

Expression von Holophytochrom in *Escherichia coli*

INAUGURALDISSERTATION

zur
Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
- Dr. rer. nat. -

des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften, FB 08
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Frank Thomas Landgraf

geboren am 30. April 1967 in Frankfurt am Main

Gießen 2003

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>II</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>III</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>1. Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Pflanzliche und prokaryotische Phytochrome	2
1.2 Biosynthese von Tetrapyrrolen	10
1.3 Chaperone und Proteinfaltung	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit	20
<i>2. Material und Methoden</i>	<i>22</i>
2.1 Materialien	22
2.2 Methoden	24
<i>3. Ergebnisse</i>	<i>29</i>
3.1 Expression von Holophytochrom in <i>Escherichia coli</i>	29
3.2 Einfluss von Chaperonen auf die Löslichkeit von Holo-Cph1	55
<i>4. Diskussion</i>	<i>63</i>
<i>5. Zusammenfassung</i>	<i>78</i>
<i>6. Literaturverzeichnis</i>	<i>79</i>
<i>7. Anhang</i>	<i>95</i>
7.1 Proteine	95
7.2 Plasmide	95
7.3 Geräte und Gebrauchsmaterialien	96
7.4 Plasmidkarten	97
<i>Danksagung</i>	<i>115</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.01	Photoreversibilität von Phytochrom	1
Abb. 1.02	Aufbau von <i>A.thaliana</i> Phytochrom B	6
Abb. 1.03	Aufbau von prokaryotischen und eukaryotischen Photorezeptoren	8
Abb. 1.04	Synthesewege von Phytochromobilin, Phycocyanobilin, Phycoerythro- bilin und Bilirubin aus Biliverdin-IX α	14
Abb. 3.01	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p6	29
Abb. 3.02	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p8	30
Abb. 3.03	SDS-PAGE von HO-1 und PcyA	31
Abb. 3.04	Plasmidkarte von pF10-His	31
Abb. 3.05	Co-Expression von pF10-His/p8	32
Abb. 3.06	Differenzspektrum von Holo-Cph1 (<i>in vitro</i> assembliert).....	33
Abb. 3.07	Gesamtproteinmuster von Apo-Cph1 bei 18°C induziert.....	34
Abb. 3.08	Apo-Cph1 bei diversen Temperaturen induziert	34
Abb. 3.09	Differenzspektrum von Cph1 bei 25°C und 30°C	35
Abb. 3.10	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p40	36
Abb. 3.11	SDS-PAGE von HO aus p40	36
Abb. 3.12	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p45	37
Abb. 3.13	Holophytochrom in <i>E.coli</i> (XL1-blue)	37
Abb. 3.14	SDS-PAGE und Zink-Fluoreszenz von Holo-Cph1	38
Abb. 3.15	Absorptionsspektren von <i>in vivo</i> assembliertem Holo-Cph1	38
Abb. 3.16	Differenzspektren von Holo-Cph1 mit diversen Chromophoren	39
Abb. 3.17	Differenzspektren von Holo-Cph1 aus pF10-His/p45	40
Abb. 3.18	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p70	41
Abb. 3.19	SDS-PAGE von HO aus p70	41
Abb. 3.20	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p66	42
Abb. 3.21	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p77	42
Abb. 3.22	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p58	43
Abb. 3.23	SDS-PAGE von Apo-Cph1 aus p58	43
Abb. 3.24	Absorptionsspektren von <i>in vivo</i> assembliertem Holo-Cph1	44
Abb. 3.25	SDS-PAGE von HO und PcyA aus <i>E.coli</i> (XL1-blue).....	45
Abb. 3.26	SDS-PAGE von HO und PcyA aus <i>E.coli</i> (TOP10F')	46
Abb. 3.27	Cph1, HO und PcyA aus <i>E.coli</i> (Tuner™ (DE3)pLacI).....	46
Abb. 3.28	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p98	47
Abb. 3.29	Sequenzbereich des Überganges von <i>ho</i> zu <i>pcyA</i> in p98.....	47
Abb. 3.30	SDS-PAGE des HO-PcyA Fusionsproteins aus p98	48
Abb. 3.31	Co-Expression von p58 und p77 bzw. p98 bei 18°C.....	48
Abb. 3.32	Spektren der gebildeten Pigmente aus p98 und p77	49

Abb. 3.33	Holo-Cph1 nach Zugabe von Pigmenten aus p77 bzw. p98.....	49
Abb. 3.34	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p83	50
Abb. 3.35	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p171	51
Abb. 3.36	SDS-PAGE von Cph1 Δ 2, HO und PcyA.....	51
Abb. 3.37	Absorptionsspektren von <i>in vivo</i> assembliertem Holo-Cph1 Δ 2.....	52
Abb. 3.38	RNAse-Behandlung und Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	53
Abb. 3.39	Absolute Spektren von <i>in vivo</i> assembliertem Holo-Cph1 Δ 2	53
Abb. 3.40	Ni-NTA-Affinitätschromatographie von Holo-Cph1 Δ 2.....	54
Abb. 3.41	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p71	55
Abb. 3.42	SDS-PAGE und <i>Western-Blot</i> von sHSP 18.9 aus p71	56
Abb. 3.43	Expression von Holo-Cph1 bei 18°C und 28°C	56
Abb. 3.44	Co-Expression von Holo-Cph1 und sHSP 18.9 bei 18°C und 28°C	57
Abb. 3.45	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p92	57
Abb. 3.46	SDS-PAGE von Apo-Cph1 und sHSP 18.9 aus p92	58
Abb. 3.47	<i>Western-Blot</i> von sHSP 18.9 aus p92	58
Abb. 3.48	Expression von Holo-Cph1 bei 18°C und 28°C	59
Abb. 3.49	Co-Expression von Holo-Cph1 und sHSP 18.9 bei 18°C und 28°C	59
Abb. 3.50	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p126	60
Abb. 3.51	Klonierungsstrategie zur Herstellung von p132	60
Abb. 3.52	SDS-PAGE von Cph1, GroEL, HO, PcyA und GroES.....	61
Abb. 3.53	Co-Expression von GroE S/L mit Holo-Cph1 bei 18°C und 28°C	62
Abb. 4.01	Expression von Häm-Oxygenase in <i>S.cerevisiae</i>	76

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Genotypen der <i>E.coli</i> -Stämme.....	22
Tab. 2.2	Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	23
Tab. 2.3	Polymerase-Kettenreaktionsbedingungen	28
Tab. 3.1	Tabelle der Absorptionsmaxima; Absorptionsdifferenzmaxima, minima und isosbestischen Punkte von Holo-Cph1	39
Tab. 3.2	Tabelle der Absorptionsmaxima; Absorptionsdifferenzmaxima, minima und isosbestischen Punkte von Holo-Cph1 Δ 2.....	54
Tab. 7.1	Proteine (Basenpaare, Aminosäuren und Molekulargewichte)	95
Tab. 7.2	Übersicht über die wichtigsten Plasmide.....	95
Tab. 7.3	Verzeichnis der wichtigsten Geräte und Gebrauchsmaterialien.....	96

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.thaliana</i>	Acker-Schmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
cDNA	copy DNA
Cph1	Cyanobakterielles Phytochrom 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ho</i> / HO	Häm-Oxygenase
HSP	Hitzestressprotein
IBP	Isosbestischer Punkt
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
<i>L.peruvianum</i>	Tomate (<i>Lycopersicon peruvianum</i>)
LB	Luria-Bertoni Medium
M	Molar
max.	Maximum
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min.	Minimum
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PAS	Per/Arndt/Sim-Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>pcyA</i> / PcyA	Phycocyanobilin-Synthase (Ferredoxin abhängige Bili-verdin-Reduktase) aus <i>Synechocystis</i> PCC 6803
Pfr	Dunkelrotlicht absorbierende Form des Phytochroms (<i>far red</i>)
Pr	Rotlicht absorbierende Form des Phytochroms (<i>red</i>)
psi	<i>pound per square inch</i> (1 psi = 6.8947x10 ³ Pascal)
<i>R.rattus</i>	Ratte (<i>Rattus rattus</i>)
<i>S.cerevisiae</i>	Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sHSP	kleines Hitzestressprotein (<i>small heat stress protein</i>)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol.	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>

1. Einleitung

Die Erkennung von Licht in Quantität und Qualität ist für Pflanzen von essentieller Bedeutung. Um ihre Entwicklung zu steuern, nehmen sie Bestrahlungsstärke, Richtung und spektrale Verteilung von Licht mit Lichtsensoren wahr. Im Gegensatz zu den Augen der Vertebraten erfolgt die Lichtperzeption bei Pflanzen durch verschiedene Photorezeptoren, die über den Organismus verteilt sind. In *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*) konnten bisher drei Typen von Photorezeptoren identifiziert werden. Sie bestehen neben den Blaulichtqualitäten erkennenden Phototropinen und Cryptochromen (Briggs und Huala, 1999; Cashmore et al., 1999; Briggs et al., 2001) aus fünf Rotlichtqualitäten erkennenden Phytochromen, welche als Phytochrom A bis E bezeichnet wurden (Clack et al., 1994).

Phytochrome wurden ursprünglich als die Photorezeptoren definiert, welche für die Rot/Dunkelrot reversiblen Antworten der Pflanzen verantwortlich sind (Parker et al., 1949; Borthwick et al., 1952a; Borthwick et al., 1952b). Ihre Untersuchung führte zu der Vermutung, dass Phytochrome in zwei unterschiedlich spektral aktiven Formen vorkommen: in einer inaktiven Rotlicht absorbierenden (Pr; *red*) Form und einer aktiven Dunkelrotlicht absorbierenden (Pfr; *far red*) Form. Die Pr Form kann durch Absorption von Rotlicht zu Pfr umgewandelt und nach der Absorption von Dunkelrot wieder zu Pr rückkonvertiert werden. Diese Umwandlungen des Phytochroms zwischen Pr und Pfr können beliebig oft wiederholt werden und werden Photochromozität genannt. Spektralphotometrische Differenzmessungen in Pflanzen bestätigten diese zwei in sich überführbaren Formen des Pigments (Butler et al., 1959).

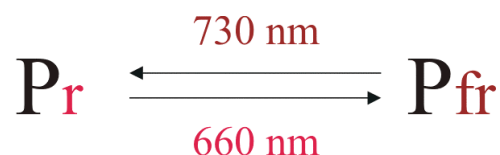


Abb. 1.01 Photoreversibilität von Phytochrom

Obwohl seit 1959 sehr viele grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden konnten (Übersichtsartikel siehe: Fankhauser und Staiger, 2002; Schäfer und Bowle, 2002), ist der grundsätzliche physikalische intramolekulare Mechanismus ebenso wenig geklärt wie die durch diese Veränderungen des Moleküls herbeigeführten Signalwandlungs-

wege. Um auf diesem Gebiet einen Schritt weiter zu kommen, wäre es wichtig, Holophytochrom in *Escherichia coli* (*E.coli*) herstellen zu können, da die bisherigen Untersuchungen mit Apoprotein durchgeführt wurden, das *in vitro* zu Holophytochrom assembliert wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die *in vitro*-Löslichkeit von Apo-Phytochromen stark eingeschränkt war. Auch für die Signalwandlung ist die Bereitstellung eines *in vivo* produzierten Photorezeptors von großer Wichtigkeit, weil nur ein vollständig funktionsfähiger Photorezeptor z.B. im Hefe-2-Hybrid-System die Suche nach lichtabhängigen Interaktionspartnern gewährleistet. Vor diesem Hintergrund sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, Holophytochrom in *E.coli* herzustellen und zusätzlich grundlegende Erkenntnisse für die Übertragung in das Hefe-System zu erhalten.

1.1 Pflanzliche und prokaryotische Phytochrome

1.1.1 Pflanzliche Phytochrome

Auf molekularer und zellulärer Ebene sind Phytochrome über die Expressionskontrolle vieler lichtgesteuerter Gene an der Entwicklung des Chloroplasten, Inhibierung und Förderung des Zellwachstums und von Ionenflüssen an den Zellmembranen beteiligt (Kendrick und Kronenberg, 1994). Die kleine Genfamilie dieser Photorezeptoren spielt unter anderem auch eine wichtige Rolle bei der Samenkeimung, Deetiolierung, Erkennung und Vermeidung der Chlorophyllbeschattung durch pflanzliche Nachbarn und bei der Blühinduktion.

Die Phytochrome sind eine Gruppe von dimeren Chromoproteinen, die durch auto-katalytische Assemblierung aus einem ca. 120 kDa Apoprotein mit einer prosthetischen Gruppe, dem Chromophor, entstehen (Rüdiger, 1969; Song et al., 1979; Quail et al., 1995). Hendricks, Borthwick und Parker gingen 1945 noch von der Vermutung aus, dass Phytochrom eine Porphyrin ähnliche Substanz sei, vermutlich Chlorophyll. Später (1950) postulierten sie, dass Phytochrom eine Ähnlichkeit zu Phycocyanin aufweist und vermutlich ein offenkettiges Pyrrol oder Bilin darstellt. Weitere Arbeiten bestätigten die Vermutung, dass der Chromophor ein Bilin sein könnte (Siegelman et al., 1966; Rüdiger, 1969). Eine genaue Charakterisierung zeigte, dass das lineare Tetra-

pyrrol Phytochromobilin dem Chromophor bei höheren Pflanzen entspricht (Lagarias und Rapoport, 1980).

Phytochrome binden Phytochromobilin in der Regel über eine Thioetherbindung an einem hochkonservierten Cystein. Das Phytochrom-Apoprotein bindet an Phytochromobilin im Cytoplasma und ergibt so die Rotlicht absorbierende Pr Form des Photorezeptors. Für diese Reaktion wird eine interne Bilin-Lyase-Domäne benötigt. Absorption von Rotlicht löst eine Z zu E Isomerisation an der C₁₅-Doppelbindung zwischen den Ringen C und D des linearen Tetrapyrrol aus, was die Bildung der Dunkelrotlicht absorbierenden Pfr Form des Phytochroms zur Folge hat (Andel et al., 1996). Dabei entsteht eine reversible Konformationsänderung des Proteins (Song, 1999). Eine Rückkonversion von Pfr zu Pr kann entweder durch eine langsame, nicht lichtinduzierte Reaktion (*dark reversion* = Dunkelreversion) oder wesentlich schneller durch Dunkelrot-Absorption erfolgen.

Phytochrome werden in zwei Klassen eingeteilt: einem lichtlabilen Typ-I (Phytochrom A in *A.thaliana*) und einem lichtstabilen Typ-II (Phytochrom B-E in *A.thaliana*) (Hirschfeld et al., 1998). Phytochrom A (Typ-I) spielt eine Hauptrolle bei der Perzeption der Tageslänge und bei der Samenkeimung als Antwort infolge von sehr niedrigen Bestrahlungsstärken über einen breiten Bereich des Lichtspektrums. Sie wird als *very low fluence response* bezeichnet und ist durch Dunkelrot nicht revertierbar (Johnson et al., 1994; Botto et al., 1996; Shinomura et al., 1996; Hamazato et al., 1997). Phytochrom A ist außerdem notwendig für die Deetiolierung bei einem hohen Dunkelrotlichtanteil (Dehesh et al., 1993; Nagatani et al., 1993; Whitelam et al., 1993). Solche Bedingungen finden sich z.B. bei der Keimung unter einer dichten Vegetationsschicht. Diese Phytochrom-Antwort, die als *high irradiance response* bezeichnet wird, ist um so bemerkenswerter, da sie im Gegensatz zu anderen Phytochromantworten durch Dunkelrot induziert und durch Rot inhibiert wird (Shinomura et al., 2000). Lichtstabile Phytochrome (PhyB-E; Typ-II) sind für die klassischen reversiblen Rot/Dunkelrot Antworten verantwortlich. In *A.thaliana* spielt Phytochrom B die wichtigste Rolle. Es ist der Haupt-Rotlichtrezeptor für die Deetiolierung und beeinflusst viele lichtregulierte Zellwachstumsantworten, die *shade avoidance* Reaktion und die Regulation der Blüteninduktion (Reed et al., 1993). Phytochrom D und E Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp geringe Änderungen im Phänotyp, und oft bedarf es Doppelmutanten, um einen Unterschied erkennen zu können (Whitelam und Devlin, 1997; Devlin et al., 1998; Devlin et al., 1999).

Die Genexpression der *A.thaliana* Phytochrome wird durch eine Vielzahl an Faktoren reguliert (Somers und Quail, 1995; Goosey et al., 1997). Phytochrom A (Typ-I) Transkription wird durch Licht über einen von Phytochrom A und B abhängigen negativen Rückkoppelungsmechanismus reprimiert (Canton und Quail, 1999). Zusätzlich wird die Stabilität des Phytochrom A Proteins wesentlich von Licht gesteuert. Die Pfr Form des Phytochrom A wird unter Lichteinfluss selektiv ubiquitiniert und folglich proteolytisch degradiert. Diese 2-fache negative Lichtsteuerung führt zu einem etwa 100-fach niedrigeren Phytochrom A Proteinanteil im Vergleich zum Zustand im Dunkeln (Clough et al., 1999). Im Gegensatz dazu steht die Phytochrom B mRNA unter der Regulierung der circadianen Rhythmik. Diese hat jedoch nur einen geringen Einfluss auf die *steady state* Anwesenheit des Proteins (Bognar et al., 1999).

Neben der lichtabhängigen Transkriptionskontrolle ist die subzelluläre Lokalisation von zentraler Bedeutung für die pflanzlichen Phytochromwirkungen. Sowohl Phytochrom A als auch Phytochrom B sind im Dunkeln im Cytoplasma lokalisiert und werden nach einem entsprechendem Lichtreiz in den Nukleus importiert (Nagy und Schäfer, 2000b). Lange Zeit herrschte die Auffassung, dass Phytochrome nur im Cytoplasma lokalisiert sind und die Regulation der Gentranskription über *second messenger* Prozesse gesteuert wird. Dies konnte aber bisher nicht eindeutig geklärt werden. Mikroinjektionsstudien zeigen eine Beteiligung von G-Proteinen, cGMP und Calmodulin (Neuhaus et al., 1993; Bowler et al., 1994a; Bowler et al., 1994b; Neuhaus et al., 1997). Die lichtabhängige Translokation von Phytochromen konnte mittlerweile auch für die Phytochrome C-E gezeigt werden (Nagy et al., 2000; Nagy und Schäfer, 2000a, 2000b; Kircher et al., 2002). Ihre Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass die Phytochrome selbst an der Genregulation im Kern beteiligt sein könnten. Dies konnte für die Pfr Form des Phytochrom B in der Tat gezeigt werden: Nachdem Phytochrom B in seiner Pfr Form in den Nukleus transloziert wurde, interagiert es mit PIF3 (*Phytochrome interacting factor 3*), einem *basic helix loop helix* Transkriptionsfaktor (Ni et al., 1999). Diese Interaktion konnte allerdings nur in der Pfr und nicht in der Pr Form des Phytochrom B gezeigt werden. Sie ist photoreversibel und erfordert, dass PIF3 an ein G-Box-Element gebunden ist (Martinez-Garcia et al., 2000). Vor kurzem wurde PIF4, ein weiterer Phytochrom-Interaktionspartner mit *basic helix loop helix*-Motiv, beschrieben (Huq und Quail, 2002). Dieser Transkriptionsfaktor bindet an Phytochrom B und wird als negativer Regulator während der Signaltransduktion bei der Zellexpansion

diskutiert (Huq und Quail, 2002). Weitere *basic helix loop helix* Transkriptionsfaktoren (RSF1, HFR1 und REP1) spielen eine wichtige Rolle bei der Phytochrom A, jedoch nicht bei der Phytochrom B Signaltransduktion (Fairchild et al., 2000; Fankhauser und Chory, 2000; Soh et al., 2000; Spiegelman et al., 2000).

Die Signaltransduktion ist funktionell sehr stark mit dem C-Terminus des Proteins verbunden. Wie in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, sind nämlich alle Phytochrome im wesentlichen aus zwei funktionellen Bereichen aufgebaut: dem besagten C-terminalen Bereich, der für die Signalweiterleitung verantwortlich ist, und einem N-terminalen lichter kennenden Bereich.

Der N-Terminale Anteil beinhaltet die Chromophor-Binde-Domäne und -wie oben schon erwähnt- die Bilin-Lyase-Aktivität, welche das Anbinden des Chromophor an das Apoprotein ermöglicht (Terry, 1997).

Die Funktion des C-terminalen Bereichs bei pflanzlichen Phytochromen wurde durch zahlreiche *missense mutations* in diesem Bereich aufgeklärt (Quail et al., 1995; Krall und Reed, 2000). Der C-Terminus lässt sich funktionell weiter unterteilen: so besteht er aus einer PAS-(Per/Arndt/Sim)-Domäne und einer Histidin-Kinase-ähnlichen-Domäne (Schneider-Poetsch et al., 1991; Yeh und Lagarias, 1998). PAS-Domänen haben diverse Funktionen. Sie können entweder als Protein-Protein Interaktionsplattform oder als Co-Faktor Bindungsdomäne fungieren (Taylor und Zhulin, 1999). Interessanterweise werden entfernte Verwandte solcher Module auch bei diversen Blaulichtrezeptoren verwendet, um Flavin-Chromophore zu binden, die sogenannten LOV-Domänen (Briggs und Huala, 1999). In Phytochromen wird die PAS-Domäne für Interaktionen mit Phytochrom Signaltransduktionspartnern benötigt (Quail et al., 1995; Elich und Chory, 1997; Ni et al., 1998; Choi et al., 1999a). Die Histidin-Kinase-ähnliche-Domäne der pflanzlichen Phytochrome zeigt Homologien zu einer besonderen Gruppe der Histidin-Kinasen von Bakterien auf. Solche sogenannten Zwei-Komponenten-Histidin-Kinasen werden für gewöhnlich von Bakterien verwendet, um auf eine Vielzahl von Umgebungseinflüssen zu reagieren. Dazu zählen unter anderem Osmolarität, Stickstoffmenge, andere Nährstoffe oder Pathogene (Hoch und Silhavy, 1995; Appleby et al., 1996). Typischerweise kommen diese Kinasen als Homodimere vor. Die Reizaufnahme erfolgt durch ein N-terminales Sensormodul, das dann die Histidin-Kinase-Domäne im C-terminalen Transmittermodul aktiviert. Dies geschieht über die Phosphorylierung eines konservierten Histidin in der Histidin-Kinase-Domäne, typischerweise über eine Kreuzphosphorylierung zwischen Untereinheiten des Kinase-

Dimers. Dieses Signal wird dann an einen Rezeptor über die Weiterleitung eines Phosphates der Histidyl-Seitenkette zu einem konservierten Aspartat im Rezeptor weitergeleitet. In manchen Fällen besitzt das C-terminale Ende des Rezeptor ein Ausgangsmodul, z.B. DNA-Bindedomäne oder eine Protein/Protein-Bindestelle, die dann eine entsprechende Informationsweiterleitung bewirkt. Jedoch fehlen in den pflanzlichen Phytochromen einige Charakteristika, insbesondere das hoch konservierte Akzeptorhistidin (Quail, 1997). Arbeiten der letzten Jahre haben Hinweise darauf geliefert, dass es sich bei der pflanzlichen Histidin-Kinase-ähnlichen-Domäne nicht um eine Histidin-Kinase, sondern um eine Serin/Threonin-Kinase handelt. Dies konnte für Hafer (*Avena sativa*) Phytochrom A belegt werden (Cashmore, 1998).



Abb. 1.02 Aufbau von *A.thaliana* Phytochrom B

Die Ähnlichkeit der Histidin-Kinase-ähnlichen-Domäne zu den Histidin-Kinasen der Bakterien ließ schon früh die Vermutung aufkommen, dass Phytochrome prokaryotischen Ursprungs sein könnten (Schneider-Poetsch und Braun, 1991; Schneider-Poetsch et al., 1991; Schneider-Poetsch, 1992). Bis zu der Entdeckung von prokaryotischen Phytochrom im Jahre 1997 (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997) war es jedoch gängige Lehrmeinung, dass Phytochrome nur in höheren Pflanzen, einigen niederen Pflanzen, sowie Algen vorkommen (Kolukisaoglu et al., 1995; Lagarias et al., 1995).

1.1.2 Prokaryotische Phytochrome

Die vollständige Sequenzierung von *Synechocystis* PCC 6803, einem Cyanobakterium, wurde 1996 abgeschlossen (Kaneko et al., 1996). Kurz darauf wurde eine erste phytochromähnliche Sequenz (*cph1*) in dem Cyanobakterium gefunden und analysiert (Hughes et al., 1996; Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass *cph1* für ein phytochromähnliches Protein kodiert und fähig ist, einen Chromophor zu binden. Ein solches Holoprotein wies auch

die typische Rot/Dunkelrot Photochromozität auf (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997; Park et al., 2000b).

Wie pflanzliche Phytochrome besitzen prokaryotische Phytochrome die Fähigkeit, Biline, vermutlich an der Chromophor-Binde-Domäne, kovalent zu binden. Sie beinhalten ein hoch konserviertes Cystein, das vermutlich wie in höheren Pflanzen auch an der Bindung des Chromophor über eine Thioetherbindung beteiligt ist. Ausserdem ist ein hochkonserviertes benachbartes Histidin vorhanden, welches für die Chromophor-Ligation und Photochromozität wichtig ist (Bhoo et al., 1997; Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997). Wird ein geeigneter Chromophor angeboten, z.B. Phytochromobilin oder Phycocyanobilin, verfügt das Chromoprotein über photochrome Eigenschaften (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997; Park et al., 2000b). Wenn man die Effizienz der Chromophorbindung von prokaryotischen Apoprotein mit diversen Chromophoren *in vitro*, z.B. Phytochromobilin, Phycocyanobilin oder Phycoerythrobilin beobachtet, ist es sehr wahrscheinlich, dass eines dieser Pigmente auch der natürliche Chromophor ist.

Für *Synechocystis* PCC 6803 konnte ein weiteres Phytochrom entdeckt werden (Park et al., 2000a). Es wurde Cph2 benannt und besitzt ein Molekulargewicht von ~145 kDa. Der Aufbau und die spektralen Eigenschaften von Cph2 sind dem von Cph1 und pflanzlichen Phytochromen ähnlich (Park et al., 2000a). Vor kurzem konnten sogar phytochromähnliche Sequenzen bei drei nicht photosynthetischen Eubakterien (*Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas putida*) nachgewiesen werden (Davis et al., 1999b). Dabei fiel in *Deinococcus radiodurans* eine ungewöhnliche Gensequenz für eine Häm-Oxygenase auf. Diese wurde BphO (*bacteriophytochrome haem oxygenase*) benannt (Bhoo et al., 2001) und bewirkt die Synthese von Biliverdin IX α , das den natürlichen Chromophor darstellt. Zwei weitere Phytochrome, Agp1 und Agp2, konnten in dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* entdeckt werden (Lamparter et al., 2002). Analysen von Agp1 zeigten, dass auch hier Biliverdin IX α der natürliche Chromophor ist und dass Holo-Agp1 als lichtabhängige Histidin-Kinase fungiert (Lamparter et al., 2002). Ein Phytochrom ähnliches Protein (Ppr) wurde in dem photosynthetischen Purpurbakterium *Rhodospirillum centenum* entdeckt (Jiang et al., 1999). Ppr besitzt einen *photoactive yellow protein* (PYP) N-Terminus, eine mittlere Domäne, die Ähnlichkeiten zu der Chromophor-Binde-Domäne der Phytochrome aufweist, und eine C-terminale Histidin-Kinase-Domäne. Ppr bindet kovalent an den blaulichtabsorbierenden Chromophor p-Hydroxy-

zimtsäure. Phylogenetische Analysen führten zu der Vermutung, dass Ppr ein Vorläufer von cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochromen darstellen könnte (Jiang et al., 1999).

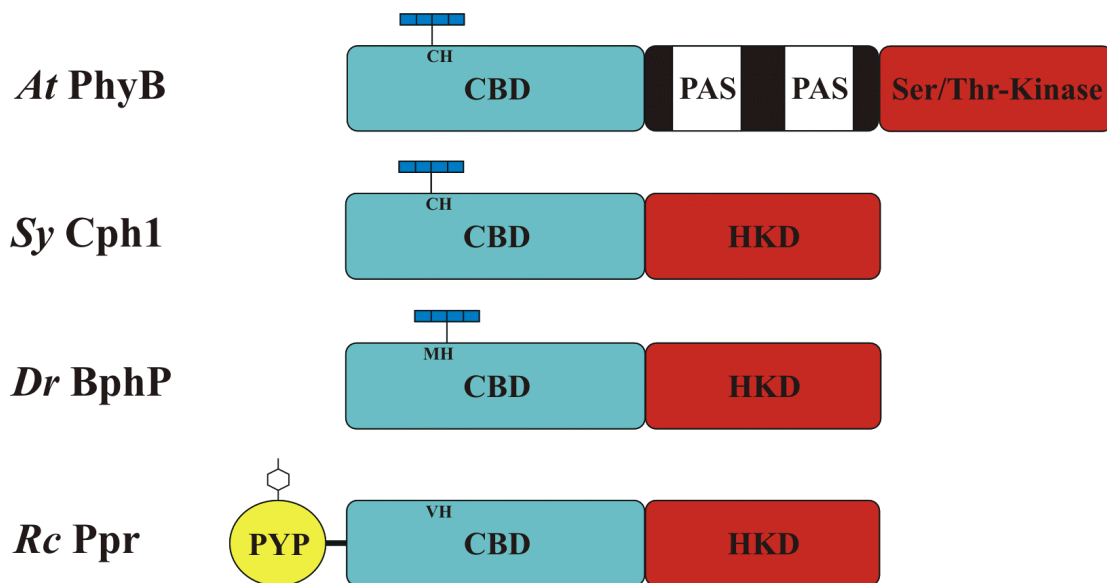


Abb. 1.03 Aufbau von prokaryotischen und eukaryotischen Photorezeptoren
At: Arabidopsis thaliana; Sy: Synechocystis PCC 6803; Dr: Deinococcus radiodurans; Rc: Rhodospirillum centenum; CBD: Chromophor-Binde-Domäne; HKD: Histidin-Kinase-Domäne; PAS: PAS-Domäne; PYP: Photoactive Yellow Protein.

Obwohl noch viele Fragen offen bleiben, hat die Entdeckung der prokaryotischen Phytochrome das evolutionäre Verständnis für die Entstehung der pflanzlichen Phytochrome entscheidend vorangetragen. Die Anwesenheit von Phytochromen in prokaryotischen Organismen bietet einen neuen Ansatz, die Evolution der Phytochrome hin zu höheren Pflanzen zu untersuchen. Nach der Endosymbiontentheorie wurden Cyanobakterien von anderen Zellen aufgenommen und bewirkten somit die Entstehung der pflanzlichen Chloroplasten. Somit wurden auch die prokaryotischen Phytochrome mit aufgenommen und in die Signalerkennungs- und Verarbeitungswege integriert. Durch die Verlagerung der entsprechenden Phytochromgene in den Kern entstand eine Eukaryotisierung des Phytochroms in Pflanzen. Das aufgenommene prokaryotische Phytochrom wurde zusätzlich modifiziert, um den spezifischen Anforderungen gerecht zu werden. Zum einen wurde via Domänenaustausch eine Serin reiche Domäne am N-Terminus eingebaut, zum anderen die oben erwähnte PAS-Domäne, welche bei vielen Sensor-Proteinen vorkommen (Taylor und Zhulin, 1999). Die PAS-Domäne wurde zwischen die Chromophor-Binde-Domäne und die Histidin-Kinase-ähnliche-Domäne

eingebaut (Quail et al., 1995; Yeh und Lagarias, 1998). Die für Prokaryoten typische Histidin-Kinase wurde gegen eine Serin/Threonin-Kinase ausgetauscht (Yeh und Lagarias, 1998).

1.1.3 Cyanobakterielles Phytochrom 1

In dieser Arbeit wird das Cyanobakterielle Phytochrom 1 (Cph1) aus *Synechocystis* PCC 6803 verwendet. Cph1 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~85 kDa. Ungefähr 10 bp *downstream* von *cph1* liegt ein Genabschnitt, der für Rcp1 (*response regulator for Cph1*) kodiert (Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997), dessen 3D-Struktur vor kurzem via Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt wurde (Im et al., 2002). Unter Verwendung von rekombinanten Holoprotein, das *in vitro* mit Phycocyanobilin assembliert wurde, konnte für Cph1 gezeigt werden, dass es eine Histidin-Kinase Aktivität besitzt und sich an dem entsprechendem Histidin autophosphoryliert (Yeh et al., 1997). Erstaunlicherweise wurde Pr, und nicht wie erwartet Pfr, als die aktivere Form identifiziert. Für pflanzliche Phytochrome konnte aber eindeutig nachgewiesen werden, dass Pfr und nicht Pr die aktive Form des Phytochrom darstellt (Quail et al., 1995; Smith, 1995).

Wie die pflanzlichen Phytochrome ist das Cph1-Apoprotein in der Lage, mit den Tetrapyrrolen Phytochromobilin, Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin autokatalytisch zu assemblieren. Allerdings sind weder pflanzliche Phytochrome noch Cph1, welche mit Phycoerythrobilin assembliert wurden, in der Lage zu photokonvertieren, stattdessen wird die absorbierte Photonen-Energie als Fluoreszenz abgegeben (Li et al., 1995; Murphy und Lagarias, 1997).

Der Extinktionskoeffizient von Cph1 wird mit $85 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bei einem λ_{max} von 656 nm angegeben (Lamparter et al., 2001). Die Absorptions-Differenz-Spektren sowohl der Pr als auch der Pfr Form bei prokaryotischen Phytochromen sind dem der höheren Pflanzen ähnlich. Zum Beispiel liegen Pr/Pfr Absorptionsformen von Cph1 (Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997) und *Deinococcus radiodurans* BphP (Davis et al., 1999b), die mit Phytochromobilin assembliert wurden, bei 668/718 nm und 663/705 nm. Bei pflanzlichem Phytochrom A liegen sie bei 666/730 nm (Vierstra und Quail, 1983).

Ein transfizierter *Synechocystis* PCC 6803 Stamm, der Cph1 in Verbindung mit einem *Histidin₆-Tag* exprimiert, ermöglichte die Aufreinigung und spektrale Charakterisierung des Holo-Cph1 aus *Synechocystis* PCC 6803 selber. Diese Studien bestätigten die typische Rot/Dunkelrot-Reversibilität von Cph1 und implizieren, dass Phycocyanobilin den natürlichen Chromophor darstellt (Hübschmann et al., 2001).

Eine C-terminal deletierte (Δ 515-748) Mutante von Cph1 (Cph1 Δ 2) zeigte fast identische spektrale Eigenschaften auf wie das intakte Protein (Yeh et al., 1997; van Thor et al., 2001). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus für die photobiologischen Eigenschaften nicht benötigt wird und dass eine Dimerisierung mit einer etwa daraus resultierenden Chromophor-Chromophor Interaktion nicht von Relevanz ist (Sineshchekov et al., 2002).

Außer dieser Rezeptorbiochemie ist über die Funktion des Photorezeptors in Cyanobakterien bisher wenig bekannt. Vor kurzem wurde die Lichtregulation der *cph1* Transkription beschrieben (Garcia-Dominguez et al., 2000). Außerdem wird der Einfluss von Cph1 als Photosensor für die lichtgesteuerte Bewegung von *Synechocystis* PCC 6803 diskutiert (Choi et al., 1999b).

Für die weiteren Analysen von Cph1 wäre entsprechend der Strukturaufklärung von Rcp1 eine genaue Kenntnis seiner Struktur von zentraler Bedeutung. Erste Kristallisationsversuche waren von wenig Erfolg gekrönt, da rekombinantes Cph1 *in vitro* starke Aggregationstendenzen aufweist. In dieser Arbeit soll eine Methode etabliert werden, lösliches Holo-Cph1 zu erhalten, das unter anderem für Kristallisationszwecke eingesetzt werden kann.

1.2 Biosynthese von Tetrapyrrolen

Gründe für die starken Aggregationstendenzen *in vitro* könnten sein, dass bei der Synthese von rekombinanten Cph1 in *E.coli* ohne Chromophor die korrekte Faltung von Cph1 negativ beeinflusst wird. *E.coli* ist nicht in der Lage, einen adäquaten Phytochrom-Chromophor bereitzustellen, da es weder Phytochromobilin noch Phycocyanobilin besitzt. Um Holophytochrom *in vivo* bereitzustellen zu können, ist die Expression von weiteren Genen notwendig, um einen Chromophor in Form eines offenkettigen Tetrapyrrol zu erhalten, da *E.coli* andere metabolische Aufgaben an Tetrapyrrole stellt.

Tetrapyrrole und ihre Derivate spielen eine essentielle Rolle in allen Organismen. So sind sie z.B. am Energietransfer und als Co-Faktor von verschiedenen Enzymen beteiligt. Ein häufig vorkommender Vertreter der Tetrapyrrole ist Häm, ein ringförmiges Tetrapyrrol, das ein Eisen (Fe^{2+}) Zentralatom besitzt. Andere physiologisch aktive Tetrapyrrole sind das Cobalamin (Vitamin B_{12}), welches ein Kobaltatom gebunden hat und die eisenhaltigen wenig abgeleiteten Sirohäme in photosynthetischen Organismen (Kofaktoren der Nitrit- und Schwefelreduktasen). Den Hauptteil der Tetrapyrrole in photosynthetischen Organismen macht die Familie der Chlorophylle aus. Chlorophylle sind ebenfalls zyklische Tetrapyrrole, die im Gegensatz zu Häm ein Magnesium (Mg^{2+}) Zentralatom und ein fünften isozyklischen Ring (E) besitzen. Phycobiline (Chromophore der Phycobilisomen in Cyanobakterien und Rotalgen) und die Phytychromobiline, Phycocyanobiline und Phycoerythrobiline (Chromophore der Phytyochrome) sind Produkte des Hämstoffwechsels, in denen das zyklische Tetrapyrrol sekundär aus Häm geöffnet wurde. Dabei geht das Zentralatom verloren.

1.2.1 Biosynthese von δ -Aminolaevulinsäure

Ausgangspunkt für alle zyklischen und offenkettigen Tetrapyrrole ist die δ -Aminolaevulinsäure. Pflanzen, Algen, Cyanobakterien sowie grüne und purpurne Schwefelbakterien besitzen die Möglichkeit, δ -Aminolaevulinsäure aus Glutamat über den sogenannten C_5 -Weg zu synthetisieren (Beale, 1999). Der erste Schritt in dieser Reaktion ist die Ligation von Glutamat an tRNA_{GLU} , der durch die Glutamyl-tRNA-Synthetase bewerkstelligt wird. Im darauffolgendem Schritt wird durch die Glutamyl-tRNA-Reduktase Glutamat zu Glutamat-1-Semialdehyd reduziert. Durch eine Transaminierung des Glutamat-1-Semialdehyd entsteht δ -Aminolaevulinsäure. Dieser Schritt wird durch die Glutamat-1-Semialdehyd-Aminotransferase bewerkstelligt (Friedmann et al., 1987; von Wettstein et al., 1995; Vavilin und Vermaas, 2002). Bei plastidlosen eukaryotischen Organismen, nichtschwefelhaltigen Purpurbakterien (*Rhodobacter*) und vielen Bakterien, die kein Chlorophyll besitzen, wird δ -Aminolaevulinsäure über den Scheminweg synthetisiert. Dies geschieht über die Kondensation von Succinyl-Coenzym A mit Glycin und wird durch die δ -Aminolaevulinsäure-Synthase katalysiert. Die δ -Aminolaevulinsäure-Synthase konnte bisher in Pflanzen nicht entdeckt werden

und es scheint, dass im *A.thaliana*-Genom kein entsprechendes Gen vorliegt. In transgenen *A.thaliana* Pflanzen, in denen die Glutamyl-tRNA-Reduktase Aktivität und somit die Biosynthese von δ -Aminolaevulinsäure durch den Einsatz von *antisense* Expression der *hemA1* mRNA stark beeinträchtigt wurde, konnten die Pflanzen unter normalen Anzuchtbedingungen nicht überleben (Kumar und Soll, 2000). Jedoch können einige Algen wie *Euglena gracilis* (Weinstein und Beale, 1983; Mayer und Beale, 1992) und *Scenedesmus obliquus* (Drechsler-Thielmann et al., 1993) δ -Aminolaevulinsäure sowohl über den Scheminweg als auch über den C₅-Weg synthetisieren.

1.2.2 Biosynthese von Protoporphyrin IX

Der Stoffwechselweg von der δ -Aminolaevulinsäure zu dem Tetrapyrrol Protoporphyrin IX ist in allen Organismen hoch konserviert. Die Aminolaevulinsäure-Dehydratase kondensiert zwei δ -Aminolaevulinsäure Moleküle zu dem Monopyrrol Porphobilinogen. Durch Kondensation von vier Molekülen Porphobilinogen (unter NH₃-Abspaltung), katalysiert durch die Porphobilinogenase, entsteht das Tetrapyrrol Uroporphyrinogen III. Durch Decarboxylierung und Oxidation von Seitenketten wird Protoporphyrinogen gebildet, das durch Oxidation der CH₂-Brücken zwischen den Pyrrolringen in Protoporphyrin IX übergeht. Vom Protoporphyrin IX aus verzweigt sich der Biosyntheseweg einerseits in Richtung der eisenhaltigen Hämverbindungen und andererseits zu den magnesiumhaltigen Chlorophyllen (Papenbrock und Grimm, 2001). Abgesehen von den zwei verschiedenen δ -Aminolaevulinsäure Syntheserouten unterscheidet sich der pflanzliche Tetrapyrrolmetabolismus von dem des tierischen in seiner subzellulären Lokalisation und seiner Vielfalt an Endprodukten. In Tieren und Hefen startet die Hämsynthese in den Mitochondrien mit der Reaktion, die durch die Aminolaevulinsäure-Synthase bewerkstelligt wird, verlagert sich dann ins Cytoplasma bis zur Stufe von Coproporphyrinogen III und wird in den Mitochondrien mit der Synthese von Protohäm abgeschlossen. In Pflanzen erfolgt die Chlorophyll-Synthese ausschließlich in den Chloroplasten, während die letzten Schritte der Hämsynthese sowohl in den Plastiden als auch in den Mitochondrien erfolgen (Smith et al., 1993; Chow et al., 1997).

