

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
DIPARTIMENTO DI FISICA**



**Struttura e funzione di recettori
batterici di luce blu contententi i
domini proteici LOV
(*Light, Oxygen and Voltage*)**

Dottorando: Valentina Buttani

Dottorato di Ricerca in Fisica

Supervisore: Prof.ssa Aba Losi

XX Ciclo - Gennaio 2009

Sommario

Le proteine fotorecetrici di luce blu contenenti il dominio fotosensore LOV (Light, Oxygen and Voltage), scoperto per la prima volta nelle fototropine di piante nel 1997, sono presenti in circa il 13 % dei batteri attualmente sequenziati. Sebbene il loro ruolo come fotorecettori sensoriali sia stato dimostrato solo per un ristretto numero di casi, il meccanismo di risposta alla luce e il relativo fotociclo transiente appaiono ben conservati con le fototropine di piante. Le reazioni fotochimiche si incentrano sul cromoforo flavin-mononucleotide (FMN), un derivato della riboflavina.

Lo studio di questi fotorecettori di nuova generazione è di grande interesse sia dal punto di vista biologico, per la definizione di un nuovo ed inatteso paradigma di percezione della luce nei procarioti, che dal punto di vista biofisico, poiché molti aspetti strutturali e funzionali rimangono da definire. La questione chiave resta infatti l'elucidazione del meccanismo primario di trasduzione del segnale innescato dalla luce in queste proteine modulari dove il dominio fotosensore è accoppiato a domini effettori di diversa funzionalità. Inoltre rimane in molti casi da dimostrare che il dominio effettore sia effettivamente regolato dal dominio fotosensore LOV, in analogia alle fototropine di piante.

Nel presente lavoro sono state studiate struttura e funzione di due proteine LOV batteriche: YtvA da *Bacillus subtilis* e una LOV-chinasi da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (PST-LOV). YtvA comprende un dominio LOV seguito da un dominio STAS (*sulphate transporter anti-sigma factor antagonist*); PST-LOV è invece composta da un dominio LOV, una *histidine kinase* (HK) e un *Response Regulator* (RR). Per l'aspetto strutturale, abbiamo utilizzato un approccio sperimentale multidisciplinare comprendente cromatografia su gel, analisi di spettri di dicroismo circolare e modellistica computazionale (I). Per YtvA tale studio ha portato alla realizzazione di un modello di dimero del dominio LOV, di recente verificato con una struttura cristallina. Sono stati altresì proposti due modelli a bassa risoluzione di proteina intera, sia per YtvA che per PST-LOV. Lo studio sulla funzionalità molecolare di YtvA ci ha permesso di determinare che il dominio STAS lega nucleotidi trifosfati (NTP) e che avviene una effettiva trasmissione interdominio del cambiamento conformazionale innescato dal fotociclo del dominio LOV (II). Tali studi sono stati condotti utilizzando un derivato fluorescente del GTP (marcato con il

fluoroforo BODIPY® TR 2'-(o-3')-O-(N-(2-aminoethyl-urethane, abbreviato in GTP_{TR}). Abbiamo inoltre individuato un aminoacido chiave per la trasmissione del segnale LOV-STAS, Glu105: la mutazione E105L infatti sopprime completamente la trasmissione LOV-STAS dei cambiamenti conformazionali fotoindotti al sito di legame per il GTP_{TR} (III).

Lo studio sulla funzionalità di PST-LOV ha portato invece alla dimostrazione del primo meccanismo di risposta al segnale tipo “*two component*” stimolato dalla luce blu nei batteri: esperimenti con ATP radioattivo hanno infatti dimostrato che l'attività chinasi è stimolata dalla luce blu, tramite l'attivazione del dominio LOV. Inoltre, attraverso l'analisi di diversi costrutti della proteina, abbiamo stabilito che l'accettore finale del fosfato inorganico proveniente dall'ATP legato al dominio chinasi, è il dominio RR, come ci si aspetterebbe da un tipico sistema “*two component*” batterico (IV).

- I. V. Buttani, A. Losi, T. Eggert, U. Krauss, K.-E. Jaeger, Z. Cao and W. Gärtner, Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV-LOV dimerization and interdomain interactions, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, 6, 41-49. DOI: [10.1039/b610375h](https://doi.org/10.1039/b610375h) ISSN: 1474-905X
- II. V. Buttani, A. Losi, E. Polverini and W. Gärtner, Blue news: NTP binding properties of the blue-light sensitive YtvA protein from *Bacillus subtilis*, *FEBS Lett.*, 2006, **580**, 3818-3822. [doi:10.1016/j.febslet.2006.06.007](https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.007) ISSN: 0014-5793
- III. V. Buttani, W. Gärtner and A. Losi, NTP-binding properties of the blue-light receptor YtvA and effects of the E105L mutation, *Eur. Biophys. J.*, 2007, 36, 831-839.
- IV. Z. Cao, V. Buttani, A. Losi and W. Gärtner, A blue light inducible two component signal transduction system in the plant pathogen *Pseudomonas syringae pv. tomato*, *Biophys. J.*, 2008, 94, 897-905.

Abbreviazioni:

Phot = Fototropine

LOV = Light Oxygen and Voltage domain

YLOV = Costrutto di YtvA contenente il dominio LOV

N-YLOV = Costrutto di YtvA contenente il dominio LOV e il cappuccio N-terminale

STAS = Sulphate transporter and anti-sigma factor antagonist

PST-LOV = Proteina contenente il dominio LOV da *Pseudomonas syringae pv. Tomato*

PST-LOV_{ARR} = Costrutto contenente il dominio LOV e il dominio histidine kinase

RR = Response Regulator

CD = Dicroismo Circolare

Struttura della dissertazione

Dopo l' introduzione e la sessione di materiali e metodi verranno presentate le 4 pubblicazioni, nell'ordine indicato in calce al sommario. A corollario di queste, verranno discussi ulteriori risultati e tecniche di analisi non inclusi nelle pubblicazioni stesse. Infine verranno presentate le conclusioni generali, anche alla luce di nuovi dati emersi di recente.

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Le fototropine ed il “paradigma LOV”.....	1
1.2	Il paradigma LOV nei procarioti: conservazione, evoluzione e prospettive.....	4
1.3	Problematiche affrontate durante il lavoro di ricerca.....	6
1.4	Gli obiettivi della ricerca	7
1.5	L’approccio sperimentale.....	9
2	MATERIALI E METODI	11
2.1	Preparazione campioni.....	11
2.2	Cromatografia su gel.....	12
2.3	Elettroforesi su gel.....	13
2.4	Spettroscopia di assorbimento.....	14
2.5	Spettroscopia di fluorescenza.....	14
2.6	Dicroismo Circolare.....	15
2.7	<i>Modelling</i> computazionale.....	16
2.8	Esperimenti di radioattività.....	17
3	L’ANALISI CONFORMAZIONALE DELLA PROTEINA SENSIBILE ALLA LUCE BLU YTVA RIVELA UN’INTERFACCIA COMPETITIVA PER LA DIMERIZZAZIONE LOV-LOV E LE INTERAZIONI INTERDOMINIO	18
3.1	Ulteriori considerazioni sulle esperienze di cromatografia.....	28
3.2	Analisi di dicroismo circolare.....	34
3.3	<i>Modelling</i> computazionale.....	37
4	PROPRIETÀ DI LEGAME DELLA PROTEINA SENSIBILE ALLA LUCE BLU YTVA DA <i>BACILLUS SUBTILIS</i> CON NTP	41

4.1	Calcolo della costante di dissociazione.....	47
4.2	Misure di <i>binding</i> su diversi costrutti derivati da YtvA.....	52
5	PROPRIETÀ DI LEGAME CON NTP DEL RECETTORE DI LUCE BLU YTV A ED EFFETTI DELLA MUTAZIONE E105L.....	56
5.1	Studio di ATP- <i>binding</i>	66
5.2	Modello di YtvA.....	67
5.3	<i>Docking</i> GTP-dominio STAS.....	71
6	UN SISTEMA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE TIPO <i>TWO-COMPONENT</i> GUIDATO DA LUCE BLU NEL PATOGENO DI PIANTE <i>PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. TOMATO</i>.....	74
6.1	Cromatografia.....	84
6.2	Dicroismo circolare.....	85
6.3	Modello.....	86
7	CONCLUSIONI.....	91
8	NOTE BIBLIOGRAFICHE.....	94

1 Introduzione

Durante questo Dottorato di Ricerca ci siamo occupati dei meccanismi molecolari primari che sottendono a fotorisposte mediate da proteine fotorecetrici batteriche di nuova generazione, che utilizzano il cosiddetto paradigma LOV (Light, Oxygen and Voltage), scoperto in fotorecettori di piante chiamati fototropine (phot), per catturare ed elaborare un input luminoso nella regione spettrale UVA-Blu (ca. 310-480 nm) . Il lavoro si inquadra in uno scenario, fino a pochi anni fa inesplorato, nel quale si investigano sempre più di frequente la struttura e la funzione di fotorecettori batterici correlati a quelli vegetali, nonché il loro significato evolutivo e le somiglianze e/o differenze di tipo meccanicistico. Tali fotorecettori, del tutto inattesi nei batteri, sono stati scoperti grazie alla grande quantità di sequenze genomiche che si stanno accumulando sugli organismi procariotici [1].

1.1 Le fototropine ed il “paradigma LOV”

Gli effetti fisiologici della luce blu (BL) sulle piante [2, 3], dal fototropismo alla fotomorfogenesi, sono stati studiati per oltre un secolo, ma solo nel 1993 è stato scoperto il primo fotorecettore di BL, denominato criptocromo (cry) in onore della sua natura elusiva, che è stato seguito nel 1997 dall’identificazione delle fototropine [4, 5]. La realizzazione che sia cry che phot legano derivati della riboflavina come cromofori (vedi figura 1-1), portò ad uno studio approfondito per caratterizzare le reazioni fotoindotte in tali fotorecettori, che non possono ovviamente basarsi su una fotoisomerizzazione.

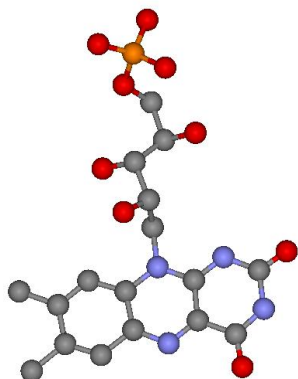


Figura 1-1 Struttura di FMN, flavin-mononucleotide da Fototropina. In azzurro Azoto, in grigio Carbonio, in rosso Ossigeno, in arancio Fosforo.

Le phot, ca 1000 aa, possiedono due piccoli domini fotosensori disposti in tandem: LOV1 e LOV2, lunghi ciascuno circa 110 aa, che sono stati purificati e caratterizzati separatamente dal resto della proteina. La loro elevata stabilità ha permesso di descrivere in modo completo il paradigma fotochimico, qui denominato paradigma LOV, e la loro struttura tridimensionale (vedi figura 1-2). Il dominio LOV rappresenta una sottoclasse dei domini PAS (PerArntSims) [6], moduli sensori e/o regolatori in proteine implicati nella rivelazione e traduzione di una molteplicità di segnali. I domini PAS, diffusi in tutti i regni viventi, sono in grado di legare diversi cofattori (eme, flavine, acido p-coumarico) e di reagire quindi a diversi stimoli esterni (concentrazione di ossigeno, luce, stato di ossidoriduzione), giocando sempre ruoli molto importanti nei meccanismi regolatori degli organismi che li contengono [7, 8].

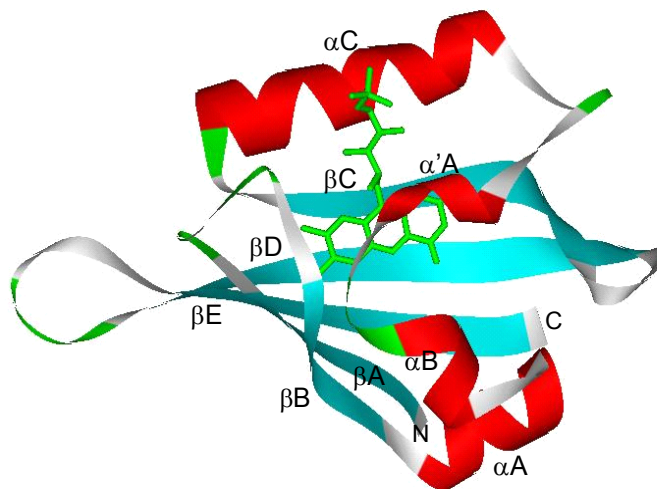


Figura 1-2 Struttura del dominio LOV2 da phy3, da *Adiantum capillus-veneris*, nell'immagine sono segnati gli elementi della struttura secondaria con la loro denominazione topologica. In verde la molecola di FMN.

Il paradigma fotosensore LOV si basa sul legame di una molecola di flavin-mononucleotide (FMN), che nello stato *dark* è legata in modo non covalente alla proteina e si trova nella forma ossidata. Lo spettro d'assorbimento mostra le caratteristiche 3 transizioni nella regione UV-Visibile, tipiche dei derivati riboflavinici. La transizione $S_0 \rightarrow S_1$ ha un massimo intorno ai 450 nm (LOV_{447}), ma presenta risoluzione vibrazionale ben definita (vedi figura 1-3) [9, 10]. Il fotociclo che avviene in seguito ad assorbimento di BL, porta alla formazione reversibile di un legame covalente con una cisteina del dominio LOV, per formare un fotoaddotto con

assorbimento spostato verso il blu (LOV₃₉₀), che a sua volta si forma in seguito al decadimento dello stato di tripletto dell'FMN, sulla scala temporale del microsecondo [11] (vedi figura 1-3). Lo stato fotoattivato LOV₃₉₀ ritorna allo stato iniziale, al buio, con un tempo di vita (τ_{rec} = tempo di *recovery*) variabile tra qualche secondo e qualche ora, a temperatura ambiente.

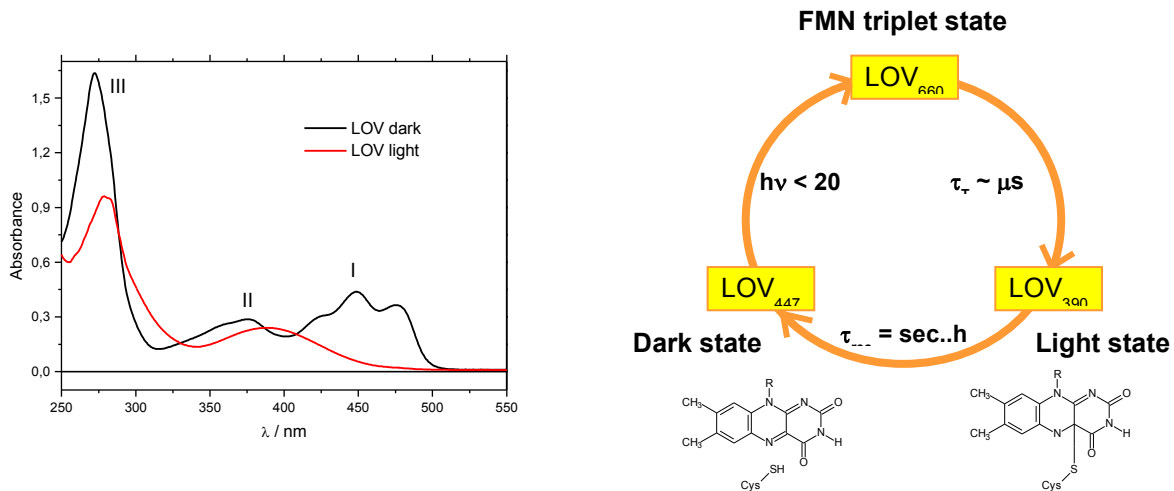


Figura 1-3 A sinistra spettro d'assorbimento tipico di una proteina contenente il dominio LOV (YtvA in questo caso, *vide infra*) allo stato *dark* e allo stato *light*; nell'immagine sono evidenziati i picchi d'assorbimento relativi alle transizioni delle riboflavine (stato *dark*). A destra il fotociclo tipico dei domini LOV, accompagnato dallo schema di legame dell'FMN nello stato *light* e *dark*.

La fotoattivazione dei domini LOV innesca, nelle phot, l'attività enzimatica del dominio effettore C-terminale Ser/Thr-chinasi, attivazione in ultima analisi responsabile delle molteplici fotorisposte mediate dalle fototropine *in vivo*, che includono il fototropismo, l'apertura degli stomi, il movimento dei cloroplasti e l'espansione fogliare. Le basi molecolari dell'attivazione luce-indotta del dominio Ser/Thr-chinasi sono solo parzialmente note, non essendo disponibile finora una struttura tridimensionale della proteina intera. Analogamente non è chiaro il significato della presenza in tandem di due domini LOV, poiché solo LOV2 pare essere indispensabile per evocare le fotorisposte [12, 13].

1.2 Il paradigma LOV nei procarioti: conservazione, evoluzione e prospettive

Il meccanismo introdotto nel paragrafo 1.1 è stato il primo ad essere descritto per recettori sensoriali di BL che utilizzano flavine come cromofori attivi [9, 14]. Questo paradigma, apparentemente così elementare in quanto il fotociclo comprende solo due specie transienti, appare sorprendentemente conservato nel mondo procariotico, in cui si sta configurando come la modalità più diffusa di rilevazione dello stimolo luminoso, almeno tra i batteri coltivabili in laboratorio. Oltre il 13% dei batteri il cui genoma è stato sequenziato contengono infatti proteine LOV, per cui si è riusciti in diversi casi a dimostrare le reazioni fotoindotte e di cui si inizia a comprendere il ruolo fisiologico, per un numero purtroppo ancora ristretto di organismi. La zona spettrale d'interesse per il paradigma LOV assume un'importanza rilevante a livello biologico: la luce blu, che è in grado di penetrare in profondità nell'acqua più di tutte le altre lunghezze d'onda, è infatti potenzialmente pericolosa per gli organismi viventi essendo in grado di eccitare con alta probabilità fotosensibilizzatori ubiquitari, come le porfirine, che formano stati di tripletto con alta efficienza. Gli stati di tripletto, in ambiente aerobico, promuovono la formazione di stati eccitati dell'ossigeno (es. ossigeno singoletto), specie altamente tossiche per le cellule. [15]. Dalla luce UVA derivano anche i ben noti danni provocati al DNA, che possono avere conseguenze più o meno gravi all'interno dell'organismo che li ha subiti. In virtù di queste considerazioni appare chiaramente importante, anche per gli organismi più primitivi, lo sviluppo di sistemi sensori di BL. E' probabile che il meccanismo di risposta alla BL, avvalendosi di cofattori sintetizzati attraverso una delle vie metaboliche più antiche, cioè la riboflavina ed i suoi derivati, abbia subito un processo di trasferimento dai microrganismi fotosintetici alle piante. Non è escludibile anche un meccanismo più complesso di co-evoluzione fra piante e batteri, che vede un'elaborazione nel tempo di meccanismi di risposta simili allo stesso stimolo luminoso, grazie alla condivisione dello stesso ambiente [1]. La principale differenza fra i domini LOV provenienti dalle piante e dai batteri non sta nella sequenza amminoacidica, che appare infatti molto simile nelle due categorie, quanto piuttosto nell'architettura proteica: le fototropine da piante infatti presentano due domini LOV in tandem (vedi paragrafo 1.1), mentre le proteine batteriche mostrano sempre un unico dominio LOV, associato ad una grande varietà di potenziali domini effettori: *Histidine-kinase*, *response regulator*, *helix turn helix*, *STAS* eccetera [16-18]. Il

quadro che si viene a presentare è quindi quello di una grande modularità di domini effettori (vedi figura 1-4) notoriamente legati a certi tipi di risposte biologiche, che si trovano affiancati a domini sensori di stimoli diversi. L'obiettivo che sorge spontaneo nell'approccio a questo argomento di ricerca è quindi quello di comprendere i meccanismi primari di trasmissione del segnale, e quindi anche di individuare le superfici di interazione tra dominio sensore e domini effettori .

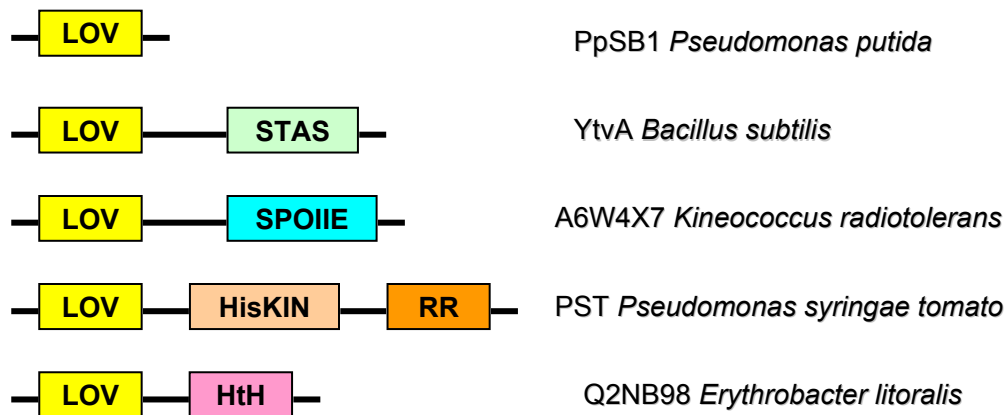


Figura 1-4 Struttura a domini di alcune proteine LOV batteriche. *STAS*: sulfate transporter/antisigma-factor antagonist; *SPOIIE*: Sporulation stage II, protein E C-terminal/Protein phosphatase 2C-related; *HisKIN*: histidine kinase; *RR*: response regulator; *HtH*: Helix-Turn-Helix regulatory protein.

Come già affermato precedentemente sono ancora pochi i dati raccolti relativamente al ruolo fisiologico delle proteine LOV batteriche, tuttavia l'interesse nei confronti di questo ramo di ricerca sta dando nuovi risultati e per alcuni organismi è stata chiarita la funzione di tali proteine. Per esempio in *Brucella abortus*, una LOV-kinasi regolata da BL è legata all'infettività batterica: è stato infatti dimostrato che negli organismi contenenti la proteina *wild type* l'infezione è stimolata dalla BL, negli organismi contenenti mutanti fotochimicamente inattivi invece ne è limitata [19]. Un secondo esempio di dimostrata funzionalità è costituito dalla proteina LOV da *Caulobacter crescentus*, che in seguito ad assorbimento di BL va a modificare il suo grado di adesione ad una superficie e tra cellule distinte. L'interpretazione di questo fenomeno dal punto di vista funzionale/biologico è stata attribuita alla necessità di una maggiore capacità di attaccamento agli elementi nutritivi presenti nell'acqua nella zona superficiale, in cui sono meno concentrati che sul fondo, e dove la luce è più intensa [16, 20].

1.3 **Problematiche affrontate durante il lavoro di ricerca**

Considerando la grande modularità dei domini LOV nel mondo dei procarioti, e la facilità della gestione in laboratorio del segnale luminoso necessario per attivarle essi si configurano come i modelli ideali nello studio dei meccanismi molecolari di trasduzione “dominio sensore-dominio effettore”. La ricerca dei punti chiave legati alla trasmissione del segnale è stata quindi uno degli argomenti affrontati durante questo lavoro di ricerca; le indicazioni emerse durante gli studi precedenti sui possibili siti d’interazione alla base della trasmissione fornivano i seguenti risultati (vedi figura 1-2):

- a. La regione proteica che lega il gruppo fosfato dell’FMN: i dati strutturali ottenuti attraverso diverse tecniche su domini LOV di fototropine isolati hanno dimostrato che i cambiamenti conformazionali che avvengono in seguito alla fotoattivazione sono di lieve entità e si concentrano nell’intorno del cromoforo [21, 22].
- b. Il foglietto β ($A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$, $I\beta$): attraverso studi NMR su un costrutto del dominio LOV2 da phot1 di *Avena sativa* è stata evidenziata l’importanza di un’elica a valle del dominio LOV per la fototrasduzione del segnale. Infatti il costrutto denominato AsLOV2-40, costituito dal dominio LOV e da 40 amminoacidi a valle del dominio stesso, mostra che nello stato dark si forma un’elica anfipatica C terminale ($J\alpha$) formata da 20 amminoacidi a contatto con la superficie esposta al solvente del foglietto β del dominio LOV con la sua parte polare; in seguito ad illuminazione con luce blu la zona C-terminale appare disordinata ed il contatto è rimosso [23]. Lo stesso gruppo di lavoro ha poi dimostrato che delle mutazioni sitospecifiche in grado di rimuovere l’interazione fra $J\alpha$ e dominio LOV portano ad un’attivazione dell’attività chinasi costitutiva (non fotoindotta) nella fototropina intera, mostrando l’importanza dell’*unfolding* dell’elica $J\alpha$ nell’evento di autofosforilazione innescato dalla luce [24].
- c. Il ponte salino formato da una lisina e da un acido glutammico ben conservati nei vari domini LOV e situati sulla superficie. Quest’idea risulta supportata dal fatto che il ponte salino E-K si trova alla fine di un *set* di amminoacidi altamente conservati che si estendono dalla cavità contenente l’FMN e arrivano fino in superficie interconnessi da forze di van der Waals. Questo volume subisce cambiamenti conformazionali nella struttura cristallina del dominio LOV2 in seguito ad assorbimento di luce blu [25, 26].

E'importante sottolineare il fatto che sebbene queste affermazioni suggeriscano un ruolo chiave del ponte salino nella trasmissione del segnale, non esiste ancora alcun dato sperimentale che dimostri che la rottura del ponte influisca in qualche modo sull'autofosforilazione delle fototropine.

Il secondo punto d'interesse sorto nella ricerca è dato dallo studio della funzionalità molecolare delle proteine LOV batteriche in rapporto alla BL. I possibili domini effettori sono stati analizzati in base alla loro funzionalità emersa in altre proteine, e si è ricercata una relazione tra lo stimolo luminoso, rilevato dal dominio LOV, e l'attivazione del dominio effettore.

1.4 *Gli obiettivi della ricerca*

Il nostro lavoro di ricerca si è concentrato sullo studio di due proteine batteriche contenenti il dominio LOV: YtvA da *Bacillus subtilis* e PST-LOV da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. YtvA rappresenta la prima proteina batterica per cui siano state evidenziate le reazioni fotochimiche phot-simili [27], è composta da 261 amminoacidi, presenta un dominio LOV associato ad un dominio STAS, ed è completata da un cappuccio N-terminale e da uno C-terminale (vedi figura 1-4). Tale proteina evidenzia un fotociclo tipico delle proteine LOV, con la formazione di un addotto covalente che ritorna allo stato di buio con un tempo più lungo rispetto a quello delle phot di piante (2.600 sec a 25 °C contro i 330 sec per le proteine di piante). La seconda proteina che abbiamo analizzato è PST-LOV da *Pseudomonas syringae* *tomato*, di 534 amminoacidi, composta da un dominio LOV seguito da un'istidina-chinasi (HK) e da un *response regulator* (RR) (vedi figura 1-4). Per entrambi gli oggetti dello studio, come abbiamo precedentemente accennato nel paragrafo 1.3, una fase della ricerca si è concentrata sulla funzione proteica; in particolare per YtvA ci siamo basati sulla funzionalità del dominio STAS, per cui il cui ruolo di *NTP-binding* (NTP = nucleotide trifosfato es. ATP, GTP) é stato ipotizzato, sia nei procarioti che negli eucarioti [25], ma è stato dimostrato finora solo per la proteina SPOIIAA da *Bacillus subtilis*, coinvolta nei meccanismi di sporulazione [26]. Il nostro scopo era di rilevare il legame degli NTP anche per il dominio STAS di YtvA e mostrare l'eventuale influenza dello stimolo luminoso, essendo il dominio STAS considerato la parte effettrice della proteina. Il gruppo di ricerca di Akbar ha descritto nel 2001 il ruolo di YtvA come

regolatore del fattore di trascrizione allo stress σ^B durante situazioni di stress da sale e da etanolo [28]. Il meccanismo attraverso il quale YtvA interagisce con σ^B probabilmente coinvolge altre proteine regolatrici, come RsbR e YqhA [28], risulta molto interessante immaginare che l'interazione proteica possa essere regolata dalla luce, in quanto la luce UVA/BL potrebbe rappresentare un fattore di stress rilevato dal dominio fotosensore di YtvA.

La proteina PST-LOV dal punto di vista funzionale è particolarmente interessante dato che contiene il sistema di trasmissione del segnale più diffuso nel regno dei procarioti, ovvero il cosiddetto *two-component system* [29]. Tale sistema di traduzione del segnale si basa su un dominio sensore N-terminale (nel nostro caso il dominio LOV), ed una chinasi C-terminale contenente l'istidine-box fosfoaccettore, generalmente predisposto all'omodimerizzazione [28]. In risposta ad un dato segnale l'istidina si autofosforila ed il gruppo fosfato viene trasmesso ad un acido aspartico ben conservato di un response regulator (RR), ovvero del dominio accettore. La presenza di un dominio sensore LOV con elevata similarità di sequenza con le fototropine, accostata al tipico sistema procariotico chinasi-RR, rende questa proteina un candidato ideale per dimostrare l'esistenza di un sistema a due componenti batterico guidato dalla luce blu.

Un ulteriore argomento di ricerca approfondito durante questi tre anni coincide con l'indagine dei meccanismi strutturali alla base della trasmissione del segnale dal dominio sensore LOV al dominio effettore, che come evidenziato precedentemente non sono ancora chiari neppure nelle phot. Numerose sono tuttavia le esperienze in laboratorio che indicano una chiara trasmissione del segnale da LOV a STAS in YtvA; esperimenti di LIOAS hanno dimostrato che la formazione del fotoprodotto corrisponde ad una contrazione del volume proteico, a testimonianza di un riarrangiamento dei legami idrogeno all'interno della cavità di legame dell'FMN [29]. Esperimenti di FTIR sul dominio LOV di YtvA hanno mostrato cambiamenti conformazionali in seguito ad assorbimento di luce blu simili a quelli osservati per il dominio LOV da fototropine, tuttavia il confronto fra questo spettro e quello misurato per la proteina intera indica chiaramente una trasmissione del segnale al resto della proteina [23], dato confermato anche dagli spettri di fluorescenza sul dominio LOV e sulla proteina intera, che risultano diversi a testimonianza della posizione chiave giocata dal triptofano ben conservato W103, che appartiene al foglietto β centrale [24]. Ci siamo chiesti quindi quali siano le basi strutturali della trasmissione intraproteica dei cambiamenti conformazionali fotoindotti.

1.5 L'approccio sperimentale

Per indagare a fondo i meccanismi alla base della trasmissione del segnale sono state utilizzate diverse tecniche sperimentali incrociate, applicate alla proteina intera e a costrutti contenenti i singoli domini: per YtvA sono stati presi in esame il solo dominio LOV (YtvA-LOV), il dominio LOV accompagnato dal cappuccio N-terminale (YtvA-NLOV) e la proteina intera. Per PST-LOV oltre alla proteina intera sono stati prodotti in laboratorio i domini LOV-HK, denominato PST-LOV_{ARR} e, separatamente, l'RR, oltre che naturalmente la proteina intera. Le esperienze di laboratorio su YtvA sono state inoltre realizzate su proteine sottoposte a mutagenesi sito specifica su amminoacidi ritenuti importanti nella trasmissione del segnale. I residui sottoposti a mutazione sono l'acido glutammico E105, situato sul foglietto β centrale, l'acido glutammico E56, deputato a formare il ponte salino con la lisina, l'acido aspartico D109, anch'esso situato sul foglietto β .

Per analizzare la forma strutturale in soluzione i diversi costrutti sono stati sottoposti a cromatografia su gel, che in seguito ad una calibrazione con proteine di peso noto restituisce il peso molecolare delle molecole eluite, e quindi la loro forma dimerica o monomerica. Per studiare invece la composizione in struttura secondaria dei costrutti sono stati registrati degli spettri di dicroismo circolare, sia allo stato di buio che allo stato di luce, sulla proteina intera, sui singoli domini e sui campioni mutati in modo da valutare le conseguenze del cambiamento di un singolo amminoacido sulla composizione globale proteica. Infine grande risalto è stato dato anche all'approccio informatico, con esperienze di modellistica computazionale su strutture cristalline ad elevata similarità di sequenza con le proteine oggetto dello studio ed esperienze di *docking* tese a creare possibili modelli d'interazione fra i diversi domini.

Per quanto riguarda invece la fase di studio funzionale, per indagare sperimentalmente la capacità di YtvA di legare nucleotidi sono stati utilizzati dei derivati fluorescenti di GTP e ATP, in grado di cambiare proprietà spettrali di assorbimento e fluorescenza in seguito a legame con una macromolecola. Per valutare l'effettiva zona di legame sono state inoltre utilizzate delle soluzioni di GTP, GDP, GMP e ATP non fluorescenti, inoltre lo scopo dell'esperienza è stata anche la valutazione dell'influenza della luce su eventuali legami con nucleotidi.

Per investigare invece l'attività chinasi fotoindotta in PST sono stati allestiti esperimenti con ATP radioattivo sulla proteina intera allo stato di luce e allo stato di buio, in modo da evidenziare

eventuali differenze nello stato di autofosforilazione in rapporto alla presenza di luce blu. Inoltre, sempre con ATP radioattivo sono stati esaminati il costrutto contenente i domini LOV-HK e le eventuali conseguenze dell'aggiunta del dominio RR alla soluzione.

2 Materiali e metodi

2.1 Preparazione campioni

Le proteine sono state espresse in modo eterologo utilizzando cellule in *E. coli* BL21 DE3 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) precedentemente trasformate con il plasmide pET28a. Il plasmide reca inserito il gene di interesse ed un tag di istidine N-terminale (sequenza:MGSSHHHHHSSGLVPRGSH) che ne consente la purificazione per affinità su colonna di nichel. L'induzione dell'espressione è stata fatta con IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Le proteine sono state in seguito purificate con cromatografia di affinità su una colonna Talon (Qiagen, Hilden, Germany) ed infine concentrate in tampone sodio-fostato 10 mM, NaCl 10 mM, pH = 8. La purezza e l'integrità delle proteine sono state verificate con elettroforesi su gel. Per YtvA e i suoi costrutti il rapporto proteina-flavina era 1:1 nei campioni, come verificato attraverso il rapporto di assorbimento UV/visibile, che era inferiore a 4, a dimostrare l'assenza apoproteina [30].

Per ottenere la proteina PST-LOV è stato in precedenza isolato il DNA di *Pseudomonas syringae tomato* (PST) DC3000, da cui è stato clonato il gene corrispondente e successivamente inserito nel plasmide pET28a (lavoro svolto da Zhen Cao, MPI-Muelheim), sempre fornito di un tag His₆. L'espressione eterologa in *E. coli* BL21 DE3 (Stratagene, Amsterdam, Paesi Bassi), è stata indotta con IPTG (30°C, 1mM, per 6 ore). PST-LOV è stata isolata dalle cellule rotte di *E.coli* (la lisi è stata ottenuta in azoto liquido grazie all'Ultraturrax, IKA, Staufen, Germania) attraverso un passaggio del lisato (separato attraverso ultracentrifugazione, 368.000 x g, 1 ora, 4°C) sopra una colonna di cromatografia per affinità alla resina di Ni⁺ (Prochem, Englewood, CO). La proteina così ottenuta si è rivelata sufficientemente pura ed è stata quindi utilizzata per successivi studi senza ulteriori processi di purificazione. Gli spettri MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) sono stati misurati con un ABI Voyager DE Pro MALDI-time-of-flight (TOF), utilizzando Sina e 2,5 acido diidrossibenzoico come matrice.

A partire dal costrutto per PST-LOV, sono stati in seguito clonati i geni per le proteine troncate (Zhen Cao, MPI-Muelheim):

- 1) il dominio LOV associato al dominio motivo HPK (aa 1-402), denominato PST-LOV_{ΔRR} con un cappuccio His₆ N-terminale

2) il dominio RR separatamente (aa 403-534), con un cappuccio His₆ C-terminale

La procedura di espressione e purificazione è analoga a quanto sopra descritto. Per valutare la composizione del cromoforo la proteina è stata denaturata attraverso il riscaldamento a 100°C per 10 min, in seguito a questo procedimento la proteina denaturata è stata eliminata attraverso centrifugazione a 14.000 rpm per 20 min. Il supernatante così ottenuto è stato concentrato con un *Microcon YM3* (13.000 rpm, 1 h, millipore, Billerica, MA, molecular weight cutoff 3.000) e poi analizzato direttamente con HPLC (High Performance Liquid Chromatography), ciascuna iniezione è stata ripetuta due volte per seguire errori statistici. Per l'HPLC è stato utilizzato un sistema Shimadzu (LC10Ai; Shimadzu Deutschland, Duisburg, Germania), impiegando una colonna 250/4 C18-RP (Macherey e Nagel, Dueren, Germania). La colonna è stata allestita con una precolonna dello stesso materiale, come solventi sono stati utilizzati acetato d'ammonio 50 mM a pH 6 (eluente B) e acetonitrile al 70% (eluente A). Come composti di riferimento sono stati utilizzati FMN, flavin-adenine dinucleotide (FAD) e riboflavina (acquistata presso Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Oltre a questo, gli spettri dei campioni discesi sono stati registrati durante la separazione con un sistema ad *array* di diodi. Un gradiente di solvente è stato applicato (t=0, 5:95 A:B, t=20 min, 40:60 A:B, t=22 min, 40:60 A:B, t=29 min, 5:95 A:B).

Il derivato fluorescente del GTP, Guanosina-5'-trifostato, BODIPY[®] TR 2'-(o -3')-O-(N-(2-amminoetil)uretano), sale trisodico (GTP_{TR}) è stato comprato da Molecular Probe (Eugene, OR, USA); mentre dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia), sono stati comprati Guanosina-5'-[γ-thio] trifosfato sale tetrasodio (GTP), Guanosina-5'-[γ-thio] difosfato sale trilitio (GDP), e Guanosina-5'- monofosfato sale disodico (GMP).

2.2 Cromatografia su gel

Gli esperimenti di cromatografia di massa su gel sono stati realizzati grazie ad una strumentazione PLC *Pharmacia*, utilizzando una colonna Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences), equilibrata con soluzione tampone Sodio-fosfato 10 mM, pH = 8, NaCl 150 mM. La curva di calibrazione è stata costruita utilizzando il kit di calibrazione a basso peso molecolare della Amersham Biosciences, composto dalle seguenti proteine: albumina da siero bovino (69 kDa), ovalbumina (42,7 kDa), α-chimotripsina (25 kDa), mioglobina (16,9 kDa), e ribonucleasi (13,7 kDa). La proteine analizzate sono state caricate ad una concentrazione fra 1 e

50 μ M per ottenere in uscita una concentrazione intorno agli 0,05 – 2,5 μ M. In alcuni casi si è proceduto anche alla raccolta dei campioni in uscita in modo da poterne analizzare lo spettro e verificare la discesa della proteina.

2.3 Elettroforesi su gel

Per verificare la purezza dei campioni è stata utilizzata l'elettroforesi su gel, la realizzazione del gel prevede la preparazione di quattro soluzioni stock: 30 ml di *Acrilammide/BIS*, ottenuta con 8,76 g di acrilammide e 0,24 g di BIS-metilene acrilammide; 15 ml di *Tris-HCl 1.5 M* portato a pH 8.8 attraverso una soluzione di HCl 1N; *Tris HCl 0.5 M* portato a pH 6.8; 10% SDS (Sodio Dodecil Solfide). A partire da queste soluzioni sono stati preparati il sample buffer e il buffer di corsa. Il primo è così composto: 3.55 ml di acqua, 1.25 ml di Tris-HCl 0.5 M, 2,5 ml di glicerolo, 2 ml di 10% SDS, 0,2 ml di bromofenolo blu e 50 μ l di β -mercaptoetanololo; il buffer di corsa è invece composto da: 1 l di acqua, 3 g di Tris base, 14,4 g di glicina e 1 g di 10% SDS.

La composizione finale del gel di corsa prevede : 6,8 ml di acqua, 8 ml di bis acrilammide, 5 ml di sample buffer e 0,2 ml di 10% SDS, mentre lo *stacking* gel, ovvero la zona in cui verranno caricati i campioni, è così costituita: 6,1 ml di acqua, 1,3 ml di bis/acrilammide, 2,5 ml di sample buffer e 0,1 ml di 10% SDS. Entrambe le soluzioni appena descritte sono state fatte degasare per 15 minuti, e di seguito sono stati aggiunti come innesco per la polimerizzazione 10 μ l di TEMED e rispettivamente 100 μ l di APS al 10% per il gel di corsa e 50 μ l per lo *stacking* gel, a questo punto si sono riempiti i vetrini con il gel di corsa per uno strato di circa 6 cm, dopo un'ora, a polimerizzazione avvenuta, è stato sovrapposto lo *stacking* gel, nel quale sono stati creati i pozzetti di caricamento; una volta che anche il secondo strato è risultato completamente asciutto sulla superficie superiore è stato aggiunto il buffer di corsa. I campioni sono stati diluiti in sample buffer 1:2, e sono stati denaturati a 40 °C per 4 minuti; caricati i campioni e i marker nei pozzetti i vetrini sono stati inseriti nella vaschetta con buffer di corsa, ed il sistema è stato collegato ad un'alimentazione esterna. A corsa finita la colorazione è stata realizzata per mezzo della *staining solution*, composta da: 200 ml di metanolo, 250 ml di acqua, 50 ml di acido acetico e 0,1 % blue comassie, nella quale il gel è stato lasciato a bagno per un paio d'ore. Dopo essere stato decolorato nella *destaining solution* il gel è stato fatto seccare per 2 h a 80 °C.

2.4 Spettroscopia di assorbimento

Gli spettri di assorbimento di tutte le misure relative ai vari costrutti di YtvA sono stati registrati attraverso uno spettrofotometro Uv/visibile Jasco 7850, gli studi sui costrutti di PST-LOV sono stati invece condotti attraverso uno spettrofotometro UV-2401PC della Shimadzu (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Germania) con temperatura fissa a 20°C, tampone fosfato 10 mM, NaCl 10 mM, pH 8. Le condizioni di fotoequilibrio, con accumulazione dello stato fotoattivato, sono state raggiunte grazie ad una lampada LedLenser® V8, con massimo di emissione a 470 nm (Zweibrüder Optoelectronics, Soelingen, Germania).

2.5 Spettroscopia di fluorescenza

Gli spettri di fluorescenza sono stati registrati con uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-50 a 20°C con un cammino di eccitazione pari a 0,4 nm. Gli spettri sono stati corretti dividendo l'intensità totale (integrata su tutte le lunghezze d'onda) per la frazione di energia assorbita ($1 - 10^{-\text{Abs}}$), dove Abs = assorbimento alla lunghezza d'onda d'eccitazione, in modo da ottenere un segnale proporzionale al rendimento quantico di fluorescenza (Φ_F). Gli esperimenti di legame con GTP_{TR} (*binding*) sono stati realizzati con YtvA nello stato attivato da luce-blu (cioè con l'FMN legato covalentemente alla cisteina 62) ottenuto illuminando il campione con una lampada che emette luce nel blu (vedi paragrafo 2.4). Gli spettri di fluorescenza sono stati sempre registrati con eccitazione a 590 nm, in modo tale che solo il GTP_{TR} fosse in grado di assorbire la luce e che non potessero avvenire fenomeni di energy transfer nei confronti di altri fluorofori. La costante di dissociazione (K_D) fra YtvA e il GTP_{TR}, e il massimo di fluorescenza ΔF_{max} sono stati ricavati realizzando una interpolazione (*fitting*) dei dati sperimentali con l'equazione non lineare [31]:

$$[P]_{\text{tot}} = \frac{K_D + 1 - \Delta F / \Delta F_{\text{max}}}{\Delta F_{\text{max}} / \Delta F - 1}$$

Dove $[P]_{\text{tot}}$ è la concentrazione di YtvA e ΔF è il valore assoluto della differenza fra la fluorescenza normalizzata del GTP_{TR} da solo e in presenza di YtvA. Un *fitting* accettabile dei valori sperimentali rispetto all'equazione sopra riportata indica che si forma un complesso 1:1 ed

è equivalente a ricavare un grafico di Scatchard lineare che intercetta l'asse x nel punto 1. La concentrazione di GTP_{TR} è stata sempre tenuta a 1 μM , mentre la concentrazione di YtvA è stata fatta variare fra 2 e 55 μM .

