

Monomerisaation vaikutus *Deinococcus radioduransin* fytokromiin

Marko Linna
Pro gradu tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologia
1.4.2014

Alkusanat

Tämä Pro Gradu –tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopiston Matemaattis-luonnontieteellisessä tiedekunnassa Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella. Haluan kiittää työn valmistumisesta ohjaajiani FT Janne Ihalaista, jonka ryhmässä sain työskennellä, sekä FT Heikki Takalaa, jonka ohjaus oli esimerkillistä. Lisäksi haluan kiittää laboratoriomestari FM Alli Liukkosta, joka valmisti useita reagensseja, huolsi tarvittavia laitteita ja antoi käytännön vinkkejä. Haluan myös esittää kiitoksen Bio- ja ympäristötieteen laitoksen välinehuoltajille, jotka takasivat puhtaiden välineiden saannin ja toteuttivat joustavasti erikoistoiveita.

Jyväskylän yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Pro gradu -tutkielman tiivistelmä

Tekijä:	Marko Linna
Tutkielman nimi:	Monomerisaation vaikutus <i>Deinococcus radiodurans</i> fytochromiin
English title:	The Effects of Monomerization on <i>Deinococcus radiodurans</i> Phytochrome
Päivämäärä:	1.4.2014 Sivumäärä: 31 + 2
Laitos:	Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine:	Solu- ja molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja(t):	prof, FT Janne Ihalainen, FT Heikki Takala

Tiivistelmä:

Fytokromit ovat yksi kolmesta fotomorfogeneesiä säätelevistä proteiiniperheistä. Niitä löytyy kasveista, bakteereista ja sienistä. Fytokromit reagoivat ympäristön muuttuviin valaistusolosuhteisiin, ja niiden tehtäviin kuuluvat muun muassa kasveilla siementen kehittymisen ja bakteereilla solusyklin säätely. Luonnossa fytochromi esiintyy homodimeerinä. Fytokromin perusrakenne koostuu kromoforin sisältävästä fotoreseptorialueesta sekä signaalintialueesta, joka välittää tiedon valaistusolosuhteiden muuttumisesta solussa eteenpäin. Tässä tutkielmassa käytetyn *Deinococcus radiodurans* -bakteerin bakteerifytokromin fotoreseptorialueen runko rakentuu Per/Arndt/Sim (PAS) ja cGMP fosfodiesteri-adenyylysiyklasi/Fh1A (GAF) -domeeneista, jotka muodostavat yhdessä kromoforin sitoutumistaskun sisältävän domeenin (*cromophore binding domain*, CBD). CBD:iin on kiinnittynyt tetrapyrroli biliverdiini. Fotoreseptorialueeseen kuuluu lisäksi fytochromiin liittyvä domeeni (*phytochrome-specific domain*, PHY), joka on kiinnittynyt GAF-osaan. Fotoreseptorialue on puolestaan liittynyt histidiinikinaasina toimivaan signaalintialueeseen. Fytokromi toimii luonnossa kytkimenä, jolla on lepotila Pr ja valottunut tila Pfr. Valottuminen tapahtuu, kun Pr-tilaisen fytochromin tetrapyrroli absorboi punaista valoa. Tämän seurauksena tetrapyrrolin muoto muuttuu vaikuttaen samalla koko fytochromin laskostumiseen. Pfr-tilasta fytochromi palautuu takaisin Pr-tilaan joko absorboimalla pitempiä aallonpituuksia tai spontaanisti pimeäpalautumiseksi kutsutussa reaktiossa. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään vaikuttavatko monomerisaatio ja PHY-domeenin lisääminen CBD:n fysikaalisiin ja spektroskopisiin ominaisuuksiin. Tutkimusta varten tuotettiin sekä CBD:n että CBD-PHY:n dimeeri- ja monomeerimuotoa. Fytokromikonstruktit analysoitiin korkean erottelun nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia -mittauksilla sekä UV-VIS -spektroskopiolla. Saaduista tuloksista on havaittavissa, että CBD:n dimeeri- ja monomeerimuotojen välillä on merkittäviä fysikaalisia eroja. Korkean erottelun nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia -mittausten tuloksista voidaan todeta, että monomeerimuodon laskostuminen Pfr -tilassa on mahdollisesti joustavampi kuin dimeerimuodon. Myös monomeerimuodon spektroskooppiset ominaisuudet poikkeavat dimeerimuodon ominaisuuksista. Monomeerimuoto valottuu dimeerimuotoa täydellisemmin Pfr-tilaan, ja pimeäpalautuminen on huomattavasti hitaampaa. PHY -domeenin lisäys CBD:iin muuttaa fytochromin spektroskopisia ominaisuuksia että stabiiliutta. CBD-PHY:n dimeeri- ja monomeerimuodot valottuivat CBD:tä paremmin Pfr-tilaan, ja etenkin monomeerimuodon pimeäpalautuminen on lähes täysin estynyt. Saadut tulokset osoittavat PHY -domeenin olevan kriittinen tekijä CBD:n stabiloinnissa. PHY-domeenin liittäminen CBD:n mahdollistaa viritystilan säilyttämisen, joka on tärkeää tutkittaessa mahdollisia käytännön sovelluksia. Esimerkki mahdollisista käytännön sovelluksista voisi olla punaisella aallonpituudella fluoresoivan proteiinin tuottaminen. Myös monomerisaatiolla on tärkeä rooli CBD:n eri konstruktioiden spektroskooppisessa käyttäytymisessä ja näin ollen voisi olla järkevää painottaa CBD:n monomeerikonstruktioiden tutkimusta.

Avainsanat: Fytokromi, CBD, HPLC-SEC, UV-VIS, monomerisaatio, pimeäpalautuminen

University of Jyväskylä
Faculty of Mathematics and Science

Abstract of Master's Thesis

Author:	Marko Linna
Title of thesis:	The Effects of Monomerization on <i>Deinococcus radiodurans</i> Phytochrome
Finnish title:	Monomerisaation vaikutus <i>Deinococcus radioduransin</i> fytochromiin
Date:	1.4.2014 Pages: 31 + 2
Department:	Department of Biological and Environmental Science
Chair:	Cell- and Molecular Biology
Supervisor(s):	prof, PhD Janne Ihalainen, PhD Heikki Takala

Abstract:

Phytochromes are one of the three protein families regulating photomorphogenesis. They are found in plants, bacteria, cyanobacteria and fungi. Phytochromes react to changes in environment's light conditions and for example they regulate seed germination and control of bacteria cell cycle. In nature phytochromes occur as homodimers. Phytochrome's basic structure consists of chromophore-containing photoreceptor region and signaling region. The signaling region of the phytochrome reacts into alterations of light conditions and transmits information in the cell. The bacterial phytochrome of the *Deinococcus radiodurans*, which was used in this study, consists of the Per/Arndt/Sim (PAS) domain and the cGMP phosphoesterase/adenylcyclase/FhlA (GAF) domain. Together PAS and GAF domains form the chromophore binding domain (CBD) and tetrapyrrole biliverdin is attached to CBD. Photoreceptor region is attached to a histidine kinase signaling region and contains also the phytochrome-related domain (PHY), which is linked to GAF. In nature phytochromes act like switches having two excitation states: Pr and light-activated Pfr. Excitation occurs when tetrapyrrole in Pr form absorbs red wavelengths of light. This causes changes in tetrapyrroles conformation, which affects the folding of the phytochrome. Phytochrome can revert back to Pr by absorbing far-red wavelengths or spontaneously in dark reversion. The aim of this study was to examine whether monomerization and the addition of PHY domain affect the physical and spectroscopical properties of CBD. CBD and CBD-PHY were produced in both di- and monomer forms. High pressure liquid chromatography-size exclusion chromatography and UV-VIS spectroscopy were used to analyze phytochrome constructs. Results indicate that there are significant physical differences between dimer and monomer forms of CBD. High pressure liquid chromatography-size exclusion chromatography results indicate that the folding of the monomer form is more flexible compared to dimer form. Also, the spectroscopical properties of the monomer and dimer forms are different. In contrast to CBD dimer, the excitation of the CBD monomer is more complete and the dark reversion is prolonged. It was also discovered that the addition of PHY domain to CBD changes spectroscopical properties and stability of the protein. Light-activation of CBD-PHY was more complete compared to CBD in mono and dimer forms, and especially the dark reversion of the monomer form was almost completely inhibited. These results verify that addition of PHY domain is critical to stabilize CBD. Therefore, the addition of PHY domain enables preserving the excited state of the protein, which is consequential information in research of practical applications, for example in attempt to produce red-fluorescent protein. Also, due to spectroscopical effects caused by monomerization of CBD constructs, it is reasonable to emphasize the relevance to study CBD monomer constructs.

Keywords: Phytochrome, CBD, HPLC-SEC, UV-VIS, monomerization, dark reversion

Sisällysluettelo

Alkusanat	2
Sisällysluettelo	5
Lyhenteet	6
1. Johdanto	7
1.1 Fytokromin rakenne	7
1.2 Fytokromin fotokonversio	9
1.3 Fytokromin muokkaus mutaatioiden avulla	10
1.4 Fluoresoivan proteiinin tulevaisuuden mahdollisuudet	11
2. Tutkimuksen tavoitteet	12
3. Materiaalit ja menetelmät	12
3.1 CBD-PHY-plasmidin tuotto ja puhdistus	12
3.2 Mutageneesi CDB-PHY-plasmidille	12
3.3 Mutageneesiplasmidien tuotto, puhdistus ja sekvensointi	14
3.4 Proteiinien tuotto.....	14
3.5 Proteiinien puhdistus.....	14
3.6 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia - mittaukset.....	15
3.7 Ultravioletti-näkyvän valon spektroskopia -mittaukset.....	16
4. Tulokset	17
4.1 Proteiinien ekspressiot ja puhdistukset	17
4.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia	17
4.3 Ultravioletti-näkyvän valon spektroskopia.....	21
5. Tulosten tarkastelu	24
5.1 Tuotto ja puhdistus.....	25
5.2 Korkeapaineinen nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia.....	26
5.3 Ultravioletti-näkyvän valon spektroskopia.....	28
6. Yhteenveto	31
7. Lähdeluettelo	32

Lyhenteet

AGE – agarosigeelielektroforeesi, (*agarose gel electrophoresis*)

CBD – kromoforin sitoutumistaskun sisältävä domeeni, (*chromophore binding domain*)

DrBphP – *Deinococcus radiodurans* Bacterial phytochrome

GAF – cGMP fosfodiesteraasi/adenyylysyklaasi/FhlA

HK – histidiinikinaasi, (*histidine kinase*)

HO1 – hemioksygenaasi 1, (*hemioxygenase 1*)

HPLC-SEC – korkean erottelun nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia, (*High pressure (performance) liquid chromatography-size exclusion chromatography*)

SDS-PAGE – natriumdodekyylisulfaatti-polyakryliamidigeelielektroforeesi, (*sodiumdodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

PAS – Per/Arndt/Sim

PHY – fytkromiiniin liittyvä, (*phytochrome related*)

1. Johdanto

Fytokromit ovat yksi kolmesta fotomorfogeneesiä säätelevistä proteiiniperheistä kryptokromien ja fototropiinien lisäksi (ks. yleiskatsaus Rockwell ym., 2006). Fytokromeja esiintyy kaikkien kasvien lisäksi sienistä ja bakteereista. Ne vastaavat eliöiden reagoinnista ympäristön muuttuviin valaistusolosuhteisiin. Näihin kuuluvat muun muassa kasveilla siementen kehittyminen sekä bakteerien solusyklin säätely.

