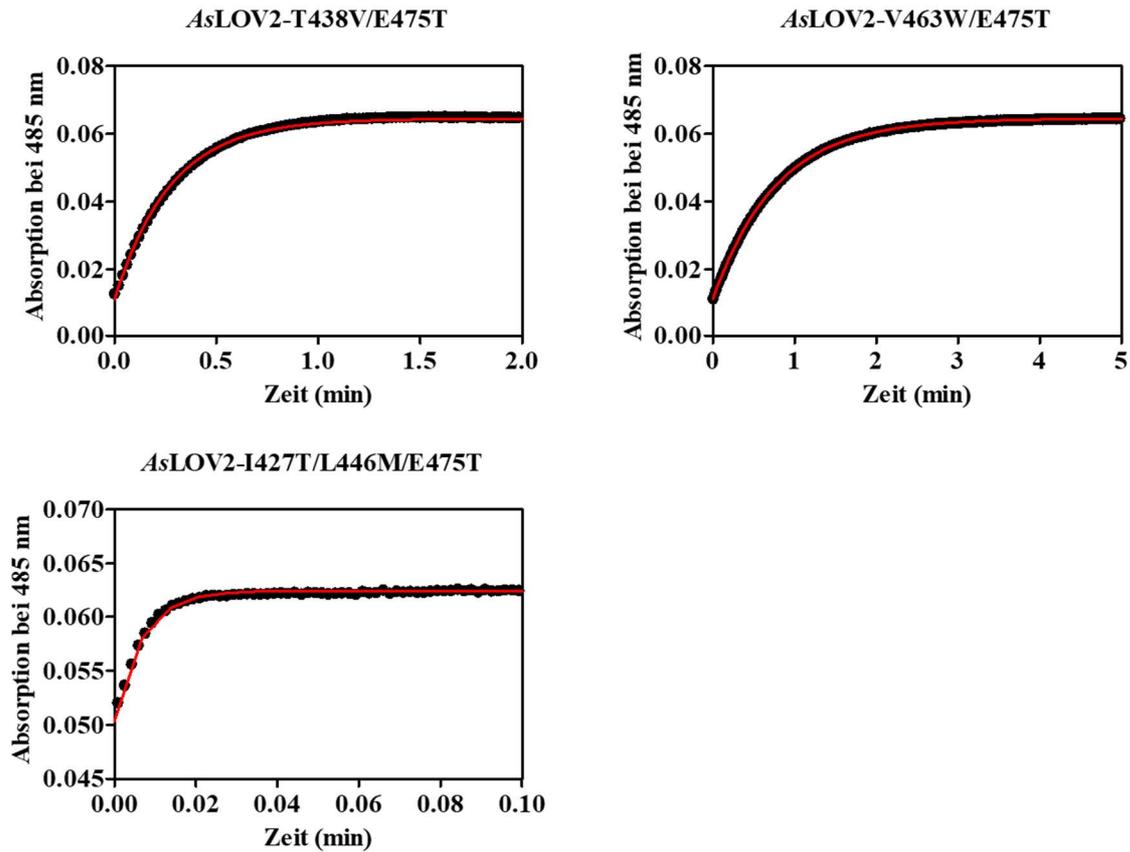


Abbildung 67: Dunkelrückkehrkinetik vorhergesagter schneller *AsLOV2*-Doppel- und Dreifachvarianten der dritten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

