

**LuK-tutkielma**

**Fytokromi-spesifisen domeenin lisäkkeen vaikutus  
bakteerifytokromin valoaktivointiin - tuotto,  
puhdistus ja UV-Vis-spektroskopinen analyysi**

**Katariina Rauhanen & Maiju Saari**



**Jyväskylän yliopisto**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Biologia

02.12.2021

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta  
Bio- ja ympäristötieteiden laitos  
Biologia

Rauhanen Katariina ja Saari Maiju: Fytokromi-spesifisen domeenin lisäkkeen vaikutus bakteerifytokromin valoaktivointiin – tuotto, puhdistus ja UV-Vis-spektroskopinen analyysi  
Kandidaatin tutkielma: 29 s., 1 liite (1 s.)  
Tutkielman ohjaajat: Professori Janne Ihalainen ja FM Moona Kurttila  
Marraskuu 2021

---

Hakusanat: *Deinococcus radiodurans*, kromofori, UV-Vis-spektroskopia, valoreseptori

Fytokromit ovat punaista ja kaukopunaista valoa absorboivia valoreseptoreita, joita esiintyy kasveissa, bakteereissa ja sienissä. Fytokromiin sitoutunut molekyyli, kromofori, absorboi fotonin ja saa aikaan muutoksia fytokromin kolmiulotteisessa rakenteessa: punaista valoa absorboiva Pr-tila virittyy Pfr-tilaksi, joka palaa takaisin Pr-tilaan absorboimalla kaukopunaista valoa tai ilman valotusta pimeäpalautumalla. Fytokromin valovaihtuvuudessa tärkeän rakenteen on havaittu olevan fytokromi-spesifisessä domeenissa (PHY-domeenissa) sijaitseva PHY-lisäke. Tässä tutkielmassa pyrkimyksenä oli tuottaa ja puhdistaa *Deinococcus radiodurans* -bakteerifytokromia ilman PHY-lisäkettä ja verrata mutantin UV-Vis-spektriä villityypin spektriin. Lisäksi selvitettiin, saadaanko mutantti valotettua Pfr-tilaan. Mutanttia saatiin tuotettua ja puhdistettua pieni määrä, 0,51 mg. Mutantin valotus Pfr-tilaan onnistui. Mutantin ja villityypin UV-Vis-spektrit erosivat toisistaan, sillä mutantti absorboi villityyppiä vähemmän punaista ja kaukopunaista valoa. Pimeäpalautumisessa, jossa tarkasteltiin mutantin palautumista Pfr-tilasta takaisin Pr-tilaan ilman valotusta, havaittiin mutantin palautuvan huomattavasti nopeammin kuin villityypin. Tutkielman keskeinen päätelmä on, että PHY-lisäke voidaan poistaa fytokromista säilyttäen sen valovaihtuvuus. Mutantin UV-Vis-spektrin ja pimeäpalautumisen perusteella voidaan päätellä, että PHY-lisäke stabiloi Pfr-tilaa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science  
Department of Biological and Environmental Science  
Biology

Rauhanen Katariina and Saari Maiju: The effects of the hairpin structure in the phytochrome specific domain to the photoactivation of bacteriophytochrome – expression, purification and UV-Vis spectroscopic analysis

Bachelor of Science Thesis: 29 p., 1 supplement (1 p.)

Supervisors: Professor Janne Ihalainen, MSc. Moona Kurttila

November 2021

---

Keywords: Chromophore, *Deinococcus radiodurans*, photoreceptor, UV-Vis spectroscopy

Phytochromes are photoreceptors, that absorb red and far-red light and are found in plants, bacteria and fungi. Chromophore, a molecule bound to phytochrome, absorbs a photon and causes changes in the three-dimensional structure of the phytochrome: the red light absorbing Pr state can be excited to the far-red light absorbing Pfr state. The phytochrome returns to the Pr state by the absorption of far-red light or thermally in dark. An important structure in photoactivation has been located to the phytochrome specific domain (PHY-domain) and the hairpin structure in the phytochrome specific domain. The aim of this thesis was to express and purify bacteriophytochrome of *Deinococcus radiodurans* without the hairpin structure and to compare the UV-Vis spectra of the mutant with the wild type. In addition, the aim was to find out if the mutant can be excited to the Pfr state. The expression of the mutant was successful and a small amount of phytochrome was purified, 0.51 mg. The mutant could be excited to the Pfr state. The UV-Vis spectra of the mutant and wild type phytochrome were different from one another: the mutant absorbed less red and far-red light than the wild type. In dark reversion experiment, where the kinetics of returning to Pr state from Pfr state was studied, it was observed that the mutant reversed faster than the wild type. The main conclusion is that the hairpin structure in the phytochrome specific domain can be removed while maintaining the ability of the phytochrome to be activated by light. Based on the UV-Vis spectra and the dark reversion, it is apparent that the Pfr state is stabilised by the hairpin structure of the phytochrome specific domain.

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT .....</b>	<b>7</b>
2.1 Proteiinin tuotto.....	7
2.2 Bakteerien lyysaus.....	8
2.3 Kromatografia.....	8
2.4 UV-Vis-spektroskopia .....	10
2.5 Tulosten käsittely .....	11
<b>3 TULOKSET .....</b>	<b>12</b>
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>19</b>
4.1 Mutantin vähäinen saanto .....	19
4.2 Puhdistus .....	20
4.3 Spektrien erot.....	22
4.3.1 Mutantti on valovaihtuva.....	22
4.3.2 PHY-lisäke on keskeinen signaalinvälityksessä.....	22
4.3.3 PHY-lisäke stabiloi Pfr-tilaa .....	23
<b>Kiitokset.....</b>	<b>25</b>
<b>KIRJALLISUUS.....</b>	<b>26</b>
<b>LIITE 1. Mutantin (PAS-GAF-PHY armless CYS) sekvenssi .....</b>	<b>30</b>

## SANASTO JA LYHENTEET

### SANASTO

<b>Domeeni</b>	proteiiniketju, joka on itsenäisesti stabiili tai kykenee läpikäymään muutoksia itsenäisesti
<b>PHY-lisäke</b>	osa fytokromi-spesifistä (PHY) -domeenia
<b>Pfr-tila</b>	kaukopunaista valoa absorboiva tila
<b>Pr-tila</b>	punaista valoa absorboiva tila
<b>signaalinvälitys</b>	absorption aiheuttamat muutokset, jotka johtavat fytokromin entsyymaattisen yksikön aktivoitumiseen
<b>valoaktivaatio</b>	fytokromin valottaminen punaisella tai kaukopunaisella valolla valovaihtuvuuden aikaansaamiseksi
<b>valovaihtuvuus</b>	fytokromin kyky siirtyä Pr-tilan ja Pfr-tilan välillä

### LYHENTEET

<b>GAF</b>	cGMP fosfodiesteriäsi / adenyylisyklaasi / FhlA
<b>LB</b>	Luria Bertani -kasvatusliuos
<b>PAS</b>	Per / Arndt / Sim
<b>PHY</b>	fytokromi-spesifinen
<b>SDS-PAGE</b>	natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidi-geelielektroforeesi
<b>TCEP</b>	tris-(2-karboksietyyli)fosfiini
<b>UV-Vis</b>	ultravioletti-näkyvä valo

# 1 JOHDANTO

Valoreseptorit ovat proteiineja, jotka absorboivat sähkömagneettista säteilyä eri aallonpituuksilla (Van Der Horst & Hellinwerf 2004, Fraikin ym. 2015). Absorption kautta eliöt saavat tietoa ympäristöstä, minkä avulla ne voivat kontrolloida esimerkiksi kasvua ja käyttäytymistä ja sopeutua vallitseviin valo-olosuhteisiin (Heintzen 2012). Valoreseptoreja ovat esimerkiksi eläimien näköpigmentit (Fuortes 1971) ja fotosynteettisillä eliöillä valoreseptorit kontrolloivat fotosynteesiä (Bauer ym. 2003). Valoreseptoreille tyypillistä on valovaihtuvuus, joka tarkoittaa proteiinin kolmiulotteisen rakenteen muuttumista sen absorboidessa valoa (Fraikin ym. 2015). Tämä tutkielma käsittelee valoreseptoreista fytokromia.

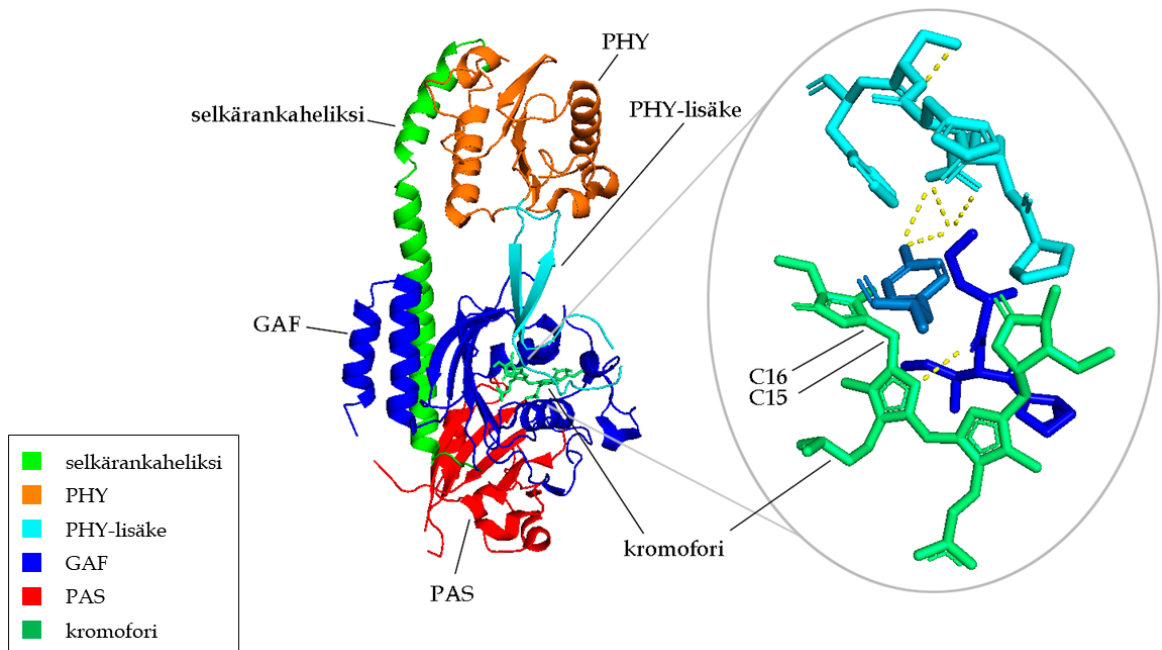
Fytokromit ovat homodimeerisiä punaista ja kaukopunaista valoa absorboivia valoreseptoreja kasveissa, bakteereissa ja sienissä (Fankhauser 2001, Rockwell ym. 2006, Takala ym. 2020). Fytokromi löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1959 (Butler ym. 1959). Aiemmin oli havaittu, että jaksottaisella punaisen valon aallonpituuksille altistumisella on vaikutusta kasvien siementen itämiseen (Borthwick ym. 1952). Fytokromit osallistuvat esimerkiksi fotosynteesiin säätelemällä fotosynteettisten proteiinien ilmentymistä (Kreslavski ym. 2018).