Fytokromien tutkimus on nykyään aktiivinen tutkimusalue, joka on kasvattanut kiinnostustaan useilla eri luonnontieteiden aloilla. Syynä tähän on fytokromien toiminta valoa kaappaavana ja virittyvänä proteiininä, jonka rakennetta muokkaamalla on mahdollista luoda fluoresoivia merkkiaineita, joiden avulla muun muassa kuvantamismenetelmät saivat aivan uusia sovellutuksia.

1.1 Fytokromin rakenne

Fytokromi koostuu yhdestä polypeptidistä, joka muodostaa homodimeerin. Tähän homodimeeriin kromofori sitoutuu kovalenttisesti. Kromofori vaihtelee fytokromiluokittain, mutta on aina tetrapyrroli. Kasveilla kromoforina toimii fytokromobiliini, syanobakteereilla fykosyanobiliini ja bakteereilla biliverdiini (ks. yleiskatsaus Rockwell ym., 2006). Kromofori on yleensä kiinnittynyt polypeptidin kysteiiniin tioesterisidoksella (Wagner ym., 2005). Sitoutuminen tapahtuu autoprotolyttisesti fytokromin sisäisen lyaasiaktiivisuuden avulla.

Fytokromi sisältää kaksi merkittävää funktionaalista aluetta. Toinen on polypeptidin N-päässä sijaitseva fotoreseptorialue. C-päädysssä sijaitsee signaalintialue, jolla on oletettu histidiinikinaasiaktiivisuus. Tällä hetkellä molekyylin tarkka rakenne tunnetaan ainoastaan fotoreseptorialueelle. Vaikka fotoreseptorialueen rakenteissa on eroja eri fytokromiluokkien välillä, löytyy kaikista yhteinen perusrakenne. Tiettyjen aminohappojen konservoituminen tällä alueella on voimakasta myös eri fytokromilajien välillä (ks. yleiskatsaus Rockwell ym., 2006). Tämä osoittaa, että fytokromin normaalin toiminnan kannalta nämä aminohapot ovat muodostuneet välttämättömiksi. Nämä konservoituneet aminohapot liittyvät kromoforin sitoutumiseen.

N-päädyssä ensimmäisenä on Per/Arndt/Sim (PAS) -domeeni. PAS saattaa sisältää proteiinien väliseen signaalointiin liittyviä alueita, joiden avulla proteiini voi polymerisoitua (Kuva 1) (Wagner ym., 2005). Tutkimusten mukaan on lisäksi mahdollista, että PAS sisältää regulaatiokohdan, johon voi sitoutua vielä tuntematon pieni ligandi (Ks yleiskatsaus Braslavsky ym., 1997). PAS:lla ei kuitenkaan ole suoraa roolia fotokonversiossa.

PAS:a seuraa cGMP fosfodiesteriini/adenyylysiyklaasi/FhlA (GAF) -domeeni. GAF muodostaa dimerisaatioalueen, jonka avulla kaksi monomeeriä fuusioituu homodimeeriksi (ks. yleiskatsaus Ulijasz ja Vierstra, 2011). GAF:lla on lisäksi tärkeä rooli kromoforin sitoutumisessa. PAS ja GAF muodostavat yhdessä kromoforin sitoutumiskohdan sisältävän domeenin (*chromophore-binding domain*, CBD), tosin varsinainen sitoutumiskohta vaihtelee fytochromilajien kesken (Davis ym., 1999). Kasvien ja syanobakteerien kromoforin sitoutuminen kysteiniiniin tapahtuu GAF-, ja bakteerifytokromeilla PAS-alueella (ks. yleiskatsaus Ulijasz ja Vierstra, 2011).

PAS- ja GAF-alueiden välissä on proteiineille hyvin harvinainen kahdeksikkorakenne (Wagner ym., 2005). Tämän rakenteen tehtävänä on vakauttaa koko proteiinin rakennetta (Noack ym., 2007). Tämä solmukohta on myös heikossa vuorovaikutuksessa GAF:a seuraavan fytochromin (*phytochrome-related*, PHY) domeenin kanssa (Ulijasz ym., 2008). PHY:n tehtävänä on stabiloida kromoforin konformaatiomuutoksia sekä johtaa signaali CBD-yksiköstä histidiinikinaasiin (*histidine kinase*, HK). Stabilointi vaikuttaa kromoforin spektroskopisiin ominaisuuksiin, ja GAF ja PHY domeenipari onkin merkittävin kromoforin ja fytochromin spektroskopiseen käyttäytymiseen vaikuttava tekijä. (Fischer ja Lagarias, 2004; Yoon ym., 2008).

C-päädyssä sijaitsee tällä hetkellä tuntematon rakenne, jonka kuitenkin on osoitettu olevan histidiinikinaasi (Bhoo ym., 2001; Yeh ja Lagarias, 1998). Toisaalta on esitetty, että joillain fytochromilajeilla kyseessä olisi histidiinikinaasin sijasta seriini-/threoniinikinaasi (Hennig ja Schafer, 2001). Kinaasiosa toimii varsinaisena signaalintyökaluna, jonka avulla muutokset ympäristössä välittyvät solulle. On myös havaittu, että joissain

tapauksissa histidinikinaasin kaltainen alue CBD:n ja proteiinikinaasin välissä voi toimia dimerisaatioalueena (Noack ym., 2007).

1.2 Fytokromin fotokonversio

Fytokromilla on kaksi eri konformaatiota: inaktiivinen perustila (Pr) sekä biologisesti aktiivinen tila (Pfr). Toisaalta on olemassa muutamia poikkeuslajeja, jossa Pfr-muoto on inaktiivinen ja Pr aktiivinen (ks. yleiskatsaus Ulijasz ja Vierstra, 2011). On myös olemassa fytokromeja, jotka virittyessään siirtyvät Pfr-tilan sijasta Pnr-tilaan, jossa absorptiomaksimi on Pfr-tilaa lyhyemmällä aallonpituuksilla (Yang ym., 2007).

Fytokromi toimii siis kytkimenä, joka aktiivisena syöttää valon aiheuttamaa signaalia solulle. Yksittäinen fytokromi on aina joko Pr- tai Pfr-tilassa. Solun signaloinnin hienosäätö tapahtuu kuitenkin solun yksittäisten fytokromien yhteisvaikutuksesta. Signaali riippuu Pr/Pfr-suhteesta.

Fotokonversiossa fytokromin konformaatiomuutos aiheutuu CBD:ssä sitoutuneena olevan kromoforin konformaation muutoksesta. Bakteerifytokromeilla kromoforina yleisesti olevan nelirenkaisen biliverdiinin D-rengas kiertyy valottuessaan C15-C16 kaksoissidoksessaan (Auldridge ym., 2012). Tätä isomerisaatiota seuraavat hyvin lyhytikäiset, picosekunnin aikaskaalassa muodostuvat välituotteet Lumi-R*, Lumi-R ja Meta-R_c. Näiden välituotteiden kautta fytokromi siirtyy Pfr-tilaan. C15-C16 -isomerisaation lisäksi merkittävä tekijä biliverdiinin konformaatiomuutoksessa on välituotteiden deprotonisaatio- ja uudelleenprotonisoitumisreaktiot.

Valottuneessa Pfr-muodossa fytokromin absorptiomaksimi liikkuu pidemmille aallonpituuksille. Kun Pfr-tilassa oleva fytokromi altistuu uuden absorptiomaksimin mukaiselle valolle, fytokromi käy läpi konformaatiomuutoksen Pfr:stä takaisin Pr-tilaan. Tällä tavoin fytokromit pystyvät vastaamaan nopeasti ympäristön muuttuviin valaistusoloihin (Auldridge ym., 2012).

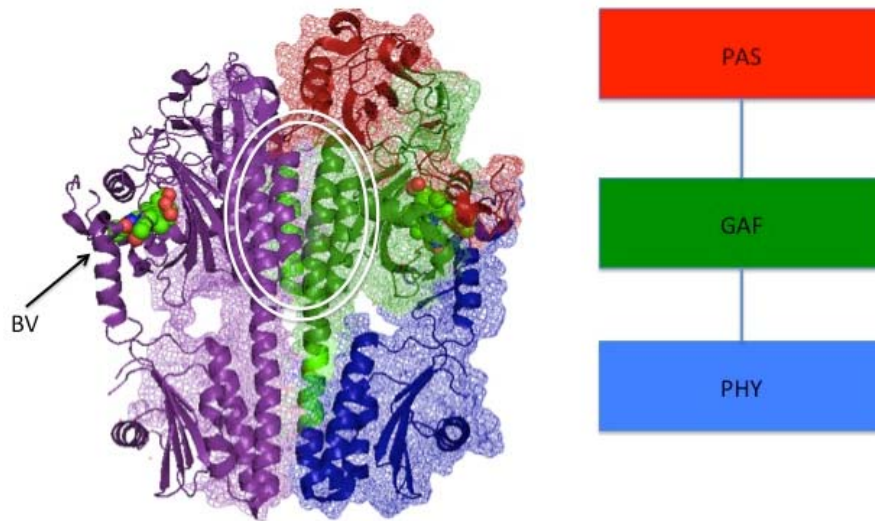
Signaloinnin hienosäätelyä lisää fytokromien kyky pimeäpalautumiseen (*dark reversion*). Pimeäpalautumisessa fytokromit palautuvat hiljalleen Pfr-tilasta Pr-tilaan myös silloin, kun oikea-aallonpituuksista valoa ei ole saatavilla. Pimeäpalautumisen tarkoituksena on

ehkäistä fytokromien liiallinen signaali kohdesoluihin ympäristön nopeassa muutoksessa (ks. yleiskatsaus Rockwell ym., 2006). Kaikilla fytokromeilla tapahtuu pimeäpalautumista. Sen nopeus vaihtelee eri lajien kesken. Kasvifytokromin pimeäpalautuminen on vähäistä, johtuen proteiinin N-päädystä olevasta P1-alueesta, jonka tehtävänä on juurikin ehkäistä pimeäpalautuminen (ks. yleiskatsaus Rockwell ym., 2006).

1.3 Fytokromin muokkaus mutaatioiden avulla

Fytokromien muokkaus mutaatioiden avulla auttaa ymmärtämään valon aiheuttaman konversion proteiinissa paremmin ja samalla mahdollistaa paremmin fluoresoivien proteiinien tuottamisen. Eri fytochromilajien väliset erot voivat olla hyvinkin suuret, mutta esimerkiksi bakteerifytokromien välillä esiintyy runsaasti konservoituneita alueita. Kun näihin alueisiin kohdennetaan mutaatioita, on tuloksena saatu muun muassa aikaisempaa huomattavasti voimakkaammin fluoresoivia proteiineja, joiden signaalintyky on alentunut (Fischer ja Lagarias, 2004; Auldrige ym., 2012).