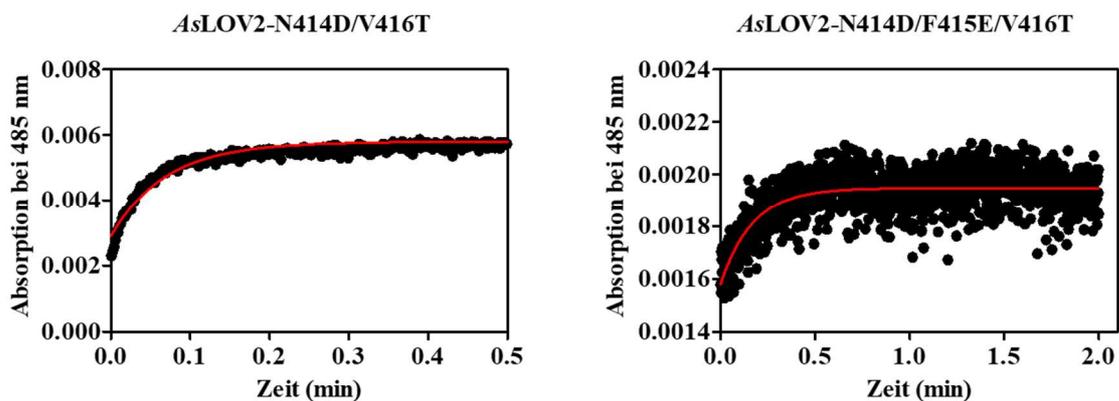


Abbildung 68: Dunkelrückkehrkinetik vorhergesagter langsamer *AsLOV2*-Doppel- und Dreifachvarianten der dritten Vorhersagerunde. Die Absorption bei $\lambda=485$ nm wurde gegen die Zeit aufgetragen. Es ist nur eine exemplarische Dunkelrückkehrmessung (2.2.5.3.1) aus einem Satz von Dreifachmessungen gezeigt. Die Lebensdauer des Adduktzustandes τ_{rec} wurde durch Anpassung der experimentellen Daten (schwarze Kreise) an eine einfache Exponentialfunktion (rote Linie) bestimmt. Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

Tabelle 26: Übersichtstabelle der experimentellen Validierung der Dunkelrückkehrmessungen. Dargestellt sind die *AsLOV2*-Varianten, die Auswahl-/Vorhersagerunde mit der Einschätzung für schneller oder langsamer, die Dunkelrückkehrkinetik (τ_{rec} (s)) und das Ergebnis der Auswahl-/Vorhersagerunde. Die Kinetikwerte τ_{rec} wurden als Mittelwerte aus technischen Triplikaten wiedergegeben, wobei der Fehler die Standardabweichung des Mittelwertes darstellt. Eine ausgewählte Variante wurde als schneller/langsamer als der *AsLOV2*-Wildtyp betrachtet, wenn ihre Adduktlebensdauer mindestens zwei Standardabweichungen schneller (< 34 s) oder langsamer (> 53 s) als die des Wildtyps (WT) ist. Wie WT: Die ausgewählte Variante ist wie WT (34 - 52 s). (A): Neigt zur Aggregation.

<i>AsLOV2</i> -Variante	Runde	Auswahl-/Vorhersagerunde	τ_{rec} (s)	Stimmt Auswahl-/Vorhersagerunde?
Wildtypisch	0	—	43 ± 4,5	—
T406C*	1	langsam	455 ± 1	Ja
T406V*	1	langsam	43 ± 0	Nein
K413C*	1	langsam	35 ± 3	Nein
N414C* (A)	1	langsam	961 ± 80	Ja
N414E*	1	langsam	207 ± 9	Ja
N414M*	1	langsam	695 ± 9	Ja
V416T*	1	schnell	2 ± 0	Ja
I427N*	1	schnell	7 ± 1	Ja
I427T*	1	schnell	1 ± 0	Ja
L446M*	1	langsam	36 ± 1	Nein
L446Q*	1	langsam	46 ± 0	Nein
L446S*	1	langsam	59 ± 0	Ja
N449E*	1	schnell	25 ± 2	Ja
E475T*	1	schnell	33 ± 1	Ja
D501W*	1	langsam	37 ± 0	Nein
D501Y*	1	langsam	36 ± 2	Nein
Q513H*	1	schnell	47 ± 9	Nein
Q513P*	1	schnell	420 ± 7	Nein
Q513R* (A)	1	schnell	85 ± 21	Nein
G528E*	1	schnell	18 ± 1	Ja
G528K*	1	schnell	40 ± 1	Nein
G528R*	1	schnell	21 ± 0	Ja
K413C/N414C	1	langsam	173 ± 7	Ja
I427T/E475T	1	schnell	2 ± 0	Ja
L446M/D501W	1	langsam	30 ± 1	Nein
L446Q/D501Y	1	langsam	14 ± 0	Nein
L446S/D501Y	1	langsam	7 ± 1	Nein
Q513R/G528R (A)	1	schnell	60 ± 5	Nein
Q513R/G528K (A)	1	schnell	54 ± 11	Nein
R410P*	2	schnell	58 ± 2	Nein
K413A*	2	schnell	28 ± 1	Ja
N414G*	2	schnell	211 ± 14	Nein
N414L*	2	langsam	1.641 ± 46	Ja
D501G*	2	schnell	41 ± 0	Nein
D515L*	2	schnell	39 ± 3	Nein