1.2.3 Chromophorbiosynthese (lineare Tetrapyrrole)

Phytobiline (Chromophore der Pflanzen) werden aus dem eisenhaltigen Protoporphyrin IX (Protohäm) über die Zwischenstufe Biliverdin IX α synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass in Rotalgen und Cyanobakterien eine lösliche Ferredoxin abhängige Häm-Oxygenase Protohäm zu Biliverdin IX α umwandelt und andere lösliche Enzyme Biliverdin IX α in Phycobiline (Chromophore der Cyanobakterien und Rotalgen) umwandeln können (Rhie und Beale, 1992; Beale, 1994; Cornejo und Beale, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass intakte pflanzliche Chloroplasten imstande sind, Biliverdin IX α aus Protohäm und anschließend Biliverdin IX α zu Phytochromobilin umzuwandeln (Terry et al., 1995; Weller et al., 1996).

Auch in *Synechocystis* PCC 6803 konnte eine Häm-Oxygenase gefunden werden, die in der Lage ist, Häm in Biliverdin IX α umzuwandeln (Cornejo et al., 1998). Diese Häm-Oxygenase katalysiert eine mehrere Schritte umfassende Mono-Oxygenase-reaktion, für die drei Moleküle Sauerstoff und mehrere Reduktionsäquivalente benötigt werden. Die Reduktionsäquivalente werden über reduziertes Ferredoxin bereitgestellt. Dabei entsteht Biliverdin IX α und CO (Cornejo et al., 1998). Ein entsprechendes Gen (*hy1*), das für eine Häm-Oxygenase kodiert, konnte auch in *A.thaliana* gefunden werden (Davis et al., 1999a). Eine ähnliche Reaktion findet auch in tierischen Organismen statt, jedoch steht hier den löslichen Ferredoxin abhängigen Häm-Oxygenasen der Rotalgen, Cyanobakterien und Pflanzen eine membranständige Häm-Oxygenase aus dem Tierreich gegenüber. Tierische Häm-Oxygenasen beziehen ihre Reduktionsäquivalente von NADPH+H⁺ bzw. der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (Tenhunen et al., 1968; Yoshinaga et al., 1982).

Obwohl die an der Chromophorbildung der Phytochrome beteiligten Häm-Oxygenasen seit 1998 (*Synechocystis* PCC 6803) bzw. 1999 (*A.thaliana*) bekannt waren, konnte erst im Jahre 2001 das letzte Enzym, das an dieser Biosynthese beteiligt ist, gefunden werden. Für das *hy2*-Gen aus *A.thaliana* wurde nachgewiesen, dass es für eine Phytochromobilin-Synthase kodiert (Kohchi et al., 2001). Die Phytochromobilin-Synthase ist eine Ferredoxin abhängige Biliverdin IX α -Reduktase, die den letzten Syntheseschritt in der Chromophorbildung (eine zwei Elektronenreduktion von Biliverdin IX α zu Phytochromobilin; siehe [Abb. 1.01](#)) bewirkt (Kohchi et al., 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien zu *hy2* konnte ein Gen in *Synechocystis* PCC 6803

ausfindig gemacht werden, das für eine putative Biliverdin-Reduktase kodiert. Dieses Gen, *pcyA* benannt, wurde kloniert und charakterisiert (Frankenberg et al., 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei PcyA um eine Ferredoxinabhängige Biliverdin IX α -Reduktase handelt. PcyA bewirkt eine vier Elektronenreduzierung des Biliverdin IX α (ohne Intermediatbildung; siehe Abb. 1.01) zu Phycocyanobilin (Frankenberg et al., 2001).

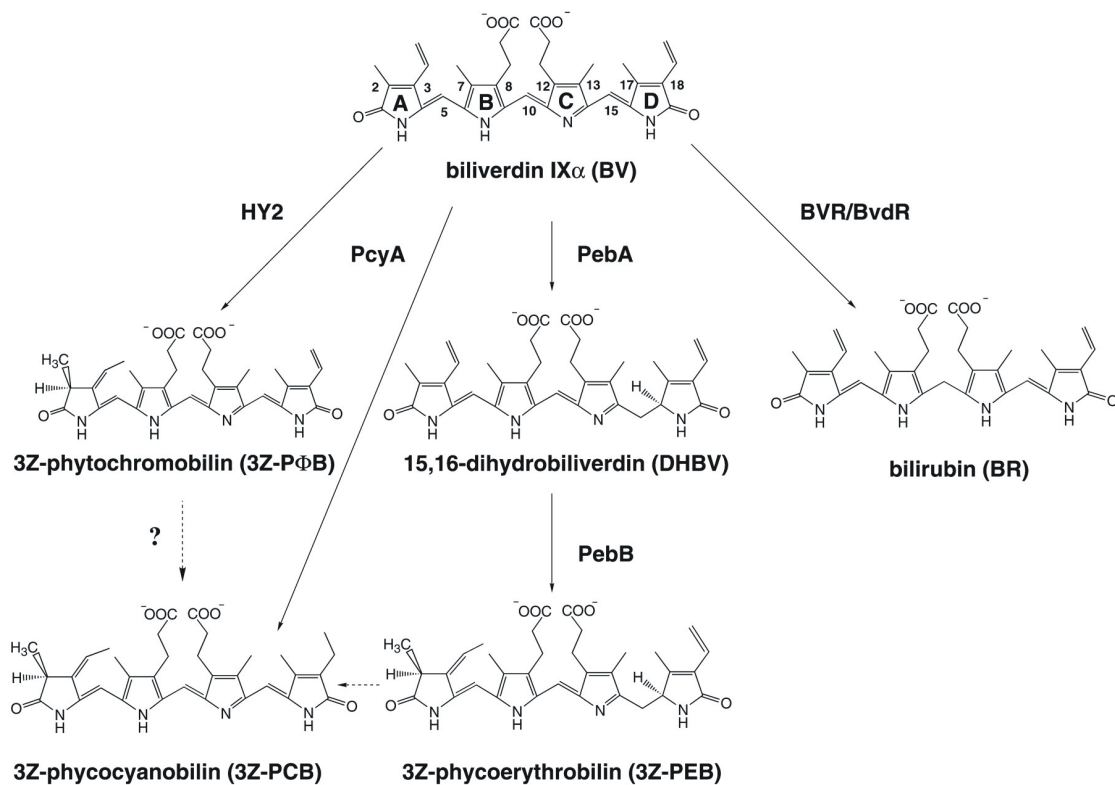


Abb. 1.04 Synthesewege von Phytochromobilin, Phycocyanobilin, Phycoerythrobin und Bilirubin aus Biliverdin IX α
aus Frankenberg et al., 2001

1.3 Chaperone und Proteinfaltung

Durch zusätzliche Bereitstellung der Gene *ho* und *pcyA* in *E.coli* könnte eine *in vivo* Assemblierung des Apoproteins mit dem Chromophor stattfinden. Falls eine *in vivo* Assemblierung nicht ausreichen sollte, um die bekannten starken Aggregations-tendenzen von Cph1 *in vitro* zu unterbinden, kann die zusätzliche Bereitstellung von Faltungshilfen in Betracht gezogen werden. Solche als molekulare Chaperone

bezeichnete Proteine sind in der Regel nötig, um eine korrekte Faltung von Proteinen zu gewährleisten. Zwar konnte gezeigt werden, dass einige kurze Polypeptidketten in der Lage sind, sich spontan zu falten und somit ihre 3-dimensionale Struktur alleine erlangen (Anfinsen, 1973), aber dies gilt nicht für komplexere Proteine. Viele neu synthetisierte Proteine benötigen eine aufwendige zelluläre Maschinerie, die unter anderem die oben erwähnten molekularen Chaperone beinhaltet, um unter Einsatz von Energie in einem überschaubaren Zeitraum in den richtigen Faltungszustand gebracht zu werden (Ellis und Hemmingsen, 1989; Hartl, 1996; Frydman, 2001). Diese sehr heterogenen Proteinfamilien verhindern außerdem die Fehlfaltung und Aggregation von Proteinen, besitzen selber aber keine Strukturinformationen für ein bestimmtes Protein. Allerdings entstehen ohne Chaperone oft ungewollte Interaktionen zwischen beliebigen hydrophoben Regionen zu faltender Proteine. Dies führt häufig zur Entstehung von Proteinaggregaten, da sich die hydrophoben Komplexe von solchen fehlgefalteten Proteinen durch Wechselwirkungen und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zusammenlagern und ausfallen (Dobson und Karplus, 1999; Radford, 2000). Die Gefahr von Aggregaten ist bei einer Überexpression von einem Protein in *E.coli* im allgemeinen und bei Cph1, wie es in dieser Arbeit vorkommt, besonders hoch. Die zelluläre Faltungsmaschinerie von *E.coli* wird durch die massive Proteinüberproduktion "überfordert" und kann eine korrekte Faltung aller neu synthetisierten Proteine nicht gewährleisten. So sollte im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht werden, ob eine Co-Expression von Chaperonen die *in vivo* Löslichkeit von Holo-Cph1 verbessert und eine *in vitro* Aggregation verhindern kann.

In den letzten 15 Jahren wurde die molekulare Funktion von Chaperonen eingehend untersucht. So konnte gezeigt werden, dass es unterschiedliche Klassen von Chaperonen gibt, die unterschiedliche Aufgaben haben. Dazu zählen das DnaK/HSP70-System, das GroEL/HSP60-System, die HSP20-Familie, die HSP100-Familie und das HSP90-System. Diese Proteine sind an der Faltung und Wiederfaltung bei einer Vielzahl von in sich strukturell unterschiedlichen Proteinen beteiligt (Horwich et al., 1993) und sind essentiell für die Zellvitalität bei unterschiedlichen Temperaturen (Cheng et al., 1989; Fayet et al., 1989). Im folgenden werden die oben erwähnten Chaperonsysteme kurz skizziert, um ihre generelle Funktionsweise aufzuzeigen und um darzulegen, welche Chaperone für eine Faltungsunterstützung von Cph1 in *E.coli* in Frage kommen.

1.3.1 Das DnaK/HSP70 Chaperonsystem

Das DnaK (HSP70) Chaperonsystem ist in *E.coli* für die Proteinfaltung von zentraler Bedeutung und besteht aus drei Proteinen: DnaK, DnaJ und GrpE. Die Proteine der DnaK-Familie bestehen aus einer N-terminalen ATP-Bindedomäne und einer C-terminalen Domäne, die mit einer Vielzahl an partiell gefalteten oder denaturierten Proteinen interagieren kann. Wie aus Untersuchungen des DnaK-Zyklus aus *E.coli* hervorgeht, benötigt die Substratinteraktion einen aktivierten DnaK/ADP-Komplex mit DnaJ. Nach Freilassung des Proteinsubstrates braucht die Regeneration des DnaK/ATP-Komplexes GrpE als Nukleotidaustauschfaktor (Schröder et al., 1993; Szabo et al., 1994; Gamer et al., 1996; Reid und Fink, 1996; Wu et al., 1996). Die DnaJ-Proteine (HSP40) sind die primären Substratsinteraktionseinheiten der HSP70 Maschinerie (Langer et al., 1992; Hendrick et al., 1993; Liberek et al., 1995; Westermann et al., 1995; Gamer et al., 1996). Die Mitglieder der DnaJ-Familie besitzen eine 70 Aminosäuren umfassende Domäne im N-terminalen Bereich, die sogenannte J-Domäne, die DnaK an dieses Peptidteil binden kann (Cyr et al., 1994). Der Einsatz der DnaK-Familie wäre für unsere Fragestellung prinzipiell denkbar, jedoch wäre es von Vorteil, Chaperonsysteme auszuwählen, die während oder unmittelbar nach der Translation an der primären Faltung beteiligt sind.

1.3.2 Das GroE L/S (HSP60) Chaperonsystem

Die GroE L/S (HSP60) Chaperonsysteme sind eine konservierte Klasse von Doppelring-Komplexen, die eine molekulare Masse von 800 kDa haben und eine zentrale Einbuchtung besitzen. Sie kommen in zwei Untergruppen vor, die in ihrer Struktur ähnlich sind, jedoch unterschiedliche Sequenzen aufweisen. *E.coli* GroEL und sein Co-Faktor, GroES, repräsentieren ein sogenanntes Gruppe I Chaperonin. Dieses System besteht aus zwei heptameren Ringen (zwei identische Untereinheiten von jeweils 57 kDa), welche „Rücken an Rücken“ aneinandergelagert sind. Jede Untereinheit besteht aus drei Domänen. Die äquatorielle Domäne beherbergt 7 ATP-Bindestellen und ist mit der apikalen Domäne durch eine Art Scharnier verbunden. Die apikale Domäne ist für die Öffnung des Zylinders verantwortlich und exponiert eine Anzahl von hydrophoben Aminosäuren für die Substratbindung. GroES ist ein homoheptamerischer Ring mit

einer Molekülmasse von 10 kDa, der an den Öffnungen des GroEL-Ringes unter der Steuerung der GroEL ATPase ab- und angelagert wird (Hartl, 1996; Bukau und Horwich, 1998; Sigler et al., 1998). Hydrophobe Oberflächen, die durch die apikale Domäne an der Innenseite des Ringes exponiert werden, treten in Wechselwirkung mit den hydrophoben Aminosäuren des zu faltenden Proteins (Hartl, 1996; Bukau und Horwich, 1998; Sigler et al., 1998). Danach können hydrophobe Sequenzen an eine flexible Verbindung zwischen zwei α -Helixen in der apikalen Domäne binden (Chatellier et al., 1999; Chen und Sigler, 1999). Stabile Substratbindung benötigt eine Interaktion des nichtnativen Polypeptids mit den apikalen Domänen (Farr et al., 2000). Die GroES-Untereinheiten besitzen mobile Sequenzschlaufen, die mit der Substratbindenden-Region in der apikalen Domäne des GroEL Kontakt aufnehmen können und die Substratdissoziation bewirken (Xu et al., 1997; Bukau und Horwich, 1998; Richardson et al., 1998; Sigler et al., 1998). GroEL ist funktionell asymmetrisch. Die beiden Ringe sind durch negative Allosterie aneinandergelagert und kommen nicht simultan in der gleichen Konfiguration vor. Ungefähr 10% der neu synthetisierten Proteine untergehen einer posttranslationalen GroEL Behandlung (Ewalt et al., 1997; Houry et al., 1999). Die meisten dieser Proteine haben ein Molekulargewicht von 20 bis 60 kDa und eine Faltungshalbwertszeit von 15 Sekunden bis etliche Minuten (Ewalt et al., 1997). Bisher wurden ungefähr 50 Proteine identifiziert, die im Cytosol von *E.coli* mit GroEL interagieren (Houry et al., 1999). Die bakterielle Ribulose-1.5-Bisphosphat Carboxylase-Oxygenase ist ein Protein, das nur über GroEL-GroES effizient gefaltet werden kann (Ewalt et al., 1997; Brinker et al., 2001). Obwohl der Innenraum nur Faltung bis zu einer bestimmten Proteingröße erlaubt, ergaben kürzlich veröffentlichte Untersuchungen, dass GroEL auch in der Lage ist, Proteine, die zu groß für die innere Kaverne sind, falten zu können (Houry et al., 1999; Chaudhuri et al., 2001). Die mitochondriale Aconitase (82 kDa) kann durch ATP-regulierte Zyklen von GroEL gebunden und durch die Anlagerung von GroES am entgegengesetzten GroEL Trans-Ring wieder abgegeben werden (Chaudhuri et al., 2001). Dieses System eignet sich somit für unseren Versuchsansatz, da es an der primären Faltung von Proteinen beteiligt ist. Somit wären durch eine Überexpression von GroE L/S in *E.coli* bessere Faltungsbedingungen gegeben, und die Wahrscheinlichkeit einer Aggregation könnte reduziert werden (Goloubinoff et al., 1989).

1.3.3 Die HSP20 Chaperonfamilie

Eine weitere Chaperonfamilie, die die Aggregation nach Faltung verhindern, sind die kleinen Hitzestressproteine (sHSP: *small heat stress protein*). Die HSP20-Familie besteht aus einem Vertreter in *Saccharomyces cerevisiae* (HSP26), 3-4 in Säugetieren und etwa 20 Vertretern in Pflanzen. In Pflanzen werden manche Vertreter der HSP20-Familie unter Hitzestressbedingungen massiv gebildet (Waters et al., 1996). Die Sequenzhomologie ist niedrig und auf einen Bereich von etwa 80 Aminosäuren im C-Terminus beschränkt. Dieser Bereich wird auch als α,β -Kristallindomäne bezeichnet und spiegelt eine evolutionäre Verbindung zwischen der HSP20-Familie und den Augenlinsen der Säugetiere wieder (Ingolia und Craig, 1982; Caspers et al., 1995). Interessanterweise kommt α,β -Kristallin in vielen Gewebetypen bei Säugetieren vor und zeigt eine erhöhte Expression unter Hitzestressbedingungen (Klemenz et al., 1991). Alle Mitglieder der HSP20-Familie bilden Oligomere in einer Größenordnung von 200-700 kDa (Ingolia und Craig, 1982; Bentley et al., 1992; Boyle und Takemoto, 1994; Chen et al., 1994; Lee et al., 1995) und zeigen eine ATP-unabhängige Chaperonaktivität (Horwitz, 1992; Jakob et al., 1993; Nicholl und Quinlan, 1994; Lee et al., 1995). Dabei konnte gezeigt werden, dass sie eine induzierte Proteinaggregation *in vitro* verhindern und *in vivo* in der Lage sind, Akkumulation von Proteinen, die unter Stress denaturiert wurden, zu stabilisieren (Jinn et al., 1993; Jinn et al., 1995; Forreiter et al., 1997). Die Gruppe der sHSP eignet sich sehr gut für unseren Versuchsansatz, da sie Proteine in einen faltungskompetenten Zustand halten und so die Wahrscheinlichkeit einer Aggregationsbildung verringern. Ein weiterer Vorteil der sHSP liegt darin, dass sie ATP-unabhängig arbeiten und die Wirtszelle nicht mit einem übermäßigen ATP-Verbrauch belasten.

1.3.4 Die HSP100 Chaperonfamilie

Die HSP100-Familie wurde durch die Charakterisierung der großen Untereinheiten des bakteriellen ClpP Proteasesystems und durch die Sequenzierung und Analysierung des HSP104 aus Hefe beschrieben (Gottesman et al., 1990; Parsell et al., 1991; Squires et al., 1991; Squires und Squires, 1992). Charakteristisch für die HSP100 Proteine sind zwei konservierte Domänen, die eine ATP-Bindestelle von etwa jeweils 200 Amino-

säuren beherbergen. Die Größe der Proteine variiert zwischen 78 und 100 kDa, je nach Größe der nichtkonservierten Bereiche zwischen den beiden Domänen, sowie durch zusätzliche C- und N-terminale Sequenzen. In Hefen und Pflanzen gibt es Hinweise für die Existenz von sowohl cytosolischen als auch organellen Formen der HSP100 Proteine (Parsell et al., 1991; Kiyosue et al., 1993; Leonhardt et al., 1993; Moore und Keegstra, 1993; Schirmer et al., 1994; Schmitt et al., 1995). Proteine der HSP100-Familie haben Chaperonaktivität und konnten in einigen Fällen sogar das HSP70/HSP40-System ersetzen (Sanchez et al., 1993; Wickner et al., 1994; Schmitt et al., 1995). Eine Besonderheit konnte durch das HSP104 aus Hefe gezeigt werden, welches imstande war, hitzeinaktivierte Luciferase wieder in Lösung zu bringen (Parsell et al., 1994). Weitere Untersuchungen in Hefe zeigten, dass HSP104 eine essentielle Komponente bei der Erholung von diversen Stressfaktoren (wie z.B. Hitzestress, Ethanol, jedoch nicht Schwermetalle) darstellt und dass diese Funktion durch das HSP101 aus *A.thaliana* übernommen werden kann (Sanchez und Lindquist, 1990; Sanchez et al., 1992; Schirmer et al., 1994). Da HSP100 nur langsam bereits bestehende Proteinaggregate entfaltet, nicht an der Faltung von Proteinen beteiligt ist und mit einem hohen Grad von ATP-Verbrauch einhergeht, ist es für unsere Problemstellung wenig geeignet. Aus diesem Grund wurde ihr Einsatz nur kurz getestet.

1.3.5 Das HSP90 Chaperonsystem

Erwähnt werden sollte noch das HSP90-Chaperonsystem. Das HSP90-Chaperonsystem wurde durch Sequenzvergleiche der Vertreter aus *E.coli* (HtpG), *Drosophila melanogaster* (HSP83), Hefe (HSP90) und des im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Glukose regulierten Proteins (GRP94) in Säugern charakterisiert (Hackett und Lis, 1983; Farrelly und Finkelstein, 1984; Kulomaa et al., 1986; Bardwell und Craig, 1987; Sorger und Pelham, 1987). Die Proteine der HSP90-Familie binden ATP und haben autophosphorylierende Eigenschaften (Csermely et al., 1993). Außerdem interagieren sie mit dem Aktin und Tubulin des Cytoskeletts in einem Ca^{2+} Calmodulin abhängigen Prozess und weisen eine Chaperonaktivität *in vitro* auf (Wiech et al., 1992). Andere Beispiele von charakteristischen HSP90 Eigenschaften sind die inaktiven Formen des cytosolischen Hormonrezeptors. Ursprünglich in Säugetierzellen gefunden (Dougherty et al., 1984; Sanchez et al., 1985), konnten solche Komplexe auch in *Drosophila melanogaster* und Wassermullchen gefunden werden (Brunt et al., 1990).

In Vertebraten ist der inaktive Hormonrezeptor an zwei Moleküle HSP90 und ein Molekül HSP56 gebunden. Um das Hormon zu aktivieren, wird ATP und eine Interaktion mit dem HSP70 Chaperonsystem benötigt (Hu et al., 1994; Kimura et al., 1995). Diese Chaperone sind für spezielle Proteine zugeschnitten und somit für diese Arbeit nicht relevant.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Synthese des Phytochrom-Chromophors in *E.coli*, um damit die gesamte Synthese von Holophytochrom in *E.coli* zu ermöglichen. Um *in vivo* assembliertes Holophytochrom aus *E.coli* zu erhalten, muss ein Phytochromgen (hier *cph1* aus *Synechocystis* PCC 6803) mit den entsprechend zusätzlich benötigten Genen (*ho* und *pcyA*) zur Expression gebracht und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Dabei wurde auch untersucht, ob das durch Sequenzvergleiche für die Chromophorbiosynthese gefundene PcyA auch tatsächlich den Chromophor Phycocyanobilin zu synthetisieren vermag. Die Bereitstellung von *in vivo* hergestelltem Holophytochrom ist eine wesentliche Voraussetzung in Bezug auf Methodik und stellt eine starke Verbesserung der Anwendungsmöglichkeiten dar.

Eine aufwendige Extraktion von Phycocyanobilin aus Cyanobakterien für eine *in vitro* Assemblierung mit dem Apoprotein entfällt, und es kann unmittelbar an den Ribosomen eine *in vivo* und nicht wie bisher eine *in vitro* Assemblierung stattfinden. Hierdurch sind bessere Faltungsbedingungen des Apoproteins durch eine Assemblierung mit dem Chromophor während und/oder unmittelbar nach der Translation gegeben. Die Löslichkeit von Cph1 wird durch die Assemblierung wesentlich erhöht (Lamparter und Hughes, unveröffentlicht). Wenn Cph1 bereits im rekombinanten Wirt assembliert, erhöht dies weiter seine Stabilität, was sich bei Kristallisationsversuchen positiv auswirken kann. Durch die Co-Expression von molekularen Chaperonen sollte zusätzlich das *in vivo* Löslichkeitsverhalten untersucht und das von Cph1 bekannte *in vitro* Aggregationsverhalten unterbunden werden.

Durch Expression in *E.coli* ist es möglich, Holophytochrommengen im Milligrammbereich aufzureinigen. Entsprechende Mengen aus *Synechocystis* PCC 6803 zu erhalten, wäre nicht zu bewerkstelligen. Nur in diesen Mengen kann Holophytochrom

für kristallographische Zwecke (3D-Strukturaufklärung) herangezogen werden, was für das Verständnis über die Funktion von Holophytochrom von entscheidender Bedeutung ist.

Zusätzlich wird durch die *in vivo* Bereitstellung von Holophytochrom in *E.coli* eine einfache *random mutagenesis* Untersuchung ermöglicht. Mittels eines zu etablierenden *high throughput screening* Verfahrens kann man dann eine hohe Zahl dieser Mutanten auf Peptid-Chromophor-Wechselwirkungen untersuchen. Erste Versuchsansätze wurden bereits getätigt.

Die Etablierung der *in vivo*-Assemblierung in *E.coli* ist zudem Vorarbeit für einen entsprechenden Ansatz in *S.cerevisiae*. In *S.cerevisiae* könnte man mittels des Hefe-2-Hybrid-Verfahrens Proteininteraktionspartner unter Berücksichtigung des Pr/Pfr-Zustandes ermitteln. Die bisher gefundenen putativen Phytochrom-Interaktionspartner wurden mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid Methode detektiert. In diesen Experimenten mussten allerdings Apophytochrom-Domänen statt Holophytochrom als Beute eingesetzt werden, wobei zentrale Eigenschaften des Photorezeptor-Moleküls fehlten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Enzyme und Chemikalien

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, BRD); Chemikalien in p.a.-Qualität von den Firmen Roth (Karlsruhe, BRD), Merck (Darmstadt, BRD) und Riedel-de Haën (Seelze, BRD) bezogen.

E. coli Stämme

Name	Hersteller	Genotyp
BL21PRO	Clontech (Palo Alto, CA, USA)	ompT, hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻), gal, dcm, F ⁻ ; beinhaltet tetR, P _{lacI} ^q /lacI, and Sp ^f auf einem autonom replizierendem Plasmid
DH5α-MCR	GibcoBRL (Karlsruhe, BRD)	F ⁻ mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)φ80dlacZΔM15Δ (lacZYA -argF) U169endA1 recA1 deoR thi-1 phoA supE44λ-gyrA96 relA1
DH5αPRO	Clontech (Palo Alto, CA, USA)	deoR, endA1, gyrA96, hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, Δ(lacZYA-argF)U169, φ80δ lacZΔM15, F ⁻ , λ ⁻ , P _{N25} /tetR, P _{lacI} ^q /lacI, Sp ^f .
TOP10F [']	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)	F ['] {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG
Tuner(DE3)pLacI	Novagen (Madison, WI, USA)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLacI (Cm ^R)
XL1-blue	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F ['] proAB lacI ^q ZAM15 Tn10 (Tet ^R)]

Tab. 2.1 Genotypen der *E. coli*-Stämme

Die Erläuterungen zu den Abkürzungen der bakteriellen Genotypen finden sich in Standardwerken (Sambrook und Russell, 2001), oder auf den Internetseiten der entsprechenden Anbieter.

Oligonukleotide

Name	Beschreibung	Länge (bp)	Oligo Sequenz
FL-03	<i>R. rattus ho-1</i> mit <i>KpnI</i> (forward)	24	5'-gcggtaccatggagcgcccacag-3'
FL-04	<i>R. rattus ho-1</i> mit <i>HindIII</i> (reverse)	26	5'-ggcgaagctttatgtctgggatgaac-3'

Name	Beschreibung	Länge (bp)	Oligo Sequenz
FL-41	pPROLar.A122 vor MCS (<i>forward</i>)	21	5'-gctcacaattatgatagattc-3'
FL-42	pPROLar.A122 hinter MCS (<i>reverse</i>)	21	5'-ctcaggagagcggtcaccgac-3'
FL-43	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i> mit <i>Bam</i> HI (<i>forward</i>)	21	5'-gcggatccat ggccgtcactg -3'
FL-44	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i> mit <i>Not</i> I (<i>reverse</i>)	25	5'-gcgcgccgcttatt ggataacatc -3'
FL-47	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> mit <i>Kpn</i> I (<i>forward</i>)	29	5'-gcggtaccat gagtgcaacttagcttc -3'
FL-48	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> mit <i>Hind</i> III (<i>reverse</i>)	26	5'-ggcgaagctt tagccttcggagggtg -3'
FL-51	<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9 mit <i>Hind</i> III (<i>forward</i>)	25	5'-gtaagcttat gtcactgatccaag -3'
FL-52	<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9 mit <i>Hind</i> III (<i>reverse</i>)	23	5'-gtaagctt taaccagagatctc -3'
FL-53	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho/pcyA</i> mit <i>Eco</i> R I, (<i>forward</i>)	28	5'-cagaattc ataagaggagaaaggtac -3'
FL-54	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho/pcyA</i> mit <i>Pst</i> I, <i>Not</i> I (<i>reverse</i>)	23	5'-gatctgcaggcgccgctt attg -3'
FL-55	Sequenzierung von <i>ho/pcyA</i>	21	5'-cgcaagctatgaatgatctg-3'
FL-58	<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9 mit <i>Bam</i> HI (<i>forward</i>)	50	5'-cggatcc ataagaggagaaaggtaccatgtcac tgatccaagaatc -3'
FL-59	<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9 mit <i>Not</i> I (<i>reverse</i>)	36	5'-cggagcggccgct taaccagagatctcaatggactt -3'
FL-60	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> (Stop zu Gln)	27	5'-gggatccaagcttct gccttcggagg -3'
FL-65	<i>E.coli</i> (XL1-blue) <i>groES</i> mit <i>Kpn</i> I (<i>forward</i>)	30	5'-gggtaccatgaat atcgtccattgcatg -3'
FL-66	<i>E.coli</i> (XL1-blue) <i>groES</i> mit <i>Not</i> I (<i>reverse</i>)	31	5'-ccgcgccgct tacgcttcaacaattgccag -3'
FL-67	<i>E.coli</i> (XL1-blue) <i>groEL</i> mit <i>Not</i> I und <i>Nde</i> I (<i>forward</i>)	50	5'-ccgcgccgct taagaggagaaacatattggcagc taagacgtaaaatt -3'
FL-68	<i>E.coli</i> (XL1-blue) <i>groEL</i> mit <i>Pac</i> I (<i>reverse</i>)	30	5'-ccttaatta atcatcatgccgcccattgc -3'
FL-69	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i> , (<i>forward</i>)	50	5'-gcggatcc ataagaggagaaaccgggcatggc cgctcactgattaaag -3'

Tab. 2.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide
Gensequenzen sind **fett**, Ribosomen-Bindestellen *kursiv* dargestellt.

Expressionsvektoren

Der Expressionsvektor pPROLar.A122 stammt von der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA). Er besitzt eine Kanamycin Resistenz (Neomycin-Phosphotransferase-Gen) und einen p15A Replikationsursprung (ori). Die Proteinexpression wird über einen Hybridpromotor mit Isopropylthiogalactosid und Arabinose gesteuert. Eine detaillierte Darstellung von pPROLar.A122 mit seinen wichtigsten Merkmalen befindet sich bei den [Plasmidkarten](#) im [Anhang](#).

Der Expressionsvektor pQE12 stammt von der Firma Qiagen (Hilden, BRD). Er besitzt eine Ampicillin Resistenz (β -Lactamase-Gen) und einen ColE1 Replikationsursprung (ori). Die Proteinexpression wird über einen T5 Promotor/*lac*-Operator-Element mit Isopropylthiogalactosid gesteuert. Eine detaillierte Darstellung von pQE12 mit seinen wichtigsten Merkmalen befindet sich bei den [Plasmidkarten](#) im [Anhang](#).

Der Expressionsvektor pPROLar.A122 kann aufgrund der verschiedenen ori und Resistenzmarkern mit dem Expressionsvektor pQE12 co-exprimiert werden.

2.2 Methoden

2.2.1 *Standardmethoden*

Molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeitstechniken wurden nach Standardmethoden (Sambrook und Russell, 2001) oder nach Herstellerangaben durchgeführt. Optimierte Arbeitsprotokolle werden unter [2.2.2](#) beschrieben.

Spektrophotometrische Messungen

Die spektrophotometrischen Messungen wurden an einem UV-Visible Diodenarray-spektralphotometer 8453 der Firma Agilent mit 100 ms bei 1 nm Auflösung durchgeführt. Für die Aufnahme eines Spektrums wurde die Basislinie in TES- β (50 mM Tris, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure, 300 mM NaCl, β -Mercaptoethanol (1/10000 v/v); pH 7.8) gefahren. Nach Bestrahlung mit der entsprechenden Lichtqualität (Hellrot: 658 ± 10 nm, oder Dunkelrot: 730 ± 12 nm) konnte das absolute Spektrum

über einen Wellenlängenbereich von 250-800 nm gemessen werden. Für die Aufnahme eines Differenzspektrums wurde die Probe mit dunkelrotem Licht bestrahlt. Daraufhin wurde eine Basislinie gefahren. Nach Bestrahlung mit hellrotem Licht konnte das Differenzsignal über einen Wellenlängenbereich von 600-800 nm gemessen werden.

Chloroformextraktion von Pigmenten

Um Biliverdin IX α oder Phycocyanobilin aus dem Überstand der Bakterien nach Aufschluss zu isolieren, wurde eine Chloroformextraktion durchgeführt. Dazu wurden 2 ml des klarifizierten Überstandes mit 0.6 ml Essigsäure und 1.6 ml 6 M HCl angesäuert. Nach Zugabe und Schütteln von 1.5 ml Chloroform wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 4000 g zentrifugiert. Die in die organische Phase übergegangenen Pigmente konnten nun abgezogen und für Messungen verwendet werden (Ishikawa et al., 1991). Bei Bedarf wurden die Mengen entsprechend angepasst.

Zink-Fluoreszenz

Nach Proteinauftrennung in einer SDS-PAGE, wurde das Acrylamidgel für 15 Minuten in einer 1 mM Zinkacetatlösung inkubiert. Offenkettige Tetrapyrrole binden Zn²⁺, indem sie eine engumschlungene Helix um das hydratisierte Ion bilden. Um Holo-phytochrom zu visualisieren, wurde das Gel mit einem UV-B Transilluminator bestrahlt (Berkelman und Lagarias, 1986; Lamparter et al., 1997). Die resultierende Fluoreszenz konnte mit einer Digitalkamera (Nikon CoolPix 995), welcher ein Interferenzfilter ($\lambda = 593$ nm) aufgesetzt war, dokumentiert werden.

Quantifizierung von Phycocyanobilin

Um Phycocyanobilin zu quantifizieren, wurde eine 1/1000-Verdünnung (v/v) des aufgereinigten Phycocyanobilin mit einer frisch zubereiteten 2%-methanolischen-HCL Lösung (1 Teil 35%-HCl und 19 Teile Methanol) angesetzt. Nachdem eine Basislinie von 500-800 nm mit der 2%-methanolischen-HCL Lösung gefahren worden war, konnte Phycocyanobilin gemessen werden. Das Maximum des Extinktionskoeffizienten sollte bei 580 nm liegen und entspricht: $y=38 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cole et al., 1967).

2.2.2 *optimierte Methoden*

Proteinexpression

Bakterien wurden aus einem Glycerolstamm auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht in einem 37°C-Brutschrank inkubiert. Eine Bakterienkolonie wurde in 5 ml LB überführt und bei 37°C über Nacht unter starkem Schütteln (270 Umdrehungen pro Minute) angezogen. Am Tag der Induktion wurde eine entsprechende Menge LB mit 1/200 der über Nacht Bakterienkultur beimpft und bei 37°C geschüttelt. Nach Erreichen einer OD₅₅₀ von 0.6-0.9 wurde die Proteinexpression induziert, nachdem die Bakterienkultur auf <18°C abgekühlt und ein Aliquot als Kontrolle abgenommen worden war. Induziert wurde, bei den auf pQE12 basierenden Plasmiden mit 1mM Isopropylthiogalactosid, während die auf pPROLar.A122 basierenden Plasmide mit 1mM Isopropylthiogalactosid und 0.2% (w/v) Arabinose (jeweils Endkonzentrationen) induziert wurden. Daraufhin wurde die Bakterienkultur für 18-20 Stunden im Dunkeln geschüttelt.

Ernten und Aufschluss der Bakterienkultur

Zum Ernten wurde die Bakterienkultur mit 3000xg bei 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet anschließend mit TES-β (50 mM Tris, 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure, 300 mM NaCl, β-Mercaptoethanol (1/10000 v/v); pH 7.8) gewaschen und in TES-β resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit zwei Durchgängen bei 16000 psi in einer *French-Pressure-Cell*. Anschließend wurde der lösliche Überstand von den Zelltrümmern bei 50000xg, 4°C für 20 Minuten getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und konnte für die Messung eines Differenzspektrum oder für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie herangezogen werden.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Der Überstand wurde mit RNase (2.4 µg pro ml induzierter Bakterienkultur) für 30 Minuten bei 4°C behandelt. Anschließend folgte eine Ammoniumsulfatfällung (1 Vol. Probe + 3 Vol. Ammoniumsulfatlösung (3.3 M NH₄SO₄⁻, 5 mM Ethylendiamintetra-

essigsäure, 50 mM Tris; pH 7.8) für mindestens 3 Stunden, wahlweise über Nacht bei 4°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (25000xg, 4°C, 20 Minuten) konnte das präzipitierte Protein in TSI⁴⁰- β (Tris 50 mM, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, β -Mercaptoethanol (1/10000 v/v); pH 7.8) aufgenommen und auf eine entsprechend äquilibrierte Ni-NTA-Agarosesäule gegeben werden. Anschließend wurde mit dem 10-fachen Säulenvolumen TSI⁴⁰- β die Ni-NTA-Säule gewaschen. Das aufgereinigte Protein wurde mit TSI³⁰⁰- β (Tris 50 mM, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol, β -Mercaptoethanol (1/10000 v/v); pH 7.8) von der Ni-NTA-Säule eluiert. Da das Imidazol die spektroskopischen Messungen durch Eigenabsorption im UV-Bereich stören würde, wurde eine weitere Ammoniumsulfatfällung, wie oben beschrieben, durchgeführt. Nach Zentrifugation (25000xg, 4°C, 20 Minuten) wurde das Protein in TES- β resuspendiert und stand nun für weitere Analysen, insbesondere spektroskopische Messungen, zur Verfügung.

Zielgerichtete Mutagenese (*Site-Directed-Mutagenesis*)

Für die zielgerichtete Mutagenese wurde das entsprechende Plasmid mittels PCR mit zwei Oligonukleotiden, deren 3'-Enden in entgegengesetzte Richtungen weisen und deren 5'-Enden auf benachbarten Nukleotidpositionen sind, neu amplifiziert. Die gewünschte(n) Mutation(en) wurden in einem der Oligonukleotide eingefügt. Das PCR-Amplifikat wurde einem DpnI-Verdau (verdaut nur dam-methyliertes Substrat, d.h. die Plasmid-Matrize jedoch nicht das PCR-Produkt) unterzogen, um Hintergrundkolonien bei der abschließenden Transformation zu verringern. Die Plasmid-Matrize musste dazu in einem *E.coli*-Stamm propagiert werden, welcher Dam⁺ Eigenschaften besitzt. Um Überhänge zu entfernen, wurde das über Gelextraktion aufgereinigte PCR-Produkt mit einer 3'-5'-Exonukleaseaktivität ausgestatteten T4-DNA-Polymerase inkubiert. Phosphatgruppen wurden mittels einer Polynukleotidkinase Behandlung wieder angefügt. Das so entstandene lineare Plasmid konnte nun ligiert und in einen *E.coli*-Stamm der Wahl transformiert werden.

Klonierungsstrategien

Aus genomischer DNA bzw. Plasmid wurde das entsprechende Gen mittels PCR (siehe [Tab. 2.3](#)) amplifiziert. Über die verwendeten Oligonukleotide (siehe [Tab. 2.2](#)) wurden

die entsprechenden Schnittstellen eingebracht. Das Amplifikat wurde über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, unter einer UV-B Handlampe ausgeschnitten und mit einem *Qiagen Gel Extraktion Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das aufgereinigte Amplifikat und der jeweilige Expressionsvektor wurden daraufhin mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt. Das PCR-Amplifikat wurde daraufhin nochmals aufgereinigt (*Qiagen PCR Purification Kit*). Der Expressionsvektor wurde nach dem Restriktionsverdau zusätzlich mit alkalischer Phosphatase (nach Angaben des Herstellers: New England Biolabs) behandelt und ebenfalls über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mit einem *Qiagen Gel Extraktion Kit* aufgereinigt. Nach einem Agarose-Quantifizierungsgel wurde eine Ligation mit 100 ng Vektor und der äquimolaren Menge an *Insert* (10 Minuten Ligationsansatz nach Herstellerangaben: New England Biolabs) durchgeführt und der Ligationsansatz in *E.coli* transformiert. Positive Konstrukte wurden mittels *Colony-PCR* und Restriktionsanalyse ermittelt.