Dimeerimuotojen tutkimisen lisäksi on siirrytty monomeerien tutkimiseen. Koska fytochromit esiintyvät luonnossa homodimeerinä, tarjoaa yksittäisen monomeerin tutkiminen uusia näkökulmia ymmärtää fytochromien fotokonversiota. Fytokromien monomerimuotojen tutkiminen kiihtyi *Deinococcus radiodurans*:n bakteerifytokromin (*Deinococcus radiodurans* Bacterial phytochrome, DrBphP) CBD:n korkearesoluutioisen rakenteen selvittyä (Wagner ym., 2007). Monomerisaatio saadaan aikaan muutamalla kohdistetulla mutaatiolla dimerisaatioalueen aminohappoihin (Kuva 2) (Auldrige ym., 2012).



Kuva 1 - CBD-PHY:n dimeerimuoto. Kuvassa on esiteltyä eri proteiinin eri domeenit sekä biliverdiini (BV). Dimerisaatioalue on ympyröitynä. Proteiinin rakenteen PDB-koodi on 3NHQ (Yang ym., 2011). Proteiinin malli on tehty MacPyMol -ohjelmalla.

1.4 Fluoresoivan proteiinin tulevaisuuden mahdollisuudet

Fytokromitutkimuksella on suuret päämäärät. Eräänä merkittävänä tavoitteena on saada paranneltua jo kehitettyä fluoresoivaa proteiinia, joka toimii punaisilla aallonpituuksilla toisin kuin nykyiset fluoresoivat proteiinit. Tämä proteiini toimisi kuten vihreä fluoresoiva proteiini, ja sen luominen tarjoaisi tutkimukselle ja teknologialle runsaasti sovellusmahdollisuuksia. Esimerkiksi elävien solujen kuvantamismenetelmät paranisivat huomattavasti (Shu ym., 2009).

Tärkeässä roolissa punaisen fluoresoivan proteiinin tuottamisessa on täysimittaisen fytokromin sijasta CBD. Tämä on loogista, koska fotonien sieppaaminen tapahtuu CBD:ssä olevan kromoforin kautta. CBD:n tapauksessa onkin siis pyrittävä muokkaamaan proteiinia siten, että elektroninen viritystila saataisiin kestävämpään pitkään. Tämän lisäksi oleellista on, että absorboitunut fotonien energia ei kuluisi konformaatiomuutokseen Pr-tilasta Pfr-tilaan, vaan se virittäisi molekyylin korkeammille energiatasoille aiheuttaen fluoresenssin. Tutkimuksissa on löydetty jo useita mutaatiokohteita, joiden seurauksena CBD on saatu fluoresoimaan punaista (Auldridge ym., 2012; Davis ym., 1999).

2. Tutkimuksen tavoitteet

Tässä tutkimuksessa pyrittiin selvittämään DrBphP:n eri konstruktioiden fysikaalisia ominaisuuksia fotokonversion aikana. Tutkimuksesta voidaan nostaa esille kolme pääkohtaa. Vaikuttaako PHY-domeenin lisäys CBD:hen merkittävästi fotokonversioon ja pimeäpalautumiseen? Vastaavasti haluttiin tutkia, onko fotokonversion dynamiikassa eroa dimeeri- ja monomeerikonstruktiin välillä. Tutkimuksen kolmantena tavoitteena oli tuottaa CBD-PHY-konstruktista monomeerikonstrukti. Oli selvitettävä, toimiiko CBD:n monomerisoinnissa käytetyt mutaatiot myös CBD-PHY:n monomerisaatioon.

3. Materiaalit ja menetelmät

3.1 CBD-PHY-plasmidin tuotto ja puhdistus

BL21(DE3)-solut, joihin oli transformoitu CBD-PHY:n geenin sisältävä pET21B plasmidi (Wagner ym., 2007), otettiin glyserolistokista pipetin kärjellä raapimalla, ja siirrostettiin 10 ml kasvatusputkeen, jossa oli 5 ml Luria Bertani -lientä ja ampicilliinia 150 µg/ml. Kasvatettiin ravistelijassa yön yli +37°C, 200 rpm.

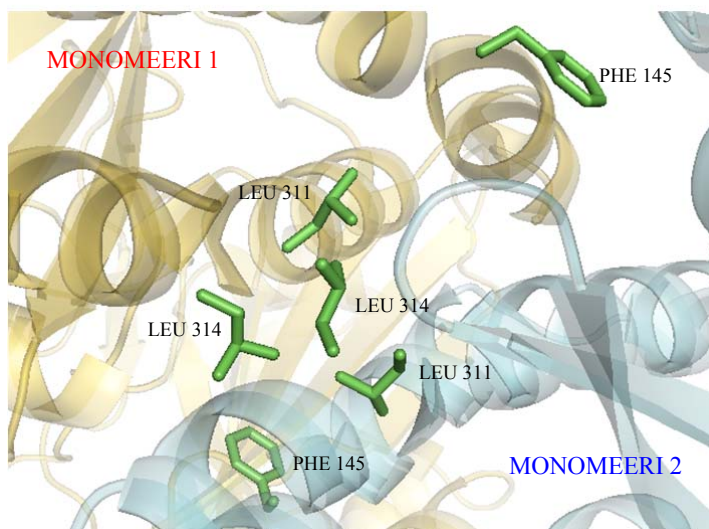
Seuraavana päivänä CBD-PHY-plasmidit puhdistettiin käyttämällä GenElute HP Plasmid Miniprep Kit -puhdistustarvikkeita (Sigma-Aldrich, cat: NA0150-1KT, lot: 021M6115). Saatujen näytteiden puhtaus ja konsentraatio tarkastettiin spektrofotometrisesti NanoDrop ND-1000:lla (Finnzymes) (Taulukko 1) sekä agarosigeelielektroforeesilla (*agarose gel electrophoresis*, AGE).

3.2 Mutageneesi CBD-PHY-plasmidille

Puhdistetuille CBD-PHY-plasmideille tehtiin mutaatiot dimerisaatioalueelle (Kuva 2) käyttämällä mutageneettisiä alukkeita, joiden sekvenssit ovat seuraavat (mutaatiot aiheuttavat kodonit tummennettu):

DrBphP F145S - 5'-ctg cgc aac gcg atg **tca** gcg ctc gaa agt gc-3'

DrBphP L311E/L314E - 5'-ctc gaa tac ctg ggc cgc **gag** ctg agc **gag** caa gtt cag gtc-3'



Kuva 2 - CBD:n dimerisaatioalue. Monomerisaatiomutaatioissa käytetyt kohdeaminohapot on esitetty tikkumallina. Käytetyn proteiinin rakenteen PDB -koodi on 2O9C (Wagner ym., 2007). Proteiinin malli on tehty MacPyMol -ohjelmalla.

Mutageneesiin käytettiin QuickChange Lightning Multi Site Directed Mutagenesis Kit -tarvikkeita (Agilent Technologies, cat: 210513-5, lot: 0006119714). Mutageneesi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti käyttämällä QuickSolution:a 0,8 µl kaikissa näytteissä jotka sitä vaativat. Tämän lisäksi templaatin määrää nostettiin 300 ng:an.

PCR -laitteena oli Bio-Rad Laboratories:n MyCycler thermal cyler, ja ajo suoritettiin seuraavin parametrein:

Segmentti	Syklit	Lämpötila (°C)	Aika
1	1	95	2 min
2	30	95	20 sek
		55	30 sek
		65	5 min
3	1	65	5 min

Saatu mutageneesituote transformoitiin mutageneesitarvikkeisiin kuuluviin XL10-Gold-soluihin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Ohjeista poiketen käytettiin tavallisia 1,5 ml Eppendorf-putkia, reaktioseokseen lisättiin 4 µl mutageneesituotetta ja maljoille maljattiin 200 µl transformaatiotuotetta. Maljoja kasvatettiin yön yli +37°C.

3.3 Mutageneesiplasmidien tuotto, puhdistus ja sekvensointi

Transformaatiomaljoilta kerättiin 12 erillispesäkettä 10 ml kasvatusputkiin, jotka sisälsivät 5 ml Luria Bertani -lientä sekä ampicilliinia (150 µg/ml). Soluja kasvatettiin yön yli +37 °C, 200 rpm. Seuraavana päivänä plasmidit puhdistettiin kuten yllä. Mitattiin plasmidien konsentraatio ja ajettiin AGE. Plasmidien sekvensointi suoritettiin käyttämällä BigDye Terminator V3.1-kittiä (Applied Biosystems, cat: 4337455).

Reaktioseokset valmistettiin ja puhdistettiin valmistajan ohjeiden mukaisesti. Sekvensointi suoritettiin AbiPrism 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi) -laitteistolla.

3.4 Proteiinien tuotto

Proteiinien tuotto tapahtui transformoimalla puhdistettu CBD, CBD-mono tai CBD-PHY-mono-plasmidi sekä hemioxygenaasia tuottava HO1-plasmidi BL21(DE3)-soluun. Transformaatiomaljoilta saaduista pesäkkeistä tehtiin pieni 5 ml nestekasvatus, joita kasvatettiin yön yli 200 rpm, +37 °C.

Seuraavana päivänä pienestä kasvatuksesta siirrostettiin 8*500 ml:aan tuoretta Luria Bertani -lientä, 1 ml jokaiseen. Annettiin kasvaa 200 rpm, +32°C. Kasvun etenemistä seurattiin spektrofotometrisesti. Kasvatusta jatkettiin, kunnes absorbanssi saavutti arvon $A_{550nm} \approx 0,6$. Tämän jälkeen kasvatusliuoksiin lisättiin isopropyli-beta-D-tiogalactopyranisidia (IPTG) loppupitoisuuteen 1 mM, ja inkubointia jatkettiin yön yli valolta suojattuna 200 rpm, +28 °C.

Kasvatuksen jälkeen bakteerit pelletoitettiin sentrifugoimalla. Sentrifugina käytettiin Sorvall RC 6+ (Thermo Scientific). Supernatantti poistettiin ja bakteeripelletti resuspensoitiin 13 ml (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH=8) ja siirrettiin mustiin 50 ml putkiin. Sentrifugoitiin uudelleen käyttäen Megafuge 1.0R:ä (Heraeus). Poistettiin supernatantti ja uudelleensuspensoitiin 10 ml (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH=8). Säilytettiin -80°C.

3.5 Proteiinien puhdistus

Bakteerisuspensio sulatettiin vesihauteella ja lisättiin 10 ml (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH=8). Lisäksi lisättiin 15 ml halkaisijaltaan 0,1 mm lasihelmiä (0,1 mm Glass Bead, ImmunoDiagnostic Oy, cat:13118-400). Putket kiinnitettiin ravistelijaan ja ravisteltiin täydellä teholla +4 °C, 2 h. Sentrifugoitiin 6000 rpm, +4 °C, 30 min (Sorvall RC 6+ -

sentrifugi, roottorina FiberLite F21-8x50y, Piramoon Technologies Inc.) ja kerättiin supernatantti. Sentrifugoitiin uudelleen 20000 rpm, +4 °C, 30 min. Kerättiin supernatantti ja lisättiin joukkoon ~10 mg biliverdiiniä (Biliverdin-hydrochloride, Frontier Scientific, cat: B655-9, lot: VY11-5682). Säilytettiin +4°C.