Fytokromeilla on lähi-infrapunasäteilyn alueella fluoresenssia (Anders & Essen 2015). Mutaatioilla on saatu parannettua fluoresenssiominaisuuksia ja fytokromien valovaihtuvuus vähentymään (Auldrige ym. 2012). Tällöin on mahdollista käyttää fytokromia biomarkkerina esimerkiksi optogenetiikassa eli biologian sovellusalalla, jossa valoreseptoreita hyödynnetään muokkaamaan solun toimintoja valolla (Losi ym. 2010). Fytokromeilla on sovelluskäyttöä valovaihtuvien entsyymien suunnittelussa sekä valoriippuvaisessa geeniekspressiossa (Fraikin 2015). Kaikille sovelluksille oleellista on, että fytokromien toiminta atomitasolla tunnetaan (Takala ym. 2020).

Fytokromeihin, kuten muihinkin valoreseptoreihin, on kiinnittynyt molekyyli, kromofori, joka absorboi valon (Heintzen 2012), mikä muuttaa valoreseptorin domeenien rakennetta (Fraikin ym. 2015). Domeeni on itsenäisesti stabiili peptidiketju tai peptidiketju, joka pystyy käymään läpi muutoksia proteiinissa itsenäisesti (Nelson & Cox 2017 s. 137). Rakennemuutokset aiheuttavat lopulta biologisen vasteen solussa (Fraikin ym. 2015).

Fytokromi koostuu PAS- ja GAF-domeeneista, fytokromi-spesifisestä domeenista (PHY-domeeni), entsyymattisesta yksiköstä sekä kromoforista (Kuva 1) (Takala ym. 2020). PAS- ja GAF-domeeneja sekä PHY-domeenia yhdessä kutsutaan valosensorimoduuliksi, joka vastaa signaalin välitykseen vaadittavista rakennemuutoksista, jotka aktivoivat entsyymattista yksikköä (Takala ym. 2020).

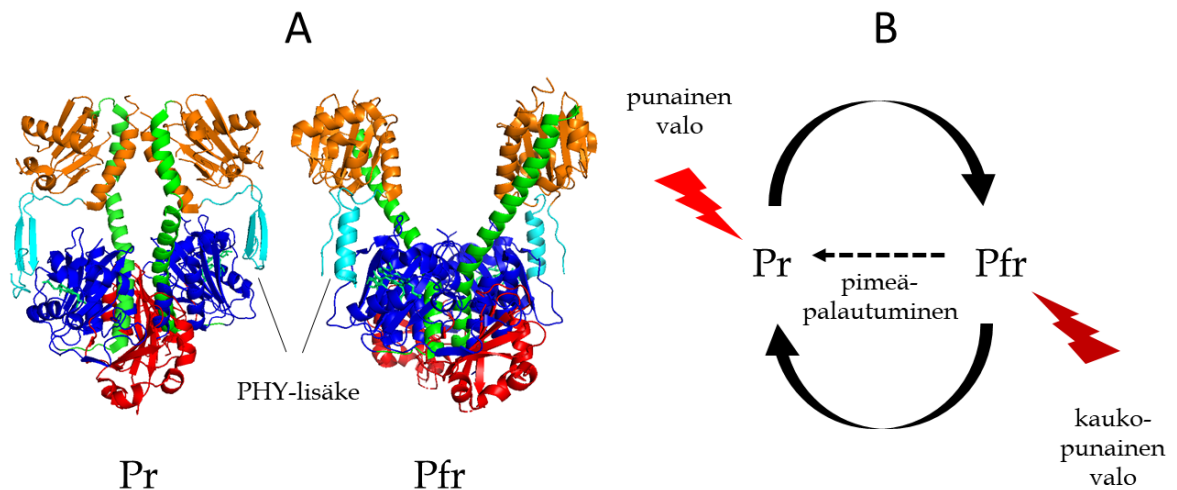
Aktivoitumisessa tärkeäksi on havaittu PHY-domeenin osana toimiva spesifinen rakenne, niin kutsuttu PHY-lisäke (Takala ym. 2014a). Kuvassa (Kuva 1) on esitelty valosensorimoduulin domeenien rakenne ja niiden kytkeytyminen toisiinsa bakteerifytokromilla. Kuvaan (Kuva 1) on merkitty kromoforin vuorovaikutukset GAF-domeeniin sekä spesifiin PHY-lisäkkeen rakenteeseen. Kemialliselta rakenteeltaan kromofori on biliini tetrapyrroli (Bhoo ym. 2001, Fraikin ym. 2015).



Kuva 1. Fytokromin monomeeri Pr-tilassa sekä GAF-domeenin ja PHY-lisäkkeen vuorovaikutukset kromoforiin. GAF-, PAS- ja PHY-domeenit, PHY-lisäke, selkärankaheliksi sekä kromofori merkitty. Entsymaattinen yksikkö ei ole kuvassa. (PDB id: 4O01 (Takala ym. 2014a))

Fytokromin rakenne vaihtelee punaista valoa absorboivan (Pr) rakenteen ja kauko-punaista valoa absorboivan (Pfr) rakenteen välillä (Kuva 2). Pfr-tilaan siirtymisen jälkeen fytokromi pystyy muokkaamaan eliön toimintaa toimimalla kinaasina. Bakteerifytokromeilla entsymaattinen yksikkö on usein histidiinikinaasi (Möglich 2019, Shin ym. 2016). Histidiinikinaasit fosforyloivat kohdeproteiineja histidiinin kohdalla (Stock ym. 2000).





Kuva 2. (A) Fytokromin valovaihtuvuuden rakennemuutokset punaista valoa absorboivasta Pr-tilasta kaukopunaista valoa absorboivaan Pfr-tilaan. Pr-tilassa valovaihtuvuudessa tärkeäksi havaittu PHY-lisäke on betakonformaatiossa ja selkärankaheliksi on taipunut. Pfr-tilassa PHY-lisäke on alfaheliksinä ja selkärankaheliksit erkanevat (PDB id: 4O0P (Pr) ja 4O01 (Pfr) (Takala ym. 2014a)). (B) Fytokromin valovaihtuvuus kaavakuvana. Pr-tilaan palautuminen voi tapahtua myös pimeäpalautumisen kautta ilman valotusta.

Rakennemuutoksessa Pr-tilasta Pfr-tilaan tapahtuu kromoforin D-renkaan C15-C16 -kaksoissidoksen E-Z -isomerisaatio (Kuva 1) (Rüdiger ym. 1983). Isomerisaatio aiheuttaa muutoksia kromoforin ja ympäröivien aminohappojen vuorovaikutuksissa, minkä on havaittu vaikuttavan PHY-lisäkkeen konformaatioon (Takala ym. 2014a). PHY-lisäke lyhenee 2,5 Ångströmin verran ja laskostuu alfakierteeksi. Lisäkkeen uudelleen laskostumisella on yhteys monomeerien erkaantumiseen toisistaan useiden nanometrien verran (Kuva 2A). Tämän hetken tiedon mukaan muutokset kromoforissa vaikuttavat lisäkkeeseen aiheuttaen uudelleenlaskostumisen.

Kokonaiskuvassa valosensorisessa moduulissa tapahtuu kromoforin isomerisaation johdosta paikallisia muutoksia, jotka muokkaavat pitkiä domeenien välisiä yhteyksiä, kuten PHY-lisäkkeen laskostumista, ja nämä muutokset ohjaavat

entsyymaattisen yksikön toimintaa (Yang ym. 2008, Burgie ym. 2014a, Burgie ym. 2016).

Pimeäpalautuminen tarkoittaa fytokromin palautumista Pfr-tilasta Pr-tilaan ilman valotusta (Rockwell & Lagarias 2010). Fytokromin pimeäpalautumisen kesto on lajista riippuen tunneista muutamiin päiviin (Rockwell ym. 2006). Pimeäpalautumisen keston voivat vaikuttaa muun muassa ympäristön pH, ionivahvuus, erilaiset pelkistävät tekijät sekä metalli-ionikonsentraatio.

Fytokromien siirtymistä Pr- ja Pfr-tilojen välillä voidaan tarkastella tasapainoreaktiona. Punaisessa valossa osa fytochromipopulaatiosta on Pr-tilassa ja osa Pfr-tilassa. Pimeäpalautumisessa fytochromipopulaatio hakeutuu uuteen tasapainotilaan tietyllä nopeudella. Ensimmäisen kertaluvun tasapainoreaktioissa lähtöaineen reaktionopeus reaktiotuotteeksi on riippuvainen lähtöaineen konsentraatiosta (Creighton 2010). Tämä tarkoittaa, että reaktio hidastuu edetessään, sillä lähtöaineen konsentraatio vähenee reaktiotuotteiden konsentraation kasvaessa.

Toisen kertaluvun reaktiossa kaksi lähtöainetta tai kaksi saman lähtöaineen molekyyliä saavat aikaan reaktion ja niiden konsentraatiot vaikuttavat reaktionopeuteen (Creighton 2010). Mikäli lähtöaineiden konsentraatiot ovat samat, reaktio etenee ensimmäisen kertaluvun reaktion mukaisesti. Mikäli toisen lähtöaineen konsentraatio on reaktion alussa huomattavasti toisen konsentraatiota suurempi ja säilyy niin läpi reaktion, reaktio tapahtuu ensimmäisen kertaluvun reaktion kaltaisesti (Creighton 2010).