Per misurare il Φ_F della flavina legata a PST, è stato utilizzato come standard FMN (Fluka, Neu-Ulm, Germania) $\Phi_F = 0.26$ [32]. Le misure sono state realizzate ad una temperatura di 10°C con una lunghezza d'onda di eccitazione di 450 nm in modo da raggiungere condizioni simili a quelle degli esperimenti fototermici [33]. Le altre misure di fluorescenza (con eccitazione a 295 e 280 nm) sono state realizzate a 20°C.

2.6 Dicroismo Circolare

Gli esperimenti di Dicroismo Circolare (CD) sono stati condotti con uno spettropolarimetro Jasco J715 calibrato con acido d'ammonio d-10-camforsulfonico; le misure sono state realizzate nella regione del lontano ultravioletto (190-250 nm) ad una temperatura di 20°C, con un cammino ottico di 0,2 cm, lo spettro del tampone è sempre stato sottratto prima di procedere all'analisi. La concentrazione delle proteine è stata stimata utilizzando i coefficienti di assorbimento a 220 nm: $^{YTV A}\epsilon_{220} = 492800 M^{-1}cm^{-1}$, $^{YLOV}\epsilon_{220} = 223900 M^{-1}cm^{-1}$, $^{N-YLOV}\epsilon_{220} = 267900 M^{-1}cm^{-1}$, $^{PST}\epsilon_{220} = 971570 M^{-1}cm^{-1}$, $^{PST-LOV \Delta RR}\epsilon_{220} = 740077 M^{-1}cm^{-1}$, $^{RR}\epsilon_{220} = 247277 M^{-1}cm^{-1}$, i coefficienti d'assorbimento sono stati calcolati in rapporto a quello dell'FMN in una soluzione con rapporto proteina - cromoforo 1:1, ovvero $^{FMN}\epsilon_{447} = 12500 M^{-1}cm^{-1}$. Il coefficiente di assorbimento del cromoforo a 220 nm è pari a: $^{FMN}\epsilon_{220} = 34500 M^{-1}cm^{-1}$, si può quindi concludere che il cromoforo contribuisce in modo trascurabile all'assorbimento nella regione UVB, dominato dal legame peptidico dei molti aminoacidi presenti. I coefficienti relativi a PST-LOV e ai suoi domini sono stati dedotti a partire da quello di YtvA riproporzionandolo per il numero degli amminoacidi. L'ellitticità media per residuo aminoacidico (Θ_{MRW}) è stata calcolata utilizzando la seguente formula: $\Theta_{MRW} = \Theta_{obs}/(10 \times cl)$ Dove Θ_{obs} è in mdeg, l è il cammino ottico = 0.2 cm, c è la concentrazione dei residui (281 aa / proteina per YtvA, 122 aa / proteina per YLOV, 146 aa/ proteina per N-YLOV, 554 aa / proteina per PST-LOV, 422 aa / proteina per PST-LOV $_{\Delta RR}$, 141 aa / proteina per RR, includendo anche il tag), Θ_{MRW} risulta quindi essere espressa in deg $cm^2 dmol^{-1}$. Tipicamente, la concentrazione proteica è nell'ordine del μM e c =

$10^{-6} \times 281 = 2.8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ per YtvA, $c = 10^{-6} \times 122 = 1.2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ per YLOV, $c = 10^{-6} \times 146 = 1.5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ per N-YLOV, $c = 10^{-6} \times 554 = 5.5 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ per PST-LOV $c = 10^{-6} \times 422 = 4.2 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ per PST-LOV_{ARR} e $c = 10^{-6} \times 141 = 1.4 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ per RR. La predizione della struttura secondaria a partire dagli spettri CD è stata realizzata mediante l'algoritmo di calcolo CCA (*Convext Constraint Analysis*) [34, 35] supportato da un database di 46 spettri proteici [35, 36]. Tale algoritmo si basa su due vincoli, come prima cosa la somma dei pesi frazionali di tutte le componenti spettrali deve essere pari a 1. In secondo luogo si definisce un volume di minimizzazione detto "di vincolo" che permette di estrarre un numero finito di curve componenti da un set di spettri senza fissarle su nodi spettrali. CCA non utilizza dati cristallografici di raggi X nel processo di deconvoluzione: una volta che il software presenta le "curve pure" è l'operatore stesso che deve assegnarle ad una determinata struttura secondaria. Lo spettro totale viene sempre comunque considerato una combinazione lineare tra le varie curve pure.

2.7 Modelling computazionale

Il modello per il dominio STAS (residui 147-254) è stato ottenuto utilizzando la struttura cristallina TM1442 (codice PDB: 1VC1) come stampo [37], attraverso il software What if [38]. Il residuo P229, corrispondente ad un gap nell'allineamento è stato inserito nella struttura grazie al software DeepViewer [39], ed il *loop* K228-E230 è stato ricostruito. Infine attraverso il calcolo energetico di Gromos96 implementato in SwissPdbViewer [40] è stata condotta una minimizzazione energetica del modello complessivo.

Le simulazioni di *docking* del dimero YLOV sono state realizzate sul Server ClusPro [41], utilizzando i programmi DOT 1.0 [42] e ZDOCK v. 2.3 [43], a partire dal modello strutturale di YLOV già pubblicato (codice di accesso PDB: 1IUM) [27]. L'algoritmo di *docking* ClusPro valuta miliardi di potenziali complessi, tenendone solo un numero predefinito con superfici favorevolmente compatibili. A questo gruppo di complessi viene poi applicata una nuova sgrossatura attraverso criteri di forze elettrostatiche e buone energie libere. La valutazione dei modelli predetti da ClusPro è stata realizzata utilizzando il VADAR tool [44], che calcola alcuni parametri relativi alla catena amminoacidica quali la superficie accessibile e la percentuale di

catene laterali idrofobiche accessibili. La qualità dei modelli di dimero YLOV predetti da ClusPro è stata altresì analizzata mediante il *Structure Analysis and Validation Server* (SAVS) del Laboratorio della genomica e proteomica strutturale all'Università della California, Los Angeles (UCLA) (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>), che implementa i programmi PROCHECK [45], WHAT_CHECK [46], ERRAT, VERIFY_3D [47], e PROVE [48]. Infine per predire la superficie di interazione del dimero YLOV sono stati utilizzati PPI-pred [49] ed il *virtuale scanning* di Alanina al Robetta server [50].

Anche per ottenere la struttura modello del complesso dimerico YLOV-YLOV è stata utilizzata la stessa metodologia (vedi descrizione precedente anche sui metodi di valutazione dei diversi modelli).

2.8 Esperimenti di radioattività

Sono stati realizzati esperimenti di auto e trans-fosforilazione utilizzando ^{32}P - γ -ATP (37mBq 100 μl , Hartmann Analytik, Braunschweig, Germania). Un tampone di reazione da 100 μl contiene 20 μg di frammenti di PST-LOV o PST-LOV_{ARR} [51]. Le reazioni sono state realizzate a temperatura ambiente sia nello stato di buio che in quello di luce. A dati intervalli temporali 10 μl della miscela di reazione sono stati estratti e miscelati con 10 μl di stop buffer sodio dodecilsolfato (SDS) [51]. Per gli esperimenti di transfosforilazione un eccesso 10 x (m/m) del dominio RR è stato aggiunto nella provetta di reazione. Di nuovo 10 μl della nuova miscela sono stati pescati a determinati intervalli temporali e miscelati con 10 μl di stop buffer. Dopo aver riscaldato a 55°C per 5 minuti, le proteine radioattive sono state separate su gel SDS-poliacrilammide per elettroforesi (PAGE), e poi tenute nella cassetta BAS 2025 (Fujifilm, Tokyo, Giappone) per determinazione della radioattività. Gli autoradiogrammi sono stati ottenuti grazie ad un analizzatore di immagini di fluorescenza FLA-3000 (Fujifilm). L'intensità dei punti è letta come PSL mm^{-2} (PSL, luminescenza fotostimolata). La dimensione dei pixel è pari a 50 x 50 μm^2 .

3 L'analisi conformazionale della proteina sensibile alla luce blu YtvA rivela un'interfaccia competitiva per la dimerizzazione LOV-LOV e le interazioni interdominio

La riproduzione dell'articolo è stata gentilmente concessa dalla *Royal Society of Chemistry* (RSC)

Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV–LOV dimerization and interdomain interactions†

Valentina Buttani,^a Aba Losi,^{*a,b} Thorsten Eggert,^c Ulrich Krauss,^c Karl-Erich Jaeger,^c Zhen Cao^d and Wolfgang Gärtner^d

Received 20th July 2006, Accepted 6th October 2006

First published as an Advance Article on the web 27th October 2006

DOI: 10.1039/b610375h

The *Bacillus subtilis* protein YtvA is related to plant phototropins in that it senses UVA–blue-light by means of the flavin binding LOV domain, linked to a nucleotide-binding STAS domain. The structural basis for interdomain interactions and functional regulation are not known. Here we report the conformational analysis of three YtvA constructs, by means of size exclusion chromatography, circular dichroism (CD) and molecular docking simulations. The isolated YtvA-LOV domain (YLOV, aa 25–126) has a strong tendency to dimerize, prevented in full-length YtvA, but still observed in YLOV carrying the N-terminal extension (N-YLOV, aa 1–126). The analysis of CD data shows that both the N-terminal cap and the linker region (aa 127–147) between the LOV and the STAS domain are helical and that the central β -scaffold is distorted in the LOV domains dimers. The involvement of the central β -scaffold in dimerization is supported by docking simulation of the YLOV dimer and the importance of this region is highlighted by light-induced conformational changes, emerging from the CD data analysis. In YtvA, the β -strand fraction is notably less distorted and distinct light-driven changes in the loops/turn fraction are detected. The data uncover a common surface for LOV–LOV and intraprotein interaction, involving the central β -scaffold, and offer hints to investigate the molecular basis of light-activation and regulation in LOV proteins.

Introduction

B. subtilis YtvA is a blue-light responsive protein (261 aa), carrying a flavin-binding LOV (light, oxygen, voltage) domain, with LOV belonging to the PAS (PerArntSim) superfamily.¹ The photochemical LOV paradigm has emerged during the last years, thanks to the discovery and molecular characterization of phototropins (phot), blue-light receptors for a variety of responses in plants.^{2–4} Phot are organized in two N-terminal LOV domains (LOV1 and LOV2, ca. 110 amino acids) and a C-terminally located ser/thr kinase domain. A self-phosphorylation reaction^{5,6} is activated by UVA–blue light illumination of phot, thanks to the activation of the LOV domains that carry a flavin-mononucleotide (FMN) as chromophore.⁷ Light activation of LOV domains triggers a photocycle that involves the reversible formation of a covalent adduct between a conserved cysteine residue and position C(4a) of FMN,^{7–11} formed upon decay of the FMN triplet state.^{12–14} Despite the similarities in the light-triggered reactions, the two phot-LOV

domains have not the same functional significance, with the self-phosphorylation reaction being mostly mediated by LOV2,^{15,16} that also presents a larger quantum yield for the formation of the covalent adduct.⁹ The LOV paradigm is configuring as one of the most conserved among distant phyla, and LOV proteins are now well documented in eukaryotes and prokaryotes.^{17,18} In bacteria they are present in about 15–17% of the sequenced genomes, and light-induced, phot-like reactions have been demonstrated for some of them.^{18–20}

Although the mechanistic details of the photochemical FMN–Cys adduct formation are still under debate (see ref. 19 and references therein, and ref. 21) the photocycle of LOV domains is by far the best characterized part of the light-to-signal transduction chain, thanks to the fact that isolated LOV domains are readily expressed and have been functionally and structurally analyzed.^{9,10,22,23} A structure of full-length phot is not yet available and little is known about the mechanism leading to kinase activation and on the protein surfaces involved in domain–domain interactions. Light-driven unfolding of the helical linker connecting LOV2 and the kinase domain (J α -linker) has been recently proposed to trigger the self-phosphorylation reaction, based on NMR spectroscopy and mutagenesis experiments.^{24,25} This idea has recently been challenged by the observation that the J α -linker is not needed either for LOV2–kinase interaction or for light-driven phosphorylation of a heterologous substrate.¹⁵

In prokaryotes the LOV light-sensing module is coupled to diverse effector domains, such as kinases (similar to phot), phosphodiesterases, response regulators, DNA-binding transcription

^aDept. of Physics, University of Parma, via G.P. Usberti 7/A, 43100-Parma, Italy. E-mail: losia@fis.unipr.it

^bCNR-IFEM, Parma, Italy

^cInstitut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, Forschungszentrum Jülich, D-52426 Jülich, Germany

^dMax-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Stiftstr. 34–36, 45470 Mülheim, Germany

† Electronic supplementary information (ESI) available: Calculation of accessible and buried surface areas using the VADAR tool. See DOI: 10.1039/b610375h

factors, regulators of stress sigma factors.^{17,18,26} Therefore, besides the intrinsic interest regarding their structure, function and physiological role, they also represent a powerful tool to understand fundamental and still open questions in the field of LOV-based photoperception. (i) Are the light-induced reactions, centered on the LOV domain, transmitted to effector partners by means of the same molecular mechanisms, and do LOV domains interact with partner domains by means of the same protein surface? In phot1-LOV2 the central β -scaffold has been demonstrated to participate in interdomain communication, making contact with the *Ja*-linker.^{24,25} A similar process has been observed with phot2-LOV2.²⁷ (ii) Why only one LOV domain is present in bacterial LOV proteins, whereas phot possess two of such units organized in tandem?^{17,18} The LOV2 domain has a higher photocycle quantum yield than LOV1,⁹ and acts as the principal light-sensing domain triggering phot1 and phot2 kinase activity, whereas LOV1 might have a regulative role.¹⁶ The amino acid sequence of bacterial LOV domains has in general intermediate characteristics between LOV1 and LOV2.¹⁸ (iii) Which factors govern LOV-LOV dimerization, considered a key feature in PAS-mediated sensing/regulation,^{28,29} and which is the relevance of it during light sensing? It was shown by gel filtration chromatography that phot1-LOV1 has a tendency to dimerize, whereas LOV2 is monomeric.³⁰ This has led to the suggestion that LOV1 is responsible for phot dimerization, providing a possible functional role for the tandem organization of LOV domains in phot.³⁰ By means of pulsed thermal grating Terazima and coworkers, detected a transient volume increase (about 1.8 times, with time constant of 300 μ s) during light activation of an extended phot1-LOV2 construct (including an N-terminal cap and the *Ja*-linker), and interpreted this phenomenon as a transient dimerization,³¹ whose functional significance is not known. Dimeric states have been detected by means of small-angle X-ray scattering (SAXS) for the LOV domain of FKF1³² and phot LOV1 domains.³³ The SAXS experiments showed that phot1-LOV2 is a dimer (in contrast with ref. 30 and 31) whereas phot2-LOV2 is monomeric.³³ The LOV domain of WC-1 from *Neurospora* has also been shown to homodimerize *in vitro*.³⁴

In this work we have investigated three different constructs of YtvA, in order to partially address these problems. In YtvA the LOV domain is linked to a C-terminal STAS domain (sulfate transporters antisigma-factor antagonists).³⁵ This architecture is conserved in LOV proteins from other Firmicutes, e.g. in *Listeria* and *Oceanobacillus* genera.¹⁸ Recent work has shown that YtvA is a positive regulator in the environmental signaling pathway that activates the general stress factor σ^B ^{36,37} and, most importantly, that the cysteine involved in the photoadduct formation is needed for its *in vivo* function,³⁷ in turn regulated by blue-light activation.³⁸ These last two recent studies allow to regard YtvA as a real flavin-based blue-light photoreceptor in *B. subtilis*, not only a blue-light sensitive protein. The STAS is thought to be the effector domain of YtvA, although little is known of its molecular functionality, with the exception that it confers to YtvA the ability to bind GTP and ATP,³⁹ in analogy with another STAS protein.⁴⁰ The constructs that we used are the LOV core (YLOV, aa 25–126), the N-YLOV comprising also the first 24 aa (aa 1–126) and the full-length protein YtvA. We applied gel filtration chromatography to detect possible dimers and circular dichroism spectroscopy for secondary structure determination, improving the data analysis with respect to previous work.⁴¹ The data uncover a common surface for YLOV

homodimerization and interdomain interactions, and corroborate a molecular model of the YLOV dimer obtained by docking simulations. Similarities and differences with phot-LOV domains are discussed.

Experimental

Protein samples and chemicals

For the N-YLOV protein, the DNA sequence encoding LOV core + N-terminal cap (aa 1–126 of the full protein) was amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). The recombinant plasmid of full-length YtvA in (pET28a) was used as template, the primers were:

5'-CAGCCATATGGCTAGTTTTCAATCATT (forward)

5'-TATTACTCGAGTTAGGTGATATCATTCTGAATTC (reverse)

Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used for the PCR. PCR product, digested with NdeI/XhoI (NEB, Ipswich, UK), was ligated into the expression vector pET28a (Novagen-Merck, Darmstadt, Germany), which was digested with the same restriction enzymes. An N-terminal extension, including the 6 \times His-tag (sequence: MGSSHHHH-HHSSGLVPRGSH) was furnished, in the same way as for YtvA and YLOV. For the details of full-length His-tagged YtvA and its isolated LOV core (YLOV) generation, see previous reports.^{19,42} The His-tagged proteins were expressed in *E. coli* BL21 DE3 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using IPTG (BioMol, Hamburg, Germany) induction. The proteins were then purified by affinity chromatography on Talon (Qiagen, Hilden, Germany) and finally concentrated in Na-phosphate buffer 10 mM, NaCl 10 mM, pH = 8.

Chromatography

Gel filtration chromatography experiments were performed on a Pharmacia FPLC apparatus, using a Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Biosciences), equilibrated with Na-phosphate 10 mM, pH = 8, NaCl = 0.15 M. A calibration curve was made using bovine serum albumin (69 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), α -chymotrypsin (25 kDa), myoglobin (16.9 kDa) and ribonuclease (13.7 kDa) (low M_w calibration kit, Amersham Biosciences). YtvA, YLOV and N-YLOV were loaded on the column at a concentration between 1 and 50 μ M, to give a final concentration ranging from 0.05 to 2.5 μ M at the detection peak, due to dilution through the column.

Circular dichroism spectroscopy and data analysis

Circular dichroism (CD) experiments were carried out using a Jasco J715 spectropolarimeter, calibrated with ammonium d-10-camporsulfonic acid. The measurements were carried out in the far-UV spectral region (195–240 nm) at a temperature of 20 °C and the buffer background was always subtracted. The optical pathlength was 0.2 cm. Protein concentration was estimated from the absorption coefficient at 220 nm, $\epsilon_{220}^{\text{YtvA}} = 492800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{220}^{\text{YLOV}} = 223900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and $\epsilon_{220}^{\text{N-YLOV}} = 267900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculated by comparison with $\epsilon_{447}^{\text{FMN}} = 12500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, in a 1 : 1 protein to chromophore ratio (*vide infra*). The corresponding value for FMN is $\epsilon_{220}^{\text{FMN}} = 34500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, thus introducing a negligible error also in case that some apoprotein is present. The mean

residue ellipticity θ_{MRW} was calculated from the concentration of residues, c , (281 aa for YtvA, 122 aa for YLOV and 146 aa for N-YLOV, including the tag, according to the formula $\theta_{MRW} = \theta_{obs}/(10 \times cl)$, where c is in mol liter⁻¹, $l = 0.2$ cm and θ_{obs} is in mdeg and θ_{MRW} in deg cm² dmol⁻¹. Typically, the protein concentration was in the μ M range and $c = 10^{-6} \times 281 = 2.8 \times 10^{-4}$ mol liter⁻¹ for YtvA, $c = 10^{-6} \times 122 = 1.2 \times 10^{-4}$ mol liter⁻¹ for YLOV and $c = 10^{-6} \times 146 = 1.4 \times 10^{-4}$ mol liter⁻¹ for N-YLOV. Prediction of secondary structure composition was performed using the convex constraint analysis (CCA) algorithm,^{43,44} and an extended curves dataset comprising 46 protein spectra.⁴⁵ In CCA, the sum of the fractional weights of each component spectrum is constrained to be 1. In addition, a constraint-called volume minimization is defined which allows a finite number of component curves to be extracted from a set of spectra without relying on spectral nodes. CCA does not use X-ray crystallographic data in the deconvolution procedure. Once the basis curves are obtained, they must be assigned to specific secondary structures. The secondary structure was also predicted from the amino acid sequence by means of bioinformatic tools, using the consensus secondary structure prediction method at the Pôle Bioinformatique Lyonnais.⁴⁶

Docking simulation, evaluation of complexes and model validation

Docking simulations of the YLOV dimer were carried out at the ClusPro Server,⁴⁷ using the DOT 1.0⁴⁸ and ZDOCK v. 2.3⁴⁹ programmes, employing the previously published YLOV structural model (PDB databank accession code 1IUM).¹⁹ The ClusPro docking algorithm evaluates billions of putative complexes, retaining a preset number with favourable surface complementarities. A filtering method is then applied to this set of structures, selecting those with good electrostatic and desolvation free energies for further clustering. Evaluation of the ClusPro predicted complexes was carried out using the VADAR tool,⁵⁰ which calculates multi-chain parameters such as the accessible surface area and the percentage of accessible hydrophobic side chains. The quality of the ClusPro predicted YLOV dimer model was verified by using the protein structure analysis and validation server (SAVS) of the NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics at the University of California, Los Angeles (UCLA) (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>) that implements the programs PROCHECK,⁵¹ WHAT_CHECK,⁵² ERRAT,⁵³ VERIFY_3D,⁵⁴ and PROVE.⁵⁵ Additionally, PPI-Pred⁵⁶ and the computational interface alanine scanning tool at the Robetta server⁵⁷ were used to predict the dimerization interface of the YLOV-monomer and of the YLOV dimers respectively.

Results and discussion

Gel filtration chromatography

The elution profile of YLOV (Fig. 1) reveals that the majority of the protein is present in a state having $M_w = 36.44$ kDa, namely 2.63 times larger than the theoretical M_w (13.81 kDa, considering also the 20 aa at the N-terminal His-tag). This suggests a dimeric state that deviates from a spherical shape, as previously reported for other LOV domains.^{30,32,33} Traces of a globular monomer are observable in some preparations, as well as a small fraction of a

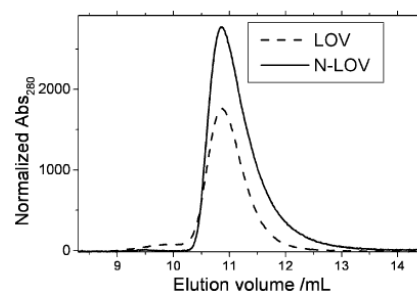


Fig. 1 Elution profiles of the YLOV (dashed line) and N-YLOV (full line) domains of YtvA. The main peaks correspond to $M_w = 2.6 \times M_{wYLOV}$ and $M_w = 2.1 \times M_{wN-YLOV}$, respectively.

larger aggregate, most probably a trimer, with $M_w = 51.97$ kDa. Light activation does not appreciably affect the elution profile of YLOV. N-YLOV is also mostly present in a dimeric state, with apparent $M_w = 34.00$ kDa, 2.06 times larger than the theoretical M_w (16.54 kDa, again including the His-tag). For N-YLOV the shape of the dimer is therefore approximately spherical.

The full-length protein YtvA presents a larger heterogeneity and the elution profile is different among different preparations (Fig. 2). Up to three peaks can be identified, with peak 1 resulting in $M_w = 72.85$ kDa, peak 2 with $M_w = 48.39$ kDa and peak 3 with $M_w = 35.07$ kDa. The theoretical M_w of YtvA is 31.36 kDa, therefore we can assign the three peaks to a dimeric state (peak 1), an elongated monomer (peak 2, $M_w = 1.56 \times M_{wYtvA}$) and a spherical monomer (peak 3, $M_w = 1.12 \times M_{wYtvA}$). Peak 2 (elongated monomer) represents in all YtvA preparations observed

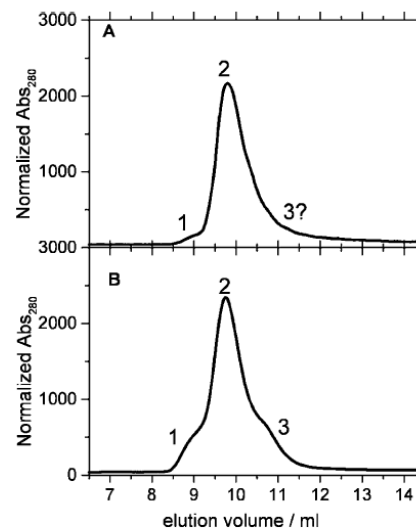


Fig. 2 Elution profile of 2 different YtvA preparations. Peak 1 corresponds to $M_w = 2.32 \times M_{wYtvA}$ ($M_{wYtvA} = 31.36$ kDa); peak 2 corresponds to $M_w = 1.56 \times M_{wYtvA}$; peak 3 corresponds to $M_w = 1.12 \times M_{wYtvA}$. A. YtvA : FMN = 1 : 1 (no apoprotein). B. YtvA : FMN \approx 2 : 1 (apoprotein is present).

(nine in total) the predominant protein fraction. Peaks I and 3 are more evident in preparations that contain considerable amount of apoprotein (without the flavin chromophore). Nevertheless, even in these cases, the flavin chromophore is present in all three fractions, as proven by detection at 390 nm (data not shown). Again light activation does not result in appreciable changes in the elution profile. For the three protein constructs, the elution profile is not affected by concentration, in the low range employed here (0.05–2.5 μM).

As a whole, the gel filtration experiments show that the LOV domain of YtvA has a strong tendency to dimerize in solution that is not hindered by the N-terminal cap. Dimerization is instead prevented by the presence of the C-terminal domain of the protein, pointing to the fact that the LOV core employs the same surface (partially or totally) for homodimerization and for interdomain interactions.

Circular dichroism spectroscopy

The UV-CD spectra for the three analyzed constructs of YtvA, in the dark adapted state, are shown in Fig. 3. The mean residue ellipticity, Θ_{MRW} , was calculated as explained in the experimental section. The spectra shown are an average of all measurements (5 sets of measurements with 2 different preparations for YLOV; 4 sets of measurements with 2 different preparations for N-YLOV; 11 sets of measurements, 9 different preparations for YtvA), but each single spectral output was analyzed separately using the CCA algorithm.

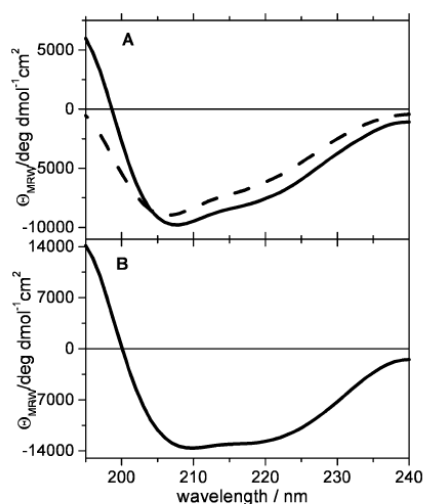


Fig. 3 CD spectra in the UV region for (A) the YLOV (dashed line) and N-YLOV (full line) domains and (B) full-length YtvA, in the dark adapted state.

A critical step during CCA analysis of CD data, is the assignment of the component curves (Fig. 4) to specific secondary structures. In the literature there is a large agreement about the CD spectrum of regular α -helices and unordered polypeptides

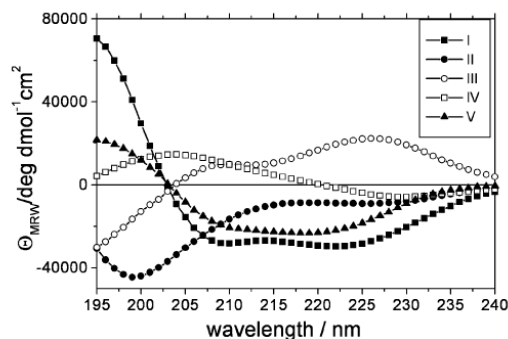


Fig. 4 The 5 component curves as extracted from the CCA analysis. The assignment is as follows: I, α -helix, II, unordered structures, III, turns and other structures, IV, distorted/twisted β -strands/parallel β -sheet, V, antiparallel β -sheet (see text for details).

(random coil, RC) that can be assigned to curve I and II respectively (ref. 58 and 59 and references therein).

Curve V was assigned to the turn fraction⁶⁰ and the β -structures were assigned to curve IV + V, whose sum is similar to the curve corresponding to β -strands in Matsuo *et al.*⁶⁰ Based on the fact that distorted/twisted β -sheets present a strong positive band in the 190–220 region,⁶¹ curve IV is assumed to include this fraction. Furthermore, the antiparallel β -sheet has three allowed transitions (the $\pi\pi^*$ transition is splitted),^{62,63} whereas the parallel β -sheet has two; therefore, we assigned curve V to the regular antiparallel β -sheet and curve IV to twisted + parallel β -sheet. Curve IV may also receive contributions from turn structures, in that different type of turns have very different CD spectra.^{44,64,65} The results of the CCA analysis, with the curve assignment as discussed above, are reported in Table 1, both for the dark and light-adapted state.

To test the quality/reliability of our component assignment, we made a prediction of secondary structure composition based on the three dimensional models of the LOV and STAS domains^{19,39} and on the consensus method for the remaining parts of the protein.⁴⁶ The N-cap and the linker region are predicted to be largely helical, whereas the His-tag (20 aa in length) is, as expected, predicted to be unordered (Table 2).

The comparison with CD data is very good in the case of the helical fraction, although for YtvA the statistical error associated with this component is quite large. This may be due to the variability in the preparations, and/or to the fact that component I and V are in some cases difficult to separate (see Fig. 4 and Table 1). The results confirm that the N-cap and the linker region are mostly helical. For full-length YtvA also the turn/loops and β -strands predicted fractions match the sum of component II + III and IV + V, respectively, within the experimental error, (Table 2), supporting our curve assignment. In the case of LOV and, particularly, N-LOV, the fraction of β -strands is smaller than expected, to the advantage of the RC/turns/others component. Furthermore, LOV domains do not contain parallel β -sheets^{19,22,23} and the large percentage associated to component IV has to be assigned to the distortion/twisting of the central, antiparallel β -scaffold. This is in contrast with YtvA, for which the number of α associated to component IV, can be readily explained with the presence of four parallel β -strands localized on the STAS

Table 1 Results of the CCA analysis on CD spectra

Secondary structure	LOV ^a (122 aa) ^b (%)		N-LOV ^a (147 aa) ^b (%)		YtvA ^a (281 aa) ^b (%)	
	Dark	Light	Dark	Light	Dark	Light
I, α -Helix	16.9 \pm 2.7 (21 \pm 3)	19.5 \pm 5.8 (24 \pm 7)	24.9 \pm 2.4 (37 \pm 4)	27.3 \pm 0.9 (40 \pm 1)	30.9 \pm 4.7 (87 \pm 13)	32.0 \pm 6.5 (90 \pm 18)
II, RC	23.9 \pm 4.1 (29 \pm 5)	22.8 \pm 3.9 (28 \pm 5)	24.9 \pm 0.9 (37 \pm 1)	23.6 \pm 0.9 (35 \pm 1)	22.4 \pm 1.0 (63 \pm 3)	21.7 \pm 3.5 (61 \pm 10)
III, β -Turns/others	27.9 \pm 1.1 (34 \pm 1)	28.8 \pm 2.3 (35 \pm 3)	27.5 \pm 1.0 (40 \pm 1)	28.3 \pm 1.5 (42 \pm 2)	16.8 \pm 3.6 (47 \pm 10)	18.7 \pm 3.5 (52 \pm 10)
IV, β -Twisted/ β -parallel	14.7 \pm 1.6 (18 \pm 2)	18.6 \pm 1.0 (23 \pm 1)	12.1 \pm 1.6 (18 \pm 2)	15.9 \pm 0.9 (23 \pm 1)	9.9 \pm 4.1 (28 \pm 11)	11.0 \pm 3.7 (31 \pm 10)
V, β -Antiparallel	16.2 \pm 4.1 (20 \pm 5)	10.2 \pm 4.7 (12 \pm 6)	10.6 \pm 3.4 (15 \pm 5)	4.9 \pm 2.1 (7 \pm 3)	19.9 \pm 5.6 (56 \pm 16)	16.6 \pm 5.8 (47 \pm 16)
$\left(\sum_{i=1}^n [y_i - f(\lambda)]^2\right)^{1/2}$ ^c	1.9 \pm 0.4	3.6 \pm 2.9	2.2 \pm 1.8	2.1 \pm 0.7	6.2 \pm 2.8	5.2 \pm 2.3

^a The statistical error is the standard deviation and comes from 5 sets of measurements on 2 different preparations for LOV, 4 sets of measurements on 2 different preparations for N-LOV, 11 sets of measurements, and 9 different preparations for YtvA. ^b The number of aa is given in parentheses, below the percentage, together with the statistical error. ^c Average squared error, where y_i = experimental curve, $f(\lambda)$ = fitting curve.

Table 2 Comparison between expected and CD-derived secondary structure composition

YtvA segments	Helices Number of aa	Turns/loops Number of aa	β -Strands Number of aa
His-Tag ^a	—	20	—
N-Cap ₁₋₂₄ ^a	10	13	1
LOV ₂₅₋₁₂₆ ^b	24	36	42
Linker ₁₂₇₋₁₄₆ ^a	18	2	—
STAS ₁₄₇₋₂₅₄ ^b	36	41	31
C-End ₂₅₅₋₂₆₁ ^a	2	4	1
YtvA ^c	90	116	75
N-LOV ^c	34	69	43
LOV ^c	24	56	42
CCA analysis—dark state	α-Helix	RC/turns/others	β-Strands
YtvA	87 \pm 13	110 \pm 9	84 \pm 17
N-LOV	37 \pm 4	77 \pm 1	33 \pm 5
LOV	21 \pm 3	63 \pm 4	38 \pm 5

^a Consensus secondary structure prediction at the Pôle Bioinformatique Lyonnais server.⁴⁶ ^b Structural homology models of the LOV core¹⁹ and of the STAS domain.³⁹ ^c Predicted number of aa for each of the constructs analyzed.

domain and a modest distortion of the overall β -fraction.³⁹ These observations suggest that dimerization in YLOV and N-YLOV markedly affects the central β -sheet of the LOV core (see the docking section).

Inspection of Table 1 and of the light – dark difference spectra (Fig. 5) shows that light activation of the three analyzed constructs does not result in large secondary structure conformational changes, as previously noticed for full-length YtvA.⁴¹ A further distortion of the central β -sheet is induced in YLOV and N-YLOV, and the difference spectra are very similar for the two proteins.

Light-induced changes of the central β -sheet have been recently demonstrated with low temperature Fourier transformed infrared spectroscopy (FTIR) also for phy3-LOV2.⁶⁶ The CD light-difference spectrum of phot1-LOV2 was interpreted as a loss of helical structure, but without the support of a detailed data analysis.⁶⁷

In full-length YtvA there is still a perturbation of the β -fraction, but a distinct change in the turn fraction (positive shoulder at ca. 230 nm in Fig. 5), missing in YLOV and N-YLOV. The determinations are affected by a large error, but confirmed by previous data as obtained with FTIR, that show a distinct

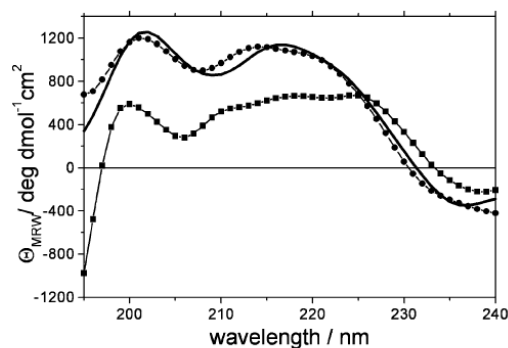


Fig. 5 Light – dark plots of the mean residue ellipticity Θ_{MRW} for YtvA (squares + line), LOV (circles + line) and N-LOV (full line), calculated from the average CD spectra (see Fig. 1 and Table 1).

difference between YtvA and YLOV in the light-induced changes of the turns fraction (around 1700 cm^{-1}).⁶⁸ These results could be

interpreted as a conformational change transmitted from the LOV core to the STAS domain, but actually we have no hint to localize precisely the position of the altered turn fraction, that could even be on the LOV domain itself and its changes being not detectable in the LOV dimers. Temperature-dependent FTIR experiments show indeed that changes in the turn fraction occur before the conformational alterations of the β -sheet in phy3-LOV2, the latter changes only detectable at room temperature.⁶⁶ In this view, the light-induced conformational changes could reach the β -scaffold only in the YLOV and N-YLOV dimers and be limited by the presence of the second domain, so that the changes on the turn fraction can persist during the lifetime of the adduct in YtvA.

The YLOV–YLOV dimer

The ClusPro best ranked model (ZDOCK generated) is shown in Fig. 6. A very similar model is ranked at the first position by using the DOT docking software (not shown).

The evaluation of the complexes performed with the VADAR tool,⁵⁹ reveals that this model has a quite large buried surface area as well as a high percentage of buried hydrophobic side-chains (33.76%) (see electronic supplementary information, ESI†). This feature would favour dimerization in an aqueous environment, and agrees with the fact that YLOV is a stable dimer in solution, even at very low concentrations. The quality of the model, evaluated at the SAVS server (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>) was as an overall good, with 84.1% of residues in most favoured regions, 12.5% of residues in additionally allowed region, 2.3% of residues in generously allowed regions and only 1.1% of residues in disallowed regions of the Ramachandran plot. The Verify-3D⁵⁴ score (96.1) and the Errat-quality factor⁵³ (98.9) were very high, both indicative of a reasonable and good resolved model-structure. Finally, the dimerization surface predicted with PPI-Pred⁵⁶ and Robetta,⁵⁷ identified high scoring regions for YLOV–YLOV interactions within A β , B β , H β and I β strands and the H β –I β loop (Fig. 6).

In the dimer models of Fig. 6, the two YLOV domains face each other with the central β -sheet, presenting an antiparallel mirror symmetry. The interface is mostly stabilized by hydrophobic interactions. This feature is not in common with phy3-LOV2, where a bunch of charged/polar amino acids forms an extended HB (hydrogen bonds) network with the corresponding residues on the second monomer, centered around His1011, Gln1013 (H β) and Asp1017 (H β –I β loop). Interestingly, His1011 and Gln1013 of LOV2 domains (Thr and A/T respectively on LOV1 domains), and this feature may account for the fact that LOV1 has a stronger tendency to dimerize than LOV2 in an aqueous environment.³⁰ Although the dimerization of phy3-LOV2 and the specific orientation of the two monomers may be an artifact of crystallization, a complex very similar to the phy3-LOV dimer is readily obtained by the docking algorithm (not shown) and the residues at the interface are part of the hot spots predicted by PPI-Pred and Robetta (Fig. 6). We note that for YLOV, complexes with similar orientation as phy3-LOV are also detected by the ClusPro docking algorithm (cluster 2 and 8 in the DOT output and cluster 10 in the ZDOCK output, see ESI†). Our choice of the model in Fig. 6 (cluster 1 for both DOT and ZDOCK outputs) is based on the ClusPro ranking, on the high surface complementarity and interactions symmetry, and on the presence of a cluster of hydrophobic amino acids at the interface, that nicely accounts for the stability of the dimer in solution.

The antiparallel mirror symmetry and the interface observed in our YLOV–YLOV model and in the phy3-LOV dimer is very similar to the one reported for homo and heterodimers of the ARNT PAS-B domain in solution⁶⁹ and in dimers of the heme-binding PAS domain of *E. coli* Dos (EcDos)⁷⁰ and *R. meliloti* FIXL (RmFIXL).⁷¹ An antiparallel mirror symmetry has also been suggested for the LOV–LOV dimer of the FKF1 protein and for phot-LOV1 on the basis of small-angle X-ray scattering experiments, although in that case the authors favoured a different model for the complex, where the two LOV domains do not face each other *via* the central β -sheet.^{32,33}

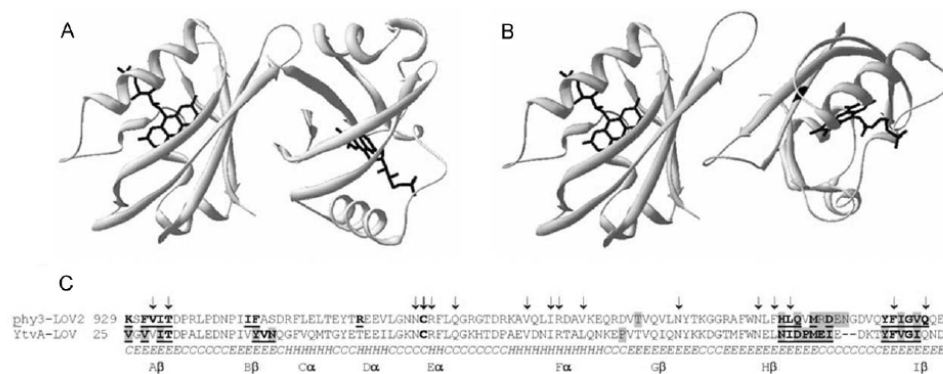


Fig. 6 (A) The YLOV dimer model (see text for details). (B) The phy3-LOV2 dimer in the crystal unit cell (PDB accession code 1G28, chains a,c).²² (C) Residues at the dimer interface (within 4 Å, shadowed), mapped on the sequence of YLOV and phy3-LOV2. For comparison the interaction hot-spots predicted by PPI-Pred⁵⁶ (in bold) and by Robetta⁵⁷ are also shown (in bold and underlined). Arrows indicate the residues interacting with FMN in phy3-LOV2. Secondary structure elements are shown below the phy3-LOV2/YLOV alignment and indicated with conventional letters. E = strands, H = helices, C = unordered. The nomenclature of the secondary structure elements is after Harper *et al.*²⁴

The model as in Fig. 6 not only corresponds to the best quality/validation parameters, but also agrees with the observations that in YLOV the β -scaffold is distorted/twisted within the dimer, as indicated by the CD data. With this respect we have to remind that the docking simulation requires that the partners within the complex are kept rigid, a feature that may not be verified in the real complex, as again suggested by the distortion of the β -scaffold. Therefore, the model structure reported in Fig. 6 has to be taken with care and, albeit probably qualitatively correct, may not match the solution dimer-structure as far as the details are concerned.

In the structure of EcDos and RmFIXL PAS domains, the dimers are further stabilized by the helical N-cap and the dimers retain an elongated shape.^{70,71} In the case of N-YLOV, although the N-cap is helical (from CD data), the dimer is instead approximately spherical (gel filtration). This observation, together with low similarity to the corresponding sequences in EcDos and RmFIXL, does not allow to build a reliable model of the N-cap in YLOV and of its orientation with respect to LOV core.

Similar considerations apply to a structural model of the full-length protein. The LOV-STAS linker region is predicted to be helical and CD data confirm the prediction (see above), nevertheless we cannot safely state that it assumes an orientation similar to that in phot1-LOV2, namely underneath the central β -scaffold of the LOV core,²⁴ because of low sequence similarity. The amino acid sequence of YtvA J α -linker is much more similar to the C-terminal extension of the heme binding PAS domain of FIXL from *B. japonicum*, actually protruding outside the PAS core.⁷² Although this might be, in the latter case, an artifact of crystallization (in the absence of the associated kinase domain), such orientation of the J α -linker cannot be excluded. This would imply a direct interaction of the STAS domain with the LOV core, competing with the dimerization surface, different to the structural features proposed for phot as a basis for the self-phosphorylation reaction.²⁴ We must also consider that alternative complex conformations may exist: the linker is not needed for the activation of the kinase activity in phot2 towards a substrate, a reaction carried out *via* direct interaction between the separately expressed LOV2 and kinase domains.¹⁵ As a whole we still have too little structural and functional information about the N-cap and J α -linker to build a reliable model of full-length YtvA. In order to gain further structural information, *e.g.*, orientation of the helical linker with respect to the LOV core and its relevance in the LOV-STAS interaction, we are designing separated constructs for the STAS domain and the LOV core furnished with the linker region.