Ensimmäinen puhdistus suoritettiin käyttämällä affiniteettikromatografiaa. Laitteena oli ÄKTA Prime ja affiniteettipylväänä käytettiin HisTrap FF crude (GE Healthcare, cat: 17-5286-01, lot: 10029903). Näytteen latauksessa käytettiin (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM Imidazoli, pH=8) ja eluoinnissa (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 500 mM Imidazoli, pH=8).

Toinen puhdistus tapahtui geelisuodatuksella. Laitteena oli ÄKTA Prime ja pylväänä käytettiin HiLoad Superdex 200 26/60 (GE Healthcare, cat: 17-1071-01, lot: 1000972). Affiniteettikromatografiapuhdistettu näyte konsentroitiin käyttämällä Amicon Ultra-15 Ultracell-10K-suodattimia (Millipore, cat: UFC901024). Konsentroidu näyte laimennettiin ~5 ml käyttämällä 10 ml (20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH=8). Näyte ajettiin geelipylvään läpi ja kerättiin puhdistettu proteiini. Saatu näyte konsentroitiin vielä ~1 ml tilavuuteen.

Saadusta näytteestä mitattiin absorbanssi NanoDrop:lla. Mittauksissa tarkasteltiin aallonpituuksia 280 nm ja 700 nm. Konsentraatiolaskuissa käytettiin A280:n molaarisena absorptiokertoimena $\epsilon=32430$ CBD:n dimeerille sekä monomeerille, ja $\epsilon=73910$ CBD-PHY:n dimeerille sekä monomeerille. Tuotteet jaettiin 50 μ l eriin, jäädytettiin nestetyypellä ja varastoitiin -80 °C.

3.6 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia-mittaukset

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-geelisuodatus (*High pressure (performance) liquid chromatography-size exclusion chromatography*, HPLC-SEC) -mittauksissa käytettiin Shimadzun SPD-MI0A VP-detektoria sekä LC-20AT-pumppua. Geelikromatografiapylväänä käytettiin Yarran 3U SEC-3000:sta, jota ennen näyte kulki Security Guard-suodattimen läpi. Ennen ajoa näytteet suodatettiin käyttämällä Millipore Durapore PVDF 0,22 μ m-suodattimia (ref#:UFC30GV00, lot#:R1SA5517).

Suodattaminen tapahtui suodattimen ohjeiden mukaisesti, sentrifugoimalla 13000 rpm, 3 min.

Ajopuskurina käytettiin (30 mM Tris, pH=8,0). Virtausnopeudeksi säädettiin 1 ml/min. Varsinaisia näytteitä ennen ajettiin 10 µl standardi (HPLC-SEC Column Performance Check, Phenomenex, lot#: AL0-3042). Standardinäytteestä saatujen tulosten perusteella piirrettiin standardisuora, jonka avulla laskettiin näyteproteiinien suhteellinen massa. Tämän jälkeen näytteiden mittaaminen suoritettiin seuraavalla tavalla: Näytteet laimennettiin 5-6 mg/ml konsentraatioon. 5 µl näyte ajettiin läpi, saaden perustilassa olevan näytteen arvot. Tämän jälkeen näytettä valotettiin 655 nm LED-valolla 15 min, jonka jälkeen ajo (5 µl) välittömästi. Edelleen näytettä valotettiin 780 nm valolla 15 min, jonka jälkeen ajo (5 µl) suoritettiin välittömästi.

Mittauksissa ilmeni tuntemattomia ongelmia, joiden seurauksena näyteproteiinit jäivät kiinni pylvääseen. Pylvästä yritettiin puhdistaa valmistajan ohjeiden mukaisesti, ilman mainittavaa tulosta. Tämän seurauksena HPLC-SEC-mittaukset pystyttiin suorittamaan kunnolla ainoastaan CBD:n monomeerille. CBD:n dimeerin tulokset otettiin vertailuun Heikki Takalan aikaisemmin tekemistä mittauksista. CBD-PHY:lle HPLC-SEC-mittauksia ei saatu suoritettua.

3.7 Ultravioletti-näkyvän valon spektroskopia -mittaukset

Kaikki mittaukset suoritettiin käyttämällä Perkin-Elmer Lambda 850 UV-VIS -spektrofotometriä. Näytteet laimennettiin (30 mM Tris, pH=8) $\approx 0,12$ mg/ml konsentraatioon. Mittaukset tehtiin aallonpituusalueella 250-850 nm. Mittauksien suoritus tehtiin alla olevan protokollan mukaisesti.

Laitteen pohjaviiva mitattiin käyttämällä laimennuspuskuria (30 mM Tris, pH=8). Pimeässä säilytetty, perustilainen näyte mitattiin peräkkäin kahteen kertaan. Näytettä valotettiin 655 nm valolla 15 min, mitattiin tänä aikana aikapisteissä 1 min, 5 min, 10 min ja 15 min. Näytettä valotettiin 780 nm valolla 15-30 min, mitattiin tänä aikana aikapisteissä 5-30 min, 5 min välein. Näytettä valotettiin uudelleen 655 nm valolla 15 min, jonka jälkeen valotus lopetettiin. Mitattiin pimeäpalautumista aikapisteissä 0, 2, 4, 8, 16, 24, 48 min...16 h, näytteestä riippuen.

4. Tulokset

4.1 Proteiinien ekspressiot ja puhdistukset

Puhdistettujen proteiinkonstruktien konsentraatiot mitattiin ja taulukoitiin (Taulukko 1). Kuten taulukosta voidaan huomata, CBD:n dimeeri- ja monomeerimuotoja saatiin puhdistettua tehokkaasti. Myös A700/A280 –suhde osoittaa tuotteen olevan puhdasta. CBD-PHY:n dimeeri- ja monomeerimuotojen saanto on huomattavasti heikompi. Myös puhtausaste on selvästi heikompi.

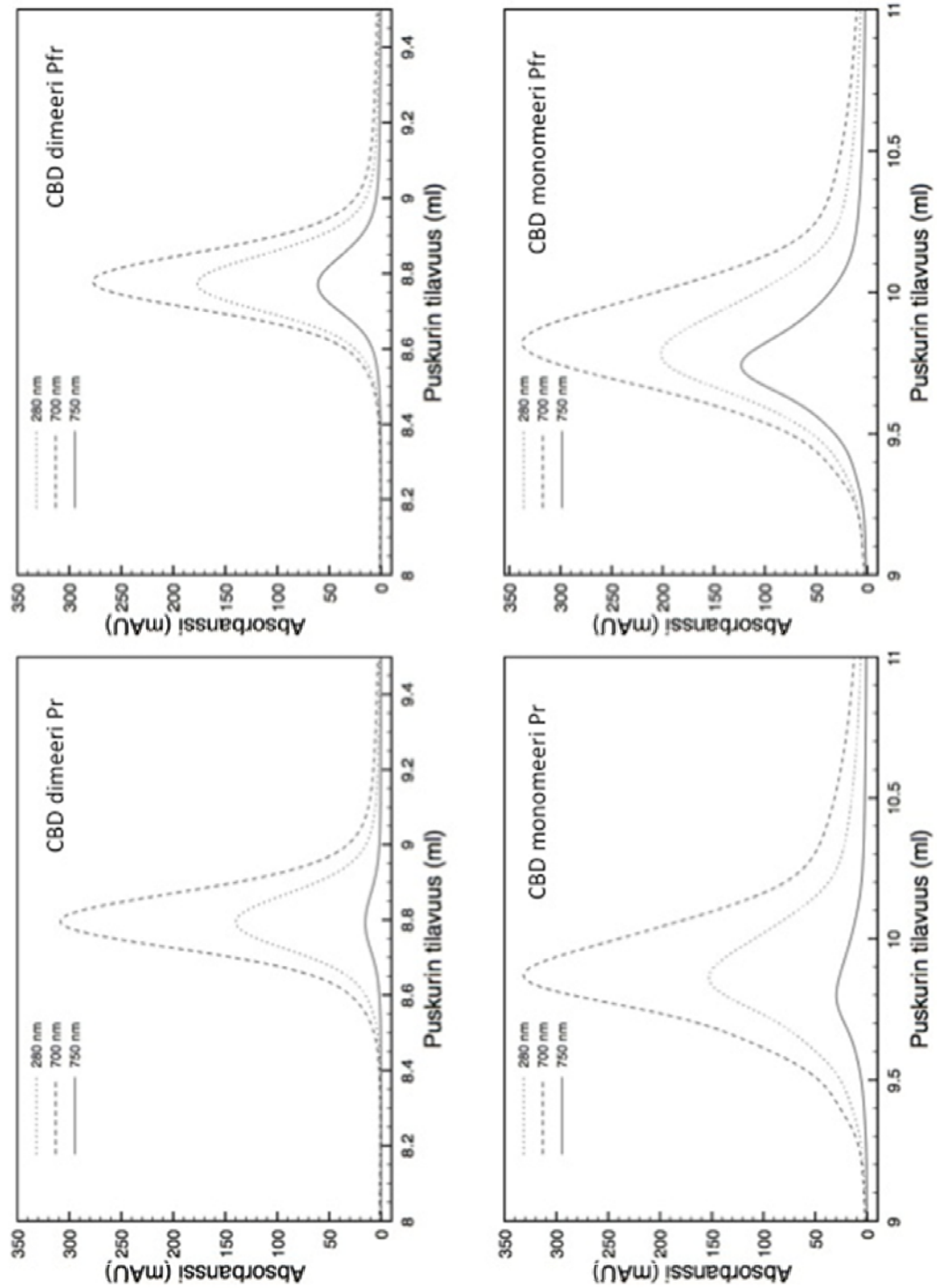
Taulukko 1-CBD:n eri konstruktien konsentraatiot puhdistuksen jälkeen.

Konstrukti	Konsentraatio (mg/ml)	A700/A280	Kokonaistuotto (μ l)
CBD dimeeri 1	40	2,3	1000
CBD dimeeri 2	46	2,3	1000
CBD monomeeri 1	54	2,3	1200
CBD monomeeri 2	55	2,3	1200
CBD-PHY dimeeri 1	29	1,1	400
CBD-PHY monomeeri 1	11	1,1	400

4.2 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia HPLC-SEC -mittauksista saatiin CBD:n dimeerille ja monomeerille oheiset tulokset (Kuva 3). On huomattava, että dimeerin mittaukset ovat Heikki Takalan tekemiä. Käytetyt mittausparametrit, pylväät ja standardit ovat samat, joten tulokset ovat keskenään vertailukelpoisia.

Tuloksia tarkastellessa merkittävimpana huomiona voidaan pitää absorbanssieroa 750 nm aallonpituudella CBD:n dimeerin ja monomeerin Pfr-tilojen välillä. Ennustetusti molempien konformaatioiden Pfr-tiloissa absorbanssi 750 nm aallonpituudella on Pr-tilaa suurempi. Kuitenkin voidaan havaita, että monomeerikonstruktiin Pfr-tilassa absorbanssi 750 nm aallonpituudella on huomattavasti voimakkaampaa kuin dimeerikonstruktilla.