Polymerase-Kettenreaktionen

Amplifikat	Matrize	Polymerase	Primer	Reaktionsbedingungen
<i>R.rattus</i> <i>ho-1</i>	pBAHO	Taq (Qiagen)	FL-03 FL-04	(30s/94°C, 30s/55°C, 60s/72°C) x 20
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i> (slr 0116)	<i>Syn.</i> genom. DNA	Pfu (Stratagene)	FL-43 FL-44	(30s/94°C, 30s/55°C, 90s/72°C) x 50
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> (sll 1184)	<i>Syn.</i> genom. DNA	Pfu (Stratagene)	FL-47 FL-48	(30s/94°C, 30s/65°C, 60s/72°C) x 25
<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9	pII-2/98	Taq (Qiagen)	FL-51 FL-52	(45s/94°C, 45s/55°C, 60s/72°C) x 30
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i>	p45	TaKaRa Ex (BioWhittaker)	FL-53 FL-54	(30s/94°C, 30s/55°C, 90s/72°C) x 30
<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9	p71	Taq (Qiagen)	FL-58 FL-59	(45s/94°C, 45s/59°C, 60s/72°C) x 35
<i>E.coli</i> <i>groES</i>	<i>E.coli</i> (XL1-blue)	TaKaRa Ex (BioWhittaker)	FL-65 FL-66	(30s/94°C, 30s/60°C, 60s/72°C) x 30
<i>E.coli</i> <i>groEL</i>	<i>E.coli</i> (XL1-blue)	TaKaRa Ex (BioWhittaker)	FL-67 FL-68	(30s/94°C, 30s/60°C, 120s/72°C) x 30
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i>	p77	TaKaRa Ex (BioWhittaker)	FL-69 FL-44	(30s/94°C, 30s/55°C, 60s/72°C) x 20

Tab. 2.3 Polymerase-Kettenreaktionsbedingungen
Alle Reaktionsbedingungen hatten einen anfänglichen Zyklus von 120s/94°C.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von Holophytochrom in *Escherichia coli*

Wie bereits in der Einleitung (siehe 1.2.3) erwähnt wurde, wird eine Häm-Oxygenase benötigt um aus Häm die Zwischenstufe Biliverdin IX α zu gewinnen. Biliverdin IX α dient als Substrat für Biliverdin IX α -Reduktasen, welche Biliverdin IX α zu einem entsprechenden Chromophor umwandeln können. Der Chromophor wiederum kann mit einem entsprechenden Phytochrom Apoprotein autokatalytisch assemblieren, was die Bildung von Holophytochrom zur Folge hat. In dieser Arbeit soll das Phytochrom Apoprotein Cph1 mit einer Häm-Oxygenase und Biliverdin IX α -Reduktase (PcyA) in *E.coli* co-exprimiert werden, um *in vivo* gebildetes Holophytochrom zu erhalten.

3.1.1 Klonierung und Expression von HO-1, PcyA und Cph1

Freundlicherweise wurde von A. Wilks ein Plasmid (pBAHO30), welches das Gen für eine lösliche (verkürzte) Häm-Oxygenase 1 (HO-1) aus *R.rattus* beinhaltet, zur Verfügung gestellt (Wilks und Ortiz de Montellano, 1993). Aus pBAHO30 konnte mittels PCR (siehe Tab. 2.3) *ho-1* amplifiziert und kloniert werden (siehe 2.2.2). [Abbildung 3.01](#) gibt die Klonierungsstrategie von dem entstandenen Plasmid p6 wieder.

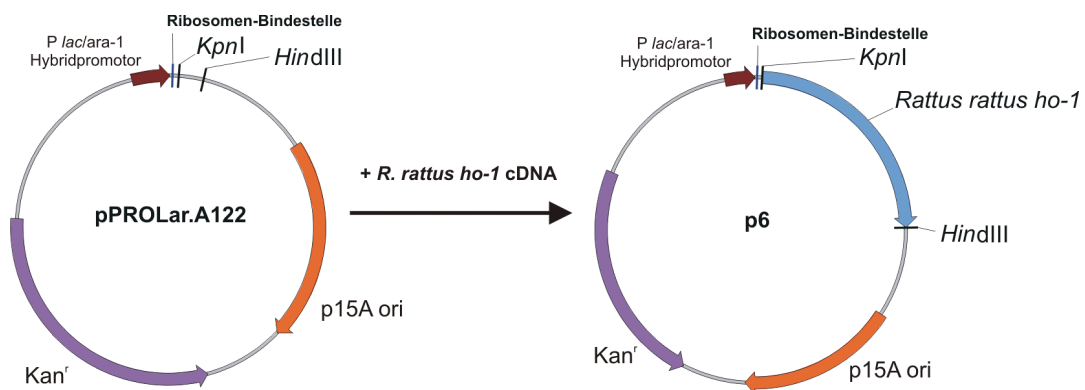


Abb. 3.01 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p6
R.rattus ho-1 wurde in pPROLar.A122 über *KpnI/HindIII* kloniert.

Nach Anzucht von p6 in *E.coli* (DH5 α PRO) konnte nach Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2), wie bei Wilks und de Montellano (1993) beschrieben, bei 37°C eine grünliche Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden. Dies wird als Beleg für die enzymatische Aktivität von *R.rattus* HO-1 angesehen und beruht auf einer Akkumulierung von Biliverdin IX α . Eine Expression der *R.rattus* HO-1 (~31 kDa) konnte in einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE jedoch nicht beobachtet werden (siehe Abb. 3.03).

Das Gen der Biliverdin IX α -Reduktase PcyA konnte aus genomischer *Synechocystis* PCC 6803 DNA mittels PCR (siehe Tab. 2.3) mit den Oligonukleotide FL-43/FL-44 (siehe Tab. 2.2) amplifiziert und kloniert werden (siehe 2.2.2). Das entstandene Plasmid wurde p8 benannt (siehe Abb. 3.02).

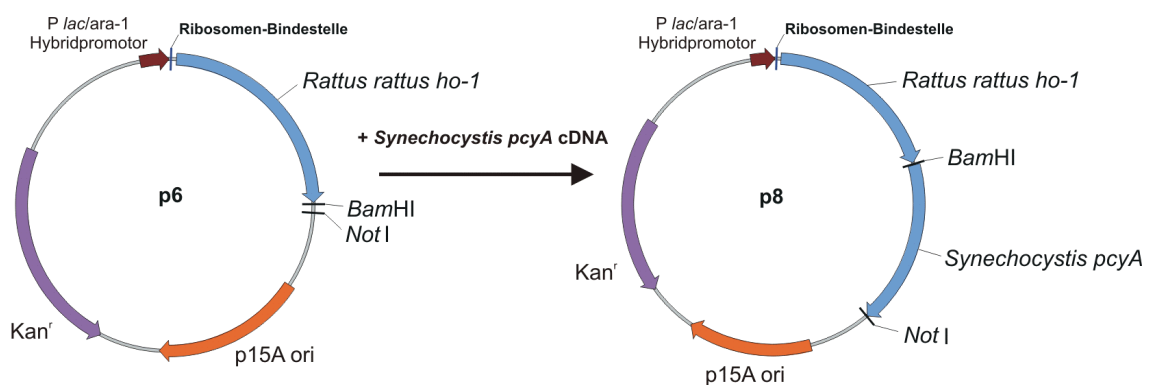


Abb. 3.02 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p8

Synechocystis PCC 6803 *pcyA* wurde bicistronisch hinter *R.rattus ho-1* in p6 über *Bam*HI/*Not*I kloniert.

Das Plasmid p8 wurde in *E.coli* (DH5 α PRO) transformiert und bei 37°C angezogen. Wie bei der Expression von HO-1 aus p6 wurde eine grünlich bis türkise Färbung der Bakterienkultur nach Induzierung der Proteinexpression von HO-1 und PcyA aus p8 beobachtet. Es konnte jedoch keine Expression von HO-1 (~31 kDa) und PcyA (~28 kDa) in einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE beobachtet werden (siehe Abb. 3.03), obwohl aufgrund der Färbung der Bakterienkultur eine Enzymaktivität anzunehmen war.

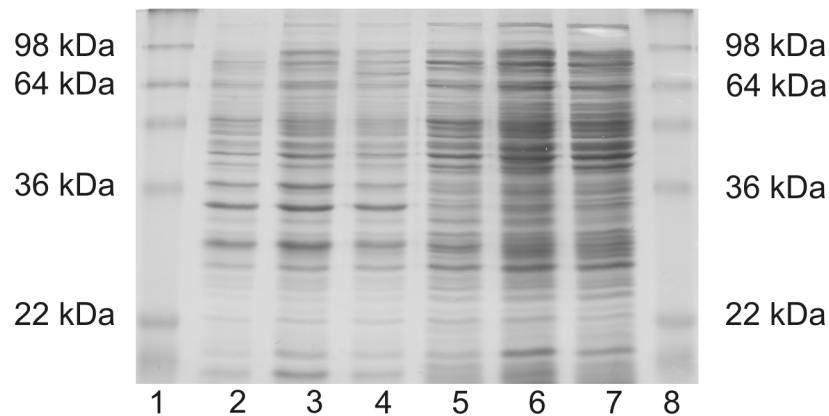


Abb. 3.03 SDS-PAGE von HO-1 und PcyA

Coomassie-Färbung. Marker (1/8); *E. coli* (DH5 α PRO) (Pellet: 2, Überstand: 5); HO-1 aus p6 (Pellet: 3, Überstand: 6); HO-1/PcyA aus p8 (Pellet: 4, Überstand: 7).

Um Holophytochrom in *E. coli* herzustellen, musste eine Co-Expression mit Apo-Cph1 erfolgen. *Synechocystis* PCC 6803 *cph1* (Hughes et al., 1997) in dem pQE12-basierten Expressionsplasmid **pF10-His** (Lamparter et al., 1997) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt (siehe Abb. 3.04). Apo-Cph1 ist mit einem sogenannten C-terminalen His₆-Tag versehen. Der His₆-Tag besteht aus 6 Histidinen, welche durch Komplexbildung an Ni-NTA-Agarose binden können. Ein Protein mit einem His₆-Tag kann somit von anderen Proteinen aufgereinigt werden.

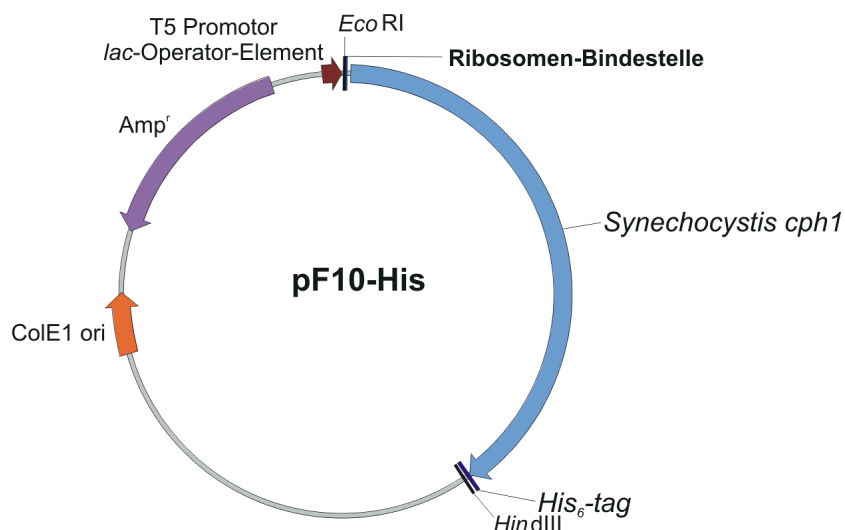


Abb. 3.04 Plasmidkarte von pF10-His

Die Plasmide **pF10-His** (*cph1*; siehe Abb. 3.04) und **p8** wurden in *E. coli* (XL1-blue) co-transformiert und nach Induktion der Proteinexpression bei 22°C inkubiert. Es

wurde eine Temperatur unter 37°C gewählt um die Löslichkeit von Apo-Cph1 zu gewährleisten. Frühere Expressionsstudien hatten gezeigt, dass Apo-Cph1 bei 37°C in sogenannte *inclusion bodies* unlöslich ausfällt. Auffällig war, dass sich die Bakterienkultur nach Induzierung der Proteinexpression von Apo-Cph1, HO-1 und PcyA nicht türkis färbte. Nach Aufschluss der Bakterien wurde ein Differenzspektrum (siehe 2.2.1) gemessen, es konnte jedoch kein Differenzsignal detektiert werden. Um die Assemblierungsfähigkeit des gebildeten Apo-Cph1 zu überprüfen, wurden 3 nmol Phycocyanobilin (freundlicherweise von N. Michael, FU-Berlin zur Verfügung gestellt) zugegeben und nach 10 Minuten Inkubationszeit (autokatalytische Assemblierung *in vitro*) ein weiteres Differenzspektrum gemessen. Wie Abb. 3.05 wiedergibt, ist das vorhandene Apo-Cph1 in der Lage mit zur Verfügung gestelltem Phycocyanobilin zu assemblieren, was sich in der Messbarkeit eines Differenzsignals ausdrückt.

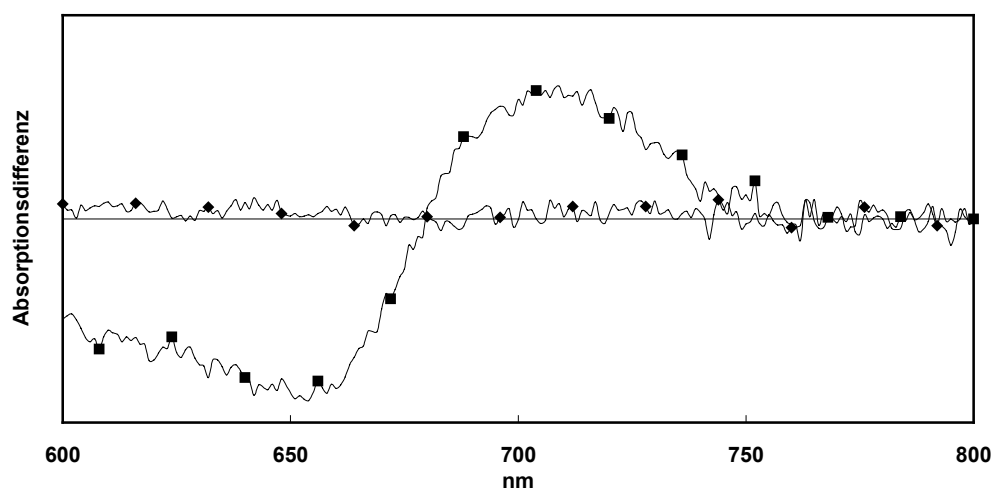


Abb. 3.05 Co-Expression von pF10-His/p8
Differenzspektrum der bei 22°C induzierten Proteine. Gemessener Überstand (◆), sowie nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin (■).

Das Ausbleiben der türkisen Färbung (Biliverdin IX α bzw. Phycocyanobilin Synthese) durch die induzierten Proteine in der Bakterienkultur wurde weiter untersucht. Bei den Temperaturbereichen von 18-24°C konnte keine Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden, jedoch war nach *in vitro*-Zugabe von Phycocyanobilin zu dem Überstand ein Differenzsignal messbar. Bei Temperaturbereichen von 25-37°C konnte eine türkise Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden. In diesen Temperaturbereichen konnte jedoch nach Aufschluss der Bakterienkultur vom Überstand kein Differenzsignal (auch nicht nach Zugabe von Phycocyanobilin *in vitro*) gemessen

werden. Um zu ermitteln, ob es sich bei der beobachteten enzymatischen Aktivität der induzierten Proteine aus p8 in den Temperaturbereichen von 25-37°C um Biliverdin IX α oder Phycocyanobilin handelte, wurden die Überstände von pF10-His (18°C) und p8 (30°C) zusammengeführt und nach einer 10-minütigen Inkubationszeit ein Differenzspektrum (siehe 2.2.1) gemessen (siehe Abb. 3.06).

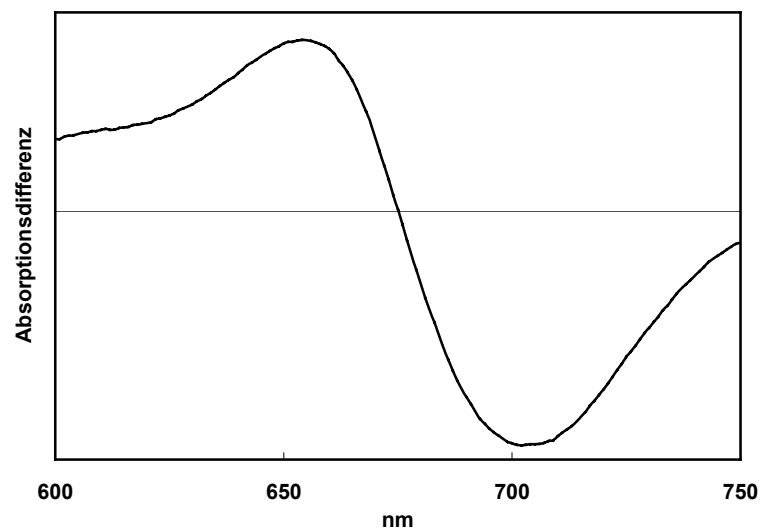


Abb. 3.06 Differenzspektrum von Holo-Cph1 (*in vitro* assembliert)
Eine bei 18°C (nach Proteinexpression) inkubierte pF10-His Bakterienkultur wurde mit einer (nach Proteinexpression) bei 30°C inkubierten p8 Bakterienkultur vereinigt und ein Differenzspektrum gemessen.

Da Biliverdin IX α nicht in der Lage ist mit Apo-Cph1 zu assemblieren (Lamparter et al., 1997; Bhoo et al., 2001), musste das von HO-1 und PcyA gebildete Endprodukt Phycocyanobilin sein. Die unterhalb von 25°C fehlende Färbung der Bakterienkultur nach Induktion der Proteinexpression (p8) ist vermutlich auf eine zu schwache enzymatische Aktivität der *R.rattus* HO-1 in diesen Temperaturbereichen zurückzuführen. Nachfolgend wurde das Löslichkeitsverhalten von Apo-Cph1 nach Induktion der Proteinexpression bei verschiedenen Temperaturen ermittelt. Dadurch sollte ein „offenes Fenster“ für die Co-Expression von Apo-Cph1 mit HO-1 und PcyA ermittelt werden. Wird die Proteinexpression von Apo-Cph1 aus pF10-His induziert (siehe 2.2.2) und nach 18 Stunden aufgearbeitet, ergibt sich folgendes Gesamtproteinmuster in einer Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE (siehe Abb. 3.07). Im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle ist bei der induzierten Probe eine deutliche Expression von einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~85 kDa zu sehen.

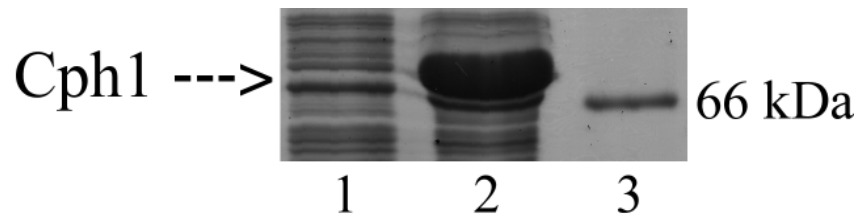


Abb. 3.07 Gesamtproteinmuster von Apo-Cph1 bei 18°C induziert
Coomassie-Färbung von SDS-PAGE. Nicht induzierte Kontrollkultur (1), induzierte Kultur (2) und Marker (3).

Nachdem Apo-Cph1 bei verschiedenen Temperaturen exprimiert worden war, ergab sich folgender Sachverhalt: Um Apo-Cph1 löslich im Überstand zu erhalten, musste die Bakterienkultur in einem Temperaturbereich zwischen 18-24°C nach Induktion der Proteinexpression inkubiert werden. Die Löslichkeit von Apo-Cph1 nimmt mit ansteigender Temperatur zunehmend ab. Bei 30°C ist fast das gesamte gebildete Apo-Cph1 in der unlöslichen Fraktion (*Pellet*) zu finden (siehe Abb. 3.08).

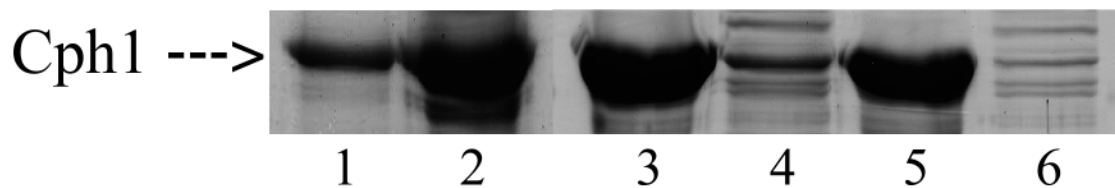


Abb. 3.08 Apo-Cph1 bei diversen Temperaturen induziert
Coomassie-Färbung von SDS-PAGE. 18°C: *Pellet* (1), Überstand (2); 25°C: *Pellet* (3), Überstand (4); 30°C: *Pellet* (5), Überstand (6).

Die Bildung von löslichen Apo-Cph1 ließ sich auch anhand einer Differenzsignal-Messung (siehe 2.2.1) zeigen. Nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin zu dem bei 25°C bzw. 30°C gebildetem Apo-Cph1 ließ sich bei 25°C noch ein schwaches Differenzsignal messen, was jedoch bei 30°C nicht mehr der Fall war (siehe Abb. 3.09). Daraus ergibt sich dass bei 25°C noch geringe Mengen von löslichen Apo-Cph1 vorhanden waren, während bei 30°C kein lösliches Apo-Cph1 mehr gebildet wurde.

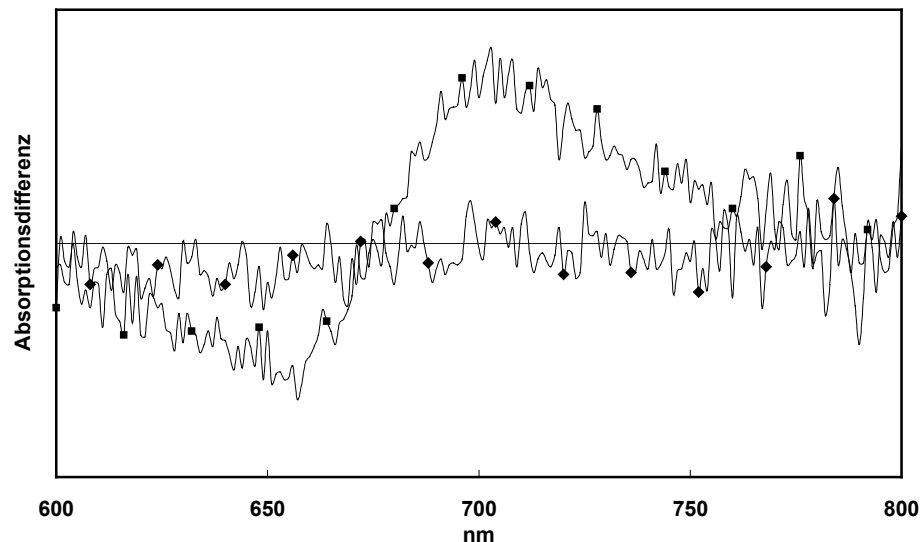


Abb. 3.09 Differenzspektrum von Cph1 bei 25°C und 30°C
Differenzsignale aus einer 25°C-Kultur (■) und 30°C-Kultur (◆) nach Zugabe von jeweils 3 nmol Phycocyanobilin.

Anhand dieser Messungen konnte gezeigt werden, dass kein „offenes Fenster“ für die Co-Expression von Apo-Cph1, HO-1 und PcyA existiert. Apo-Cph1 war in den Temperaturbereichen von 25-37°C unlöslich, in denen eine enzymatische Aktivität von HO-1 und PcyA durch Bildung von Phycocyanobilin (Färbung) nachgewiesen werden konnte.

3.1.2 Klonierung und Expression von HO, PcyA und Cph1

Eine Häm-Oxygenase (HO) aus *Synechocystis* PCC 6803 (sll1184) wurde erstmals 1998 beschrieben (Cornejo et al., 1998). Die Umgebungstemperatur im Lebensbereich von *Synechocystis* PCC 6803 liegt wesentlich niedriger (25°C) als die der Körpertemperatur von *R.rattus* (37°C). Eine Häm-Oxygenase aus *Synechocystis* PCC 6803 könnte somit unter den hier verwendeten Expressionstemperaturen enzymatisch ausreichend aktiv sein. Um die Verwendbarkeit der *Synechocystis* PCC 6803 Häm-Oxygenase (HO) zu überprüfen, wurde die Gensequenz mittels PCR aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden FL-47/FL-48 (siehe Tab. 2.2) amplifiziert (siehe Tab. 2.3) und das Amplifikat kloniert (siehe 2.2.2). Das entstandene Plasmid wurde p40 benannt (Abb. 3.10).

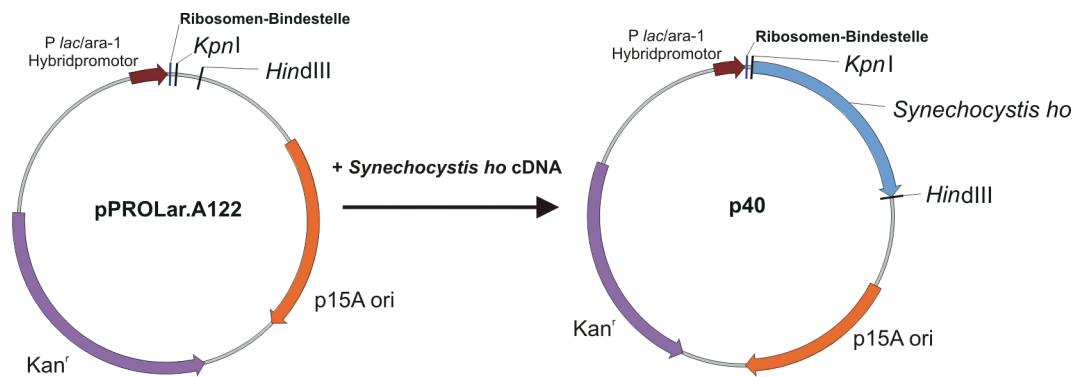


Abb. 3.10 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p40
Synechocystis PCC 6803 *ho* wurde in pPROLar.A122 über *KpnI/HindIII* kloniert.

Nach erfolgter Anzucht und Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2) konnte in den Temperaturbereichen von 18-37°C eine grünliche Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden, was als vorläufiger Beweis für die Akkumulierung von Biliverdin IX α gelten konnte. In einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE konnte jedoch keine Expression der Häm-Oxygenase bei ~27 kDa beobachtet werden (siehe Abb. 3.11).

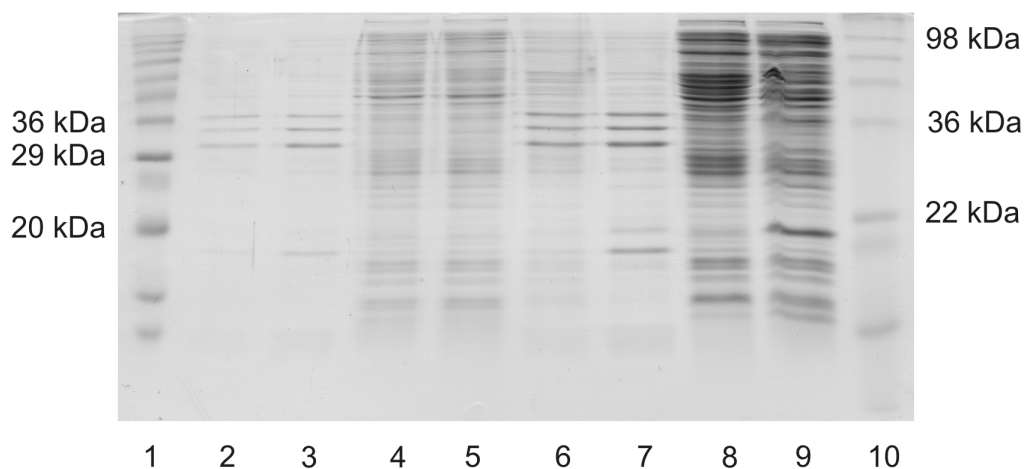


Abb. 3.11 SDS-PAGE von HO aus p40
 Coomassie-Färbung. Marker: 1 und 10; 18°C *Pellet* (nicht induziert: 2, induziert: 3); 18°C *Überstand* (nicht induziert: 4, induziert: 5); 24°C *Pellet* (nicht induziert: 6, induziert: 7); 24°C *Überstand* (nicht induziert: 8, induziert: 9)

Das *pcyA*-Gen aus p8 wurde durch einen Restriktionsendonukleaseverdau mit *BamHI* und *NotI* ausgeschnitten und über ein Agarosegel gereinigt. Das Plasmid p40 wurde ebenfalls mit *BamHI* und *NotI* verdaut, anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt und über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 2.2.2). Die so gewonnenen Fragmente wurden ligiert und in *E.coli* (XL1-blue) transformiert. Nach Überprüfung

der positiven Konstrukte (*Colony-PCR* und Restriktionsanalyse) wurde das entstandene Plasmid p45 benannt (siehe Abb. 3.12).

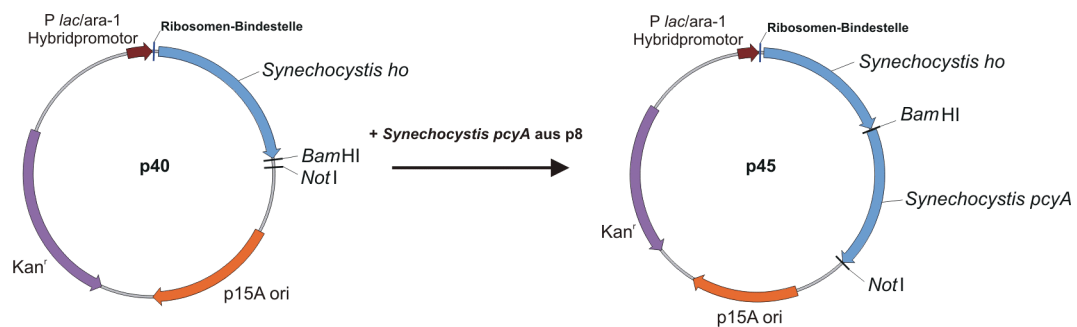


Abb. 3.12 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p45

Synechocystis PCC 6803 *pcyA* wurde bicistronisch in p40 hinter *ho* über *Bam*HI/*Not*I kloniert.

Nach erfolgter Co-Transformation der Plasmide p45 und pF10-His in *E.coli* (XL1-blue) wurden diese nach Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2) bei 18°C für 18 Stunden inkubiert. Durch die Co-Expression von Apo-Cph1 mit HO und PcyA konnte eine deutliche türkise Färbung der Bakterienkultur festgestellt werden. Die nicht induzierte Kontrollkultur hatte die übliche beige/gelbliche Färbung (siehe Abb. 3.13).

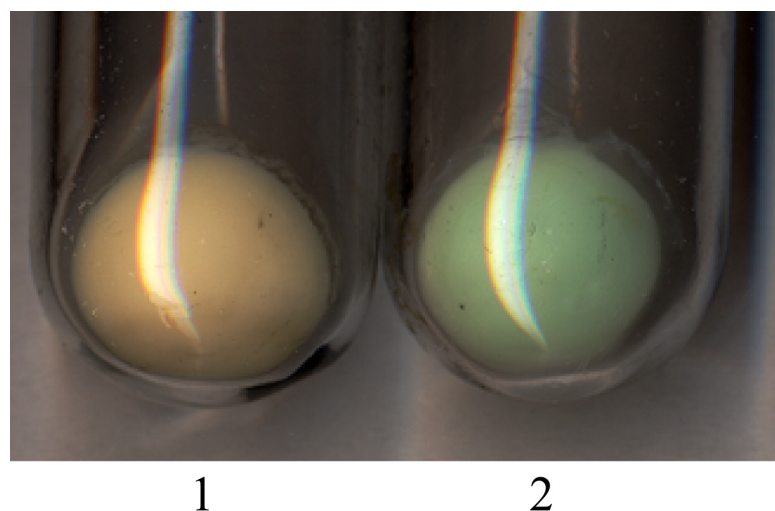


Abb. 3.13 Holophytochrom in *E.coli* (XL1-blue)

pF10-His/p45 Pellets. Nicht induzierte Kontrollkultur (1) und Isopropylthiogalactosid/Arabinose induzierte Kultur (2).

Diese ersten Hinweise auf die erfolgreiche Expression von rekombinanten Holo-Cph1 in *E.coli* wurden durch weitere Untersuchungen bestätigt. Ein Aliquot der Bakterien wurde einer SDS-PAGE unterzogen, von dem Gel eine Zink-Fluoreszenz (siehe 2.2.1)

angefertigt und die Fluoreszenz dokumentiert. Anschließend wurde das Gel einer Coomassie-Färbung unterzogen. Die korrelierenden Ergebnisse sind in Abbildung 3.14 dargestellt.

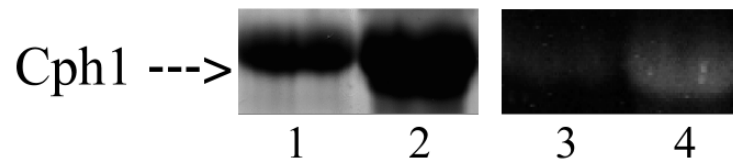


Abb. 3.14 SDS-PAGE und Zink-Fluoreszenz von Holo-Cph1
Proteinexpression bei 22°C. Coomassie-Färbung von *Pellet* (1) und Überstand (2); Zink-Fluoreszenz von *Pellet* (3) und Überstand (4).

Die Bakterien wurden aufgeschlossen und Holo-Cph1 mit Hilfe des angehängten His₆-Tag über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.2) aufgereinigt. Das nunmehr von anderen Proteinen aufgereinigte Holophytochrom konnte spektroskopisch analysiert werden (Abb. 3.15).

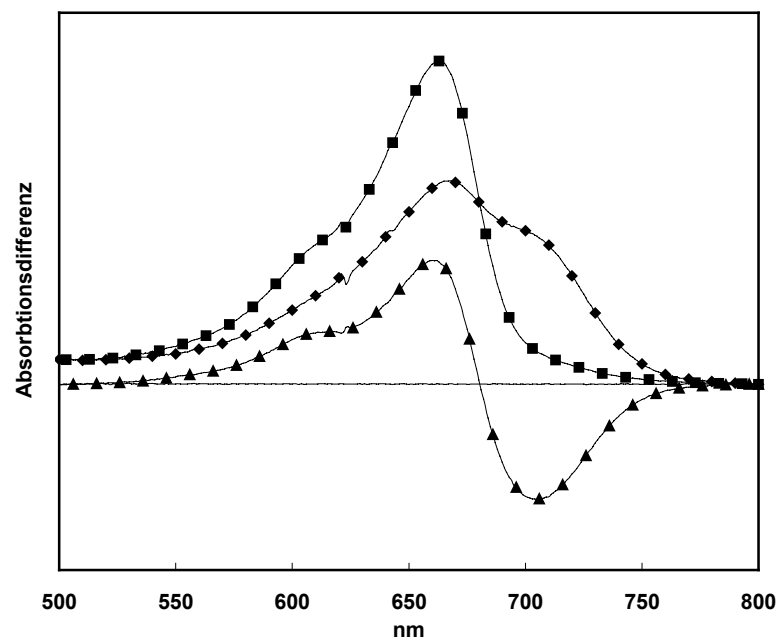


Abb. 3.15 Absorptionsspektren von *in vivo* assembliertem Holo-Cph1
Co-Expression von pF10-His/p45; nach Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Spektren nach Dunkelrot- (■) und Rot-Bestrahlung-(◆); zusammen mit dem korrespondierendem Differenzspektrum (▲).

Durch Co-Expression von pF10-His und p45 war es nun erstmals gelungen, *in vivo* assembliertes Holophytochrom in größeren Mengen in *E.coli* herzustellen. Allerdings

fiel bei näherer Betrachtung des Spektrums eine hypsochrome (Blau-) Verschiebung im Vergleich zu *in vitro* assemblierten Holophytochrom auf (Abb. 3.16). Um diese Auffälligkeit näher zu untersuchen, wurde Apo-Cph1 mit 3 nmol Phycocyanobilin versetzt und nach einer Inkubationszeit (autokatalytische Assemblierung *in vitro*) ein Differenzspektrum (siehe 2.2.1) gemessen. Diese Prozedur wurde auch mit aus p45 gewonnenen Phycocyanobilin wiederholt. Die Resultate der Messungen sind in Abbildung 3.16 zusammengefasst.

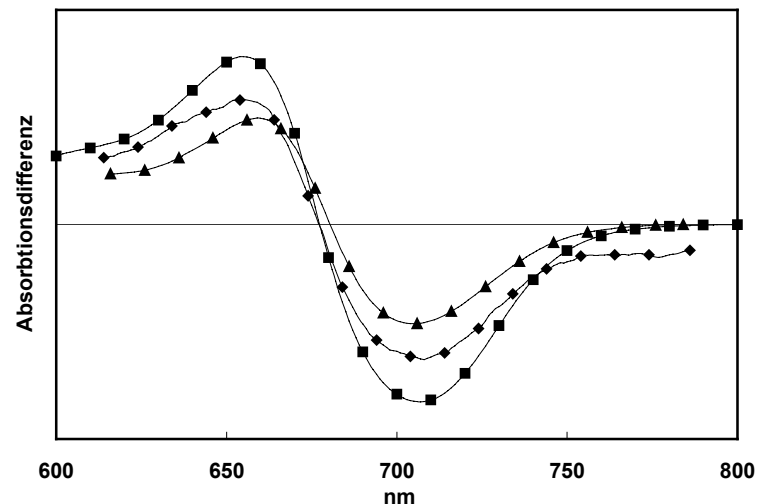


Abb. 3.16 Differenzspektren von Holo-Cph1 mit diversen Chromophoren Apo-Cph1 autokatalytisch assembliert (*in vitro*) mit 3 nmol Phycocyanobilin (■) sowie Phycocyanobilin aus p45 (◆). Äquivalente Daten für *in vivo* assembliertes Holo-Cph1 aus pF10-His/p45.2 (▲) sind zum Vergleich beigefügt.

Zur besseren Übersicht sind die relevanten Messdaten in Tabelle 3.1 dargestellt.

	$\lambda_{\max} \text{ Pr}$	$\Delta\Delta A_{\max}$	$\Delta\Delta A_{\min}$	$\Delta\Delta A_{\text{IBP}}$
p45/pF10-His (<i>in vivo</i>)	663	660	705	680
p45 + Apo-Cph1 (<i>in vitro</i>)		655	708	678
Phycocyanobilin + Apo-Cph1 (<i>in vitro</i>)		655	707	678
Phycocyanobilin + Apo-Cph1 (Lamparter et al., 1997)	658	655	708	677
Phytochromobilin + Apo-Cph1 (Lamparter et al., 1997)		670	719	680

Tab. 3.1 Tabelle der Absorptionsmaxima; Absorptionsdifferenzmaxima, minima und isobestischen Punkte von Holo-Cph1

Tabelle 3.1 verdeutlicht, dass die hypsochrome (Blau-) Verschiebung nur bei *in vivo* assemblierten Holophytochrom auftritt. Auf die möglichen Ursachen wird in der

Diskussion (4.) näher eingegangen. Holophytochrom konnte nun *in vivo* gebildet werden. Die Ergebnisse wurden in *FEBS Letters* veröffentlicht (Landgraf et al., 2001).

Eine weitere Fragestellung, die der Klärung bedurfte, war die Frage nach dem Sättigungsgrad der Assemblierung. Waren die Expressionsprodukte von HO und PcyA aus p45 in der Lage genügend Chromophor (Phycocyanobilin) zur Verfügung zu stellen, um das gebildete Apo-Cph1 vollständig zu assemblieren? Um diese Frage zu beantworten wurde das gebildete Holo-Cph1 aus einer p45/pF10-His Bakterienkultur differenzspektroskopisch (siehe 2.2.1) untersucht. Nach Aufnahme eines Differenzspektrum wurden zu dem gemessenen Überstand 3 nmol Phycocyanobilin zugegeben und nach einer kurzen Inkubationszeit (autokatalytische Assemblierung *in vitro*) ein weiteres Differenzspektrum gemessen (siehe Abb. 3.17).

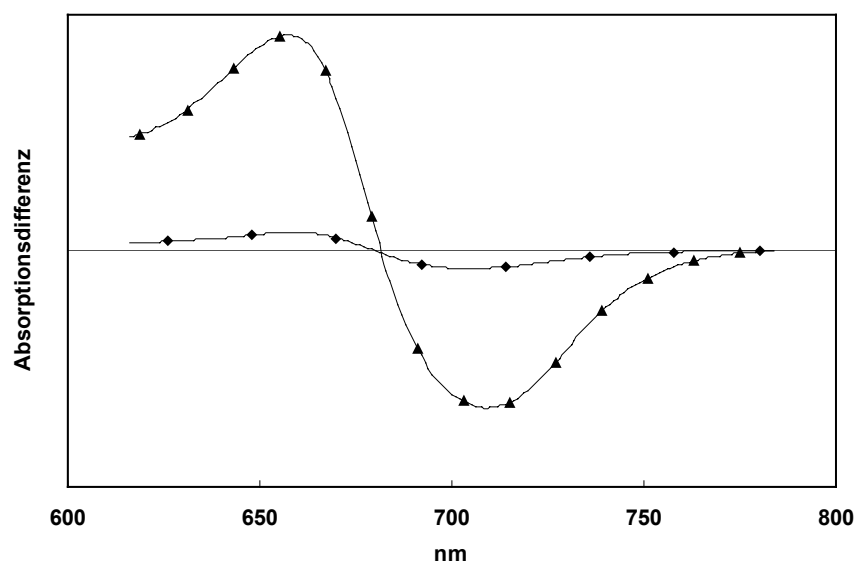


Abb. 3.17 Differenzspektren von Holo-Cph1 aus pF10-His/p45
Holophytochromexpression bei 18°C von pF10-His/p45 (◆), sowie nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin (▲).

Abbildung 3.17 belegt, dass *in vivo* gebildetes Apo-Cph1 höchstens zu 10% mit einem Chromophor versehen wurde. Die Ursachen dafür könnten an den unterschiedlich stark exprimierenden Promotoren oder der Anzahl der Plasmidkopien (ori) pro Bakterium liegen. Um die Bedingungen für die Expression zu optimieren, wurde ein Austausch der Expressionsvektoren durchgeführt.

3.1.3 Austausch der Expressionsvektoren

Die *Synechocystis* PCC 6803 HO Gensequenz wurde aus p40 mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hind*III isoliert und in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor pQE12 ligiert (p70; siehe Abb. 3.18).