Absorbanssi kuvaa, kuinka iso osa säteilevästä valosta jää näytteeseen valon kohdatessa sen (Nelson & Cox 2017 s. 80). Aine pystyy absorboimaan vain energiatilaansa vastaavaa energiaa. Aineen energiatila muuttuu, kun se absorboi valoa. UV-Vis-spektroskopia perustuu aineen kykyyn reagoida sähkömagneettiseen säteilyyn. UV-Vis-spektroskopiolla mitataan absorboituneen valon määrää. Lamber-Beerin laki on yhtälö, joka kuvaa absorbanssin

muodostuvan väliaineen paksuuden ( $l$ ), molaarisen absorptiokertoimen ( $\epsilon$ ) ja näytteen konsentraation ( $c$ ) tulona

$$A = \epsilon lc .$$

Tutkielmassa tuotettiin ja puhdistettiin *E. coli* BL21(DE3) -kannan soluissa *Deinococcus radiodurans* -bakteerifytokromimutanttia. Mutantista oli poistettu PHY-lisäke ja lisätty poistokohtaan kysteini (L445-C-A480) sekä korvattu kaksi pintakysteiniä seriinillä (C93S, C437S). *D. radioduransin* fytochromilla on C24-sidos kromoforiin (Wagner ym. 2005), joten sitä ei ole mutatoitu pois, jotta ei muutettaisi muita kromoforin yhteyksiä aminohappoihin, jotka voisivat vaikuttaa valovaihtuvuuteen. Mutantilla ei ole entsyymattista yksikköä. Tämän tutkielman jälkeen PHY-lisäkkeen poistokohdan mutatoituun kysteiniin pyritään uudelleenkytkemään PHY-lisäke, minkä takia pintakysteinit korvattiin seriinillä, jotta lisäkettä ei kytkettäisi väärään kohtaan.

Tämän tutkielman tavoitteena on tuottaa ja puhdistaa mutanttifytokromia ja verrata mutantin ja villityypin fytochromin UV-Vis-spektrejä toisiinsa. Selvitetään, miten spektrit eroavat toisistaan ja saadaanko mutantti valotettua Pfr-tilaan. Hypoteesimme on, että tuotto ja puhdistus onnistuvat, mutantin spektri eroaa villityypistä ja mutantti saadaan valotettua Pfr-tilaan. Oletamme näin, koska tärkeäksi havaitun rakenteen poisto mitä ilmeisemmin vaikuttaa fytochromin toimintaan eli valovaihtuvuuteen. Kromofori on läheisessä vuorovaikutuksessa PHY-lisäkkeen kanssa (Kuva 1).

Parhaan tietomme mukaan PHY-lisäkettä ei ole aiemmin poistettu kuin yhdessä tutkimuksessa (Gourinchas 2018). On tärkeää saada tietää mitä vaikutuksia poistamisella tulee olemaan proteiiniin tai voidaanko PHY-lisäkettä edes poistaa vahingoittamatta proteiinia muutoin. Tämän tutkielman tuloksia hyödynnetään mahdollisesti projekteissa, jossa tutkitaan tarkemmin PHY-lisäkkeen roolia.

## 2 AINEISTO JA MENETELMÄT

### 2.1 Proteiinin tuotto

Tässä tutkielmassa tuotettiin, puhdistettiin ja tutkittiin mutatoitua bakteerifytokromia. FM Moona Kurttila oli tehnyt mutaatiot pET21b-plasmidiin.

Aloitettiin 5 ml tuotto (5 ml LB-liuos, 404 mM ampisilliini) lisäämällä LB-kasvatusliuokseen glyserolissa säilöttyjä BL21DE3-kannan soluja, joihin oli transformoitu *Deinococcus radiodurans* -bakteerifytokromin mutanttia sisältävä plasmidi. Inkuboitiin aloituskasvatusta +37 °C, 230 rpm, 19 tuntia (New Brunswick Scientific, Excella E24 Inkubator Shaker Series).

Siirrettiin 1 ml aloituskasvatusta tuottokasvatukseen (500 ml LB, 404 mM ampisilliini). Inkuboitiin +37 °C, 230 rpm (New Brunswick Excella E25, Incubator Shaker Series) (2 h 15 min). Seurattiin bakteerikulttuurin OD<sub>600</sub>-arvoa. Kun OD<sub>600</sub>-arvo oli 0,61, aloitettiin tuotto lisäämällä IPTG (1 mM, Thermo Scientific). Inkuboitiin +28 °C, 230 rpm, yön yli.

Otettiin SDS-PAGE-näytteet ennen tuoton aloitusta (näyte 1) ja yön yli tuoton jälkeen (näyte 2). SDS-PAGE-näytteitä sentrifugoitiin 5 min, 5000 rpm (Thermo Scientific). Supernatantti poistettiin ja lisättiin 1:1 Nanopure-vettä ja 2x SDS-näytepuskuria (35,5 V% H<sub>2</sub>O, 2 V% SDS, 25 V% glyseroli, 0,06 M Tris pH 6,8, 10<sup>-3</sup> V% Promophenol Blue 10%:ssa etanolissa, 5 V% b-merkaptotaetanolin).

Tuottokasvatuksesta kerättiin bakteerit sentrifugoimalla 15 minuuttia, 6000 rpm, +4 °C (Thermo Scientific, Sorval RC6+ ja F9S-4x1000y rotor), jonka jälkeen bakteeripellettiin lisättiin 20 ml lyysispuskuria (20mM Tris, 50 mM NaCl, 0,3 mM TCEP, pH 8). Liuotettiin pelletti puskuriiin ja lisättiin vielä noin 30 ml puskuria. Suspensiot säilöttiin jäällä.

## 2.2 Bakteerien lyysaus

Bakteerit lyysattiin Avestin Emulsiflex-C3 -homogenisaattorilla, jotta fytochromi saatiin vapautettua bakteerien sisältä. Sylinteri pestiin vedellä ja jäähdytettiin jäällä 15 min ennen lyysausta. Näyte kiersi kahdesti laitteen läpi 1000–1500 bar paineessa. Lysaatti säilöttiin jäällä.

Sentrifugoitiin lyysattua näytettä 30 min, 20000 rpm, +4 °C (Thermo Scientific, Sorval RC6+ ja F21S-8x50 rotor) erottamaan bakteerimassa proteiinipitoisesta supernatantista. Lysaatista otettiin SDS-PAGE-näyte, joka sentrifugoitiin kuten aikaisemmat SDS-PAGE-näytteet, mutta 13300 rpm. Otettiin SDS-PAGE-näyte (näyte 3) pelletistä ja käsiteltiin kuten aiemmat SDS-PAGE-näytteet. Otettiin supernatantista SDS-PAGE-näyte (näyte 4), johon lisättiin 30 µl näytepuskuria.

Liuotettiin 2,3 mg biliverdiiniä (Frontier Scientific, biliverdin hydrochloride) 100 µl 0,6 M NaOH ja 900 µl lyysispuskuria. Biliverdiiniä lisättiin liuokseen, jotta fytochromi saataisiin valovaihtuvaksi ja mittaukset tehtyä. Lisättiin liuotettu biliverdiini sentrifugoidun lysaatin supernatanttiin ja inkuboitiin +4 °C ja pimeässä yön yli.

## 2.3 Kromatografia

Biliverdiinin, mahdollisten aggregaattien tai saostumien liukeneminen ja poistuminen varmistettiin sentrifugoimalla näytettä 6000 rpm, +4 °C, 15 min (Heraeus Megafuge 1,0R). His6-leimattu fytochromi (Liite 1) puhdistettiin muista näytteen sisältämistä proteiineista affiniteettikromatografialla sitouttamalla fytochromi HisTrap FF Crude 5 ml pylvään (GE Healthcare) sisältämään nikkeliin. Ajo suoritettiin BioRad NGC Chromatography -laitteella ohjeen mukaisesti. Pesupuskurilla (20 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM imidatsoli, 0,6 mM TCEP) huuhdeltiin pylväästä muut proteiinit fytochromin ollessa sitoutuneena nikkeliin. Eluutiopuskurin (20 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 500 mM imidatsoli, 0,6 M TCEP)

sisältämä imidatsoli korvasi fytochromin sitoutumisen nikkeliin, jolloin fytochromi eluotui pois ja se pystyttiin keräämään. Koko ajon ajan mitattiin absorbanssia 280, 405, 700 ja 750 nm aallonpituuksilla. Kerätyt näytteet absorboivat eluution aikana 700 nm, mistä tiedettiin niiden sisältävän fytochromia. TCEP:tä käytettiin puskurissa pelkistämään mutaatiokohtaan lisätty kysteiini.

Otettiin SDS-PAGE-näyte (näyte 5) eniten 700 nm aallonpituutta absorboivista fraktioista. Suoritettiin osalle hieman 700 nm aallonpituutta absorboiville pesuvaiheen fraktioille vastaava affiniteettikromatografia uudestaan samalla tavalla, jotta varmistuttaisiin, että kaikki mahdollinen fytochromi kerätään. Otettiin SDS-PAGE-näyte (näyte 6) toisen ajon 700 nm aallonpituutta eniten absorboivasta fraktiosta, joka kerättiin.

Laimennettiin fraktiot 50 ml SEC-puskurilla (30 mM Tris, pH 8, 0,6 mM TCEP). Mitattiin ensimmäisen ja toisen ajon näytteiden proteiinkonsentraatio spektrofotometrillä (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer). Konsentroidiin näytteet noin 10 ml tilavuuteen konsentroitiputkilla (Millipore Amicon Ultra-15 10 kDa) 4800 rpm, 10 min, +4 °C (Heraeus Megafuge 1,0R) lisäämään fytochromin pitoisuutta näytteessä. Yhdistettiin konsentroidu näyte ja toisesta affiniteettikromatografiasta kerätty fytochromia sisältävä näyte yhdeksi näytteeksi.

Liuotettiin 3,8 mg biliverdiiniä 100 µl 0,6 M NaOH ja 900 µl lyysispuskuria ja lisättiin yhdistettyyn näytteeseen, jotta varmasti kaikkiin fytochromipopulaation fytochromeihin sitoutuisi biliverdiini. Inkuboitiin jäällä pimeässä yön yli.

Konsentroidiin näyte kaksi kertaa kuten aiemmin noin 1 ml tilavuuteen. Ruiskusuodatettiin näyteliuos ruiskusuodattimella (VWR Syringe filter 0,2 µm cellulose acetate membrane). Suoritettiin kokoerottelukromatografia erottamaan mahdolliset proteiiniaggregaatit näytteestä sekä selvittämään biliverdiinin kiinnittymistä fytochromiin. Ajo suoritettiin samalla laitteella kuin affinitettikromatografia ohjeen mukaisesti. Käytetty pylväs oli HiLoad 26/600

Superdex 20 pg (GE Healthcare). Havainnoitiin samoja aallonpituuksia kuin affiniteettikromatografiassa ja 700 nm absorboivat fytochromifraktiot kerättiin.