AsLOV2-Variante	Runde	Auswahl-/ Vorhersagerunde	τ_{rec} (s)	Stimmt Auswahl-/ Vorhersagerunde?
N414A/V416A	2	langsam	42 ± 2	Nein
N414A/V416L	2	langsam	59.764 ± 7.190	Ja
N414L/V416L (A)	2	langsam	> 103.020	Ja
N414L/H495L	2	langsam	416 ± 43	Ja
N414L/Q513L (A)	2	langsam	4.507 ± 136	Ja
N414L/L514A	2	langsam	1.032 ± 91	Ja
R410P/G528A	2	schnell	60 ± 1	Nein
R410P/G528E	2	schnell	58 ± 1	Nein
R410P/G528R	2	schnell	44 ± 0	Nein
K413A/N414G	2	schnell	265 ± 34	Nein
K413A/D501G	2	schnell	39 ± 3	Nein
N414G/L446E	2	schnell	45 ± 1	Nein
N414G/L446S	2	schnell	520 ± 26	Nein
N414G/G528E	2	schnell	243 ± 5	Nein
R442L/D515L	2	schnell	61 ± 2	Nein
E475T/G528E	2	schnell	32 ± 1	Ja
D501G/G528E	2	schnell	46 ± 1	Nein
N414D/V416T	3	langsam	4 ± 0	Nein
T438V/E475T	3	schnell	17 ± 1	Ja
V463W/E475T	3	schnell	46 ± 1	Nein
N414D/F415E/V416T	3	langsam	33 ± 9	Nein
I427T/L446M/E475T	3	schnell	0,4 ± 0	Ja

Legende:

	Ausgewählte/Vorhergesagte Variante ist mind. zwei Standardabweichungen schneller (< 34 s) oder langsamer (> 52 s) als die Wildtyp Variante.
	Auswahl/Vorhersage ist wie Wildtyp (34-52 s).
	Auswahl/Vorhersage ist falsch.