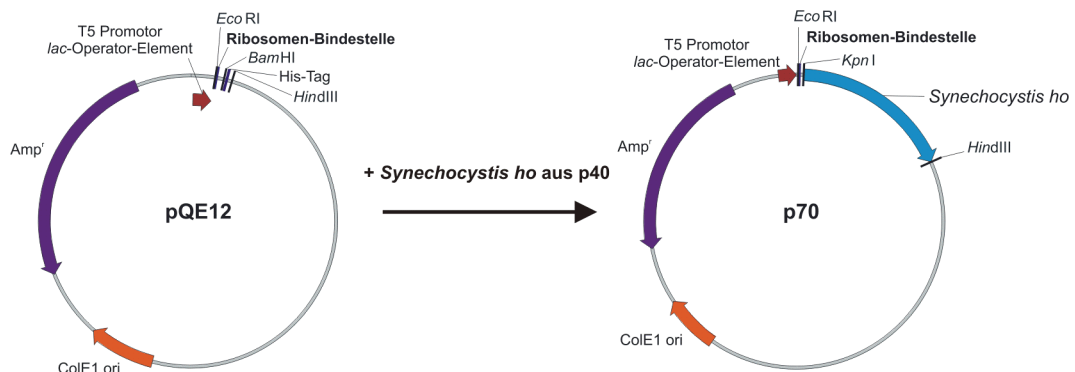


Abb. 3.18 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p70
Synechocystis PCC 6803 *ho* wurde aus p40 isoliert und in pQE12 über *Eco*RI und *Hind*III eingesetzt.

Nach Anzucht von p70 und Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2) konnte in einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE eine Expression von einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ~25 kDa beobachtet werden (Abb. 3.19), entsprechend dem Molekulargewicht von HO aus *Synechocystis* PCC 6803. Eine enzymatische Aktivität wurde durch eine grünliche Färbung der Bakterienkultur vorläufig bestätigt.

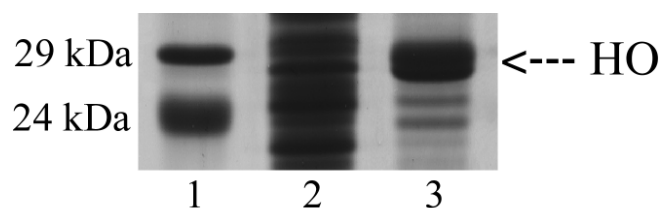


Abb. 3.19 SDS-PAGE von HO aus p70
 Coomassie-Färbung. Marker (1), nicht induzierte Kontrollkultur (2) und induzierte Kultur (3).

Um eine Umklonierung von *Synechocystis* PCC 6803 HO und *PcyA* zu bewerkstelligen, wurde der vorliegende Expressionsvektor pQE-12 (Qiagen) modifiziert. Wie aus der Plasmidkarte von pQE-12 (Abb. 3.20) hervorgeht, besitzt dieser in seinem ursprünglichen Zustand drei Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen, die für

die vorgesehene Umklonierung ungünstig waren. Um die folgenden Klonierungen durchführen zu können, wurde die MCS aus pUC-18 mit *EcoRI* und *HindIII* isoliert und in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor pQE12 ligiert. Durch die Umklonierung wurde die Ribosomen-Bindestelle entfernt. Das entstandene Plasmid wurde p66 benannt (Abb. 3.20).

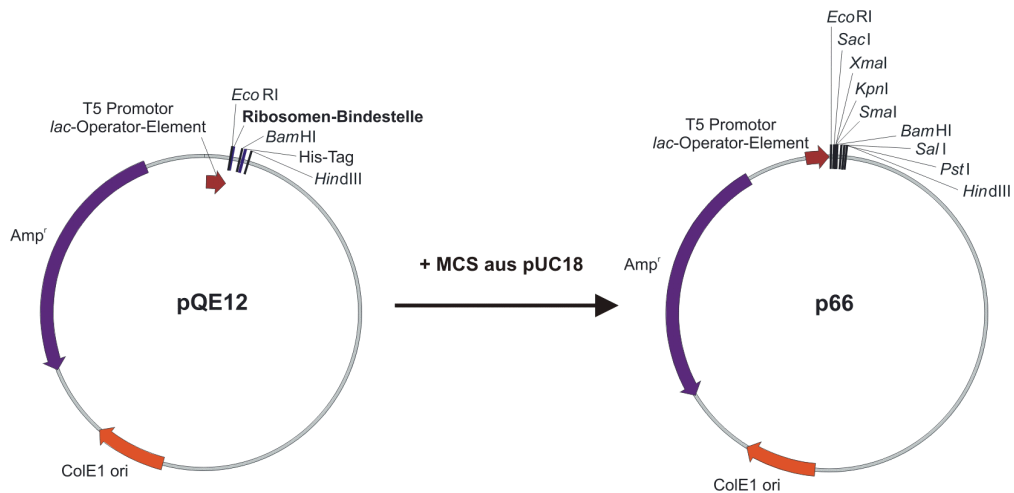


Abb. 3.20 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p66

Die isolierte MCS aus pUC18 wurde in pQE12 über *EcoRI* und *HindIII* eingesetzt.

Diese zusätzlich eingefügten Restriktionsendonukleasen-Erkennungssequenzen konnten für weitere Klonierungsschritte genutzt werden. Die Gene von *Synechocystis* PCC 6803 HO und PcyA wurden mit den Oligonukleotiden FL-53/FL-54 mittels PCR aus p77 amplifiziert und über die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor p66 kloniert (p77: siehe Abb. 3.21).

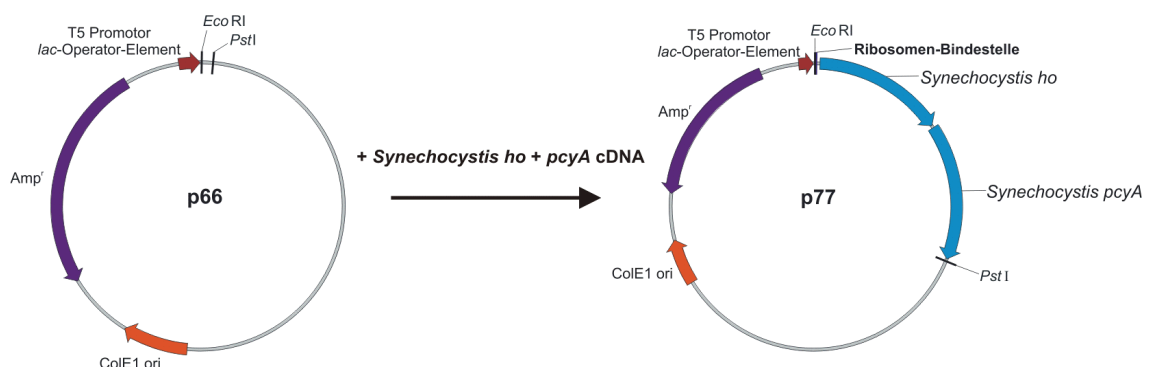


Abb. 3.21 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p77

Synechocystis PCC 6803 *ho* und *pcyA* wurden in p66 über *EcoRI* und *PstI* kloniert.

Nach erfolgter Transformation und Anzucht in *E.coli* (XL1-blue) konnte nach Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2) eine türkise Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden.

Um *in vivo* assembliertes Holophytochrom mit p77 herstellen zu können, musste das Cph1 Gen aus pF10-His in den Expressionsvektor pPROLar.A122 umkloniert werden. *cph1* wurde über die Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hind*III aus pF10-His isoliert und in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor pPROLar.A122 ligiert. Das entstandene Plasmid wurde p58 benannt (Abb. 3.22).

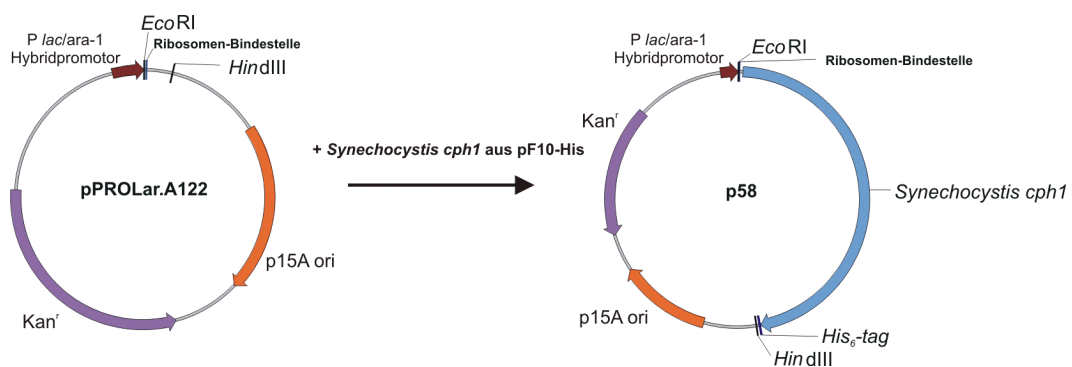


Abb. 3.22 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p58
cph1 wurde aus pF10-His isoliert und in pPROLar.A122 über *Eco*RI und *Hind*III kloniert.

Nach Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2) konnte in einem SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung die Expression von Apo-Cph1 bei einem Molekulargewicht von ~85 kDa gezeigt werden (Abb. 3.23).

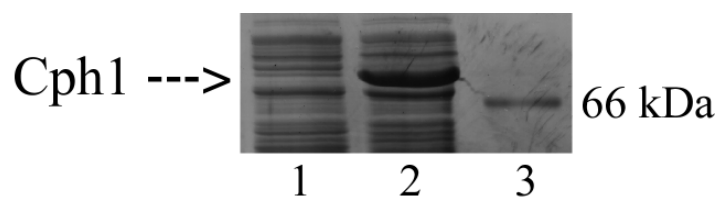


Abb. 3.23 SDS-PAGE von Apo-Cph1 aus p58
Coomassie-Färbung. Nicht induzierte Kontrollkultur (1), induzierte Kultur (2) und Marker (3).

Die Plasmide p58 und p77 wurden in *E.coli* (XL1-blue) co-transformiert und die Proteinexpression induziert (siehe 2.2.2). Holo-Cph1 wurde nach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie spektrophotometrisch analysiert (siehe 2.2.1). Nachdem die

absoluten und ein Differenzspektrum gemessen worden waren, wurde nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin erneut ein Differenzspektrum gemessen. Dieses zweite Differenzspektrum war mit dem zuvor gemessenen Differenzspektrum deckungsgleich (Abb. 3.24). Die Absorptionsmaxima, Absorptionsdifferenzmaxima, -minima sowie isosbestischen Punkte sind mit den in Tab. 3.1 angegebenen Werten der *in vivo* Assemblierung von Holo-Cph1 aus p45/pF10-His identisch.

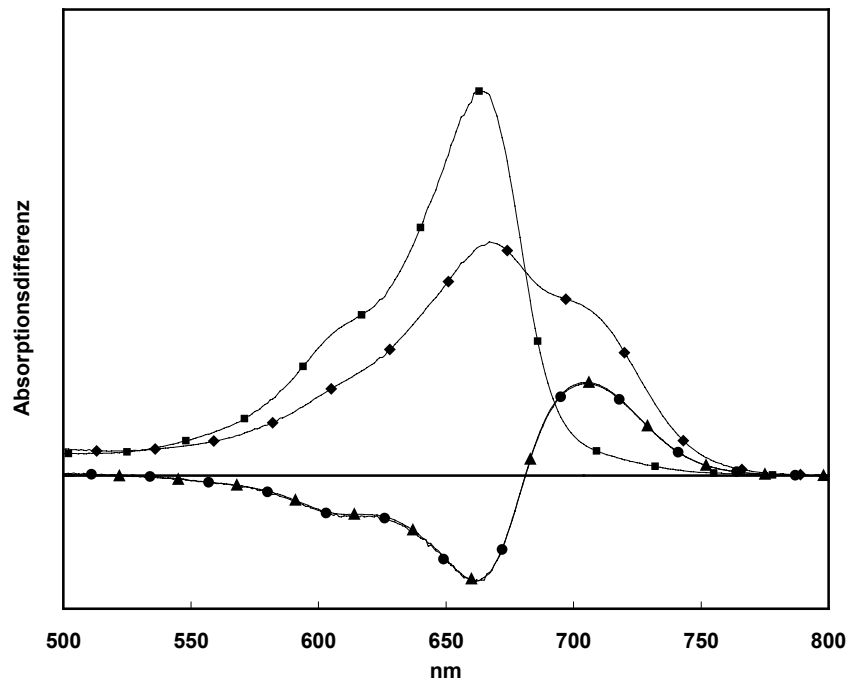


Abb. 3.24 Absorptionsspektren von *in vivo* assembliertem Holo-Cph1 Holo-Cph1 aus p58/p77; nach Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Spektren nach Dunkelrot- (■) und Rot-Bestrahlung (◆); zusammen mit dem korrespondierendem Differenzspektrum (▲), sowie nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin (●).

Somit konnte durch den Austausch der Expressionsvektoren *in vivo* gebildetes und vollständig abgesättigtes Holophytochrom erzeugt werden. Auch hier wurde eine hypsochrome Blauverschiebung bei *in vivo* gebildeten Holophytochrom gegenüber *in vitro* assemblierten Holophytochrom gemessen (siehe Tab. 3.1). Trotz der *in vivo* Assemblierung zu Holo-Cph1 war nach Aufschluss der Bakterien ein massives *in vitro* Aggregationsverhalten vorhanden, wie es für das überexprimierte Apoprotein bekannt war. Auf dieses Phänomen wird bei der Expression von Cph1Δ2 (siehe 3.1.5) und bei der Überexpression von molekularen Chaperonen (siehe 3.2) nochmals eingegangen.

3.1.4 Bildung eines Fusionsprotein bestehend aus HO und PcyA

Bei einer SDS-PAGE-Analyse von [p77](#) in *E.coli* (XL1-blue) fiel eine deutliche Expression bei einem apparenten Molekulargewicht von ~50 kDa auf (Abb. 3.25). Ferner war auffällig, dass bei ~25 kDa (den Molekulargewichten von HO als auch PcyA) kein Expressionsprodukt zu erkennen war.

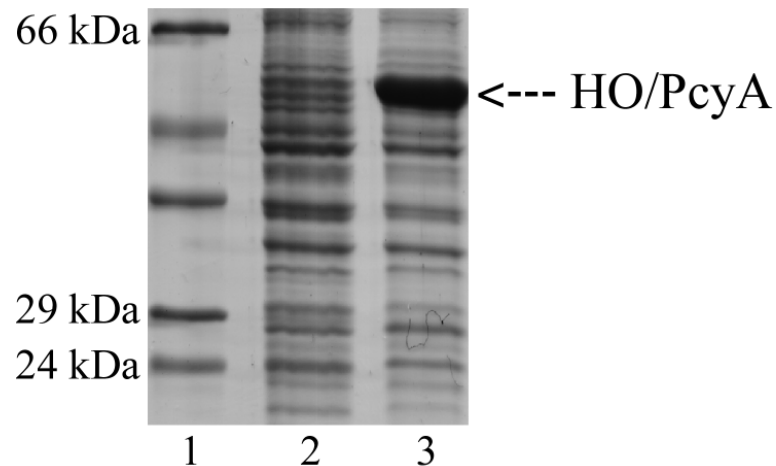


Abb. 3.25 SDS-PAGE von HO und PcyA aus *E.coli* (XL1-blue)
Coomassie-Färbung. Nicht induzierte Kontrollkultur (2), induzierte Kultur (3) und Marker (1).

Da bei der Häm-Oxygenase (HO) ein TAG als Stop-Codon verwendet wird, war es möglich, dass aufgrund der *Suppressor*-Eigenschaft von *E.coli* (XL1-blue) ein 50 kDa Expressionsprodukt gebildet wurde. Zwischen den Gensequenzen von *ho* und *pcyA* liegen genau 4 x 3 Basen. Um dies zu überprüfen, wurde die Holophytochrom-expression in den *sup⁻* Stämmen *E.coli* (TOP10F') und *E.coli* (Tuner™(DE3)pLacI) durchgeführt (siehe [Tab. 2.1](#)). Nach erfolgter Transformation von [p77](#) in *E.coli* (TOP10F') wurde dieser angezogen, die Proteinbildung induziert (siehe [2.2.2](#)) und mittels SDS-PAGE/Coomassie-Färbung untersucht (siehe [2.2.1](#)). Während im *E.coli* (TOP10F') Stamm keine Expression bei ~50 kDa beobachtet werden konnte, war in einem Bereich mit einem apparenten Molekulargewicht von ~25 kDa eine deutliche Expression vorhanden. Diese Expression war bei verschiedenen Isopropylthiogalactosid-Induzierungskonzentrationen nahezu konstant (Abb. 3.26).

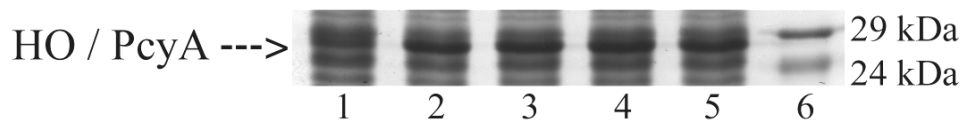


Abb. 3.26 SDS-PAGE von HO und PcyA aus *E. coli* (TOP10F')
Coomassie-Färbung. Nicht induzierte Kontrollkultur (1); mit 0.5 (2), 1 (3), 1.5 (4) sowie 2 (5) mM Isopropylthiogalactosid induzierten Kulturen. Marker (6).

Nach erfolgter Co-Transformation von **p77** und **p58** in *E. coli* (Tuner™(DE3)pLacI) wurde die Proteinbildung induziert (siehe 2.2.2) und eine SDS-PAGE/Coomassie-Färbung angefertigt (siehe 2.2.1). Bei den entsprechenden Molekulargewichten konnten Expressionen beobachtet werden (Abb. 3.27). Das *in vivo* gebildete Holo-Cph1 wurde spektrophotometrisch (siehe 2.2.1) analysiert.

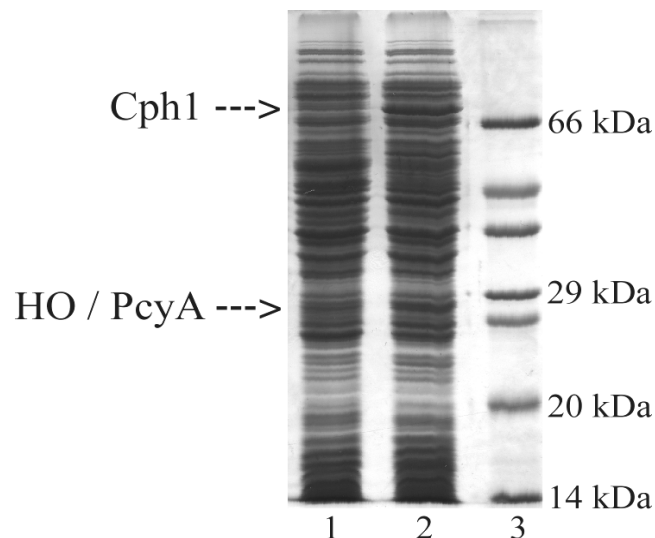


Abb. 3.27 Cph1, HO und PcyA aus *E. coli* (Tuner™ (DE3)pLacI)
SDS-PAGE/Coomassie-Färbung. p58/p77: nicht induziert (1), induziert (2); Marker (3).

Somit konnte durch Verwendung eines *sup⁻* *E. coli*-Stammes die ursprünglich beobachtete Expression bei einem apparenten Molekulargewicht von ~50 kDa verhindert und die zu erwartenden bei ~25 kDa beobachtet werden.

War das 50 kDa Fusionsprotein nach wie vor in der Lage Phycocyanobilin bereitzustellen? Da die *Suppressor*-Eigenschaft in den entsprechenden *E. coli*-Stämmen nur einen gewissen Anteil ausmacht, war nicht klar, ob Phycocyanobilin durch das 50 kDa Fusionsprotein oder durch einige wenige korrekt synthetisierte HO und PcyA

Proteine gebildet wurde. Ein Vorteil eines Fusionsproteins wäre die räumliche Nähe von HO und PcyA bei der Phycocyanobilin-Synthese. Eine solche Konstellation könnte, biotechnologisch gesehen, eine Verbesserung bei aufeinanderfolgenden Enzymschritten darstellen. Zum anderem würde ein Fusionsprotein die Bereitstellung von Phycocyanobilin in *S.cerevisiae* erheblich erleichtern, da es die Klonierungsstrategie einfacher gestalten würde. Um die Frage nach einer Aktivität des HO-PcyA Fusionsproteins zu beantworten, wurde mittels zielgerichteter Mutagenese (siehe 2.2.2) das Stop-Codon der Häm-Oxygenase (HO) in Glutamin umgewandelt. Somit konnte ein Fusionsprotein entstehen, das sowohl HO als auch PcyA beinhaltet (Abb. 3.28).

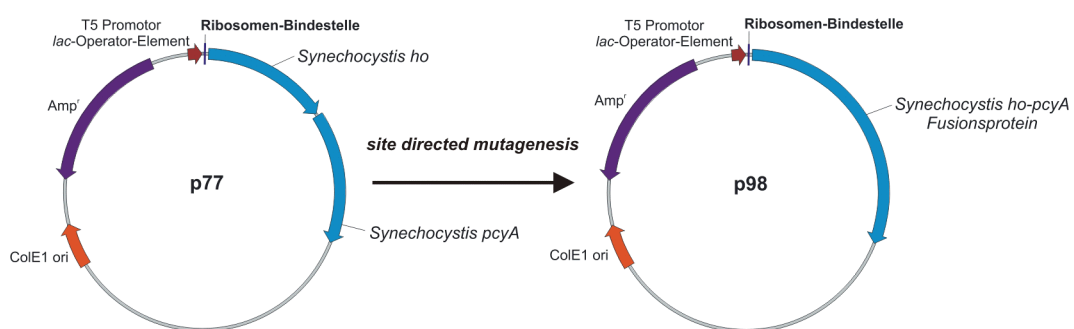


Abb. 3.28 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p98
Ein Fusionsprotein aus *Synechocystis* PCC 6803 *ho* und *pcyA* wurde über *site-directed-mutagenesis* hergestellt.

Nach erfolgter Mutagenese wurde das entstandene Plasmid (p98) mittels Restriktionsanalyse überprüft und der Übergang von *ho* zu *pcyA* sequenziert. Wie Abbildung 3.29 wiedergibt, konnte mit der Sequenzierung die erfolgreiche Mutagenese bestätigt werden.

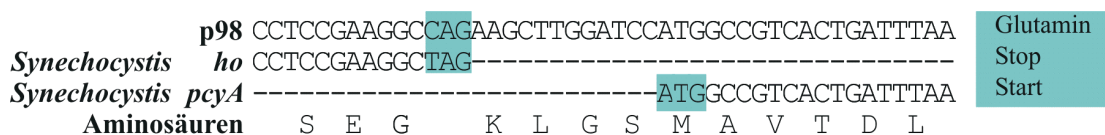


Abb. 3.29 Sequenzbereich des Überganges von *ho* zu *pcyA* in p98

Zusätzlich wurde p98 nach erfolgter Transformation in *E.coli* (TOP10F'; *sup*⁻), angezogen und nach induzierter Proteinbildung (siehe 2.2.2) eine SDS-PAGE/Coomassie-Färbung angefertigt. Es konnte die erwartete Bande bei ~50 kDa detektiert werden (Abb. 3.30), während bei ~25 kDa keine Expression mehr sichtbar war.

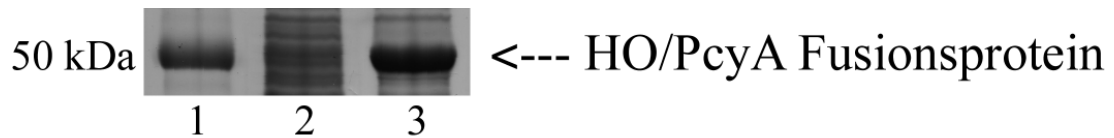


Abb. 3.30 SDS-PAGE des HO-PcyA Fusionsproteins aus p98
Coomassie-Färbung. Marker (1), Nicht induzierte Kontrollkultur (2) und induzierte Kultur (3).

Nach Co-Transformation mit p58, Anzucht und Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2), wurde ein Differenzspektrum (siehe 2.2.2) gemessen. Eine Kontrolle bestehend aus p58/p77 wurde parallel gemessen (Abb. 3.31).

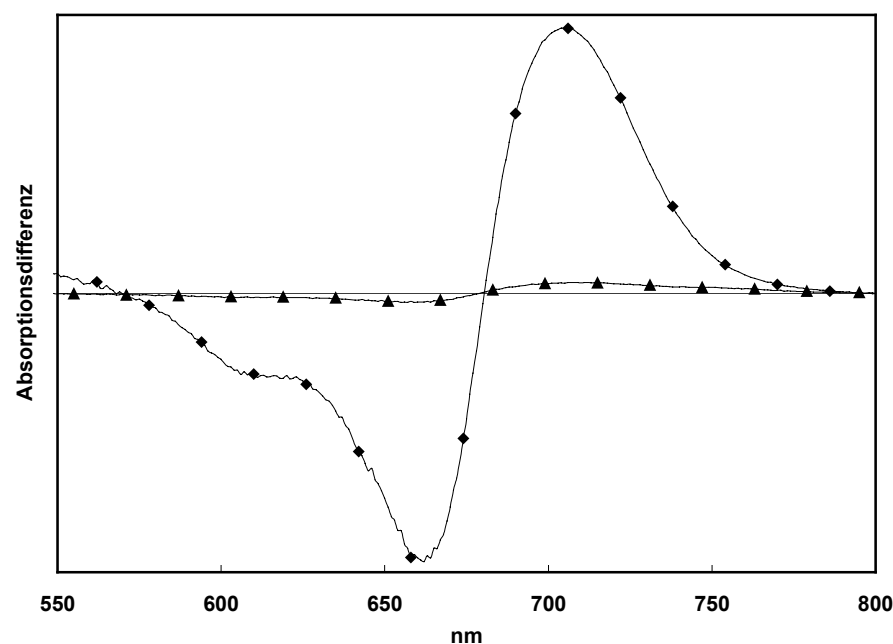


Abb. 3.31 Co-Expression von p58 und p77 bzw. p98 bei 18°C
Expression von Holo-Cph1 aus p58/p77 (◆) bzw. p58/p98 (▲).

Die Differenzsignale aus Abbildung 3.31 wurden mittels Bradford-Proteinbestimmung auf die vorhandene Gesamtproteinmenge normiert. Auffällig waren die unterschiedlichen Signalstärken bei den Differenzspektren. Das aus p58/p98 gebildete Holo-Cph1 war im Vergleich zu Holo-Cph1 aus p58/p77 extrem gering. Um das entstandene Pigment des aus p98 gebildeten Fusionsprotein zu überprüfen, wurden mit p77 als Kontrolle Chloroformextraktionen (siehe 2.2.1) der gebildeten Pigmente durchgeführt (Abb. 3.32).

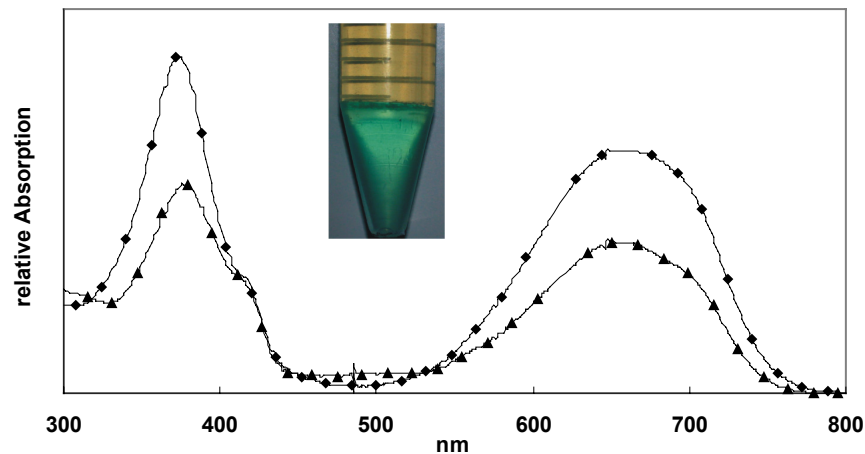


Abb. 3.32 Spektren der gebildeten Pigmente aus p98 und p77
Die von p98 (◆) bzw. p77 gebildeten Pigmente (▲) wurde nach einer Chloroformextraktion spektroskopisch gemessen. Das Bild in der Grafik zeigt eine Chloroformextraktion des aus p98 gebildeten Pigmentes.

Die Absorptionsspektren der gebildeten Pigmente aus p98 und p77 (siehe Abb. 3.32) zeigten keine auffälligen Unterschiede. Die aus Abbildung 3.32 abgeleiteten Pigmentmengen wurden zu Normierungszwecken in Abbildung 3.33 verwendet. Um die Assemblierungsfähigkeit der gebildeten Pigmente von p77 und p98 miteinander zu vergleichen, wurden jeweils gleiche Mengen zu Apo-Cph1 hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten (autokatalytische Assemblierung *in vitro*) konnte ein Differenzspektrum (siehe 2.2.1) gemessen werden (Abb. 3.33).

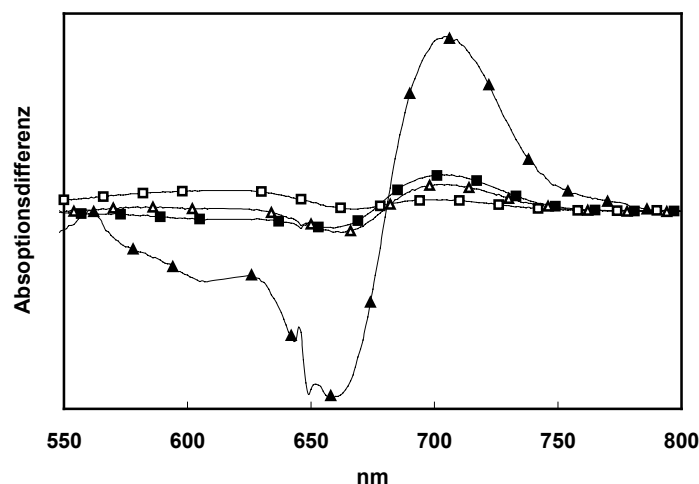


Abb. 3.33 Holo-Cph1 nach Zugabe von Pigmenten aus p77 bzw. p98
Differenzspektren von Holo-Cph1 nach Zugabe von 10 µl Pigment aus p77 (Δ) bzw. p98 (□) zu Apo-Cph1; sowie nach Zugabe von weiteren 100 µl Pigment aus p77 (▲) bzw. p98 (■). Die Spektren wurden auf die vorhandenen Pigmentmengen aus Abb. 3.32 normiert.

Wie Abbildung 3.33 deutlich wiedergibt ist das gebildete Pigment aus p98 im Vergleich zu dem gebildeten Pigment aus p77 nur zu einem sehr geringeren Anteil in der Lage mit Apo-Cph1 zu assemblieren. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde p98 und das assoziierte Fusionsprotein nicht weiter untersucht.

3.1.5 Expression von HO, PcyA und Cph1Δ2

Nachdem die Aggregation durch *in vivo* gebildetem Holo-Cph1 *in vitro* nicht unterbunden werden konnte, wurde ein C-terminal verkürztes Konstrukt für die *in vivo* Holophytochrombildung gewählt. Cph1Δ2 besteht aus dem N-terminalen Phytochromanteil des Cph1-Gens, während die Histidin-Kinase-Domäne (C-Terminus) fehlt (Sineshchekov et al., 2002). Cph1Δ2 aggregiert nach Aufschluss der Bakterienkultur nicht. Ein Plasmid welches Cph1Δ2 beinhaltet (p926.5) wurde von Jon Hughes freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Cph1Δ2 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* aus p926.5 isoliert, in den entsprechend geöffneten Expressionsvektor pPROLar.A122 kloniert und in *E.coli* (BL21PRO) transformiert. Das entstandene Plasmid wurde p83 benannt (siehe Abb. 3.34).

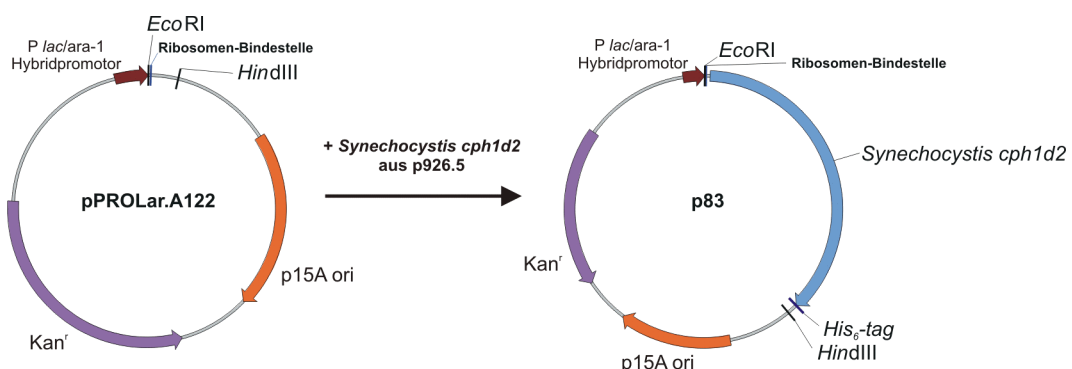


Abb. 3.34 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p83

Synechocystis PCC 6803 *cph1Δ2* wurde aus p926.5 isoliert und in pPROLar.A122 über *EcoRI* und *HindIII* kloniert.

Wie bei der Expression von sHSP in p71 bzw. p92 deutlich wurde (siehe Abbildungen 3.42 für p71 und 3.46 bzw. 3.47 für p92), ist eine Ribosomen-Bindestelle bei einer bicistronischen Expression für jedes zu exprimierende Gen vorteilhaft. Das nach-

geschaltete Gen wird ohne eine eigene Ribosomen-Bindestelle deutlich schwächer exprimiert. Aus diesem Grund wurde das Plasmid p77 (*ho* und *pcyA*) modifiziert. *Synechocystis* PCC 6803 *pcyA* wurde erneut mit einer PCR (siehe Tab. 2.3) amplifiziert und kloniert (siehe 2.2.2). Hierfür wurden die Oligonukleotide FL-69 und FL-44 (siehe Tab. 2.2) verwendet, wobei FL-69 zusätzlich für eine Ribosomen-Bindestelle kodierte. Das entstandene Plasmid wurde p171 benannt (siehe Abb. 3.35).

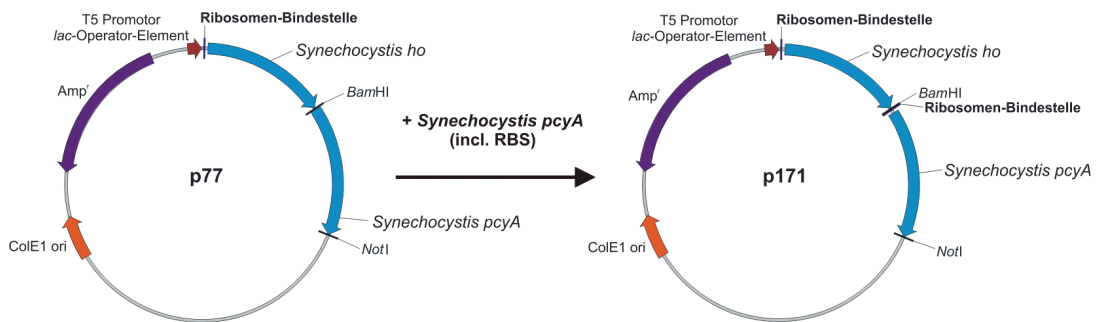


Abb. 3.35 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p171

Synechocystis PCC 6803 *pcyA* wurde in pPROLar.A122 über *Bam*HI und *Not*I kloniert. Dadurch wurde eine Ribosomen-Bindestelle vor *pcyA* eingebracht.

Die Sequenzierung von *ho* und *pcyA* zeigte keine PCR bedingten Mutationen. Nach Co-Transformation mit p83 in *E.coli* (BL21PRO) erfolgte die routinemäßige Anzucht und Induktion (siehe 2.2.2) der Proteinexpression. Zusätzlich zu der visuellen Erfolgskontrolle der Holophytochrombildung (türkise Bakterienpellets) konnten in einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE die Expressionsprodukte nachgewiesen werden (Abb. 3.36).

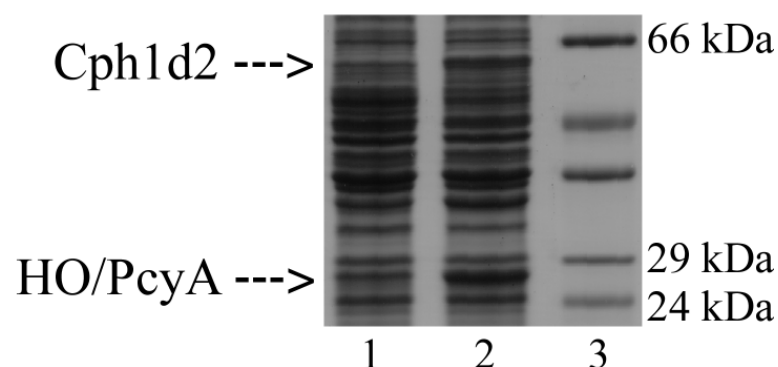


Abb. 3.36 SDS-PAGE von Cph1 Δ 2, HO und PcyA

Coomassie Färbung. p171/p83 (nicht induziert: 1, induziert: 2); Marker (3).

Ferner wurde das *in vivo* gebildete Holo-Cph1 Δ 2 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.2) aufgereinigt und spektrophotometrisch (siehe 2.2.1) untersucht. Hierzu wurden die absoluten Spektren, sowie ein Differenzspektrum ohne und nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin gemessen (Abb. 3.37).

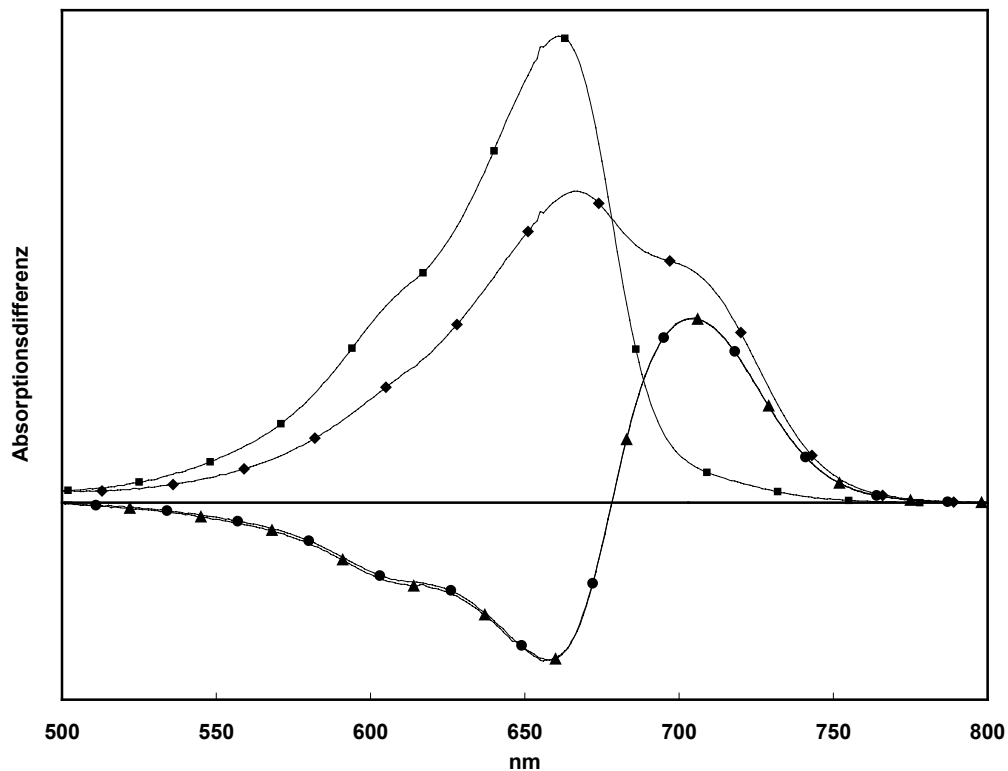


Abb. 3.37 Absorptionsspektren von *in vivo* assembliertem Holo-Cph1 Δ 2 Holo-Cph1 Δ 2 aus p83/p171 nach Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Spektren nach Dunkelrot- (■) und Rot-Bestrahlung (◆); zusammen mit dem korrespondierendem Differenzspektrum (▲), sowie nach Zugabe von 3 nmol Phycocyanobilin (●).

Die Ergebnisse belegen die vollständige *in vivo* Assemblierung des gebildeten Apo-Cph1 Δ 2 zu Holo-Cph1 Δ 2.

Die Affinitätsreinigung wurde weiter optimiert. Der Einsatz einer RNase-Behandlung nach Aufschluss der Bakterienkultur hat sich als vorteilhaft für die Aufreinigung von Holo-Cph1 Δ 2 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie erwiesen (siehe Abb. 3.38).

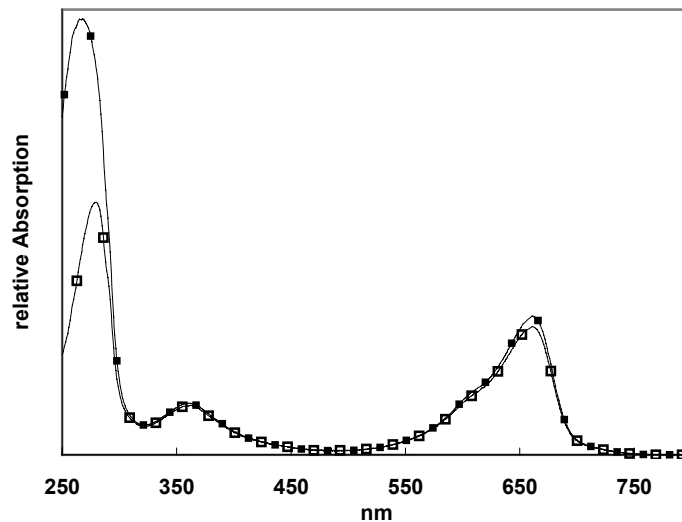


Abb. 3.38 RNase-Behandlung und Ni-NTA-Affinitätschromatographie
Holo-Cph1 Δ 2 ohne (■) und mit RNase-Behandlung (□; 2.4 μ g RNase pro ml
Bakterienkultur).