We wish to point out that with CD experiments we can only see modifications in the secondary structure elements, but protein movements could occur without large conformational changes of the secondary structure. Furthermore our experiments are not time resolved, therefore we cannot detect transient structural changes occurring within the time-scale for the formation of the adduct (*ca.* 2 μ s).¹⁹ Another problem is represented by the fact that we are working with a system that only partially resembles physiological conditions. In fact, from a very recent paper we know that YtvA functions within a large macromolecular complex, about which we presently do not have any structural information.³⁷ Some hints about the way the STAS domain is activated may come from our recent experiments showing that YtvA binds Nucleotide TriPhosphate (NTP = GTP, ATP)³⁹ and that light-

induced conformational changes are transmitted from the LOV-core to the NTP binding cavity on the STAS domain.³⁹ These changes are very small and certainly do not imply large structural changes in YtvA, but may have a larger significance within the macromolecular complex mentioned above.

Conclusions

In this work we have investigated the conformation of YtvA in solution. The analysis of CD spectra by means of the CCA algorithm and curve assignment has been improved with respect to previous work and can be now reliably employed to determine the secondary structural composition of LOV proteins. The LOV domain of YtvA has been proven to be an elongated dimer, stabilized by interactions that involve the β -scaffold, for which we have modelled a structure that agrees with experimental data and bioinformatic analysis. In the N-YLOV construct, the helical N-terminal cap is expected to participate in dimerization, although we could not model the complex due to lack of information about the orientation of this segment. In the full-length protein YtvA, dimerization appears only in case that apoprotein is present, most probably with the formation of heterodimers (apoprotein/FMN-bound YtvA). The data strongly suggest that the β -scaffold is involved both in YLOV dimerization and intraprotein interactions with the linker and/or STAS domain, confirming that this region is a good candidate as a surface responsible for signal transmission to the effector domains in LOV proteins. This latter aspect highlights a sharp similarity with phot-LOV2,²⁴ but the missing light-driven unfolding of the J α -linker also points to a distinct difference between phot and YtvA, in the way the effector domain is activated. Furthermore, the data presented here suggest that dimerization of LOV domains might play an important regulative role by competing with domain-domain interactions and should be thoroughly investigated.

References

- 1 M. H. Hefti, K. J. Francoijs, S. C. de Vries, R. Dixon and J. Vervoort, The PAS fold: A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction, *FEBS J.*, 2004, **271**, 1198–1208.
- 2 W. R. Briggs, C. F. Beck, A. R. Cashmore, J. M. Christie, J. Hughes, J. A. Jarillo, T. Kagawa, H. Kanegae, E. Liscum, A. Nagatani, K. Okada, M. Salomon, W. Rüdiger, T. Sakai, M. Takano, M. Wada and J. C. Watson, The phototropin family of photoreceptors, *Plant Cell*, 2001, **13**, 993–997.
- 3 W. R. Briggs and J. M. Christie, Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors, *Trends Plant Sci.*, 2002, **7**, 204–210.
- 4 R. Banerjee and A. Batschauer, Plant blue-light receptors, *Planta*, 2005, **220**, 498–502.
- 5 E. Huala, P. W. Oeller, E. Liscum, I. S. Han, E. Larsen and W. R. Briggs, *Arabidopsis* NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain, *Science*, 1997, **278**, 2120–2123.
- 6 E. Knieb, M. Salomon and W. Rüdiger, Autophosphorylation, electrophoretic mobility and immunoreaction of oat Phototropin 1 Under UV and Blue Light, *Photochem. Photobiol.*, 2005, **81**, 177–182.
- 7 M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert and W. R. Briggs, Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor phototropin, *Biochemistry*, 2000, **39**, 9401–9410.
- 8 M. Salomon, W. Eisenreich, H. Dürr, E. Scleicher, E. Knieb, V. Massey, W. Rüdiger, F. Müller, A. Bacher and G. Richter, An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from *Avena sativa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 12357–12361.
- 9 M. Kasahara, T. E. Swartz, M. A. Olney, A. Onodera, N. Mochizuki, H. Fukuzawa, E. Asamizu, S. Tabata, H. Kanegae, M. Takano, J. M.

- Christie, A. Nagatani and W. R. Briggs, Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, 2002, **129**, 762–773.
- 10 S. Crosson and K. Moffat, Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch, *Plant Cell*, 2002, **14**, 1067–1075.
- 11 C. W. M. Kay, E. Schleicher, A. Kuppig, H. Hofner, W. Rüdiger, M. Schleicher, M. Fischer, A. Bacher, S. Weber and G. Richter, Blue light perception in plants. Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450A mutant of phototropin, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 10973–10982.
- 12 J. T. M. Kennis, S. Crosson, M. Gauden, I. H. M. van Stokkum, K. Moffat and R. van Grondelle, Primary Reactions of the LOV2 Domain of Phototropin, a Plant Blue-Light Photoreceptor, *Biochemistry*, 2003, **42**, 3385–3392.
- 13 T. E. Swartz, S. B. Corchey, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs and R. A. Bogomolni, The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 36493–36500.
- 14 T. Kottke, J. Heberle Dominic Hehn and P. Hegemann, Phot-LOV1: Photocycle of a Blue-Light Receptor Domain from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 1192–1201.
- 15 D. Matsuoka and S. Tokutomi, Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 13337–13342.
- 16 J. M. Christie, T. E. Swartz, R. A. Bogomolni and W. R. Briggs, Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function, *Plant J.*, 2002, **32**, 205–219.
- 17 S. Crosson, S. Rajagopal and K. Moffat, The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains, *Biochemistry*, 2003, **42**, 2–10.
- 18 A. Losi, The bacterial counterparts of plants phototropins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 566–574.
- 19 A. Losi, E. Polverini, B. Quest and W. Gärtner, First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes, *Biophys. J.*, 2002, **82**, 2627–2634.
- 20 U. Krauss, A. Losi, W. Gärtner, K.-E. Jaeger and T. Eggert, Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, **7**, 2229–2236.
- 21 E. Schleicher, R. M. Kowalczyk, C. W. M. Kay, P. Hegemann, A. Bacher, M. Fischer, R. Bittl, G. Richter and S. Weber, On the reaction mechanism of adduct formation in LOV domains of the plant blue-light receptor phototropin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 11067–11076.
- 22 S. Crosson and K. Moffat, Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 2995–3000.
- 23 R. Fedorov, I. Schlichting, E. Hartmann, T. Domratcheva, M. Fuhrmann and P. Hegemann, Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch: the Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.*, 2003, **84**, 2492–2501.
- 24 S. M. Harper, L. C. Neil and K. H. Gardner, Structural basis of a phototropin light switch, *Science*, 2003, **301**, 1541–1544.
- 25 S. M. Harper, J. M. Christie and K. H. Gardner, Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity, *Biochemistry*, 2004, **43**, 16184–16192.
- 26 A. Losi, in *Flavin photochemistry and photobiology*, ed. D.-P. Häder and G. Jori, Elsevier, Amsterdam, 4th edn, 2006, ch. 10, pp. 223–276.
- 27 T. Eitoku, Y. Nakasone, D. Matsuoka, S. Tokutomi and M. Terazima, Conformational dynamics of phototropin 2 LOV2 domain with the linker upon photoexcitation, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13238–13244.
- 28 B. L. Taylor and I. B. Zhulin, PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1999, **63**, 479–506.
- 29 M. A. Gilles-Gonzalez and G. Gonzalez, Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1–22.
- 30 M. Salomon, U. Lempert and W. Rüdiger, Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain, *FEBS Lett.*, 2004, **572**, 8–10.
- 31 Y. Nakasone, T. Eitoku, D. Matsuoka, S. Tokutomi and M. Terazima, Kinetic Measurement of Transient Dimerization and Dissociation Reactions of Arabidopsis Phototropin 1 LOV2 Domain, *Biophys. J.*, 2006, **91**, 645–653.
- 32 M. Nakasako, D. Matsuoka, K. Zikihara and S. Tokutomi, Quaternary structure of LOV-domain containing polypeptide of *Arabidopsis* FKFl1 protein, *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 1067–1071.
- 33 M. Nakasako, T. Iwata, D. Matsuoka and S. Tokutomi, Light-Induced Structural Changes of LOV Domain-Containing Polypeptides from *Arabidopsis* Phototropin 1 and 2 Studied by Small-Angle X-ray Scattering, *Biochemistry*, 2004, **43**, 14881–1489.
- 34 P. Ballario, C. Talora, D. Galli, H. Linden and G. Macino, Roles in dimerization and blue light photoreponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins, *Mol. Microbiol.*, 1998, **29**, 719–729.
- 35 L. Aravind and E. V. Koonin, The STAS domain a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists, *Curr. Biol.*, 2000, **10**, R53–R55.
- 36 S. Akbar, T. A. Gaidenko, K. Min, M. O'Reilly, K. M. Devine and C. W. Price, New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 2001, **183**, 1329–1338.
- 37 T. A. Gaidenko, T. J. Kim, A. L. Weigel, M. S. Brody and C. W. Price, The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**, 6387–6395.
- 38 M. Avila-Perez, K. J. Hellingwerf and R. Kort, Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**, 6411–6414.
- 39 V. Buttani, A. Losi, E. Polverini and W. Gärtner, Blue news: NTP binding properties of the blue-light sensitive YtvA protein from *Bacillus subtilis*, *FEBS Lett.*, 2006, **580**, 3818–3822.
- 40 S. M. Najafi, D. A. Harris and M. D. Yudkin, The SpoIIAA protein of *Bacillus subtilis* has GTP-binding properties, *J. Bacteriol.*, 1996, **178**, 6632–6634.
- 41 A. Losi, E. Ghiraldelli, S. Jansen and W. Gärtner, Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2005, **81**, 1145–1152.
- 42 A. Losi, B. Quest and W. Gärtner, Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 759–766.
- 43 A. Perczel, M. Hollosi, G. Tusnady and G. D. Fasman, Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins, *Protein Eng.*, 1991, **4**, 669–679.
- 44 A. Perczel, K. Park and G. D. Fasman, Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide, *Anal. Biochem.*, 1992, **203**, 83–93.
- 45 I. R. Bates, P. Matharu, N. Ishiyama, D. Rochon, D. D. Wood, E. Polverini, M. A. Moscarello, N. J. Viner and G. Harauz, Characterization of a Recombinant Murine 18.5-kDa Myelin Basic Protein, *Protein Expression Purif.*, 2000, **20**, 285–299.
- 46 C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon and G. Deleage, NPS@: Network Protein Sequence Analysis, *Trends Biochem. Sci.*, 2000, **25**, 147–150.
- 47 S. R. Comeau, D. W. Gatchell, S. Vajda and C. J. Camacho, ClusPro: An automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes, *Bioinformatics*, 2004, **20**, 45–50.
- 48 J. G. Mandell, V. A. Roberts, M. E. Pique, V. Kotlovyi, J. C. Mitchell, E. Nelson, I. Tsigelny and L. F. Ten Eyck, Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit, *Protein Eng.*, 2001, **14**, 105–113.
- 49 R. Chen, L. Li and Z. Weng, ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm, *Proteins*, 2003, **52**, 80–87.
- 50 L. Willard, A. Ranjan, H. Zhang, H. Monzavi, R. F. Boyko, B. D. Sykes and D. S. Wishart, VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 3316–3319.
- 51 R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss and J. M. Thornton, PROCHECK-A program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.*, 1993, **26**, 283–291.
- 52 R. W. Hooft, G. Vriend, C. Sander and E. E. Abola, Errors in protein structures, *Nature*, 1996, **381**, 272–272.
- 53 C. Colovos and T. O. Yeates, Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions, *Protein Sci.*, 1993, **2**, 1511–1519.
- 54 R. Luthy, J. U. Bowie and D. Eisenberg, Assessment of protein models with three-dimensional profiles, *Nature*, 1992, **356**, 83–85.
- 55 J. Pontius, J. Richelle and S. J. Wodak, Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures, *J. Mol. Biol.*, 1996, **264**, 121–136.

- 56 J. R. Bradford and D. R. Westhead, Improved prediction of protein-protein binding sites using a support vector machines approach, *Bioinformatics*, 2005, **21**, 1487–1494.
- 57 T. Kortemme, D. E. Kim and D. Baker, Computational alanine scanning of protein-protein interfaces, *Sci. STKE*, 2004, **2004**(219), p12.
- 58 N. Sreerama, S. Y. Venyaminov and R. W. Woody, Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis, *Anal. Biochem.*, 2000, **287**, 243–251.
- 59 N. Sreerama, S. Y. Venyaminov and R. W. Woody, Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy, *Protein Sci.*, 1999, **8**, 370–380.
- 60 K. Matsuo, R. Yonehara and K. Gekko, Improved Estimation of the Secondary Structures of Proteins by Vacuum-Ultraviolet Circular Dichroism Spectroscopy, *J. Biochem.*, 2005, **138**, 79–88.
- 61 N. Sreerama and R. W. Woody, Structural composition of betaI- and betaII-proteins, *Protein Sci.*, 2003, **12**, 384–388.
- 62 N. J. Greenfield, Analysis of circular dichroism data, *Methods Enzymol.*, 2004, **383**, 282–317.
- 63 R. W. Woody and A. Koslowski, Recent developments in the electronic spectroscopy of amides and alpha-helical polypeptides, *Biophys. Chem.*, 2002, **101–102**, 535–551.
- 64 N. J. Greenfield, Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data, *Anal. Biochem.*, 1996, **235**, 1–10.
- 65 C. T. Chang, C. S. Wu and J. T. Yang, Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the beta-turns, *Anal. Biochem.*, 1978, **91**, 13–31.
- 66 T. Iwata, D. Nozaki, S. Tokutomi and H. Kandori, Comparative investigation of the LOV1 and LOV2 domains in *Adiantum* Phytochrome3, *Biochemistry*, 2005, **44**, 7427–7434.
- 67 S. B. Corchnoy, T. E. Swartz, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs and R. A. Bogomolni, Intramolecular proton transfers and structural changes during the photocycle of the LOV2 domain of phototropin 1, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 724–731.
- 68 T. Bednarz, A. Losi, W. Gärtner, P. Hegemann and J. Heberle, Functional variations among LOV domains as revealed by FT-IR difference spectroscopy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**, 575–579.
- 69 P. B. Card, P. J. A. Erbel and K. H. Gardner, Structural Basis of ARNT PAS-B dimerization: use of a common beta-sheet interface for hetero- and homodimerization, *J. Mol. Biol.*, 2005, **353**, 664–677.
- 70 H. J. Park, C. Suquet, J. D. Satterlee and C. Kang, Insights into signal transduction involving PAS domain oxygen-sensing heme proteins from the X-ray crystal structure of *Escherichia Coli* Dos Heme Domain (EcDosH), *Biochemistry*, 2004, **43**, 2738–2746.
- 71 H. Miyatake, M. Mukai, S. Y. Park, S. Adachi, K. Tamura, H. Nakamura, K. Nakamura, T. Tsuchiya, T. Iizuka and Y. Shiro, Sensory mechanism of oxygen sensor FixL from *Rhizobium meliloti*: crystallographic, mutagenesis and resonance Raman spectroscopic studies, *J. Mol. Biol.*, 2000, **301**, 415–431.
- 72 W. Gong, B. Hao, S. S. Mansy, G. Gonzalez, M. A. Gilles-Gonzalez and M. K. Chan, Structure of a biological oxygen sensor: a new mechanism for heme-driven signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 15177–15182.

3.1 Ulteriori considerazioni sulle esperienze di cromatografia

A completamento dell'articolo sopra riportato, qui di seguito mostrerò ulteriori esperienze e considerazioni emerse durante gli studi sulla struttura di YtvA.

Data la grande variabilità dei cromatogrammi proteici si è indagata la relazione fra la purezza delle diverse preparazioni di YtvA e la presenza dei picchi riscontrati. Per studiare tale relazione si sono accostati diversi approcci: attraverso l'elettroforesi su gel è stata valutata la purezza delle diverse preparazioni (denominate a, b, c..) e su questa base si sono analizzati i rispettivi cromatogrammi (vedi figura numero 3-1). Nell'articolo I i cromatogrammi di figura 2 sono riferiti rispettivamente alle preparazioni: YtvAa per la figura A, YtvAf per la figura B.

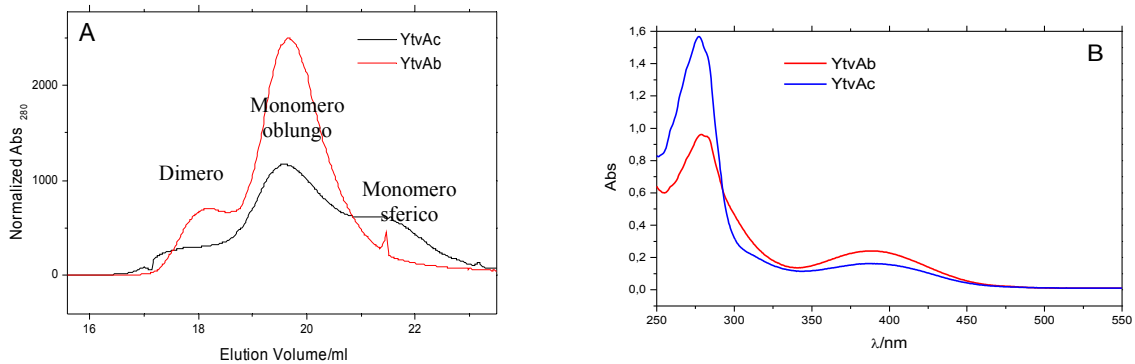


Figura 3-1 A: Cromatogramma delle due preparazioni YtvAb e YtvAc; in figura l'assegnazione della forma strutturale proteica corrispondente ad ogni picco. **B:** Spettri di assorbimento delle due preparazioni YtvAb e YtvAc.

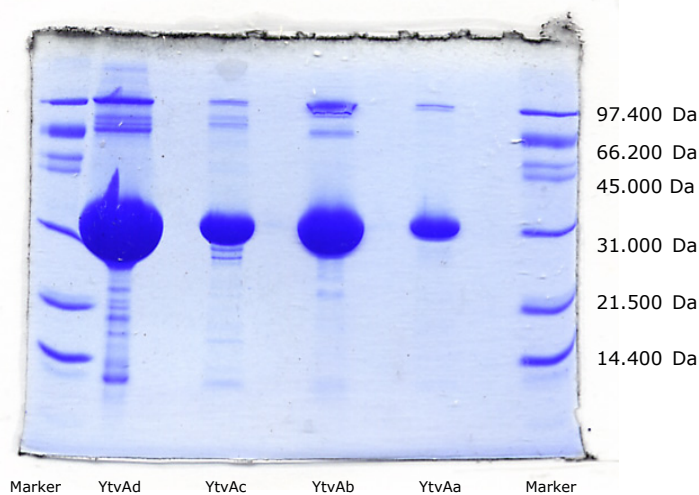


Figura 3-2 Gel di elettroforesi per 4 preparazioni di YtvA denominate a, b, c, d. Sulle due colonne laterali i markers, di cui in figura sono indicati i pesi molecolari.

Come si può notare dall'elettroforesi su gel la preparazione denominata YtvAb presenta meno frammenti e dimeri rispetto alla preparazione YtvAc, risulta cioè essere più pura, tale considerazione è confermata anche dallo spettro d'assorbimento nello stato di luce delle due preparazioni, che presenta un rapporto fra picchi (e quindi una presenza di apoproteina) maggiore nel secondo caso rispetto al primo. Dai cromatogrammi si osserva che YtvAb si presenta principalmente sotto forma di monomero oblungo (picco centrale), con una piccola percentuale di dimero, mentre in YtvAc compare anche il picco corrispondente al monomero sferico (a destra) e la percentuale di monomero oblungo sembra diminuire. I risultati sopra riportati vengono confermati dal cromatogramma di figura 3-3, esso rappresenta la curva ottenuta per la proteina YtvAa (utilizzata nell'articolo I), che come si evince dallo spettro d'assorbimento, non contiene apoproteina: YtvAa scende praticamente per intero sotto forma di monomero oblungo, e solo in piccola percentuale sotto forma di dimero. Per verificare di aver effettuato l'analisi sull'oloproteina si è realizzata anche una registrazione di cromatografia fissando la lunghezza d'onda di rilevazione a 340 nm, assorbimento tipico del cromoforo FMN; si può notare che lo spettro di eluizione è molto simile nei due casi, anche se l'FMN appare presente in concentrazione maggiore nel dimero (vedi figura 3-3).

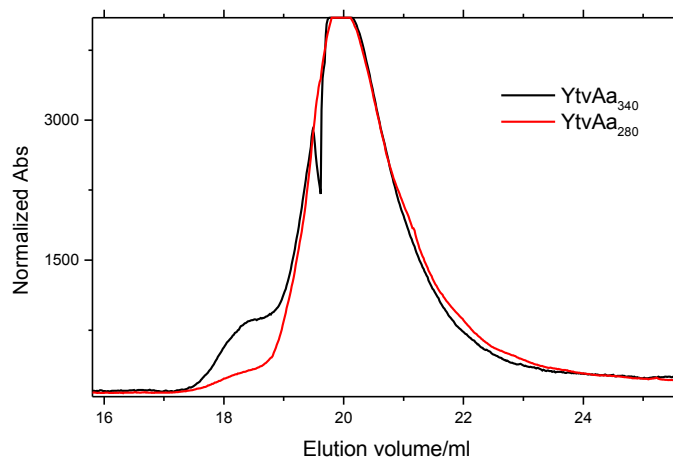


Figura 3-3 Cromatogramma della proteina YtvAa registrato a 280 nm, lunghezza d'onda d'assorbimento tipica degli amminoacidi (curva rossa) e a 340 nm, lunghezza d'onda d'assorbimento tipica dell'FMN (curva nera). Per evidenziare le differenze degli spettri registrati le due curve sono state rapportate alla stessa scala.

Le frazioni eluite durante la cromatografia della preparazione YtvAe sono state raccolte e analizzate attraverso la spettroscopia di assorbimento per verificare il contenuto dei diversi picchi. Tale operazione ha mostrato che in YtvAe il picco assegnato al monomero sferico contiene una minor quantità di cromoforo rispetto al picco corrispondente al monomero oblungo (vedi figura 3-4), suggerendo una preferenza per la conformazione sferica da parte della apoproteina.

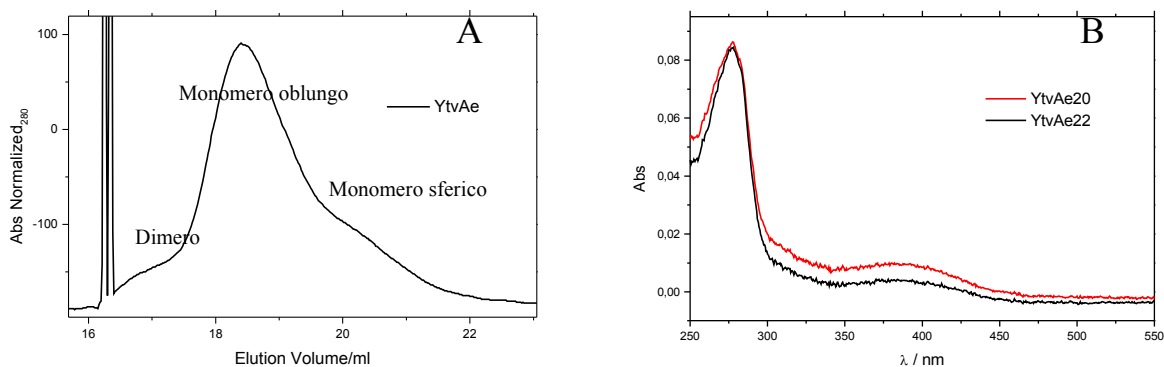


Figura 3-4 **A:** Cromatografia di YtvAe: sono presenti tre picchi, il primo corrispondente al dimero, il secondo al monomero oblungo, il terzo al monomero sferico. **B:** Spettri d'assorbimento delle frazioni raccolte, YtvAe22 (corrispondente prevalentemente al monomero sferico) presenta un rapporto negli assorbimenti maggiore, quindi una maggior presenza di apoproteina rispetto a YtvAe20 (prevalentemente monomero oblungo).

Per indagare il rapporto fra macrostruttura proteica ed assenza di cromoforo la preparazione YtvAh è stata denaturata attraverso riscaldamento a 50°C in modo da consentire la perdita dell'FMN; la mancanza di cromoforo sulla soluzione così ottenuta è stata verificata attraverso un esperimento di fluorescenza ed in seguito si è effettuata la cromatografia sulla preparazione in gioco; i risultati sono riportati nella figura numero 3-5. Come si vede la procedura induce la formazione di aggregati in seguito alla rinaturazione proteica, il monomero oblungo cala drasticamente, mentre il monomero sferico subisce una riduzione inferiore.

Prima di realizzare le misure di cromatografia sulla apoproteina si è verificato il metodo di denaturazione termica anche tramite acquisizione di spettri CD: la denaturazione è stata seguita attraverso gli spettri registrati ad intervalli regolari in seguito a riscaldamento delle soluzioni di YtvAa e di YLOV nello stato light. Si può notare che la denaturazione di YLOV avviene ad una temperatura inferiore rispetto alla proteina intera, infatti sono evidenti le variazioni

spettroscopiche nel grafico che all'aumentare della temperatura mostra la tipica conformazione a *random coil*; non si notano invece grosse variazioni nella struttura secondaria di YtvAa fino alla temperatura di 40°C, vedi figura numero 3-5.

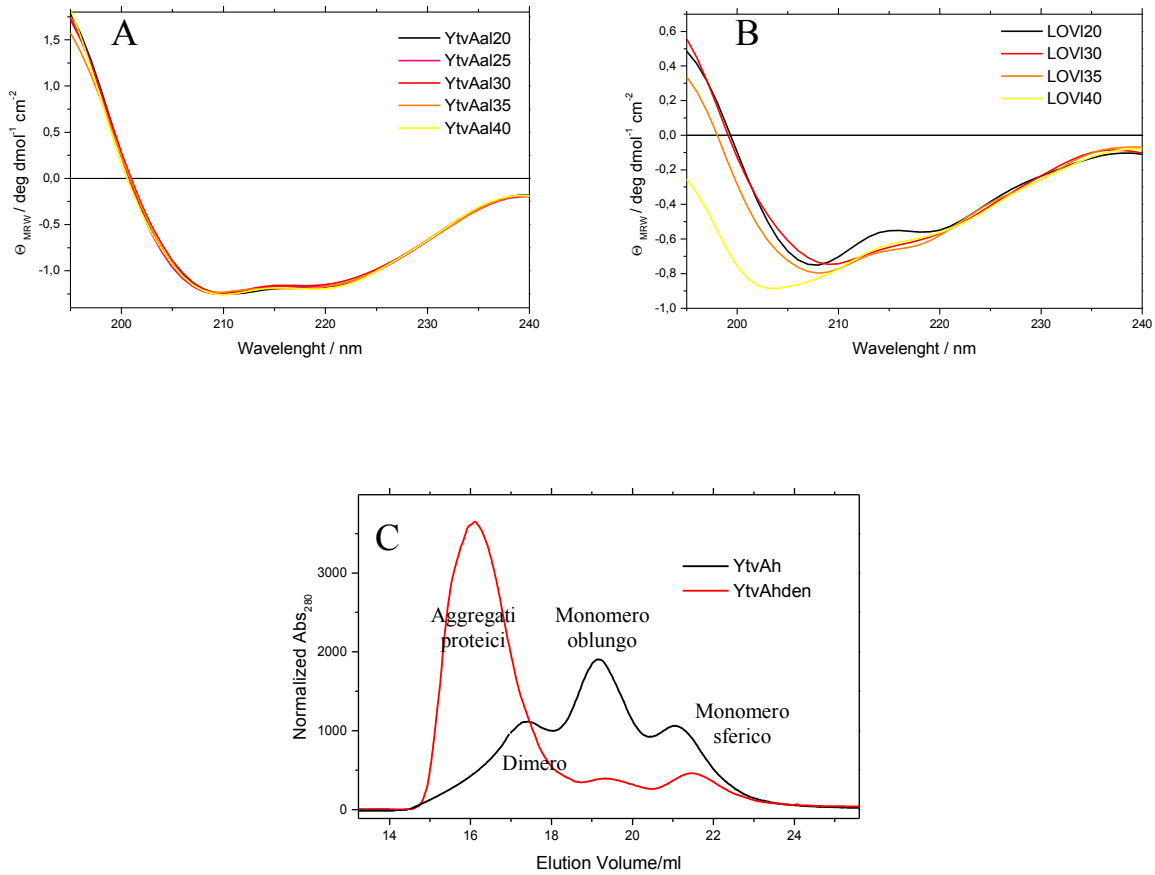


Figura 3-5 A: Spettri di dicroismo circolare per YtvAa in funzione dell'aumento di temperatura (denaturazione) a partire da 20°C fino a 40°C. **B:** Spettri di denaturazione registrati da 20 a 40 °C per YLOV. **C:** Cromatogramma di YtvAh e della stessa proteina in seguito ad estrazione del cromoforo.

Attraverso la cromatografia su gel si sono studiate anche le macrovariazioni della conformazione proteica in rapporto agli stati *dark* o *light*: la stessa preparazione è stata analizzata sia in seguito ad illuminazione con luce blu, che in seguito ad incubazione al buio. Nella figura numero 3-6 sono riportati i risultati ottenuti sia per il dominio LOV che per la proteina intera: in entrambi i casi appare chiaro un leggero *shift* verso sinistra del cromatogramma della proteina allo stato di luce rispetto allo stato *dark*, questo indica che la proteina nello stato *light* occupa un volume maggiore rispetto allo stato *dark* (di circa il 15%) dove sembra mantenere una struttura più

compatta. Quindi anche la cromatografia su gel indica un cambiamento conformazionale fotoindotto, di piccola entità, in accordo con i dati CD.

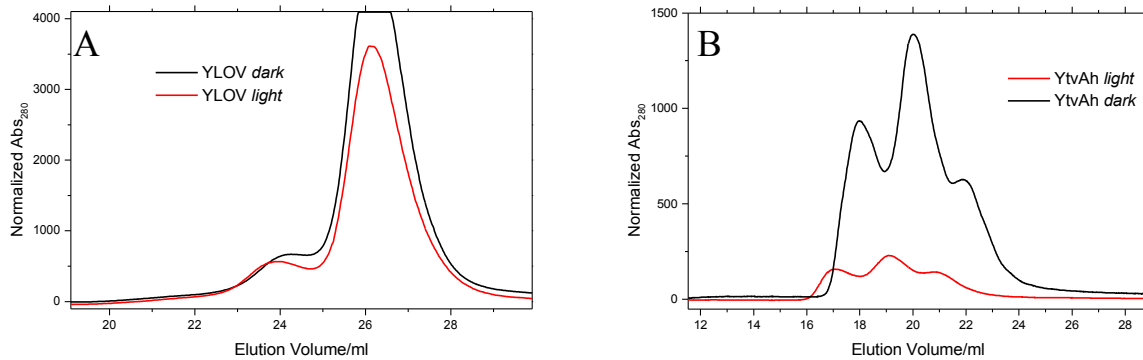


Figura 3-6 A: Cromatogramma del dominio YLOV allo stato *dark* e allo stato *light*, il primo sembra assumere uno stato più compatto rispetto al secondo, avendo un tempo di eluizione superiore. **B:** Cromatogramma della proteina intera YtvAh allo stato *dark* e allo stato *light*, le variazioni conformazionali in seguito ad assorbimento di luce blu sono simili a quelle subite dal solo dominio YLOV.

Per valutare l'importanza di amminoacidi chiave nella conformazione proteica prove di cromatografia sono state realizzate anche su proteine sottoposte a mutagenesi sitospecifica: nella figura numero 3-7 sono riportati il cromatogramma e lo spettro d'assorbimento di due diverse preparazioni di E105L, tale mutazione coinvolge la superficie esposta al solvente del β sheet centrale, che si ipotizza essere coinvolto nelle interazioni intraproteiche, segnatamente E105 si trova sullo *strand* G β (vedi figura 1-2). E105La si presenta per la maggior parte sotto forma di monomero oblungo e in parte di dimero; E105Lc, che anche dallo spettro d'assorbimento non sembra essere una buona preparazione si presenta come monomero sferico e in parte come dimero. La mutagenesi sitospecifica non sembra avere conseguenze sulla macroconformazione proteica, anche in questo caso il picco corrispondente al monomero sferico si presenta nella preparazione contenente più apoproteina, indicando che questa è la conformazione preferenziale assunta quando il cromoforo non è incorporato.

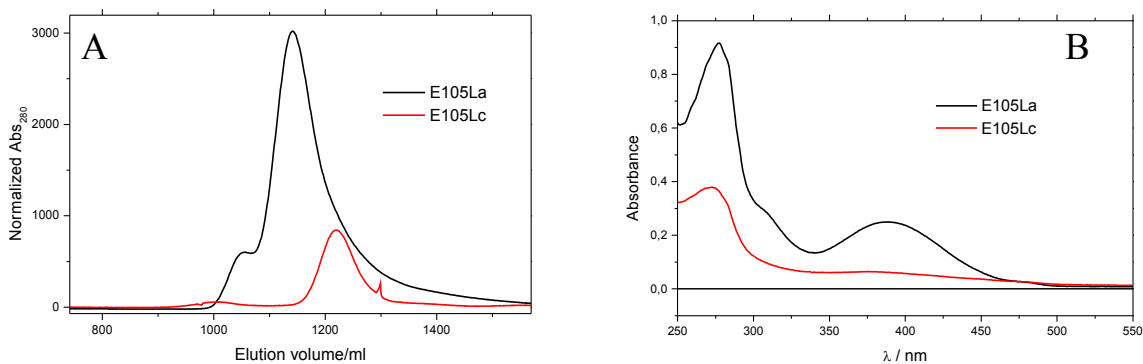


Figura 3-7 A: Cromatogramma di due preparazioni di E105L. **B:** Spettro d'assorbimento delle stesse preparazioni di E105L.

Una seconda sostituzione prevede la mutagenesi del residuo adiacente L106 nella proteina mutata YtvA-L106F, il cui cromatogramma è mostrato nella figura numero 3-8; L106 si trova nella cavità cromoforica, sempre sullo *strand* G β (vedi figura 1-2). Anche in questo caso non sembrano esserci modificazioni significative nella struttura macroscopica proteica, sono evidenti infatti i tre picchi riscontrati anche nella proteina nativa.

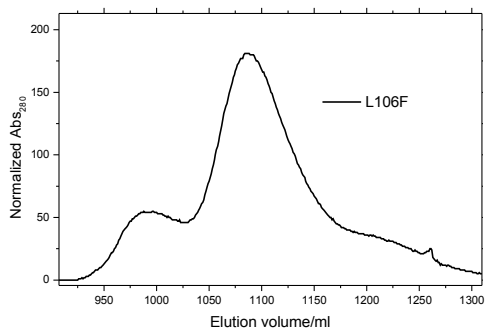


Figura 3-8 Cromatogramma di L106F.

3.2 Analisi di dicroismo circolare

Tramite esperienze di dicroismo circolare è stato confermato il ruolo chiave della cisteina 62 in YtvA, coinvolta nel legame covalente con FMN, tale residuo amminoacidico è stato sostituito da un'istidina incapace di legarsi al cromoforo. L'analisi realizzata sulla proteina mutata C62H non mostra variazioni fotochimiche, vedi figura numero 3-9; solo attorno ai 195-200 nm si nota uno scostamento, tale zona è però soggetta ad una variabilità intrinseca alla misura stessa.

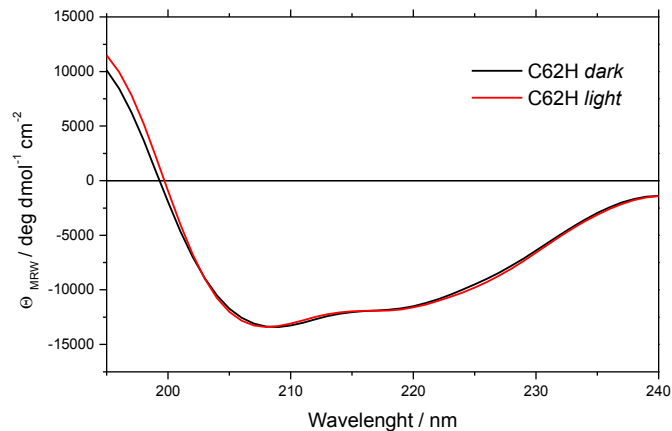


Figura 3-9 Spettro di dicroismo circolare ottenuto per il mutante C62H allo stato di buio e di luce.

Per studiare la struttura completa di YtvA, a corredo dei risultati riportati nell'articolo I, è stato anche analizzato tramite dicroismo circolare un costrutto contenente il dominio LOV, il cappuccio N terminale e il *linker* di unione allo STAS, per un totale di 166 amminoacidi compreso l'His tag. Nella tabella numero 3-1 sono riportati i risultati dell'analisi ottenuta con l'algoritmo CCA degli spettri acquisiti, comparati con i costrutti N-YLOV e YLOV già riportati nell'articolo. Il confronto fra N-YLOV-linker ed N-YLOV indica circa 16 amminoacidi in *random coil*, su un totale di 19 amminoacidi di *linker*, a differenza delle previsioni che lo ipotizzavano in alfa elica, i restanti amminoacidi sembrano assumere la conformazione di β antiparallelo. E' importante sottolineare il fatto che neppure il *linker* previene la dimerizzazione (cromatogramma non riportato), quindi l'analisi sulla struttura secondaria non corrisponde ad una forma monomeric del costrutto.

Tabella 3-1 Confronto fra le analisi in struttura secondaria ottenute tramite l’algoritmo di calcolo CCA sugli spettri medi delle preparazioni YLOV, N-YLOV, N-YLOV-linker allo stato di buio e di luce.

Sec. structure	†% YLOV ‡ (122 aa)		†% N-YLOV ‡ (147 aa)		†%N-YLOV-linker ‡ (166 aa)	
	dark	light	dark	light	dark	Light
I. α -helix	16.9 \pm 2.7 (21 \pm 3)	19.5 \pm 5.8 (24 \pm 7)	24.9 \pm 2.4 (37 \pm 4)	27.3 \pm 0.9 (40 \pm 1)	20.5 \pm 0.7 (34 \pm 1)	21.9 \pm 1.2 (36 \pm 2)
II. RC	23.9 \pm 4.1 (29 \pm 5)	22.8 \pm 3.9 (28 \pm 5)	24.9 \pm 0.9 (37 \pm 1)	23.6 \pm 0.9 (35 \pm 1)	30.8 \pm 0.2 (51 \pm 1)	30.6 \pm 0.6 (51 \pm 1)
III. β -turns/others	27.9 \pm 1.1 (34 \pm 1)	28.8 \pm 2.3 (35 \pm 3)	27.5 \pm 1.0 (40 \pm 1)	28.3 \pm 1.5 (42 \pm 2)	25.2 \pm 0.3 (42 \pm 1)	26.0 \pm 0.7 (43 \pm 1)
IV. $\beta_{\text{twisted}}/\beta_{\text{Par}}$	14.7 \pm 1.6 (18 \pm 2)	18.6 \pm 1.0 (23 \pm 1)	12.1 \pm 1.6 (18 \pm 2)	15.9 \pm 0.9 (23 \pm 1)	9.7 \pm 1.2 (16 \pm 2)	10.3 \pm 0.9 (17 \pm 2)
V. β_{Antipar}	16.2 \pm 4.1 (20 \pm 5)	10.2 \pm 4.7 (12 \pm 6)	10.6 \pm 3.4 (15 \pm 5)	4.9 \pm 2.1 (7 \pm 3)	13.8 \pm 1.4 (23 \pm 2)	11.2 \pm 1.6 (19 \pm 3)
$\ s < \sum_{i=1}^n [y_i - f(\lambda)]^2 >$	1.9 \pm 0.4	3.6 \pm 2.9	2.2 \pm 1.8	2.1 \pm 0.7	1.0 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3

†: l’errore statistico è la deviazione standard e deriva da 5 set di misure su 2 diverse preparazioni per YLOV, 4 set di misure su 2 diverse preparazioni per N-YLOV; 2 set di misure su 2 diverse preparazioni per N-YLOV-linker; ‡: il numero di aa è riportato in parentesi tonde sotto la percentuale insieme all’errore statistico; §: errore quadratico medio, dove y_i = curva sperimentale, $f(\lambda)$ = curva di fitting.

Una fase molto importante negli esperimenti di dicroismo circolare è costituita dall’analisi degli spettri acquisiti: numerosi sono gli algoritmi di calcolo utilizzabili per ricondurre lo spettro alla composizione in struttura secondaria e prima di scegliere il metodo CCA sono stati vagliati diversi sistemi, in particolare quelli contenuti nel pacchetto online “Dichroweb” (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb>), che contiene cinque algoritmi di calcolo (SELCON3, CONTINLL, CDSSTR, VARSLC, K2d), da applicare in combinazione a 7 possibili *dataset* di curve [52]. Un confronto è stato inoltre realizzato con l’analisi ottenuta attraverso “DSSP”, un metodo di previsione della struttura secondaria basato sulla sequenza amminoacidica proteica: tale metodologia prevede la definizione di legame H come base di partenza per lo studio, ed una conseguente definizione di *turns* e *bridges* come componenti primarie della struttura secondaria finale. Nella tabella numero 3-2 sono riportati i dati ottenuti mediante l’applicazione degli algoritmi CCA e DSSP sugli spettri medi di YtvA e di YLOV, mentre nella tabella 3-3 sono riportati i valori ottenuti con gli algoritmi di calcolo contenuti in Dichroweb. Esaminando le analisi degli stessi spettri conseguite con metodi diversi si può notare che le variazioni luce buio

sembrano essere più accentuate nei risultati ottenuti con gli algoritmi di Dichroweb rispetto a quelli derivati da CCA. Limitando il confronto all'analisi dello spettro medio di YtvA allo stato *dark* un buon accordo emerge fra CCA e CDSSTR, con entrambi i database. CONTIN sembra invece essere più efficace con il database numero 7. In complesso possiamo dire che il confronto ci rassicura sulla bontà dei risultati trovati con CCA.

Tabella 3-2 Confronto fra l'analisi degli spettri medi di YtvA e di YLOV ottenuti con l'algoritmo di calcolo CCA e con DSSP; essendo il secondo un metodo basato solo sulla sequenza amminoacidica non è stato possibile ottenere una differenziazione degli stati *dark* e *light* della proteina.