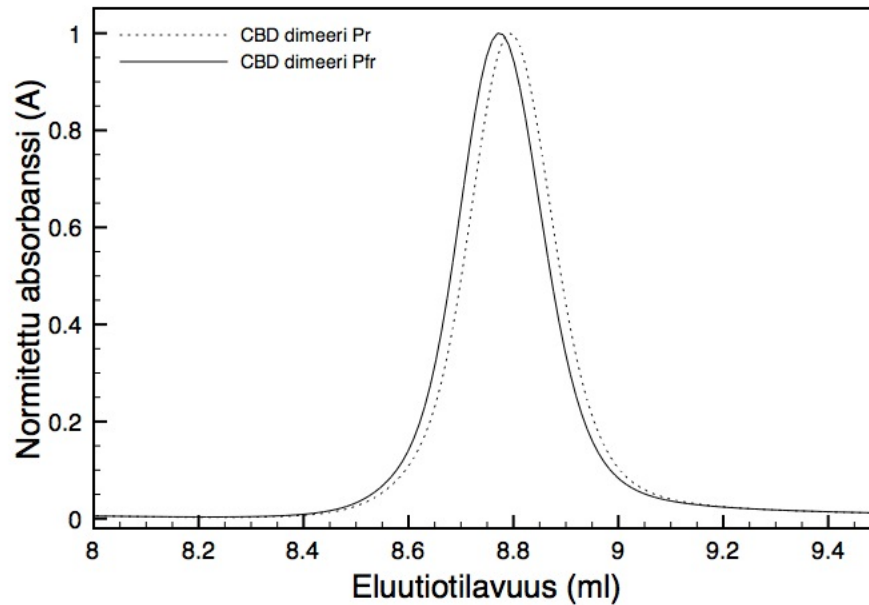
Huomattava on myös, että absorbanssi 700 nm aallonpituudella ei merkitsevästi muutu kummallakaan konstruktilla siirryttäessä Pr-tilalta Pfr-tilalle.



Kuva 3 - CBD:n dimeerin ja monomeerin HPLC-SEC ajot. Kuvaajat esittävät absorbanssin tärkeimmillä aallonpituuksilla eluutiotilavuuden funktiona.

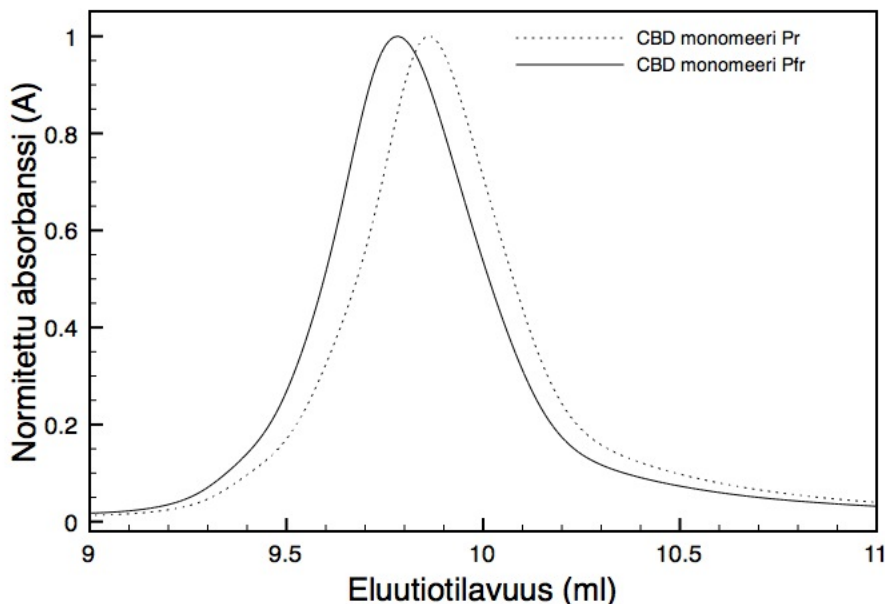
CBD:n dimeerimuodon absorbanssikäyrä mitattiin aallonpituudella 280 nm sekä Pr- että Pfr -tilassa (Kuva 4). Näin saatiin selvitettyä, onko fotokonversiolla vaikutusta proteiinin

rakenteeseen. Tulokset on selvytyden vuoksi normalisoitu suurimpien arvojen mukaan. Kuten huomataan, Pr- ja Pfr-tilan absorbanssimaksimit tulevat hieman eri eluutiivilavuuksissa. Tämä tarkoittaa, että proteiinin konformaatiossa on tapahtunut muutoksia, jotka aiheuttavat CBD:n näennäisen koon muuttumisen. Muutos ei kuitenkaan ole erityisen merkittävä.



Kuva 4 - CBD:n dimeerin kromatogrammi sekä Pr- että Pfr -muodossa detektoituna aallonpituudella 280 nm. Kuvaajat normalisoitu suurimman arvon mukaan.

CBD:n monomeerimuodolle tehtiin vastaavat kuvaajat (Kuva 5). Kuten voidaan huomata, monomeerimuodolla eluutiivilavuuden muutos on huomattavasti dimeerimuodon muutosta suurempi (Kuva 4). Molemmilla CBD:n muodoilla muutos on samansuuntainen. Proteiini näyttää HPLC-SEC:n kautta tarkasteltuna Pfr-tilassa suuremmalta verrattuna Pr-tilaan. Monomeerimuodolla tämä näennäinen koon muutos on kuitenkin huomattavasti suurempi.



Kuva 5 - CBD:n monomeerin kromatogrammi sekä Pr- että Pfr -muodossa detektoituna aallonpituudella 280 nm. Kuvaajat normalisoitu suurimman arvon mukaan.

Edellä esiteltyjen havaintojen perusteella laskettiin CBD:n dimeeri- ja monomeerimuodon piikkien eluointinopeus suhteessa standardisuoraan, ja verrattiin eroja Pr- ja Pfr-tilan välillä (Taulukko 2).

Taulukko 2 - CBD:n dimeeri- ja monomeerimuodon eluoinnin absorbanssi- ja eluointinopeudet HPLC-SEC -ajosta. Taulukossa on laskettu standardinäytteiden perusteella konstruktien suhteelliset molekyylipainot.

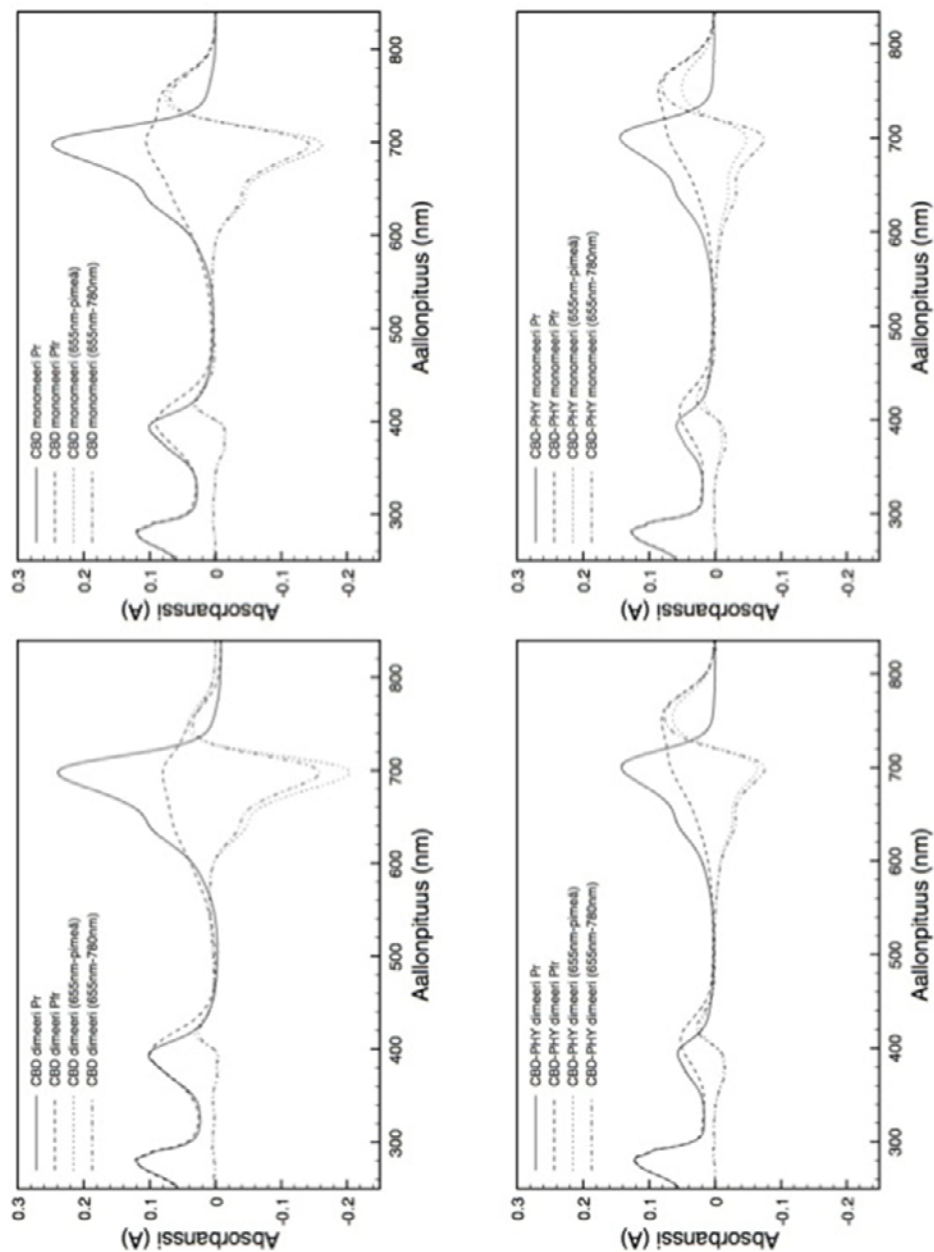
	Pr	Pfr	Pr-Pfr
CBD dimeeri (ml)	8,79	8,77	0,02
CBD dimeeri (kDa)	58,8	60,0	1,2
CBD monomeeri (ml)	9,86	9,78	0,08
CBD monomeeri (kDa)	26,4	28,2	1,8

Lasketut arvot tukevat aikaisemmin tehtyjä havaintoja (Kuvat 4 ja 5). Dimeerimuodolla Pr- ja Pfr-tilan välinen eluointilavuusero oli 0,02 ml. Tämä tarkoittaa näennälistä 1,2 kDa:n painoeroa. Monomeerimuodolla vastaavat arvot ovat 0,08 ml ja 1,8 kDa.

Monomeerimuodolla näennäinen painon muutos on siis 50% suurempi. Toisaalta pitää huomata, että monomeerimuoto on massaltaan 50% dimeerimuotoa pienempi.