Otettiin SDS-PAGE-näyte (näyte 7) eniten fytochromia sisältävästä fraktiosta ja SDS-PAGE-näyte (näyte 8) kaikista kerätyistä fytochromia sisältävistä fraktioista. Mitattiin näytteiden proteiinkonsentraatio spektrofotometrillä (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer). Jatkettiin konsentrointia kuten aiemmin ja otettiin SDS-PAGE-näyte (näyte 9), josta mitattiin proteiinkonsentraatio uudelleen kuten aiemmin. Jäädettiin näyte nestemäisellä typellä ja säilytettiin - 80 °C.

Näytteitä kuumennettiin 5 min +95 °C ennen SDS-PAGE-ajoa. Ajettiin näytteet (näytteet 1-9) 12 % SDS-PAGE-geelissä (Biorad Mini-Protean TGX Gels) SDS-ajopuskurissa (250 mM Tris, 1,9 M glysiini, 5,4 m-% SDS), 200 V, 15 minuuttia. Molekyylipainostandardina käytettiin Thermo Scientific Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder. SDS-PAGE-geeli inkuboitui väriaineessa (0,04 % Serva Blue, 25 % isopropanoli, 10 % etikkahappo) 15 minuuttia. Väriaineen poiston jälkeen inkuboitui geeliä hetki 10 % etikkahapossa. Liuos vaihdettiin kerran ja geeli jätettiin noin kolmeksi vuorokaudeksi inkuboitumaan, jotta väriaine poistuu geelistä. Geeli kuvattiin Biorad ChemiDoc MP Imaging Systemillä.

## **2.4 UV-Vis-spektroskopia**

Mutantti ja villityypin fytochromin (PAS-GAF-PHY 31.07.19. JR) UV-Vis-spektrit mitattiin Agilent Technologiesin Cary 8454 UV-Vis-spektrofotometrillä. Kaukopunavalotuksessa käytettiin 780–1060 nm valoa, punaisen valon valotuksessa käytettiin 661 nm LED-valoa. Käytetyt kyvetit olivat 10 mm Quartz Suprasil -kyvettejä (Helma Analytics). Mutantti laimennettiin 10x ja villityyppi 230x SEC-puskurilla.

Mitattiin taustavalon ja puskurin spektrit ennen ensimmäistä mittausta erikseen villityypille ja mutantille. Spektrit mitattiin ensin ilman valotusta. Mutanttia

valotettiin yhteensä 30 sekuntia 661 nm valolla, jonka jälkeen yhteensä 3,5 minuuttia kaukopunavalolla ja vielä 37 sekuntia 661 nm. Villityyppi valotettiin yhteensä 40 sekuntia 661 nm, jonka jälkeen yhteensä 75 sekuntia kaukopunavalolla ja tämän jälkeen vielä minuutti 661 nm. Valottaminen punaisella valolla tehtiin useassa osassa, minkä jälkeen aina mitattiin spektri, jotta varmistuttaisiin, että maksimi Pfr-tila saavutetaan, kunnes valotetut spektrit olivat samat. Myös kaukopunaisella valolla valotettiin useassa osassa.

Pimeäpalautumisen mittausta tehtiin mutantille ja villityypille samalla tavalla. Valotettiin yhteensä 200 sekuntia fytochromia valottamalla vuorotellen 20 sekuntia 661 nm ja 20 s kaukopunavaloa aloittaen valottamalla 661 nm. Fytochromin spektri mitattiin seuraavissa aikapisteissä: 0 s, 15 s, 30 s, 60 s, 120 s, 4 min, 8 min, 15 min, 30 min, 1 h 45 min ja 2 h 45 min. Ennen 0 sekunnin aikapistettä fytochromi valotettiin 661 nm, jonka jälkeen spektri mitattiin. Alle 8 minuutin aikapistet mitattiin näytteestä, joka palautettiin mittausten välissä Pfr-tilaan valottamalla. Yli 8 minuutin aikapisteen jälkeen fytochromia ei enää palautettu Pfr-tilaan mittausten välissä vaan spektrit mitattiin aikapisteissä.

## 2.5 Tulosten käsittely

Tulokset käsiteltiin Office 365 Excel -ohjelmalla (Microsoft). Affiniteettikromatografiassa ja kokoerottelukromatografiassa saaduista tuloksista tehtiin kuvaajat eikä dataa käsitelty muutoin.

UV-Vis-spektrit käsiteltiin villityypin ja mutantin osalta samalla tavalla. Ensin puskurin absorbanssi vähennettiin kaikista absorbanssiarvoista. Tämän jälkeen spektrien perustaso korjattiin vähentäen 850 nm absorbanssi kaikista arvoista. Näin ollen kaikki absorbanssit nousivat tasossa 850 nm absorbanssin verran. Tällä varmistettiin, että spektrissä ei ole negatiivisia absorbansseja, sillä 850 nm absorbanssin pitäisi olla nolla.



Mutantin spektreille tehtiin sironnankorjaus, sillä niiden havaittiin nousseen tasossa erityisesti pienempien aallonpituuksien kohdalla. Sironnankorjauksessa mutantin raakaspektristä vähennettiin sironnankorjausfunktion arvot. Mutantin ja villityypin spektrit normitettiin itsenäisesti jakamalla mutantin ja villityypin spektrin 280 nm absorbanssi kaikilla spektrin absorbansseilla. Kuvista jätettiin pois ne aallonpituudet, jotka eivät olleet merkityksellisiä tutkimuksen kannalta eli aallonpituudet alle 250 nm sekä yli 850 nm.

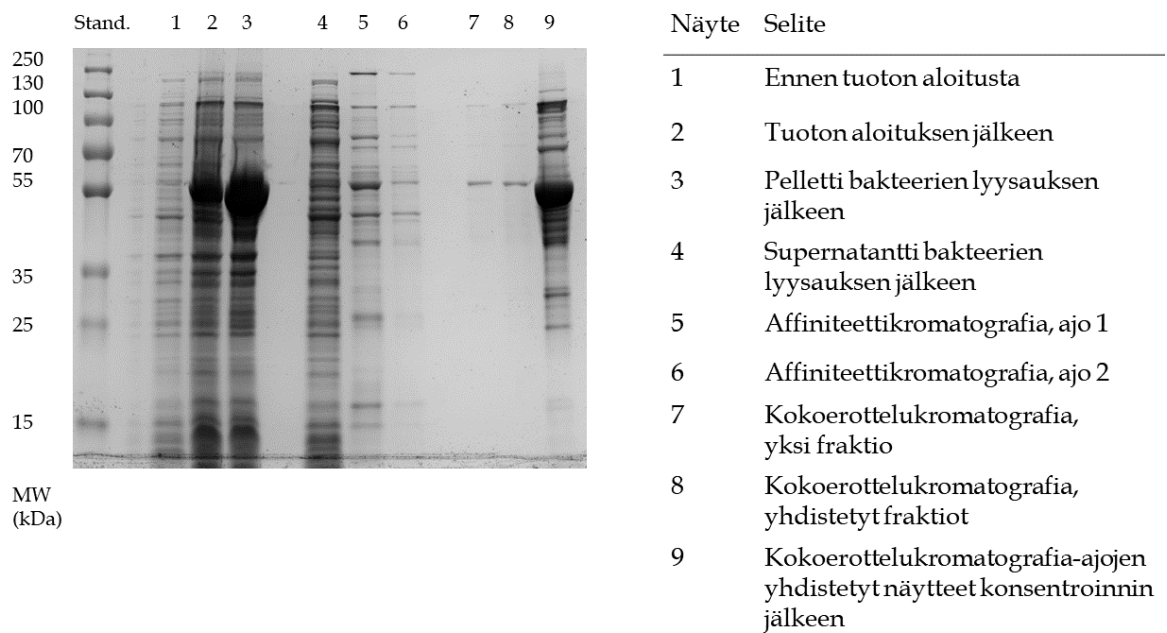
Pfr:n suhteellinen osuus eri aikapisteissä laskettiin jakamalla aikapisteiden 750 nm absorbanssi 700 nm absorbanssilla erikseen jokaiselle spektrille. Spektri normitettiin jakamalla kaikki Pfr:n suhteellisen osuuden arvot Pfr:n suhteellisen osuuden maksimiarvolla eli ensimmäisen aikapisteen (0 min) arvolla. Näin ollen ensimmäisessä aikapisteessä (0 min) Pfr:n suhteellisen osuuden maksimiarvo saa arvon yksi. Pfr:n suhteellisen osuuden muutosta mallinnettiin kahden komponentin sovituksella ja yhden komponentin sovituksella MatLAB R2018c -ohjelmistolla (The Mathworks, Inc.).

### 3 TULOKSET

Tutkielmassa tuotettiin ja puhdistettiin mutatoitua bakteerifytokromia, jota verrattiin villityypin bakteerifytokromiin UV-Vis-spektroskopisesti. Tutkielman tulokset koostuvat SDS-PAGE-geelielektroforeesista, jolla pyrittiin seuraamaan tuoton ja puhdistuksen onnistumista, affiniteetti- ja kokoerottelukromatografiasta, joilla puhdistettiin tuotettu fytochromi sekä UV-Vis-mittauksista, joissa verrattiin mutanttifytokromia villityypin fytochromiin.

Mutantin sekvenssin (Liite 1) perusteella molekyylipainoksi tiedetään 51,35 kDa. Molekyylipaino on haettu mutantin sekvenssillä ProtParam-verkkosivulta.