Sec. structure	†%YtvA CCA ‡(281 aa)		% YtvA DSSP ‡(281 aa)	†% YLOV CCA ‡(122 aa)		% YLOV DSSP ‡(122 aa)
	dark	light		dark	light	
I. α -helix	30.9 ± 4.7 (87 ± 13)	32.0 ± 6.5 (90 ± 18)	25.7 (72)	16.9 ± 2.7 (21 ± 3)	19.5 ± 5.8 (24 ± 7)	19.7 (24)
II. RC	22.4 ± 1.0 (63 ± 3)	21.7 ± 3.5 (61 ± 10)	27.4 (77)	23.9 ± 4.1 (29 ± 5)	22.8 ± 3.9 (28 ± 5)	31.1 (38)
III. β -turns/others	16.8 ± 3.6 (47 ± 10)	18.7 ± 3.5 (52 ± 10)	13.9 (39)	27.9 ± 1.1 (34 ± 1)	28.8 ± 2.3 (35 ± 3)	12.3 (15)
IV. $\beta_{\text{twisted}}/\beta_{\text{par.}}$	9.9 ± 4.1 (28 ± 11)	11.0 ± 3.7 (31 ± 10)	24.9 (70)	14.7 ± 1.6 (18 ± 2)	18.6 ± 1.0 (23 ± 1)	29.5 (36)
V. $\beta_{\text{Antipar.}}$	19.9 ± 5.6 (56 ± 16)	16.6 ± 5.8 (47 ± 16)	8.0 (23)	16.2 ± 4.1 (20 ± 5)	10.2 ± 4.7 (12 ± 6)	7.4 (9)
$\S < \sum_{i=1}^n [y_i - f(\lambda)]^2 >$	6.2 ± 2.8	5.2 ± 2.3		1.9 ± 0.4	3.6 ± 2.9	

†: l'errore statistico è la deviazione standard e deriva da 11 set di misure su 9 diverse preparazioni per YtvA e da 5 set di misure su 2 diverse preparazioni per YLOV; ‡: il numero di aa è riportato in parentesi tonde sotto la percentuale insieme all'errore statistico; §: errore quadratico medio, dove y_i = curva sperimentale, $f(\lambda)$ = curva di fitting.

Tabella 3-3 Confronto fra l'analisi di struttura secondaria sugli spettri medi di YtvA *dark* e YtvA *light* ottenuta con CCA e con gli algoritmi contenuti nel pacchetto Dichroweb.

Sec. structure	%YtvA CCA ‡ (281 aa)		%YtvA CDSSTR4 ‡ (281 aa)		%YtvA CDSSTR7 ‡ (281 aa)		%YtvA CONTIN4 ‡ (281 aa)		%YtvA CONTIN7 ‡ (281 aa)	
	dark	light	dark	light	dark	light	dark	Light	dark	light
I. α -helix	30.9 \pm 4.7 (87 \pm 13)	32.0 \pm 6.5 (90 \pm 18)	30,4 (86)	42,3 (119)	35,3 (99)	47 (132)	32,2 (90)	40,8 (115)	28,0 (79)	43,4 (122)
II. RC	22.4 \pm 1.0 (63 \pm 3)	21.7 \pm 3.5 (61 \pm 10)	26,3 (74)	23,7 (66)	24,3 (68)	21,4 (60)	32,9 (93)	23,6 (66)	21,8 (61)	23,3 (66)
III. β -turns/ others	16.8 \pm 3.6 (47 \pm 10)	18.7 \pm 3.5 (52 \pm 10)	19,4 (55)	15,4 (42)	18,3 (51)	15,7 (44)	14,6 (41)	22,2 (62)	20,7 (58)	20,4 (57)
IV. β_{twisted} / β_{Par}	9.9 \pm 4.1 (28 \pm 11)	11.0 \pm 3.7 (31 \pm 10)	9,4 (27)	7,7 (22)	9,6 (27)	7,1 (20)	8,1 (23)	7,7 (22)	10,6 (30)	7,5 (21)
V. β_{Antipar}	19.9 \pm 5.6 (56 \pm 16)	16.6 \pm 5.8 (47 \pm 16)	14 (39)	11,3 (32)	12,7 (36)	8,7 (25)	12,2 (34)	5,7 (16)	18,9 (53)	5,4 (15)

†: l'errore statistico è la deviazione standard e deriva da 11 set di misure su 9 diverse preparazioni; ‡: il numero di aa è riportato in parentesi tonde sotto la percentuale insieme all'errore statistico.

3.3 Modelling computazionale

Oltre al modello di dimero del dominio LOV presentato nell'articolo, attraverso la modellizzazione proteica si sono affrontate altre strade per indagare la struttura di YtvA: la modellizzazione comparativa si basa sul fatto che proteine appartenenti alla stessa famiglia abbiano *folding* simili, seguendo questa teoria si è tentato di estendere la struttura già presentata di YLOV anche ai 23 residui N-terminali esclusi nella struttura depositata con codice PDB 1IUM. Attraverso il motore di ricerca BLAST sono state trovate nella PDB bank due proteine con una elevata similarità di sequenza rispetto alla struttura da modellizzare. La prima è la proteina FixL_Rhime, proteina batterica contenente EME e sensibile alla concentrazione di ossigeno all'interno della cellula, la seconda è la proteina DOS, da *Escherichia coli*, una fosfodiesterasi per l'AMP ciclico regolata dall'eme. Fra le strutture presenti nella banca-dati corrispondenti alle due proteine (codici 1DO6; 1EWO per FixL e 1S66, 1S67, 1VB6 per DOS) sono state scelte le due con maggior risoluzione, grazie poi all'algoritmo CLUSTALW sono state allineate le tre sequenze (vedi figura numero 3-10).

1S67L	16		NAADGIFFP	ALEQNMMGAV	LINEN---DE	VMFFNPAAEK
1EW0	122	GSHMLETEDV	VRARDAHLRS	ILDTPVDATV	VSATD---GT	IVSFNAAAVR
YtvaLOV_	1			VGVV	ITDPALEDNP	IVYVNQGFVQ
				. *	.	.. * .
1S67L	52	LWGYKREEVI	GNNIDMLIPR	DL-RPAHPEY	IRHNREGGKA	RVEGMSRELQ
1EW0	169	QFGYAEEEVI	GQNLRIIMP-	EPYRHEHDGY	LQRYMATGEK	RIIGIDRVVS
YtvaLOV_	25	MTGY-ETEEI	LGKNCRFLQG	KHTDPA----	EVDNIRTALQ	NKEPVTVQIQ
		** * *
1S67L	101	LEKKGSKIW	TRFALSKVSA	EGKVYYLALV	RDAS	
1EW0	218	GQRKDGSTFP	MKLAVGEMRS	GGERFFTGF	RDLT-	
YtvaLOV_	70	NYKKDGTMF	NELNIDPMEI	EDKTYFVGIQ	NDI-	
		.***.	*	

Figura 3-10 Allineamento di sequenza di 1S67L, dalla proteina DOS, 1EW0, di FixL e YLOV.

In seguito a queste analisi preliminari si è deciso di utilizzare la struttura 1EW0 per modellare N-YLOV, dato che la sovrapposizione fra le due risulta particolarmente buona e che la proteina DOS presenta un'elica troppo corta. A questo punto grazie a Deep Viewer è stato realizzato l'allineamento strutturale fra le due, si è quindi potuto procedere alla modellizzazione vera e propria grazie a What if. Ottenuto il modello rozzo siamo passati su Deep Viewer per realizzare una minimizzazione energetica. A questo punto il dominio LOV e l'elica N-terminale appena modellata sono stati importati su Deep Viewer utilizzando come stampo FixL e collegati con un legame peptidico. In seguito ad un'ulteriore minimizzazione energetica è stato ottenuto il modello presentato nella figura numero 3-11.

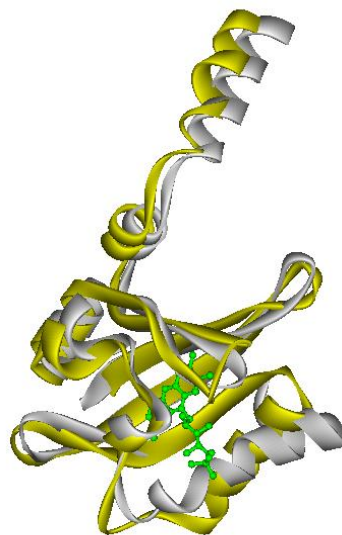


Figura 3-11 Modello di N-YLOV (in giallo) confrontato con la struttura cristallina di FixL (bianco) che ha fatto da stampo. In verde la molecola di FMN, cofattore di N-YLOV.

Una volta che il modello è stato ottenuto si è proceduto ad un esperimento di *docking* attraverso i software DOT e ZDOCK come già descritto nell'articolo I al paragrafo "materiali e metodi". Delle prime dieci strutture ottenute da entrambi i software solo la settima e l'ottava di ZDOCK sono confrontabili alla struttura cristallina del dimero di FixL, come si può vedere nella figura 3-12. La proteina forma un legame con la sua omologa affacciando i due foglietti beta, le alfa eliche N-terminali si incrociano per compattare la figura finale.

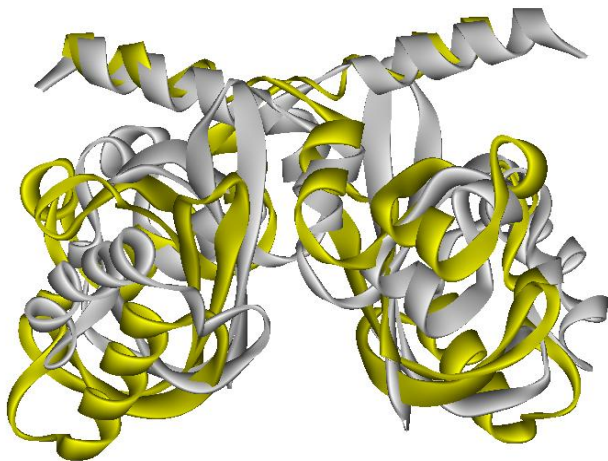


Figura 3-12 Confronto fra il modello dimerico di N-YLOV ottenuto con il software ZDOCK (struttura nr. 8) in giallo, ed il dimero FixL (struttura cristallina) in bianco.

La maggior parte dei modelli in uscita dai programmi utilizzati prevede che si formino dei legami idrofobici fra i *loop* di collegamento del beta *sheet* centrale, la struttura appare meno compatta rispetto a quella mostrata in figura 3-12. Come esempio mostriamo il modello numero 3 ottenuto con il software DOT (in figura 3-13).

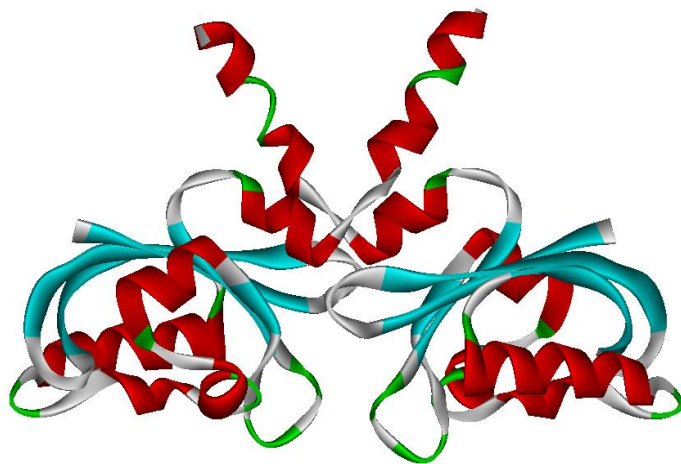


Figura 3-13 Dimero di N-YLOV ottenuto con DOT (modello numero 3).

Al momento in cui si procedeva con le esperienze oggetto di questa tesi di dottorato una struttura cristallina dimerica non era ancora stata ottenuta, solo nel 2007 Andreas Moglich e Keith Moffat hanno pubblicato il dimero di N-YLOV allo stato di luce e allo stato di buio mostrati nella figura 3-14 [53]. La struttura cristallina mostrata è chiaramente diversa dal modello di N-YLOV da noi creato, dato che il monomero stesso si differenzia per l'orientazione dell'elica N terminale nello spazio. Positivo è invece il confronto con il modello YLOV-YLOV presentato nel nostro articolo: anche se l'orientazione è diversa il dominio LOV pone come interfaccia alla dimerizzazione il foglietto β tipico del PAS *fold*. Come si può notare le variazioni macroscopiche nella struttura secondaria e terziaria in seguito ad assorbimento di luce blu sono poco significative e riguardano prevalentemente i *turn* e i foglietti beta coinvolti nel legame.

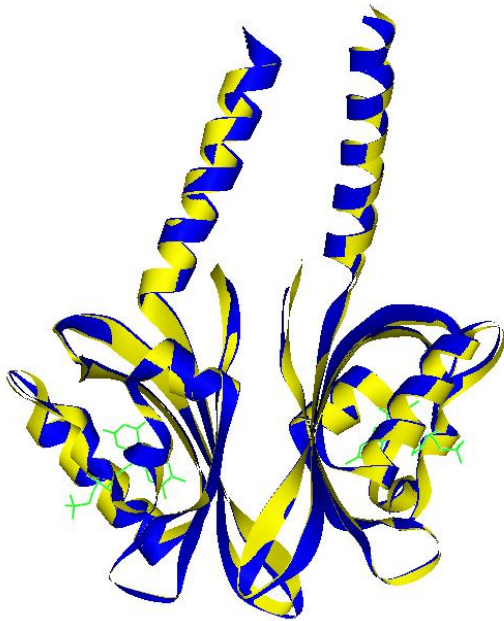


Figura 3-14 Sovrapposizione delle strutture cristalline al buio e alla luce del dimero N-YLOV presentate da Keith e Moffat. In blu è stato evidenziato lo stato *dark*, in giallo lo stato *light*.

4 Proprietà di legame della proteina sensibile alla luce blu YtvA da *Bacillus subtilis* con NTP

La riproduzione dell'articolo è stata gentilmente concessa da *Elsevier*

Blue news: NTP binding properties of the blue-light sensitive YtvA protein from *Bacillus subtilis*

Valentina Buttani^a, Aba Losi^{a,b,*}, Eugenia Polverini^{a,b}, Wolfgang Gärtner^c

^a Department of Physics, University of Parma, Italy

^b CNR-INFN, V.le G.P. Usberti 7/A, 43100 Parma, Italy

^c Max-Planck-Institute for Bio-Inorganic Chemistry, Muelheim an der Ruhr, Germany

Received 17 May 2006; revised 1 June 2006; accepted 1 June 2006

Available online 15 June 2006

Edited by Peter Brzezinski

Abstract The blue-light sensitive protein YtvA from *Bacillus subtilis* is built of a photoactive, flavin-binding LOV (Light, Oxygen and Voltage) domain and a STAS domain with unknown function. Here we show that YtvA binds a fluorescent derivative of guanosine triphosphate (GTP_{TR}) that can be displaced by both GTP or ATP. Unspecific NTP (N = G or A) binding is supported by the molecular model of YtvA-STAS. Blue-light activation of YtvA results in small and dark-reversible spectroscopic changes for GTP_{TR}, suggesting that light-driven conformational changes are transmitted from the LOV core to the GTP_{TR} binding site. These results support the idea that STAS domains may have a general NTP binding role and open a way to investigate the molecular functionality of YtvA-STAS. © 2006 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: LOV-proteins; Blue-light photoreceptor; GTP-binding proteins; ATP-binding proteins; STAS domain; Fluorescence

1. Introduction

Blue-light is a ubiquitous stimulus for living organisms and represents a driving evolutionary force, given its unique capability to penetrate deeply into sea water [1]. Furthermore blue-light is potentially dangerous because it is readily absorbed by endogenous photosensitizers [2]. In this view it is not surprising that the long sought blue-light plant photosensors have turned out to bear riboflavin derivatives as chromophores, biosynthesized through one of the most ancient enzymatic pathways [3]. Among flavin-photosensors, phototropins (phot) that trigger a variety of blue-light responses in plants, are those best characterized at the molecular level [4]. Phot proteins possess two N-terminal photoactive LOV (light, oxygen and voltage) domains that bind oxidized flavin mono-nucleotide (FMN) as chromophore, absorbing maximally at ca. 450 nm in the dark [5], and exhibit a typical PAS (PerArntSim) fold [6]. Blue-light illumination of phot-LOVs triggers a photocycle involving the reversible formation of a blue-shifted FMN-cysteine C(4a)-thiol adduct (referred to as light-activated state), ultimately

inducing auto-phosphorylation of phot via activation of the C-terminal kinase domain [4] (and references therein). Thanks to ongoing genome projects it has become evident that the LOV paradigm is widely spread also among prokaryotes, where LOV proteins are highly modular and include kinases, phosphodiesterases, transcriptional regulators etc. [7–10]. YtvA from *Bacillus subtilis* was the first bacterial LOV-protein for which a phot-like photochemistry has been demonstrated [7]. It is built of an N-terminal LOV and a C-terminal STAS domain (Sulphate Transporters AntiSigma-factor antagonists) [11]; this architecture is conserved in LOV proteins from other Firmicutes, e.g. in *Listeria* and *Oceanobacillus* genera [9]. The physiological role of YtvA as a putative photoreceptor is currently under investigation and a molecular function for its STAS domain is still uncharacterized. A prominent feature is that the sequence of the STAS domain includes two classical GTP-binding motifs, DxxG and NKxD [12,13]. A general role of STAS domains as NTP-binding units has been anticipated [11] and GTP binding was demonstrated for SPOIIA, a STAS protein involved in *B. subtilis* sporulation [14]. We also previously noted that the ATP-binding signature of Ser/Thr threonine kinases is partially conserved in YtvA-STAS [7]. We therefore decided to investigate the binding of nucleotides by using a red-light fluorescent derivative of GTP [15] and exchange experiments, demonstrating that both ATP and GTP can associate to YtvA. Furthermore we modeled the STAS domain of YtvA (YtvA-STAS), highlighting similarities with small GTP-binding proteins.

2. Materials and methods

His-tagged YtvA and its isolated LOV core (YtvA-LOV) were expressed in *E. coli* (BL21) (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using IPTG (BioMol, Hamburg, Germany)-induction and employing the pET28a plasmid (Novagen-Merck, Darmstadt, Germany), as described [7,16]. The proteins were purified by affinity chromatography on Talon (Qiagen, Hilden, Germany) and finally concentrated in Naphosphate buffer 10 mM, NaCl 10 mM, pH 8. Guanosine 5'-triphosphate, BODIPY[®] TR 2'-(or-3')-O-(N-(2-aminoethyl) urethane), trisodium salt (GTP_{TR}) was purchased from Molecular Probe (Eugene, OR, USA). Guanosine-5'-[γ-thio]triphosphate tetrasodium salt (GTP) and adenosine 5'-(3-thiotriphosphate) tetralithium salt (ATP) were from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Absorption spectra were recorded with a UV-2102PC spectrophotometer (Shimadzu Germany, Duisburg, Germany). Steady-state fluorescence measurements were carried out on a Perkin-Elmer LS50 luminescence spectrometer. GTP_{TR} was excited at 590 nm. The output signal was divided by the fraction of absorbed energy ($1-10^{-A}$, where A is the absorbance at the excitation wavelength) in order to obtain a signal that is

*Corresponding author. Department of Physics, University of Parma, Viale G.P. Usberti 7/A, 43100 Parma, Italy. Fax: +39 0521 905223. E-mail address: losia@fis.unipr.it (A. Losi).

proportional to the quantum yield (referred to as normalized fluorescence). Unless otherwise stated, binding experiments were carried out with YtvA in its blue-light activated state (i.e. FMN covalently bound to Cys 62), achieved by illuminating the sample with a blue-light emitting Led-Lenser® V8 lamp (470 nm, Zweibrüder Optoelectronics, Soellingen, Germany) as previously described [16]. The blue-light was switched-off just prior recording of the absorption and fluorescence spectra, ensuring that at least 95% of the sample is present as FMN-Cys adduct, given the long lifetime for the recovery to the dark state (denoted as YtvA₄₅₀ from the absorption maximum of the bound flavin), $\tau_{rec} > 3500$ s at 20 °C [16,17]. At 470 nm the absorption spectrum of GTP_{TR} has a deep minimum and cannot anyway be excited during the measurements given that the blue-light was kept off. The fluorescence spectra were always recorded upon excitation at 590 nm (where solely GTP_{TR} absorbs) and no energy transfer can occur from or to other fluorophores.

The dissociation constant (K_D) between YtvA and GTP_{TR} and the maximum fluorescence enhancement (ΔF_{max}) were evaluated by fitting the experimental data with the non-linear equation (rearranged from Eq. 2 in [18])

$$[P]_{tot} = \frac{K_D + 1 - \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}}}{\frac{\Delta F}{\Delta F_{max}} - 1} \quad (1)$$

where $[P]_{tot}$ is the concentration of YtvA and ΔF is the absolute value difference in the normalized fluorescence between GTP_{TR} alone and in the presence of YtvA. An agreeable fitting of the experimental data to Eq. 1 indicates that a 1:1 complex is formed and is equivalent to obtain a linear Scatchard plot, intercepting the x-axis in 1 [18]. The concentration of GTP_{TR} was kept constant at 1 μ M and [YtvA] was varied between 2 and 55 μ M.

The 3-D structure of YtvA-STAS (residues 147–254) was built using the TM1442 crystal structure [19] as template (PDB entry code 1VC1), after a multialignment with all the STAS proteins, as reported in the Pfam database (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>, accession number PF01740). Because of low sequence identity with known STAS structures, the secondary structure alignment was used to select the template (see supplementary material, S1). The model was built with the tools available in the What If [20] software; the residue P229, corresponding to a gap in the alignment, was successively inserted into the structure by means of the DeepView software [21] and the K228-E230 loop was rebuilt. An energy minimization of the modelled protein was carried out with the Gromos96 force field implementation of SwissPdbViewer [22]. The model was positively evaluated with the WhatIf protein model check [20].

3. Results

3.1. NTP binding to YtvA

GTP_{TR} in phosphate buffer has an absorption maximum at 590 nm and a fluorescence spectrum centered at 620 nm. Upon addition of YtvA (in the blue-light activated state [7]), the absorbance is shifted to the red, with concomitant enhancement of GTP_{TR} fluorescence (Fig. 1).

The fluorescence increment reaches a plateau after about 40 min of incubation (at 20 °C). Similar features have been observed for GTP binding proteins, upon binding of fluorescent GTP derivatives [15,23]. The experimental data could be readily fit with Eq. 1 indicating a 1:1 stoichiometry. The derived $K_D = 38$ μ M reveals a binding site with relatively low affinity. Displacement experiments with excess of non-fluorescent GTP (100 μ M) result in a partial reversal of the absorption red-shift and in a diminished fluorescence, indicating a competition for the same binding site (Fig. 2). Due to the low binding constant, the exchange is not complete, as instead happens for G-proteins [15]. ATP has a similar effect, albeit with a slower time-course. Prolonged incubations with ATP or GTP result in identical spectroscopic features for the two nucleotides (Fig. 2). The displacement experiments confirm that the nucle-

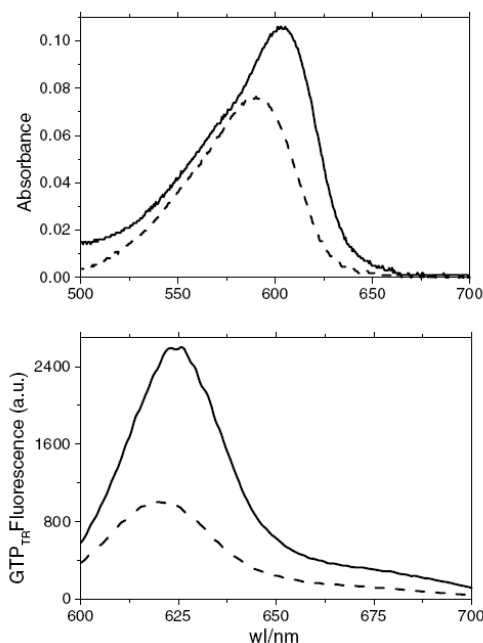


Fig. 1. (Top) Absorption and (bottom) fluorescence spectra of 1 μ M GTP_{TR} in buffer (dashed line) and in the presence of 55 μ M YtvA (full line) in the light-activated state. The fluorescence was recorded upon 590 nm excitation.

otide moiety effectively binds to the protein and that the observed spectroscopic effects are not due to a simple binding of the GTP_{TR} BODIPY part. Control experiments with YtvA-LOV showed that the binding of GTP_{TR} does not occur for this peptide, but that the full protein is needed.

Dark incubation of GTP_{TR}-loaded YtvA results in small but reproducible spectroscopic changes, with a further red-shift of the absorption spectrum (Fig. 3) and an additional enhancement of fluorescence (ca. 8% for conditions as in Fig. 3). These changes are reversible upon further blue-light irradiation of the flavin chromophore.

3.2. Structural model of YtvA-STAS

The 3-D model of the STAS domain of YtvA is shown in Fig. 4 and is characterized by an extended β -sheet that includes four parallel β -strands, with intervening α -helices. A typical GTP-binding motif DxxG (here DLSG) [13] occupies part of D β and the adjacent loop and characterizes the YtvA-like family [10] (Fig. 4).

By searching through deposited structures and sequences of GTP-binding proteins, we found limited similarity of YtvA-STAS with proteins belonging to the SRP (signal recognition proteins) family [13]. Fig. 5 shows the sequence and secondary structure alignment within the homology region of YtvA-STAS and the GTP-binding domain of SRP54, a Ffh (54 homologue) protein from *Thermus aquaticus*. The magic-fit option in DeepView also readily superimposes these protein regions (PDB access ID for Ffh is 1JPJ [24]). In P-loop GTPases the DxxG G3 (or Walker B) motif is positioned on

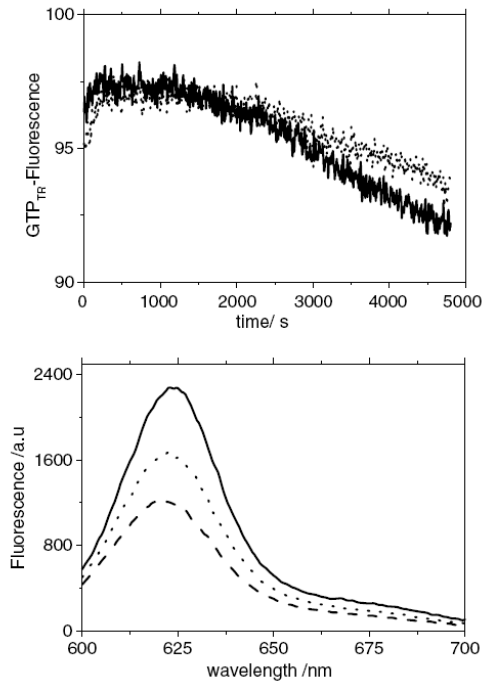


Fig. 2. Displacement of GTP_{TR} by GTP and ATP. Top: at time = 0, GTP_{TR} -loaded YtvA (see Fig. 1 for conditions) was incubated with 100 μM GTP (solid line) or ATP (dotted line) and the fluorescence at 620 nm was monitored (590 nm excitation). The initial fluorescence rise is due to the time needed to reach a homogeneous temperature within the cuvette after mixing and is observed also with GTP_{TR} alone (not shown). Bottom: prolonged incubation of GTP_{TR} -loaded YtvA with 100 μM GTP led to a marked decrease of fluorescence after 1 (dotted line) and 15 h at 4 °C (dashed line). Incubation with ATP in the same conditions gave the same spectra (not shown).

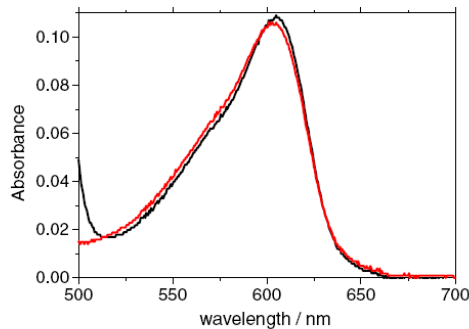


Fig. 3. Spectroscopic changes of 1 μM GTP_{TR} in the presence of 55 μM YtvA upon re-conversion to the dark state YtvA₄₅₀ (black line) and additional blue-light activation (red line). At these concentration about 50% of GTP_{TR} is bound to the protein.

strand 4 according to a recent nomenclature [13] and overlaps with the DxxG pattern of YtvA-STAS. The topology of the two proteins is also the same within the homology region

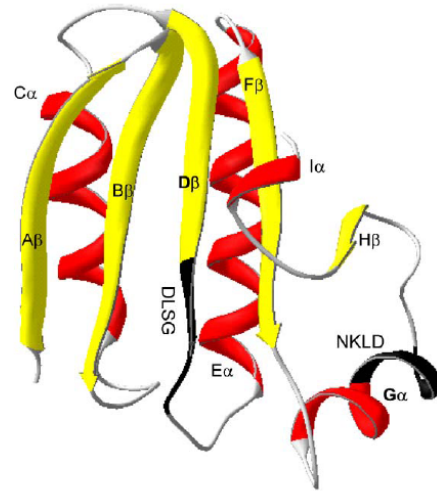


Fig. 4. Model of YtvA-STAS. In dark, the position of the two GTP-binding motifs. The secondary structural elements (α -helices and β -strands) have been named consecutively from A β (N-terminus) to I α (C-terminus).

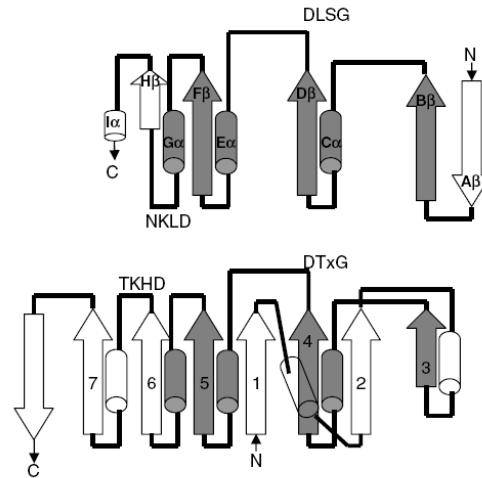


Fig. 5. Top, sequence alignment of YtvA-STAS and SRP54 (O07347) in the homology region. Cylinders, α -helices; arrows, β -strands. Bottom, topology of YtvA-STAS and SRP54. For the latter a recent numeration has been adopted, according to which the G3 (DxxG) and G4 ([NT]KxD) motif are on strand 4 and 6, respectively [13].

(Fig. 5). The same occurs with other SRP proteins, such as FtsY [25] (not shown).

The position of the second GTP recognizing motif [NT]KxD (G4, strand 6 in SRP54) is instead not the same in YtvA-STAS (Fig. 5). As previously noted [11], no P-loop, that has the function to properly position the triphosphate moiety of a bound nucleotide in NTPases [13], is present in STAS domains.

4. Discussion

The binding of GTP and ATP to YtvA is in line with the suggested idea that STAS domains may have a general NTP binding role [11]. To our knowledge, this has been demonstrated only for the SPOIIA protein [14] and for YtvA (this work), and it may be representative of a novel NTP-binding fold. It has been suggested that the conserved D β -E α loop that in STAS domains hosts the DxxG motif is involved in phosphate binding and the β -sheet scaffold could accommodate the rest of the NTP molecule [11]. In SPOIIAA a DSSG pattern is localized in the same loop as in YtvA-STAS, but shifted towards the E α -helix [11]. Interestingly, in bacterial STAS domains the DxxG motif is localized as in YtvA (involving D β) or as in SPOIIAA (involving E α) and the two positions are mutually exclusive, pointing to a functional role for this pattern. In fact phosphorylation of the first serine in DSSG is crucial for the biological activity of SPOIIAA and at the same time impairs NTP binding and hydrolysis [14].

The affinity of YtvA for NTP appears to be low, with K_D in the μ M range. Although the binding constant may be larger for NTP that do not carry the bulky BODIPY fluorophore, from the exchange experiments we do not expect that the affinity can dramatically increase. For SPOIIA the K_D is 0.25 and 2.5 μ M for GTP and ATP, respectively. K_D s in this range have also been determined for SRP proteins [26,27]. For SRP proteins the low affinity has been attributed to the fact that the empty binding site is largely stabilized by a network of hydrogen bonds, that need to be broken to accommodate the nucleotide [28]. The quite large red-shift in the absorption spectrum of the bound GTP_{TR} could reflect an altered equilibrium among the three delocalized structures of the BODIPY chromophore, indicating a polar/aprotic [29] binding cavity with a definite hydrogen bonds network. This issue will be further investigated with the aid of fluorescence quenching studies and solvatochromic effects.

The binding of GTP and ATP appears to be unspecific in YtvA, in agreement with the fact that the [NT]KxD G4 motif does not seem to be positioned in the correct protein region to stabilize the guanosine moiety via hydrogen bonds with the aspartate residue [12]. A low nucleotide discrimination has also been observed for the SRP protein FtsY, for which the aspartate of G4 plays in fact a negligible role [30]. Instead, GTP specificity is greatly enhanced by complexation of FtsY within the SRP particle. A similar discrimination mechanism, e.g. driven by protein–protein interactions, may be operating in YtvA.

Finally, we would briefly discuss a possible physiological role for NTP binding to YtvA, based on the available information about this protein. It is known that YtvA is a positive regulator in the activation of the general stress transcription factor σ^B [31], whose activity is controlled post-translationally by a phosphorelay-signal transduction network [32]. A separate pathway triggers sporulation, during which another alternative transcription factor, σ^E , regulates the expression of more than 253 genes in the mother cell [33]. In cells overexpressing σ^E YtvA is one of the genes that is upregulated (supplementary material in [33]). Furthermore YtvA is down-regulated in cells overexpressing SPOIIID, a transcriptional regulator involved in the synthesis of spore coat proteins (supplementary materials in [34]). Therefore YtvA seems to be involved either in stress response or in sporulation. It is

interesting to note that in *B. subtilis* both responses are related to a drastic drop of ATP and GTP [35,36], pointing to a functional role for the observed NTP binding.

Acknowledgements: We are grateful to Zhen Cao and Ulrich Krauss for sample preparation and advice. This work was partially supported by DFG (Forschergruppe FOR526).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2006.06.007.

References

- [1] Cockell, C.S. (2000) Ultraviolet radiation and the photobiology of earth's early oceans. *Origins Life Evol. Biosphere* 30, 467–499.
- [2] Ghetti, F., Checucci, G. and Lenzi, F. (1992) Photosensitized reactions as primary molecular events in photomovements of microorganisms. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 15, 185–198.
- [3] Fischer, M., Schott, A.K., Romisch, W., Ramsperger, A., Augustin, M., Fidler, A., Bacher, A., Richter, G., Huber, R. and Eisenreich, et al. (2004) Evolution of vitamin B2 biosynthesis. A novel class of riboflavin synthase in Archaea. *J. Mol. Biol.* 343, 267–278.
- [4] Briggs, W.R. and Christie, J.M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 7, 204–210.
- [5] Kasahara, M., Swartz, T.E., Olney, M.A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J.M., Nagatani, A. and Briggs, W.R. (2002) Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 129, 762–773.
- [6] Crosson, S. and Moffat, K. (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2995–3000.
- [7] Losi, A., Polverini, E., Quest, B. and Gärtner, W. (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys. J.* 82, 2627–2634.
- [8] Crosson, S., Rajagopal, S. and Moffat, K. (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42, 2–10.
- [9] Losi, A. (2004) The bacterial counterparts of plants phototropins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 566–574.
- [10] Losi, A. (2006) Flavin-based photoreceptors in bacteria in: *Flavin Photochemistry and Photobiology* (Häder, D.-P. and Jori, G., Eds.), pp. 223–276, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- [11] Aravind, L. and Koonin, E.V. (2000) The STAS domain – a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr. Biol.* 10, R53–R55.
- [12] Kjeldgaard, M., Nyborg, J. and Clark, B.F. (1996) The GTP binding motif: variations on a theme. *FASEB J.* 10, 1347–1368.
- [13] Leipe, D.D., Wolf, Y.L., Koonin, E.V. and Aravind, L. (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J. Mol. Biol.* 317, 41–72.
- [14] Najafi, S.M., Harris, D.A. and Yudkin, M.D. (1996) The SpoIIAA protein of *Bacillus subtilis* has GTP-binding properties. *J. Bacteriol.* 178, 6632–6634.
- [15] McEwen, D.P., Gee, K.R., Kang, H.C. and Neubig, R.R. (2001) Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal. Biochem.* 291, 109–117.
- [16] Losi, A., Quest, B. and Gärtner, W. (2003) Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 759–766.
- [17] Bednarz, T., Losi, A., Gärtner, W., Hegemann, P. and Heberle, J. (2004) Functional variations among LOV domains as revealed by

- FT-IR difference spectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, 575–579.
- [18] Favilla, R. and Mazzini, A. (1984) The binding of 1,N6-etheno-NAD to bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 788, 48–57.
- [19] Lee, J.Y., Ahn, H.J., Ha, K.S. and Suh, S.W. (2004) Crystal structure of the Tm1442 protein from *Thermotoga maritima*, a homolog of the *Bacillus subtilis* general stress response anti-sigma factor RsbV. *Proteins* 56, 176–179.
- [20] Vriend, G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.* 8, 52–56, 29.
- [21] Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714–2723.
- [22] Scott, W.R.P., Hunenberger, P.H., Tironi, I.G., Mark, A.E., Billeter, S.R., Fennel, J., Torda, A.E., Huber, T., Kruger, P. and van Gunsteren, W.F. (1999) The GROMOS biomolecular simulation program package. *J. Phys. Chem. A* 103, 3596–3607.
- [23] Korlach, J., Baird, D.W., Heikal, A.A., Gee, K.R., Hoffman, G.R. and Webb, W.W. (2004) Spontaneous nucleotide exchange in low molecular weight GTPases by fluorescently labeled gamma-phosphate-linked GTP analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2800–2805.
- [24] Padmanabhan, S. and Freymann, D.M. (2001) The conformation of bound GMPPNP suggests a mechanism for gating the active site of the SRP GTPase. *Structure* 9, 859–867.
- [25] Shan, S.O. and Walter, P. (2005) Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS Lett.* 579, 921–926.
- [26] Jagath, J.R., Rodnina, M.V., Lentzen, G. and Wintermeyer, W. (1998) Interaction of guanine nucleotides with the signal recognition particle from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 37, 15408–15413.
- [27] Moser, C., Mol, O., Goody, R.S. and Sinning, I. (1997) The signal recognition particle receptor of *Escherichia coli* (FtsY) has a nucleotide exchange factor built into the GTPase domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11339–11344.
- [28] Freymann, D.M., Keenan, R.J., Stroud, R.M. and Walter, P. (1999) Functional changes in the structure of the SRP GTPase on binding GDP and Mg²⁺GDP. *Nat. Struct. Biol.* 6, 793–801.
- [29] Baruah, M., Qin, W., Flors, C., Hofkens, J., Vallee, R.A.L., Beljonne, D., Van der Auweraer, M., De Borggraeve, W.M. and Boens, N. (2006) Solvent and pH dependent fluorescent properties of a dimethylaminostyryl borondipyromethene dye in solution. *J. Phys. Chem. A* 110, 5998–6009.
- [30] Shan, S.O. and Walter, P. (2003) Induced nucleotide specificity in a GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4480–4485.
- [31] Akbar, S., Gaidenko, T.A., Min, K., O'Reilly, M., Devine, K.M. and Price, C.W. (2001) New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 1329–1338.
- [32] Hecker, M. and Volker, U. (2001) General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv. Microbial. Physiol.* 44, 35–91.
- [33] Eichenberger, P., Jensen, S.T., Conlon, E.M., van Ooij, C., Silvaggi, J., Gonzalez-Pastor, J.E., Fujita, M., Ben Yehuda, S., Stragier, P., Liu, J.S. and Losick, R. (2003) The σ^E regulon and the identification of additional sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 327, 945–972.
- [34] Eichenberger, P., Fujita, M., Jensen, S.T., Conlon, E.M., Rudner, D.Z., Wang, S.T., Ferguson, C., Haga, K., Sato, T. and Liu, et al. (2004) The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology* 2, 1664–1683.
- [35] Zhang, S. and Haldenwang, W.G. (2005) Contributions of ATP, GTP, and redox state to nutritional stress activation of the *Bacillus subtilis* sigmaB transcription factor. *J. Bacteriol.* 187, 7554–7560.
- [36] Piggot, P.J. and Hilbert, D.W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 579–586.

4.1 Calcolo della costante di dissociazione

La costante di dissociazione in un sistema di *binding* recettore-ligando (K_D) può essere calcolata in diversi modi a partire da una titolazione eseguita con concentrazione di ligando bassa e costante e concentrazione di recettore in eccesso e variabile.

Il legame ligando-recettore è stato evidenziato, nelle nostre esperienze di laboratorio, tramite la variazione del segnale di fluorescenza di un derivato fluorescente del GTP, indicato con GTP_{TR} (vedi articolo II), che subisce un aumento dell'intensità di fluorescenza e uno *shift* del picco d'assorbimento in seguito a legame con una proteina (vedi articolo II); la variazione di fluorescenza rappresenta la percentuale di ligando legato in funzione della concentrazione del recettore. Il primo passo nella titolazione è la ricerca del valore di saturazione ΔF_{max} , corrispondente all'aumento di fluorescenza massimo nella condizione in cui tutto il GTP_{TR} sia legato alla proteina ($\alpha = 1$, dove α è la frazione di legante legata). Tale valore può essere ricavato in due modi: graficando ΔF , ovvero la variazione di fluorescenza del GTP_{TR} legato rispetto al GTP_{TR} libero in soluzione, in funzione della concentrazione di YtvA ($[YtvA]$) e ricavando il valore della curva all'infinito, oppure graficando $1/\Delta F$ in funzione di $1/[YtvA]$ e calcolando l'inverso dell'intercetta sull'asse delle ordinate (vedi figura 4-1).

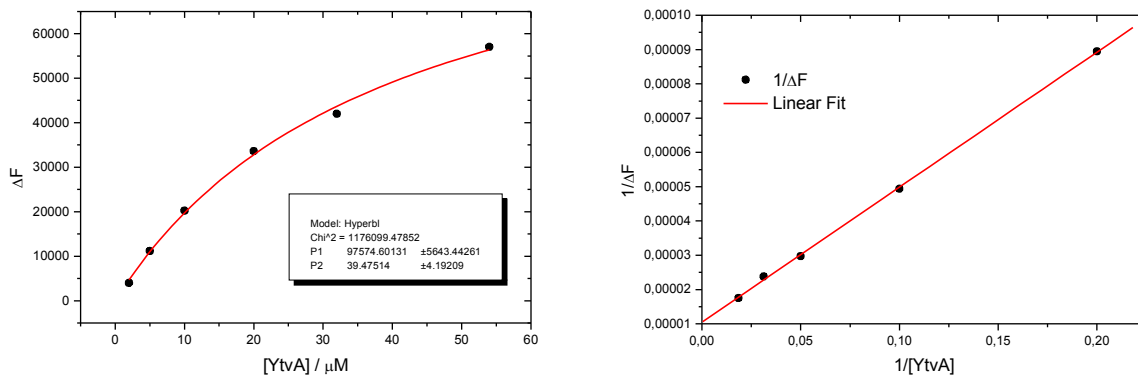


Figura 4-1 A sinistra ΔF in funzione di $[YtvA]$, i punti sono stati interpolati con una curva iperbolica, P1 corrisponde a ΔF_{max} . A destra grafico di $1/\Delta F$ in funzione di $1/[YtvA]$, l'inverso dell'intercetta con l'asse delle ordinate individua ΔF_{max} .

Dal grafico mostrato in figura 4-1 si ottiene un ΔF_{max} pari a 97574 con l'interpolazione iperbolica, a 95080 con il metodo dell'inverso dell'intercetta; per continuare con il calcolo di K_D è stata utilizzata la media dei due valori: 96000. Definendo $\alpha = \Delta F / \Delta F_{max}$ come grado di

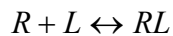
saturazione proteica, la concentrazione di proteina libera ($[YtvA]_f$) è definita come: $[YtvA] - \alpha \cdot [GTP]$, dove $[GTP]$ nel nostro caso è pari a 1 (vedi tabella 4-1).

Tabella 4-1 Titolazione YtvA-GTP_{TR} con $[GTP]$ 1 μ M e $[YtvA]$ variabile in eccesso.