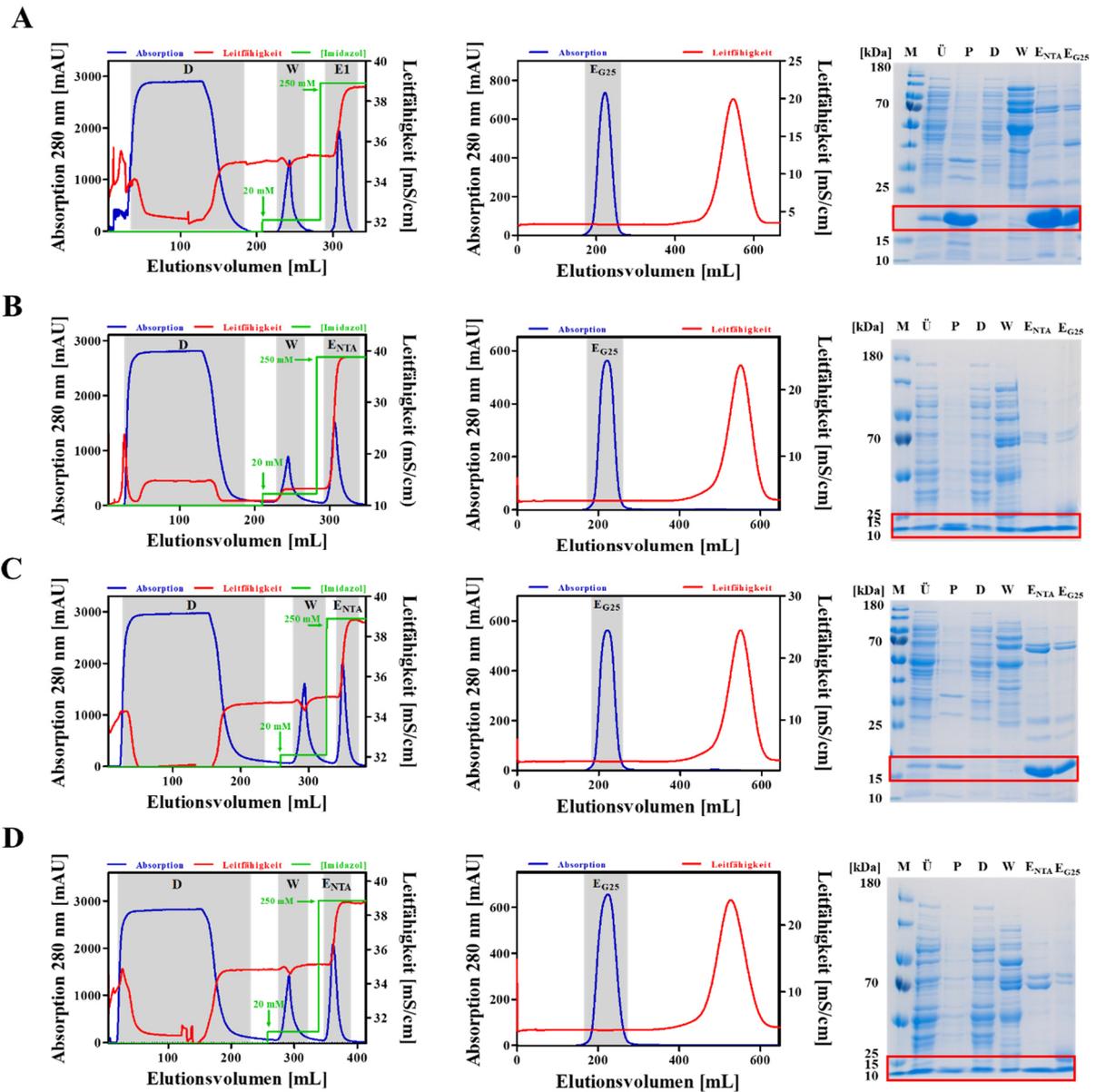


Abbildung 69: Reinigungschromatogramme und SDS-PAGE Analysen von *Ds*LOV-M49S (A) und -C72S (B) sowie *As*LOV2-V416T (C) und C450S (D). Dargestellt sind jeweils links: die IMAC Reinigungschromatogramme der jeweiligen Proteinvarianten (2.2.3.3.2). Durch eine online Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Proteinelution verfolgt (blaue Linie). Die Leitfähigkeit ist als rote Linie dargestellt. Die grüne Linie kennzeichnet die Imidazolkonzentration. Die grau unterlegten Balken zeigen die Durchlaufphase (D), Waschphase (W) und Eluatphase (E_{NTA}) an. Mitte: Chromatogramme des Entsalzungsschritts/Pufferwechsels mittels Größenausschlusschromatographie (2.2.3.5.2). Durch eine online Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Proteinelution verfolgt (blaue Linie). Die Leitfähigkeit ist als rote Linie dargestellt. Auf der rechten Seite sind die dazugehörigen SDS-PAGE Analysen (2.2.4.2) aller Reinigungsschritte und des Pufferwechsels gezeigt. Von links nach rechts wurden die Proben hier wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraktion nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraktion und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschphase (W), Eluatprobe nach Reinigung (E_{NTA}), Eluatprobe nach Entsalzung und Pufferwechsel (E_{G25}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraktion (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte von *Ds*LOV-M49S (A), -C72S (B), *As*LOV2-V416T (C) und -C450S (D) betragen 16.793, 16.823, 18.794 und 18.776 Da.