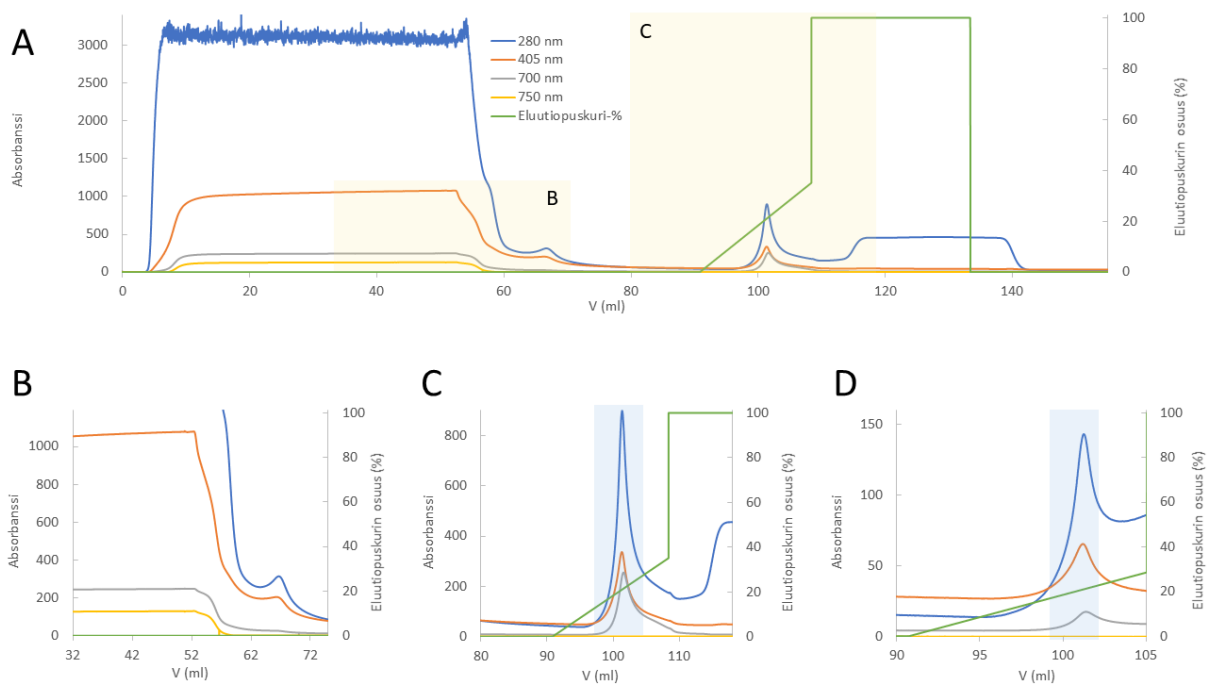
Mutantin saanto oli 0,51 mg / 500 ml tuotto. Tuoton onnistuminen havaittiin lisääntyvästä proteiinin määrästä 51 kDa kohdalla tuoton aloituksen jälkeen (Kuva 3, näytteet 1–2). Bakteerien hajotuksen jälkeen niiden sisältä saatiin kerättyä fytokromia, joka liukeni sentrifuugauksen jälkeen supernatanttiin (Kuva 3, näyte 4). Suurempi osa fytokromista jäi hajonneita bakteerisoluja sisältävään pellettiin (Kuva 3, näyte 3).



Kuva 3. SDS-PAGE-geeli. Näytteet on otettu tuoton ja puhdistuksen eri vaiheissa. Tuotetun fytokromin molekyylipaino on 51 kDa.

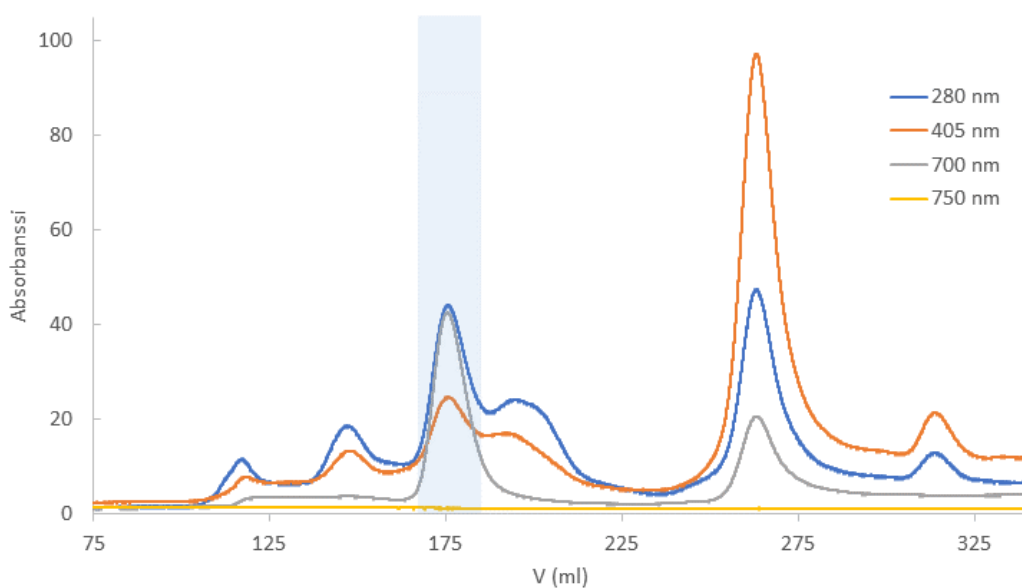
Affiniteetikromatografialla onnistuttiin eristämään fytokromia (Kuva 3). Affiniteetikromatografialla ei saatu eristettyä puhdasta fytokromia, sillä affiniteetikromatografian jälkeinen näyte sisältää muitakin proteiineja kuin fytokromia (Kuva 3, näytteet 5–6). Konsentroidin tuo esille, että kokoerottelukromatografialla ei myöskään saatu eroteltua pelkkää fytokromia, sillä lopullinen konsentroidin näyte ei ole puhdas (Kuva 3, näyte 9). Fytokromia on kuitenkin kaikista proteiineista eniten puhdistuksien jälkeisissä näytteissä (Kuva 3).

Affiniteettikromatografia ajettiin toisen kerran ensimmäisestä ajosta kerätyillä fraktioilla (Kuva 4B), koska 700 nm absorbanssi oli hieman kohonnut ja haluttiin varmistaa, että saadaan puhdistettua kaikki mahdollinen fytokromi. Toisella ajolla fytokromia ei juurikaan saatu eristettyä (Kuva 4D). Eluoidut näytteet absorboivat enemmän 400 nm kuin 700 nm (Kuva 4C ja 4D). Eluoidut näytteet absorboivat myös 280 nm huomattavasti enemmän kuin 700 nm (Kuva 4C ja 4D). Ensimmäisen ajon jälkeen fytokromi eluutui 107,4 mM ja toisella ajolla 106,1 mM imidatsolikonsentraatiossa.



Kuva 4. Affiniteettikromatografia. (A) Ensimmäisen ajon kromatogrammi, johon keltaisella palkilla merkityistä tarkennukset kuvissa (B), jossa ensimmäisen ajon pesuvaiheen kromatogrammi fraktioista, jotka ajettiin toisen kerran sekä (C), jossa ensimmäisen ajon kromatogrammi eluution aikana. (D) Toisen ajon kromatogrammi eluution aikana. Sinisellä palkilla on merkitty kerätyt fraktiot, jotka absorboivat 700 nm.

Kokoerottelukromatografialla saatiin eristettyä fytokromia (Kuva 5). Ennen fraktioiden keräystä näyte on absorboinut 280 ja 405 nm (Kuva 5). Kokoerottelukromatografiassa 405 nm ja 700 nm absorbanssin suhde on kääntynyt verrattuna affiniteettikromatografiaan (Kuva 5). Kokoerottelukromatografiassa myös 280 nm absorbanssin suhde 700 nm absorbanssiin on lähes 1 (Kuva 5).



Kuva 5. Kokoerottelukromatografia. 700 nm absorboivat fraktiot kerättiin (sinisellä palkilla).

Absorbanssia ei saatu mitattua affiniteettikromatografia-ajojen jälkeisistä näytteistä. Yhdistettyjen kokoerottelukromatografianäytteiden absorbanssi mitattiin, absorbanssiksi ( $A_{280}$ ) saatiin 0,03. Konsentroidun näytteen absorbanssia yritettiin mitata lukuisia kertoja, mutta tulokset vaihtelivat paljon. Absorbanssiksi saatiin kahdessa mittauksessa 0,178 sekä 0,189 aallonpituudella 280 nm. Absorbanssin keskiarvoksi määritettiin 0,1835. Nämä tulokset säästettiin. Laskettiin näytteen konsentraatio

$$c = \frac{A_{280\text{keskiarvo}}}{Abs\ 0,1\ \%} = \frac{1,835}{1,277} \text{ g/l} = 1,437 \text{ g/l},$$

jossa Abs 0,1 % on mutantin suhdeluku 1,277 ja  $A_{280}$ -arvona käytettiin 1,835, joka on aallonpituudella 280 nm mitattujen absorbanssien keskiarvo 1 cm matkalla.

Koska lopullisen konsentroidun näytteen konsentraation mittauksissa oli vaikeuksia, laskettiin UV-Vis-mittausten perusteella näytteen konsentraatio

$$c = \frac{A_{280}}{\text{Abs } 0,1 \%} = \frac{0,259510517120361}{1,277} = 2,032188858 \cdot 10^{-4} \text{ mg} / \mu\text{l} .$$

Kun laimennoskerroin (10) huomioitiin, saatiin konsentraatioksi

$$c = 10 \cdot 2,032188858 \cdot 10^{-4} \text{ mg} / \mu\text{l} = 2,0321 \dots \cdot 10^{-3} \text{ mg} / \mu\text{l} .$$

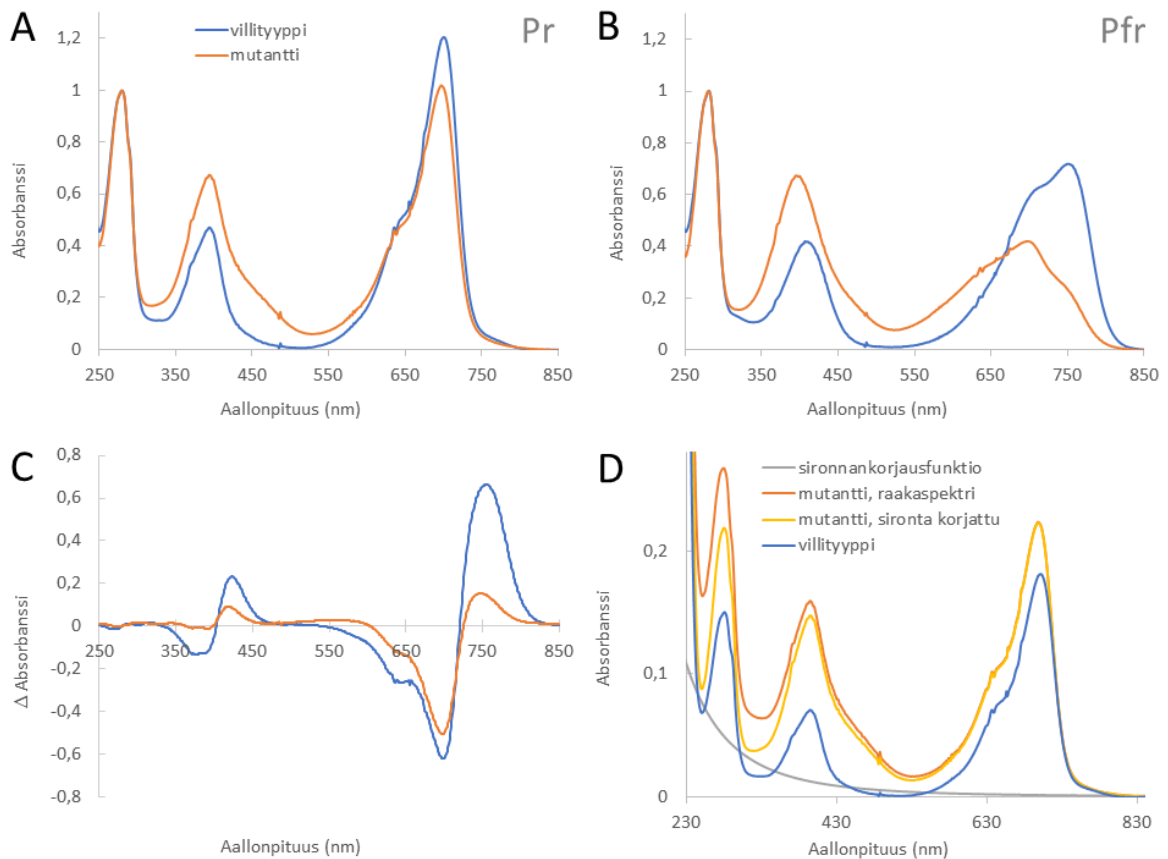
Laskettiin saanto

$$\begin{aligned} \text{Saanto} &= c \cdot V = 2,0321 \dots \cdot 10^{-3} \text{ mg} / \mu\text{l} \cdot 250 \mu\text{l} = 0,50804 \dots \text{ mg} \\ &\approx 0,51 \text{ mg} . \end{aligned}$$