Weiterhin wurden verschiedene Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer und die Anzahl der Waschschriffe ausgetestet. Die höchste Reinheit von Holo-Cph1 Δ 2 wurde mit einem 40 mM Imidazol enthaltenem Waschpuffer und einem Spülen der Säule mit dem 10-fachen Säulenvolumen erzielt. Nach Aufreinigung von Holo-Cph1 Δ 2 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie ergaben sich folgende Spektren (Abb. 3.39).

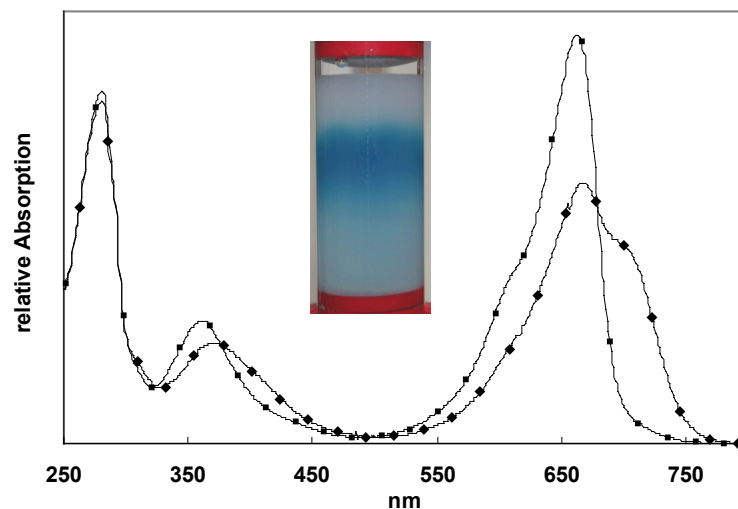


Abb. 3.39 Absolute Spektren von *in vivo* assembliertem Holo-Cph1 Δ 2
Holo-Cph1 Δ 2 nach Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie.
Spektren nach Dunkelrot (■) und Rot-Bestrahlung (◆). Das Absorptions-
verhältnis von Pr zu dem des 280 nm-Maximums beträgt 1.16. Das Bild in der
Grafik zeigt Cph1 Δ 2 an eine Ni-NTA-Säule gebunden.

Abbildung 3.39 gibt Aufschluss über die Reinheit von Holo-Cph1 Δ 2 nach Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 2.2.2). Nach Messung der absoluten Spektren konnte ein Verhältnis des Pr-Maximums zu dem des 280 nm-Maximum (= Absorptionsverhältnis) von 1.16 erzielt werden. Dieser hohe Aufreinigungsgrad lässt sich auch in einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE der einzelnen Ni-NTA-Affinitätschromatographie Fraktionen zeigen (Abb. 3.40). Im Eluat sind noch einzelne Proteinbanden zu erkennen, welche nicht in der letzten Waschfraktion auftauchen. Diese Banden könnten mit Cph1 Δ 2 assoziierte Proteine darstellen.

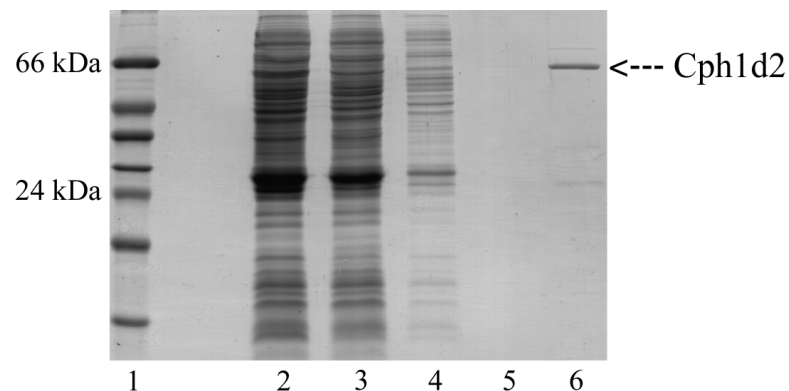


Abb. 3.40 Ni-NTA-Affinitätschromatographie von Holo-Cph1 Δ 2
Coomassie Färbung des SDS-PAGE. Marker (1); p171/p83 (vor Säule: 2, nach Säule: 3, erster Waschschrift: 4, letzter Waschschrift: 5, Eluat: 6).

Tabelle 3.2 gibt relevante Messdaten von aufgereinigtem Cph1 Δ 2 wieder. Auch bei *in vivo* assemblierten Holo-Cph1 Δ 2 war ein Unterschied im Vergleich zu *in vitro* assemblierten Holo-Cph1 Δ 2 zu erkennen.

	λ_{\max} Pr	$\Delta\Delta A_{\max}$	$\Delta\Delta A_{\min}$	$\Delta\Delta A_{\text{IBP}}$
p171/p83 (<i>in vivo</i>)	662	656	704	679
Phycocyanobilin + Apo-Cph1 Δ 2 (<i>in vitro</i>)	656	655	707	677

Tab. 3.2 Tabelle der Absorptionsmaxima; Absorptionsdifferenzmaxima, minima und isosbestischen Punkte von Holo-Cph1 Δ 2

Das aufgereinigte Cph1 Δ 2 zeigt *in vitro* keine Aggregationstendenzen. Durch die Co-Expression der drei beteiligten Gene aus *Synechocystis* PCC 6803 (*cph1 Δ 2*, *ho* und *pcyA*) in *E.coli* (BL21PRO) kann Holophytochrom *in vivo* im Milligrammbereich gebildet werden.

3.2 Einfluss von Chaperonen auf die Löslichkeit von Holo-Cph1

Die Co-Expression von *Synechocystis* PCC 6803 Cph1 Δ 2 mit HO und PcyA ermöglichte die Bildung von *in vivo* assembliertem Holo-Cph1 Δ 2. Dieses tendierte, im Gegensatz zu Holo-Cph1, nicht zur *in vitro*-Aggregation nach Isolierung aus Bakterien. Um eine *in vitro*-Aggregation von Holo-Cph1 zu verhindern, wurde der Einfluss von sHSP bzw. GroE S/L untersucht.

3.2.1 Co-Expression von *L.peruvianum* sHSP 18.9 mit Holo-Cph1

In einem ersten Versuchsansatz wurde die Co-Expression von Holo-Cph1 mit einem kleinen Hitzestressprotein (sHSP) aus Tomate (*L.peruvianum*) gewählt. Hierzu wurde die Gensequenz von sHSP 18.9 mittels PCR (siehe Tab. 2.3) mit den Oligonukleotiden FL-51/FL-52 (siehe Tab. 2.2) aus dem Plasmid pII-2/98 (freundlicherweise von C. Forreiter zur Verfügung gestellt) amplifiziert und kloniert (siehe 2.2.2). Das entstandene Plasmid wurde p71 benannt (siehe Abb. 3.41).

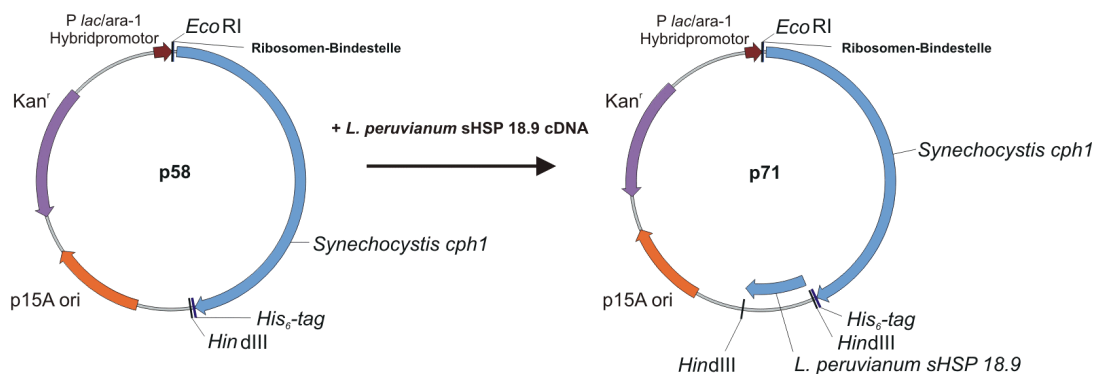


Abb. 3.41 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p71

L.peruvianum sHSP 18.9 cDNA wurde bicistronisch hinter *cph1* in p58 über *Hind*III eingebracht.

Im Rahmen der weiteren Charakterisierung wurde p71 angezogen und die Proteinbildung induziert (siehe 2.2.2). Es wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung sowie eine SDS-PAGE mit anschließendem *Western-Blot* (1/10000 (v/v) α sHSP) durchgeführt (Abb. 3.42).

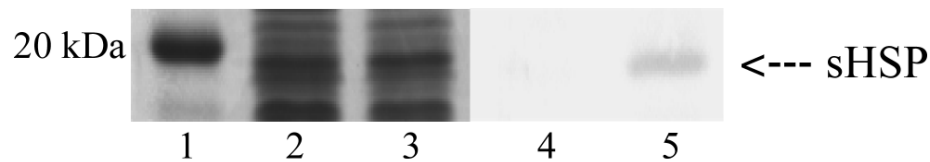


Abb. 3.42 SDS-PAGE und *Western-Blot* von sHSP 18.9 aus p71

Coomassie-Färbung von Marker (1), nicht induzierte Kontrollkultur (2) und induzierte Kultur (3). *Western-Blot* mit α sHSP (1/10000 (v/v)) von nicht induzierter Kontrollkultur (4) und induzierter Kultur (5).

Abbildung 3.42 belegt über den Antikörpernachweis die Bildung des kleinen Hitzestressproteins, jedoch konnte in der Coomassie-Färbung keine Expression beobachtet werden. Um den Einfluss des kleinen Hitzestressproteins zu überprüfen, wurde eine Co-Transformation mit p77 durchgeführt. Nach Anzucht und Induktion der Proteinexpression wurde die Kultur aufgeteilt und bei 18°C bzw. 28°C inkubiert (siehe 2.2.2). Als Referenzkontrolle lief parallel eine co-transformierte p58/p77-Kultur mit. Nach Aufschluss der Bakterien (siehe 2.2.2) wurden die Differenzspektren (siehe 2.2.1) gemessen und mittels Bradford-Proteinbestimmung auf die Gesamtproteinmenge normiert (Abb. 3.43 für p58/p77 und Abb. 3.44 für p71/p77).

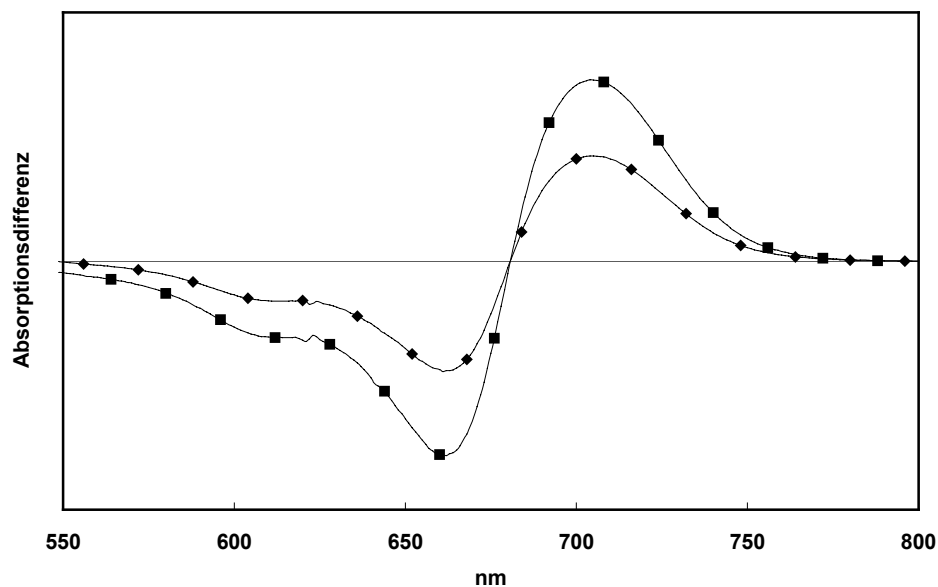


Abb. 3.43 Expression von Holo-Cph1 bei 18°C und 28°C

Differenzspektren von Holo-Cph1 bei 18°C (■) und 28°C (◆). Das Differenz-Signal von 28°C (◆) entspricht $\approx 60\%$ des 18°C (■) Absorptionsmaximum. Kontrollversuch zu Abbildung 3.44.

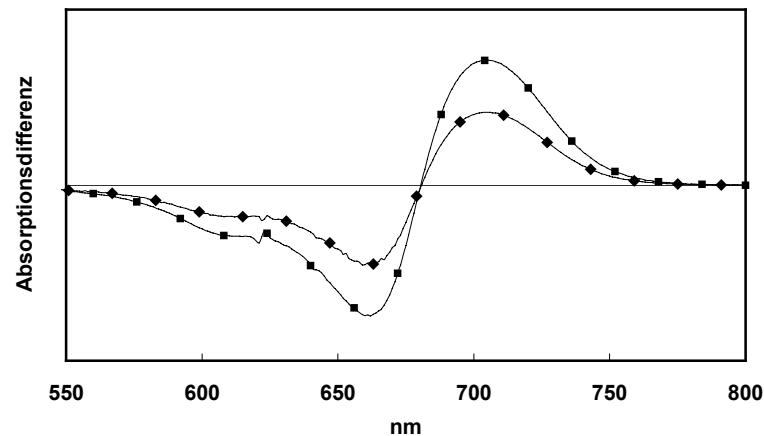


Abb. 3.44 Co-Expression von Holo-Cph1 und sHSP 18.9 bei 18°C und 28°C
Differenzspektrern von Holo-Cph1 und sHSP 18.9 bei 18°C (■) und 28°C (◆).
Das Differenz-Signal von 28°C (◆) entspricht 50-60% des 18°C (■) Absorptionsmaximum.

Durch Co-Expression von *L.peruvianum* sHSP 18.9 mit Cph1, HO und PcyA konnte keine Verbesserung *in vivo* erzielt werden. Weder konnte die Löslichkeit von Holo-Cph1 bei 28°C im Vergleich zur Kontrolle (p58/p77) verbessert werden, noch konnte eine Aggregation nach Aufschluss der Bakterienkultur *in vitro* verhindert werden.

Um sicherzustellen, dass eine *in vivo*-Löslichkeitsverbesserung nicht aufgrund eines äquimolaren Ungleichgewichtes bei der Expression von Cph1 und sHSP ausblieb, wurde eine Modifikation in der Klonierungsstrategie gewählt. Hierzu wurde das sHSP erneut mittels PCR (siehe Tab. 2.3) mit den Oligonukleotiden FL-58/FL-59 (siehe Tab. 2.2) amplifiziert und kloniert (siehe 2.2.2). Mit dem Oligonukleotid FL-58 wurde zusätzlich eine Ribosomen-Bindestelle inkorporiert. Das entstandene Plasmid wurde p92 benannt (Abb. 3.45).

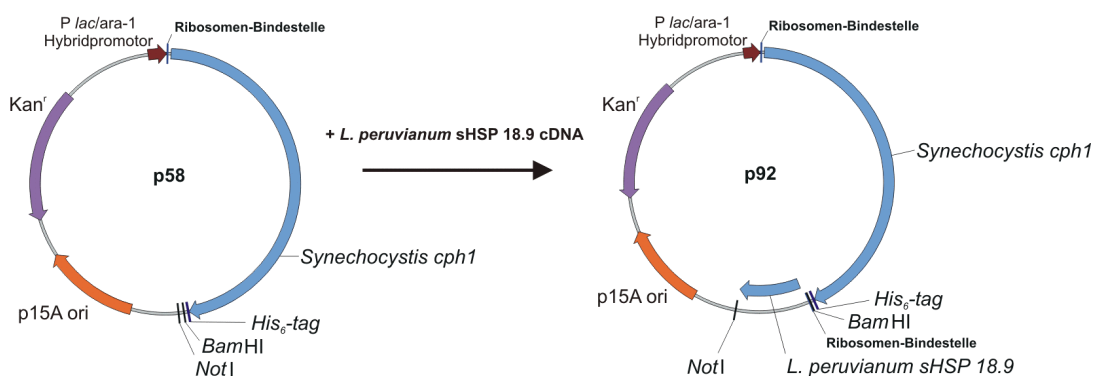


Abb. 3.45 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p92
L.peruvianum sHSP 18.9 cDNA wurde bicistronisch hinter *cph1* in p58 über *Bam*HI und *Not*I kloniert. Dadurch wurde eine Ribosomen-Bindestelle vor sHSP eingebracht.

Das Plasmid p92 wurde in *E.coli* transformiert, angezogen und die Proteinbildung induziert (siehe 2.2.2). Nach Aufschluss der Bakterien (siehe 2.2.2) wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 3.46), sowie eine SDS-PAGE mit anschließendem *Western-Blot* (1/10000 (v/v) α sHSP; Abb. 3.47) durchgeführt.

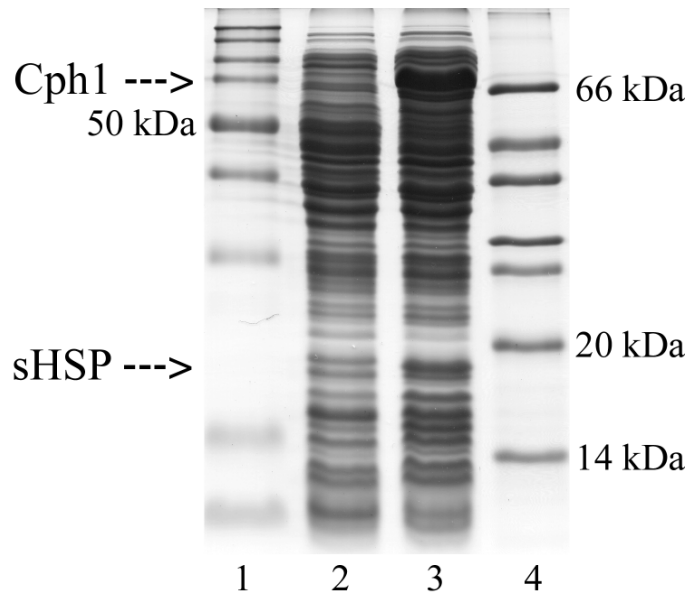


Abb. 3.46 SDS-PAGE von Apo-Cph1 und sHSP 18.9 aus p92
Coomassie Färbung. Marker (1 und 4); p92 (nicht induziert: 2, induziert: 3).

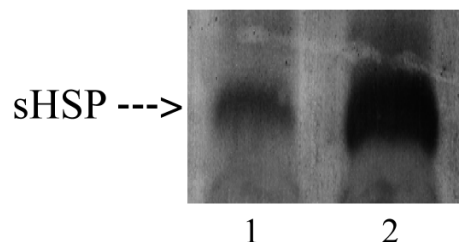


Abb. 3.47 *Western-Blot* von sHSP 18.9 aus p92
Überstände von p92 (nicht induziert: 1, induziert: 2). α sHSP mit 1/10000 (v/v).

Die Ergebnisse aus Abbildung 3.46 und Abbildung 3.47 spiegeln den Einfluss der Ribosomen-Bindestelle auf die Expressionsstärke wieder. Eine Expression von sHSP ist nun auch im Coomassie gefärbten SDS-PAGE deutlich zu erkennen. Nach erfolgter Co-Transformation von p92 mit p77 wurde die Bakterienkultur angezogen, die Proteinbildung induziert und bei 18°C bzw. 28°C inkubiert (siehe 2.2.2). Als Kontrolle diente eine p58/p77-Bakterienkultur.

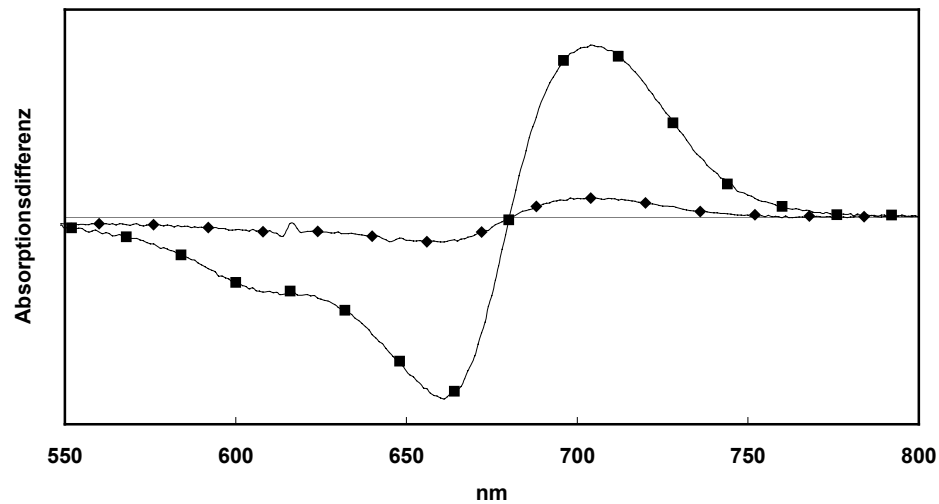


Abb. 3.48 Expression von Holo-Cph1 bei 18°C und 28°C
Differenzspektren von Holo-Cph1 bei 18°C (■) und 28°C (◆). Das Differenz-Signal von 28°C (◆) entspricht $\approx 10\%$ des 18°C (■) Absorptionsmaximum. Kontrollversuch zu Abbildung 3.49.

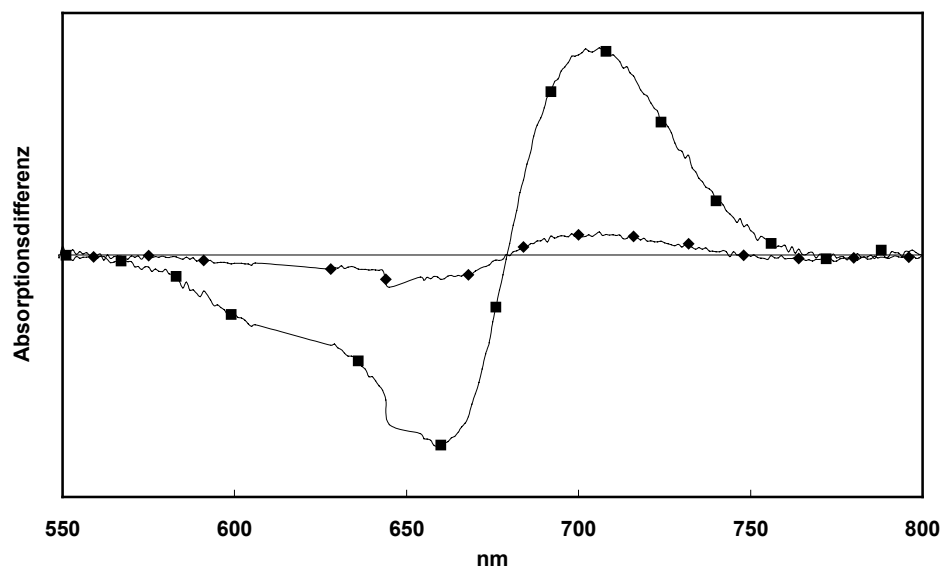


Abb. 3.49 Co-Expression von Holo-Cph1 und sHSP 18.9 bei 18°C und 28°C
Differenzspektren von Holo-Cph1 und sHSP 18.9 bei 18°C (■) und 28°C (◆). Das Differenz-Signal von 28°C (◆) entspricht $\approx 10\%$ des 18°C (■) Absorptionsmaximum.

Auch nach Erhöhung der *L.peruvianum* sHSP 18.9 Expression mit Holo-Cph1 ließ sich keine Verbesserung der Löslichkeit von Holo-Cph1 beobachten. Dies galt sowohl für die Expression bei 28°C *in vivo*, als auch für die Aggregation des Holo-Cph1 *in vitro* nach Aufschluss der Bakterien.

3.2.2 Co-Expression von GroE S/L aus *E.coli* mit Holo-Cph1

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Überexpression von GroE S/L mit Holo-Cph1 untersucht. Hierzu wurde mittels PCR (siehe Tab. 2.3) mit den Oligonukleotiden FL-65/FL-66 (siehe Tab. 2.2) *groES* aus *E.coli* (XL1-blue) amplifiziert und kloniert (p126; siehe Abb. 3.50).

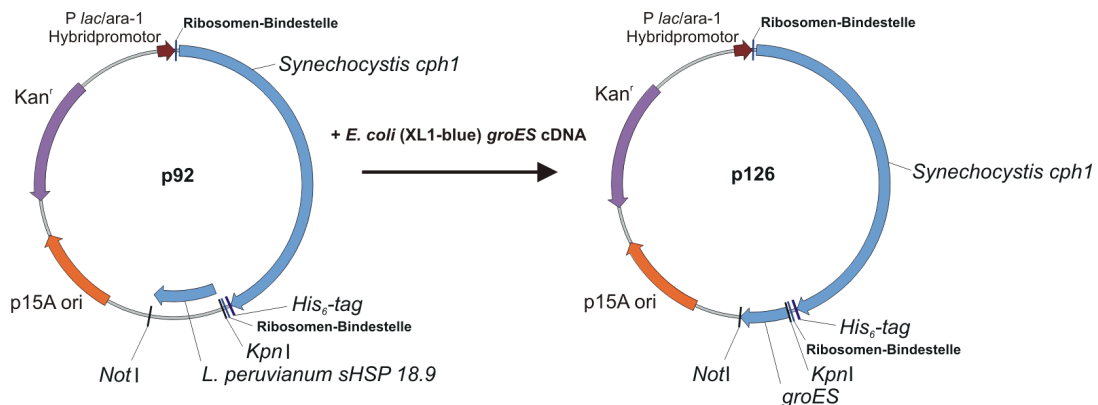


Abb. 3.50 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p126
E.coli GroES cDNA wurde bicistronisch hinter *cph1* in p92 über *KpnI* und *NotI* kloniert.

In einem zweiten Schritt konnte das mit den Oligonukleotiden FL-67/FL-68 (siehe Tab. 2.2) gebildete PCR-Amplifikat von *groEL* (siehe Tab. 2.3) in p126 kloniert werden. Das entstandene Plasmid wurde p132 benannt (Abb. 3.51). Bei der Erstellung von p132 wurde über das Oligonukleotid eine Ribosomen-Bindestelle eingebracht.

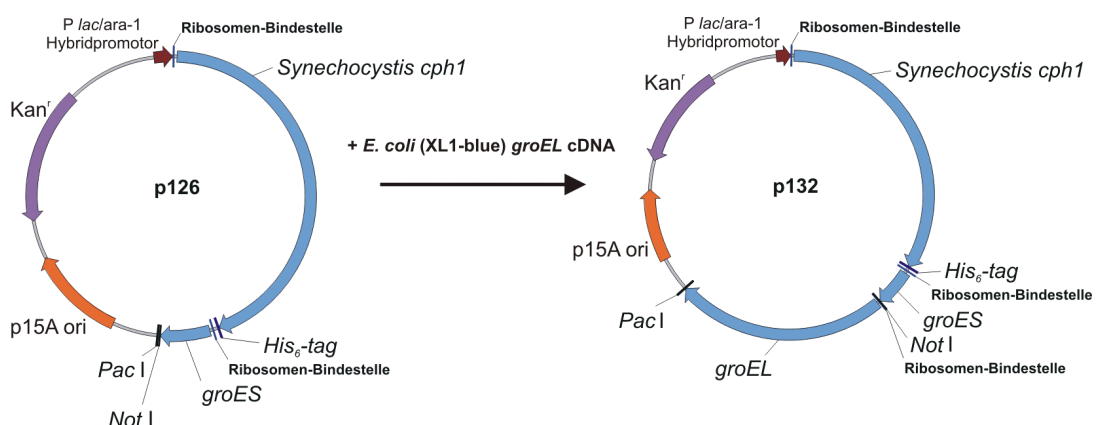


Abb. 3.51 Klonierungsstrategie zur Herstellung von p132
E.coli GroEL cDNA wurde polycistronisch hinter *groE* und *cph1* in p126 über *NotI* und *PacI* kloniert.

Nach Co-Transformation von p132 mit p77 in *E.coli* (TOP10F') und Induktion der Proteinexpression (siehe 2.2.2) konnte in einer Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE eine Expression bzw. Überexpression aller beteiligten Proteine (Cph1, GroEL, HO, PcyA und GroES) beobachtet werden (Abb. 3.52).

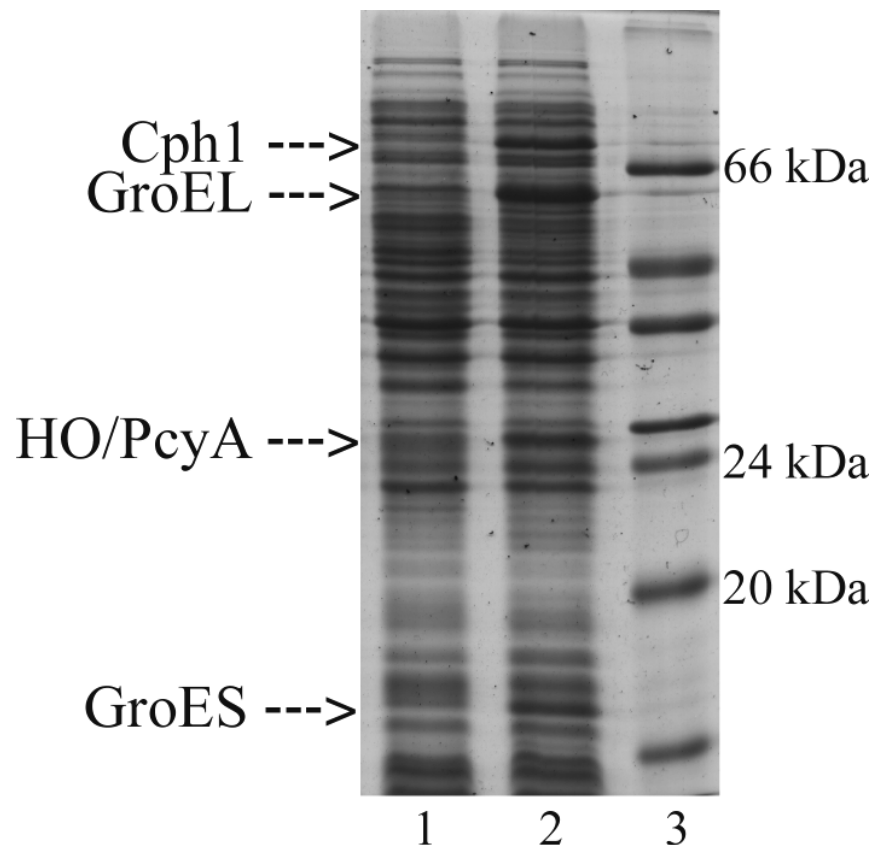


Abb. 3.52 SDS-PAGE von Cph1, GroEL, HO, PcyA und GroES
Coomassie Färbung. p132/p77 (nicht induziert: 1, induziert: 2); Marker (3).

Nach Anzucht der co-transformierten Plasmide p132 und p77 in *E.coli* (TOP10F') und Induktion der Proteinexpression wurde die Kultur aufgeteilt und bei 18°C bzw. 28°C inkubiert (siehe 2.2.2). Als Referenzkontrolle lief parallel eine p58/p77-Bakterienkultur mit. Nach Aufschluss der Bakterien (siehe 2.2.2) wurden die Differenzspektren (siehe 2.2.1) gemessen und mittels Bradford-Proteinbestimmung auf die Gesamtproteinmenge normiert (Abb. 3.53 für p132/p77 und Abb. 3.48 für p58/p77).

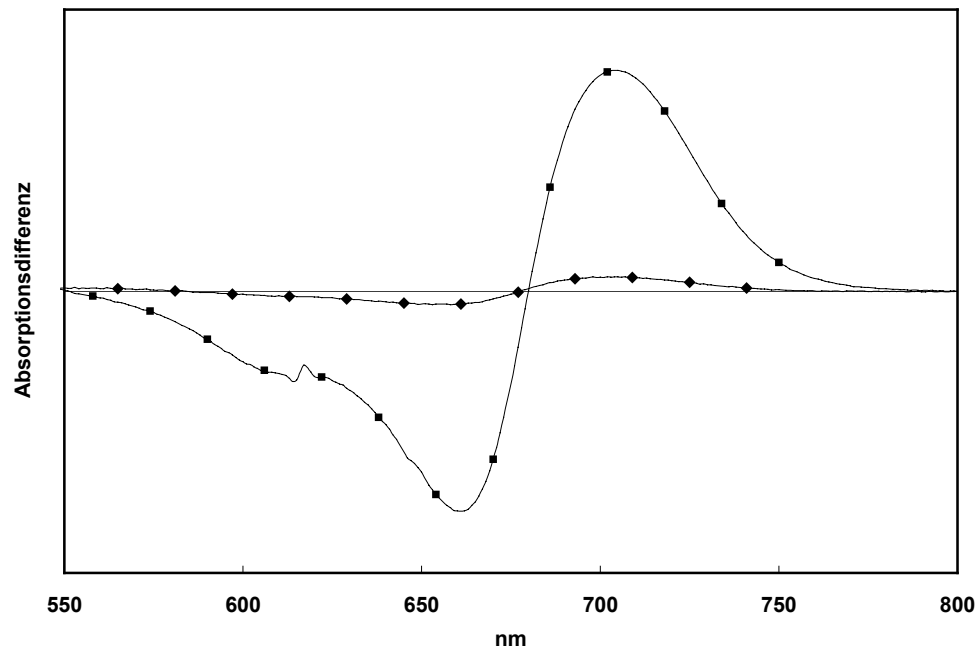


Abb. 3.53 Co-Expression von GroE S/L mit Holo-Cph1 bei 18°C und 28°C
 Differenzspektren von GroE S/L mit Holo-Cph1 bei 18°C (■) und 28°C (◆).
 Das Differenz-Signal von 28°C (◆) entspricht $\approx 10\%$ des 18°C (■) Absorptions-
 maximum.

Bei der Überexpression von GroE S/L aus *E.coli* (XL1-blue) mit Holo-Cph1 trat keine Verbesserung der *in vivo*-Löslichkeit bei 28°C auf (Abb. 3.53). Auch war eine *in vitro*-Aggregation nach Aufschluss der Bakterien massiv vorhanden.

Die Co-Expression von molekularen Chaperonen konnte die Aggregation von Holo-Cph1 nicht verbessern. Bei allen Versuchen war die Löslichkeit der 28°C-Expression nicht besser als die der Kontrolle ohne Anwesenheit von molekularen Chaperonen. Ferner war nach Aufschluss der Bakterien eine *in vitro*-Aggregation von Holo-Cph1 bei allen Proben nach wie vor massiv vorhanden.

4. Diskussion

Die Entdeckung eines prokaryotischen Phytochroms (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997) hatte weitreichende Auswirkungen im Fachgebiet (Übersichtsartikel siehe: Hughes und Lamparter, 1999). Durch Untersuchungen an Bau und Funktion von prokaryotischen Phytochromen ist es möglich, Erkenntnisse über den evolutionären Ursprung der Phytochrome aus höheren Pflanzen zu gewinnen. Da aber nur etwa ~23 photoaktive Holo-Cph1 Moleküle in *Synechocystis* PCC 6803 pro Zelle vorkommen (Hübschmann et al., 2001), ist eine präparative Aufreinigung von Holo-Cph1 aus diesem Organismus ausgeschlossen. Im Gegensatz zu pflanzlichen Phytochromen konnte gezeigt werden, dass Cph1 als Apoprotein leicht in *E.coli* exprimiert und mit geeigneten Affinitätschromatographischen Methoden gereinigt werden kann (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997). Um letztendlich Holo-Cph1 zu erhalten, musste allerdings Phycocyanobilin *in vitro* hinzugegeben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass man rekombinantes, *in vivo* assembliertes Holophytochrom aus *E.coli* erhalten kann, indem man drei Proteine co-exprimiert: Zum Beispiel Cph1, um ein Apoprotein bereitzustellen, eine HO, um Häm zu Biliverdin IX α umzuwandeln und eine spezifische Biliverdin IX α -Reduktase, um aus dem Intermediat Biliverdin IX α den entsprechenden Chromophor zu bilden. Die hier vorgestellte *in vivo* Synthese von Holophytochrom in *E.coli* ermöglicht die Aufreinigung des gebildeten Holophytochroms im Milligrammbereich und bringt den weiteren Vorteil mit sich, dass eine aufwendige Isolierung von Phycocyanobilin aus Cyanobakterien überflüssig wird. Das aufgereinigte Holo-Cph1 wird nun für weitere Untersuchungen, wie etwa die Aufklärung der 3-D Struktur, herangezogen. Zusätzlich war es möglich, durch die Etablierung dieser Methode in *E.coli* einen entsprechenden Ansatz in *S.cerevisiae* zu untersuchen. Durch die Bereitstellung des Chromophors in *S.cerevisiae* könnten Hefe-2-Hybrid Analysen unter Berücksichtigung des Pr/Pfr-Zustandes erfolgen. Um Holophytochrom in *S.cerevisiae* zu erhalten, waren in der Vergangenheit verschiedene Versuchsansätze durchgeführt worden. Es hatte sich gezeigt, dass ein in der Häm-Biosynthese defizienter *S.cerevisiae*-Stamm ein normales Wachstum aufzeigt, wenn dem Anzuchtmedium exogenes Häm dargeboten wurde

(Gollub et al., 1977; Guarente und Mason, 1983). Daraufhin wurde untersucht, ob *S.cerevisiae* die linearen Tetrapyrrole Phycocyanobilin bzw. Phytochromobilin aufzunehmen vermag. Einem *S.cerevisiae*-Stamm, der das Phytochrom A Apoprotein aus Hafer (*Avena sativa*) überexprimierte, wurde im Anzuchtmedium exogenes Phycocyanobilin bzw. Phytochromobilin dargeboten, um *in vivo* assembliertes Holophytochrom zu erhalten (Li und Lagarias, 1994). Dabei konnte gezeigt werden, dass *S.cerevisiae* in Lage war zu einem gewissen Grad diese Pigmente aufzunehmen, die daraufhin mit dem dargebotenen Apoprotein zu Holophytochrom assemblieren konnten (Li und Lagarias, 1994). Dieser Versuchsansatz erforderte jedoch größere Mengen von isoliertem Phycocyanobilin (Phytochromobilin kann kaum in größeren Mengen isoliert werden), und die routinemäßige Durchführung dieses Versuchsansatzes erwies sich als problematisch. Ein weiterer Versuchsansatz, um Holophytochrom in Hefen zu erhalten, wurde in *Pichia pastoris* durchgeführt. Die Expression von rekombinanten Apo-Phytochrom wurde zwar hauptsächlich in *S.cerevisiae* durchgeführt, kann aber auch in *Pichia pastoris* erfolgen (Deforce et al., 1991; Wahleithner et al., 1991; Li und Lagarias, 1992; Deforce et al., 1993; Kunkel et al., 1993; Li und Lagarias, 1994; Kunkel et al., 1995; Tomizawa et al., 1995). Nach Expression eines Apo-Phytochroms in *Pichia pastoris* konnte die zeitabhängige Bildung von spektral aktiven Holophytochrom beobachtet werden, ohne dass exogenes Bilin zugeführt worden war (Wu und Lagarias, 1996). Dieses Phänomen war von anderen Arbeitsgruppen bisher nicht beobachtet worden (Schmidt et al., 1996), was Wu und Lagarias auf die verwendeten kürzeren Expressionszeiten des Apo-Phytochroms zurückführten (Wu und Lagarias, 1996). Spektrale Untersuchungen führten zu der Annahme, dass *Pichia pastoris* Phytochromobilin bildete. Zu welchem Zweck *Pichia pastoris* einen Chromophor zu synthetisieren vermag, konnte nicht geklärt werden (Wu und Lagarias, 1996). Dieser an sich hoffnungsvolle Ansatz konnte sich jedoch nicht etablieren. Die Bereitstellung eines *in vivo* gebildeten Chromophors und die damit verbundene Möglichkeit von photoaktiven Holophytochrom in *S.cerevisiae* wäre von großem Vorteil. Die Suche nach Phytochrom-Interaktionspartnern könnte unter Berücksichtigung des Pr/Pfr-Zustandes von Holophytochrom erfolgen und somit der Versuch unternommen werden, lichtspezifische Signalwege aufzuklären.

Apo-Cph1, welches *in vitro* mit Phycocyanobilin assembliert wurde, zeigt nach Abschluss der Bakterien massive Aggregationstendenzen. Durch eine *in vivo* Assemblierung zu Holo-Cph1 könnte durch Faltungsbedingungen in der intakten Bakterien-

zelle diese *in vitro*-Aggregation möglicherweise unterbunden werden. Ebenfalls wurde untersucht, ob eine Expression von molekularen Chaperonen die Löslichkeit des *in vivo* gebildeten Holo-Cph1 verbessert und eine *in vitro*-Aggregation nach Aufschluss der Bakterien verhindert werden kann.

4.1 Expression von Holo-Cph1 in *E.coli*

Ein erster Schritt auf dem Weg zu Holophytochrom in *E.coli* war das Einbringen einer Häm-Oxygenase. Nach Klonierung des *R.rattus* Häm-Oxygenase-Gens (*ho-1*) in den Expressionsvektor pPROLar.A122 (= p6) konnte durch Induzierung der Proteinexpression von HO-1 bei 37°C eine grünliche Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden. Dies ist auf eine Akkumulierung von Biliverdin IX α , dem entstandenen Endprodukt der HO-1, zurückzuführen (Wilks und Ortiz de Montellano, 1993). Biliverdin IX α ist jedoch kein Substrat für die Cph1 Bilin-Lyase-Domäne: wie bei pflanzlichen Phytochromen werden lediglich Phycocyanobilin, Phytochromobilin und Phycoerythrobilin „akzeptiert“. Für die Umwandlung von Biliverdin IX α zu Phycocyanobilin musste zusätzlich eine entsprechende Biliverdin IX α -Reduktase zur Expression gebracht werden. Um die entsprechende Biliverdin IX α -Reduktase aus *Synechocystis* PCC 6803 einsetzen zu können, wurde das mittels einer BLAST-Analyse ermittelte Homolog zu HY-2 (*A.thaliana*) untersucht. Das PcyA-Gen aus *Synechocystis* PCC 6803 wurde hinter *ho-1* aus *R.rattus* kloniert (p8). Somit bestand die Möglichkeit, über ein Plasmid sowohl *R.rattus* HO-1 als auch *Synechocystis* PCC 6803 PcyA zur Expression zu bringen. In der Tat konnte nach Expression von HO-1 und PcyA bei 37°C eine türkise Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden, allerdings war in einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE keine Expression der beteiligten Proteine beobachtet worden (siehe Abb. 3.03).