$[YtvA]$ (μ M)	ΔF	α (frazione di GTP _{TR} legato)	$[YtvA]_f$
54	57.039	0,59415	53,4
32	42.004	0,43754	31,6
20	33.618	0,35019	19,6
10	20.238	0,21081	9,8
5	11.175	0,11641	4,9

La concentrazione di recettore libero è indispensabile per ricavare la costante di dissociazione, secondo i passaggi seguenti:

Chiameremo R il recettore, in questo caso YtvA, L il ligando, in questo caso GTP_{TR}. La reazione di *binding* per un unico sito di legame si può descrivere con:



La velocità di associazione è pari a: $V_{on} = [R] \cdot [L] \cdot k_{on}$

La velocità di dissociazione è pari a: $V_{off} = [RL] \cdot k_{off}$

Quando si raggiunge l'equilibrio la velocità di dissociazione è pari alla velocità di associazione, ovvero: $[R] \cdot [L] \cdot k_{on} = [RL] \cdot k_{off}$ da cui si ricava la seguente:

$$\frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} = K_D$$

Ponendo $[R] = K_D$ si ottiene $[L] = [RL]$

Ovvero quando la concentrazione di recettore libero è pari alla costante di dissociazione, la quantità di ligando libero è esattamente uguale alla quantità di ligando legato, infatti quando il ligando ha elevata affinità per il recettore la costante di dissociazione è piccola, basta cioè una piccola concentrazione di recettore per legare la metà dei ligandi.

Graficando la concentrazione di proteina libera P_f in funzione di α , cioè della percentuale di GTP_{TR} legato, in corrispondenza di $\alpha=1/2$ si ottiene $P_f=K_D$. Nella figura numero 4-2 i punti sono

stati interpolati con una curva iperbolica, per cui è stato possibile ricavare il valore di P_f in corrispondenza di $\alpha=1/2$:

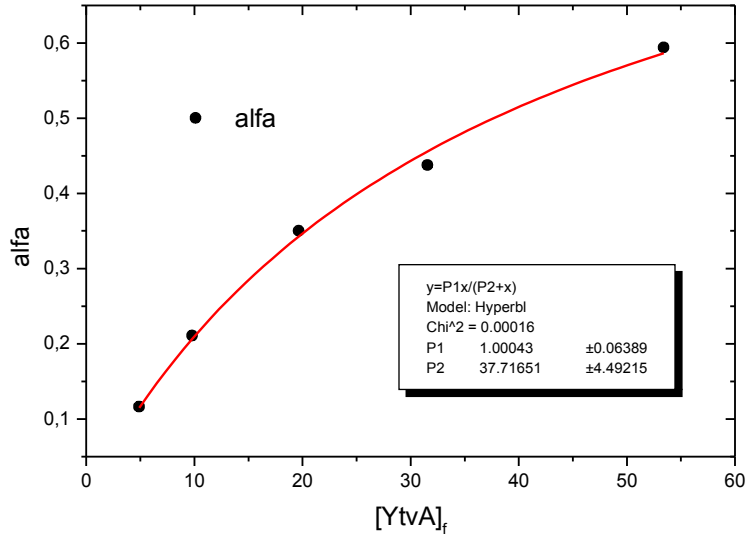


Figura 4-2 Grafico di α in funzione di $[YtvA]_f$, l'interpolazione con modello d'iperbole permette di derivare il valore di $[YtvA]_f$ in corrispondenza di $\alpha=1/2$.

$$y = \frac{P_1 \cdot x}{(P_2 + x)} \quad 0,5 \cdot P_2 + 0,5 \cdot x = P_1 \cdot x \quad x = \frac{0,5 \cdot P_2}{(P_1 - 0,5)} \quad \text{In questo caso } K_D = 37,7 \mu\text{M}$$

A partire dagli stessi dati iniziali è possibile ricavare la costante di dissociazione anche con un altro metodo, detto di *Scatchard*, che qui di seguito descriveremo.

La concentrazione totale del ligando è pari alla somma della concentrazione di ligando libero e legato: $[L_{TOT}] = [L] + [LR]$

Utilizzando la definizione riportata precedentemente per K_D : $K_D = \frac{[L] \cdot [R]}{[LR]}$

$$\text{si ottiene: } [LR] = \frac{[L] \cdot [R]}{K_D} = \frac{([L_{TOT}] - [LR]) \cdot [R]}{K_D}$$

$$[LR] \cdot K_D = [L_{TOT}] \cdot [R] - [LR] \cdot [R] \quad \text{Dividendo tutto per } [R] \cdot K_D \text{ si ottiene:}$$

$$\frac{[LR]}{[R]} = \frac{[L_{TOT}]}{K_D} - \frac{[LR]}{K_D} \quad \text{detta equazione di Scatchard.}$$

Essendo: $[LR] = \alpha \times [L_{TOT}]$, $[R] = [YtvA_f]$, $[L_{TOT}] = 1 \mu\text{M}$ si ottiene:

$$\frac{\alpha}{[YtvA_f]} = \frac{1}{K_D} - \frac{1}{K_D} \cdot \alpha$$

Realizzando l'interpolazione lineare di $\alpha/[YtvA_f]$ in funzione di α è quindi possibile ricavare K_D in due modi: come inverso dell'intercetta sull'asse delle ordinate e come inverso del coefficiente proporzionale.

Qui di seguito un esempio della metodologia di lavoro appena descritta su una preparazione di YtvA.

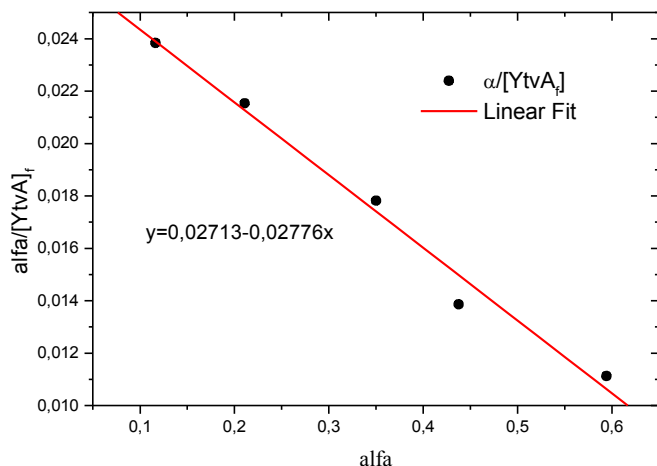


Figura 4-3 Grafico di *Scatchard* della titolazione di YtvA con GTP_{TR} .

La costante di dissociazione calcolata come inverso dell'intercetta con l'asse delle ordinate è pari a $1/0,02713=36,9$. Quella calcolata come inverso del coefficiente è pari a $1/0,02776=36$. Nella tabella seguente sono riportati a confronto i valori ottenuti con i tre metodi appena descritti.

Tabella 4-2 Costante di dissociazione calcolata con tre metodi diversi: per K_D^1 vedi figura 3-2, K_D^2 è l'inverso dell'intercetta con le ordinate del grafico di *Scatchard*, K_D^3 è l'inverso del coefficiente proporzionale del grafico di *Scatchard* (vedi figura 4-3).

K_D^1	K_D^2	K_D^3
37,7 μM	36,9 μM	36 μM

Le procedure di determinazione della costante di dissociazione appena descritte sono state eseguite anche per studiare il legame con GTP_{TR} di preparazioni di YtvA contenenti apoproteina in eccesso, qui di seguito riportiamo un esempio.

La titolazione è stata eseguita mantenendo la concentrazione di GTP_{TR} bassa e costante ($1 \mu M$) e la concentrazione di YtvA variabile in eccesso. Nella figura 4-4 la curva che approssima la variazione di fluorescenza in funzione della concentrazione proteica, si può notare che l'andamento non è iperbolico come nel caso della preparazione precedente, infatti per l'interpolazione si è dovuta utilizzare una curva di Boltzman; ΔF_{max} risulta essere pari a 81500. Il valore corrispondente alla variazione massima di fluorescenza è stato ricavato anche mediante il grafico doppiamente inverso di $1/\Delta F$ in funzione di $1/[YtvA]$; anche in questo caso il grafico è diverso da quello ottenuto per la preparazione precedente, non essendo possibile utilizzare l'interpolazione lineare la curva è stata approssimata con un'esponenziale del tipo: $y = e^{a+bx}$. L'inverso dell'intercetta con l'asse delle ordinate rappresenta ΔF_{max} , e risulta essere pari a: 77312.

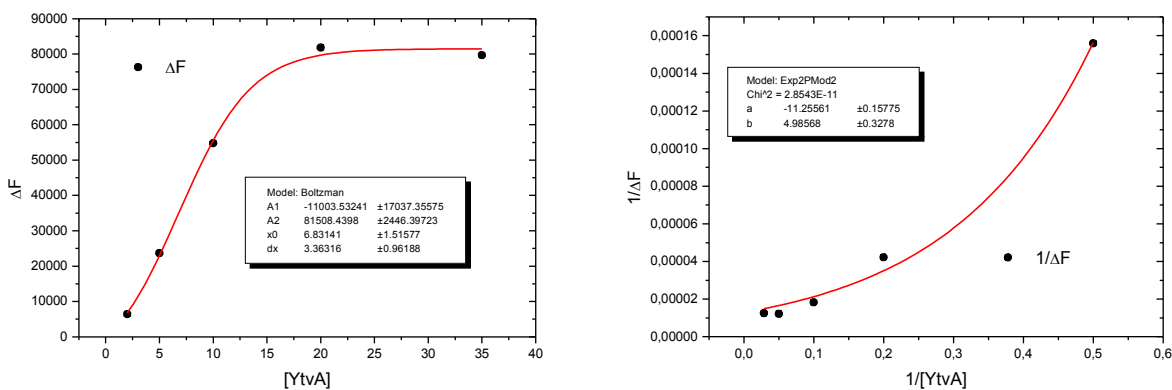


Figura 4-4 A sinistra ricerca di ΔF_{max} come punto asintotico della curva ΔF in funzione di $[YtvA]$. A destra ricerca di ΔF_{max} come doppio inverso della variazione di fluorescenza in funzione della concentrazione proteica. La curva di fitting è $y = e^{a+bx}$.

Utilizzando anche in questo caso la media dei due valori ottenuti per ΔF_{max} (79400) si è proceduto alla creazione del grafico di *Scatchard* (vedi figura 4-5), che mette in relazione la percentuale di ligando legato con la concentrazione di proteina libera. I punti corrispondenti alla titolazione possono essere interpolati con una curva quadratica, il valore corrispondente

all'inverso dell'intercetta con l'asse delle ordinate dà la costante di dissociazione: 33,7 μ M. La curva di titolazione mostra l'andamento tipico del *binding* su siti multipli a diversa affinità: molto probabilmente un secondo sito di legame è costituito dalla tasca contenente normalmente l'FMN sul dominio LOV.

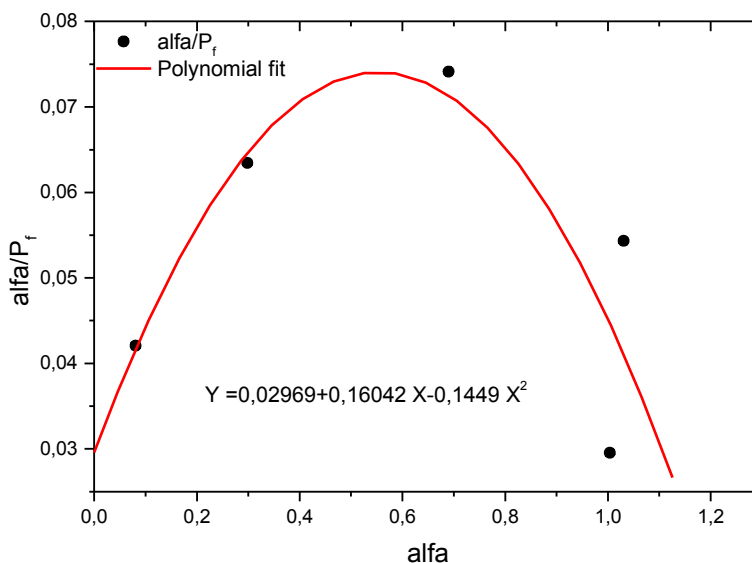


Figura 4-5 Grafico di *Scatchard* della preparazione apoproteica di YtvA con GTP.

4.2 Misure di binding su diversi costrutti derivati da YtvA

Per identificare la regione proteica di YtvA responsabile del legame con GTP_{TR} si sono realizzate delle prove su costrutti proteici contenenti il solo dominio LOV, il dominio STAS e il LOV più il cappuccio N-terminale. Nella figura numero 4-6 lo spettro d'assorbimento del GTP_{TR} libero in soluzione confrontato con una preparazione di GTP_{TR} 1 μ M lasciata ad incubare con YLOV e N-YLOV, si può notare che lo spettro non subisce alcun tipo di variazione se unito al solo dominio LOV, mentre un leggero *shift* è presente nel caso del dominio N-YLOV, anche se in misura nettamente inferiore rispetto alle esperienze di *binding* con YtvA.

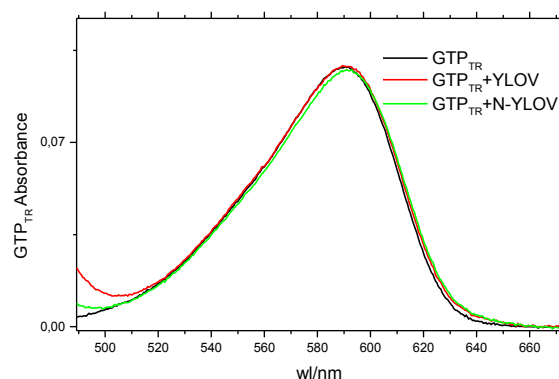


Figura 4-6 Spettro di assorbimento di GTP_{TR} in soluzione (nero), in aggiunta a YLOV (rosso) e in aggiunta a N-YLOV (verde).

Per ottenere la costante di dissociazione relativa alla reazione di legame fra N-YLOV e GTP_{TR} è stata realizzata una titolazione con concentrazione costante di GTP_{TR} 1 μM e concentrazione proteica in eccesso. Il procedimento utilizzato per calcolare K_D è lo stesso impiegato nella preparazione della proteina intera: ΔF_{max} è stato calcolato come inverso dell'intercetta dell'interpolazione lineare e come tendenza all'infinito della variazione di fluorescenza in rapporto alla concentrazione proteica. I due valori ricavati sono rispettivamente pari a: 21719 e 26269, nel calcolo di α è stato utilizzato il valor medio dei due: 24.000.

A partire da ΔF_{max} sono stati calcolati α e α/P_f per realizzare il grafico di *Scatchard* e ricavare quindi la costante di dissociazione, che risulta essere pari a 46,4 come inverso del coefficiente proporzionale ed a 49,1 come inverso dell'intercetta con l'asse delle ordinate.

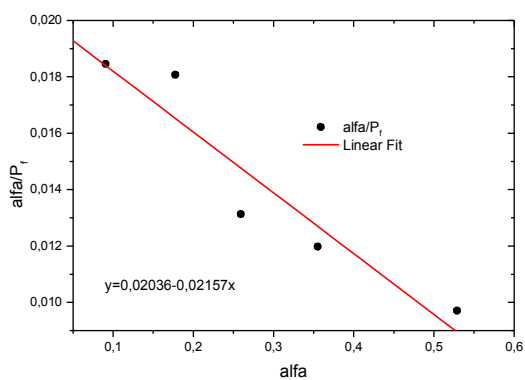


Figura 4-7 Grafico di *Scatchard* della titolazione GTP_{TR} N-YLOV.

Il secondo metodo di derivazione della costante di dissociazione è quello corrispondente all'interpolazione di α in funzione di P_f come nella figura 4-8; qui di seguito i calcoli per ricavare la concentrazione di proteina libera in corrispondenza di $\alpha=1/2$.

$$y = \frac{P_1 \cdot x}{(P_2 + x)} \quad 0,5 \cdot P_2 + 0,5 \cdot x = P_1 \cdot x \quad x = \frac{0,5 \cdot P_2}{(P_1 - 0,5)} \quad \text{In questo caso } K_D = 50,1$$

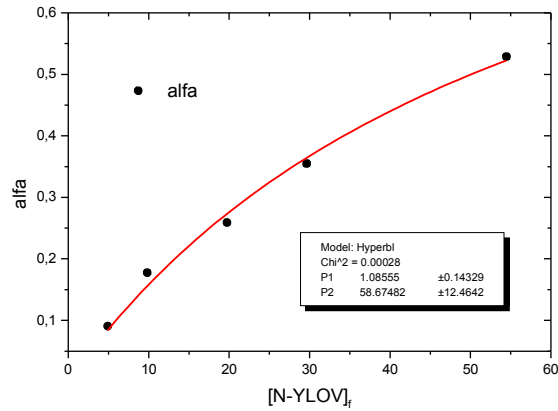


Figura 4-8 α in funzione della concentrazione di proteina libera, in grafico l'interpolazione con curva iperbolica.

Utilizzando invece il metodo di “Mazzini” (vedi articolo II) la costante di dissociazione risulta essere pari a 66 μM , come si può vedere nell'interpolazione riportata nella figura 4-9.

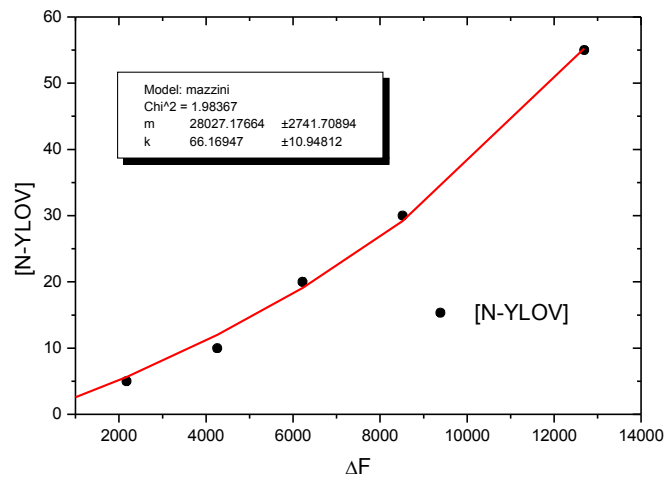


Figura 4-9 Grafico di $[\text{N-YLOV}]$ in funzione della variazione di fluorescenza del GTP_{TR} rispetto allo stato libero in soluzione. I punti sono stati interpolati con la curva non lineare di Mazzini (vedi articolo II).

Nella tabella numero 4-3 sono messi a confronto i diversi valori ottenuti per la costante di dissociazione di N-YLOV con GTP_{TR} attraverso i metodi sopra riportati.

Si può affermare che N-YLOV lega il GTP_{TR} con una costante di dissociazione superiore, quindi il *binding* risulta più debole rispetto alla proteina intera e soprattutto, la posizione del massimo di assorbimento é diversa, indicando un sito di legame differente, probabilmente aspecifico; l'analisi effettuata è comunque indicativa del fatto che il cappuccio N-terminale partecipa al legame con GTP_{TR} .

Tabella 4-3 Risultati a confronto della costante di dissociazione calcolata con tre metodi diversi: per K_D^1 vedi figura numero 4-8, K_D^2 è l'inverso dell'intercetta con le ordinate del grafico di *Scatchard*, K_D^3 è l'inverso del coefficiente proporzionale del grafico di *Scatchard*, K_D^4 è dedotta con il *fitting* non lineare attraverso la curva di "Mazzini".

K_D^1	K_D^2	K_D^3	K_D^4
50,1 μ M	49,1 μ M	46,4 μ M	66,2

Proseguendo con lo studio di legame del GTP_{TR} con i singoli domini di YtvA, una titolazione è stata eseguita anche con GTP_{TR} 1 μ M e STAS in concentrazione variabile. Il picco d'assorbimento del GTP_{TR} non subisce *shift* significativi, così come la fluorescenza del GTP_{TR} con lunghezza d'onda di eccitazione pari a 590 nm (vedi figura 4-10). Tale esperienza sembrerebbe mostrare la mancanza totale di affinità fra il nucleotide e il dominio proteico, contrariamente a quanto ipotizzato nell'articolo II. E' da sottolineare il fatto che la preparazione di STAS a disposizione per l'esperienza, analizzata anche con elettroforesi, fosse particolarmente ricca di frammenti proteici e impurità, per poter affermare qualcosa di più definitivo quindi la tecnica andrebbe ripetuta su una preparazione proteica più pura.

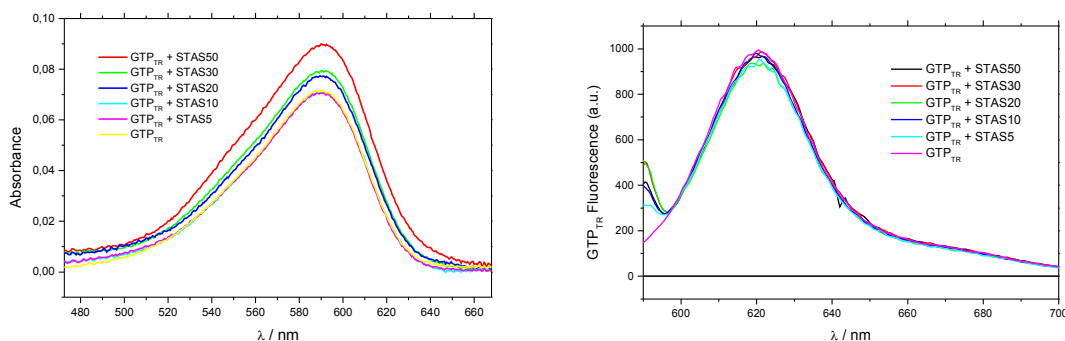


Figura 4-10 Nel grafico a sinistra assorbimento del GTP_{TR} libero in soluzione e lasciato ad incubare con STAS in concentrazione variabile (da 5 a 50 μ M). Nella figura di destra fluorescenza d'assorbimento del GTP_{TR} libero in soluzione e lasciato ad incubare con il dominio STAS mantenendo la lunghezza d'onda di eccitazione pari a 590 nm.

5 Proprietà di legame con NTP del recettore di luce blu YtvA ed effetti della mutazione E105L

La riproduzione dell'articolo è stata gentilmente concessa da *Springer Science*

NTP-binding properties of the blue-light receptor YtvA and effects of the E105L mutation

Valentina Buttani · Wolfgang Gärtner ·
Aba Losi

Received: 29 December 2006 / Revised: 2 March 2007 / Accepted: 15 March 2007 / Published online: 19 April 2007
© EBSA 2007

Abstract YtvA is a blue-light-sensing protein from *Bacillus subtilis* related to plant phototropins. It carries a LOV (light, oxygen and voltage) domain, binding FMN (flavin mononucleotide) as chromophore, and a STAS (sulphate transporters and antisigma-factor antagonists) domain with poorly characterized function. We have recently shown that YtvA binds triphosphate nucleotides (NTP) and highlighted a structural similarity between the STAS domain and small GTP-binding proteins. In this work we further investigated the NTP-binding properties of YtvA, employing a fluorescent derivative of GTP (GTP_{TR}) and mutagenesis experiments. The main results are as follows: (a) competition experiments indicate that the affinity of YtvA for GTP is much higher than that for GDP and GMP. (b) Blue-light-induced structural changes are transmitted from the LOV core to the NTP-binding cavity, establishing a possible intraprotein signal-transduction pathway. (c) A mutation in the central β -scaffold of the LOV core, E105L, impairs the light-driven spectroscopic changes of bound GTP_{TR}. This result is supported by circular dichroism data, in that YtvA-E105L does not show the light-induced conformational change in the turn fraction that characterizes YtvA, implying that E105 is functionally important. (d) In the structural model of the

LOV-STAS complex, based on docking algorithms, the interface includes the I β -H β loop on the LOV core, as well as parts of the central β -scaffold. E105 is predicted to interact with the LOV-STAS linker region, suggested to play a role in phototropin signaling.

Keywords LOV domain · STAS domain · Fluorescence · Modeling

Introduction

The discovery of the ‘LOV paradigm’ from the group of Briggs (Christie et al. 1999; Salomon et al. 2000) represents a turning point in the field of photosensory biology. Phototropin (phot) proteins are responsible for a variety of blue-light-driven effects in plants, aiming at maximizing the efficiency of the photosynthesis process, meanwhile minimizing overexposure damages (Briggs and Christie 2002). The LOV (light, oxygen and voltage) domains (LOV1 and LOV2) of phot are readily expressed as autonomously folding protein domains (ca. 110 aa) and have been extensively characterized during the last few years. In the dark, phot-LOV domains bind non-covalently the FMN (flavin mononucleotide) in its oxidized form and absorb maximally at about 450 nm (LOV₄₄₇) (Christie et al. 1999; Salomon et al. 2000). Blue-light illumination triggers a photocycle with the formation of a blue-shifted, metastable FMN-cysteine C(4a) thiol adduct (LOV₃₉₀) (Salomon et al. 2000, 2001), via the μ s decay of the FMN triplet state (Kottke et al. 2003; Losi et al. 2004a; Swartz et al. 2001). LOV₃₉₀ slowly reverts to LOV₄₄₇ in the dark on the second-to-minute time-scale (depending on the specific system) (Kasahara et al. 2002). LOV domains belong to the PAS (PerArntSim) superfamily and the

Proceedings of the XVIII Congress of the Italian Society of Pure and Applied Biophysics (SIBPA), Palermo, Sicily, September 2006.

V. Buttani · A. Losi (✉)
Department of Physics, University of Parma,
viale G.P. Usberti 7/A, 43100 Parma, Italy
e-mail: losia@fis.unipr.it

W. Gärtner
Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, Stiftstr. 34-36,
45470 Mülheim an der Ruhr, Germany

structure retains the typical PAS fold, with a central anti-parallel five-stranded β -scaffold, flanked by connecting helices (Crosson and Moffat 2001, 2002; Fedorov et al. 2003). In the following, the secondary structure elements are named in alphabetical order, followed by greek alpha or greek beta to denote helices and strands, respectively: from the N- to C- terminus of the LOV core: A β , B β , C α , D α , E α , F α , G β , H β , and I β . The reactive cysteine is located within the D α –E α loop.

The LOV photochemical paradigm has apparently been conserved among distant phyla and LOV proteins are widely found in prokaryotes (Crosson et al. 2003; Losi 2006). Phot-like photochemical reactions have been demonstrated for *Bacillus subtilis* YtvA (Losi et al. 2002), *Pseudomonas putida* SB2-LOV (Krauss et al. 2005) and a LOV-HK (histidine-kinase) protein from *Caulobacter crescentus* (Losi 2004). Genes coding for LOV proteins are up to now detectable in about 15% of the sequenced prokaryotic genomes, making them the most spread blue-light photosensors in microorganisms (Losi 2006). Although information on the in vivo function of bacterial LOV proteins is still sparse, recent works reported that YtvA acts as a positive regulator of the general stress transcription factor σ B in *B. subtilis* (Akbar et al. 2001), specifically in the environmental branch of the complex pathway leading to σ B activation (Gaidenko et al. 2006), in a clearly shown blue-light regulated way (Avila-Perez et al. 2006). Consistently, cysteine 62 that forms the adduct with FMN during YtvA photocycle (Losi et al. 2002), is essential for YtvA to exert its positive regulation on σ B during environmental stress (Gaidenko et al. 2006). These data indicate that YtvA is indeed a blue-light photoreceptor in *B. subtilis*, although light is not the sole environmental input that can be sensed by this protein (Gaidenko et al. 2006). These recent studies allow regarding YtvA as a real flavin-based blue-light photoreceptor in *B. subtilis*, not only a blue-light sensitive protein. Furthermore it has been suggested that YtvA might be involved in light-control of sporulation, via cross talks of the stress response and sporulation pathways (Avila-Perez et al. 2006). Indeed, the alternative transcription factor σ E regulates during sporulation the expression of more than 253 genes in the mother cell (Eichenberger et al. 2003), and in cells overexpressing σ E, YtvA is upregulated [supplementary material in Eichenberger et al. (2003)]. In addition, YtvA is down-regulated in cells overexpressing SPOIID, a transcriptional regulator involved in the synthesis of spore coat proteins [supplementary materials in Eichenberger et al. (2004)], supporting a still putative regulatory function of YtvA within the sporulation pathway.

STAS is thought to be the effector domain of YtvA, although little is known of its molecular functionality and we cannot exclude that it is actually a second sensing

domain that acts synergistically with the light-sensitive LOV core. We have recently shown that the STAS domain confers to YtvA the ability to bind guanosine triphosphate (GTP) and adenosine triphosphate (ATP), meanwhile highlighting a topological similarity between the STAS domain and small GTP-binding proteins (Buttani et al. 2006). A general role of STAS domains as NTP-binding units (N = nucleoside) had been anticipated (Aravind and Koonin 2000) and GTP binding was demonstrated for SPOIIAA, a small STAS protein involved in *B. subtilis* sporulation (Najafi et al. 1996). Interestingly, activation of the stress and sporulation pathways in *B. subtilis* are related to a drastic drop of ATP and GTP (Piggot and Hilbert 2004; Zhang and Haldenwang 2005), pointing to a functional role for the in vitro observed NTP-binding properties of YtvA.

In this work we further analyze the nucleotide-binding properties of YtvA, by employing a red-light fluorescent derivative of GTP (BODIPY[®] TR-GTP, referred to as GTP_{TR}) (McEwen et al. 2001). Competition experiments employing non-fluorescent guanosine derivatives were carried out in order to assess the relative affinity of YtvA towards GTP, GDP and GMP. Besides, we investigated the effects of the E105L mutation (Losi et al. 2005) on the GTP-binding properties of YtvA. E105 is a charged amino acid, unique to YtvA-like LOV proteins and is localized on the H β strand, within the central β -sheet of the LOV core (Losi et al. 2005), a molecular surface suggested to be involved in intraprotein interactions (Buttani et al. 2007) and signal transduction in LOV proteins (Harper et al. 2003, 2004). We also present a low-resolution structural model of truncated YtvA, based on docking simulations between the LOV and STAS domains and in agreement with the experimental data.

Experimental

His-tagged YtvA and YtvA-E105L were expressed in *E. coli* (BL21) (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using IPTG (BioMol, Hamburg, Germany)-induction and employing the pET28a plasmid (Novagen-Merck, Darmstadt, Germany), as described (Losi et al. 2002, 2003, 2005). The proteins were purified by affinity chromatography on Talon (Qiagen, Hilden, Germany) and finally concentrated in Na-phosphate buffer 10 mM, NaCl 10 mM, pH = 8. Protein purity was routinely checked by gel electrophoresis. The flavin:protein ratio was 1:1 in the samples employed here, as judged from the UV/VIS absorbance ratio, that was ≤ 4 , meaning that no apoprotein is present (Losi et al. 2005). Guanosine-5'-triphosphate, BODIPY[®] TR 2'-(or-3')-O-(N-(2-aminoethyl) urethane), trisodium salt (GTP_{TR}), was purchased from Molecular Probe (Eugene,

OR, USA); Guanosine-5'-[γ -thio]triphosphate tetrasodium salt (GTP), Guanosine-5'-[γ -thio] diphosphate trilithium salt (GDP) and Guanosine 5'-monophosphate disodium salt hydrate were from Sigma-Aldrich (Milano, Italy). Absorbance spectra were recorded with a Jasco 7850 UV/V is spectrophotometer. Steady state fluorescence emission spectra were recorded with a Perkin–Elmer LS-50 spectrofluorimeter, at 20°C. GTP_{TR} was excited at 590 nm with an excitation path length of 0.4 cm. The spectra were divided for the fraction of absorbed energy, $(1-10^{-Abs})$ where Abs = absorbance at the excitation wavelength, $\lambda_{ex} = 590$ nm, in order to obtain a signal that is proportional to the quantum yield of fluorescence, Φ_F . Unless otherwise stated, binding experiments were carried out with YtvA in its blue-light activated state (i.e., FMN covalently bound to Cys 62), achieved by illuminating the sample with a blue-light emitting Led-Lenser[®] V8 lamp (470 nm, Zweibrüder Optoelectronics, Solingen, Germany) as previously described (Buttani et al. 2006). The fluorescence spectra were always recorded upon excitation at 590 nm (where solely GTP_{TR} absorbs and no energy transfer can occur from or to other fluorophores). The dissociation constant (K_D) between YtvA and GTP_{TR} and the maximum fluorescence enhancement (ΔF_{max}) was evaluated by fitting the experimental data with the non-linear equation [rearranged from Eq. 2 in Favilla and Mazzini (1984)]:

$$[P]_{tot} = \frac{K_D + 1 - \frac{\Delta F}{\Delta F_{max}}}{\frac{\Delta F_{max}}{\Delta F} - 1} \quad (1)$$

where $[P]_{tot}$ is the concentration of YtvA and ΔF is the absolute difference value in the normalized fluorescence between GTP_{TR} alone and in the presence of YtvA. An agreeable fitting of the experimental data to Eq. 1 indicates that a 1:1 complex is formed and is equivalent to obtain a linear Scatchard plot, intercepting the x-axis in 1 (Favilla and Mazzini 1984). The concentration of GTP_{TR} was kept constant at 1 μ M and [YtvA] was varied between 2 and 55 μ M.

Circular dichroism spectroscopy and data analysis

Circular dichroism (CD) experiments were carried out using a Jasco J715 spectropolarimeter, calibrated with ammonium d-10-camphorsulphonic acid. The measurements were carried out in the far-UV spectral region (190–250 nm) at a temperature of 20°C and the buffer background was always subtracted. The optical pathway was 0.2 cm. Protein concentration was estimated from the absorption coefficient at 220 nm, $\epsilon_{220}^{YtvA} = 492,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buttani et al. 2007). The corresponding value for FMN is $\epsilon_{220}^{FMN} = 34,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, thus introducing a

negligible error. The mean residue ellipticity Θ_{MRW} was calculated from the concentration of residues, c , (281 aa/protein for YtvA, including the tag), according to the formula $\Theta_{MRW} = \Theta_{obs}/(10 \times c)$, where c is in mol l^{-1} , $l = 0.2$ cm, Θ_{obs} is in mdeg and Θ_{MRW} in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Typically, the protein concentration was in the μ M range and $c = 10^{-6} \times 281 = 2.8 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ (Buttani et al. 2007). Prediction of secondary structure composition was performed using the convex constraint analysis (CCA) algorithm (Perczel et al. 1991), as previously described (Buttani et al. 2007).

Docking simulation, evaluation of complexes and model validation

The structural model of the LOV (aa 25–126) and STAS (aa 147–254) domain of YtvA has been previously presented (Buttani et al. 2006; Losi et al. 2002). In order to obtain a model structure of the LOV–STAS interaction complex, the two domains were docked together using the ClusPro Server, including ZDOT 1.0 (Mandell et al. 2001) software and the ZDOCK v.2.3 (Chen et al. 2003). The ClusPro docking algorithm evaluates billions of putative complexes, retaining a preset number with favourable surface complementarities. A filtering method is then applied to this set of structures, selecting those with good electrostatic and desolvation free energies for further clustering. The quality of the ClusPro predicted LOV–STAS complexes was verified by using the protein structure analysis and validation server (SAVS) of the NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics at the University of California, Los Angeles (UCLA) (<http://www.nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>) that implements the programs PROCHECK (Laskowski et al. 1993), WHAT_CHECK (Hooft et al. 1996)(4), ERRAT (Colovos and Yeates 1993), VERIFY_3D (Luthy et al. 1992) and PROVE (Pontius et al. 1996).

Results

GTP_{TR} binding to YtvA and competition with unlabeled nucleotides

The spectral properties of GTP_{TR} have been reported in (Buttani et al. 2006). In phosphate buffer GTP_{TR} absorbs maximally at 590 nm, with emission centered at 620 nm. Upon addition of YtvA (in the blue-light activated state), we observed an enhancement of GTP_{TR} fluorescence and a concomitant red-shift (ca. 13 nm) and hyperchromicity of the absorption spectrum in the visible region (Buttani et al. 2006). Analysis of the experimental data with Eq. 1 gave a

dissociation constant $K_D = 38 \mu\text{M}$, with a single binding site. This is only true if no apoprotein is present (UV/VIS ratio in the dark state ≤ 4 (Losi et al. 2005), since flavin-free YtvA binds GTP_{TR} with very high affinity. Two binding sites with different affinity were preliminarily identified, one of them being most probably on the apo-LOV core (Losi et al., unpublished). Displacement experiments with excess of non-fluorescent GTP (100 μM) resulted in a partial reversal of the absorption red shift and in a diminished fluorescence, indicating a competition for the same binding site as GTP_{TR} . Due to the low-binding constant, the exchange was not complete (Buttani et al. 2006). ATP had a similar effect, albeit with a slower time-course. The displacement experiments confirmed that the nucleotide moiety effectively binds to the protein and that the observed spectroscopic effects are not due to an unspecific binding of the GTP_{TR} BODIPY[®] moiety.

Conversely, an equivalent excess of guanosine diphosphate (GDP) or guanosine monophosphate (GMP) is not sufficient to displace GTP_{TR} bound to YtvA and under these conditions we could not record any loss of GTP_{TR} fluorescence (Fig. 1) and back shift of the absorption maximum (not shown).

The slight increase in the fluorescence observed upon adding GDP or GMP is due to the partial dark recovery of YtvA (Buttani et al. 2006). These results indicate that the affinity of YtvA for GDP and GMP is much lower than for triphosphate nucleotides.

Effects of the E105L mutation

Glutamate 105 is localized on the H β strand, in close vicinity with the conserved W103, which was shown to be

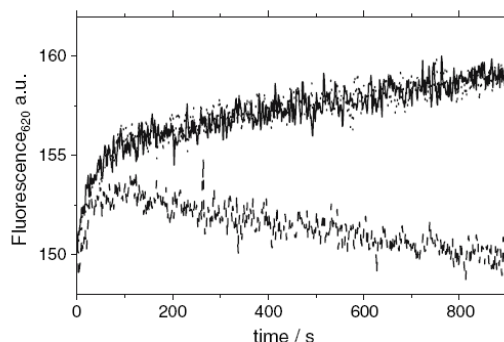


Fig. 1 Time course of fluorescence for GTP_{TR} bound to YtvA upon addition of GTP (dashed line), GDP (dotted line) and GMP (full line). For the experiments, 1 μM GTP_{TR} was incubated overnight with 44 μM YtvA. 100 μM of non-labeled nucleotides were then added, immediately before starting to record the fluorescence change at 620 nm (excitation at 590 nm)

a marker of intraprotein interactions in YtvA (Losi et al. 2005) and in phot-LOV2 (Harper et al. 2003). In between, another conserved residue, N104, is hydrogen bonded to O4 on FMN (Crosson and Moffat 2001) and undergoes changes in the lit state of LOV domains (Freddolino et al. 2006). E105 is found in YtvA, YtvA-like family and other bacterial proteins, but is invariably a hydrophobic aa (L, I or M) in phot LOV domains (Losi 2004). For these reasons, E105 could be functionally important in YtvA and represent a specific activation pathway, driven by the formation of the photoproduct.

In the light-adapted state YtvA-E105L binds GTP_{TR} as shown by the increase in fluorescence and the red-shift in the absorption and emission spectra, as in YtvA-WT (wild type) (Fig. 2).

The data obtained by fluorescence titration experiments as described in Buttani et al. (2006) are well fitted with Eq. 1, indicating a 1:1 stoichiometry. The obtained $K_D = 35 \mu\text{M}$ is very similar to the one for YtvA-WT ($K_D = 38 \mu\text{M}$). Also in YtvA-E105L, GTP_{TR} can be partially displaced by an excess of GTP (not shown).

Despite the sharp similarities in the binding properties, GTP_{TR} -loaded YtvA-WT and YtvA-E105L show significant differences when they switch between the dark (YtvA₄₅₀) and light-activated state (YtvA₃₉₀). GTP_{TR} bound to YtvA undergoes slight but well reproducible light-driven spectroscopic changes (Fig. 1, 3) In YtvA₄₅₀-WT, the absorption maximum further shifts to the red and the fluorescence slightly increases (Buttani et al. 2006). These changes are fully reversible and indicate that the light-driven conformational changes, centered on the LOV domain, are transmitted to the GTP_{TR} -binding cavity on the STAS domain. For YtvA-E105, upon reversion to the dark-

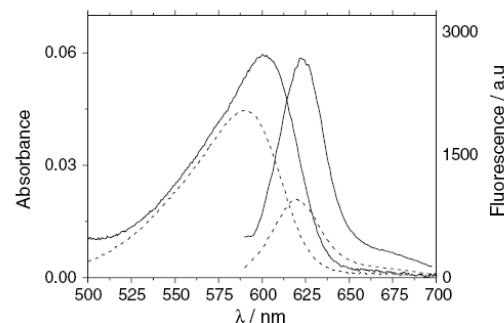


Fig. 2 Visible absorption (left) and emission spectra (right) for GTP_{TR} in phosphate buffer (dotted line) and in the presence of 55 μM YtvA-E105L (full line). The emission spectra were recorded upon 590-nm excitation. The output was divided by $1-10^{-\text{Abs}}$, in order to normalize for the difference in absorbance [see “Experimental” and Buttani et al. (2006)]

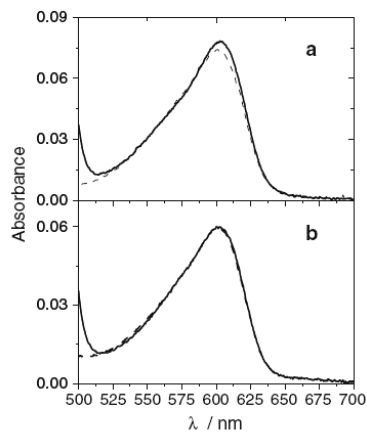


Fig. 3 Absorption spectra of YtvA-bound GTP_{TR} in the visible spectral range in the dark- (full lines) and the light- (dashed line) adapted state for **a** YtvA-WT and **b** YtvA-E105L. Conditions were as in Fig. 1. The E105L substitution impairs the spectroscopic changes of bound GTP_{TR} in switching from YtvA₄₅₀ (dark) to YtvA₃₉₀ (light)

adapted state, no further red shift in the absorption spectrum or of the fluorescence intensity are detected. This suggests that the transmission of light-driven conformational changes from the LOV core to the STAS domain is impaired (Fig. 3).

In agreement with this result, a careful inspection of the circular dichroism spectra (Buttani et al. 2007) and of a larger number of investigated samples than previously reported (Losi et al. 2005) indicates that in YtvA-E105L a light-driven change in the turn fractions, characteristic of full length YtvA, is not observed (Table 1), a feature particularly evident in the light–dark difference spectra (Fig. 4).

The conformational changes observed in YtvA-E105L more closely resemble those in the isolated LOV domain (Buttani et al. 2007) and their transmission to the rest of protein is impaired or occurs via a different pathway. This confirms the observations made with GTP_{TR}.