Villityypin fytochromi absorboi enemmän kuin mutantti sekä Pr- että Pfr-tilassa 600–750 nm alueella (Kuva 6). Mutantti saatiin valotettua Pfr-tilaan (Kuva 6B). Mutantti absorboi enemmän 400 nm sekä Pr- että Pfr-tilassa (Kuva 6). Sironnankorjauksessa (Kuva 6D) pyrittiin vähentämään sironnan aiheuttama, erityisesti pienillä aallonpituuksilla havaittava spektrin liiallinen nousu tasosta. Sironnan korjaus tehtiin vain mutantin spektreille vähentämällä mutantin raakaspektrin absorbanssista sironnankorjausfunktion arvo

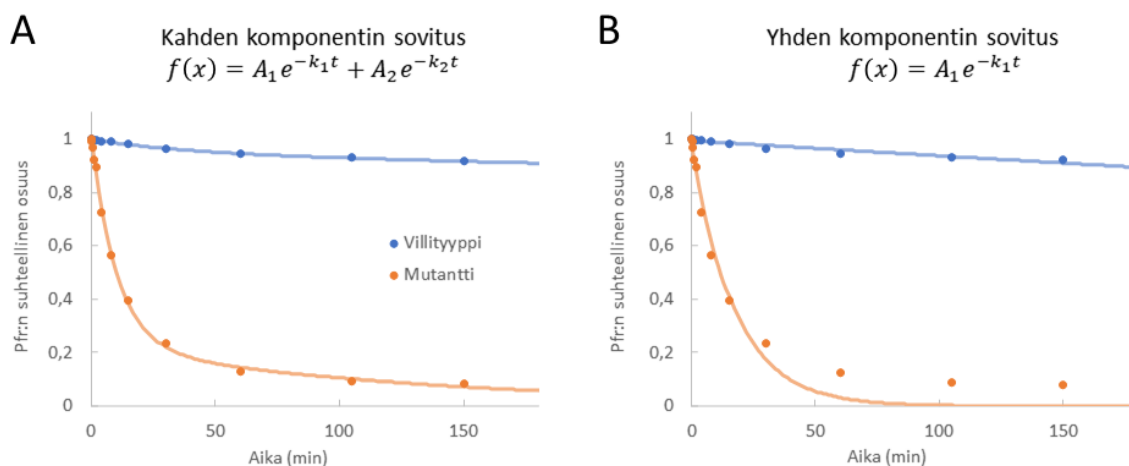
$$A_{\text{sironnankorjattu}} = A_{\text{mutantti raakaspektri}} - \frac{1}{\lambda^4} \cdot x ,$$

jossa A on absorbanssi,  $\lambda$  on aallonpituus ja x on vakio, tässä tapauksessa 0,30.



Kuva 6. (A) Mutantin UV-Vis-spektri Pr-tilassa verrattuna villityyppiin, molemmat valotettu kaukopunaisella valolla. (B) Mutantin UV-Vis-spektri Pfr-tilassa verrattuna villityyppiin, molemmat on valotettu punaisella valolla (661 nm). (C) Villityypin ja mutantin erotusspektrit, joissa Pr:n absorbanssi on vähennetty Pfr:n absorbanssista. (D) Mutantin Pr- ja Pfr-tilojen spektrit korjattiin sironnan osalta, esimerkkinä mutantin raakaspektri sekä korjattu spektri Pr-tilassa.

Pimeäpalautumisessa mitattiin Pfr:n suhteellisen osuuden muutosta. Mutanttia ja villityyppiä valotettiin aluksi punaisella valolla 661 nm, jonka jälkeen spektri mitattiin eri aikapisteissä ilman valotusta (Kuva 7). Villityypin Pfr:n suhteellinen osuus ei juuri muuttunut mittausaikana, kun taas mutantti palautui nopeasti (Kuva 7). Villityypin palautumisen aikavakio oli 39 min ensimmäisellä komponentilla (Taulukko 1). Mutantin kohdalla vastaava arvo oli 10 min (Taulukko 1).



Kuva 7. Pfr:n suhteellisen osuuden muutos ajan funktiona ilman valotusta kahden komponentin sovituksella (A) ja yhden komponentin sovituksella (B). Sekä mutanttia että villityyppiä valotettiin aluksi 661 nm, jotta fytochromi saatiin Pfr-tilaan. Tämän jälkeen mitattiin spektri ilman valotusta eri aikapisteissä. Pfr:n suhteellisen osuuden muutos laskettiin jokaisessa aikapisteessä jakamalla 750 nm absorbanssi 700 nm absorbanssilla. Kuvat on normitettu niin, että nollassa minuutissa Pfr:n suhteellisen osuuden muutos saa arvon yksi Pfr:n maksimikonsentraatiossa näytteessä. Aikapisteissä mitattu data on merkitty pisteinä, yhden ja kahden komponentin sovitukset viivoina.

Eri komponenttien sovitukset tehtiin mallintamaan palautumisreaktion kinetiikkaa. Yhden komponentin sovitus tehtiin oletuksella, että reaktio etenisi ensimmäisen kertaluvun kinetiikan mukaan (Kuva 7B). Yhden komponentin sovitus ei sopinut mitattuihin aikapisteisiin (Kuva 7B). Palautumista mallintaa paremmin toisen kertaluvun kinetiikkaan perustuva kahden komponentin mallinnus (Kuva 7A). Mallinnuksessa käytettyjen funktioiden vakiot taulukoitiin (Taulukko 1). Kun nopeusvakio ( $k$ ) kasvaa ja aikavakio ( $\tau$ ) pienenee, palautuminen etenee nopeammin.

Taulukko 1. Pfr:n suhteellista muutosta kuvaavien kahden ja yhden komponentin funktioiden vakiot. Vakio A kuvaa amplitudia, k nopeusvakiota ja  $\tau$  aikavakiota.  $\tau$  on nopeusvakion käänteisluku.

vakio	Kahden komponentin sovitus		Yhden komponentin sovitus	
	villityyppi	mutantti	villityyppi	mutantti
A <sub>1</sub>	0,0513	0,7822	0,9938	0,9804
A <sub>2</sub>	0,9475	0,222		
k <sub>1</sub>	0,0258	0,09565	0,00059	0,05748
k <sub>2</sub>	0,000231	0,007561		
$\tau_1$	39 min	10 min	28 h	17 min
$\tau_2$	82 h	132 min		

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

Tässä tutkielmassa tuotettiin ja puhdistettiin bakterifytokromia ilman PHY-lisäkettä ja verrattiin sen UV-Vis-spektrejä villityypin fytochromiin. Tutkielman keskeinen löydös on, että PHY-lisäke voidaan poistaa fytochromista säilyttäen sen valovaihtuvuus, mutta mutantin UV-Vis-spektri eroaa villityypistä.

### 4.1 Mutantin vähäinen saanto

Fytochromia saatiin tuotettua ja puhdistettua varsin pieni määrä (0,51 mg / 500 ml tuotto). Erilaisten mutanttien saanto on ollut vaihtelevaa. Mutantteja on saatu tuotettua 1,1 mg / 500 ml ja 40,6 mg / 500 ml välillä (Kurttila 2019) sekä esimerkiksi jopa 79,5 mg/500 ml (Goncharenko 2018). Pienimmätkin määrät ovat suurempia kuin tässä tutkimuksessa saatu. Pientä saantoa selittää erityisesti fytochromin jääminen pellettiin (Kuva 3). Syy tähän voisi olla se, että mutantti ei ole niin stabiili kuin villityyppi. Stabiilisuudella tarkoitetaan tässä yhteydessä proteiinin kykyä säilyttää laskostunut rakenteensa, jolloin sillä on potentiaali toimia, joka fytochromin kohdalla tarkoittaa valoaktivaatiota kaukopunavalolla. Epästabiilimpi fytochromi



voisi liueta heikommin supernatanttiin tai mahdollisesti aggregoitua ja kasaantua pellettiin.

Aikaisemmin tutkielmissa joillain mutanteilla pellettiin ei ole jäänyt suurta määrää fytochromia vaan suurin osa on ollut supernatantissa (Kurkinen 2017, Goncharenko 2018). Toisaalta on tuotettu mutantteja, joista on jäänyt fytochromia pellettiin kuten tässä tutkimuksessa (Kurttila 2019).

## **4.2 Puhdistus**

Aikaisempien tutkielmien osalta myös fytochromin puhtaus on vaihdellut eri mutanteilla. Joillain mutanteilla on saatu lähes täysin puhdasta fytochromia (Kurkinen 2017, Goncharenko 2018). Toisilla mutanteilla ei olla saatu täysin puhdasta fytochromia affiniteetti- ja kokoerottelukromatografian jälkeen (Kurttila 2019). Puhtaus voi riippua myös menetelmästä eikä vain mutantista. Ainakin Kurkinen käytti tutkielmassaan korkean resoluution kokoerottelukromatografiaa. Tässä on verrattu vain muutamaa tutkielmaan, joten menetelmän ja mutantin vaikutuksesta puhtauteen on vaikea sanoa tarkemmin.