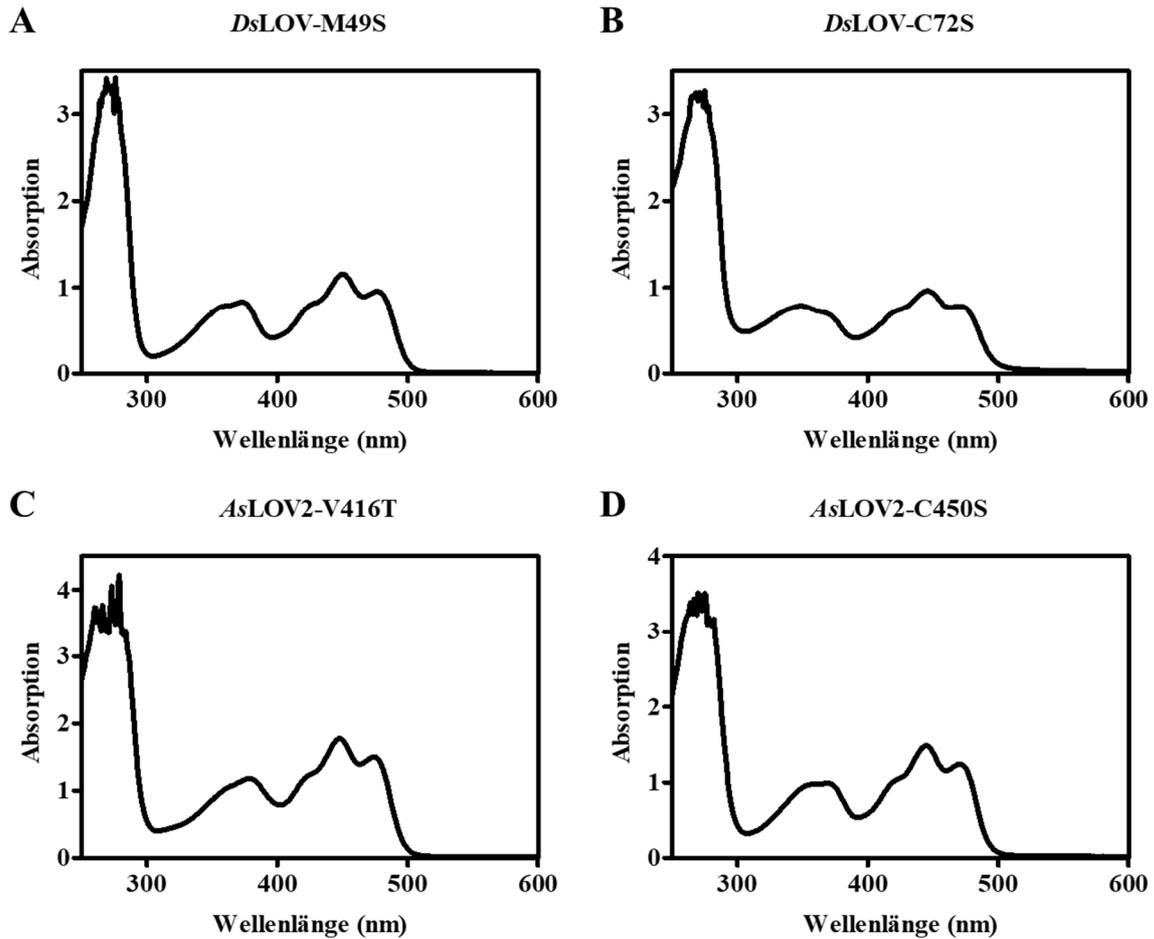


Abbildung 70: Absorptionsspektren der Dunkelzustände von *DsLOV-M49S* (A) und *-C72S* (B) sowie *AsLOV2-V416T* (C) und *-C450S* (D). Alle Proben wurden unverdünnt mit Lagerpuffer A (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT; pH-Wert 8,0) in einem 2 mm Lichtweg gemessen und das Dunkelspektrum wurde aufgezeichnet (schwarze Linie) (2.2.5.1). Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt.