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass Cph1 bei einer Expression von Temperaturen über ~25°C in sogenannte *inclusion bodies* ausfällt. Um Holophytochrom zu erhalten, wurde Cph1 aus *Synechocystis* PCC 6803 zusammen mit PcyA und HO-1 für 18 Stunden bei 22°C exprimiert. Hierbei konnte jedoch keine grünlich/türkise Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden. Das Ausbleiben der Färbung signalisierte, dass weder Biliverdin IX α noch Phycocyanobilin gebildet worden war. Abbil-

[dung 3.05](#) zeigt, dass lösliches Apo-Cph1 gebildet worden war und mit exogen dargebotenem Phycocyanobilin autokatalytisch assemblieren konnte. Die fehlende Färbung der Bakterienkultur ist darum vermutlich durch die unzureichende enzymatische Aktivität von HO-1 und/oder PcyA bei 22°C hervorgerufen worden. Aufgrund dessen wurde eine Expression von Cph1, HO-1 und PcyA in *E.coli* bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. In einem Temperaturbereich von 18-24°C konnte keine Färbung der Bakterienkultur nach Induzierung der Proteinexpression beobachtet werden, und ein Differenzsignal war erst nach Zugabe von Phycocyanobilin messbar. In den Temperaturbereichen über 25°C konnte eine türkise Färbung der Bakterienkultur nach Induzierung der Proteinexpression beobachtet werden. In diesen Temperaturbereichen war jedoch auch nach Zugabe von Phycocyanobilin kein Differenzsignal zu erkennen, da Cph1 aufgrund der hohen Anzuchtstemperatur in *inclusion bodies* akkumulierte. Auch war man sich nicht sicher, um welches Pigment es sich bei der beobachteten Färbung handelte. Um festzustellen ob es sich bei der beobachteten türkisen Färbung um Biliverdin IX α oder Phycocyanobilin handelte, wurden nach Induzierung der Proteinexpression eine bei 18°C inkubierte [pF10-His](#) (*cph1*) Bakterienkultur und eine bei 37°C inkubierte [p8](#) (*ho-1* und *pcyA*) Bakterienkultur gemischt, aufgeschlossen und der lösliche Überstand spektrophotometrisch untersucht (siehe [Abb. 3.06](#)). Da Biliverdin IX α nicht in der Lage ist, mit Cph1 autokatalytisch zu assemblieren (Lamparter et al., 1997; Bhoo et al., 2001), bedeutet das gemessene Differenzsignal, dass es sich bei dem gebildeten Endprodukt von den enzymatischen Aktivitäten der HO-1 und PcyA um Phycocyanobilin handeln musste. Da die Bildung von Phycocyanobilin bei Temperaturen über 25°C erfolgte, das gebildete Apo-Cph1 bei diesen Temperaturen jedoch fast quantitativ unlöslich war, wurde versucht, ein „offenes Fenster“ für die Co-Expression von Cph1, PcyA und HO-1 zu finden. Dazu wurde das Löslichkeitsverhalten von Apo-Cph1 zwischen 18-30°C ermittelt. [Abbildung 3.08](#) gibt exemplarisch die Ergebnisse für die Löslichkeit von Apo-Cph1 bei drei verschiedenen Temperaturen wieder: bei 18°C war fast das gesamte Apo-Cph1 löslich im Überstand zu finden, lediglich ein geringer Anteil befand sich unlöslich im *Pellet*. Bei 25°C war fast das gesamte Apo-Cph1 im *Pellet* zu finden. Dies wurde auch durch ein schwaches Differenzsignal in [Abbildung 3.09](#) bestätigt. Bei 30°C befand sich das gesamte Apo-Cph1 unlöslich im *Pellet*. Ein Differenzsignal war nicht mehr messbar (siehe [Abb. 3.09](#)). Es war also nicht möglich, ein „offenes Fenster“ für die *in vivo* Holophytochrombildung bei der Co-Expression von Cph1, PcyA und HO-1

zu ermitteln. Die Problematik bestand nun darin, dass Apo-Cph1 bei den Temperaturen, bei denen der Chromophor bereitgestellt wurde, unlöslich war. Um diesen Sachverhalt zu ändern, wurde ein Austausch der *R.rattus* Häm-Oxygenase erwägt. Das Temperaturoptimum von HO-1 liegt aufgrund der Körpertemperatur von *R.rattus* bei 37°C (Schacter, 1978). Vermutlich war diese HO-1 bei Temperaturen unter 25°C in ihrer enzymatischen Aktivität zu stark eingeschränkt und konnte somit PcyA kein Biliverdin IX α zur Verfügung stellen. Daher schien es ratsam, eine Häm-Oxygenase aus einem Organismus zu verwenden, dessen Temperaturoptimum zwischen 18-24°C liegt.

Eine Häm-Oxygenase aus *Synechocystis* PCC 6803 (HO) wurde von Cornejo et al., 1998 entdeckt und charakterisiert. Die Umgebungstemperatur im Lebensraum von *Synechocystis* PCC 6803 liegt bei ungefähr 25°C (Hübschmann et al., 2001). Schon vor der Entdeckung von HO konnte die funktionelle Aktivität einer Häm-Oxygenase bei 25°C aus Extrakten von *Synechocystis* PCC 6803 gezeigt werden (Cornejo und Beale, 1997). Nach Klonierung von *ho* aus genomischer *Synechocystis* PCC 6803 DNA in den Expressionsvektor pPROLar.A122 (p40) konnte nach Induktion der Proteinexpression auch in den Temperaturbereichen von 18-37°C eine grünliche Färbung der Bakterienkultur beobachtet werden. In einem Coomassie gefärbten SDS-PAGE konnte wiederum keine Expression beobachtet werden (siehe Abb. 3.11). Das PcyA-Gen wurde auch hinter *ho* in das Plasmid p40 kloniert (= p45). Die Plasmide pF10-His (*cph1*) und p45 (*ho* und *pcyA*) wurden in *E.coli* (XL1-blue) co-transformiert und nach Induzierung der Proteinexpression bei 22°C inkubiert. Nach Pelletierung der Bakterienkultur wurde im Vergleich zur nicht induzierten Kontrollkultur eine türkise Färbung beobachtet (siehe Abb. 3.13). Eine Zink-Fluoreszenz und Coomassie-Färbung konnte dann die Bildung von Holophytochrom bestätigen. Zink-Fluoreszenz kann als Nachweis für Phytochrome, die mit einem Chromophor kovalent verknüpft sind, herangezogen werden (Berkelman und Lagarias, 1986). Das gebildete Holo-Cph1 wurde aus den aufgeschlossenen Bakterien mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend spektrophotometrisch analysiert (siehe Abb. 3.15). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Holophytochrom *in vivo* gebildet worden war. Durch die Wahl von *Synechocystis* PCC 6803 HO und PcyA war es nun erstmals gelungen, lösliches Holo-Cph1 in *E.coli* zur Expression zu bringen.

Bei UV-Vis-Messungen des *in vivo* gebildeten Holophytochroms fiel allerdings eine hypsochrome (Blau-) Verschiebung im Vergleich zu *in vitro* assemblierten Holophyto-

chrom auf (siehe Tab. 3.1). Apo-Cph1, das aus pF10-His erhalten und mit Phycocyanobilin versetzt wurde (autokatalytische Assemblierung *in vitro*), entspricht dem in der Literatur (*in vitro* assembliertes Holo-Cph1) beschriebenen Verhalten im UV-Vis (siehe Abb. 3.16). Ähnliche Ergebnisse im UV-Vis wurden durch eine *in vitro*-Assemblierung von Apo-Cph1 mit Phycocyanobilin aus p45 erhalten (siehe Abb. 3.16; Zur besseren Übersicht sind die relevanten Ergebnisse in Tabelle 3.1 zusammengefasst). Daraus ergibt sich, dass die hypsochrome (Blau-) Verschiebung nur bei *in vivo* assemblierten Holophytochrom auftritt. Der Grund für die spektrale Verschiebung könnte sein, dass durch eine *in vivo* Assemblierung während der Translation das Holophytochrom in seiner Konformation *in situ* durch die Bakterienzelle in einem anderen Zustand als bei der *in vitro* Assemblierung vorliegt.

Zusätzlich wurde der Fragestellung nachgegangen, ob das *in vivo* gebildete assemblierungsfähige Apo-Cph1 vollständig mit einem Chromophor versehen worden war (= 100%-Absättigung). Abbildung 3.17 zeigt, dass das von HO und PcyA gebildete Phycocyanobilin nicht ausreichte, allen Apo-Cph1 Molekülen ausreichend Chromophor zur Verfügung zu stellen. In der Tat wurde eine Expression von HO und PcyA im SDS-PAGE/Coomassie nicht beobachtet, lediglich durch die enzymatische Aktivität wurde ihre Anwesenheit belegt. Der Grund für die unzureichende Bereitstellung von Chromophor könnten die unterschiedlichen Expressionsstärken der verwendeten Promotoren sein oder in der pro Bakterienzelle vorliegenden Plasmidzahl liegen. Plasmide, die ColE1 als Replikationsursprung beinhalten, kommen pro Bakterienzelle mit 70-80 Kopien vor, während Plasmide mit p15A als Replikationsursprung lediglich mit 8-15 Kopien pro Bakterienzelle vorkommen. Auch eine Regulation durch die Bakterien selber muss in Betracht gezogen werden, da eine starke Expression der HO mit einer übermäßigen Beanspruchung des vorhandenen Häm-Pools einhergehen könnte und die Bildung von HO über einen Rückkoppelungsmechanismus reprimiert werden könnte.

Um das assemblierungsfähige Apo-Cph1 mit einem Chromophor abzusättigen, wurde über einen Austausch der Expressionsvektoren versucht, ein günstigeres Expressionsverhältnis von HO und PcyA im Verhältnis zu Cph1 zu erreichen. Zur Überprüfung, ob sich pQE12 für die Expression von HO und PcyA eignet, wurde HO in pQE12 kloniert (= p70, siehe Abb. 3.18) und erfolgreich exprimiert (siehe Abb. 3.19). Es konnte eine grünliche Färbung (Biliverdin IX α) der Bakterienkultur beobachtet werden. Anschließend wurden die HO und PcyA Gene bicistronisch in einen modifizierten pQE12-Vektor kloniert (p77: siehe Abb. 3.21). Das Cph1-Gen wurde in pPROLar.A122 kloniert (=

p58, siehe Abb. 3.22), um eine Co-Expression mit p77 zu ermöglichen. Nachdem die Bildung von Apo-Cph1 überprüft worden war (siehe Abb. 3.23), wurde eine Co-Expression von p58 mit p77 in *E.coli* (XL1-blue) durchgeführt. Nach Induktion der Proteinexpression wurde das bei 22°C löslich *in vivo* gebildete Holo-Cph1 über Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt und spektrophotometrisch untersucht. Anschließend wurde Phycocyanobilin zugegeben, um die Vollständigkeit der Assemblierung zu überprüfen. Wie Abbildung 3.24 zeigt, war es durch den Austausch der Expressionsvektoren gelungen, Apo-Cph1 vollständig mit einem Chromophor zu versehen und somit abgesättigtes Holo-Cph1 *in vivo* herzustellen. Auch bei diesen Messungen bestätigte sich die 5 nm hypsochrome (Blau-) Verschiebung im Vergleich zu *in vitro* assemblierten Holo-Cph1.

4.2 Bildung eines HO-PcyA Fusionsproteins

Bei einer SDS-PAGE/Coomassie-Färbung von p77 fiel eine dominante Expression bei einem apparenten Molekulargewicht von ~50 kDa auf (siehe Abb. 3.25). Das Fehlen einer sichtbaren Expressionsbande bei ~25 kDa (Größenbereich von sowohl HO als auch PcyA) deutete auf einen *read through* hin, da das Stop-Codon der HO als TAG vorlag und zwischen den HO und PcyA Genen genau 12 Basenpaare, die *in frame* 4 Aminosäuren kodierten, lagen. Die *Suppressor*-Eigenschaft des verwendeten *E.coli*-Stammes XL1-blue könnte die Bildung eines 50 kDa Fusionsproteins von HO und PcyA durch Überlesen des Stop-Codon bewirkt haben. Die Co-Expression von p58 und p77 wurde in den *sup⁻* *E.coli*-Stämmen (TOP10F') und (TunerTM(DE3)pLacI) vorgenommen (Genotypen: siehe Tab. 2.1). Nach Induzierung der Proteinexpression in den oben genannten *E.coli*-Stämmen konnten in SDS-PAGE/Coomassie-Färbungen Expressionen bei ~25 kDa beobachtet werden (siehe Abbildungen 3.26 und 3.27). Eine Expression bei ~50 kDa trat nicht mehr auf (Abb. 3.27). Die *Suppressor*-Eigenschaft von *E.coli* (XL1-blue) führte somit zur Bildung eines Fusionsproteins bestehend aus HO und PcyA. Dies ließ sich durch die Wahl eines geeigneten *sup⁻* *E.coli*-Stammes verhindern.

Durch die Bildung eines Fusionsproteins aus HO und PcyA ergab sich die Überlegung, ob der Chromophor durch das Fusionsprotein und/oder durch die wahrscheinlich vorhandenen (aber im SDS-PAGE nicht sichtbaren) einzelnen Proteine gebildet werden

kann. Ein Fusionsprotein könnte im Vergleich zu Einzel-Proteinen von Vorteil sein: HO und PcyA wären in räumlicher Nähe, was die Umwandlung von Biliverdin IX α zu Phycocyanobilin begünstigen könnte.

Um dies zu überprüfen, wurde ein Plasmid, das für ein HO-PcyA Fusionsprotein kodiert, mittels zielgerichteter Mutagenese gebildet (p98: siehe Abb. 3.28). Das Plasmid p98 wurde in *sup*⁻ *E.coli* (TOP10F') transformiert und die Proteinbildung induziert. Eine starke Türkisfärbung (Chloroformextraktion: siehe 3.32) und eine Bande bei ~50 kDa bestätigten den Klonierungserfolg; ein ~25 kDa Expressionsprodukt war nicht sichtbar (siehe Abb. 3.30). Nach erfolgter Co-Transformation mit p58 (*cph1*) in *E.coli* (TOP10F') wurde das *in vivo* entstandene Holo-Cph1 spektrophotometrisch analysiert (siehe Abb. 3.31). Das Differenzsignal war im Vergleich zur parallel laufenden Kontrolle von Holophytochrom, das durch Cph1 mit HO und PcyA (p58/p77) gebildet wurde, sehr niedrig (Abb. 3.31). Die von den einzelnen Proteinen (p77) bzw. dem Fusionsprotein (p98) gebildeten Chromophore wurden in Chloroform extrahiert (Ishikawa et al., 1991). Die UV-Vis Eigenschaften waren ähnlich. Dadurch konnte allerdings nicht eindeutig bestätigt werden, dass es sich um Phycocyanobilin handelt (siehe Abb. 3.32). Deshalb wurden die aus p77 bzw. p98 gebildeten Chromophore zu Apo-Cph1 gegeben (autokatalytischen Assemblierung) und Differenzspektren gemessen (Abb. 3.33). Das Fusionsprotein (p98) konnte nur zu einem geringen Anteil (im Vergleich zu den einzeln gebildeten Proteinen aus p77) assemblieren. Die Bildung des assemblierungsfähigen Phycocyanobilins durch das Expressionsplasmid p77 in *E.coli* (XL1-blue) kam darum vermutlich primär durch die vereinzelt gebildeten Proteine HO und PcyA zustande und nicht durch das gebildete Fusionsprotein. Das Fusionsprotein (p98) selber scheint nur in geringem Maße assemblierungsfähigen Chromophor zu bilden, während der Großteil des gebildeten Pigmentes nicht in der Lage ist, mit Apo-Cph1 zu assemblieren.

4.3 Einfluss von molekularen Chaperonen auf das Löslichkeitsverhalten von Holo-Cph1

Durch Co-Expression der Plasmide p58 und p77 konnte vollständig *in vivo* assembliertes Holophytochrom gebildet werden. Da Holo-Cph1 trotz der *in vivo*-Assemblierung dazu tendierte, massiv *in vitro* nach Aufschluss der Bakterien zu

aggregieren, wurde die zusätzliche Expression von molekularen Chaperonen in Erwägung gezogen. Wie in der Einleitung (1.4) bereits erwähnt, wurden für diesen Versuchsansatz Chaperonsysteme verwendet, die unmittelbar nach Translation dafür sorgen könnten, dass die Konformation von Holo-Cph1 *in vivo* verbessert und eine Aggregation von Holo-Cph1 *in vitro* verhindert werden könnte.

In einem ersten Versuchsansatz wurde eine Überexpression von GroE S/L mit Cph1, HO und PcyA durchgeführt. Das GroE S/L System ist in *E.coli* an der Faltung von Proteinen unmittelbar nach ihrer Translation an den Ribosomen beteiligt. Es gehört zu den zentralen Faltungselementen in *E.coli*. Eine Überexpression von GroE S/L könnte die korrekte Faltung des ebenfalls exprimierten Holo-Cph1 gewährleisten und/oder verbessern. Die hypsochrome (Blau-) Verschiebung des *in vivo* gebildeten Holo-Cph1 zeigt einen deutlichen Unterschied im UV-Vis im Vergleich zu *in vitro* assemblierten Holo-Cph1 auf. Eine Überexpression von GroE S/L könnte den Konformationszustand dahingehend optimieren, dass eine Aggregation von Holo-Cph1 *in vitro* nach Aufschluss der Bakterien nicht mehr stattfindet. Nach Klonierung des Plasmids p132 (siehe Abb. 3.51) wurde eine Überexpression der induzierten Proteine nach SDS-PAGE/Coomassie-Färbung sichtbar (siehe Abb. 3.52). Das Löslichkeitsverhalten von Holo-Cph1 wurde bei verschiedenen Temperaturen untersucht (siehe Abb. 3.53). Eine verbesserte Expression von Holo-Cph1 konnte jedoch nicht beobachtet werden. Holo-Cph1 zeigte *in vitro* nach wie vor ein massives Aggregationsverhalten.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Co-Expression von Holo-Cph1 mit einem sHSP aus Tomate (*Lycopersicon peruvianum*) durchgeführt. Dies erschien sinnvoll, da kleine Hitzestressproteine andere Proteine in einem faltungskompetenten Zustand halten und ATP-unabhängig arbeiten. Dies ist für den beschriebenen Versuchsansatz insofern von Vorteil, da dadurch eine Wirtszelle nicht mit übermäßigem ATP-Verbrauch belastet wird. Nach erfolgreicher Klonierung der sHSP 18.9 cDNA hinter *cph1* in p58 (= p71) konnte dieses Plasmid in *E.coli* (TOP10F') angezogen und die Proteinexpression induziert werden. Dabei fiel auf, dass die Bildung des sHSP über einen Antikörpernachweis zwar bestätigt werden konnte, diese jedoch zu schwach ausgefallen war, um in einer SDS-PAGE/Coomassie-Färbung erkennbar zu sein (siehe Abb. 3.42). Um zu prüfen, ob trotz der geringen Menge an sHSP eine Verbesserung der Löslichkeit von Holo-Cph1 bewirkt werden kann, wurden p71 und p77 co-transformiert und bei 18°C bzw. 28°C die Proteinbildung induziert. Die Temperatur von 28°C wurde gewählt, um einen Einfluss des sHSP auf die Löslichkeit von Holo-Cph1 im Vergleich

zur 18°C Expression zu erfassen. Als Kontrolle diente eine p58/p77-Bakterienkultur. Die Co-Expression des sHSP 18.9 konnte bei 28°C (Abb. 3.44) keine verbesserte Löslichkeit von Holo-Cph1 im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.43) zeigen. Die Aggregation des Holo-Cph1 war nach Aufschluss der Bakterien *in vitro* nach wie vor massiv vorhanden.

Um sicherzustellen, dass dieses Ergebnis nicht aufgrund der geringen Expressionsintensität des sHSP 18.9 verursacht wurde, ist eine Modifikation von p71 durchgeführt worden. Das Einsetzen einer zusätzlichen Ribosomen-Bindestelle vor dem sHSP 18.9-Gen (= p92; siehe Abb. 3.45) konnte dessen Expression deutlich steigern (siehe Abb. 3.46). Dennoch konnte die sichtbar starke Expression von sHSP 18.9 keine Verbesserung der Löslichkeit von Holo-Cph1 *in vivo* bewirken. Ebenso wurde nach wie vor eine massive Aggregation von Holo-Cph1 *in vitro* nach Aufschluss der Bakterien beobachtet.

Leider hat die Expression von molekularen Chaperonen keine verbesserte Löslichkeit des Holo-Cph1 bei 28°C bewirkt, noch eine Aggregation *in vitro* nach Aufschluss der Bakterien verhindert. Verschiedene Arbeiten hatten gezeigt, dass GroE S/L in der Lage ist die Proteinfaltung und Expression von Proteinen in *E.coli* zu verbessern (Goloubinoff et al., 1989; Watanabe et al., 2002). Die Aggregation von Holo-Cph1 *in vitro* nach Aufschluss der Bakterien ist für die Kristallbildung von enormem Nachteil. Alle anderen Applikationen, die sich aus der hier entwickelten Holo-Cph1-Gewinnung ergeben, bleiben davon unberührt. Da Holo-Cph1 *in vivo* löslich gebildet wird und nicht in *inclusion bodies* ausfällt, können *random mutagenesis* Untersuchungen, um z.B. Peptid-Chromophor-Wechselwirkungen zu untersuchen, nach wie vor durchgeführt werden. Auch für einen in *S.cerevisiae* zu etablierenden Hefe-2-Hybrid-Ansatz kann Holo-Cph1 verwendet werden.

Um mittels Kristallisation bei der Aufklärung im Bereich der Chromophorbindung an das Apoprotein und dessen Konformationsveränderungen durch unterschiedliche Lichtqualitäten (Hellrot/Dunkelrot) weiter zu kommen, wurde versucht, eine Deletionsmutante (Cph1Δ2), die nur aus dem Chromophor bindenden N-Terminus besteht, vollständig *in vivo* mit einem Chromophor zu versehen.

4.4 Expression von Holo-Cph1 Δ 2 in *E.coli*

In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Deletionsmutante von Cph1 (Cph1 Δ 2), die nur aus dem N-terminalen Phytochromanteil besteht, nach Aufschluss der Bakterien nicht zur Aggregation *in vitro* neigt (Hughes, pers. Mitteilung, Yeh et al., 1997). Es konnte ferner gezeigt werden, dass Holo-Cph1 Δ 2 fast identische spektrale Eigenschaften im UV-Vis wie Holo-Cph1 aufweist (Yeh et al., 1997; van Thor et al., 2001; Sineshchekov et al., 2002).

Das Cph1 Δ 2-Gen wurde in den Expressionsvektor pPROLar.A122 kloniert (= p83; siehe Abb. 3.34). Zusätzlich wurde vor das PcyA-Gen in dem Plasmid p77 eine Ribosomen-Bindestelle kloniert (p171; siehe Abb. 3.35). Eine starke Expression der induzierten Proteine von p171/p83 Co-Transformanten konnte in einer SDS-PAGE/Coomassie-Färbung gezeigt werden (siehe Abb. 3.36). Die enzymatische Aktivität der Expressionsprodukte wurde durch eine türkise Färbung der Bakterienkultur deutlich. Ferner konnte gezeigt werden, dass auch Holo-Cph1 Δ 2 *in vivo* vollständig assembliert wurde (Abb. 3.37).

Um von einem Protein ein Kristall erhalten zu können, ist es essentiell, dass das Protein von anderen Proteinen aufgereinigt ist. Dazu muss eine Aufreinigung, wie in unserem Falle über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, optimiert werden. Um dies zu bewerkstelligen, wurden diverse Faktoren untersucht. Ein RNase-Verdau nach Aufschluss der Bakterien konnte den Reinheitsgrad (Absorptionsverhältnis: Verhältnis des Pr-Maximum zu dem des 280nm-Maximum) erheblich verbessern. Wie Abbildung 3.38 wiedergibt, konnte durch den RNase-Verdau das Absorptionsmaximum bei 260-280 nm nach einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie zugunsten von 280 nm verschoben werden. Zusätzlich ist eine erhebliche Erniedrigung im Absorptionsmaximum bei 280 nm zu beobachten. Der Einfluss von DNase wurde ebenfalls untersucht, brachte jedoch keine Verbesserung. Eine Imidazolkonzentration von 40 mM im Waschpuffer sowie ein Spülen der Ni-NTA-Agarosesäule mit dem 10-fachen Säulenvolumen ergab das beste Resultat. Nach Messung der absoluten Spektren konnte ein Absorptionsverhältnis (Verhältnis des Pr-Maximums zu dem des 280 nm Maximum) von 1.16 erzielt werden (siehe Abb. 3.39). Ein Coomassie gefärbtes SDS-PAGE zeigt einzelne Fraktionen während der Aufreinigungsphase bei einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie (siehe

Abb. 3.40). Dort zeigt sich, dass Holo-Cph1 Δ 2 zu einem hohen Grad (von anderen Proteinen) aufgereinigt worden war.

Eine hypsochrome (Blau-) Verschiebung (5 nm) war bei *in vivo* assemblierten Holo-Cph1 Δ 2 im Vergleich zu *in vitro* assemblierten Holo-Cph1 Δ 2 vorhanden (siehe Tab. 3.2). Dies deckt sich mit Ergebnissen, welche bisher für Holo-Cph1 erhalten wurden. Diverse Untersuchungen hatten gezeigt, dass das UV-Vis-Verhalten von Holo-Cph1 Δ 2 mit dem von Holo-Cph1 nahezu identisch ist (Yeh et al., 1997; van Thor et al., 2001; Sineschekov et al., 2002). Falls diese spektrale Verschiebung, wie bereits vermutet wurde, durch die Faltungsbedingungen in der Bakterienzelle zustande kommt, hat der Verlust des C-Terminus in Cph1 Δ 2 auf die Bindung des Chromophors und dessen spektrale Eigenschaften keinen Einfluss. Ein anderer Grund für die hypsochrome Verschiebung könnte bei dem Chromophor Phycocyanobilin liegen. In dem hier etablierten Expressionssystem wird Phycocyanobilin in *E.coli* hergestellt. Dies besitzt nicht nur den Vorteil einer *in vivo*-Bildung von Phycocyanobilin, sondern gewährleistet auch die unmittelbare Bindung an das Apoprotein durch die hier etablierte Co-Expression. Sowohl eigene als auch Untersuchungen in der Gruppe um C. Lagarias zeigten, dass die Bildung von Phycocyanobilin in Abwesenheit von Apo-Cph1 problematisch ist (Gambetta und Lagarias, 2001). Die Bildung von Phycocyanobilin bzw. dessen Stabilität ist zumindest in *E.coli* in Abwesenheit von Apo-Cph1 nicht immer gewährleistet. Die meisten Untersuchungen an Holo-Cph1 bzw. Holo-Cph1 Δ 2 waren mit Phycocyanobilin durchgeführt worden, das über Methanolyse aus Cyanobakterien gewonnen wurde. Eine geringfügige Veränderung des Phycocyanobilins kann hierbei nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann die Reinheit und das Alter des verwendeten Phycocyanobilins eine Rolle spielen. Phycocyanobilin zeigt in wässriger Lösung eine sukzessive Veränderung seiner spektralen Eigenschaften (nicht gezeigt). Durch die fehlende Aggregation von Holo-Cph1 Δ 2 eignet sich dieses hervorragend für Kristallbildungsversuche und eine anschließende Aufklärung der 3-dimensionalen Struktur mittels Kristallstrukturanalyse. Da Holo-Cph1 Δ 2 in seinen UV-Vis-Eigenschaften mit denen von Holo-Cph1 identisch ist, können trotz der fehlenden Histidin-Kinase-Domäne wertvolle Hinweise über die Bindung des Chromophors an die Chromophor-Binde-Domäne mittels Kristallstrukturanalyse gewonnen werden.

Durch diese Arbeit konnte mittels Co-Expression der beteiligten Proteine *in vivo* assembliertes Holophytochrom in *E.coli* hergestellt werden.

Apo-Cph1 Δ 2 und Apo-Cph1 lassen sich in *E.coli* (BL21PRO) problemlos exprimieren. Durch Co-Expression mit HO und PcyA können die gebildeten Apoproteine *in vivo* zu Holophytochrom assemblieren. Eine *in vitro*-Assemblierung mit Phycocyanobilin, das in einem aufwendigen Verfahren aus Cyanobakterien isoliert werden müsste, entfällt. Nach Aufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie erhält man hochreines Holophytochrom. Dieses kann, zumindest für Holo-Cph1 Δ 2, auf 10 mg/ml konzentriert werden, ohne dass eine Aggregation *in vitro* stattfindet. Nach einer weiteren Aufreinigung über *size exclusion chromatography* kann man den Versuch unternehmen, von Holo-Cph1 Δ 2 ein Kristall zu erhalten, um ihn mittels Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen und somit seine 3-dimensionale Struktur aufzuklären. Da Holo-Cph1 Δ 2 im UV-Vis dieselben Eigenschaften aufweist wie Holo-Cph1, können Erkenntnisse über die Peptid-Chromophor-Wechselwirkungen höchstwahrscheinlich auch auf Holo-Cph1 übertragen werden. Dies wäre für das Verständnis über die Funktionsweise von cyanobakteriellen Phytochrom, auch im Hinblick auf Phytochrome in höheren Pflanzen, von entscheidender Bedeutung.

Durch *in vivo* Bildung von Holophytochrom in *E.coli* können mittels *random mutagenesis* in einem zu etablierenden *high throughput* Verfahren die Peptid-Chromophor-Wechselwirkungen weiter untersucht werden. Auch diese Untersuchungen werden entscheidend zu dem Funktionsverständnis von Phytochromen beitragen.

Diese Arbeit zeigt, dass die Co-Expression der zur Holophytochrombildung benötigten Proteine und die damit verbundene *in vivo* Assemblierung in *E.coli* prinzipiell möglich ist, und dass diese Erfahrungen für weitere Ansätze genutzt werden können. Erste Erfolge konnten dadurch bereits in *S.cerevisiae* durch eine Diplom-Arbeit von Frau Katrin Link unter meiner Betreuung erzielt werden. In dieser Arbeit war es uns gelungen, schwach grünlich gefärbte *S.cerevisiae*-Zellen durch Expression einer Häm-Oxygenase zu erhalten (siehe Abb. 4.01).

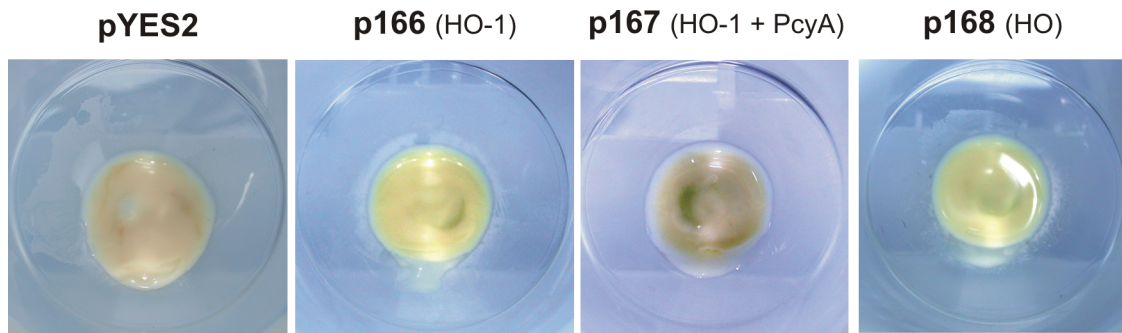


Abb. 4.01 Expression von Häm-Oxygenase in *S.cerevisiae*
 pYES2: Leervektorkontrolle; p166, 167 und p168: Expression der oben angegebenen Proteine. Abbildung aus der Diplomarbeit von Frau Katrin Link (2002).

Weitere Untersuchungen sind für optimierte Umsetzungsbedingungen der Häm-Oxygenase nötig. Um Biliverdin IX α bilden zu können, benötigt die Häm-Oxygenase freies Häm. Da *S.cerevisiae* ein eukaryotischer Organismus ist, ist das Vorhandensein von freiem Häm im Cytosol aufgrund der Kompartimentierungen nicht unbedingt gewährleistet. Das letzte Enzym in der Synthese von Häm, die Ferrochelatase, ist an der inneren Seite der mitochondrialen Membran angesiedelt (Camadro und Labbe, 1988; Karr und Dailey, 1988; Dailey et al., 2000; Karlberg et al., 2002). Nach der Synthese von Häm in den Mitochondrien kann Häm zwar auch in andere Kompartimente wie dem Cytosol oder den Peroxisomen gelangen, um dort entsprechenden Apoproteinen zur Verfügung zu stehen, jedoch ist über seine Verfügbarkeit in den einzelnen Kompartimenten wenig bekannt (Winkler et al., 1988; Labbe-Bois und Labbe, 1990). Um das Vorhandensein von Häm im Cytoplasma zu gewährleisten, könnte Ferrochelatase ohne deren mitochondriale Importsequenz exprimiert werden. Untersuchungen durch Expression von Ferrochelatase ohne deren mitochondriale Importsequenz an Ferrochelatase defizienten *S.cerevisiae*-Stämmen konnte das Vorhandensein von Ferrochelatase in allen Kompartimenten belegen (Prasad und Dailey, 1995). Jedoch war die gebildete Menge von Häm wesentlich niedriger als bei Wild-Typ-Stämmen von *S.cerevisiae* (Prasad und Dailey, 1995). Ein anderer Aspekt, der bei der Expression von prokaryotischen Genen in eukaryotischen Organismen berücksichtigt werden muss, ist das Spleißen von Introns. Spleißstellen in Hefe sind mit relativ guter Sicherheit *in silico* erkennbar (Long et al., 1997; Lopez und Seraphin, 1999). Analysen wiesen für sowohl *Synechocystis* PCC 6803 HO und PcyA keine derartigen Sequenzbereiche auf, und die leichte grünliche Färbung der *S.cerevisiae*-Kultur konnte zumindest für die Häm-Oxygenase ein Spleißen ausschließen. Obwohl

noch weitere Untersuchungen ausstehen, um *in vivo* gebildetes Holophytochrom in *S.cerevisiae* zu erhalten, ist die Suche nach Protein-Interaktionspartnern unter Berücksichtigung des Pr/Pfr-Zustandes von Phytochrom bereits erheblich näher gerückt.

Diese Arbeit stellt durch die *in vivo* Synthese von Holophytochrom in *E.coli* eine Verbesserung der Holophytochromgewinnung dar. Des Weiteren ermöglicht die hier beschriebene *in vivo*-Synthese von Holophytochrom in *E.coli* den Einsatz weiterer Analysemethoden zur Charakterisierung von Holophytochrom. Dadurch können weitere grundlegende Erkenntnisse über Phytochrome erhalten werden, was unser Verständnis über deren vielfältige Wirkungsweisen zweifelsohne vertiefen wird.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, die *in vivo* Holophytochromsynthese in *E.coli* zu etablieren, um ausreichend *in vivo* assembliertes Holophytochrom herstellen zu können. Ferner kann die Methode für Untersuchungen im Rahmen eines *random mutagenesis screening* Verfahrens nutzbar gemacht werden. Die Etablierung dieser Methode ist für einen entsprechenden Ansatz in *S.cerevisiae* von Vorteil, da dadurch die Möglichkeit entsteht, nach Phytochrom Interaktionspartnern mittels der Hefe-2-Hybrid Methode unter Berücksichtigung des Pr/Pfr-Zustandes von Phytochrom zu suchen.

- Um Holophytochrom zu bilden, wurden die entsprechenden Gene aus *Synechocystis* PCC 6803 (*cph1*, *ho* und *pcyA*) zur Expression gebracht. Daraufhin konnte erstmals lösliches Holo-Cph1 gebildet werden. Bei näheren Analysen fiel eine hypsochrome (Blau-) Verschiebung von ~5 nm auf, die nur bei einer *in vivo*, jedoch nicht bei einer *in vitro*-Assemblierung auftrat.
- Durch SDS-PAGE Analysen wurde die Präsenz eines Fusionsproteins aus HO und PcyA festgestellt, welches aufgrund der *sup*-Eigenschaft von *E.coli* (XL1-blue) zustande gekommen war. Durch die Wahl eines entsprechenden *sup*⁻ *E.coli*-Stammes konnte die Bildung eines Fusionsproteins verhindert werden. Das Fusionsprotein ergab zwar ein farbliches Pigment, jedoch konnte dieses Pigment kaum mit dem dargebotenen Apo-Cph1 assemblieren.
- Durch die *in vivo*-Assemblierung von Apo-Cph1 mit Phycocyanobilin konnte jedoch nicht die schon für das Apoprotein und für *in vitro* assembliertes Holo-Cph1 beobachteten Aggregationstendenzen nach Aufschluss der Bakterien verhindert werden. Um diese Aggregationen zu unterbinden, wurde die Co-Expression von molekularen Chaperonen (sHSP und GroE L/S) untersucht. Die Expression der oben erwähnten molekularen Chaperonen konnte die Löslichkeit von Holo-Cph1 *in vivo* und die Aggregationsbildung *in vitro* nicht unterbinden.
- Durch Deletion des C-Terminus (Histidin-Kinase-Domäne) von Cph1 entsteht ein Konstrukt (Cph1Δ2), das *in vitro* nicht mehr aggregiert. Cph1Δ2 ergab nach Co-Expression mit HO und PcyA ebenfalls vollständig *in vivo* assembliertes Holophytochrom und konnte nach einer optimierten Ni-NTA-Affinitätschromatographie zu einem hohen Grad aufgereinigt werden, was sich an dem im UV-Vis gemessenen Absorptionsverhältnis von 1.16 widerspiegelt.