4.3 Ultravioletti-näkyvän valon spektroskopia

UV-VIS-spektroskopiamittauksilla saatiin tulokset CBD:n dimeeri- ja monomeerimuodoille, jotka on esitetty alla (Kuva 6). Mittaustuloksista laskettiin lisäksi erotusspektrit pimeässä olleen Pr -näytteen ja 655 nm valolla valotetun Pfr -näytteen sekä 780 nm valotetun Pr -näytteen ja 655 nm valotetun Pfr -näytteen erotuksista

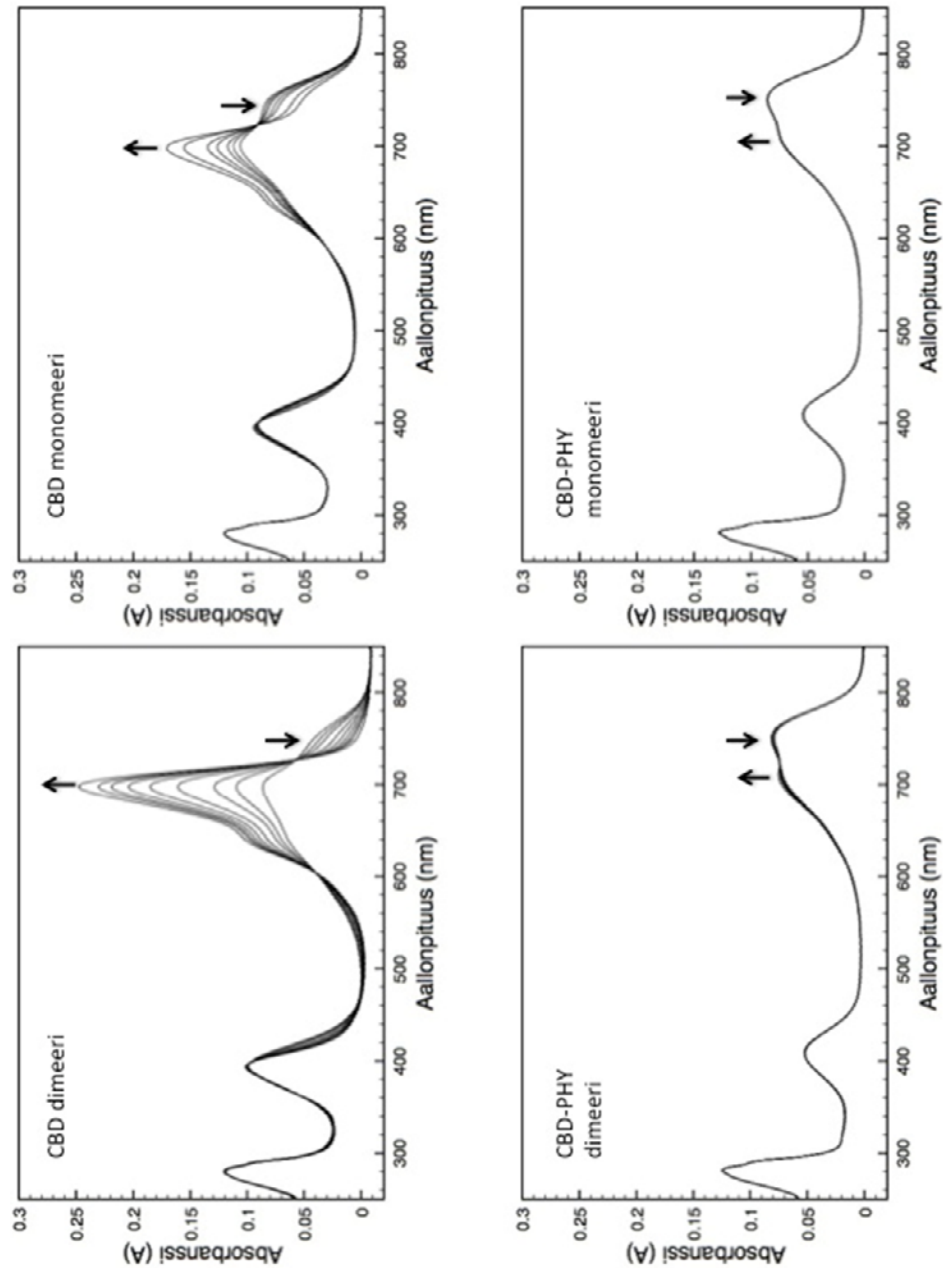


Kuva 6 - CBD:n eri konstruktioiden UV-VIS -mittaukset. Lisäksi on esitettyä absorptierotusspektrit: 655nm-pimeässä ollut näyte ja 655nm-780nm.

Kuvaajista voidaan huomata, että Pfr-tilan absorptio 750 nm aallonpituudella kasvaa järjestelmällisesti CBD:n dimeerin piikin ollessa matalin ja CBD-PHY:n monomeerin ollessa korkein (Kuva 6). CBD-PHY:n konstruktilla siirtyminen Pfr-tilaan on siis täydellisempää kuin CBD:n konstruktilla.

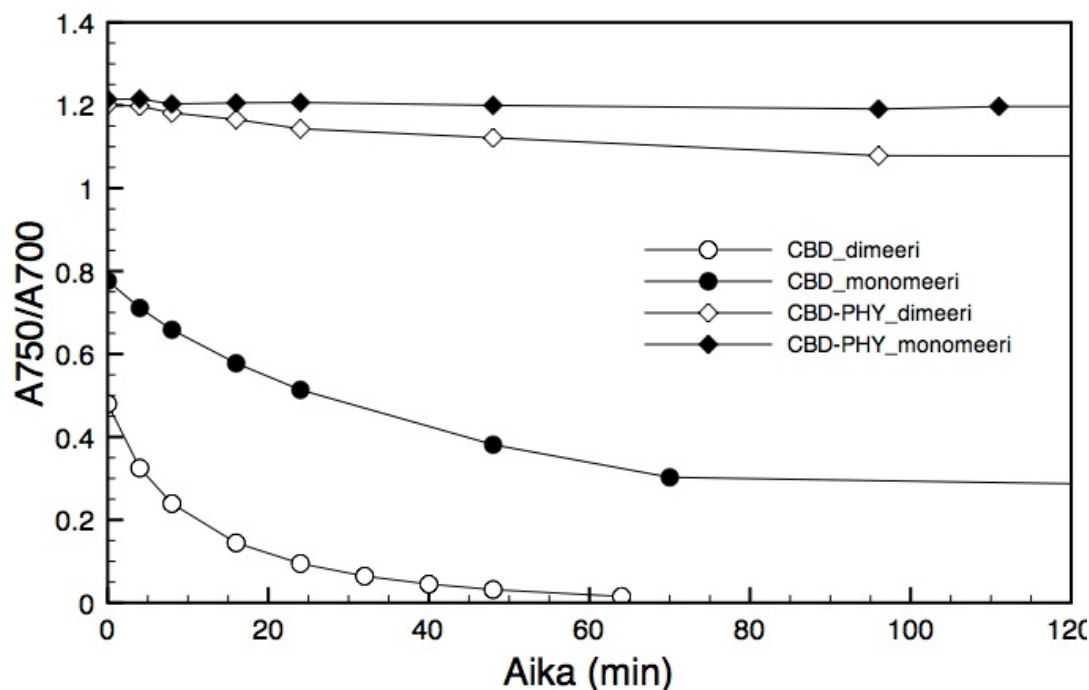
Toinen merkittävä havainto liittyy differentiaalikuvaajiin. Myös niiden suhteen on havaittavissa trendi, jossa CBD:n dimeerimuodolla pimeässä ollut näyte on täydellisemmin Pr-tilassa kuin Pr-tilaan valotettuna, kun taas CBD-PHY:n monomeerimuodolla Pr-tila saadaan täydellisemmin valotuksen avulla.

Pimeäpalautumista seurattiin 16 tunnin ajan. Kahden ensimmäisen tunnin ajalta otetuista mittauspisteistä tehtiin kuvaajat (Kuva 7). Lisäksi luotiin kuvaaja, jossa on esitetty pimeäpalautumisen eteneminen seuraamalla absorbanssiarvojen suhteita aallonpituuksilla 700 nm ja 750 nm (Kuva 8).



Kuva 7 – CBD:n eri konstruktien pimeäpalautuminen UV-VIS –spektroskopiolla mitattuna. Mittausten aikapisteet olivat CBD:n dimeerillä 0,4,8,16,24,32,40,48 ja 64 min, monomeerilla 0,4,8,16,24,48 ja 70 min sekä CBD-PHY:n konstrakteilla 0, 4, 8, 16, 24, 48 ja 96 min. Nuolilla on esitetty piikkien nousu/lasku pimeäpalautumisen edetessä.

CBD-PHY:n molemmat muodot erottuvat selkeästi, koska niillä pimeäpalautumista ei tapahdu lähes laisinkaan (Kuva 7). Myös CBD:n monomeerimuodon pimeäpalautuminen on CBD:n dimeerimuotoon verrattuna hitaampaa.



Kuva 8 – CBD:n eri konstruktien pimeäpalautuminen kuvattuna A750/A700 suhteen ajan funktiona.

Kuva 8 selkeyttää saatuja pimeäpalautumiskuvaajia (Kuva 7). Voidaan havaita, että CBD-PHY:n konstruktit säilyvät Pfr-tilassa lähes täydellisesti (Kuva 8). CBD:n monomeerin palautuminen on nopeampaa. CBD:n dimeerinäyte palautui täydellisesti Pr-tilaan n. tunnin kuluttua valotuksesta.

5. Tulosten tarkastelu

Tässä tutkimuksessa kerättiin tulokset CBD:n dimeerin ja monomeerin käyttäytymisestä HPLC-SEC:ssä sekä CBD:n ja CBD-PHY:n dimeerin ja monomeerin spektroskopisista ominaisuuksista ja stabiilisuuksista.

CBD:n dimeerin ja monomeerin välille saatiin selvä ero sekä HPLC-SEC:ssä että UV-VIS-spektroskopiassa. Näistä monomeeri osoittautui spektroskooppisesti stabiilimmaksi. UV-VIS-spektroskopiassa monomeerinäytteessä Pfr -muodon osuus oli selvästi dimeeriä suurempi. Myös pimeäpalautuminen tapahtui monomeerilla dimeeriä hitaammin.

PHY -domeenin lisääminen CBD:hen vaikutti merkittävästi koko proteiinin ominaisuuksiin. PHY:n stabiloiva vaikutus näkyy UV-VIS -absorbanssikäyrissä CBD:tä täydellisempänä virittymisenä sekä erittäin hitaana pimeäpalautumisena. CBD-PHY:n onnistunut monomerisaatio paljasti myös CBD-PHY:n tapauksessa monomeerin olevan dimeeriä hieman, joskaan ei kovin merkitsevästi täydellisemmin virittyvä ja Pfr -muodoltaan stabiilimpi.