Structural modeling of the LOV-STAS interaction complex in YtvA

Despite its stability as a full-length protein in solution, it was not possible up to now to obtain a crystal structure of YtvA, potentially due to an intrinsic conformational heterogeneity (Buttani et al. 2007). Therefore, we have tried to obtain structural information by means of molecular modeling and domain–domain docking simulation. The structure of YtvA-LOV exhibits the characteristic PAS fold, a pocket including the helix-turn-helix

Table 1 Results of the CCA analysis on CD spectra

Secondary Structure	YtvA-E105L (%) ^a (281 aa) ^b		N-LOV (%) ^a (147 aa) ^b		YtvA (%) ^a (281 aa) ^b	
	Dark	Light	Dark	Light	Dark	Light
I. α -Helix	34.7 ± 6.1 (98 ± 17)	35.6 ± 5.2 (100 ± 15)	24.9 ± 2.4 (37 ± 4)	27.3 ± 0.9 (40 ± 1)	30.9 ± 4.7 (87 ± 13)	32.0 ± 6.5 (90 ± 18)
II. RC	22.5 ± 0.5 (63 ± 1)	22.6 ± 1.7 (63 ± 4)	24.9 ± 0.9 (37 ± 1)	23.6 ± 0.9 (35 ± 1)	22.4 ± 1.0 (63 ± 3)	21.7 ± 3.5 (61 ± 10)
III. β -turns/others	17.0 ± 2.9 (48 ± 8)	17.6 ± 0.4 (49 ± 1)	27.5 ± 1.0 (40 ± 1)	28.3 ± 1.5 (42 ± 2)	16.8 ± 3.6 (47 ± 10)	18.7 ± 3.5 (52 ± 10)
IV. $\beta_{\text{widespread}}$ / β_{bar}	6.7 ± 2.8 (19 ± 8)	9.3 ± 2.8 (26 ± 8)	12.1 ± 1.6 (18 ± 2)	15.9 ± 0.9 (23 ± 1)	9.9 ± 4.1 (28 ± 11)	11.0 ± 3.7 (31 ± 10)
V. β_{antipar}	18.9 ± 4.0 (53 ± 11)	14.9 ± 4.0 (43 ± 11)	10.6 ± 3.4 (15 ± 5)	4.9 ± 2.1 (7 ± 3)	19.9 ± 5.6 (56 ± 16)	16.6 ± 5.8 (47 ± 16)
$\sum_{i=1}^n [y_i - f(\lambda)]^2$ ^c	5.2 ± 2.5	4.9 ± 3.1	2.2 ± 1.8	2.1 ± 0.7	6.2 ± 2.8	5.2 ± 2.3

^a The statistical error is the standard deviation and is obtained from three sets of measurements on three different preparations for YtvA-E105L, four sets of measurements on two different preparations for N-LOV (LOV core + N-terminal cap), eleven sets of measurements, and nine different preparations for YtvA. Data for N-LOV and YtvA are taken from Buttani et al. (2007)
^b The number of aa (amino acids) is given in parenthesis, below the percentages, together with the statistical error
^c Average squared error, where y_i = experimental curve, $f(\lambda)$ = fitting curve See Buttani et al. (2007) for details

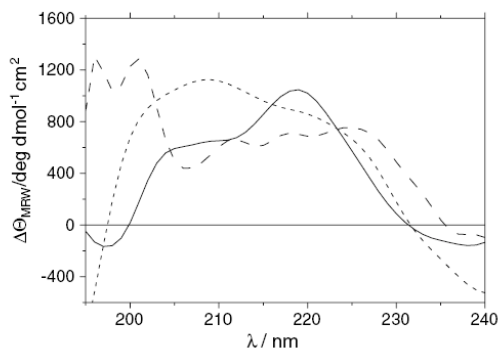


Fig. 4 Light-dark circular dichroism spectra, displayed as difference in the mean residue ellipticity, $\Delta\Theta_{MRW}$, for YtvA-E105L (full line) compared with YtvA-WT (dashed line) and YtvA-LOV (dotted line) (the latter two spectra were taken from ref. (Buttani et al. 2007) for comparison). In YtvA-WT, the positive band at $\lambda > 230$ nm has been assigned to a variation in the turns fraction occurring upon formation of the photoproduct YtvA₃₉₀ (Buttani et al. 2007)

C α -E α (with the intervening D α) and the helical connector F α as walls, and a five-stranded antiparallel β -scaffold as floor (A β , B β and G β , H β , I β) (Losi et al. 2002). The extended β -scaffold constitutes a sort of pavement for the FMN chromophore, by forming a hydrophobic pocket around the dimethyl benzyl ring and surrounding the isoalloxazine ring by providing polar and apolar interactions. The STAS domain is characterized by an extended β -sheet that includes four parallel β -strands (^SB β , ^SD β , ^SF β , ^SH β , the superscript ‘‘S’’ denotes the STAS domain), with intervening α -helices (^SC β , ^SE β , ^SG β). The first strand, ^SA β , is antiparallel to the remaining four (Buttani et al. 2006).

In the modeled LOV-STAS complex best ranked by ClusPro (cluster 1), the C-terminal end of the LOV core is too far away from the N-terminus of the STAS domain to be linked with the 20 aa long linker; therefore, it was not taken into consideration. The second-best-ranked model complex (cluster 2) is shown in Fig. 5, together with the model for the LOV-LOV dimer that we have recently reported (Buttani et al. 2007). The Verify-3D score (Luthy et al. 1992) (>93) and the Errat-quality factor for cluster 2 (Colovos and Yeates 1993) (90.1) were quite high, both indicative of a reasonable and well-resolved model-structure.

The model complex proposed in Fig. 5 is in agreement with several observations: (a) the two domains are favourably oriented with their terminal ends to be joined with the linker; (b) from previous works we know that the isolated LOV domain of YtvA forms a dimer, where the interface is mostly built via the central β -scaffold, and that the same surface is involved in LOV-STAS interactions

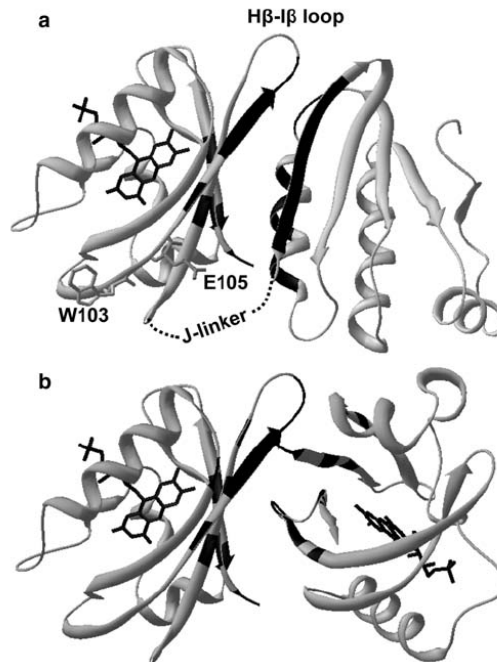


Fig. 5 a Model of the LOV-STAS interaction complex in YtvA as compared with the (b) LOV-LOV dimer (Buttani et al. 2007). In black regions at the contact interface (residues within 4 Å). In both cases the interface comprises residues in the central β -scaffold of the LOV core, namely belonging to A β , B β , H β , I β and the H β -I β loop (indicated in a). On the STAS domain ^SA β , ^SC α and the ^SC α -^SD β loop participate in the LOV-STAS interaction. The J-linker, joining the LOV and the STAS domains, is schematically drawn to indicate its proximity to E105

(Buttani et al. 2007). Accordingly, in cluster 2, the LOV core offers the same interacting surface as within the LOV-LOV dimer; (c) E105 is not part of the LOV-STAS interface; rather it is likely to interact with the linker, that is rich in positively charged lysine residues, and by this pathway it facilitates the transmission of conformational changes to the STAS domain. The same is true for W103, a marker of intraprotein interactions in YtvA (Losi et al. 2004b), most probably also showing a direct contact with the linker (Losi et al. 2005); (d) the LOV-STAS interface includes the H β -I β loop and part of the adjacent H β , I β strands on the LOV core. These structural elements have been recently suggested to be part of the activation pathway of phot-LOV2 (Freddolino et al. 2006). Furthermore, two conserved residues that form hydrogen bonds with C4 on FMN, N104 and Q123, are localized on H β and I β , respectively, and are likely to undergo changes upon formation of the photoadduct (Crosson and Moffat 2002;

Fedorov et al. 2003). This point will be further discussed (See “Discussion”).

We could not model with sufficient confidence the remaining parts of the protein, namely the N-terminal cap (aa 1–24), the J-linker (aa 127–145) and the C-terminal end (aa 255–261). It has been derived from circular dichroism data that the N-cap is largely helical (Buttani et al. 2007), but we have no hint about its orientation. Also for the J-linker we cannot state from circular dichroism data (Buttani et al. 2007) with certainty that it is helical like in phot-LOV2 (Harper et al. 2003). Preliminary data on an extended YtvA-LOV construct show that the J-linker is unordered in the dark state and does not prevent LOV-LOV dimerization (Losi et al., unpublished), in sharp contrast with phot-LOV2 (Harper et al. 2003).

Discussion

The binding of GTP and ATP to YtvA is in line with the suggested idea that STAS domains may have a general NTP-binding role (Aravind and Koonin 2000). To our knowledge, this has up to now only been demonstrated for the SPOIIA protein (Najafi et al. 1996) and for YtvA (Buttani et al. 2006), and it may be representative of a novel NTP-binding fold. It has been suggested that the conserved ⁵Dβ–⁵Ez loop that in STAS domains hosts the DxxG motif is involved in γ -phosphate binding, as in P-loop GTPases (Leipe et al. 2002), and the β -sheet scaffold could accommodate the rest of the NTP molecule (Aravind and Koonin 2000). This would resemble lipid binding by Sec14 domains, which have the same structural fold but show no detectable sequence similarity to the STAS domains (Aravind et al. 1999). The Sec14 family groups substrate carriers or transfer proteins, e.g., guanine nucleotide exchange factors (Schmidt and Hall 2002), phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer proteins (Sha et al. 1998) and alpha-tocopherol transfer proteins (Meier et al. 2003). A similar binding configuration between GTP and YtvA-STAS would explain the lack of a P-loop pattern, in which the ligand would be deeply embedded within the cavity, formed by the parallel β -scaffold and the two helical segments ⁵Cz and ⁵Ez.

The spectroscopic changes undergone by bound GTP_{TR} upon YtvA light–dark conversion, suggest that NTP binding has a functional significance, related to the role of YtvA as a photoreceptor during activation of the general stress factor σ B and, possibly, during sporulation (Avila-Perez et al. 2006). Indeed it has been observed that in *B. subtilis* both responses are related to a drastic drop of ATP and GTP (Piggot and Hilbert 2004; Zhang and Haldenwang 2005). It can be imagined that the STAS domain of YtvA is not an effector/catalytic domain, as previously suggested,

but rather a sensing unit for the level of NTPs within the cell. This would configure YtvA as a double sensor, for light and metabolic state, somehow reminiscent of the blue-light and redox state sensor Appa in *Rhodobacter sphaeroides* (Braatsch et al. 2002). In agreement with this suggestion, still largely to be verified, we have up to now no hints that YtvA has a GTPase activity. Prolonged incubation and dark-light cycling of YtvA does not alter the affinity of GTP_{TR} that is not blocked on the γ -phosphate and therefore could be hydrolyzed. The displacement experiments show nevertheless that the affinity for GDP is much lower than for GTP, so that, in case of hydrolysis of the γ -phosphate, GDP_{TR} should be released. Nevertheless, a weak hydrolytic activity as observed for SPOIIAA (Najafi et al. 1996) cannot be excluded. It is possible that an essential cofactor is missing: it is well known that in many ATPases and GTPases Mg²⁺ is required for the hydrolytic activity (Leipe et al. 2002), but in YtvA even very low concentrations of this cation induce extensive precipitation, preventing any titration experiments (not shown).

The results obtained with YtvA-E105L, for which the light-driven effects on bound GTP_{TR} are negligible, point to a critical role of this residue in transmitting the conformational changes from the light-sensitive LOV core to the STAS domain, a result confirmed by circular dichroism experiments (Figs. 3, 4; Table 1). In future experiments, this mutation might help to define a physiological role for the NTP-binding activity of YtvA and its link with light sensing. It has been proven that, in the absence of other stress factors, Cys 62 is required for YtvA to exert its positive regulatory role on σ B, but it is not required for the positive effect of YtvA overexpression in the presence of salt stress (Gaidenko et al. 2006). Furthermore, transcriptional analysis of the *ytvA* structural gene indicated that it provides the entry point for at least one additional environmental input, mediated by the Spx global regulator of disulfide stress (Gaidenko et al. 2006). The effects of the E105L substitution and of the C62A/E105L double mutation on the complex physiological responses mediated by YtvA should help to understand the relevance of the NTP-binding properties of the protein with respect to its light-sensing role.

Previous spectroscopic data (Losi et al. 2005) and the LOV–STAS model complex presented here, indicate that E105 does not interact directly with the STAS domain, but rather with the interdomain J-linker region. This is similar to the configuration in the NMR-derived structural model of phot-LOV2, where the initial portion of H β containing W491 (corresponding to W103 in YtvA) and L493 (E105 in YtvA) interact directly with the initial part of the J-linker (Harper et al. 2003). The J-linker in phot-LOV2 is partially helical in the dark state and undergoes light-driven

unfolding (Harper et al. 2003), a process thought to be involved in regulation of the kinase activity (Harper et al. 2004). This feature is not observed in YtvA (Buttani et al. 2007; Losi et al. 2005), although we have provided evidence here that the linker region might be functionally important, via interactions with the H β strand of the LOV core. Future mutagenesis experiments will help in functional mapping the residues important in intraprotein communication in YtvA.

The LOV–STAS complex modeled here agrees well with previous data, indicating that in the full-length protein a LOV-domain mediated dimerization is prevented from the presence of the STAS domain. Dimerization is in fact still observed in an extended LOV construct that comprises the N-terminal cap (Buttani et al. 2007), and it is also not prevented by the presence of the J-linker (Losi et al., unpublished). In general, the relevance of LOV–LOV dimerization in LOV proteins has been poorly investigated, although dimerization is considered a key feature in PAS-mediated sensing/regulation (Taylor and Zhulin 1999; Gilles-Gonzalez and Gonzalez 2005), and LOV1 might be responsible for phototropin dimerization (Salomon et al. 2004). We note also that LOV–LOV dimerization and its competition with intraprotein interactions might provide a functional explanation for the presence of two LOV domains in plant phot [see Buttani et al. (2007) for a detailed discussion].

According to the model in Fig. 5, the interaction surface on the LOV core comprises the H β –I β loop, a region suggested to be important in activation of phot-LOV2 (Freddolino et al. 2006). The two main pathways for LOV domains activation highlighted by means of molecular dynamics simulations (Freddolino et al. 2006), appear therefore to be both represented in YtvA: (a) conformational changes within H β on the LOV core, most probably driven by the light-induced movement of N104 (a LOV1-like pathway) (Freddolino et al. 2006), could be transmitted to the STAS domain via the linker region; (b) the H β –I β loop and adjacent regions within the β -scaffold might interact directly with the STAS domain, thereby being affected by conformational changes triggered by the movement of Q123, another conserved residue hydrogen bonded to O4 on FMN and located on I β . This would represent a LOV2-like pathway (Freddolino et al. 2006).

Acknowledgments We are grateful to Zhen Cao and Eugenia Polverini for sample preparation and advice. This work was partially supported by DFG (Forschergruppe FOR526).

References

Akbar S, Gaidenko TA, Min K, O'Reilly M, Devine KM, Price CW (2001) New family of regulators in the environmental signaling

- pathway which activates the general stress transcription factor of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:1329–1338
- Aravind L, Koonin EV (2000) The STAS domain a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Curr Biol* 10:R53–R55
- Aravind L, Neuwald AF, Ponting CP (1999) Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr Biol* 9:R195–R197
- Avila-Perez M, Hellingwerf KJ, Kort R (2006) Blue-light activates the σ B-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol* 188:6411–6414
- Braatsch S, Gomelsky M, Kuphal S, Klug G (2002) A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* 45:827–836
- Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 7:204–210
- Buttani V, Losi A, Polverini E, Gärtner W (2006) Blue news: NTP binding properties of the blue-light sensitive YtvA protein from *Bacillus subtilis*. *FEBS Lett* 580:3818–3822
- Buttani V, Losi A, Eggert T, Krauss U, Jaeger K-E, Cao Z, Gärtner W (2007) Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV–LOV dimerization and interdomain interactions. *Photochem Photobiol Sci* 6:41–49
- Chen R, Li L, Weng Z (2003) ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* 52:80–87
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:8779–8783
- Colovos C, Yeates TO (1993) Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci* 2:1511–1519
- Crosson S, Moffat K (2001) Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:2995–3000
- Crosson S, Moffat K (2002) Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14:1067–1075
- Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003) The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42:2–10
- Eichenberger P, Jensen ST, Conlon EM, van Ooij C, Silvaggi J, Gonzalez-Pastor JE, Fujita M, Ben Yehuda S, Stragier P, Liu JS, Losick R (2003) The σ E Regulon and the Identification of Additional Sporulation Genes in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 327:945–972
- Eichenberger P, Fujita M, Jensen ST, Conlon EM, Rudner DZ, Wang ST, Ferguson C, Haga K, Sato T, Liu JS, Losick R (2004) The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biology* 2:e328–e328
- Favilla R, Mazzini A (1984) The binding of 1,N6-etheno-NAD to bovine liver glutamate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 788:48–57
- Fedorov R, Schlichting I, Hartmann E, Domratheva T, Fuhrmann M, Hegemann P (2003) Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch: the Phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* 84:2492–2501
- Freddolino PL, Dittich M, Schulten K (2006) Dynamic switching mechanisms in LOV1 and LOV2 domains of plant phototropins. *Biophys J* 91:3630–3639
- Gaidenko TA, Kim TJ, Weigel AL, Brody MS, Price CW (2006) The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188:6387–6395

- Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G (2005) Heme-based sensors: defining characteristics, recent developments, and regulatory hypotheses. *J Inorg Biochem* 99:1–22
- Harper SM, Neil LC, Gardner KH (2003) Structural basis of a phototropin light switch. *Science* 301:1541–1544
- Harper SM, Christie JM, Gardner KH (2004) Disruption of the LOV-J α helix interaction activates phototropin kinase activity. *Biochemistry* 43:16184–16192
- Hooft RW, Vriend G, Sander C, Abola EE (1996) Errors in protein structures. *Nature* 381:272–272
- Kasahara M, Swartz TE, Olney MA, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H, Asamizu E, Tabata S, Kanegae H, Takano M, Christie JM, Nagatani A, Briggs WR (2002) Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 129:762–773
- Kottke T, Heberle J, Dominic Hehn, Hegemann P (2003) Phot-LOV1: photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* 84:1192–1201
- Krauss U, Losi A, Gärtner W, Jaeger K-E, Eggert T (2005) Initial characterization of a blue-light-sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct. *Phys Chem Chem Phys* 7:2229–2236
- Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291
- Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L (2002) Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. *J Mol Biol* 317:41–72
- Losi A (2004) The bacterial counterparts of plants phototropins. *Photochem Photobiol Sci* 3:566–574
- Losi A (2006) Flavin-based photoreceptors in bacteria. In: Häder D-P, Jori G (eds) *Flavin photochemistry and photobiology*, Elsevier, Amsterdam, pp 223–276
- Losi A, Polverini E, Quest B, Gärtner W (2002) First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J* 82:2627–2634
- Losi A, Quest B, Gärtner W (2003) Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain. *Photochem Photobiol Sci* 2:759–766
- Losi A, Kottke T, Hegemann P (2004a) Recording of blue-light induced energy and volume changes within the wild-type and mutated phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys J* 86:1051–1060
- Losi A, Ternelli E, Gärtner W (2004b) Tryptophan fluorescence in the *Bacillus subtilis* phototropin-related protein YtvA as a marker of interdomain interaction. *Photochem Photobiol* 80:150–153
- Losi A, Ghiraldelli E, Jansen S, Gärtner W (2005) Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light-sensing LOV protein YtvA. *Photochem Photobiol* 81:1145–1152
- Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356:83–85
- Mandell JG, Roberts VA, Pique ME, Kotlovoy V, Mitchell JC, Nelson E, Tsigelny I, Ten Eyck LF (2001) Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit. *Protein Eng* 14:105–113
- McEwen DP, Gee KR, Kang HC, Neubig RR (2001) Fluorescent BODIPY-GTP analogs: real-time measurement of nucleotide binding to G proteins. *Anal Biochem* 291:109–117
- Meier R, Tomizaki T, Schulze-Briese C, Baumann U, Stocker A (2003) The molecular basis of vitamin E retention: structure of human α -tocopherol transfer protein. *J Mol Biol* 331:725–734
- Najafi S M, Harris DA, Yudkin MD (1996) The SpoIIAA protein of *Bacillus subtilis* has GTP-binding properties. *J Bacteriol* 178:6632–6634
- Perczel A, Hollosi M, Tusnady G, Fasman D G (1991) Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins. *Protein Eng* 4:669–679
- Piggot PJ, Hilbert DW (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7:579–586
- Pontius J, Richelle J, Wodak SJ (1996) Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures. *J Mol Biol* 264:121–136
- Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR (2000) Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue-light receptor phototropin. *Biochemistry* 39:9401–9410
- Salomon M, Eisenreich W, Dürr H, Scleicher E, Knieb E, Massey V, Rüdiger W, Müller F, Bacher A, Richter G (2001) An optomechanical transducer in the blue-light receptor phototropin from *Avena sativa*. *Proc Nat Acad Sci USA* 98:12357–12361
- Salomon M, U. Lempert U, Rüdiger W (2004) Dimerization of the plant photoreceptor phototropin is probably mediated by the LOV1 domain. *FEBS Lett* 572:8–10
- Schmidt A, Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16:1587–1609
- Sha B, Phillips SE, Bankaitis VA, Luo M (1998) Crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein. *Nature* 391:506–510
- Swartz TE, Corchnoy SB, Christie JM, Lewis JW, Szundi I, Briggs WR, Bogomolni RA (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue-light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* 276:36493–36500
- Taylor L, Zhulin IB (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479–506
- Zhang S, Haldenwang WG (2005) Contributions of ATP, GTP, and redox state to nutritional stress activation of the *Bacillus subtilis* σ B transcription factor. *J Bacteriol* 187:7554–7560

5.1 Studio di ATP-binding

Lo studio delle proprietà di legame di YtvA nei confronti di nucleotidi è proseguito con la titolazione proteica con un derivato fluorescente dell'ATP, indicato come ATP_{TR} ; anche in questo caso si sono analizzate tramite spettroscopia di assorbimento e di fluorescenza delle soluzioni contenenti proteina in concentrazione variabile (da 2 a 35 μM) e ligando in concentrazione bassa e costante (1,2 μM). Lo spettro d'assorbimento di ATP_{TR} mostra un picco centrato intorno ai 590 nm in soluzione, ed uno *shift* dello stesso, con un sensibile aumento del coefficiente di assorbimento all'aumentare della concentrazione proteica, vedi figura numero 5-1. In prima analisi è possibile affermare quindi che l'ATP tende a legarsi ad YtvA, tesi già evidenziata nell'articolo II grazie agli esperimenti di competizione fra nucleotidi marcati e non.

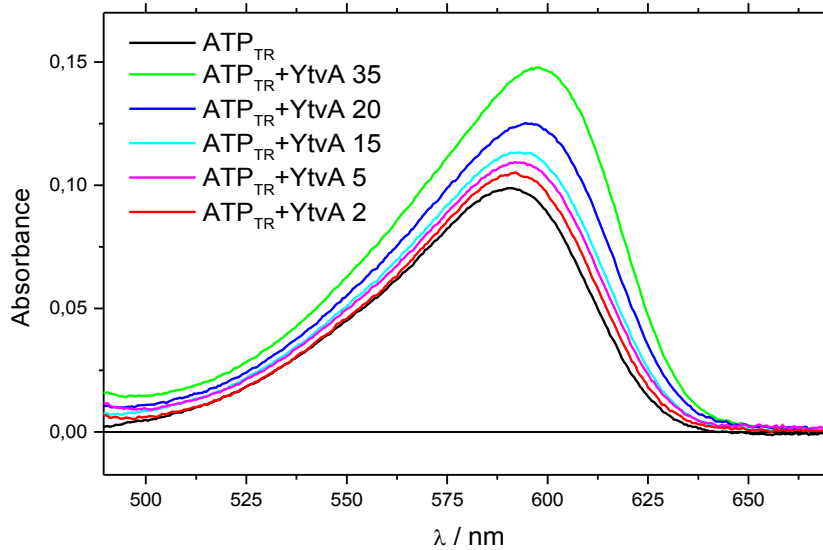


Figura 5-1 Assorbimento di ATP_{TR} in funzione della concentrazione proteica, YtvA in concentrazione variabile da 2 a 35 μM , ATP_{TR} in concentrazione costante pari a 1,2 μM .

La seconda fase sperimentale prevede la registrazione degli spettri di fluorescenza delle soluzioni di ATP_{TR} e proteina già analizzate con spettroscopia di assorbimento: è possibile notare uno *shift* verso il rosso proporzionale alla concentrazione di YtvA presente in soluzione; a differenza di quanto osservato durante le esperienze con GTP_{TR} però l'intensità di fluorescenza diminuisce all'aumentare del legame fra nucleotide e proteina. Questo fenomeno può essere dovuto al fatto che l'adenosina è un donore di elettroni più debole rispetto alla guanosina e quindi agisce come *quencher* più debole quando il nucleotide è libero in soluzione, evidenziando così i fenomeni di *quenching* interni alla cavità di legame nella proteina. In seguito alla dimostrazione del legame fra YtvA ed ATP_{TR} sono state realizzate anche prove negli stati *dark* e *light* ed è stato possibile così dimostrare che anche l'ATP_{TR}, così come il GTP_{TR}, subisce un cambiamento conformazionale fotoindotto (vedi figura numero 5-2).

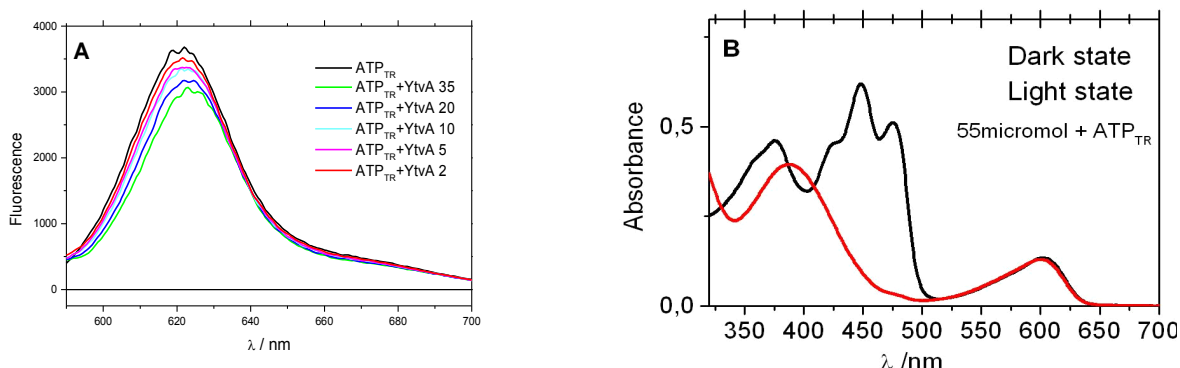


Figura 5-2 A: Spettri di fluorescenza di ATP_{TR} con eccitazione a 590 nm, concentrazione di ATP_{TR} costante e pari a 1,2 μM, concentrazione proteica variabile da 2 a 35 μM. **B:** Spettri d'assorbimento di una soluzione YtvA 55 μM e ATP_{TR} 1,2 μM allo stato *dark* ed allo stato *light*.

5.2 Modello di YtvA

L'esperimento di *docking* fra i modelli dei due domini LOV e STAS riportato nell'articolo III è stato completato con la creazione di un modello per la proteina intera, senza però il cappuccio N-terminale, poiché i dati provenienti dagli altri esperimenti relativamente a tale componente non si sono rivelati sufficienti per poterlo orientare nello spazio. A tale scopo l'algoritmo di calcolo ZDOCK non ha prodotto modelli ragionevoli per l'introduzione del *linker*, probabilmente perché la componente idrofobica dell'algoritmo di calcolo risulta troppo importante: il dominio STAS

tende in quasi tutti i complessi risultanti a legarsi alla zona elicale del dominio LOV, quindi senza possibilità di collegamento mediante il *linker*. Il software DOT ha prodotto invece strutture più interessanti, e molto simili fra loro, fra tutte queste abbiamo scelto la numero 9 (diversa dal complesso riportato nell'articolo) per procedere alla creazione di un modello per YtvA. Tale scelta è stata motivata dall'analisi di una serie di fattori, primo su tutti la previsione di PPIpred sulle zone di legame per STAS e LOV; grande peso ha avuto anche la valutazione della conformazione in cui i due domini potessero essere legati con più facilità. In seguito alla scelta realizzata il *linker* è stato modellato in alfa elicale (amminoacidi 104-121), come previsto dai programmi di predizione di struttura secondaria a partire dalla sequenza amminoacidica (vedi paragrafo 3). I domini LOV e STAS sono quindi stati entrambi legati al *linker*, e le due zone di contatto sono state messe in *loop*. Tutte queste operazioni sono state eseguite grazie al software "What if", implementato in "SPDBViewer"; una minimizzazione energetica sui due *loop* creati è stata eseguita mantenendo bloccato il resto della struttura, a completamento del modello creato è stata effettuata una minimizzazione finale sull'intera sequenza amminoacidica. Sul modello creato sono state compiute delle verifiche standard per valutarne la coerenza: il grafico di Ramachandran non mostra la presenza di elementi in zone non permesse, non sono presenti *clash* e gli amminoacidi che tendenzialmente devono formare legami idrogeno si trovano orientati verso il solvente. Nella figura numero 5-3 è riportato il modello appena descritto, a destra sempre lo stesso modello in cui sono stati evidenziati i punti rilevanti nello studio eseguito su YtvA: in blu il triptofano W103, che negli esperimenti di fluorescenza si è mostrato sensibile alle variazioni conformazionali proteiche in seguito ad assorbimento di luce blu, nel nostro modello viene a trovarsi accanto alla zona *linker*, soggetto quindi alle variazioni conformazionali che verosimilmente trasmettono il segnale d'assorbimento del fotone dal dominio LOV al resto della proteina. La sequenza DLSG, deputata al legame con nucleotidi, si trova accanto al loop H β -I β (vedi figura 1-2), che come noto è coinvolto nelle variazioni luce-buio (vedi articolo II). La seconda sequenza deputata al legame con GTP (NKLD), si trova invece esposta al solvente nella zona diametralmente opposta rispetto al dominio LOV, tale sequenza effettivamente non risulta però conservata nelle proteine YtvA-like. L'acido glutammico E105 (in rosa) si trova accanto al *linker*, quindi in buon accordo con le affermazioni riportate nell'articolo precedente, che lo identificano come amminoacido essenziale nella trasmissione delle informazioni dal dominio LOV al dominio STAS.

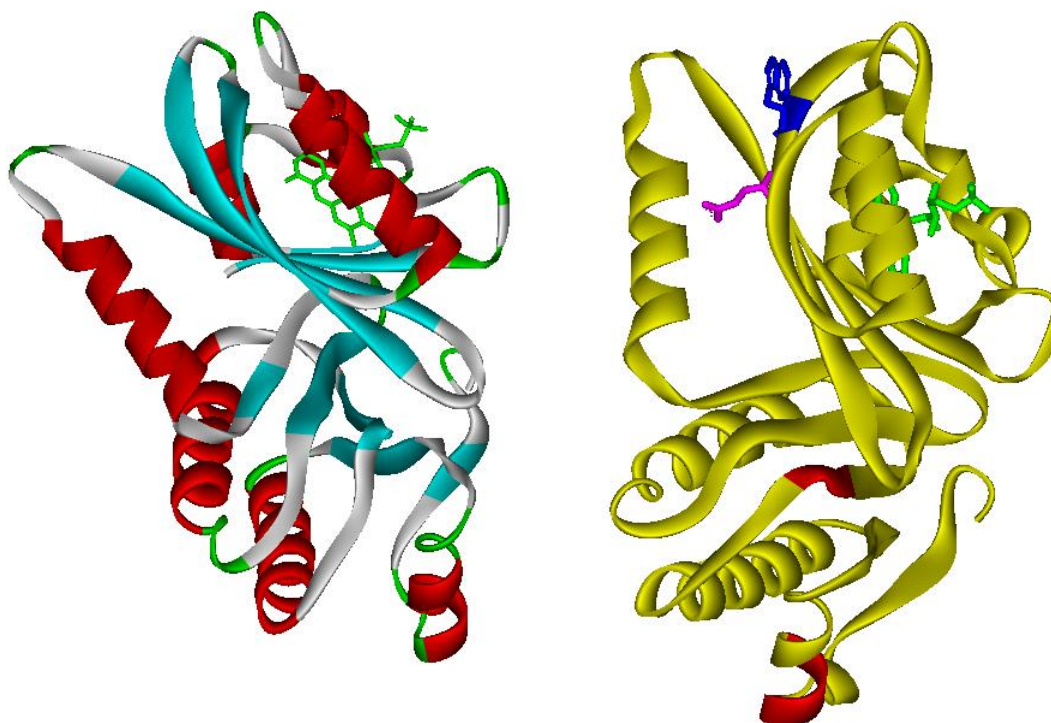


Figura 5-3 Modello di YtvA ottenuto grazie al *docking* fra i modelli LOV e STAS, a destra evidenziati in figura il triptofano W103, in blu, l'acido glutammico E105 in rosa, le sequenze deputate al legame con i nucleotidi in rosso.

Un secondo tentativo di modellizzazione è stato realizzato a partire dal modello di PpSB2 da *Pseudomonas putida* [54]. Tale proteina, costituita da 151 amminoacidi, comprende un dominio sensore LOV seguito da un segmento C-terminale (31 amminoacidi) ad alfa elica; nell'articolo presentato da Krauss il segmento elicale, di carattere anfipatico si allinea ai foglietti β del dominio LOV, con cui realizza un legame idrofobo attraverso la parte non polare; gli amminoacidi carichi negativamente restano invece esposti al solvente. Le sequenze di YtvA e di PpSB2 sono state allineate attraverso il software "Clustal W" (vedi figura numero 5-4), e conseguentemente il modello di YtvA-LOV è stato sovrapposto a quello di PpSB2. Il *linker* elicale di connessione di YtvA è stato modellato sulla parte C-terminale di PpSB2 ed attraverso il software "GetMol" il dominio LOV e il *linker* sono stati uniti. In SPDBViewer si è eseguita la minimizzazione energetica, ed il modello così ottenuto è stato sottoposto a *docking* con il modello del dominio STAS presentato nell'articolo II, attraverso i software DOT e ZDOCK. Fra i cluster di soluzioni proposte è stato scelto il terzo modello risultante dal software DOT in base a considerazioni energetiche e conformazionali. Il modello è stato quindi completato legando il *backbone*, creando un *loop* fra gli amminoacidi 119-123 ed eseguendo una minimizzazione

energetica finale, tutte queste operazioni sono state eseguite con il programma SPDBViewer (vedi figura numero 5-5). Il grafico di Ramachandran sul modello ottenuto è positivo: gli unici amminoacidi che non sono compresi nelle zone di maggior probabilità sono infatti quelli già evidenziati nei singoli domini. Non sono inoltre presenti amminoacidi che fanno *clash*, neppure con lo scheletro. Infine gli amminoacidi che non formano legami idrogeno attesi sono esposti al solvente.

YLOV	MASFQSFGLPGQLEVIKALDHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNOQGFVQMT
PpSB2	-----MSPMINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILIVNPAFERLT
	:. : :::: ::* . *:*::: :.. ::* * ::*
YLOV	GYETEEILGKNCRFLOQKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGT
PpSB2	GYCADDILYQDCRFLQGEDHDQPGIAI IREAIREGRPCQVLRNRYRKDGS
	** ::* * :*****:. * . : ** *::: .* :*****:
YLOV	MFWNELNIDPMEIEDK--TYFVGIQNDI TKQKEYEKLEDSLTEITAL --
PpSB2	LFWNELSITPVHNEADQLTYIIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRR
	:*****.* *:. * . *:*:*****.* * * * :. : :* : *
YLOV	-----
PpSB2	QQGQAKH

Figura 5-4 Allineamento fra le sequenze amminoacidiche di YLOV e PpSB2, in giallo la sequenza di YtvA che è stata modellata ad alfa elica sul modello di PpSB2.

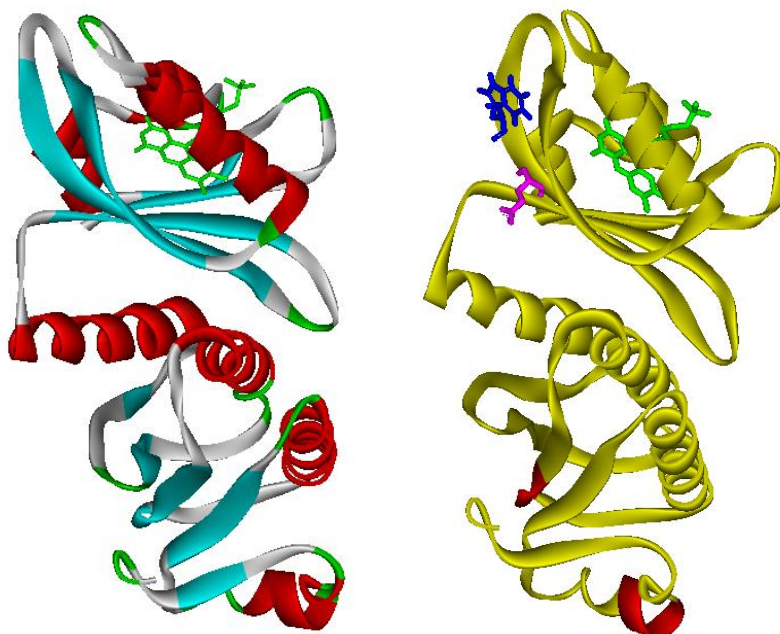


Figura 5-5 Modello di YtvA creato su PpSB2. In evidenza nella figura a destra: in blu il triptofano del dominio LOV, W103; in rosa l'acido glutammico E105; in rosso i domini che hanno capacità di legare nucleotidi.

Il modello presentato è in accordo con le considerazioni espresse nel paragrafo 3: il foglietto β del dominio LOV si trova infatti all'interfaccia fra i due domini e crea un legame principalmente idrofobico con il *linker* e le eliche del dominio STAS. Nella figura 5-5 è evidenziato anche il triptofano W103, che si viene a trovare in prossimità del *linker*, ed è quindi sensibile alle variazioni conformazionali proteiche in seguito ad assorbimento della luce, a conferma di quanto ottenuto sperimentalmente nell'analisi di fluorescenza su YtvA. L'amminoacido E105 si trova in prossimità del *loop* di unione al *linker*, quindi in buona posizione per poter mediare la risposta fotochimica al domino effettore. Il modello non è però in accordo con tutti i dati sperimentali: i *partner* più probabili al legame con E105, ovvero le lisine K134 e K130 (non evidenziate nell'immagine), non si trovano in una posizione tale da consentire il contatto, inoltre le sequenze "NKLD" e "DLSG" (evidenziate in rosso nella figura 5-5), deputate al legame con GTP, si trovano dalla parte opposta rispetto al dominio LOV, affacciate al solvente.

5.3 Docking GTP-dominio STAS

Il legame fra dominio STAS e GTP è stato analizzato anche mediante esperienze di *docking* computazionale, lo studio dell'interazione fra le due molecole tiene conto delle componenti entalpica ed entropica: la prima rappresenta la somma fra energia interna del ligando ed energia d'interazione, mentre la seconda, più complessa da valutare, tiene conto della desolvatazione. In questo genere di analisi due sono i limiti principali: la mancanza del solvente esplicito, e la rigidità della proteina, cui non è consentito variare conformazione; la molecola di ligando invece è tenuta flessibile negli angoli delle torsioni. Il software utilizzato per l'analisi in oggetto è "Autodock Tools", che esegue un campionamento conformazionale e sfruttando un algoritmo genetico porta ad un set di conformazioni probabili di interazione fra proteina e ligando. Ogni *job* di docking consiste di più *run*, alla fine dei quali vengono selezionati gli individui migliori; tutte le conformazioni prescelte nei vari *run* vengono poi sovrapposte affinché si possa valutare la *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Le strutture vengono successivamente raggruppate in *cluster* secondo una soglia impostata di RMSD, le strutture più *clusterizzate* sono quelle più probabilmente corrette. La carica del recettore è stata calcolata mediante *Kollman*, che connette le cariche parziali note di ogni amminoacido, per il ligando invece è stato utilizzato *Gasteid*.

Prima di realizzare l'esperienza di *docking* con STAS e GTP si è simulato il legame fra la molecola di GTP e la proteina Ffh, da *Thermus aquaticus*, coinvolta nei sistemi di traslocazione durante la sintesi proteica, che è emersa fra le sequenze depositate durante la ricerca di proteine leganti GTP simili al dominio STAS di YtvA (vedi articolo II). Tale proteina, essendo stata cristallizzata con una molecola di GNP (codice PDB: 1jpi), permette di verificare la correttezza della metodologia utilizzata. Il secondo *cluster* a minor energia è praticamente sovrapposto alla struttura effettivamente ritrovata in cristallizzazione (vedi immagine numero 5-6), il risultato positivo permette di utilizzare lo stesso approccio anche con il dominio STAS.

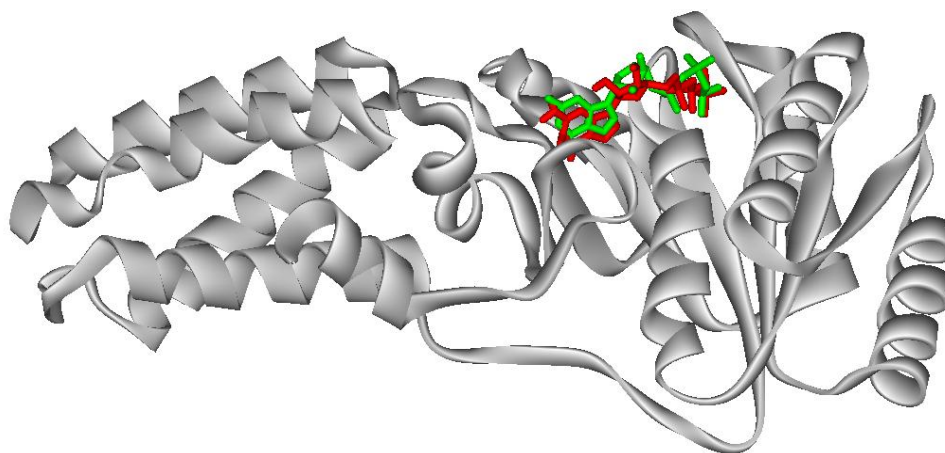


Figura 5-6 Struttura cristallina di Ffh, in verde il nucleotide cristallizzato, in rosso il risultato di *docking*.

Nell'esperienza, grazie al software *Sybyl 7.0*, è stata preparata la molecola di GTP- γ -thio, la stessa utilizzata nelle esperienze di fluorescenza, con un atomo di zolfo al posto dell'ossigeno legato al fosfato γ . La popolazione di partenza è stata fissata a 150 individui, ed il numero di *run* è stato definito pari a 100.

La struttura più *clusterizzata* e ad energia minore coincide anche con la seconda nell'istogramma dell'energia (vedi figura numero 5-7), e vede il GTP che si lega allo STAS con i gruppi fosfati nella zona di legame con nucleotidi predetta (DLSG). La struttura più *clusterizzata* presenta invece i gruppi fosfati del GTP vicino alla sequenza NKLD (vedi figura 5-7), che è presente solo in YtvA, e non nelle proteine YtvA-simili. Si può quindi concludere che il legame di GTP con il dominio STAS, già dimostrato attraverso esperienze di fluorescenza, avviene molto probabilmente nelle zone deputate in letteratura al legame con nucleotidi, sebbene la

conformazione ottenuta sia in contrasto con quanto atteso, essendo la sequenza DXXG (detta anche *Walker B*) il cosiddetto switch, che interagisce con il fosfato terminale.

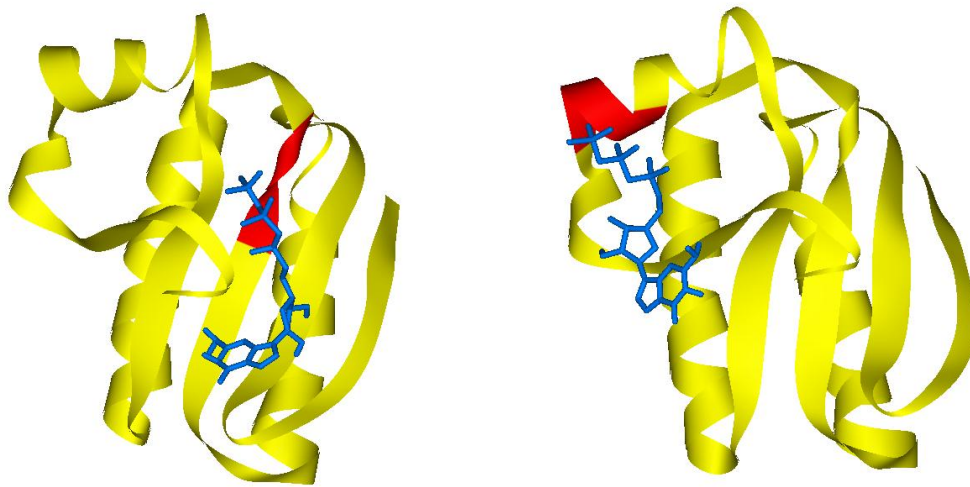


Figura 5-7 Risultati di docking fra dominio STAS e GTP, a sinistra in rosso la sequenza DLSG, a destra la sequenza NKLD.