Kuten aiemmin todettiin, mutantti on voinut aggregoitua tuoton jälkeisen sentrifugoinnin aikana ja kasaantua pellettiin (Kuva 3). Taipumus aggregoitua näkyy todennäköisesti myös puhdistuksen aikana. Mutantti on aggregoitunut mitä ilmeisemmin ennen affinitetikromatografian eluutiota tai sen aikana. Tämä aiheuttaa näytteessä sirontaa. Näytteeseen liukenemattomat aineet sirottavat valoa ja koska pienimmillä aallonpituuksilla sirontaa tapahtuu enemmän, vaikuttaa sironta 280 nm, 400 nm ja 700 nm välisiin suhteisiin. Näin ollen absorbanssi on suurempaa 400 nm kuin 700 nm affiniteetikromatografian eluution aikana (Kuva 4A ja 4C).

Edellistä havaintoa vahvistaa kokoerottelukromatografian tulokset (Kuva 5). Tutkielmassa suoritettiin kokoerottelukromatografia, jotta mahdolliset aggregaatit saadaan poistettua. Kokoerottelukromatografian jälkeen 700 nm ja 400 nm suhde on kääntynyt ja on normaalin fytokromin absorptiospektrin mukainen (Kuva 5). Tämän selittää se, että aggregaattien poisto vähentää 400 nm absorbanssia, koska sirontaa tällä aallonpituudella ei tapahdu niin paljon, mikä muuttaa 400 nm 700 nm suhdetta. Kokoerottelukromatografiassa 700 nm ja 400 nm suhde on kääntynyt, joten se on sisältänyt aggregaatteja, jotka ovat aiheuttaneet sirontaa. Kromatogrammilta nähdään myös, että ennen kerättyjä fraktioita näytettä on eluoitunut pois (Kuva 5). Kaikkia aggregaatteja ei välttämättä ole saatu poistettua, koska UV-Vis-mittauksissa havaitaan sirontaa (Kuva 4D) tai mutantti aggregoituu puhdistuksen jälkeen.

On mahdollista, että affiniteetikromatografian aikana biliverdiiniä ei ole ollut tarpeeksi, jotta kaikkiin fytokromeihin olisi sitoutunut biliverdiini. Biliverdiiniä lisättiin affiniteetikromatografian jälkeen, jotta kaikki mahdollinen holoproteiini (biliverdiini sitoutuneena fytokromiin) saataisiin kerättyä. Biliverdiinin lisäys ei todennäköisesti ole vaikuttanut suuresti holoproteiinin määrään, koska vähentynyt 280 nm absorbanssi kokoerottelukromatografiassa verrattuna affiniteetikromatografiaan (Kuva 4 ja 5) selittyy todennäköisesti sironnan vähentymisellä kokoerottelukromatografian jälkeen. Aggregaattien poisto on vähentänyt sirontaa millä on ollut vaikutus sekä 280 nm ja 700 nm suhteeseen, että 700 nm ja 400 nm suhteeseen. Affiniteetti- ja kokoerottelukromatografia (Kuva 4 ja 5) sekä SDS-PAGE-geeli (Kuva 3) kaikki viittaavat vahvasti mutantin aggregoituneen.

Puhdistukset on tehty automaattisesti, joten työn suoritus tuskin on vaikuttanut puhdistuksen tarkkuuteen. Vaikka näyte ei ollut täysin puhdasta fytokromia, se ei näytä haitanneen UV-Vis-mittauksia mitatulla aallonpituusalueella (Kuva 6). Epäpuhtaudet eivät sido biliverdiiniä ja niiden mahdollinen 280 nm absorbanssi ei näy

tuloksissa, koska spektrit on normitettu 280 nm mukaan. Epäpuhtaudet voivat kuitenkin vaikuttaa sirontaan. Affiniteetti- ja kokoerottelukromatografia ovat tälle tutkimukselle riittävän tarkkoja menetelmiä.

### 4.3 Spektrien erot

#### 4.3.1 Mutantti on valovaihtuva

Mutantti ei absorboinut kaukopunaista valoa niin paljon kuin villityyppi (Kuva 6). Tälle voi olla kaksi eri selitystä. Mutantti ei siirry Pfr-tilaan niin paljon ja tämä havaittaisiin pienempänä absorptiona. Voi olla, että mutantti siirtyy Pfr-tilaan yhtä paljon, mutta sen Pfr-tila on erilainen kuin villityypillä ja siten erilaisen kemiallisen ympäristön vuoksi sen absorptio-ominaisuudet olisivat erilaiset. Tällöin herää kysymys, voidaanko puhua Pfr-tilasta, mikäli se on selkeästi erilainen kuin villityypin Pfr-tila. Tutkimuksessa, jossa koko PHY-domeeni oli poistettu, absorbanssi oli vähentynyt kaukopuna-alueella verrattuna PHY-domeenilliseen fytokromiin (Takala ym. 2018). Tämä on yhteneväistä tutkimuksemme kanssa.

Samanlaisia havaintoja PHY-domeenin roolista on tehty aikaisemmin. Kun PHY-domeeni on poistettu, absorbanssi ei saavuttanut samaa maksimiabsorbanssia kuin villityyppi (Takala ym. 2014b). Takalan ym. tutkimuksissa oli käytetty samaa villityyppiä kuin tässä tutkimuksessa. Vaikka tutkimuksessamme kaukopunavalon absorbanssi on vähäisempää mutantilla, tärkeä havainto on se, että mutantti saadaan valoaktivoitua Pfr-tilaan.

#### 4.3.2 PHY-lisäke on keskeinen signaalinvälityksessä

Mutantin absorptio-ominaisuudet ovat erilaisia kuin villityypin. Mutantti absorboi enemmän 400 nm, mutta vähemmän punaista ja kaukopunaista valoa kuin villityyppi sekä Pr- että Pfr-tilassa (Kuva 6). Erilaiset absorptio-ominaisuudet viittaavat erilaiseen signaalinvälitykseen, koska erilainen kemiallinen rakenne

biliverdiinin ympärillä vaikuttaa sen absorptiokykyyn. Signaalinvälityksellä tarkoitetaan absorption aiheuttamien muutosten ketjua, joka lopulta johtaa entsyymaattisen yksikön aktivoitumiseen. Tällä ei tarkoiteta signaalinvälitystä solussa, joka muokkaa eliön biologista toimintaa. Tutkimuksessa ei ollut mukana entsyymaattista yksikköä. Jatkossa olisi tärkeää tutkia, saadaanko fytochromi biologisesti aktiiviseksi ilman PHY-lisäkettä.

Koska mutantti on valovaihtuva ilman PHY-lisäkettä, on ilmeistä, että fytochromilla on oltava signaalinvälitysreittejä, joihin PHY-lisäke ei liity. On ehdotettu, että kromoforin muutokset eivät olisi täysin kytkeytyneitä fytochromin valovaihtumisen aikana tapahtuviin muutoksiin (Takala ym. 2018). Mutatoinnilla on saatu kromofori Pr-tilaan, mutta samaan aikaan domeenien tasapaino on ollut Pfr-tilassa.

Tämän tutkimuksen perusteella emme voi sanoa, miten signaalinvälitysreitti muuttuu. UV-Vis-spektroskopiolla mitataan kromoforin absorboiman valon määrää, mutta ei saada rakenteellista tietoa fytochromista. Emme esimerkiksi tiedä biliverdiinin konformaatiota tai yhteyksiä aminohappoihin. Rakenteellista tietoa fytochromeista on mitattu esimerkiksi röntgenkristallografialla (Ulijasz ym. 2011, Edlund ym. 2016, Claesson ym. 2020), NMR-spektroskopiolla (Gustavsson ym. 2020) ja kryoelektronimikroskoopilla (Ulijasz ym. 2011). Tutkimuksestamme ilmenee, että signaalinvälitysreitti todennäköisesti muuttuu, sillä mutantti ei siirry Pfr-tilaan niin paljoa kuin villityyppi (Kuva 6), vaikka on mahdollista, että mutantin Pfr-tila on erilainen kuin villityypin. Rakennemuutoksia ilman PHY-lisäkettä tulisi jatkossa tutkia.

#### 4.3.3 PHY-lisäke stabiloi Pfr-tilaa

PHY-lisäkkeen on havaittu olevan keskeinen valovaihtumisessa (Takala ym. 2014a). PHY-lisäkkeen on havaittu estävän biliverdiinin liikkumista GAF-domeenin lähetyviltä (Ulijasz ym. 2011) ja yhden aminohapon muutokset PHY-lisäkkeeseen

ovat nopeuttaneet pimeäpalautumista tuhatkertaisesti (Burgie ym. 2014b). PHY-lisäkkeen voidaan ajatella toimivan ikään kuin kytkimenä, joka säätelee PHY-domeenin paikkaa. On havaittu, että Pfr-tilassa PHY-lisäke vetää PHY-domeenia lähemmäs GAF-domeenia (Takala ym. 2014a).

Tarkastelemalla Pfr:n suhteellista osuutta eri aikapisteissä havaittiin mutantin palautuvan Pfr-tilasta Pr-tilaan huomattavasti nopeammin kuin villityypin (kuva 7A). Tutkimuksessa, jossa koko PHY-domeeni oli poistettu, palautuminen oli nopeampaa verrattuna villityyppiin (Takala ym. 2014b). Tämä antaa tietoa siitä, että PHY-domeenilla on tärkeä rooli Pfr-tilan stabiloinnissa. On ehdotettu, että Pfr-tila omaa stabiilimman eli vakaamman rakenteen, Pr-tilan ollessa dynaamisempi (Gustavsson ym. 2020). Tämä tieto sekä aiemmat havainnot PHY-lisäkkeen merkityksestä yhdistettynä tutkimukseemme antaa viitteitä siitä, että PHY-lisäke stabiloi "jäykempää" Pfr-tilaa.

Tutkimuksemme osoittaa, että PHY-lisäkkeen poisto saa aikaan muutoksia palautumisnopeudessa. Tämän lisäksi entsyymattinen yksikkö näyttää lisäävän palautumista (Takala ym. 2014b), joskin vähemmän kuin PHY-domeeni. Mielenkiintoista olisi tutkia seuraavaksi, kuinka palautuminen tapahtuu ilman PHY-lisäkettä entsyymattisen yksikön kanssa. Vastaavia tuloksia PAS-GAF-domeenien nopeasta pimeäpalautumisesta ovat tehneet myös muut (Burgie ym. 2014b). Samassa tutkimuksessa kokopitkä fytokromi ei kuitenkaan palautunut nopeammin kuin ilman entsyymattista yksikköä oleva mutantti. Pimeäpalautuminen *in vitro* voisi mahdollisesti erota solun sisällä tehtävästä pimeäpalautumisesta (Klose ym. 2020), mitä olisi myös tärkeä tutkia.