5.1 Tuotto ja puhdistus

CBD:n dimeeri- ja monomeerimuotoja sekä CBD-PHY:n dimeerimuotoa tuottavia plasmideja oli jo valmiina, niitä täytyi ainoastaan tuottaa ja puhdistaa lisää. CBD-PHY:n monomeerimuotoa varten CBD-PHY:n dimeerimuotoa tuottavaan plasmidiin tehtiin monomerisaatiomutaatioita, jotka esiteltiin ensimmäisen kerran Auldridgen artikkelissa CBD:n monomerisaation yhteydessä (Auldridge ym., 2012). Vastavia mutaatioita testattiin nyt siis CBD-PHY -konstruktiin onnistuneesti. Tästä voidaan päätellä, että aikaisemmin CBD:n monomerisoinnin yhteydessä esitelty dimerisaatioalue ja siinä tehtävät kolme mutaatiota F145S, L311E ja L314E (Kuva 2), toimivat myös CBD:n PAS-GAF:a pitemmillä konstruktilla (CBD-PHY ja CBD-PHY-HK) ja että PHY-alueella dimerisaatioon johtavat sitoutumiset ovat vähäisiä. Plasmidit siirtyivät transformaatioissa bakteereihin ongelmitta, ja fytochromikonstruktioiden tuotto oli riittävää (Taulukko 1).

Ongelmia ilmeni ainoastaan CBD-PHY:n monomeerin puhdistuksessa. Affiniteettikromatografian aikana proteiini ei tarttunut kolumniin vaan ajautui suoraan läpi. Kyseiselle konstruktiolle tehtiin kaksi erillistä tuottoa ja puhdistusta, mutta molemmilla kerroilla tulos oli sama. Myöhemmin Heikki Takala onnistui omassa yrityksessään puhdistamaan CBD-PHY monomeeria uudesta tuotosta. Saadun proteiinin määrä oli kuitenkin pienempi verrattuna muihin konstruktuihin.

Syy proteiinin tarttumattomuuteen affiniteettikromatografian aikana jäi tuntemattomaksi. Yhtenä vaihtoehtona epäiltiin proteiinin vääränlaista laskostumista, jossa tarttumisen kannalta oleelliset osat olisivat jääneet proteiinin sisälle. Tämä hypoteesi voidaan kuitenkin unohtaa Heikki Takalan onnistuneesta puhdistuksesta johtuen.

Todennäköinen syy proteiinin tarttumattomuuteen on proteiinien liian emäksinen ympäristö. Tällöin proteiinin eri osissa on voinut sattua muun muassa odottamattomia deprotonaatioita, joiden takia proteiinin tarttumiskyky kolumniin olisi heikentynyt. Tämän on voinut aiheuttaa liiallinen NaOH:n käyttö biliverdiinin liuotuksessa. Toisaalta emäksisen liuoksen määrä on niin pieni, että sen olisi pitänyt laimentua riittävästi sekoitettaessa proteiinin joukkoon.

Kolmas mahdollisuus affiniteettikromatografian epäonnistumiseen on virheelliset puskuriliuokset. Toisaalta puskuriliuokset valmistettiin uudelleen ensimmäisen epäonnistumisen jälkeen, joten tämänkään ei pitäisi olla ongelmien syy.

5.2 Korkeapaineinen nestekromatografia-kokoa erotteleva kromatografia

Sekä dimeeri- että monomeerimuodon mittaustuloksista nähdään, että suuri osa CBD:stä pysyy valotuksen jälkeenkin Pr-tilassa (Kuva 3). Valotus on kuitenkin onnistunut, koska Pfr-muodon osuus moninkertaistuu valotuksen jälkeisissä mittauksissa. Mielenkiintoisimmat tulokset saadaan kuitenkin, kun tarkastellaan CBD:n Pr- ja Pfr-muotojen absorbanssikäyriä eluutiivilavuuden funktiona aallonpituudella 280 nm (Kuvat 4 ja 5). Kuten huomataan, absorbanssimaksimit ovat eluutiivilavuuden suhteen tarkasteltuna eri kohdilla Pr- ja Pfr-tiloilla. Pfr-tilassa oleva proteiini eluoituu Pr-tilassa olevaa proteiinia aikaisemmin. Ilmiö on havaittavissa CBD:n dimeerimuodossa, mutta tulee voimakkaammin esille CBD:n monomeerissä. Kuten tuloksista näkyy, CBD:n monomeerillä eluutiivilavuuden muuttuminen, sekä siitä johtuva näennäinen molekyyylimassan kasvaminen on noin kolmanneksen suurempi verrattuna dimeerimuotoon (Taulukko 2).

Varmaa tietoa ilmiön syystä ei ole. Todennäköistä on, että CBD:n biliverdiinin fotokonvertoituessa Pr-muodosta Pfr-muotoon proteiinin rakenteessa tapahtuvat konformaatiomuutokset aiheuttavat proteiinin muuttumisen joustavammaksi. Tämä voi selittyä esimerkiksi vuorovaikutusten katkeamisella. Täysin päinvastainen ilmiö on havaittu Cph1:llä, jolla Pfr-muoto on molekyyylimassaltaan näennäisesti Pr-muotoa pienempi (Lamparter ym., 2001). Monomeerikonstruktissa fotokonversion aiheuttama molekyylin rakenteen avautuminen on mahdollisesti suurempaa. Tämä voi johtua molekyylin puolta pienemmästä molekyyylimassasta, jolloin sama muutos ilmenee

monomeerimuodossa suhteellisesti suurempana. Toisaalta voi myös olla, että dimeerimuodossa molemmat eri monomeerit estävät toistensa täydellisen konformaatiomuutoksen stabiloiden rakennetta. Dimerisaatioalue saattaa olla merkittävä alue kyseisen ilmiön aiheuttajana.

On myös huomioitava mahdollisuus, että monomeerimuotoinen fytochromi tarttuu suodatinpylvään pintarakenteisiin. Tällöin niiden kulkeutuminen pylvään läpi hidastuu. Syitä monomeerien tarttumiseen voi olla useita. Jo pelkästään puolta pienempi koko voi edesauttaa tarrautumista. Lisäksi on mahdollista, että monomeerikonstruktiin Pfr-muodossa paljastuu joitain molekyylin sisäisiä osia, jotka vuorovaikuttavat pylvään kanssa. Kuvaajia tarkastelemalla voidaan kuitenkin epäillä edellä esitetyn kiinnittymisen vaikutuksia tulosten erilaisuuteen dimeerin ja monomeerin välillä. Jos kiinnittymistä tapahtuisi tasaisesti kaikkien molekyylien kesken, pitäisi niiden erottautua pylväässä laajalla eluutiotilavuudella. Tällöin saatu kuvaaja pitäisi olla suhteellisen laaja ja matala.

Valitettavasti CBD-PHY -konstrukteille ei pystytty suorittamaan mittauksia laitteistovian vuoksi. Ensimmäisten näyteajojen jälkeen saatu signaali osoitti, että näyte tulee ulos hyvin laajalla näytepuskurin tilavuusalueella. Lisäksi signaalin intensiteetti rupesi heikkenemään. Tulosten pohjalta pääteltiin, että näyte tarttuu SEC-pylvääseen. Jokaisella ajokerralla näytettä kumuloitui pylvääseen, ja mittauksia ei enää voinut pitää luotettavina. Lisäksi järjestelmän paine nousi jatkuvasti. Pylvästä yritettiin puhdistaa käyttämällä erilaisia liuottingradientteja valmistajan ohjeiden mukaan. Näillä toimenpiteillä järjestelmän paine saatiin laskettua, ja testiajajojen mukaan tukos alkoi poistumaan. Tästä huolimatta pylvään resoluutio laski, joten varsinainen mittaaminen jouduttiin keskeyttämään.

Ongelman syy selvisi myöhemmin kesällä. Valmistajan kanssa käytyjen keskustelujen ja tarkempien tutkimusten jälkeen vika paikallistettiin esisuodattimeen. Valmistusvirheestä johtuen suodattimeen alkoi ajan kuluessa muodostua ruostetta. Ruoste reagoi mahdollisesti näytteessä olleen ylimääräisen biliverdiinin kanssa ja kulkeutui varsinaiseen kolumniin. Jos kuitenkin tarkastellaan CBD:llä saatuja tuloksia, ja verrataan niitä saatuihin UV-VIS-mittauksien arvoihin kaikilla konstrukteilla, voidaan tehdä hypoteettinen oletus, että

HPLC-SEC -mittauksissa olisi entisestään korostunut PHY -domeenin vaikutus konformaation muutoksessa.

5.3 Ultravioletti-näkyvän valon spektroskopia

UV-VIS-spektroskopiolla saatiin arvoja, jotka osaltaan tukevat HPLC-SEC:sta saatuja tuloksia, ja toisaalta tarjoavat uusia näkökulmia CBD:n käyttäytymiseen. Verrattuna HPLC-SEC-mittauksiin, UV-VIS-mittaukset tehtiin CBD:n dimeerin ja monomeerin lisäksi CBD-PHY:n vastaaville konstruktiolle (Kuvat 6-8). CBD-PHY:n mittaukset osoittivat, että PHY-domeeni vaikuttaa biliverdiinin absorptioon ja fytokromikompleksin toimintaan merkittävästi.

CBD:n dimeeri siirtyi Pfr-tilaan hitaasti. Takaisinvalotettaessa Pr-tilaan muutos oli myös hyvin hidasta. Vielä 30 minuutin jälkeen absorbanssikäyrässä oli havaittavissa kasvua Pr:n osalta. Tämä tarkoittaa, että palautuminen on ollut hidasta, ja näytekyvetissä on edelleen osa Pfr-tilassa. Pimeäpalautuminen tapahtui CBD:n villityypillä nopeasti ja tasaisesti. Noin tunnin kuluttua Pfr:ään virittämisestä absorbtiospektri oli palautunut ennen virittämistä olleisiin arvoihin (Kuvat 7 ja 8).

CBD:n monomeerilla fotokonversio Pfr-tilaan tapahtui hyvin nopeasti. Jo ensimmäisen minuutin kohdalla olleessa ensimmäisessä mittauspisteessä näyte oli virittynyt maksimiarvoonsa. Mukana oli kuitenkin Pr-tilaisia molekyyliä, tosin huomattavasti pienemmässä suhteessa kuin villityypin mittauksissa. Myös takaisinvirittäytyminen tapahtui huomattavasti nopeammin verrattuna villityyppiin. Jo viiden minuutin jälkeen suurin osa näytteestä oli palannut takasin Pr-tilaan. 20 minuutin kuluttua näyte oli täysin Pr-tilassa. Tuloksista on huomattavissa monomeerimuodon voimakkaampi virittyminen Pfr-tilaan dimeerimuotoon verrattuna (Kuva 6). Pimeäpalautuminen oli CBD:n monomeerimuodolla huomattavasti hitaampaa kuin dimeerimuodolla. Palautuminen tapahtui tasaisesti, ollen alkutilassaan vasta yli 16 tunnin jälkeen tapahtuneessa mittauksessa (Kuvat 7 ja 8).

CBD-PHY-konstruktin dimeeri muodostaa jatkumon CBD:n dimeerin ja monomeerin käyttäytymisen kanssa. Virittyminen Pfr-tilaan tapahtui nopeasti ensimmäisen valotusminuutin aikana, nousten maksimiarvoonsa viiden minuutin mittauspisteessä.