6 Un sistema di trasduzione del segnale tipo *Two-component* guidato da luce blu nel patogeno di piante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

La riproduzione dell'articolo è stata gentilmente concessa dalla *Biophysical Society*

A Blue Light Inducible Two-Component Signal Transduction System in the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Z. Cao,* V. Buttani,[†] A. Losi,[†] and W. Gärtner*

*Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, D-45470 Mülheim, Germany; and [†]Department of Physics, University of Parma, Italy

ABSTRACT The open reading frame *PSPTO2896* from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* encodes a protein of 534 amino acids showing all salient features of a blue light-driven two-component system. The N-terminal LOV (light, oxygen, voltage) domain, potentially binding a flavin chromophore, is followed by a histidine kinase (HK) motif and a response regulator (RR). The full-length protein (PST-LOV) and, separately, the RR and the LOV+HK part (PST-LOV_{ΔRR}) were heterologously expressed and functionally characterized. The two LOV proteins showed typical LOV-like spectra and photochemical reactions, with the blue light-driven, reversible formation of a covalent flavin-cysteine bond. The fluorescence changes in the lit state of full-length PST-LOV, but not in PST-LOV_{ΔRR}, indicating a direct interaction between the LOV core and the RR module. Experiments performed with radioactive ATP uncover the light-driven kinase activity. For both PST-LOV and PST-LOV_{ΔRR}, much more radioactivity is incorporated when the protein is in the lit state. Furthermore, addition of the RR domain to the fully phosphorylated PST-LOV_{ΔRR} leads to a very fast transfer of radioactivity, indicating a highly efficient HK activity and a tight interaction between PST-LOV_{ΔRR} and RR, possibly facilitated by the LOV core itself.

INTRODUCTION

Light is an energy source and an ever present stimulus on earth. The short wavelength region, i.e., the ultraviolet (UV) and blue light range, however, can be harmful to organisms because of the deleterious effects on DNA (UV range) (1) or the capability to excite, with high yield, ubiquitously present photosensitizing compounds, e.g., porphyrins and flavins (blue light effects) (2). Photoexcitation converts such compounds with high efficiency into the triplet state, which in the presence of oxygen generates the highly oxidative oxygen singlet state and other reactive oxygen containing species (3). Blue light detecting photosensors are thus of the utmost importance for any organism, allowing the development of repair systems (4), the formation of protective (shielding) substances, or—for motile organisms—the escape from regions with high UV/blue light intensity (5). At least three systems have been identified recently that fulfill this function. All are based on flavin derivatives that serve as chromophores in these photoreceptors. They were named cryptochromes; light, oxygen, voltage (LOV) proteins; and blue-light-sensing using flavins (BLUF) proteins (6). The most widely spread of these flavin-based photoreceptors are the LOV domain-containing proteins (LOV) (7). They are assumed to be present in all plants, and prokaryotic genome analysis revealed the presence of LOV proteins in ~15% of all sequenced genomes (6). In prokaryotes the light-sensing LOV module is coupled to diverse effectors domains, such as kinases (similar to the plant phototropins), phosphodiesterases, response regulators (RRs), DNA-binding transcription factors, and regulators of stress σ factors (7,8). The majority

of LOV domains is found together with histidine kinase (HK) motifs or with transcription factors in the same open reading frame (ORF) or arranged in a single operon, allowing an efficient physiological response of the cell to a light pulse. This relatively simple, stereotypical structure of photoreceptors, together with their instantaneous (=light triggered) activation or deactivation makes these sensory proteins excellent candidates to study signal transduction mechanisms.

A considerably large percentage of the bacterial LOV proteins are members of the histidine protein kinase (HPK) kinase superfamily (6,8). In bacteria, signal transducing HPKs, together with phosphoaspartyl RRs, are the key elements of two-component signal transduction systems (9). The HPKs generally contain an N-terminal sensing domain (e.g., LOV) and a C-terminal kinase core, but additional domains may be present. The kinase core of HPK features the phosphoaccepting histidine box (H-box) within the homodimerization domain and, downstream to it, the highly conserved homology boxes of the nucleotide-binding, catalytic domain (N-, D-, F-, and G-boxes) (10). In response to a signal, HPKs autophosphorylate the H-box histidine residue from which the phosphoryl group is transferred to a conserved aspartic acid residue in the receiver domain of an RR (9). HPKs can be further divided into subfamilies according to their sequence similarity (10). The hybrid HPK-RR LOV proteins from Pseudomonadales and Xanthomonadales (γ -proteobacteria) are highly homologous and form a distinct family (6,8). The kinase domain is characteristic of the HPK4 class: besides a typical H-box, these proteins exhibit the PF-TTK signature in the so-called F-box. Furthermore, their LOV domains are among those that are most homologous to (plant) phot-LOVs. Given these features, namely, the association of an “ideal” phot-like LOV domain with prototyp-

Submitted March 21, 2007, and accepted for publication August 23, 2007.

Address reprint requests to W. Gärtner, E-mail: gaertner@mpi-muelheim.mpg.de.

Editor: Janos K. Lanyi.

© 2008 by the Biophysical Society
0006-3495/08/02/897/09 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.108977

ical kinase and RR motifs, they are good candidates to test the molecular properties of this novel, putatively a blue light-driven two-component signaling system in bacteria. Additionally, although there is no report on light-elicited responses in these organisms, a few links have been established among plant defense systems, plant photosensors, and bacterial pathogens belonging to *Pseudomonales* (11–13), prompting an investigation of bacterial photosensors in view of their potential role during the infectivity process.

We present studies on the molecular and spectroscopic properties of the LOV-HPK-RR hybrid protein (gene name *PSPTO2896*) from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), an important plant pathogen whose genome was recently sequenced (14). The recombinant protein from ORF *PSPTO2896* will be named PST-LOV. To this purpose three protein constructs were built: i), the full protein PST-LOV2896 encompassing the LOV, HPK, and RR domains; ii), the truncated PST-LOV2896 Δ RR (comprising the LOV and HPK domain); and iii), the separated RR.

Pseudomonas syringae has gained remarkable interest due to its capability to infect a wide variety of plants, exhibiting strain-to-host specificity with ~50 known pathovars (pv.) (15). Three strains, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, and *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A have been genome sequenced (14,16,17). An inspection revealed ORFs with strong homology to LOV domains. The ORF *PSPTO2896* from the genome of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 encodes a LOV protein of 534 amino acids (PST-LOV), corresponding to a molecular mass of 58.9 kDa. Sequence alignment reveals a domain architecture with a typical LOV domain (aa 33–136) containing all salient amino acids required for flavin-mononucleotide (FMN) binding, followed by a HK motif and an ATP-binding domain (aa 154–389). The final part of PST-LOV is built as an RR domain (aa 409–534), making this protein a typical two-component system, in this case the HPK activity being fused to the RR domain (Fig. 1). The HK domain is characteristic of the HPK4 class (8,10). Although generally RRs contain one or more output domains downstream of the receiver domain, in some cases, as in the here investigated protein, only the receiver domain is present, often fused with the cognate HPK (hybrid HPK-RR) (10). In this case, no RR-output domain was identified in the vicinity of this encoding gene.

Analysis of this protein and the demonstration of light-induced signal transduction between the two domains would add blue light as a stimulus to the two-component system, which is present in many prokaryotic microorganisms.

MATERIALS AND METHODS

Cloning and biochemistry

Pst DC3000 was grown in Luria-Bertani medium overnight at 37°C. Genomic DNA was isolated with Qiagen DNeasy Tissue kit (Qiagen,

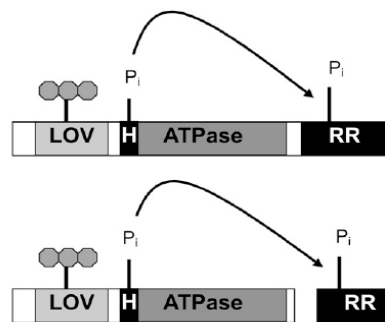


FIGURE 1 Principal architecture of two-component systems. Both arrangements that have been used in this study, i.e., the HK and RR as a fusion protein and as two separate proteins, are shown.

Duesseldorf, Germany). i) Full-length protein: The ORF *PSPTO2896* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from genomic *P. syringae* DNA, using the primers 5'-TCCAGTACATATGTCGGAAAACAAGACCCGTGTCG (forward) and 5'-TACAATCTCGAGTCAGGCAATGCCGTTGGGAC (reverse); PCR conditions: 95°C 2 min, 25 times (95°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 2 min), 72°C 10 min, 4°C hold. Both primers contained restriction sites (shown in bold) for insertion of the PCR product into the plasmid pET28a (Novagen-Merck, Darmstadt, Germany), which is furnished at its 5'-end with an octadecanucleotide encoding for a His₆ tag. Heterologous expression in *Escherichia coli* BL21 DE3 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) was induced by IPTG (30°C, 1 mM, for 6 h). PST-LOV was isolated from the lysed *E. coli* cells (lysis was by an Ultraturax, IKA, Staufen, Germany, in liquid nitrogen) by passage of the crude lysate (separated from the cell debris by ultracentrifugation, 368,000 × *g*, 1 h, 4°C) over a Ni²⁺-resin affinity chromatography column (Prochem, Englewood, CO). Such obtained protein was practically pure and was used for further studies without additional purifications. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) spectra were measured with an ABI Voyager DE Pro MALDI-time-of-flight (TOF), using Sina and 2,5-dihydroxybenzoic acid as matrix. ii) Truncated proteins: For generation of protein fragments holding the LOV domain and the HPK motif (aa 1–402), and separately the RR (aa 403–534), the two parts of PST-LOV were amplified by PCR from the full-length encoding DNA, using the primers 5'-TCCAGTACATATGTCGGAAAACAAGACCCGTGTCG (LOV and HPK forward), 5'-CTCGAGTCACGATCCCTGAGGTGA (LOV and HPK reverse), and 5'-CCATGGATAGACGCCCTGGGACGCA (RR forward), 5'-TACAATCTCGAGGCAATGCCGT (RR reverse); again, the restriction site motifs used from cloning into pET28a are shown in bold. The front part of PST-LOV was furnished with an N-terminal His₆ tag, whereas the RR domain was followed by a C-terminal His₆ tag. Further procedures, i.e., cell growth, IPTG-induction, harvest, and purification were performed as for the full-length protein (see above).

Chromophore composition

The protein-bound chromophore was released by heat denaturation. The sample was kept at 100°C for 10 min, after which time the sample was centrifuged to remove denatured protein (14,000 rpm, 20 min). The supernatant was passed through a Microcon YM3 centrifugal concentrator (13,000 rpm, 1 h, Millipore, Billerica, MA, molecular weight cutoff 3'000) and directly used for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. Each injection was repeated two times to follow statistical errors. HPLC: A HPLC system from Shimadzu (LC10Ai; Shimadzu Deutschland,

Duisburg, Germany) was used, employing a 250/4 C18-RP column (Macherey and Nagel, Düren, Germany). The column was equipped with a precolumn of the same material, and 50 mM ammonium acetate, pH 6 (eluent B) and 70% acetonitrile in B (eluent A) were used as solvents. Authentic FMN, flavin-adenine dinucleotide (FAD), and riboflavin (purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used as reference compounds. Besides that, spectra of the eluted samples were recorded during the separation by a diode array detection system. A solvent gradient ($t = 0$, 5:95 A:B, $t = 20$ min, 40:60 A:B, $t = 22$ min, 40:60 A:B, $t = 29$ min, 5:95 A:B) was applied.

Spectroscopy

All measurements were carried out in phosphate buffer 10 mM, pH = 8, NaCl 10 mM. Absorption spectra and kinetic traces were recorded at 20°C with a temperature-controlled Shimadzu UV-2401PC spectrophotometer. Origin 7.5 (OriginLab, Northampton, MA) was employed for data treatment and kinetic fitting. Photoequilibrium conditions, with accumulation of the photoactivated state, were achieved illuminating the sample with a blue light emitting Led-LenserV8 lamp (ZweiBrüder Optoelectronics, Solingen, Germany). Steady-state fluorescence spectra have been recorded with a temperature-controlled Perkin-Elmer LS-50 luminescence spectrometer (Perkin-Elmer, Beaconsfield, England). To measure the fluorescence quantum yield (Φ_F) of the bound flavin chromophore, FMN (Fluka, Neu-Ulm, Germany) was used as a standard ($\Phi_F = 0.26$) (18), and measurements were carried out at 10°C with 450 nm excitation to achieve conditions similar to the laser-induced optoacoustic spectroscopy (LIOAS) experiments (vide infra). Other fluorescence measurements (excitation at 295 and 280 nm) were carried out at 20°C.

Laser-induced optoacoustic spectroscopy

For the LIOAS experiments, excitation at 450 nm was achieved by pumping the frequency-tripled pulse of a neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser (SL 456G, 6-ns pulse duration, 355 nm, Spectron Laser System, Rugby, Great Britain) into a β -barium borate optical parametric oscillator (OPO-C-355, bandwidth 420–515 nm, Laser Technik Vertriebs, Ertestadt-Friesheim, Germany) as previously described (19). The cuvette holder FLASH 100 (Quantum Northwest, Spokane, WA) was temperature controlled to $\pm 0.02^\circ\text{C}$. The signal was detected by a V103-RM ultrasonic transducer and fed into a 5662 preamplifier (Panametrics, Waltham, MA). The pulse fluence was varied with a neutral density filter and measured with a pyroelectric energy meter (RJP735 head connected to a meter RJ7620 from Laser Precision, Libertyville, IL). The beam was shaped by a 1×12 mm slit, allowing a time resolution of ~ 60 ns by employing deconvolution techniques (20). The experiments were performed in the linear regime of amplitude versus laser fluence, and the total incident energy normally used was $\sim 20 \mu\text{J/pulse}$ (this corresponds to 7.5×10^{-11} einstein for 450 nm excitation, photon energy 265.82 kJ/mol). The sample concentration was $\sim 7.5 \mu\text{M}$, corresponding to 0.9×10^{-9} mol in the excitation volume $V_0 = 0.12$ mL. These conditions correspond to 0.08 photon per protein molecule. New cocine (Fluka) was used as calorimetric reference (21). The time evolution of the pressure wave was assumed to be a sum of monoexponential functions. The deconvolution analysis yielded the fractional amplitudes (ϕ_i) and the lifetimes (τ_i) of the transients (Sound Analysis 3000, Quantum Northwest). The time window was between 20 ns and 5 μs . At a given temperature and for each resolved i th step, the fractional amplitude ϕ_i is the sum of the fraction of absorbed energy released as heat (α_i) and the structural volume change per absorbed einstein (ΔV_i), according to Eq. 1 (22,23)

$$\phi_i = \alpha + \frac{\Delta V_i}{E_\lambda} \frac{c_p \rho}{\beta} \quad (1)$$

E_λ is the molar excitation energy, $\beta = (\partial V/\partial T)_p/V$ is the volume expansion coefficient, c_p is the heat capacity at constant pressure, and ρ is the

mass density of the solvent. In this work we used the so-called “two temperature” (TT) method to separate α_i from ΔV_i (24). The sample waveform was acquired at a temperature for which heat transport is zero, $T_{\beta=0} = 3.7^\circ\text{C}$ and at a slightly higher temperature $T_{\beta>0} = 10^\circ\text{C}$. At $T_{\beta=0}$ the LIOAS signal is only due to ΔV_i . The reference for deconvolution was recorded at $T_{\beta>0}$, and Eqs. 2a and 2b were then used to derive α_i and ΔV_i :

$$\Delta V_i = \phi_i|_{T_{\beta=0}} \times E_\lambda \frac{\beta}{c_p \rho}|_{T_{\beta>0}} \quad (2a)$$

$$\alpha_i = \phi_i|_{T_{\beta>0}} - \phi_i|_{T_{\beta=0}} \quad (2b)$$

To minimize the photoconversion of the dark state and to avoid experimental artifacts related to the long recovery kinetics of the adduct, we used low repetition rates for the excitation (1/25 Hz). Under the conditions employed the absorption decrease at 450 nm was $<5\%$ at the end of each experiment. Two sets of experiments were carried out for each protein, and a total of eight deconvolution fittings at each temperature.

Size exclusion chromatography

Gel filtration chromatography experiments were performed on a Pharmacia (Piscataway, NJ) fast protein liquid chromatography apparatus, using a Superdex 75 HR 10/30 column (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), equilibrated with a Na-phosphate buffer, 10 mM, pH = 8, NaCl = 0.15 M, as previously described (25). Bovine serum albumin (69 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), α -chymotrypsin (25 kDa), myoglobin (16.9 kDa), and ribonuclease (13.7 kDa) (low Mw calibration kit, Amersham Biosciences) were used for calibration of the column. The proteins were loaded on the column at a concentration between 1 and 50 μM to give a final concentration ranging from 0.05 to 2.5 μM at the detection peak, due to dilution through the column.

Radioactivity experiments

Auto- and transphosphorylation experiments were performed using ^{32}P - γ -ATP (37 mBq 100 μl , Hartmann Analytik, Braunschweig, Germany). A 100 μl reaction buffer (26) contains 20 μg PST-LOV or LOV-HK fragment. The reactions were performed at room temperature in dark and light separately. At given time points, 10 μl of the reaction mixture was extracted and quenched with 10 μl sodium dodecylsulfate (SDS) stop buffer (26). For transphosphorylation experiments, a $10\times$ excess (m/m) of the RR domain was added into the reaction tube. Again, 10 μl of the new mixture was withdrawn at different time points and quenched with 10 μl SDS stop buffer. After heating at 55°C for 5 min, radioactive proteins were separated on SDS-polyacrylamide-gel electrophoresis (PAGE) gels, which were kept in a BAS cassette 2025 (Fujifilm, Tokyo, Japan) for detection of radioactivity. Autoradiograms were obtained from a fluorescence image analyzer FLA-3000 (Fujifilm). Spot intensity is read as PSL mm^{-2} (PSL, photostimulated luminescence). Pixel size was $50 \times 50 \mu\text{m}^2$.

RESULTS AND DISCUSSION

Steady-state absorption measurements and kinetics of the dark recovery reaction

Heterologous expression of *PSPTO2896* and *PSPTO2896* $_{\Delta\text{RR}}$ in *E. coli* BL21 DE3, followed by His tag mediated affinity purification yielded recombinant proteins of expected size (MALDI- mass spectrometry: 61,049.2 and 46,299.3, expected mass: 61,098.4 and 46,367.4, respectively, including the 20 aa long His tag) with an absorbance spectrum typical

for an oxidized flavin species ($\lambda_{\max} = 447$ nm, Fig. 2) under dark conditions. Blue light irradiation produced bleaching in the visible region, with concomitant loss of flavin fluorescence and appearance of a species absorbing maximally at ~ 390 nm, all features characterizing the formation of the covalent adduct in LOV proteins (27,28). The absorption spectra of purified PST-LOV $_{\Delta RR}$ in the dark- and light-adapted state are shown in Fig. 2, together with the light-dark difference spectrum. Similar spectra are obtained for PST-LOV, albeit with a slightly larger scattering (not shown).

The high UV/Visible ratio in the dark state ($Abs_{280}/Abs_{447} = 8.6$) indicates that a certain amount of apoprotein is present (29). The calculated absorption coefficient of ap-PST-LOV $_{\Delta RR}$ at 280 nm is $22,015 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ProtParam tool at the ExPASy Proteomics Server <http://expasy.org>), whereas for bound FMN it is $\sim 26,250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (29). From these data we can estimate that $Abs_{280}/Abs_{447} \sim 4$ for a 1:1 protein/FMN ratio (no apoprotein present). Therefore, in the sample shown in Fig. 2 we may estimate that the protein/FMN ratio is ~ 3.5 . The full-length PST-LOV protein shows an even larger amount of apoprotein, as the protein/FMN ratio is ~ 4.5 for the measured $Abs_{280}/Abs_{447} = 12.5$ (ideal ratio $Abs_{280}/Abs_{447} = 4.5$ for a 1:1 complex). The full-length protein was subjected to a chromophore extraction to determine the chromophore composition (which could influence the spectroscopic properties). HPLC analysis showed preferentially FMN as chromophore (86%), accompanied by some FAD (13.3%), and a small amount of riboflavin (0.7%). It should be mentioned that especially older samples show a change of the latter two flavin derivatives due to decomposition of FAD: a

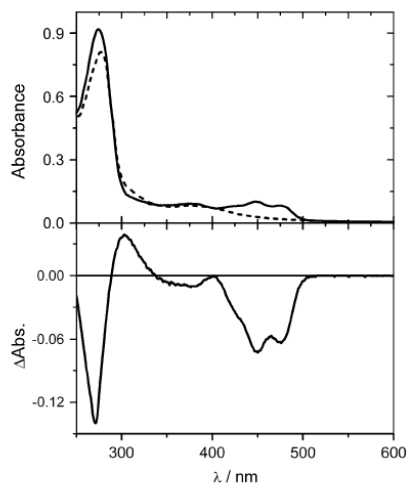


FIGURE 2 (Top) Absorption and (bottom) absorption difference spectra (light-dark) of PST-LOV $_{\Delta RR}$ before and after blue light irradiation.

Biophysical Journal 94(3) 897–905

6-month-old sample, kept at -40°C and identically prepared, showed a composition of 86:4:10 for FMN/FAD/riboflavin.

The absorption spectrum in the visible region is typical for FMN-binding LOV proteins, showing the three vibrational bands of the $S_0 \rightarrow S_1$ transition (29,30). In the ultraviolet-A (UVA) range ($S_0 \rightarrow S_2$ transition), the absorption maximum is red shifted (381 nm) with respect to YtvA (376 nm) and to Crphot-LOV1 and PpSB2-LOV (both showing a broad band centered at ~ 360 nm). In riboflavin derivatives this band is the most sensitive to the polarity of the microenvironment (31), and it is characteristically different between phot-LOV1 and LOV2 (shifted more to the red in LOV2) (28). The light-dark difference spectrum resembles the formation of the covalent adduct in LOV domains, generating the characteristic bleaching of the $S_0 \rightarrow S_1$ transition (Fig. 2).

In the dark, the photoadduct slowly reverts to the dark state, as can be followed by recording the recovery of absorbance at 447 nm, the full-length PST-LOV being slightly faster than the truncated protein (Fig. 3). The kinetic trace can best be fitted with a double exponential decay function, yielding an average life time of 5650 s for the full-length protein and 6210 s for the truncated protein. We can, however, not exclude that the biexponential behavior is an artifact due to a slight change in the scattering during the long-lasting measurements.

The average lifetime for the dark recovery reaction, $\langle \tau_{\text{rec}} \rangle$, is extremely long for both constructs (Table 1), even when compared to other bacterial LOV proteins ($\tau_{\text{rec}} = 3200$ s for YtvA, at 20°C) (19).

Fluorescence of the conserved W111

Phot-LOV domains and the vast majority of bacterial LOV domains carry a single, conserved tryptophan residue localized on the H β strand (8). The specific function of this residue is unknown; in YtvA (W103), it is involved in intraprotein interactions (32), most probably via contacts with the N-terminal cap (A. Losi and V. Buttani, unpublished) and/or with the

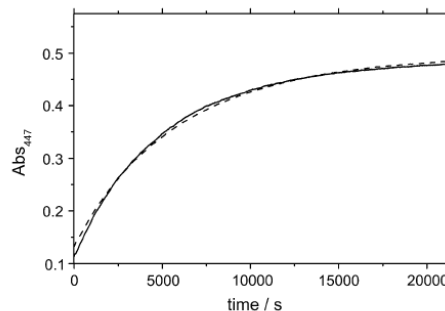


FIGURE 3 Dark-recovery time course (20°C) for full-length PST-LOV (solid line) and for the truncated protein PST-LOV $_{\Delta RR}$ (dashed line), obtained by measuring the absorbance at 447 nm. Experimental data were fitted by a two-exponential decay function.

TABLE 1 Kinetic and spectroscopic data of recombinant proteins PST-LOV and PST-LOV_{ΔRR} from *P. syringae* pv. *tomato*

20°C	LOV+kinase	Full-length protein
A1	27% ± 1%	65% ± 2.5%
τ1/s	3505 ± 33	3950 ± 55
A2	73% ± 1%	35% ± 2.5%
τ2/s	7210 ± 24	8820 ± 36
⟨τ⟩/s*	6210	5650

$$*(\tau_{\text{rec}}) = \sum A_i \tau_i / 100.$$

linker region C-terminal to the LOV core (29). The fluorescence of W103 in full-length YtvA is blue shifted with respect to the isolated YtvA-LOV (32), but no major changes are observed upon formation of the photoadduct. Conversely, in phot1-LOV2 W491 undergoes conformational changes upon formation of the photoadduct due to the unfolding of the linker region (33,34). In PpSB2-LOV the fluorescence of W97 slightly increases in the photoadduct with a concomitant broadening of the band, reverting to the original value after dark conversion of the protein (35).

In PST-LOV_{ΔRR} and PST-LOV, the fluorescence maximum of W111 (again the only tryptophan in the whole protein) is localized at ~332 nm, slightly blue shifted with respect to YtvA (335 nm) (32). Only very small changes are detectable by selective excitation of the Trp residue with 295 nm light (not shown). Excitation at 280 nm, however, caused a reversible change for the full-length protein, namely a slight increase of the fluorescence intensity and a spectral broadening. This reversible, light-induced change is much smaller in the truncated PST-LOV_{ΔRR} (Fig. 4).

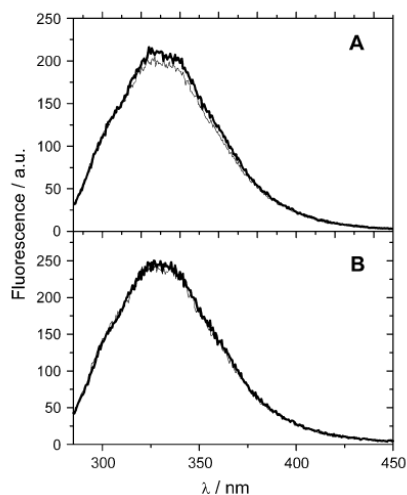


FIGURE 4 UVA fluorescence of (A) PST-LOV and (B) PST-LOV_{ΔRR} after 280 nm excitation in the dark- (thin line) and light- (thick line) adapted states.

The fluorescence change observed for PST-LOV may originate from conformational changes involving tyrosine(s) that increase energy transfer to W111 in the light state as suggested for YtvA (32), since these aromatic residues also are excited at 280 nm. This idea is supported by the fact that the change is not detected upon selective excitation of W111 at 295 nm. The important observation here is the difference between the truncated protein, PST-LOV_{ΔRR}, and the full-length protein, PST-LOV, the former one showing practically no change of the fluorescence in the dark or lit state, whereas the full-length protein exhibits an increase of fluorescence upon illumination. These data demonstrate an interaction between the LOV-HK and the RR domains that changes upon illumination. Most probably this involves one or more amino acids on the LOV core that change their conformation or environment upon formation of the photo-product. A mutation of the tryptophan111 to identify its role in this process failed and produced only (misfolded) apoprotein void of any chromophore.

LIOAS measurements

The LIOAS signals at $T_{\beta=0} = 3.70^\circ\text{C}$ are similar to those recorded for other LOV proteins (19,30,35,36) with a transient species formed within 20 ns (time resolution of the measurement) showing a small contraction ($\Delta V_1 = -0.8$ ml/einstein), assigned to the FMN triplet state (PST-LOV_T). The triplet decays with a lifetime of $\tau_2 = \sim 1.5 \mu\text{s}$ into a long-lived species, assigned to the covalent, blue-shifted photoadduct (PST-LOV₃₉₀). Different from the LOV proteins previously analyzed, the formation of the adduct does not correspond to a further, larger contraction but to a very small expansion, $\Delta V_2 < 0.5$ ml/einstein (Table 2).

With the knowledge that the FMN triplet state, both in solution and in LOV proteins, lies at ~200 kJ/mol (30,36,37), it is possible to calculate the triplet formation quantum yield, Φ_T , from Eq. 3:

$$\Phi_T \frac{E_T}{E_A} = 1 - \alpha_1 - \Phi_F \frac{E_F}{E_A}, \quad (3)$$

where E_F is the average energy for the fluorescence emission (232 kJ/mol, 515 nm).

$\Phi_F = 0.25$ is the flavin fluorescence quantum yield, and $E_A = 265.8$ kJ/mol is the photon energy at 450 nm. The triplet quantum yield and also the yield of adduct formation is on the order of 0.45–0.5, typical for LOV proteins. The energy level of the adduct was calculated by means of Eq. 4 and requires the measure of Φ_{390} . This was done relative to YtvA, as previously reported (19).

$$\alpha_2 = \Phi_T \frac{E_T}{E_A} - \Phi_{390} \frac{E_{390}}{E_A}. \quad (4)$$

Finally, the molecular volume changes are evaluated by means of Eqs. 5a and 5b:

TABLE 2 LIOAS data for the PST-LOV proteins

	α_1 ($\tau_1 < 20$ ns)	ΔV_1 (mL/mol)	$\alpha_2(\tau_2/\mu\text{s}^*)$	ΔV_2 (mL/mol)
PSPTO2896 Δ_{RR}	0.34 ± 0.03	-1.57 ± 0.34	0.16 ± 0.02 (1.6 ± 0.27)	$+0.22 \pm 0.12$
PSPTO2896	0.44 ± 0.03	-1.49 ± 0.15	0.13 ± 0.03 (1.4 ± 0.2)	$+0.31 \pm 0.18$

The statistical error originates from an averaging of eight values for each temperature.

*Average value at 3.70°C and 10°C.

$$\Delta V_T = \frac{\Delta V_1}{\Phi_T} \quad (5a)$$

$$\Delta V_{390} = \Delta V_T + \frac{\Delta V_2}{\Phi_{390}} \quad (5b)$$

The results are reported in Table 3 and compared with other LOV proteins.

The values of Φ_T and Φ_{390} are, within experimental error ($\sim 20\%$), very similar for all the proteins analyzed, as well as the high energy level for the adduct that stores $\sim 50\%$ of the excitation energy. The latter aspect points to a strained conformation and small conformational changes with respect to the unphotolyzed state, a peculiar characteristic of LOV domains (19,35,36). The μs decay kinetics of the triplet state into the adduct indicates that the photocycle is similar to other LOV proteins (30,38,39). A notable difference is that the total structural volume change corresponding to the formation of the adduct, ΔV_{390} , is very small and almost entirely derives from the formation of the triplet state (Table 3, Eqs. 5a and 5b). Actually, the formation of the adduct corresponds to a small expansion (ΔV_2 in Table 2) instead of being a quite large contraction as in other LOV proteins (19,35,36). This does not necessarily imply that, as a whole, the protein conformational changes are smaller. In photoreceptors the light-induced ΔV s recorded by means of the LIOAS technique may receive different contributions, e.g., changes in the protein secondary structure, in hydrogen bonds (HBs) around the chromophore, or solvation/electro-

striction effects (40). In LOV domains the negative ΔV_2 originates mainly from a rearrangement of the HB network around the flavin chromophore, which results in an overall contraction as shown by means of mutagenesis studies on Cr-phot-LOV1 (36). In the relatively large PST-LOV and PST-LOV Δ_{RR} constructs, other conformational changes of opposite sign might compensate for this HB rearrangement, resulting in an overall small expansion. This hypothesis is supported by a comparison of the results obtained with full-length YtvA and the isolated YtvA-LOV in that the value of ΔV_2 is more negative in the latter system (19).

Phosphorylation assay

Systems like the PST-LOV protein presented here—composed of input domains ready to detect a broad variety of incoming stimuli, thereby activating its HK domain, which in turn activates a signal-transducing RR protein (or protein domain)—are well known and precisely characterized in many other prokaryotic organisms (9). Whereas two-component signal transduction systems are furnished with highly variable input domains and also induce quite different physiological responses, the central building blocks, i.e., the HK activity and the RR (domain), show a remarkable sequential and structural conservation. The central reaction step is the transfer of a phosphate group, initially bound upon activation to a fully conserved histidine of the receptor, to an aspartate residue of the RR.

An analysis of this reaction with PST-LOV by addition of ATP would result in a phosphorylated full-length protein with no insight into the different steps. An attempt to dissect this reaction would be possible by separating both protein domains. This approach yielded the truncated LOV-HK protein (46 kDa) and the RR domain (16 kDa) as independently expressed proteins, as described above. For functional studies, the full-length protein as also a C-terminally truncated construct consisting only of the LOV domain and the HK motif was subjected to light-dependent phosphorylation assays. The separately expressed RR protein, added later in the course of the experiment, would allow us to identify the essential phosphate transfer from HK to RR in a separate experiment. In both full-length and C-terminally truncated PST-LOV, radioactive phosphate is incorporated, but in a much higher yield upon blue light irradiation than under dark conditions (Fig. 5).

It should be taken into account that the very slow recovery rate of the dark state impedes the reaction such that any

TABLE 3 Photophysical and energetic parameters of PST-LOV proteins

	Φ_T	$E_{390}/\text{kJ/mol}$	Φ_{390}	$\Delta V_T/\text{mL/mol}$	$\Delta V_{390}/\text{mL/mol}$
PST-LOV Δ_{RR}	0.58	144	0.51	-2.5	-2.0
PST-LOV	0.47	149	0.41	-2.9	-2.1
*PpSB2-LOV	0.46	133	0.42	-1.74	-16.0
†YtvA	0.62	136	0.49	-0.71	-12.5
‡YtvA-LOV	0.69	113	0.55	-0.67	-17.2
‡Cr-phot-LOV1	0.63	171	0.6	-1.15	-8.0

The values of E_{390} , ΔV_T , and ΔV_{390} are affected by the measurement error ($< 10\%$, see Table 2) and by the quantum yield determination, whose error depends on a variety of factors (e.g., absorption coefficients, reference standard values, and energy level of the triplet state). Repeated measurements (four) for Φ_{390} gave an experimental variation within 8%.

*Full-length SB2 LOV protein from *Pseudomonas putida* (35).

†Full-length YtvA from *Bacillus subtilis* and its isolated LOV domain, YtvA-LOV (19).

‡Isolated LOV1 domain of phototropin from *Chlamydomonas reinhardtii* (36).

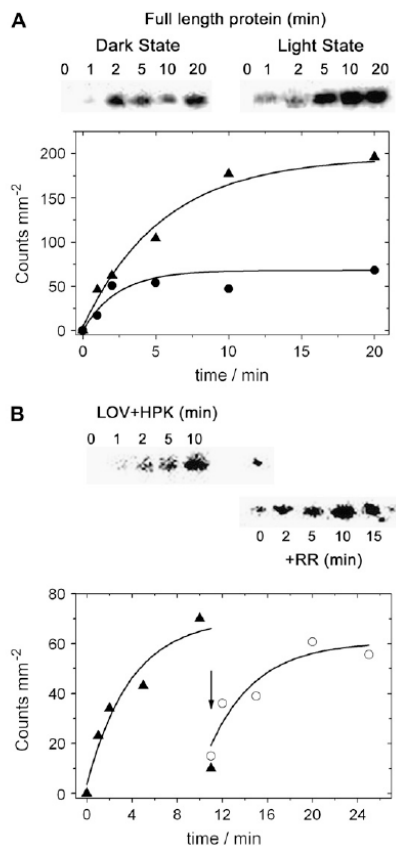


FIGURE 5 Assay of phosphorylation activity of PST-LOV. Full-length and C-terminally truncated protein were incubated with ³²P- γ -ATP (see Materials and Methods), either in the dark or upon blue light irradiation. Aliquots were withdrawn at indicated time points and were separated on an SDS-PAGE electrophoresis gel. The gels were then covered with foil and the incorporated radioactivity was determined. (A) Full-length protein. From left to right: time course (0–20 min) of ³²P-phosphate incorporation under blue light irradiation and in the dark. The time course of radioactivity incorporation is shown below. The slight downward deviation of the data point at 10 min might be due to an experimental (pipetting) error. (B) C-terminally truncated fragment containing solely the LOV and the HK domains. This autoradiogram also shows phosphate transfer to the RR after being added to the reaction mixture. Addition is indicated by an arrow. The time course of phosphate incorporation (and phosphate transfer) is shown below. Note that the final data point for the HK domain drops instantaneously upon RR addition (solid triangle at 10 min).

scattering light accumulates in the lit state and thus mimics apparent activity of the dark state. The reaction reaches a plateau for both constructs within ~ 10 min, indicating that i), apparently the residual amount of illuminated sample is fully phosphorylated and ii), the removal of the RR domain does

not impede the phosphorylation of the histidine residue in the HK domain. Addition of the RR to the fully phosphorylated LOV-HK fragment (Fig. 5 B, arrow) resulted in a practically instantaneous phosphate transfer to the RR. The apparently lower radioactivity in the samples of RR taken after very early time points (2 and 5 min) is due to the experimental conditions such that a large excess of the RR was added. The ongoing incorporation of radioactivity into the RR, even after the HK domain does not show any radioactivity, is due to ³²P- γ -ATP, which is still present in the reaction mixture that is rapidly attached to the RR by the very active HK domain.

Implications from the *P. syringae* LOV protein for the transduction mechanism of LOV proteins

The experiments demonstrate a blue light-driven, flavin-bearing HK activity in prokaryotes, which thereby adds blue light to the large number of stimuli that are recorded by this bacterial two-component signal transduction system (41). A similarly built sensory protein, carrying a photoactive yellow protein (PYP)-domain has recently been described (42). The different chromophore structure in both types of proteins becomes immediately clear from an inspection of the absorption spectra: broad and unstructured in the PYP-case and fine structured for the flavin-protein.

A very similar reactivity was recently demonstrated for red light activated bacterial phytochromes, also furnished with an HK domain and a separate RR (26,43). These findings show the modular setup for many bacterial systems, where a broad variety of input signals induce an ensemble of output responses, mediated by a highly conserved signal processing mechanism.

The observation that W111 or a neighboring tyrosine (e.g., Y103) is probably in close vicinity to the RR domain implies the direct interaction of RR with the light-responsive LOV core. This agrees with the low resolution structure (4.2 Å) of ThKA from *Thermotoga maritima*, a PAS-HK kinase in complex with its RR, i.e., a similar architecture to PST-LOV (44) (the LOV domain is a PAS fold (45)). In this complex the RR is in direct contact with both the HK and the PAS domain, and it was suggested that RR not only acts as an efficient phosphoryl carrier but also exerts a regulative role on the PAS-sensing domain (e.g., by a feedback regulation of sensing) (44). It is also conceivable that the LOV core directly interacts with the HK domain, given the enhancement of the self-phosphorylation activity upon light-activation, again in agreement with the structure of ThKA. The highly conserved W111 and Y103 correspond to W103 and Y95 in YtvA (32) and are localized on strand H β and G β , respectively, neighboring K105 in the G β -H β loop. K105 in tum is involved in a salt bridge with E64, a feature of LOV domains suggested to be important in light-to-signal transduction (7). Molecular dynamics simulations suggest that light-induced modifications of the E-K salt bridge are typical for LOV1

activation and are triggered by a change in HBs between FMN and N99 (corresponding to N110 in PST-LOV). Note that this asparagine is directly adjacent to the conserved Trp (46). Conversely, LOV2 activation could be mostly related to conformational changes in the H β -I β loop (46). This preferential activation for LOV1 and LOV2 via distinct pathways might be related to their specific role within phototropins, with LOV being necessary and sufficient to elicit the majority of light-elicited phot responses and LOV1 probably playing a regulatory role (47,48). In bacterial LOV proteins, the LOV domain has intermediate characteristics between LOV1 and LOV2 (8), in agreement with the data presented here that point both to a light triggered activation of the kinase activity and to regulation via interactions with RR; this intermittent function probably even indicates its ancestry to the LOV proteins of eukaryotes.

Beyond the biochemical characterization presented here, a question on the biological role of this protein remains. Such an approach probably requires the generation of knockout mutants and investigations on modified pathogenicity of such constructs. A search of the locus of this gene (PSPTO_2896) revealed several ORFs encoding signaling or DNA-regulating proteins which could be involved in signal transduction: ORF 2901, DNA-binding protein; ORFs 2903, 2906, transcriptional regulators; and ORF 2907, GGDEF domain/EAL domain protein. However, no detailed investigation has yet been performed.

CONCLUSION

The results presented here add blue light as a stimulus to the large family of bacterial two-component signal transduction systems. The data demonstrate a functional system, showing light-regulated communication between the various domains of this protein. The aspect of blue light regulation, employing receptor structures in *P. syringae* very similar to those used by plants, points to a putative role of the bacterial photoreceptors in light-regulated host pathogen interactions, a research field with a strong scientific and potentially economic impact. Yet, only a few reports on that topic are available, clearly demanding much stronger research activity.

Note added in proof. During the time this manuscript was being processed, an exciting report from T. Swartz and co-workers showed that an LOV-kinase regulates infectivity in the animal pathogen *Brucella abortus*. In the same work they have characterized the kinase activity of a few other bacterial LOV proteins (49).

We kindly acknowledge the help of Dr. K. Emst, University of Düsseldorf, during the radioactivity work, and the technical help of N. Dickmann (Max-Planck-Institut Mülheim) for the MALDI-TOF measurements, and the expert support of Ms. Astrid Wirtz, FZ Jülich, during the HPLC analysis of chromophore content. Robin Buell (The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850) kindly provided a cell culture of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR526, project A1).

REFERENCES

- Pattison, D. I., and M. J. Davies. 2006. Actions of ultraviolet light on cellular structures. In *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 131–157.
- Spikes, J. D. 1989. Photosensitization. In *The Science of Photobiology*. K. C. Smith, editor. Plenum Press, New York and London. 79–110.
- Miranda, M. A. 2001. Photosensitization by drugs. *Pure Appl. Chem.* 73:481–486.
- Weber, S. 2005. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1707:1–23.
- Armitage, J. P., and K. Hellingwerf. 2003. Light-induced behavioral responses ('phototaxis') in prokaryotes. *Photosynth. Res.* 76: 145–155.
- Losi, A. 2006. Flavin-based photoreceptors in bacteria. In *Flavin Photochemistry and Photobiology*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 223–276.
- Crosson, S., S. Rajagopal, and K. Moffat. 2003. The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry.* 42:2–10.
- Losi, A. 2004. The bacterial counterparts of plants phototropins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:566–574.
- West, A. H., and A. M. Stock. 2001. Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem. Sci.* 26:369–376.
- Grebe, T. W., and J. B. Stock. 1999. The histidine protein kinase superfamily. *Adv. Microb. Physiol.* 41:139–227.
- Genoud, T., A. J. Buchala, N. H. Chua, and J. P. Metraux. 2002. Phytochrome signalling modulates the SA-perceptive pathway in Arabidopsis. *Plant J.* 31:87–95.
- Zzier, J., M. Delledonne, T. Mishina, E. Severi, M. Sonoda, and C. Lamb. 2004. Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* 136:2875–2886.
- Delledonne, M. 2005. NO news is good news for plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:390–396.
- Buell, C. R., V. Joardar, M. Lindeberg, J. Selengut, I. T. Paulsen, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, and J. F. Kolonay, R. Madupu, S. Daugherty, L. Brinkac, M. J. Beanan, D. H. Haft, W. C. Nelson, T. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, J. Liu, Q. Yuan, H. Khouri, N. Fedorova, B. Tran, D. Russell, K. Berry, T. Utterback, S. E. Van Aken, T. V. Feldblyum, M. D'Ascenzo, W. L. Deng, A. R. Ramos, J. R. Alfano, S. Cartinhour, A. K. Chatterjee, T. P. Delaney, S. G. Lazarowitz, G. B. Martin, D. J. Schneider, X. Tang, C. L. Bender, O. White, C. M. Fraser, and A. Collmer. 2003. The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:10181–10186.
- Hirano, S. S., and C. D. Upp. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:624–653.
- Joardar, V., M. Lindeberg, R. W. Jackson, J. Selengut, R. Dodson, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. DeBoy, A. S. Durkin, M. G. Giglio, R. Madupu, W. C. Nelson, M. J. Rosovitz, S. Sullivan, J. Crabtree, T. Creasy, T. Davidsen, D. H. Haft, N. Zafar, L. W. Zhou, R. Halpin, T. Holley, H. Khouri, T. Feldblyum, O. White, C. M. Fraser, A. K. Chatterjee, S. Cartinhour, D. J. Schneider, J. Mansfield, A. Collmer, and C. R. Buell. 2005. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J. Bacteriol.* 187:6488–6498.
- Feil, H., W. S. Feil, P. Chain, F. Larimer, G. DiBartolo, A. Copeland, A. Lykidis, S. Trong, M. Nolan, and E. Goltsman, J. Thiel, S. Malfatti, J. E. Loper, A. Lapidus, J. C. Detter, M. Land, P. M. Richardson, N. C. Kyrpides, N. Ivanova, and S. E. Lindow. 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 11064–11069.