6. Literaturverzeichnis

- Andel F, 3rd, Lagarias JC, Mathies RA** (1996) Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. *Biochemistry* **35**: 15997-16008
- Anfinsen CB** (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230
- Appleby JL, Parkinson JS, Bourret RB** (1996) Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**: 845-848
- Bardwell JC, Craig EA** (1987) Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5177-5181
- Beale SI** (1994) Biosynthesis of cyanobacterial tetrapyrrole pigments: hemes, chlorophylls, phycobilins. In DA Bryant, ed, *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 519-558
- Beale SI** (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth Res* **60**: 43-73
- Bentley NJ, Fitch IT, Tuite MF** (1992) The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**: 95-106
- Berkelman TR, Lagarias JC** (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **156**: 194-201
- Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B, Vierstra RD** (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**: 776-779
- Bhoo SH, Hirano T, Jeong HY, Lee JG, Furuya M, Song PS** (1997) Phytochrome photochromism probed by site-directed mutations and chromophore esterification. *J Am Chem Soc* **119**: 11717-11718
- Bognar LK, Hall A, Adam E, Thain SC, Nagy F, Millar AJ** (1999) The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14652-14657
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW** (1952a) *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**: 929-934
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK** (1952b) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**: 662-666
- Botto JF, Sanchez RA, Whitelam GC, Casal JJ** (1996) Phytochrome A Mediates the Promotion of Seed Germination by Very Low Fluences of Light and Canopy Shade Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **110**: 439-444

- Bowler C, Neuhaus G, Yamagata H, Chua NH** (1994a) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**: 73-81
- Bowler C, Yamagata H, Neuhaus G, Chua NH** (1994b) Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev* **8**: 2188-2202
- Boyle D, Takemoto L** (1994) Characterization of the alpha-gamma and alpha-beta complex: evidence for an *in vivo* functional role of alpha-crystallin as a molecular chaperone. *Exp Eye Res* **58**: 9-15
- Briggs WR, Beck CF, Cashmore AR, Christie JM, Hughes J, Jarillo JA, Kagawa T, Kanegae H, Liscum E, Nagatani A, Okada K, Salomon M, Rüdiger W, Sakai T, Takano M, Wada M, Watson JC** (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* **13**: 993-997
- Briggs WR, Huala E** (1999) Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 33-62
- Brinker A, Pfeifer G, Kerner MJ, Naylor DJ, Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2001) Dual function of protein confinement in chaperonin-assisted protein folding. *Cell* **107**: 223-233
- Brunt SA, Riehl R, Silver JC** (1990) Steroid hormone regulation of the *Achlya ambisexualis* 85-kilodalton heat shock protein, a component of the *Achlya* steroid receptor complex. *Mol Cell Biol* **10**: 273-281
- Bukau B, Horwich AL** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366
- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB** (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**: 1703-1708
- Camadro JM, Labbe P** (1988) Purification and properties of ferrochelatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a precursor form of the protein. *J Biol Chem* **263**: 11675-11682
- Canton FR, Quail PH** (1999) Both phyA and phyB mediate light-imposed repression of PHYA gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **121**: 1207-1216
- Cashmore AR** (1998) Higher-plant phytochrome: "I used to date histidine, but now I prefer serine". *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13358-13360
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**: 760-765
- Caspers GJ, Leunissen JA, de Jong WW** (1995) The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved "alpha-crystallin domain". *J Mol Evol* **40**: 238-248

- Chatellier J, Buckle AM, Fersht AR** (1999) GroEL recognises sequential and non-sequential linear structural motifs compatible with extended beta-strands and alpha-helices. *J Mol Biol* **292**: 163-172
- Chaudhuri TK, Farr GW, Fenton WA, Rospert S, Horwich AL** (2001) GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated. *Cell* **107**: 235-246
- Chen L, Sigler PB** (1999) The crystal structure of a GroEL/peptide complex: plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell* **99**: 757-768
- Chen Q, Osteryoung K, Vierling E** (1994) A 21-kDa chloroplast heat shock protein assembles into high molecular weight complexes *in vivo* and *in Organelle*. *J Biol Chem* **269**: 13216-13223
- Cheng MY, Hartl FU, Martin J, Pollock RA, Kalousek F, Neupert W, Hallberg EM, Hallberg RL, Horwich AL** (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature* **337**: 620-625
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS** (1999a) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* **401**: 610-613
- Choi JS, Chung YH, Moon YJ, Kim C, Watanabe M, Song PS, Joe CO, Bogorad L, Park YM** (1999b) Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Photochem Photobiol* **70**: 95-102
- Chow KS, Singh DP, Roper JM, Smith AG** (1997) A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported *in vitro* into both chloroplasts and mitochondria. *J Biol Chem* **272**: 27565-27571
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA** (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol Biol* **25**: 413-427
- Clough RC, Jordan-Beebe ET, Lohman KN, Marita JM, Walker JM, Gatz C, Vierstra RD** (1999) Sequences within both the N- and C-terminal domains of phytochrome A are required for PFR ubiquitination and degradation. *Plant J* **17**: 155-167
- Cole WJ, Chapman DJ, Siegelman HW** (1967) The structure of Phycocyanobilin. *J Am Chem Soc* **89**: 3643-3645
- Cornejo J, Beale SI** (1997) Phycobilin biosynthetic reactions in extracts of cyanobacteria. *Photosynth Res* **51**: 223-230
- Cornejo J, Willows RD, Beale SI** (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant J* **15**: 99-107

- Csermely P, Kajtar J, Hollosi M, Jalsovszky G, Holly S, Kahn CR, Gergely P, Jr., Soti C, Mihaly K, Somogyi J** (1993) ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J Biol Chem* **268**: 1901-1907
- Cyr DM, Langer T, Douglas MG** (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* **19**: 176-181
- Dailey HA, Dailey TA, Wu CK, Medlock AE, Wang KF, Rose JP, Wang BC** (2000) Ferrochelatase at the millennium: structures, mechanisms and [2Fe-2S] clusters. *Cell Mol Life Sci* **57**: 1909-1926
- Davis SJ, Kurepa J, Vierstra RD** (1999a) The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6541-6546
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD** (1999b) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**: 2517-2520
- Deforce L, Furuya M, Song PS** (1993) Mutational analysis of the pea phytochrome A chromophore pocket: chromophore assembly with apophytochrome A and photoreversibility. *Biochemistry* **32**: 14165-14172
- Deforce L, Tomizawa K, Ito N, Farrens D, Song PS, Furuya M** (1991) *In vitro* assembly of apophytochrome and apophytochrome deletion mutants expressed in yeast with phycocyanobilin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10392-10396
- Dehesh K, Franci C, Parks BM, Seeley KA, Short TW, Tepperman JM, Quail PH** (1993) *Arabidopsis* HY8 locus encodes phytochrome A. *Plant Cell* **5**: 1081-1088
- Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC** (1998) Phytochrome E influences internode elongation and flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1479-1487
- Devlin PF, Robson PR, Patel SR, Goosey L, Sharrock RA, Whitelam GC** (1999) Phytochrome D acts in the shade-avoidance syndrome in *Arabidopsis* by controlling elongation growth and flowering time. *Plant Physiol* **119**: 909-915
- Dobson CM, Karplus M** (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 92-101
- Dougherty JJ, Puri RK, Toft DO** (1984) Polypeptide components of two 8 S forms of chicken oviduct progesterone receptor. *J Biol Chem* **259**: 8004-8009
- Drechsler-Thielmann B, Dornemann D, Senger H** (1993) Synthesis of protoheme via both the C4-pathway and the Shemin pathway in the pigment mutant C-2A' of *Scenedesmus obliquus*. *Z Naturforsch* **48c**: 584-589
- Elich TD, Chory J** (1997) Biochemical characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *Plant Cell* **9**: 2271-2280

- Ellis RJ, Hemmingsen SM** (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends Biochem Sci* **14**: 339-342
- Ewalt KL, Hendrick JP, Houry WA, Hartl FU** (1997) *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90**: 491-500
- Fairchild CD, Schumaker MA, Quail PH** (2000) HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* **14**: 2377-2391
- Fankhauser C, Chory J** (2000) RSF1, an *Arabidopsis* locus implicated in phytochrome A signaling. *Plant Physiol* **124**: 39-45
- Fankhauser C, Staiger D** (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta* **216**: 1-16
- Farr GW, Furtak K, Rowland MB, Ranson NA, Saibil HR, Kirchhausen T, Horwich AL** (2000) Multivalent binding of nonnative substrate proteins by the chaperonin GroEL. *Cell* **100**: 561-573
- Farrelly FW, Finkelstein DB** (1984) Complete sequence of the heat shock-inducible HSP90 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **259**: 5745-5751
- Fayet O, Ziegelhoffer T, Georgopoulos C** (1989) The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J Bacteriol* **171**: 1379-1385
- Forreiter C, Kirschner M, Nover L** (1997) Stable transformation of an *Arabidopsis* cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity *in vivo*. *Plant Cell* **9**: 2171-2181
- Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC** (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**: 965-978
- Friedmann HC, Thauer RK, Gough SP, Kannangara CG** (1987) d-aminolevulinic acid formation in the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* requires tRNA_{GLU}. *Carlsberg Res Commun* **52**: 363-371
- Frydman J** (2001) Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem* **70**: 603-647
- Gambetta GA, Lagarias JC** (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10566-10571
- Gamer J, Multhaup G, Tomoyasu T, McCarty JS, Rudiger S, Schonfeld HJ, Schirra C, Bujard H, Bukau B** (1996) A cycle of binding and release of the DnaK, DnaJ and GrpE chaperones regulates activity of the *Escherichia coli* heat shock transcription factor sigma32. *Embo J* **15**: 607-617

- Garcia-Dominguez M, Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ** (2000) Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J Bacteriol* **182**: 38-44
- Gollub EG, Liu KP, Dayan J, Adlersberg M, Sprinson DB** (1977) Yeast mutants deficient in heme biosynthesis and a heme mutant additionally blocked in cyclization of 2,3-oxidosqualene. *J Biol Chem* **252**: 2846-2854
- Goloubinoff P, Gatenby A, Lorimer G** (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* **337**: 44-47
- Goosey L, Palecanda L, Sharrock RA** (1997) Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* PHYB, PHYD, and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol* **115**: 959-969
- Gottesman S, Squires C, Pichersky E, Carrington M, Hobbs M, Mattick JS, Dalrymple B, Kuramitsu H, Shiroza T, Foster T, et al.** (1990) Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3513-3517
- Guarente L, Mason T** (1983) Heme regulates transcription of the CYC1 gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**: 1279-1286
- Hackett RW, Lis JT** (1983) Localization of the hsp83 transcript within a 3292 nucleotide-sequence from the 63B heat shock locus of *Drosophila melanogaster*. *Nucl Acids Res* **11**: 7011-7030
- Hamazato F, Shinomura T, Hanzawa H, Chory J, Furuya M** (1997) Fluence and wavelength requirements for *Arabidopsis* CAB gene induction by different phytochromes. *Plant Physiol* **115**: 1533-1540
- Hartl FU** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579
- Hendrick JP, Langer T, Davis TA, Hartl FU, Wiedmann M** (1993) Control of folding and membrane translocation by binding of the chaperone DnaJ to nascent polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10216-10220
- Hirschfeld M, Tepperman JM, Clack T, Quail PH, Sharrock RA** (1998) Coordination of phytochrome levels in phyB mutants of *Arabidopsis* as revealed by apoprotein-specific monoclonal antibodies. *Genetics* **149**: 523-535
- Hoch JA, Silhavy TJ** (1995) Two Component Signal Transduction,
- Horwich AL, Low KB, Fenton WA, Hirshfield IN, Furtak K** (1993) Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* **74**: 909-917
- Horwitz J** (1992) Alpha-crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10449-10453

- Houry WA, Frishman D, Eckerskorn C, Lottspeich F, Hartl FU** (1999) Identification of *in vivo* substrates of the chaperonin GroEL. *Nature* **402**: 147-154
- Hu LM, Bodwell J, Hu JM, Orti E, Munck A** (1994) Glucocorticoid receptors in ATP-depleted cells. Dephosphorylation, loss of hormone binding, HSP90 dissociation, and ATP-dependent cycling. *J Biol Chem* **269**: 6571-6577
- Hübschmann T, Borner T, Hartmann E, Lamparter T** (2001) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Eur J Biochem* **268**: 2055-2063
- Hughes J, Lamparter T** (1999) Prokaryotes and phytochrome. The connection to chromophores and signaling. *Plant Physiol* **121**: 1059-1068
- Hughes J, Lamparter T, Mittmann F** (1996) Cerpu;PHY0;2, a "normal" phytochrome in *Ceratodon* (accession no. U56698). *Plant Physiol* **112**: 446
- Hughes J, Lamparter T, Mittmann F, Hartmann E, Gärtner W, Wilde A, Borner T** (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**: 663
- Huq E, Quail PH** (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *Embo J* **21**: 2441-2450
- Im YJ, Rho SH, Park CM, Yang SS, Kang JG, Lee JY, Song PS, Eom SH** (2002) Crystal structure of a cyanobacterial phytochrome response regulator. *Protein Sci* **11**: 614-624
- Ingolia TD, Craig EA** (1982) Four small *Drosophila* heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 2360-2364
- Ishikawa K, Sato M, Yoshida T** (1991) Expression of rat heme oxygenase in *Escherichia coli* as a catalytically active, full-length form that binds to bacterial membranes. *Eur J Biochem* **202**: 161-165
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J** (1993) Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* **268**: 1517-1520
- Jiang Z, Swem LR, Rushing BG, Devanathan S, Tollin G, Bauer CE** (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* **285**: 406-409
- Jinn TL, Chen YM, Lin CY** (1995) Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass heat shock protein complex in soybean. *Plant Physiol* **108**: 693-701
- Jinn TL, Wu SH, Yeh CH, Hsieh MH, Yeh YC, Chen YM** (1993) Immunological kinship of class I low molecular weight heat shock proteins and thermostabilization of soluble proteins *in vitro* among plants. *Plant Cell Physiol* **34**: 1055-1062

- Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC** (1994) Photoresponses of Light-Grown *phyA* Mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol* **105**: 141-149
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S** (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**: 109-136
- Karlberg T, Lecroq D, Gora M, Silvegren G, Labbe-Bois R, Hansson M, Al-Karadaghi S** (2002) Metal binding to *Saccharomyces cerevisiae* ferrochelatase. *Biochemistry* **41**: 13499-13506
- Karr SR, Dailey HA** (1988) The synthesis of murine ferrochelatase *in vitro* and *in vivo*. *Biochem J* **254**: 799-803
- Kendrick RE, Kronenberg G** (1994) Photomorphogenesis in Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Kimura Y, Yahara I, Lindquist S** (1995) Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing Hsp90-mediated signal transduction pathways. *Science* **268**: 1362-1365
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schäfer E, Nagy F** (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* **14**: 1541-1555
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1993) Characterization of cDNA for a dehydration-inducible gene that encodes a CLP A, B-like protein in *Arabidopsis thaliana* L. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1214-1220
- Klemenz R, Frohli E, Steiger RH, Schafer R, Aoyama A** (1991) Alpha B-crystallin is a small heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3652-3656
- Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC** (2001) The *Arabidopsis* *hy2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* **13**: 425-436
- Kolukisaoglu HU, Marx S, Wiegmann C, Hanelt S, Schneider-Poetsch HA** (1995) Divergence of the phytochrome gene family predates angiosperm evolution and suggests that *Selaginella* and *Equisetum* arose prior to *Psilotum*. *J Mol Evol* **41**: 329-337
- Krall L, Reed JW** (2000) The histidine kinase-related domain participates in phytochrome B function but is dispensable. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8169-8174

- Kulomaa MS, Weigel NL, Kleinsek DA, Beattie WG, Conneely OM, March C, Zarucki-Schulz T, Schrader WT, O'Malley BW** (1986) Amino acid sequence of a chicken heat shock protein derived from the complementary DNA nucleotide sequence. *Biochemistry* **25**: 6244-6251
- Kumar AM, Soll D** (2000) Antisense HEMA1 RNA expression inhibits heme and chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**: 49-55
- Kunkel T, Speth V, Buche C, Schäfer E** (1995) *In vivo* characterization of phytochrome-phycoerythrin adducts in yeast. *J Biol Chem* **270**: 20193-20200
- Kunkel T, Tomizawa K, Kern R, Furuya M, Chua NH, Schäfer E** (1993) *In vitro* formation of a photoreversible adduct of phycoerythrin and tobacco apophytochrome B. *Eur J Biochem* **215**: 587-594
- Labbe-Bois R, Labbe P** (1990) Tetrapyrrole and Heme Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In HA Dailey, ed, *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*. McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp 235-285
- Lagarias DM, Wu SH, Lagarias JC** (1995) Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol Biol* **29**: 1127-1142
- Lagarias JC, Rapoport H** (1980) Chromopeptides from Phytochrome. The Structure and Linkage of the PR Form of the Phytochrome Chromophore. *J Am Chem Soc* **102**: 4821-4828
- Lamparter T, Esteban B, Hughes J** (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur J Biochem* **268**: 4720-4730
- Lamparter T, Michael N, Mittmann F, Esteban B** (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Lamparter T, Mittmann F, Gärtner W, Borner T, Hartmann E, Hughes J** (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11792-11797
- Landgraf FT, Forreiter C, Hurtado Pico A, Lamparter T, Hughes J** (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **508**: 459-462
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU** (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* **356**: 683-689
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E** (1995) Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J Biol Chem* **270**: 10432-10438
- Leonhardt SA, Fearson K, Danese PN, Mason TL** (1993) HSP78 encodes a yeast mitochondrial heat shock protein in the Clp family of ATP-dependent proteases. *Mol Cell Biol* **13**: 6304-6313

- Li L, Lagarias JC** (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J Biol Chem* **267**: 19204-19210
- Li L, Lagarias JC** (1994) Phytochrome assembly in living cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12535-12539
- Li L, Murphy JT, Lagarias JC** (1995) Continuous fluorescence assay of phytochrome assembly *in vitro*. *Biochemistry* **34**: 7923-7930
- Liberek K, Wall D, Georgopoulos C** (1995) The DnaJ chaperone catalytically activates the DnaK chaperone to preferentially bind the sigma 32 heat shock transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6224-6228
- Long M, de Souza SJ, Gilbert W** (1997) The yeast splice site revisited: new exon consensus from genomic analysis. *Cell* **91**: 739-740
- Lopez PJ, Seraphin B** (1999) Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition. *Rna* **5**: 1135-1137
- Martinez-Garcia JF, Huq E, Quail PH** (2000) Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. *Science* **288**: 859-863
- Mayer SM, Beale SI** (1992) Succinyl-coenzyme A synthetase and its role in delta-aminolevulinic acid biosynthesis in *Euglena gracilis*. *Plant Physiol* **99**: 482-487
- Moore T, Keegstra K** (1993) Characterization of a cDNA clone encoding a chloroplast-targeted Clp homologue. *Plant Mol Biol* **21**: 525-537
- Murphy JT, Lagarias JC** (1997) The phytofluors: a new class of fluorescent protein probes. *Curr Biol* **7**: 870-876
- Nagatani A, Reed JW, Chory J** (1993) Isolation and Initial Characterization of *Arabidopsis* Mutants That Are Deficient in Phytochrome A. *Plant Physiol* **102**: 269-277
- Nagy F, Kircher S, Schäfer E** (2000) Nucleo-cytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochromes. *Semin Cell Dev Biol* **11**: 505-510
- Nagy F, Schäfer E** (2000a) Control of nuclear import and phytochromes. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 450-454
- Nagy F, Schäfer E** (2000b) Nuclear and cytosolic events of light-induced, phytochrome-regulated signaling in higher plants. *Embo J* **19**: 157-163
- Neuhaus G, Bowler C, Hiratsuka K, Yamagata H, Chua NH** (1997) Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *Embo J* **16**: 2554-2564
- Neuhaus G, Bowler C, Kern R, Chua NH** (1993) Calcium/calmodulin-dependent and -independent phytochrome signal transduction pathways. *Cell* **73**: 937-952

- Ni M, Tepperman JM, Quail PH** (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**: 657-667
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH** (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* **400**: 781-784
- Nicholl ID, Quinlan RA** (1994) Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. *Embo J* **13**: 945-953
- Papenbrock J, Grimm B** (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. *Planta* **213**: 667-681
- Park CM, Kim JI, Yang SS, Kang JG, Kang JH, Shim JY, Chung YH, Park YM, Song PS** (2000a) A second photochromic bacteriophytochrome from *Synechocystis sp.* PCC 6803: spectral analysis and down-regulation by light. *Biochemistry* **39**: 10840-10847
- Park CM, Shim JY, Yang SS, Kang JG, Kim JI, Luka Z, Song PS** (2000b) Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis sp.* PCC6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry* **39**: 6349-6356
- Parker MW, Hendricks SB, Borthwick HA, Went FW** (1949) *Am J Bot* **36**: 194-204
- Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S** (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**: 475-478
- Parsell DA, Sanchez Y, Stitzel JD, Lindquist S** (1991) Hsp104 is a highly conserved protein with two essential nucleotide-binding sites. *Nature* **353**: 270-273
- Prasad AR, Dailey HA** (1995) Effect of cellular location on the function of ferrochelatase. *J Biol Chem* **270**: 18198-18200
- Quail PH** (1997) The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bioessays* **19**: 571-579
- Quail PH, Boylan MT, Parks BM, Short TW, Xu Y, Wagner D** (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680
- Radford SE** (2000) Protein folding: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci* **25**: 611-618
- Reed JW, Nagpal P, Poole DS, Furuya M, Chory J** (1993) Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell* **5**: 147-157

- Reid KL, Fink AL** (1996) Physical interactions between members of the DnaK chaperone machinery: characterization of the DnaK.GrpE complex. *Cell Stress Chaperones* **1**: 127-137
- Rhie G, Beale SI** (1992) Biosynthesis of phycobilins. Ferredoxin-supported nadph-independent heme oxygenase and phycobillin-forming activities from *Cyanidium caldarium*. *J Biol Chem* **267**: 16088-16093
- Richardson A, Landry SJ, Georgopoulos C** (1998) The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem Sci* **23**: 138-143
- Rüdiger W** (1969) [On the structure of the phytochrome chromophore and its apoprotein linkage]. *Justus Liebigs Ann Chem* **723**: 208-212
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Ed 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanchez ER, Toft DO, Schlesinger MJ, Pratt WB** (1985) Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J Biol Chem* **260**: 12398-12401
- Sanchez Y, Lindquist SL** (1990) HSP104 required for induced thermotolerance. *Science* **248**: 1112-1115
- Sanchez Y, Parsell DA, Taulien J, Vogel JL, Craig EA, Lindquist S** (1993) Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol* **175**: 6484-6491
- Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S** (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *Embo J* **11**: 2357-2364
- Schacter BA** (1978) Assay of microsomal heme oxygenase in liver and spleen. *Methods Enzymol* **52**: 367-372
- Schäfer E, Bowle C** (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Rep* **3**: 1042-1048
- Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E** (1994) An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* **6**: 1899-1909
- Schmidt P, Westphal UH, Worm K, Braslavsky SE, Gärtner W, Schaffner K** (1996) Chromophore-protein interaction controls the complexity of the phytochrome photocycle. *J Photochem Photobiol B* **34**: 73-77
- Schmitt M, Neupert W, Langer T** (1995) Hsp78, a Clp homologue within mitochondria, can substitute for chaperone functions of mt-hsp70. *Embo J* **14**: 3434-3444
- Schneider-Poetsch HA** (1992) Signal transduction by phytochrome: phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor proteins. *Photochem Photobiol* **56**: 839-846

- Schneider-Poetsch HA, Braun B** (1991) Proposal on the nature of phytochrome action based on the C-terminal sequences of phytochrome. *J Plant Physiol* **137**: 576-580
- Schneider-Poetsch HA, Braun B, Marx S, Schaumburg A** (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. Hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction. *FEBS Lett* **281**: 245-249
- Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B** (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *Embo J* **12**: 4137-4144
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M** (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8129-8133
- Shinomura T, Uchida K, Furuya M** (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **122**: 147-156
- Siegelman HW, Turner BC, Hendricks SB** (1966) The chromophore of phytochrome. *Plant Physiol* **41**: 1289-1292
- Sigler PB, Xu Z, Rye HS, Burston SG, Fenton WA, Horwich AL** (1998) Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu Rev Biochem* **67**: 581-608
- Sineshchekov V, Koppel L, Esteban B, Hughes J, Lamparter T** (2002) Fluorescence investigation of the recombinant cyanobacterial phytochrome (Cph1) and its C-terminally truncated monomeric species (Cph1Delta2): implication for holoprotein assembly, chromophore-apoprotein interaction and photochemistry. *J Photochem Photobiol B* **67**: 39-50
- Smith AG, Marsh O, Elder GH** (1993) Investigation of the subcellular location of the tetrapyrrole-biosynthesis enzyme coproporphyrinogen oxidase in higher plants. *Biochem J* **292 (Pt 2)**: 503-508
- Smith H** (1995) Physiological and ecological functions with the phytochrome family. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 269-315
- Soh MS, Kim YM, Han SJ, Song PS** (2000) REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2061-2074
- Somers DE, Quail PH** (1995) Temporal and spatial expression patterns of PHYA and PHYB genes in *Arabidopsis*. *Plant J* **7**: 413-427
- Song PS** (1999) *J Biochem Mol Biol* **32**: 215-225

- Song PS, Chae Q, Gardner JD** (1979) Spectroscopic properties and chromophore conformations of the photomorphogenic receptor: phytochrome. *Biochim Biophys Acta* **576**: 479-495
- Sorger PK, Pelham HR** (1987) The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J Mol Biol* **194**: 341-344
- Spiegelman JI, Mindrinos MN, Fankhauser C, Richards D, Lutes J, Chory J, Oefner PJ** (2000) Cloning of the *Arabidopsis* RSF1 gene by using a mapping strategy based on high-density DNA arrays and denaturing high-performance liquid chromatography. *Plant Cell* **12**: 2485-2498
- Squires C, Squires CL** (1992) The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol* **174**: 1081-1085
- Squires CL, Pedersen S, Ross BM, Squires C** (1991) ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J Bacteriol* **173**: 4254-4262
- Szabo A, Langer T, Schröder H, Flanagan J, Bukau B, Hartl FU** (1994) The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10345-10349
- Taylor BL, Zhulin IB** (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**: 479-506
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R** (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**: 748-755
- Terry MJ** (1997) Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell Environ* **20**: 740-745
- Terry MJ, McDowell MT, Lagarias JC** (1995) (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *J Biol Chem* **270**: 11111-11118
- Tomizawa K, Stockhaus J, Chua NH, Furuya M** (1995) Spectrophotometric and molecular properties of mutated rice phytochrome A. *Plant Cell Physiol* **36**: 511-516
- van Thor JJ, Borucki B, Crieleard W, Otto H, Lamparter T, Hughes J, Hellingwerf KJ, Heyn MP** (2001) Light-induced proton release and proton uptake reactions in the cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* **40**: 11460-11471
- Vavilin DV, Vermaas WF** (2002) Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol Plant* **115**: 9-24
- Vierstra RD, Quail P** (1983) Purification and initial characterization of 124-kilodalton phytochrome from *Avena*. *Biochemistry* **36**: 13389-13395

- von Wettstein D, Gough SP, Kannangara CG** (1995) Chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1039-1057
- Wahleithner JA, Li LM, Lagarias JC** (1991) Expression and assembly of spectrally active recombinant holophytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10387-10391
- Watanabe K, Fujiwara H, Inui K, Suzuki Y** (2002) Oligo-1,6-glucosidase from a thermophile, *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006, was efficiently produced by combinatorial expression of GroEL in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* **35**: 35-43
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E** (1996) Evolution, structure and funktion of the small heat shock proteins in Plants. *J Exp Bot* **47**: 325-338
- Weinstein JD, Beale SI** (1983) Separate physiological roles and subcellular compartments for two tetrapyrrole biosynthetic pathways in *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **258**: 6799-6807
- Weller JL, Terry MJ, Rameau C, Reid JB, Kendrick RE** (1996) The phytochrome-deficient *pcd1* mutant of pea is unable to convert heme to biliverdin IXalpha. *Plant Cell* **8**: 55-67
- Westermann B, Prip-Buus C, Neupert W, Schwarz E** (1995) The role of the GrpE homologue, Mgelp, in mediating protein import and protein folding in mitochondria. *Embo J* **14**: 3452-3460
- Whitelam GC, Devlin PF** (1997) Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant Cell Environ* **20**: 752-758
- Whitelam GC, Johnson E, Peng J, Carol P, Anderson ML, Cowl JS, Harberd NP** (1993) Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light. *Plant Cell* **5**: 757-768
- Wickner S, Gottesman S, Skowyra D, Hoskins J, McKenney K, Maurizi MR** (1994) A molecular chaperone, ClpA, functions like DnaK and DnaJ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12218-12222
- Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U** (1992) Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature* **358**: 169-170
- Wilks A, Ortiz de Montellano PR** (1993) Rat liver heme oxygenase. High level expression of a truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species. *J Biol Chem* **268**: 22357-22362
- Winkler H, Adam G, Mattes E, Schanz M, Hartig A, Ruis H** (1988) Co-ordinate control of synthesis of mitochondrial and non-mitochondrial hemoproteins: a binding site for the HAP1 (CYP1) protein in the UAS region of the yeast catalase T gene (CTT1). *Embo J* **7**: 1799-1804
- Wu B, Wawrzynow A, Zylicz M, Georgopoulos C** (1996) Structure-function analysis of the *Escherichia coli* GrpE heat shock protein. *Embo J* **15**: 4806-4816

- Wu SH, Lagarias JC** (1996) The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* synthesizes a functionally active chromophore precursor of the plant photoreceptor phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8989-8994
- Xu Z, Horwich AL, Sigler PB** (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**: 741-750
- Yeh KC, Lagarias JC** (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13976-13981
- Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias JC** (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**: 1505-1508
- Yoshinaga T, Sassa S, Kappas A** (1982) The occurrence of molecular interactions among NADPH-cytochrome c reductase, heme oxygenase, and biliverdin reductase in heme degradation. *J Biol Chem* **257**: 7786-7793

7. Anhang

7.1 Proteine

<i>Protein</i>	<i>Anzahl der Basenpaare</i>	<i>Anzahl der Aminosäuren</i>	<i>Molekulargewicht (kDa)</i>
<i>Rattus rattus</i> HO-1	801	267	30.58
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 PcyA	747	249	28.24
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 HO	723	241	27.16
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 Cph1	2244	748	84.23
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 Cph1Δ2	1542	514	57.87
<i>E.coli</i> (XL1-blue) GroEL	1647	549	57.44
<i>E.coli</i> (XL1-blue) GroES	294	98	10.50
<i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9	465	155	17.69
<i>Synechocystis</i> PCC 6803 HO-PcyA Fusionsprotein	1482	494	55.78

Tab. 7.1 Proteine (Basenpaare, Aminosäuren und Molekulargewichte)
Die Daten für Tabelle 7.1 wurden mit der Software *Vector NTI* der Firma Infor-Max (Oxford, UK) ermittelt.

7.2 Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Insert</i>	<i>Expressionsvektor</i>
pF10-His	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i>	pQE12
p926.5	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> Δ2	pQE12
p6	<i>Rattus rattus</i> <i>ho-1</i>	pPROLar.A122
p8	<i>Rattus rattus</i> <i>ho-1</i> und <i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i>	pPROLar.A122
p40	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i>	pPROLar.A122
p45	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i>	pPROLar.A122
p58	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i>	pPROLar.A122
p70	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i>	pQE12
p77	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i>	pQE12
p83	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> Δ2	pPROLar.A122
p92	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> und <i>L.peruvianum</i> sHSP 18.9	pPROLar.A122
p98	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho/pcyA</i> Fusionsprotein	pQE12
p132	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> und <i>groE S/L</i>	pPROLar.A122
p171	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i> (+ Ribosomen-Bindestelle)	pQE12

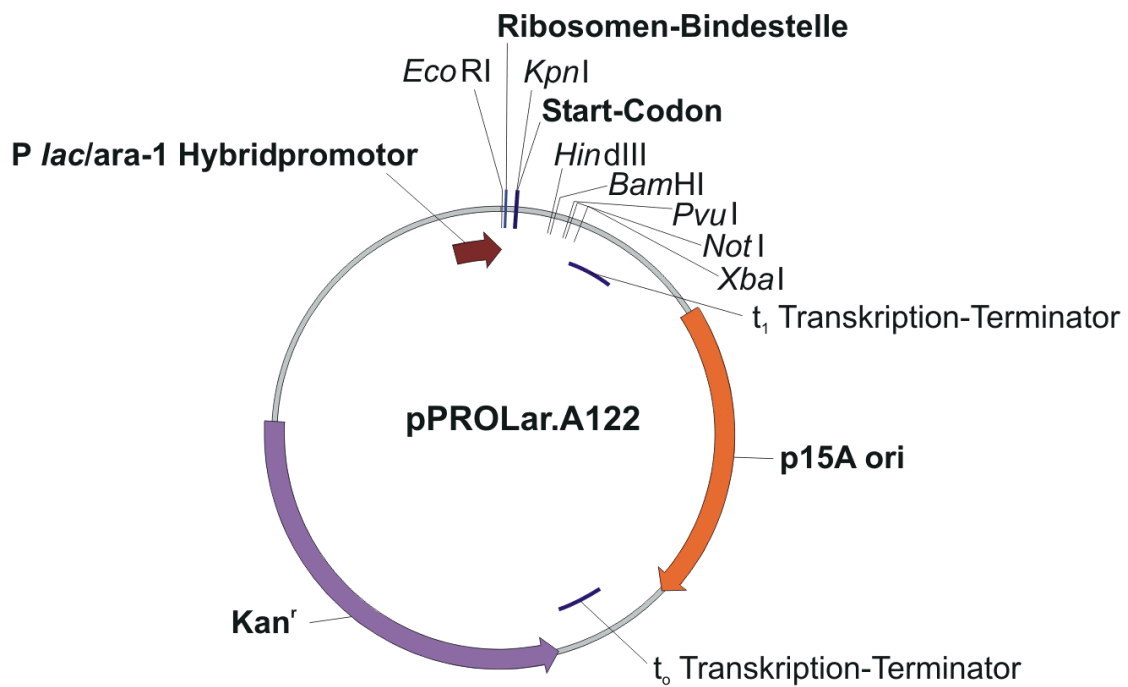
Tab. 7.2 Übersicht über die wichtigsten Plasmide

7.3 Geräte und Gebrauchsmaterialien

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>	
Alkaline Phosphatase	New England BioLabs	Frankfurt am Main, BRD
Biofuge Stratos	Kendro	Hanau, BRD
Eppendorf Centrifuge 5417 C	Eppendorf	Hansestadt Hamburg, BRD
French Pressure Cell (SLM-Aminco)	Thermo Spectronic	Rochester, NY, USA
Gene Quant II RNA / DNA Calc.	Pharmacia Biotech	Freiburg, BRD
Hybond™-P (PVDF-Membran)	Amersham Pharmacia	Freiburg, BRD
Ionenseparator GENO-sep	Grünbeck	Höchstädt a.d. Donau, BRD
Küvetten PS 1.5 ml Plastibrand	MAGV	Rabenau-Londorf, BRD
MinElute Gel Extraction Kit (50)	Qiagen	Hilden, BRD
MinElute PCR Purification Kit (50)	Qiagen	Hilden, BRD
Mini-Protean 3 Electrophoresis System	BioRad	München, BRD
Nikon CoolPix 995	Nikon	Düsseldorf, BRD
Ni-NTA Spin Kit (50)	Qiagen	Hilden, BRD
Oligonukleotide (<i>Primer</i> : FL01-FL34)	BioTez	Berlin, BRD
Oligonukleotide (<i>Primer</i> : FL35-FL60)	Sigma-Ark	Darmstadt, BRD
Oligonukleotide (<i>Primer</i> : FL61-FL75)	Qiagen Operon	Köln, BRD
Pfu DNA Polymerase	Stratagene Europe	Amsterdam, Niederlande
Phycocyanobilin	Norbert Michael	Freie Universität Berlin, BRD
PowerPac 200	BioRad	München, BRD
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen	Hilden, BRD
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs	Frankfurt am Main, BRD
T4 DNA Ligase (400.000 units/ml)	New England BioLabs	Frankfurt am Main, BRD
TaKaRa Ex Taq	BioWhittaker Europe	Verviers, Belgien
Taq Polymerase	Qiagen	Hilden, BRD
Taq Polymerase (<i>self-made</i>)	Sabine Buchert	Freie Universität Berlin, BRD
Thermocycler T3	Biometra	Göttingen, BRD
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hansestadt Hamburg, BRD
Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell	BioRad	München, BRD
UV-Handlampe VL-6M (312 nm, 1x6 W)	BioTech Trade & Service	St. Leon-Rot, BRD
UVmini 1240	Shimadzu	Duisburg, BRD
UV-Visible Spectrophotometer 8453	Agilent Technologies	Karlsruhe, BRD

Tab. 7.3 Verzeichnis der wichtigsten Geräte und Gebrauchsmaterialien

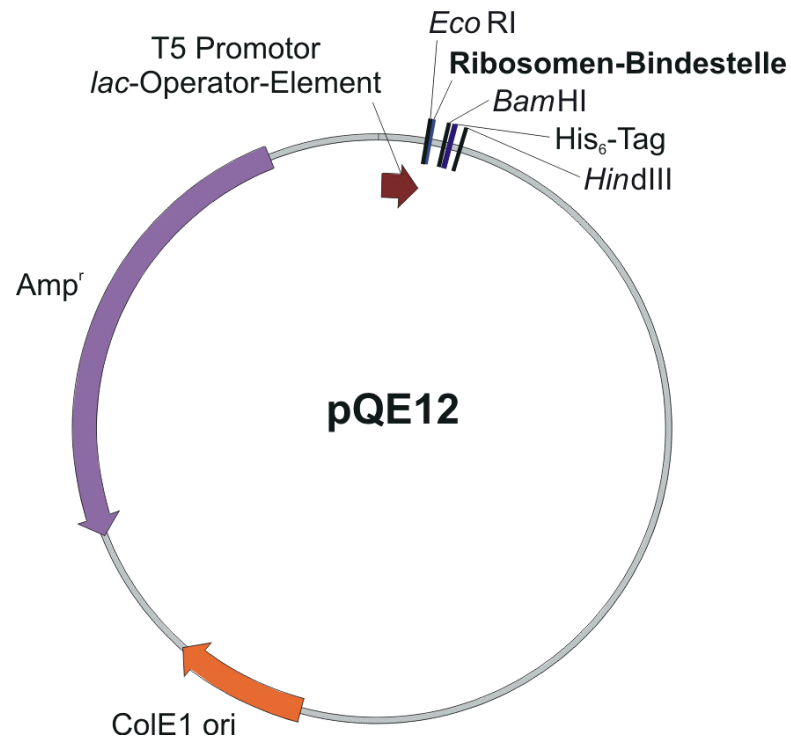
7.4 Plasmidkarten

Plasmidkarte***pPROLar.A122***

Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	2631 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	MCS		
Zweck:	Klonierung (Proteinexpression in <i>E.coli</i>)		
Bemerkungen:			
Erhalten durch / Erstellt von:	Clontech	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

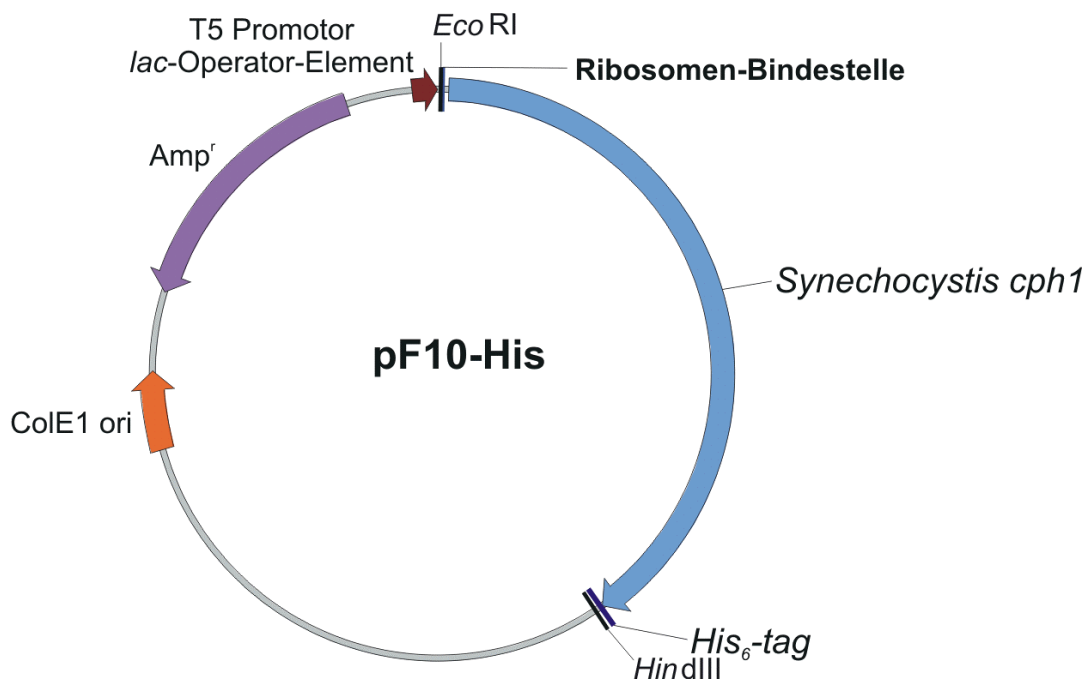
pQE12



Expressionsvektor:	pQE12 (Qiagen)	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	3427 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	MCS		
Zweck:	Klonierung (Proteinexpression in <i>E. coli</i>)		
Bemerkungen:			
Erhalten durch / Erstellt von:	Jon Hughes	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

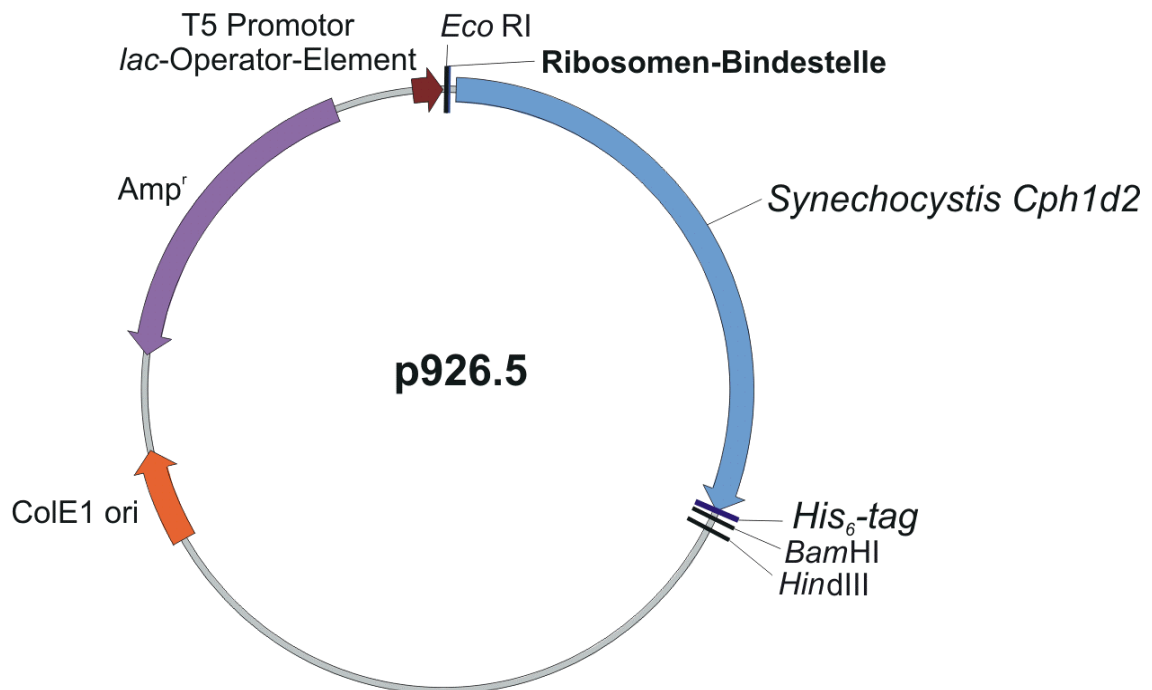
pF10-His



Expressionsvektor:	pQE12 (Qiagen)	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	5659 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> + C-terminalen His ₆ -Tag		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1		
Bemerkungen:	kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Jon Hughes	Datum:	2000
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	Ja