Takaisinviritys oli hyvin nopeaa. Palautuminen Pr -tilaan oli tapahtunut täydellisesti jo ensimmäisen viiden minuutin aikana. Merkittävä muutos CBD:n konstruktioihin verrattuna ilmeni pimeäpalautumisessa. Virittymisen jälkeen palautuminen on äärimmäisen hidasta. Vuorokauden aikana osa näytteestä oli palautunut Pr -tilaan, mutta suurin osa (n. 85%) oli edelleen Pfr -tilassa (Kuvat 7 ja 8).

CBD-PHY:n monomeerimuodossa virittämisherkkyys korostui. Ennen valotusta tehdyissä pohjamittauksissa pimeässä säilytetyistä näytteistä CBD-PHY:n monomeerimuodossa näkyi absorbanssikäyrässä pientä kohoamaa Pfr -muodon aallonpituuden kohdalla. Vaikka näytettä käsiteltiin pimeässä, hyvinkin pieni valonmäärä tässä vaiheessa, tai mahdollisesti jo aikaisemmin proteiinin eristämisvaiheessa, aiheutti virittymisen osassa näytettä. Muilla konstruktioilla tätä ei tapahtunut. Varsinainen virittyminen tapahtui hyvin nopeasti. Myös takaisinvirittyminen valotuksen avulla oli nopeaa. CBD-PHY:n dimeeri- ja monomeerimuotojen välillä ei ole merkittävää eroa Pfr -tilojen absorbanssikäyrissä (Kuva 6). Pimeäpalautuminen CBD-PHY:n monomeerimuodossa on dimeerimuotoa hitaampaa. Vuorokauden aikana näyte oli pysynyt lähes täysin Pfr -tilassa (Kuva 7).

Pimeäpalautumistuloksia tarkastellessa täytyy ottaa huomioon, että aktiivisia mittauksia suoritettiin ensimmäisen 90 min ajan, jonka jälkeen näytteitä mitattiin vasta seuraavana aamuna, yön yli säilytyksen tapahtuessa $+4^{\circ}\text{C}$. Tämän vuoksi varsinaista pimeäpalautumisen dynamiikkaa voidaan luotettavasti seurata ainoastaan ensimmäisten mittausten osalta, yön yli suoritettujen mittausten jäädessä ainoastaan suuntaa antaviksi.

Absorptioerotuskuvaajista voidaan huomata, että absorbanssikäyrät ovat hyvin lähellä toisiaan, oli kyseessä sitten virittäminen pimeässä säilytetystä näytteestä tai perustilaan valotetun näytteen virittämisestä (Kuva 6). Huomioitavaa on, että CBD:llä virittäminen pimeässä olleesta näytteestä aiheuttaa suuremman eron absorbanssissa verrattuna viritykseen, joka kohdistuu perustilaan valottamalla saatuun näytteeseen. CBD-PHY:n tapauksessa tilanne on päinvastainen. Perustilaan valotetun proteiinin viritys aiheuttaa suuremman absorbanssieron verrattuna pimeässä olleen viritykseen. Tämä ero korostuu CBD-PHY:n monomeerimuodolla. Tämä tarkoittaa, että CBD:tä ei saada takaisinviritettyä

tehokkaasti valon avulla. Perustila saavutetaan täysin ainoastaan pimeäpalautumisen avulla. CBD-PHY:llä tilanne on päinvastainen.

Saadut tulokset vastaavat dimeerimuotojen osalta aikaisemmin saatuja tutkimustuloksia vastaavankaltaisella Agp1 -fytokromilla (Noack ym., 2007). Artikkelissa saadut erot PAS-GAF:n ja PAS-GAF-PHY:n dimeerimuotojen välillä ovat pienempiä kuin tässä työssä esiteltyt, mutta tämä selittyy osaksi eri fytokromilla. Merkittävää on pelkän CBD:n pimeäpalautumisen hitaus. Tämä on päinvastainen havainto verrattuna tässä työssä esiteltyihin tuloksiin. Toisaalta PHY -domeenin vaikutus fotokonversioon on osoitettu myös muualla (Ulijasz ym., 2008). Monomerisaation vaikutuksesta fotokonversioon on eriäviä tuloksia (Sineshchekov ym., 2002; Auldridge ym., 2012). Myös tässä tapauksessa tuloksiin vaikuttaa eri fytokromi, koska esimerkiksi DrBphP:n tapauksessa monomerisaatiolla on merkittävä vaikutus fytokromin ominaisuuksiin (Auldridge ym., 2012).

Myös UV-VIS -mittauksiin sisältyi mahdollisia tuloksiin vaikuttavia virhelähteitä. Proteiinit sulatettiin mittauksia varten -80°C säilytyksestä. Sulatus tehtiin hellävaraisesti käsissä, jonka jälkeen proteiinit pidettiin jäällä. Tästä huolimatta sulatuksen aikana osa proteiineista on voinut hajota. Hajoamista on voinut tapahtua myös jäädytyksen aikana. Mitattavien näytteiden konsentraatioissa voi olla pieniä eroavaisuuksia, johtuen epätarkkaan konsentraatiomittaukseen perustuvista laimennoslaskuista ja etenkin pipetointivirheistä. Tällä ei pitäisi kuitenkaan olla merkitystä, koska kaikkien näytteiden konsentraatio asetettiin siten, että UV-VIS -mittaukset tapahtuivat optimaalisella absorbanssialueella. Kolmas mahdollinen virhelähde on ulkoinen valonlähde. Vaikka näytteitä käsiteltiin ja säilytettiin pimeässä koko mittaustapahtuman ajan, mittaustilassa oli heikkoja valonlähteitä, jotka saattoivat vaikuttaa näytteiden lähtöviritystiloihin. Myös näytteen valotuksessa saattoi tapahtua virheitä. Valonlähde on saattanut muuttaa asentoa, jolloin näytteen valotus on ollut puutteellista. Toisaalta mittaukset on toteutettu huolella, ja mittaustuloksissa ei ole nähtävillä mitään edellä esiteltyihin ongelmiin viittaavaa. Ainoastaan CBD-PHY:n monomeerimuodolla oli jo lähtötilaa mitattaessa osa näytteestä Pfr -muodossa, mutta valottuminen on saattanut tapahtua jo proteiinin puhdistusvaiheessa.

6. Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa saatiin tuloksia, jotka osoittavat selvästi, että PHY -domeenilla on merkittävä osuus fytochromin fotokonversiossa ja stabiiliudessa. Samaten voidaan nähdä, että monomerisaatio voimistaa sekä CBD:n että CBD-PHY:n fotokonversiota, ja samalla fotokonvertoidut muodot ovat stabiilimpia kuin vastaavat dimeerimuodot. Ilman PHY -domeenia CBD ei pysty suorittamaan fotokonversiota kokonaan, vaan jää Meta-R_c muotoon. Osittain tästä syystä selittyy tässä tutkimuksessa CBD-PHY:n dimeeri- ja monomeerimuotojen voimakkaampi siirtyminen Pfr -tilaan. Monomerisaation vaikutuksesta on olemassa CBD:n osalta jo nyt saadun kaltaisia tuloksia (Auldridge ym., 2012). Toisaalta CBD-PHY -konstruktion monomerisaatio on hyvin tuore tutkimuskohde. Saadut tulokset vahvistavat monomerisaation Pfr-tilan stabiloivan vaikutuksen.

Tutkimuksen perusteella fytochromitutkimusta kannattaisi siirtää voimakkaammin monomeerimuotojen tutkimukseen. Ne ovat dimeerimuotoja stabiilimpeja, jolloin viritystilän ylläpito on helpompaa. Kun lisäksi löydetään sopivia mutaatioita, joilla saadaan estettyä fytochromin konformaatiomuutokset ja siirrettyä viritysenergian purkautuminen fluoresenssiin, olemme paljon lähempänä uusien sovellusten läpimurtoa.

7. Lähdeluettelo

Auldridge, M.E., K.A. Satyshur, D.M. Anstrom ja K.T. Forest. 2012. Structure-guided engineering enhances a phytochrome-based infrared fluorescent protein. *J.Biol.Chem.* 287:7000-7009.

Bhoo, S., S.J. Davis, J. Walker, B. Karniol ja R.D. Vierstra. 2001. Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature.* 414.

Braslavsky, S.E., W. Gärtner, and K. Schaffner. 1997. Phytochrome photoconversion. *Plant, Cell and Environment.* 20:700-701-706.

Davis, S.J., A.V. Vener ja R.D. Vierstra. 1999. Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science.* 286:2517-2520.

Fischer, A.J. ja J.C. Lagarias. 2004. Harnessing phytochrome's glowing potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:17334-17339.

Hennig, L. ja E. Schafer. 2001. Both subunits of the dimeric plant photoreceptor phytochrome require chromophore for stability of the far-red light-absorbing form. *J.Biol.Chem.* 276:7913-7918.

Lamparter, T., B. Esteban ja J. Hughes. 2001. Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur.J.Biochem.* 268:4720-4730.

Noack, S., N. Michael, R. Rosen ja T. Lamparter. 2007. Protein conformational changes of *Agrobacterium* phytochrome Agp1 during chromophore assembly and photoconversion. *Biochemistry.* 46:4164-4176.

Rockwell, N.C., Y.S. Su ja J.C. Lagarias. 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu.Rev.Plant.Biol.* 57:837-858.

Shu, X., A. Royant, M.Z. Lin, T.A. Aguilera, V. Lev-Ram, P.A. Steinbach ja R.Y. Tsien. 2009. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science.* 324:804-807.

Sineshchekov, V., L. Koppel', B. Esteban, J. Hughes ja T. Lamparter. 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.

Ulijasz, A.T., G. Cornilescu, D. von Stetten, S. Kaminski, M.A. Mroginski, J. Zhang, D. Bhaya, P. Hildebrandt ja R.D. Vierstra. 2008. Characterization of two thermostable cyanobacterial phytochromes reveals global movements in the chromophore-binding domain during photoconversion. *J.Biol.Chem.* 283:21251-21266.

Ulijasz, A.T. ja R.D. Vierstra. 2011. Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture. *Curr.Opin.Plant Biol.* 14:498-506.

Wagner, J.R., J.S. Brunzelle, K.T. Forest ja R.D. Vierstra. 2005. A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature.* 438:325-331.

Wagner, J.R., J. Zhang, J.S. Brunzelle, R.D. Vierstra ja K.T. Forest. 2007. High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J.Biol.Chem.* 282:12298-12309.

Yang, X., Z. Ren, J. Kuk ja K. Moffat. 2011. Temperature-scan cryocrystallography reveals reaction intermediates in bacteriophytochrome. *Nature*. 479:428-432.

Yang, X., E.A. Stojkovic, J. Kuk ja K. Moffat. 2007. Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:12571-12576.

Yeh, K.C. ja J.C. Lagarias. 1998. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:13976-13981.

Yoon, J.M., T.R. Hahn, M.H. Cho, J.S. Jeon, S.H. Bhoo ja Y.K. Kwon. 2008. The PHY domain is required for conformational stability and spectral integrity of the bacteriophytochrome from *Deinococcus radiodurans*. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 369:1120-1124.