18. van den Berg, P. W., J. Widengren, M. A. Hink, R. Rigler, and A. G. Visser. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects. *Spectrochim. Acta [A]*. 57:2135–2144.
19. Losi, A., B. Quest, and W. Gärtner. 2003. Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2:759–766.
20. Rudzki, J. E., J. L. Goodman, and K. S. Peters. 1985. Simultaneous determination of photoreaction dynamics and energetics using pulsed, time resolved photoacoustic calorimetry. *J. Am. Chem. Soc.* 107:7849–7854.
21. Abbruzzetti, S., C. Viappiani, D. H. Murgida, R. Erra-Balsells, and G. M. Bilmes. 1999. Non-toxic, water-soluble photocalorimetric reference compounds for UV and visible excitation. *Chem. Phys. Lett.* 304:167–172.
22. Small, J. R., L. J. Libertini, and E. W. Small. 1992. Analysis of photoacoustic waveforms using the nonlinear least squares method. *Biophys. Chem.* 42:24–48.
23. Rudzki-Small, J., L. J. Libertini, and E. W. Small. 1992. Analysis of photoacoustic waveforms using the nonlinear least square method. *Biophys. Chem.* 41:29–48.
24. Malkin, S., M. S. Churio, S. Shochat, and S. E. Braslavsky. 1994. Photochemical energy storage and volume changes in the microsecond time range in bacterial photosynthesis—a laser induced photoacoustic study. *J. Photochem. Photobiol. B.* 23:79–85.
25. Buttani, V., A. Losi, T. Eggert, U. Krauss, K.-E. Jaeger, Z. Cao, and W. Gärtner. 2007. Conformational analysis of the blue-light sensing protein YtvA reveals a competitive interface for LOV-LOV dimerization and interdomain interactions. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6:41–49.
26. Hübschmann, T., H. J. M. M. Jorissen, T. Börner, W. Gärtner, and N. T. deMarsac. 2001. Phosphorylation of proteins in the light-dependent signalling pathway of a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.* 268:3383–3389.
27. Briggs, W. R., T. S. Tseng, H. Y. Cho, T. E. Swartz, S. Sullivan, R. A. Bogomolni, E. Kaiserli, and J. M. Christie. 2007. Phototropins and their LOV domains: versatile plant blue-light receptors. *J. Integr. Plant Biol.* 49:4–10.
28. Kasahara, M., T. E. Swartz, M. A. Olney, A. Onodera, N. Mochizuki, H. Fukuzawa, E. Asamizu, S. Tabata, H. Kanegae, M. Takano, J. M. Christie, A. Nagatani, and W. R. Briggs. 2002. Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from Arabidopsis, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 129:762–773.
29. Losi, A., E. Ghiraldelli, S. Jansen, and W. Gärtner. 2005. Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA. *Photochem. Photobiol.* 81:1145–1152.
30. Losi, A., E. Polverini, B. Quest, and W. Gärtner. 2002. First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys. J.* 82:2627–2634.
31. Johansson, L. B., A. Davidsson, G. Lindblom, and K. R. Naqvi. 1979. Electronic transitions in the isoalloxazine ring and orientation of flavins in model membranes studied by polarized light spectroscopy. *Biochemistry*. 18:4249–4253.
32. Losi, A., E. Temelli, and W. Gärtner. 2004. Tryptophan fluorescence in the *Bacillus subtilis* phototropin-related protein YtvA as a marker of interdomain interaction. *Photochem. Photobiol.* 80:150–153.
33. Harper, S. M., L. C. Neil, and K. H. Gardner. 2003. Structural basis of a phototropin light switch. *Science*. 301:1541–1544.
34. Harper, S. M., L. C. Neil, I. J. Day, P. J. Hore, and K. H. Gardner. 2004. Conformational changes in a photosensory LOV domain monitored by time-resolved NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 126:3390–3391.
35. Krauss, U., A. Losi, W. Gärtner, K.-E. Jaeger, and T. Eggert. 2005. Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 7:2229–2236.
36. Losi, A., T. Kottke, and P. Hegemann. 2004. Recording of blue light-induced energy and volume changes within the wild-type and mutated phot-LOV1 domain from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys. J.* 86:1051–1060.
37. Gauden, M., S. Crosson, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, K. Moffat, and J. T. M. Kennis. 2004. Low-temperature and time-resolved spectroscopic characterization of the LOV2 domain of *Avena sativa* phototropin. In *Femtosecond Laser Applications in Biology*. S. Avrielleir and J. M. Tualle, editors. SPIE, Bellingham, WA. 97–104.
38. Swartz, T. E., S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs, and R. A. Bogomolni. 2001. The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J. Biol. Chem.* 276:36493–36500.
39. Kottke, T., J. Heberle, D. Hehn, B. Dick, and P. Hegemann. 2003. Phot-LOV1: photocycle of a blue-light receptor domain from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys. J.* 84:1192–1201.
40. Losi, A., and S. E. Braslavsky. 2003. The time-resolved thermodynamics of the chromophore-protein interactions in biological photosensors. Learning from photothermal measurements. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5:2739–2750.
41. Alm, E., K. Huang, and A. Arkin. 2006. The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comput. Biol.* 2:e143.
42. Jiang, Z. Y., L. R. Swem, B. G. Rushing, S. Devanathan, G. Tollin, and C. E. Bauer. 1999. Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science*. 285:406–409.
43. Yeh, K. C., S. H. Wu, J. T. Murphy, and J. C. Lagarias. 1997. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science*. 277:1505–1508.
44. Yamada, S., S. Akiyama, H. Sugimoto, H. Kumita, K. Ito, T. Fujisawa, H. Nakamura, and Y. Shiro. 2006. The signaling pathway in histidine kinase and the response regulator complex revealed by x-ray crystallography and solution scattering. *J. Mol. Biol.* 362:123–139.
45. Crosson, S., and K. Moffat. 2001. Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:2995–3000.
46. Freddolino, P. L., M. Dittlich, and K. Schulten. 2006. Dynamic switching mechanisms in LOV1 and LOV2 domains of plant phototropins. *Biophys. J.* 91:3630–3639.
47. Christie, J. M., T. E. Swartz, R. A. Bogomolni, and W. R. Briggs. 2002. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J.* 32:205–219.
48. Cho, H. Y., T. S. Tseng, E. Kaiserli, S. Sullivan, J. M. Christie, and W. R. Briggs. 2007. Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 143:517–529.
49. Swartz, T. E., T. S. Tseng, M. A. Frederickson, G. Paris, D. J. Comerci, G. Rajashekara, J. G. Kim, M. B. Mudgett, G. A. Splitter, R. A. Ugalde, F. A. Goldbaum, W. R. Briggs, and R. A. Bogomolni. 2007. Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science*. 317:1090–1093.

6.1 Cromatografia

La proteina PST-LOV, oggetto dello studio nell'articolo sopra riportato, non è stata finora cristallizzata come proteina intera; per acquisire informazioni riguardanti la sua conformazione sono state eseguite delle esperienze di cromatografia su gel per tre costrutti: PST-LOV (proteina intera, amminoacidi: 1-534 compreso l'His-tag), PST-LOV_{ΔRR} (dominio LOV e *Histidine Kinase*, amminoacidi: 1-422 compreso l'His-tag), RR (*Response Regulator*, amminoacidi: 423-564 compreso His-tag). In figura numero 6-1 gli spettri di eluizione dei tre costrutti con lunghezza d'onda d'assorbimento centrata a 280 nm; si può notare che tutti e tre i preparati scendono principalmente sotto forma di monomero e che sono presenti altri picchi minori corrispondenti a frazioni proteiche. In particolare PST-LOV è pari a 75064 kDa ($1,22 \times MW_{PST-LOV}$), PST-LOV_{ΔRR} è pari a 62579 kDa ($1,35 \times MW_{PST-LOV\Delta RR}$) ed infine RR è pari a 16814 kDa ($1,05 \times MW_{RR}$). Si può quindi concludere in prima analisi che la proteina intera sia un monomero non perfettamente sferico in soluzione, il RR appare invece come monomero sferico, benché il picco di eluizione sia piuttosto allargato e suggerisca la presenza dei dimeri, mentre i domini PST-LOV_{ΔRR} assumono una conformazione leggermente oblunga; tali risultati appaiono in contrasto con l'attesa dimerizzazione della chinasi proteica.

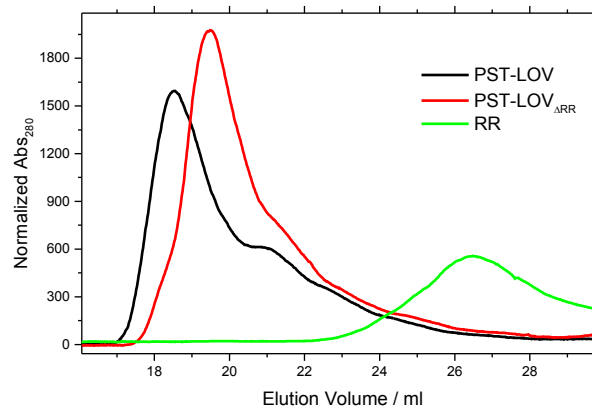


Figura 6-1 Cromatografia di PST-LOV in nero, in rosso PST-LOV_{ΔRR}, in verde RR.

6.2 Dicroismo circolare

I tre costrutti analizzati mediante cromatografia su gel sono stati sottoposti anche a spettroscopia di dicroismo circolare; gli spettri sono stati acquisiti allo stato di buio e allo stato di luce, tranne il dominio RR che non contenendo elementi fotosensibili ha prodotto un solo spettro. I risultati sono stati analizzati con l'algoritmo di calcolo CCA. In tabella 6-1 sono riassunti i risultati ottenuti, la percentuale di struttura secondaria è stata trasformata in numero di amminoacidi. Confrontando gli spettri al buio per la proteina intera e i domini separati si evince che la struttura β di RR nella proteina intera si srotola a favore di α -elica e *random coil* quando tale dominio viene espresso separatamente. La struttura della proteina intera, confrontata alle analisi di *consensus prediction* appare più ordinata di quanto ci si aspetti: la componente *random coil* appare inferiore in favore di una maggior componente β -parallela e β -antiparallela. In tabella sono state riportate anche le variazioni luce-buio tradotte in numero di amminoacidi per i vari costrutti. La variazione in seguito ad illuminazione con luce blu è decisamente più importante per PST-LOV rispetto ai singoli domini, si assiste infatti ad una trasformazione nello stato di luce da α -elica a struttura β (parallelo e antiparallelo), anche la componente *turn* appare inferiore nello stato di luce. Nel costrutto PST-LOV_{ARR} si assiste ad una variazione sensibilmente inferiore in seguito ad illuminazione con luce blu, si può quindi dedurre una trasmissione del segnale da dominio fotosensore a RR.

Tabella 6-1 Risultati dell'analisi CCA sugli spettri di dicroismo circolare allo stato di luce e di buio per PST-LOV, PST-LOV_{ARR} (domino LOV e *His kinase*), e per RR; la composizione in struttura secondaria è stata tradotta in numero di amminoacidi. L'analisi rappresenta la media di due preparazioni diverse.

	PST- LOV <i>dark</i>	PST-LOV <i>light</i>	PST-LOV <i>dark-light</i>	PST- LOV _{ARR} <i>dark</i>	PST- LOV _{ARR} <i>light</i>	PST- LOV _{ARR} <i>dark-light</i>	RR
<i>alfa elica</i>	199	185	-14	124	127	3	42
<i>random coil</i>	103	108	5	83	78	-5	3
<i>beta turn</i>	107	99	-8	88	91	3	25
<i>other-beta parallelo</i>	69	73	4	65	69	4	39
<i>beta antiparallelo</i>	76	89	13	62	57	-5	32

6.3 Modello

Lo studio su PST-LOV è proseguito con l'applicazione di metodi computazionali per l'elaborazione di un modello di proteina intera. In figura numero 6-2 sono presentati i domini analizzati.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSENKTRVDNAATGDIQHQGKDIFFAAVETTR**MPMIVTDPNRPDNP**II**FSNRAFLEMTGYTAE**EEILGTNCRFLQGPDTDP**PAVVQSIRDAIAQRNDISAEI**I**NYRKDGSSFWNALFISPVYNDAGDLIYFFASQLDISRRKDAE**EALRQAQKMEALGQLTGGIAHDFNNLLQVMGGYIDLIGSAAEKPVIDVQRVQRSVYHAKSAVERASTLTQKLLAFARKQKLGQGRVLNGLVSIVEPLIERTFGPEVAIETDLEPALKNCRIDPTQAEVALLNIFINARDALIGRENPKVFIETRNLLVDELANMSYDGLLPGRYVSIIVTDNGIGMPASIRDRVMDPFFTTKEEGKGSGLGLSMVYGFQKSSGGAARIYTEEGVGTTLRLYFPVDEAGLTNTESPQASDRRLGSSERILIVEDRDPVAELAKMVLDDYGYVSEIVLNAREALKKFESGNMYDLLFTDLIMPGGMNGVMLAREVRRRYPKVKVLLTTGYAESSIERTDIGGSEFDVSKPCMPHDLARKVRQVLDG**PNGIA**

Figura 6-2 Sequenza di PST-LOV, in grassetto l'His-tag, in verde il dominio LOV, in giallo il dominio *Histidine Kinase*, in azzurro il *Response Regulator*.

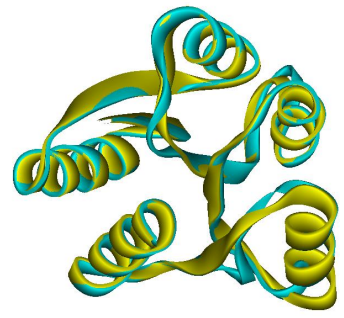
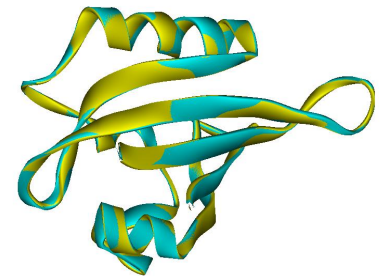
In rete sono state ricercate le sequenze con alta similarità rispetto ai vari domini: LOV, HK e RR. Le sequenze prescelte sono state allineate con la sequenza di PST-LOV da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, vedi allineamenti di sequenza delle struttura prescelte come modelli in figura 6-3: il dominio LOV è stato modellato su phy3-LOV2 da *Adiantum Capillus-Veneris* (codice pdb 1G28). Il dominio HK è stato modellato sulla porzione citoplasmatica di un'*histidine kinase* da *Thermotoga Maritima* (codice pdb 2C2A). Il dominio RR è stato modellato sulla struttura cristallina di un regolatore di risposta da *Streptococcus pneumoniae* (codice pdb 2A9P).

```

          10          20          30          40          50          60
PST-LOV  MPMIVTDPNRPDNPIIFSNRAFLEMTGYTAEEILGTNCRFLQGPDTDPPAVVQSIRDAIAQ
Phy3-LOV2 KSFVITDPRLPDNPIIFASDRFLELTEYTREEVLGNCRFLQGRGTDRKAVQLIRDAVKE
          :*::**..*****:..***:* ** **:*..***** .* * ** ***:..
          70          80          90          100
PST-LOV  RNDISAEIINYRKDGSSFWNALFISPVYNDAGDLIYFFASQLDI
Phy3-LOV2 QRDVTVQVLNYTKGGRAFWNLFHLQVMRDENGDVQYFIGVQQEM
          :.*::**:* *.* :*** :... : : ** : **.. * : :

          10          20          30          40          50          60
PST-RR   -ERILIVEDRDPVAELAKMVLDDYGYVSEIVLNAREALKKFESGNMYDLLFTDLIMPGGM
2A9P     MKKILIVDDEKPISDIIKFNMTKEGYEVVTAFNGREALEQFEAE-QPDIIILDLMLP-EI
          :*::**:*.. :... : * : : . ** ..*..*****:**: *:: **:* * :

          70          80          90          100          110          120
PST-RR   NGVMLAREVRRRYPKVKVLLTTGYAESSIERTDIGGSEFDVSKPCMPHDLARKVRQVLD
2A9P     DGLEVAKTIR-KTSSVPILMLSAKDSEFDKVIGLELGADDYVTKPFSNRELQARVKALLR
          :* : * : * : . * : * : . . . : . . * * : * : * : * : * : *
```



```

      10      20      30      40      50      60
PST-LOVARR -EALRQAQKMEALG-----QLTGGIAHDFNLLQVMGGYIDLIGSAAEKPVIDVQRVQ
2C2A      MENVTESKELERLKRIDRMKTEFIANISHLRLTPLTAIKAYAETIYNSLG--ELDLSLTK
      * : : : : * * : : : : * : : : : * : : : : * : : : : * : : : :
      70      80      90      100     110     120
PST-LOVARR RSVYHAKSAVERASTLTKQLLAFARKQK----LQGRVLNGLVSV-IVEPLIERTFGPEV
2C2A      EFLEVIIDQSNHLENLLNELLDFSRLEKSLQINREKVDLCDLVESAVNAIKEFASSHNV
      . : : : : . : : : : * : : : : * : : : : : : : : : * : : : : * : : : :
      130     140     150     160     170     180
PST-LOVARR AIETD-LEPALKNCRIDPTQAEVALLNIFINARDALIGRENPKVFIETRNLLVDELANMS
2C2      NVLFESNVPCPVEAYIDPTRIRQVLLNLLNNG-VKYSKADAPDKYVK---VILDEKD--G
      : : : * . : . * : : : : . : : : : * : : : : : : : : : * : : : :
      190     200     210     220     230     240
PST-LOVARR YDGLLPGRYVSIAVTDNGIGMPASIRDVMDPFFTTKE----EGKGSGLGLSMVYGFQK
2C2A      G-----VLIIVEDNGIGIPDHAKDRIFEQFYRVDSSTLYEVPGTGLGLAITKEIVEL
      * * * * * * * * * * : : : : : * : : : : * * : : : * : : : :
      250     260     270
PST-LOVARR SGGAAARIYTEEGVGTTLRLYFPVD-----
2C2A      HGGRIWVESEVGKSRFFVWIPKDRAGEDNRQDN
      * * : : * * * : : : : * *

```

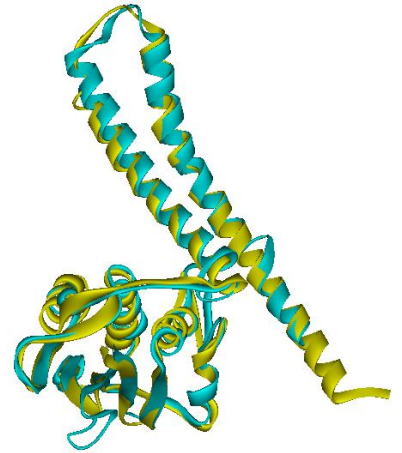


Figura 6-3 Allineamento di sequenza ottenuto con ClustalW fra i domini di PST-LOV e le strutture cristalline scelte. Accanto ad ogni dominio la sovrapposizione fra la struttura cristallina (in giallo) e il modello ottenuto per i domini di PST-LOV (in azzurro).

A partire dai modelli ottenuti per i domini LOV e HK di PST-LOV si è proceduto al *docking* con il software “Cluspro”, che implementa gli algoritmi ZDOCK e DOT (vedi paragrafo 2.7), i modelli proposti in uscita sono stati analizzati secondo criteri chimico-fisici, e grande importanza è stata data alla predizione di zone proteiche interazione ottenuta con “PPIpred” e il “Robetta server”. Il modello prescelto è il quarto proposto dal software ZDOCK, mostrato nella figura 6-4; per unire i due domini sono stati aggiunti grazie al programma “SPDBViewer” gli amminoacidi appartenenti al *linker*, sono stati posti in struttura *coil* come da predizione ed è stato creato un *loop*. Infine si è eseguita una minimizzazione energetica su tutta la struttura con “GROMOS”. Si può notare che anche in questo caso, come in YtvA, che la zona interessata alle interazioni sul dominio LOV è quella del foglietto β .

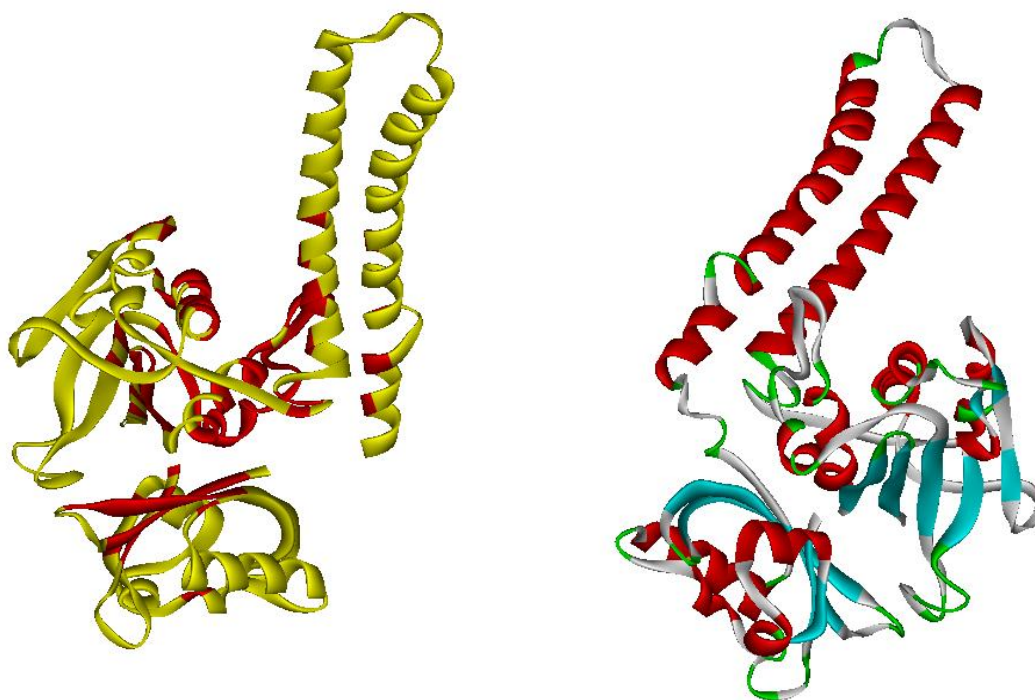


Figura 6-4 A sinistra il risultato numero 4 sviluppato dall’algoritmo di calcolo ZDOCK del server ClusPro, in rosso le zone predette da PPIpred deputate all’interazione intraproteica. A destra il modello PST-LOV_{ΔRR}.

Per completare il modello la struttura appena ottenuta è stata sottoposta a *docking*, sempre con i software DOT e ZDOCK, con il dominio RR. Il complesso prescelto, ovvero la terza struttura proposta da ZDOCK, è stato completato aggiungendo gli amminoacidi della zona *linker*, mettendoli in *coil* come da predizione e minimizzando energeticamente l’intero modello. Nell’immagine sono evidenziati i possibili residui istidinici deputati al legame con fosfato e al conseguente trasferimento al RR (vedi figura 6-5).

Il modello così ottenuto è stato confrontato con la composizione in struttura secondaria rilevata dai dati CD; nella tabella 6-2 sono riportati i risultati dell’analisi con CCA degli spettri allo stato *dark* per PST-LOV e PST-LOV_{ΔRR} e dello spettro di RR, dato che i modelli strutturali assegnano solo tre tipi di struttura secondaria agli amminoacidi della proteina, per poter comparare i due approcci diversi si è indicata come componente β la somma di “beta antiparallelo” e “*other*-beta parallelo”, mentre il “random coil” è stato fatto corrispondere alla somma di “random coil” e “beta turn”. I segmenti amminoacidici non modellizzati (vedi figura 6-2) sono stati completati nella tabella con la previsione di struttura secondaria da *consensus prediction*, i 20 amminoacidi

componenti l'His-tag sono stati indicati come random coil. I modelli di PST-LOV e PST-LOV_{ARR} mostrano un buon accordo con le analisi degli spettri CD, il modello di RR è invece quello che si discosta maggiormente con l'analisi dello spettro CD, esso presenta infatti una componente superiore di struttura alfa e random rispetto alle previsioni, a discapito di una minor componente β .

Tabella 6-2 Confronto fra l'analisi degli spettri medi CD allo stato dark analizzati con l'algoritmo di calcolo CCA e la composizione in struttura secondaria prodotta dal modello da noi presentato per PST-LOV, PST-LOV_{ARR} e RR.

	PST-LOV dark CCA	PST-LOV expected	PST- LOV_{ARR} dark	PST- LOV_{ARR} expected	RR	RR expected
<i>alfa elica</i>	199	188	124	124	42	52
<i>beta strand</i>	145	120	127	92	71	27
<i>Random coil</i>	210	246	171	206	28	62

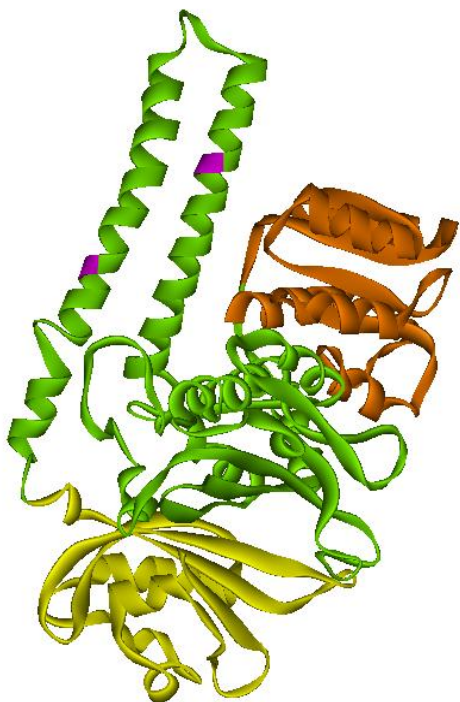


Figura 6-5 Nell'immagine il modello finale di PST-LOV, in giallo il dominio LOV, in verde l'HK, in arancio il RR. In rosa sono stati evidenziati i due residui istidinici dell'HK.

Come si può notare il modello proposto è in buon accordo con i risultati sperimentali secondo i quali il dominio RR si presenta in soluzione come monomero sferico, il dominio HK come

monomero oblungo e la proteina intera anch'essa come monomero leggermente oblungo. Il dominio LOV è in grado, attraverso il foglietto β , di trasmettere al resto della proteina le variazioni conformazionali indotte dalla luce blu. L'istidina in grado di fare da accettore-transfer di fosfati si trova in posizione opposta rispetto al *Response Regulator*, è noto tuttavia che le chinasi agiscono normalmente come dimeri, anche se dalle esperienze di cromatografia non sono emersi complessi proteici, il meccanismo di transfosforilazione non si può quindi descrivere univocamente con questo modello.

7 Conclusioni

L'approccio multidisciplinare affrontato durante questi tre anni di ricerca ha portato risultati interessanti e stimolanti verso il proseguo dello studio nella direzione avviata, le proteine batteriche contenenti domini LOV si confermano modelli flessibili, diffusi e facilmente gestibili per l'indagine dei meccanismi di risposta e di trasduzione della luce. I risultati più gratificanti riguardano:

- a. Il modello di struttura di un dimero del dominio LOV da YtvA di *Bacillus subtilis*. Tale modello, ottenuto grazie a metodologie di *docking* e convalidato da tecniche spettroscopiche e biochimiche, si è potuto confrontare positivamente con la struttura cristallina ottenuta successivamente dal gruppo di Keith Moffat [53]. Inoltre tali studi hanno rivelato che il β -*scaffold* del LOV-*core* è coinvolto nelle interazioni intraproteiche e, di conseguenza, partecipa verosimilmente alla comunicazione interdominio.
- b. L'attestazione del legame di nucleotidi trifosfati (NTP) al dominio STAS di YtvA, e i cambiamenti conformazionali fotoindotti al sito di legame. Questi studi hanno rilevato una importante funzionalità molecolare della proteina, oltre alla fotosensibilità, e dimostrano una effettiva comunicazione interdominio LOV-STAS, questa volta di tipo funzionale. Il β -*scaffold* del LOV-*core* si è rivelato cruciale, come suggerito dagli studi conformazionali di cui al punto a), in quanto la mutazione E105L sopprime la trasmissione dei cambiamenti fotoindotti alla cavità di legame per gli NTP. Dati più recenti indicano che anche la mutazione D109L ha un effetto analogo (Aba Losi, manoscritto in preparazione), rivelando come questi due residui carichi, caratterizzanti la famiglia di proteine YtvA nelle Firmicute, siano determinanti per la funzionalità molecolare. Recentissimo è il legame con studi di tipo fisiologico: YtvA è un regolatore positivo del fattore di trascrizione σ^B , attività che cresce significativamente quando i batteri vengono esposti alla luce blu [55]. Le mutazioni E105L e D109L sopprimono la dipendenza dalla luce di tale attività in colture batteriche (Klaas Hellingwerf, comunicazione personale). Queste osservazioni sono importantissime per legare i nostri studi *in vitro* con gli effetti *in vivo*, in quanto i) confermano che il legame degli NTP ha rilevanza fisiologica; ii) svelano che la comunicazione interdominio LOV-STAS è indispensabile per gli effetti fotoindotti osservati *in vivo*; iii) identificano il ruolo del

dominio STAS come effettore o come switch secondario nel processo di trasduzione del segnale; iv) confermano il ruolo cruciale del β -*scaffold* del LOV-*core* nella fotoattivazione di YtvA.

- c. La dimostrazione dell'attività chinasi fotoregolata in PST-LOV, da *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, essendo la prima scoperta in assoluto di trasduzione del segnale di un sistema prettamente batterico, come quello del *two component signal system*, unito ad un modulo di risposta alla luce, il dominio LOV, già evidenziato negli organismi superiori. Similmente, anche nelle fototropine di piante l'attività chinasi di autofosforilazione è accentuata dall'illuminazione. Dati recenti dimostrano che l'attività chinasi fotoregolata delle proteine LOV batteriche è legata a risposte fisiologiche, quali l'infettività e l'adesione cellulare [19, 20]. Poiché *Pseudomonas syringae* è un importante patogeno vegetale, è plausibile che PST-LOV abbia un ruolo nella regolazione delle interazioni con la pianta ospite, un aspetto che merita sicuramente un'analisi approfondita.

Lo studio invece che risulta essere più incompleto allo stato attuale è quello che riguarda la modellizzazione strutturale per la proteina intera, sia per YtvA che per PST-LOV. Non è stato infatti finora possibile ottenere un risultato che ben si accordasse a tutte le informazioni relative ai punti critici per la funzionalità e la struttura stessa. In particolare per YtvA, che è stata la proteina più approfonditamente studiata da questo punto di vista, probabilmente manca una similarità di sequenza adeguatamente elevata del dominio STAS con strutture cristalline depositate nella banca dati PDB. La bassa risoluzione del modello del dominio STAS va ad inficiare anche gli esperimenti di *docking* con il *linker* e il dominio LOV, e quindi i tentativi di unione dei due domini. Anche l'analisi eseguita sul legame degli NTP, analizzato con modelli computazionali va ad inserirsi in questo contesto, e non risulta quindi particolarmente significativa ed attendibile.

Gli studi realizzati durante questi anni di attività pongono la base per il proseguo della ricerca in questo settore, dove tanti punti vanno chiariti e tanti spunti meritano di essere approfonditi. Lo studio di proteine oggetto di mutagenesi sitospecifica si è rivelato particolarmente produttivo per l'individuazione dei punti chiave nella trasmissione del segnale intraproteica. Una grande

attenzione va quindi posta al proseguimento di tale tipo di approccio sperimentale, che nel caso di YtvA ha dato ottimi risultati che si stanno anche verificando funzionalmente (vedi punti a e b). Un'operazione simile potrebbe essere portata avanti con PST-LOV, la cui risposta è facilmente identificabile con esperimenti di autoradiogrammi utilizzando ATP radioattivo. Una volta focalizzata l'attenzione sulle zone d'interesse per la trasmissione del segnale sarebbe interessante confrontare le risposte in proteine diverse, per indagare la similarità e le differenze di trasmissione del segnale in proteine LOV differenti, sostanzialmente verificandone la modularità. Come evidenziato da indagini sulla dinamica molecolare [56], i domini LOV possono avere almeno due diversi *pathways* di attivazione, i.e. diverse regioni del LOV-core attraverso cui può propagarsi il segnale. E' verosimile quindi che le proteine LOV possano esibire l'uno o l'altro *pathway* di attivazione, che si siano poi concretizzati nella evoluzione di due domini entrambi fotoattivi (LOV1 e LOV2), ma con diverso significato funzionale nelle fototropine di piante. Oltre a ciò uno sviluppo futuro potrebbe anche essere quello di individuare le zone di trasmissione per i domini effettori, e confrontare risposte uguali per stimoli diversi.

8 Note bibliografiche

1. Losi, A. and W. Gaertner, *Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors*. Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal Of The European Photochemistry Association And The European Society For Photobiology, 2008. **7**: p. 1168-1178.
2. *Photomorphogenesis in plants and bacteria*. 2006.
3. Briggs, W.R., *Photomorphogenesis in plants and bacteria*. 2006: p. 171-197.
4. Ahmad, M. and A.R. Cashmore, *HY4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor*. Nature, 1993. **366**: p. 162-166.
5. Huala, E., et al., *Arabidopsis NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain*. Science, 1997. **278**: p. 2120-2123.
6. Hefti, M.H., et al., *The PAS fold. A redefinition of the PAS domain based upon structural prediction*. European Journal Of Biochemistry / FEBS, 2004. **271**(6): p. 1198-1208.
7. Zhulin, I.B., B.L. Taylor, and R. Dixon, *PAS domain S-boxes in archaea, bacteria and sensors for oxygen and redox*. Trends in Biochemical Sciences, 1997. **22**(9): p. 331-333.
8. Taylor, B.L. and I.B. Zhulin, *PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light*. Microbiology And Molecular Biology Reviews: MMBR, 1999. **63**(2): p. 479-506.
9. Salomon, M., et al., *Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin*. Biochemistry, 2000. **39**(31): p. 9401-9410.
10. Kasahara, M., et al., *Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domain of the phototropins from Arabidopsis, rice and Chlamydomonas Reinhardtii*. Plant Physiol, 2002. **129**: p. 762-773.
11. Kay, C.W.M.S., E. Kuppig, A. Hofner, H. Rudiger, W. Schleicher, M. Fischer, M. Bacher, A. Weber, S. Richeter, G., *Blue light perception in plants. Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450A mutant of phototropin*. J. Biol. Chem., 2003. **278**: p. 10973-10982.
12. Kimura, M. and T. Kagawa, *Phototropin and light-signaling in phototropism*. Current opinion in Plant Biology, 2006. **9**: p. 503-508.
13. Christie, J.M., et al., *Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function*. Plant J, 2002. **32**: p. 205-219.
14. Losi, A., *Flavin-based Blue-light Photosensors: A Photobiophysics Update*. Photochemistry And Photobiology, 2007. **83**: p. 1283-1300.
15. Ghetti, F., G. Checcucci, and F. Lenci, *Photosensitized reactions as primary molecular events in photomovements of microorganisms*. Journal Of Photochemical and Photobiological B., 1992. **15**: p. 185-198.
16. Purcell, E.B.C., S., *Photoregulation in prokaryotes*. Curr. Op. Microbiol., 2008. **11**: p. 168-178.
17. Corrochano, L.M., *Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour*. Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal Of The European Photochemistry Association And The European Society For Photobiology, 2007. **6**: p. 725-736.
18. Crosson, S., S. Rajagopal, and K. Moffat, *The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains*. Biochemistry, 2003. **42**: p. 2-10.

19. Swarts, T.E., et al., *Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria*. *Science*, 2007. **317**: p. 1090-1093.
20. Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D. C.; Fiebig, A.; Crosson, S., *A photosensory two-component system regulates bacterial cell-attachment*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2007. **104**: p. 18241-18246.
21. Salomon, M., et al., *An optomechanical transducer in the blue light receptor phototropin from Avena sativa*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 2001. **98**(22): p. 12357-12361.
22. Swarts, T.E., et al., *Vibration spectroscopy reveals light-induced chromophore and protein structural changes in the LOV2 domain of the plant blue-light receptor phototropin I*. *Biochemistry*, 2002. **41**: p. 7183-7189.
23. Bednarz, T., et al., *Functional variations among LOV domains as revealed by FT-IR difference spectroscopy*. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal Of The European Photochemistry Association And The European Society For Photobiology*, 2004. **3**: p. 575-579.
24. Losi, A., E. Ternelli, and W. Gartner, *Tryptophan fluorescence in the Bacillus subtilis phototropin-related protein YtvA as a marker of interdomain interaction*. *Photochemistry And Photobiology*. **80**: p. 150-153.
25. Aravind, L. and E.V. Koonin, *The STAS domain -- a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists*. *Current Biology*, 2000. **10**(2): p. R53-R55.
26. Najafi, S.M., D.A. Harris, and M.D. Yudkin, *The SpoIIAA protein of Bacillus subtilis has GTP-binding properties*. *J. Bacteriol.*, 1996. **178**: p. 6632-6634.
27. Losi, A., et al., *First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes*. *Biophysical Journal*, 2002. **82**(5): p. 2627-2634.
28. Grebe, T.W. and J.B. Stock, *The histidine protein kinase superfamily*. *Adv. Microbial. Physiol.*, 1999. **41**: p. 139-227.
29. West, A.H. and A.M. Stock, *Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems*. *Trends Biochemic. Sci.*, 2001. **26**: p. 369-376.
30. Losi, A., et al., *Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA*. *Photochemistry And Photobiology*. **81**(5): p. 1145-1152.
31. Favilla, R. and A. Mazzini, *The binding of 1,N6-etheno-NAD to bovine liver glutamate dehydrogenase*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1984. **788**: p. 48-57.
32. Van den Berg, P.W., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy of flavins and flavoenzymes: photochemical and photophysical aspects*. *Spectrochim. Acta*, 2001. **57**: p. 2135-2144.
33. Losi, A., B. Quest, and W. Gartner, *Listening to the blue: the time-resolved thermodynamics of the bacterial blue-light receptor YtvA and its isolated LOV domain*. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal Of The European Photochemistry Association And The European Society For Photobiology*, 2003. **2**(7): p. 759-766.
34. Perczel, A., et al., *Convex constraint analysis: a natural deconvolution of circular dichroism curves of proteins*. *Protein Engineering*, 1991. **4**(6): p. 669-679.

35. Perczel, A., K. Park, and G.D. Fasman, *Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: A practical guide*. Analytical Biochemistry, 1992. **203**(1): p. 83-93.
36. Bates, I.R., et al., *Characterization of a Recombinant Murine 18.5-kDa Myelin Basic Protein*. Protein Expres. Purif., 2000. **20**: p. 285-299.
37. Lee, J.Y., et al., *Crystal structure of the TM1442 protein from Thermotoga maritima, a homolog of the Bacillus subtilis general stress response anti-antisigma factor RsbV*. Proteins, 2004. **56**: p. 176-179.
38. Vriend, G., *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. J. Mol. Graph., 1990. **8**(29): p. 52-56.
39. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**: p. 2714-2723.
40. Scott, W.R.P., et al., *The GROMOS biomolecular simulation program package*. J. Phys. Chem., 1999. **A 103**: p. 3596-3607.
41. Comeau, S.R., et al., *ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes*. Bioinformatics (Oxford, England), 2004. **20**: p. 45-40.
42. Mandell, J.G., et al., *Protein docking using continuum electrostatics and geometric fit*. Protein Engineering, 2001. **14**(2): p. 105-113.
43. Chen, R., L. Li, and Z. Weng, *ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm*. Proteins, 2003. **52**(1): p. 80-87.
44. Willard, L., et al., *VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(13): p. 3316-3319.
45. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK-A program to check the stereochemical quality of protein structures*. J. Appl. Crystallogr., 1993. **26**: p. 283-291.
46. Hooft, R.W., et al., *Errors in protein structures*. Nature, 1996. **381**(6580): p. 272.
47. Colovos, C. and T.O. Yeates, *Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions*. Protein Science: a Publication Of The Protein Society, 1993. **2**(9): p. 1511-1519.
48. Luthy, R., J.U. Bowie, and D. Eisenberg, *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature, 1992. **356**(6364): p. 83-85.
49. Pontius, J., J. Richelle, and S.J. Wodak, *Deviations from Standard Atomic Volumes as a Quality Measure for Protein Crystal Structures*. Journal of Molecular Biology, 1996. **264**(1): p. 121-136.
50. Bradford, J.R. and D.R. Westhead, *Improved prediction of protein-protein binding sites using a support vector machines approach*. Bioinformatics (Oxford, England), 2005. **21**(8): p. 1487-1494.
51. Hubschmann, T., et al., *Phosphorylation of proteins in the light-dependent signalling pathway of a filamentous cyanobacterium*. European Journal Of Biochemistry / FEBS, 2001. **268**: p. 3383-3389.
52. Whitmore, L. and B.A. Wallace, *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**: p. 668-673.
53. Moffat, A.M.a.K., *Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA*. Journal of Molecular Biology, 12 October 2007. **Volume 373**(Issue 1): p. 112-126.

54. Krauss, U., et al., *Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from Pseudomonas putida: a paradigm for an extended LOV construct*. *Phys. Chem.*, 2005. **7**: p. 2229-2236.
55. Avila-Perez, M., K.J. Hellingwerf, and R. Kort, *Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of Bacillus subtilis via YtvA*. *Journal Of Bacteriology*, 2006. **188**(17): p. 6411-6414.
56. Freddolino, P.L., M. Dittrich, and K. Schulten, *Dynamic Switching Mechanisms in LOV1 and LOV2 Domains of Plant Phototropins*. *Biophysical Journal*, 2006. **91**(10): p. 3630-3639.

**Un grandissimo ringraziamento, per avermi seguito durante tutta
l'attività di ricerca va alla Dott.ssa Aba Losi
Dipartimento di Fisica
Università degli Studi di Parma**

Per l'aiuto nelle esperienze di modellistica
computazionale ringrazio la Dott.ssa Eugenia Polverini
Dipartimento di Fisica
Università degli Studi di Parma

Un particolare ringraziamento, per la collaborazione e
l'ospitalità concessami in Germania va al
Prof. Wolfgang Gaertner
Max Planck Institut Fur Bioanorganische Chemie
MH- Germany

L'ultimo ringraziamento è per tutto il gruppo di ricerca
del Prof. Wolfgang Gaertner, in particolare
per la collaborazione nella preparazione dei campioni a
Zhen Cao e Ulrich Krauss