Pfr:n suhteellisen osuuden muutosta tutkittiin sovittamalla mitatut aikapisteet kahdella komponentilla (Kuva 7A) ja yhdellä komponentilla (Kuva 7B). Aikapisteiden sovittukseen päädyttiin, sillä yhden komponentin sovitus ei kuvannut tarpeeksi tarkasti muutosta Pfr:n suhteellisessa osuudessa, vaan jätti osan

aikapisteistä kuvaajan ulkopuolelle. Kahden komponentin sovitus kuvasi Pfr:n suhteellisen osuuden muutosta tarkemmin ja aikapisteet asettuivat kuvaajalle. Pfr:n suhteellisen osuuden muutoksesta voidaan päätellä, että mutantti palaa Pr-tilaan huomattavasti villityyppiä nopeammin.

Tärkeä huomio tutkielmassamme on se, että fytochromia voidaan tuottaa ja puhdistaa ilman PHY-lisäkettä. Mutatoitu fytochromi vaikuttaa olevan vähemmän stabiili kuin villityyppi. UV-Vis-spektroskopisesti mutantti eroaa villityypistä, mutta tärkeä huomio on, että mutantti on valovaihtuva. Tutkielma tukee aikaisempia havaintoja PHY-lisäkkeen merkityksestä fytochromin toiminnalle. PHY-lisäkkeen rooli valovaihtuvuudessa on keskeinen, mutta ei välttämätön.

## **KIITOKSET**

Kiitokset ohjaajillemme Moona Kurttilalle ja Janne Ihalaiselle kaikesta avusta tutkielman aikana. Tutkimus on osa Suomen Akatemian rahoittamaa professori Janne Ihalaisen projektia ja tutkimuksen tuloksia hyödynnetään mahdollisesti FM Moona Kurttilan väitöskirjatyössä. Kandidaatin tutkielman tehnyt työpari on osallistunut työskentelyyn tasapuolisesti ja katsomme meidän molempien ansaitsevan saman arvosanan LuK-tutkielmasta.

## KIRJALLISUUS

- Anders K. & Essen L-O. 2015. The family of phytochrome-like photoreceptors: diverse, complex and multi-colored, but very useful. *Curr Opin Struct Biol.* 35: 7-16.
- Auldrige M. E., Satyshur K. A., Anstrom D. M. & Forest K. T. 2012. Structure-guided Engineering Enhances a Phytochrome-based Infrared Fluorescent Protein. *J Biol Chem.* 287: 7000-7009.
- Bauer C., Elsen S., Swem L.R., Swem D. L. & Masuda S. 2003. Redox and light regulation of gene expression in photosynthetic prokaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1429):147-53.
- Bhoo S-H., Davis S. J., Walker J., Karniol B. & Vierstra R. D. 2001. Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature.* 414: 776-779.
- Borthwick H. A., Hendricks S. B., Parker M. W., Toole E. H. & Toole V. K. 1952. A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38: 662-666.
- Burgie E. S. & Vierstra R. D. 2014a. Phytochromes: An Atomic Perspective on Photoactivation and Signaling. *The Plant Cell.* 26:4568-83.
- Burgie E. S., Wang T., Bussell A. N., Walker J. M., Li H. & Vierstra R. D. 2014b. Crystallographic and electron microscopic analyses of a bacterial phytochrome reveal local and global rearrangements during photoconversion. *J Biol Chem.* 29:289(35):24573-87.
- Burgie E. S., Zhang J. & Vierstra R. D. 2016. Crystal Structure of Deinococcus Phytochrome in the Photoactivated State Reveals a Cascade of Structural Rearrangements during Photoconversion. *Structure.* 24: 448-457.
- Butler W. L., Norris K. H., Siegelman H. W & Hendricks S. B. 1959. Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45: 1703-1708.
- Claesson E., Yuan Wahlgren W., Takala H., Pandey S., Castillon L., Kuznetsova V., Henry L., Panman M., Carrillo M., Kübel J., Nanekar R., Isaksson L., Nimmrich A., Cellini A., Morozov D., Maj M., Kurttila M., Bosman R., Nango E., Tanaka R., Tanaka T., Fangjia L., Iwata S., Owada S., Moffat K., Groenhof G., Stojković E. A., Ihalainen J. A., Schmidt M. & Westenhoff S. 2020. The primary structural photoresponse of phytochrome proteins captured by a femtosecond X-ray laser. *eLife.* 9:e53514.

- Creighton T. E. 2010. *The Physical and Chemical Basis of Molecular Biology*. Helvetian Press.
- Edlund P., Takala H., Claesson E., Henry L., Dods R., Lehtivuori H., Panman M., Pande K., White T., Nakane T., Berntsson O., Gustavsson E., Båth P., Modi V., Roy-Chowdhury S., Zook J., Berntsen P., Pandey S., Poudyal I., Tenboer J., Kupitz C., Barty A., Fromme P., Koralek J. D., Tanaka T., Spence J., Liang M., Hunter M. S., Boutet S., Nango E., Moffat K., Groenhof G., Ihalainen J., Stojković E. A., Schmidt M. & Westenhoff S. 2016. The room temperature crystal structure of a bacterial phytochrome determined by serial femtosecond crystallography. *Sci Rep.* 6: 35279.
- Fankhauser C. 2001. The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J Biol Chem.* 276(15):11453–6.
- Fraikin G. Y., Strakhovskaya M. G., Belenikina N. S. & Rubin A. B. 2015. Bacterial photosensory proteins: Regulatory functions and optogenetic applications. *Microbiology.* 84:461–472.
- Fuortes M. 1971. Responses of photoreceptors. *J. Psychiatr. Res.* 8:289–300.
- Goncharenko M. 2018. Photoinduced changes in phytochromes studied by means of low temperature UV-VIS spectroscopy. Pro gradu -tutkielma, Jyväskylän yliopisto. <https://jyx.jyu.fi/handle/123456789/57535>
- Gourinchas G., Heintz U. & Winkler A. 2018. Asymmetric activation mechanism of a homodimeric red light-regulated photoreceptor. *Elife.* 7:e34815.
- Gustavsson E., Isaksson L., Persson C., Mayzel M., Brath U., Vrhovac L., Ihalainen J., Karlsson B. G., Orekhov V. & Westenhoff S. 2020. Modulation of Structural Heterogeneity Controls Phytochrome Photoswitching. *Biophysical Journal.* 118: 415–421.
- Heintzen C. 2012. Plant and fungal photopigments. *WIREs Membr Transp Signal.* 1:411–432.
- Klose C., Nagy F. & Schäfer E. 2020. Thermal Reversion of Plant Phytochromes. *Mol Plant.* 13(3):386–397.
- Kreslavski V. D., Los D. A., Schmitt F-J., Zharmukhamedov S. K., Kuznetsov V. V. & Allakhverdiev S. I. 2018. The impact of the phytochromes on photosynthetic processes. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 1859(5):400–408.
- Kurkinen S. 2017. The importance of biliverdin-pyrrole water-histidine interaction in the photoactivation of *Deinococcus radiodurans* phytochrome. Pro-gradu-tutkielma, Jyväskylän yliopisto. <https://jyx.jyu.fi/handle/123456789/53397>
- Kurttila M. 2019. Azido IR-probes: a novel way to study phytochromes. Pro-gradu-tutkielma, Jyväskylän yliopisto. <https://jyx.jyu.fi/handle/123456789/65667>



- Losi A., Viappiani C. & Nonell S. 2010. Photofunctional proteins: from understanding to engineering. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9: 1285.
- Möglich A. 2019. Signal transduction in photoreceptor histidine kinases. *Protein Sci.* 28:1923–1946.
- Nelson D. L. & Cox M. M. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman, New York.
- Rockwell N. C. & Lagarias J. C. 2010. A brief history of phytochromes. *Chemphyschem.* 26; 11(6): 1172–1180.
- Rockwell N. C., Su Y-S. & Lagarias J. C. 2006. Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 837–858.
- Rüdiger W., Thümmel F., Cmiel E. & Schneider S. 1983. Chromophore structure of the physiologically active form (P(fr)) of phytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(20):6244–8.
- Shin A-Y., Han Y-J., Baek A., Ahn T., Kim, S. Y., Nguyen T. S., Son M., Lee K. W., Shen Y., Song P-S. & Kim J-I. 2016. Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nat. Commun.* 7: 11545.
- Stock A. M., Robinson V. L. & Goudreau P. N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 69:183–215.
- Takala H., Edlund P., Ihalainen J. & Westenhoff S. 2020. Tips and turns of bacteriophytochrome photoactivation. *Photochem. Photobiol Sci.* 19:1488–1510.
- Takala H., Lehtivuori H., Hammarén H., Hytönen V. P. & Ihalainen J. A. 2014b. Connection between absorption properties and conformational changes in *Deinococcus radiodurans* phytochrome. *Biochemistry.* 18:53(45):7076–85.
- Takala H., Björling A., Berntsson O., Lehtivuori H., Niebling S., Hoernke M., Kosheleva I., Henning R., Menzel R., Ihalainen J. & Westenhoff S. 2014a. Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors. *Nature.* 509:245–248.
- Takala H., Lehtivuori H., Berntsson O., Hughes A., Nanekar R., Niebling S., Panman M., Henry L., Menzel A., Westenhoff S. & Ihalainen J. 2018. On the (un)coupling of the chromophore, tongue interactions and overall conformation in a bacterial phytochrome. *J. Biol. Chem.* 293:8161–8172.
- Ulijasz A. T. & Vierstra R. D. 2011. Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14(5):498–506.
- Van Der Horst M. A. & Hellinwerf K. J. 2004. Photoreceptor Proteins, “Star Actors of Modern Times”: A Review of the Functional Dynamics in the Structure of

Representative Members of Six Different Photoreceptor Families. *Acc. Chem. Res.* 37:13–20.

Wagner J. R., Brunzelle J. S., Forest K. T. & Vierstra R. D. 2005. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature*. 17:438(7066):325–31.

Yang X., Kuk J. & Moffat K. 2008. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: Photoconversion and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:14715–14720.

**LIITE 1. MUTANTIN (PAS-GAF-PHY ARMLESS CYS) SEKVENSSI**

MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSL  
NAATFLGQEPTVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGSPDALQYRATLDWPAA  
GHLSTVHRVGELLILEFEPTEAWDSTGPHALRNAMFALESAPNLRALAEVAT  
QTVRELTGFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARA  
LYTRHLLRLTADTRAAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRN  
MGVGSSLSVSVVVGGLWGLIACHHQTPYVLPDLRRTTLEYLGRLLSLQVQVK  
EAADVAAFRQSLREHHARVALAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRF  
EGRWQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAA  
GLLAISVGEGWSESLVWLRPELCAEPWHPGEIEEAQDLRDTLTGALEHHHHH  
H