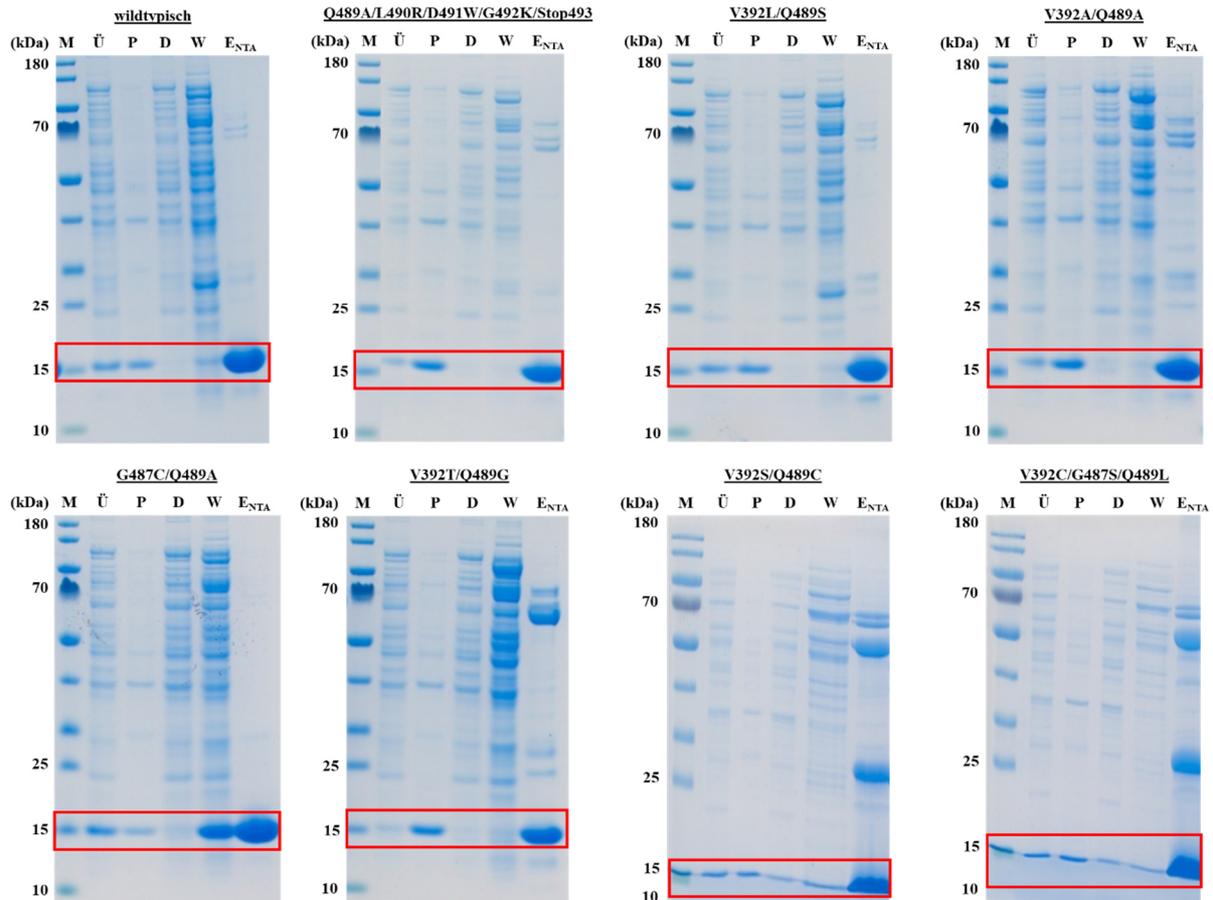


Abbildung 71: SDS-PAGE Analyse der Reinigungsschritte aller iLOV-Varianten. Alle Proteine wurde mittels IMAC an einer selbstgepackten Tropfsäule (2.2.3.3.1) gereinigt, von jedem Reinigungsschritt wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (2.2.4.2). Von links nach rechts wurden die Proben wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraktion nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraktion und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraktion (W), Eluatprobe (E_{NTA}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraktion (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Die theoretischen Molekulargewichte sind in Tabelle 7 gelistet.