Plasmidkarte

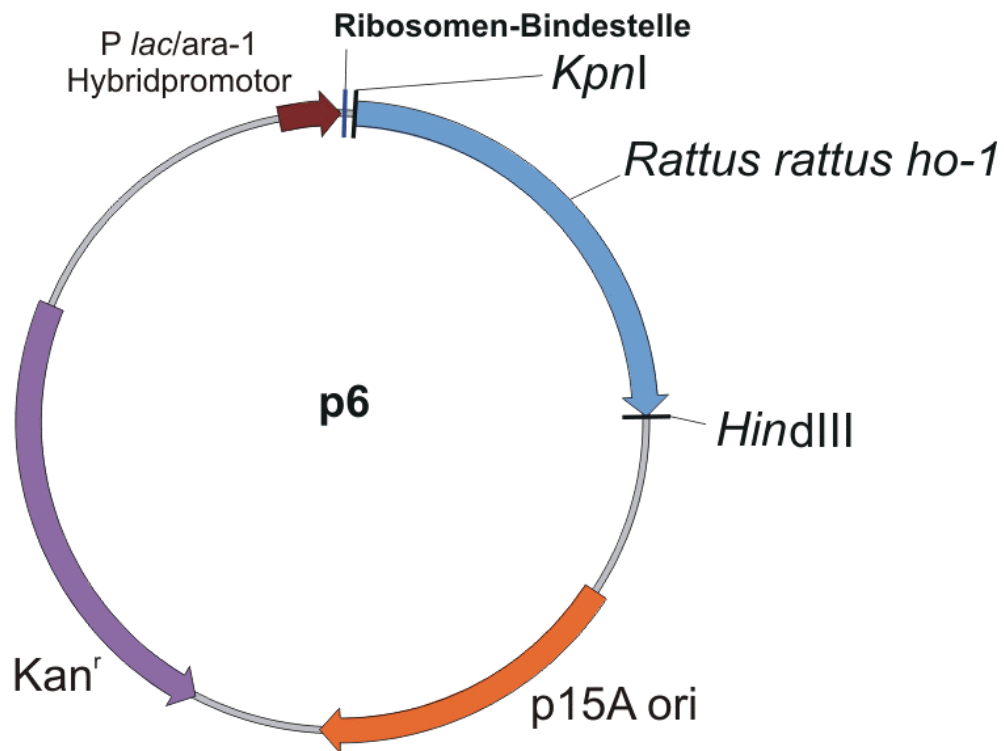
p926.5



Expressionsvektor:	pQE12 (Qiagen)	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	4984 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1Δ2</i> + C-terminalen His ₆ -Tag		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1Δ2		
Bemerkungen:	kloniert via <i>EcoRI/BamHI</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Jon Hughes	Datum:	2000
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	Ja

Plasmidkarte

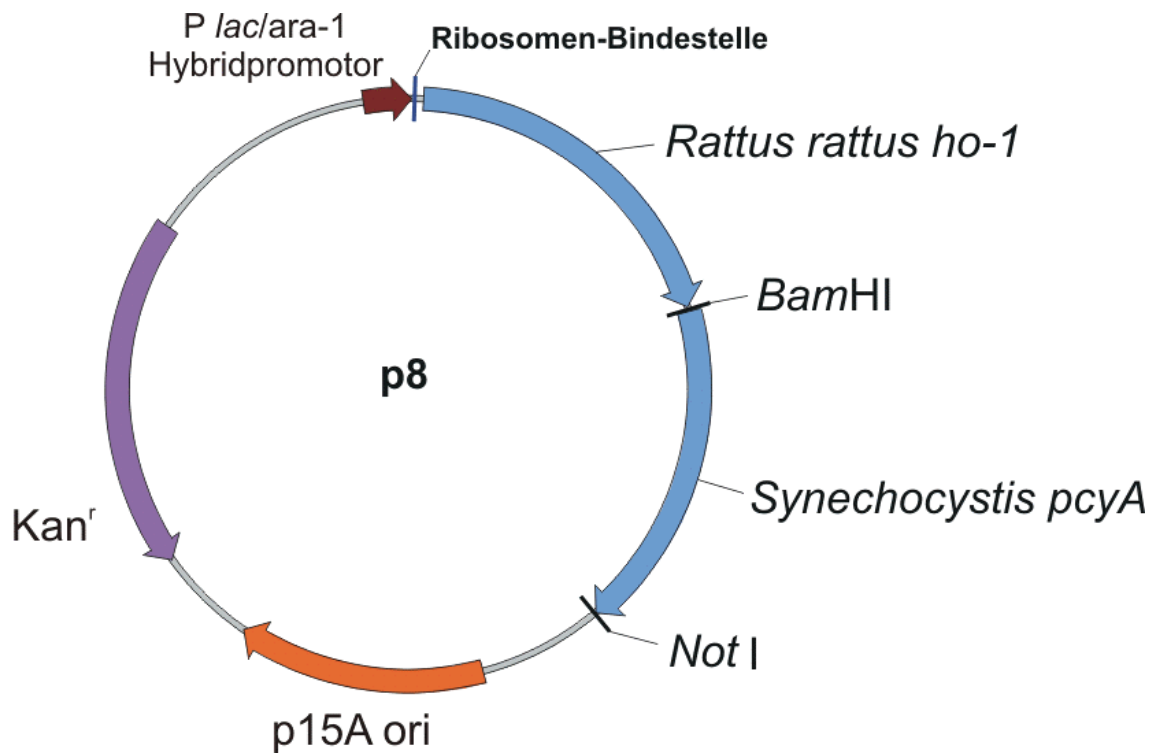
p6



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	3365 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Rattus rattus ho-1</i>		
Zweck:	Proteinexpression von HO-1		
Bemerkungen:	kloniert via <i>KpnI/HindIII</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

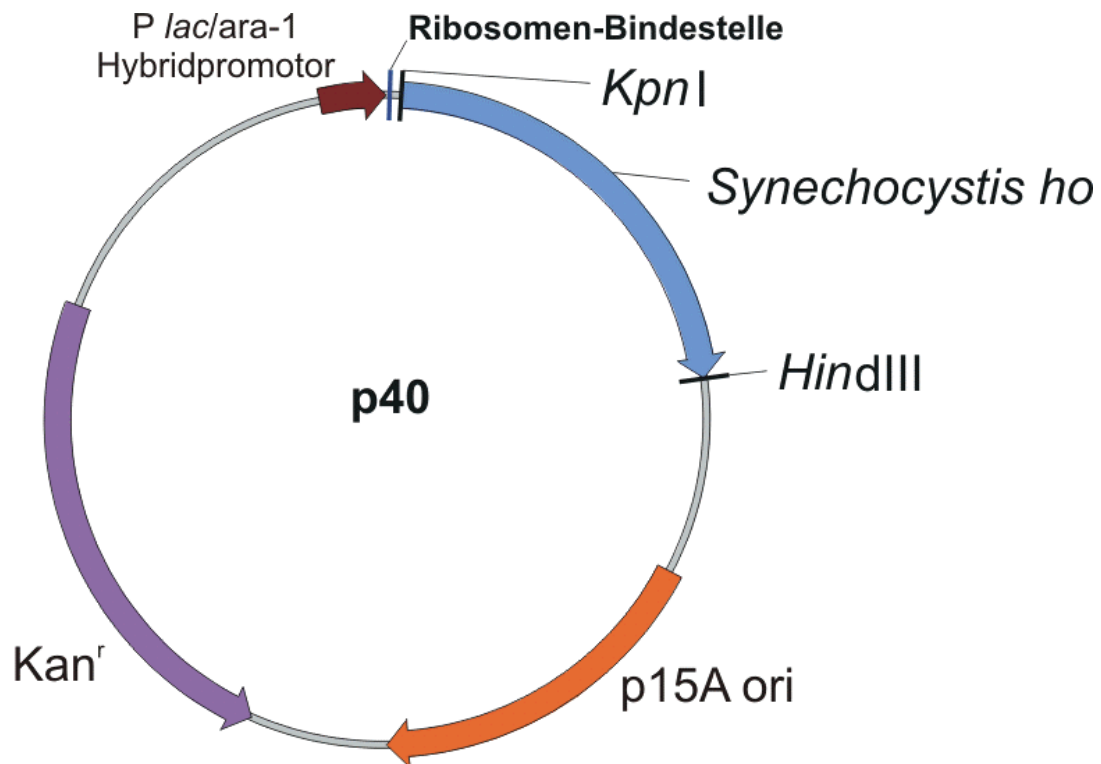
p8



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	4087 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Rattus rattus ho-1</i> und <i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>pcyA</i>		
Zweck:	Proteinexpression von HO-1 und PcyA		
Bemerkungen:	<i>ho-1</i> kloniert via <i>KpnI/HindIII</i> ; <i>pcyA</i> via <i>BamHI/NotI</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

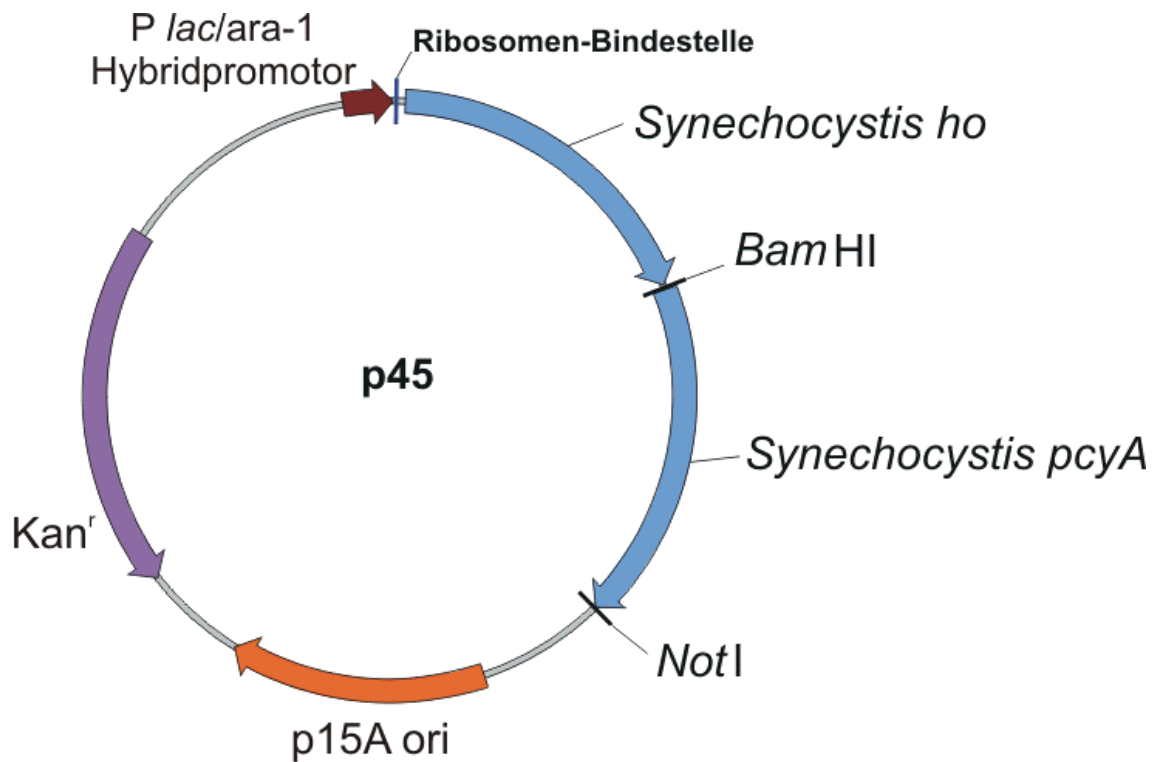
p40



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	3288 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i>		
Zweck:	Proteinexpression von HO		
Bemerkungen:	<i>ho</i> kloniert via <i>KpnI/HindIII</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

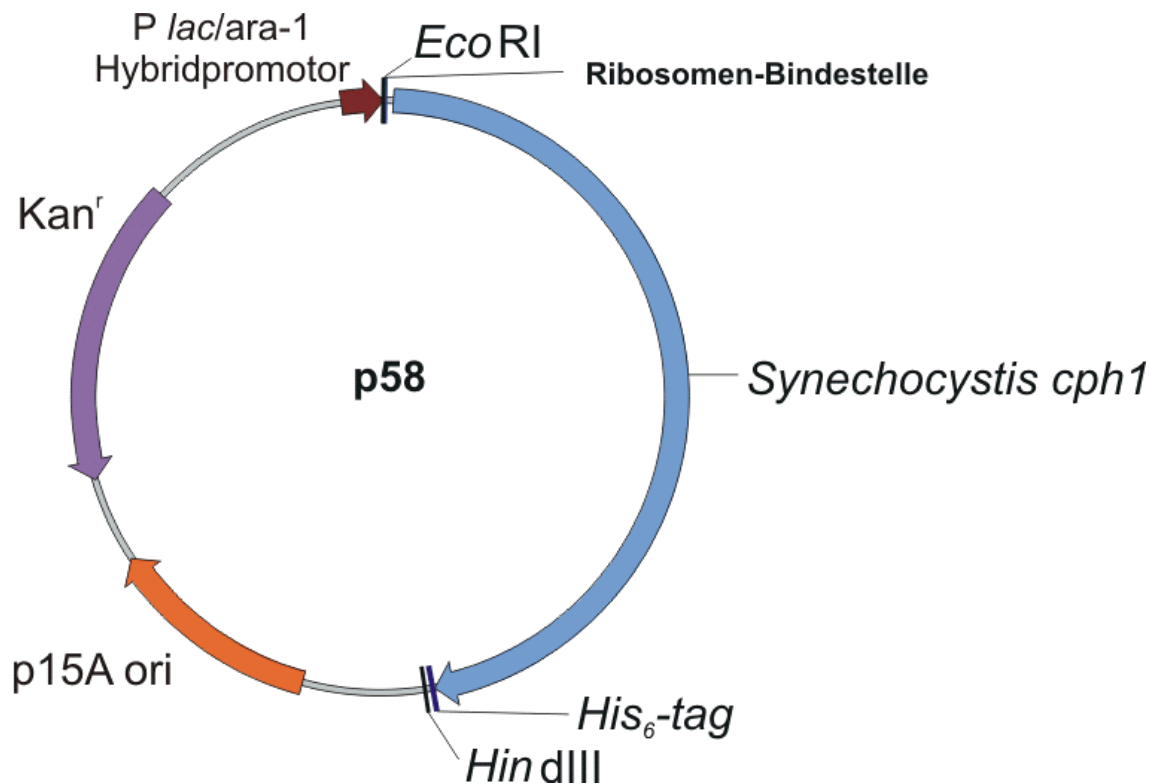
p45



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	4010 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i>		
Zweck:	Proteinexpression von HO und PcyA		
Bemerkungen:	<i>ho</i> kloniert via <i>KpnI/HindIII</i> ; <i>pcyA</i> via <i>BamHI/NotI</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

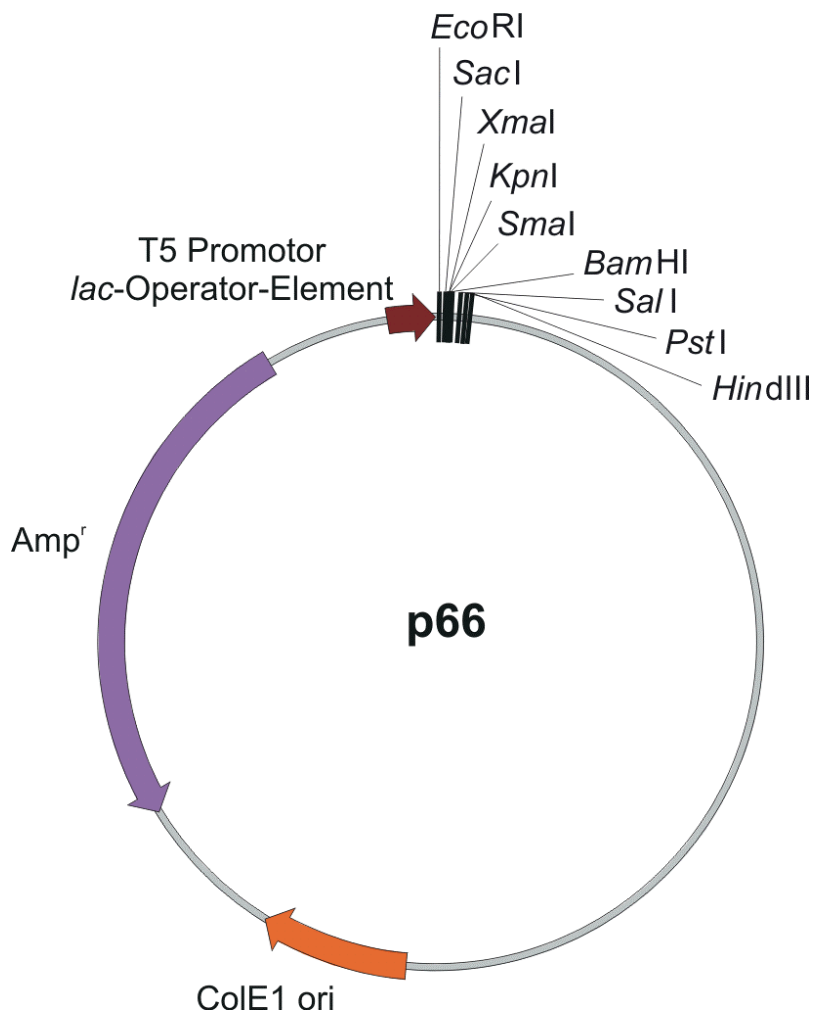
p58



Expressionsvektor:	pPROLar.A122	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	4833 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> + C-terminalen His ₆ -Tag		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1		
Bemerkungen:	kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i> aus pF10-His		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

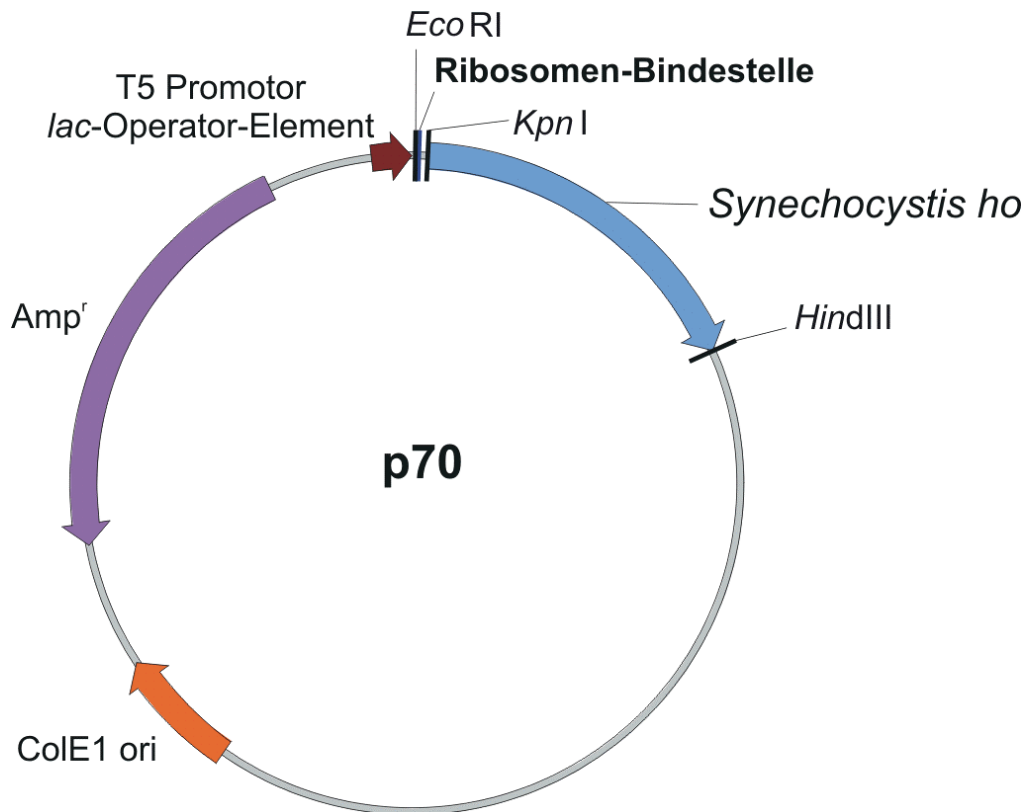
p66



Expressionsvektor:	pQE12 (Qiagen)	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	3414 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	MCS aus pUC18		
Zweck:	Klonierung (Proteinexpression in <i>E.coli</i>)		
Bemerkungen:	kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

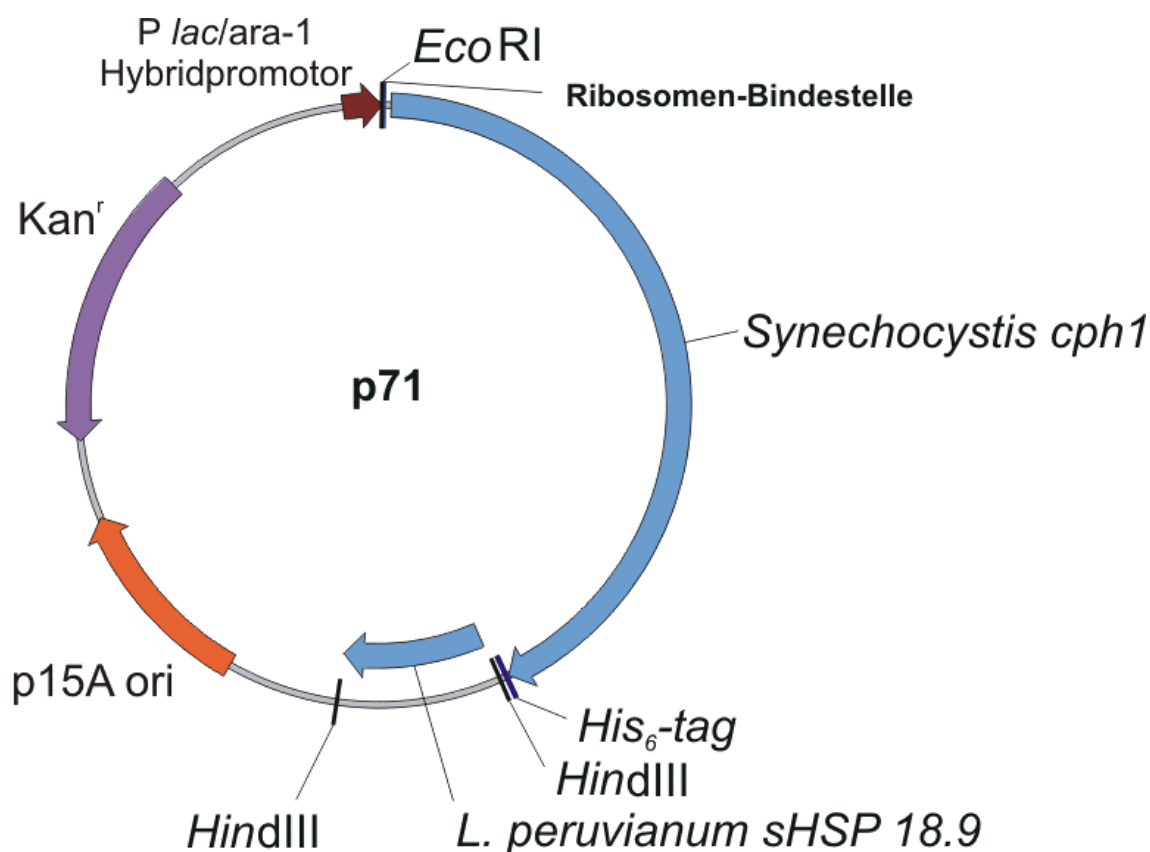
p70



Expressionsvektor:	pQE12 (Qiagen)	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	4114 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i>		
Zweck:	Proteinexpression von HO		
Bemerkungen:	kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

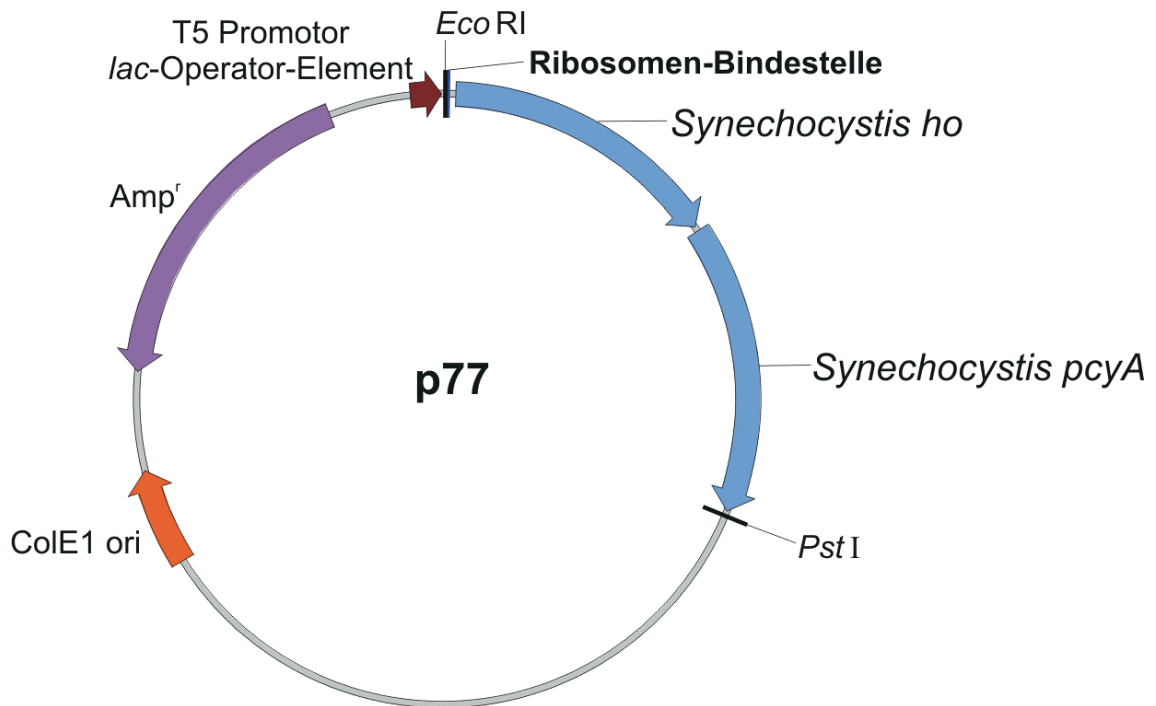
p71



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	5304 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> + C-terminalen His ₆ -Tag und <i>Lycopersicon peruvianum</i> sHSP 18.9		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1 und sHSP 18.9		
Bemerkungen:	<i>cph1</i> kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i> ; sHSP via <i>HindIII</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2002
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

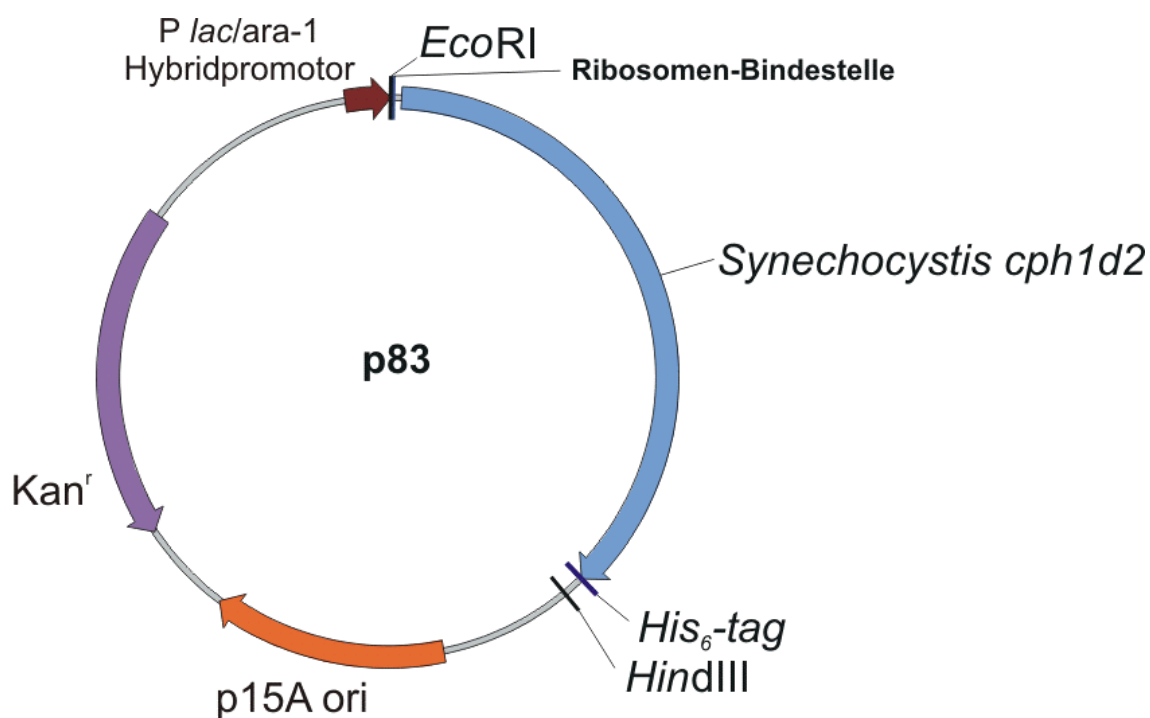
p77



Expressionsvektor:	p66 (aus pQE12 (Qiagen))	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	4893 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i>		
Zweck:	Proteinexpression von HO und PcyA		
Bemerkungen:	kloniert via <i>EcoRI/PstI</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2001
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	Ja

Plasmidkarte

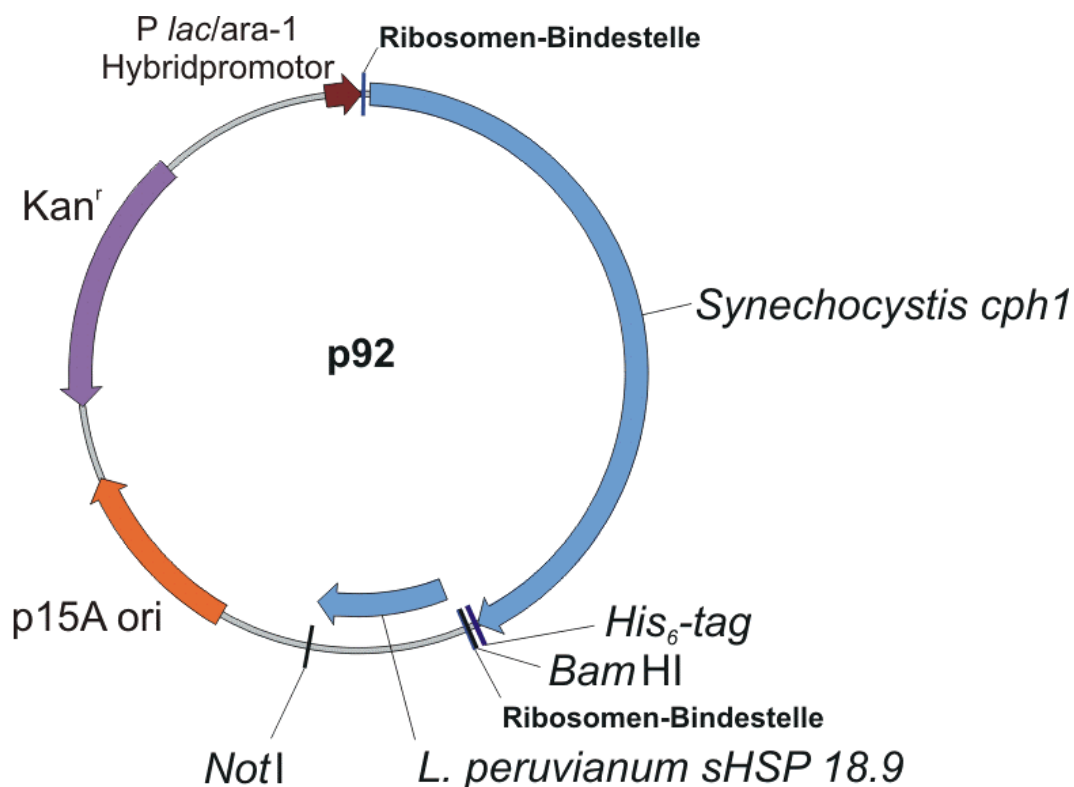
p83



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	4158 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1Δ2</i> + C-terminalen <i>His</i> ₆ -Tag		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1Δ2		
Bemerkungen:	<i>cph1Δ2</i> kloniert via <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III aus p926.5		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2002
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

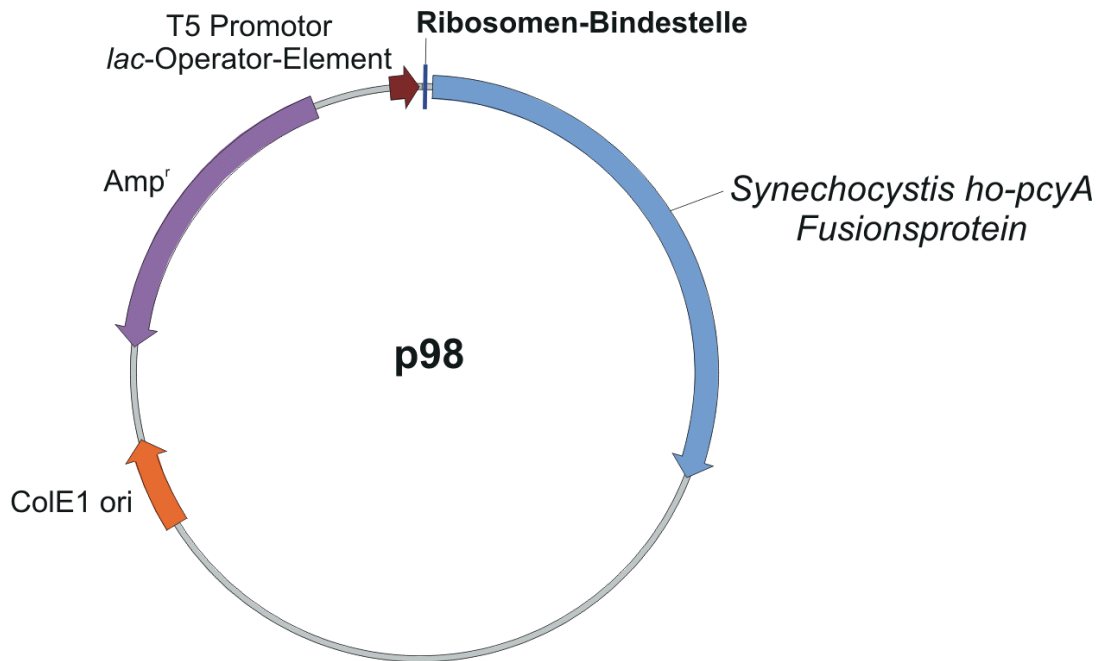
p92



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	5295 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> + C-terminalen His ₆ -Tag und <i>Lycopersicon peruvianum</i> sHSP 18.9 (+ Ribosomen-Bindestelle)		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1 und sHSP 18.9		
Bemerkungen:	<i>cph1</i> kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i> ; sHSP via <i>BamHI/NotI</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2002
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

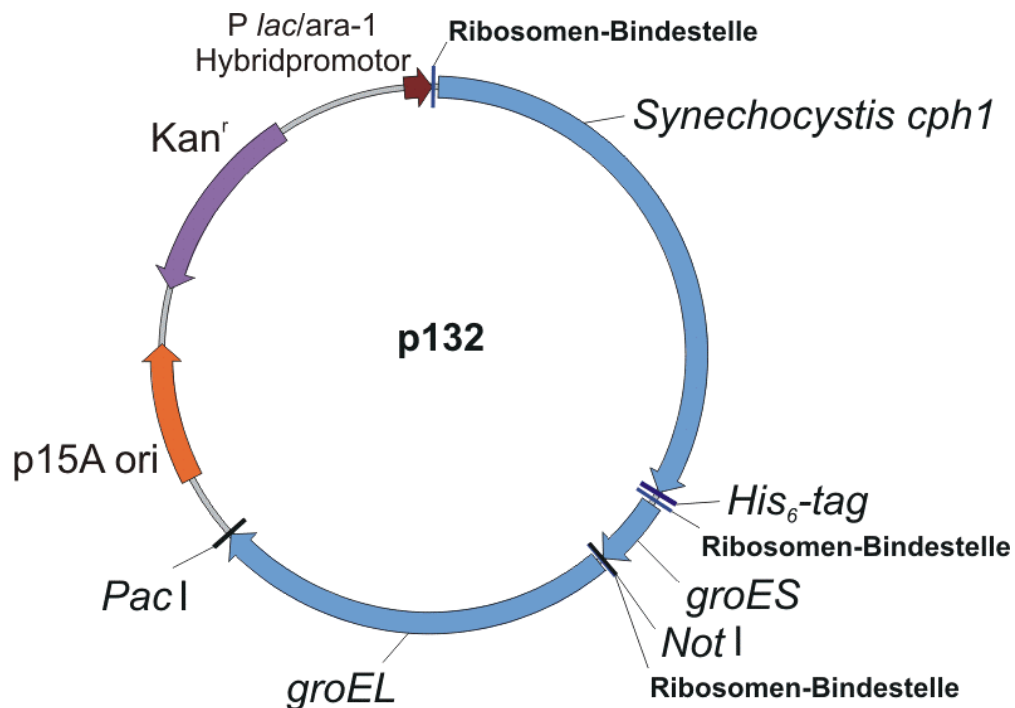
p98



Expressionsvektor:	p66 (aus pQE12 (Qiagen))	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	4893 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i> Fusionsprotein		
Zweck:	Proteinexpression von HO-PcyA Fusionsprotein		
Bemerkungen:	kloniert via zielgerichtete Mutagenese aus p77		
Erhalten durch / Erstellt von:	Link/Landgraf	Datum:	2002
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	Ja

Plasmidkarte

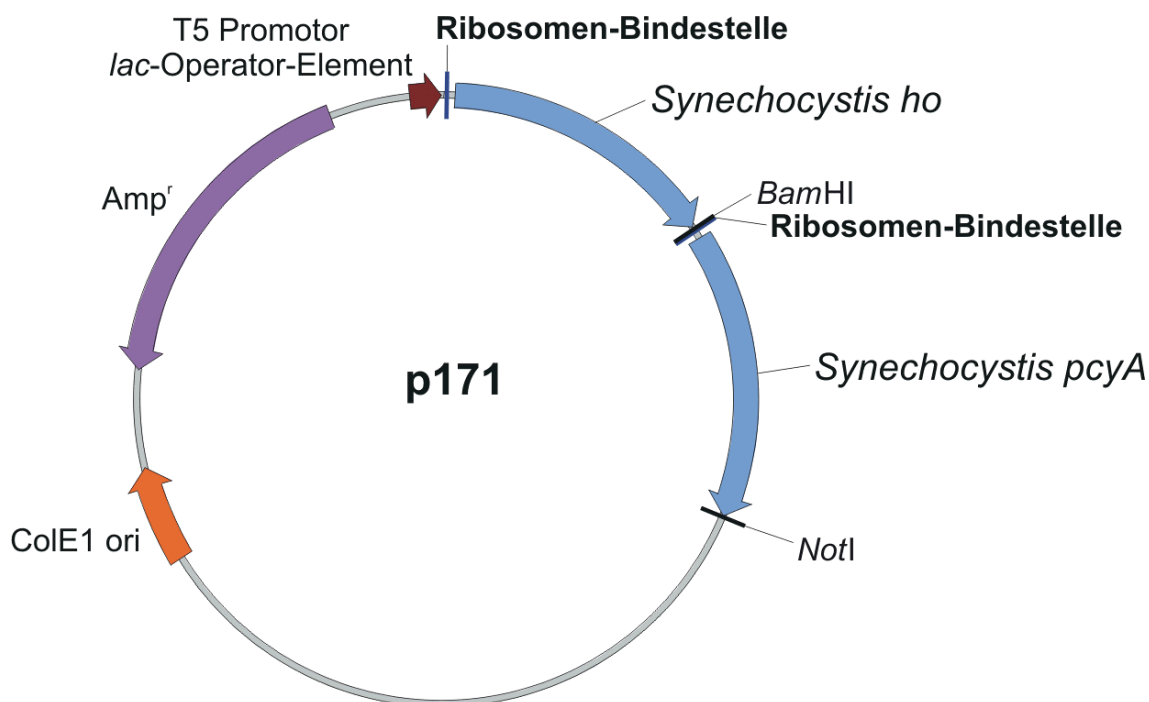
p132



Expressionsvektor:	pPROLar.A122 (Clontech)	Ori:	p15A
Plasmidgröße:	6787 bp	Resistenz:	Kanamycin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>cph1</i> + C-terminalen His ₆ -Tag und <i>groE S/L</i> aus <i>E.coli</i> (XL1-blue)		
Zweck:	Proteinexpression von Cph1 und GroE S/L		
Bemerkungen:	<i>cph1</i> kloniert via <i>EcoRI/HindIII</i> ; <i>groES</i> via <i>KpnI/NotI</i> ; <i>groEL</i> via <i>NotI/PacI</i>		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2002
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	nein

Plasmidkarte

p171



Expressionsvektor:	p66 (aus pQE12 (Qiagen))	Ori:	ColE1
Plasmidgröße:	4915 bp	Resistenz:	Ampicillin
Insert:	<i>Synechocystis</i> PCC 6803 <i>ho</i> und <i>pcyA</i> (+ Ribosomen-Bindestelle)		
Zweck:	Proteinexpression von HO und PcyA		
Bemerkungen:	<i>pcyA</i> kloniert via <i>Bam</i> HI/ <i>Not</i> I in p77		
Erhalten durch / Erstellt von:	Frank Landgraf	Datum:	2002
NCBI Accession-Number:		Sequenzierung:	Ja

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Tanja Gans, Melanie Bingel, Sabrina Beck, Jutta Bender und Silvia Schwan für deren unermüdliche Unterstützung im Labor und für die äußerst nette Zusammenarbeit.

Mein spezieller Dank geht auch an alle Kollegen im Labor, besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Katrin Link, Petra Wünnenberg, Hanno Mahler, Kai P. Willführ, Claudia Hanakam, Lina Paulenz, Torsten Knauer und *last but not least* Michael „Micky“ Metzmaier.

Herrn Prof. Dr. Gottfried Wagner, Herrn Prof. Dr. Edwin Pahlich und deren Arbeitsgruppen möchte ich für die freundliche Aufnahme in die Pflanzenphysiologie Gießen und für angenehme Diskussionen danken.

Frau Prof. Dr. Gabriele Klug möchte ich für Ihre stete Unterstützung und für die unzählbaren Nutzungen der *French-Press* ganz besonders danken. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn Andreas Jäger meinen herzlichen Dank aussprechen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Betreuern, Herrn HD Dr. Christoph Forreiter und Herrn Prof. Dr. Jon Hughes, bedanken, ohne deren stetige Unterstützung und konstruktive Diskussionen diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.