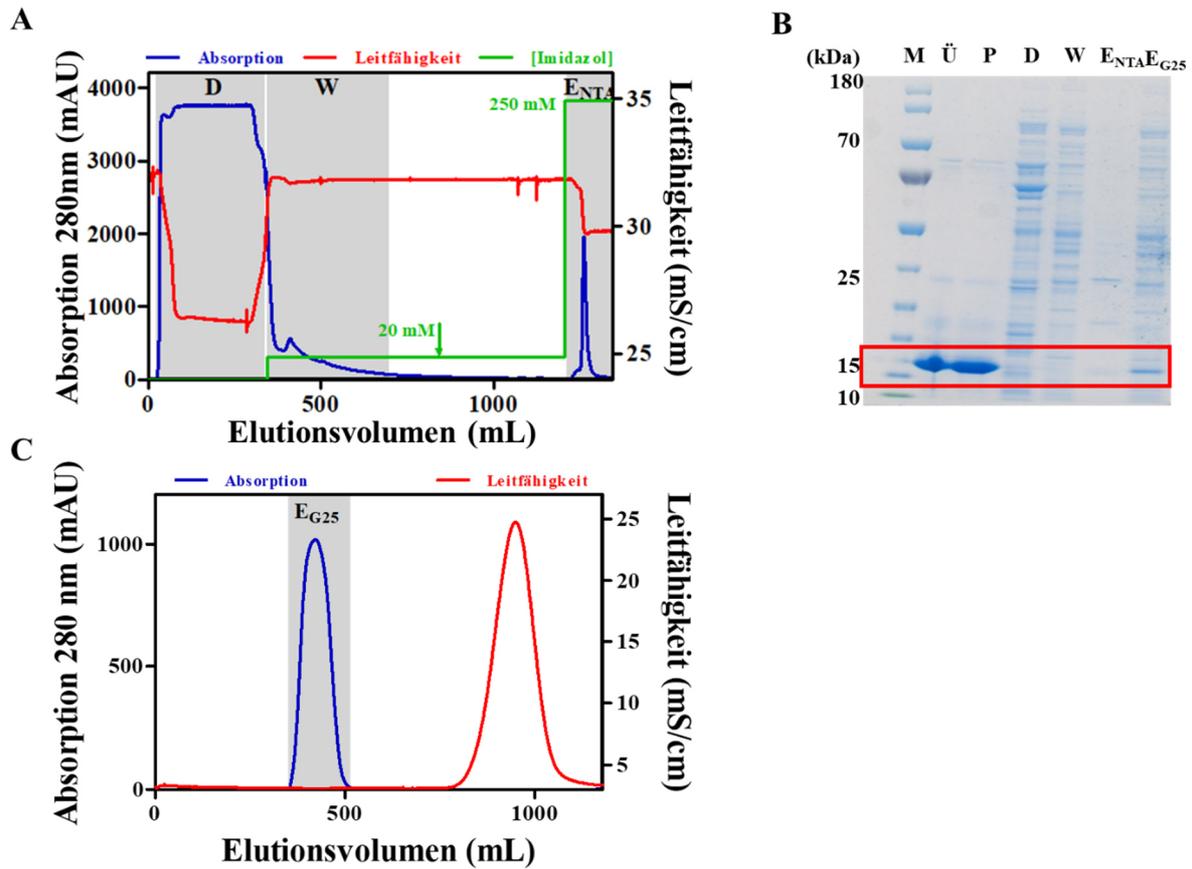


Abbildung 72: Reinigungschromatogramme (A und CB) und SDS-PAGE Analyse (C) von *PpSB1-LOV*. Die Reinigung erfolgte mittels IMAC (A) unter Verwendung des Säulenmaterials Ni-NTA Superflow (2.2.3.3.2). Durch eine online Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Proteinelution verfolgt (blaue Linie). Die Leitfähigkeit ist als rote Linie dargestellt. Die grüne Linie kennzeichnet die Imidazolkonzentration. Die grau unterlegten Balken zeigen die Durchlaufraktion (D), Waschfraktion (W) und Eluat (E_{NTA}) an. (B) Chromatogramm des Entsalzungsschritts-/Pufferwechsels mittels Größenausschlusschromatographie (2.2.3.5.2). Durch eine online Messung der Absorption bei 280 nm wurde die Proteinelution verfolgt (blaue Linie). Die Leitfähigkeit ist als rote Linie gekennzeichnet. (C) SDS-PAGE Analyse (2.2.4.2) aller Reinigungsschritte und des Pufferwechsels. Von links nach rechts wurden die Proben hier wie folgt aufgetragen: Marker (M) (PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder, Tris-Glycine 12 %, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), lösliche Proteinfraction nach Zellaufschluss (Überstand; Ü), unlösliche Proteinfraction und Zelltrümmer (Pellet, P), Durchlauf (D), Waschfraktion (W), Eluatprobe nach Reinigung (E_{NTA}) sowie Eluatprobe nach Entsalzung und Pufferwechsel (E_{G25}). Es wurden 5 µL Marker und 10 µg der jeweiligen löslichen Proteinprobe aufgetragen. Die unlösliche Proteinfraction (P) wurde mit einem identischen Volumen wie die lösliche (Ü) aufgetragen. Der Bereich des zu erwartenden theoretischen Molekulargewichts ist mit einem roten Rechteck markiert. Das theoretische Molekulargewicht von *PpSB1-LOV* beträgt 18.588 Da.