

1. Einleitung

Licht ist eine wichtige Energieressource für das Leben auf der Erde. Andererseits ist es eins der wichtigsten Signale, das von verschiedenen Organismen genutzt wird, um Informationen über die Umwelt zu erhalten. Während der Evolution haben Bakterien, Tiere und Pflanzen verschiedene Chromo-Proteine entwickelt, die in der Lage sind, Licht wahrzunehmen. Mit Hilfe solcher Photorezeptoren können Lebewesen die räumliche, zeitliche und spektrale Variabilität des Lichtes erfassen und in geeigneter Weise darauf antworten. Es wurden verschiedene Photorezeptoren entdeckt und bezüglich ihrer chemischen Struktur in unterschiedliche Familien eingeteilt. Im Folgenden werden verschiedene Photorezeptorfamilien beschrieben. In dieser Arbeit wurden *Agrobacterium*-Phytochrom 1 (Agp1) und *Agrobacterium*-Phytochrom 2 (Agp2) untersucht, daher soll auf die Familie der Phytochrome detaillierter eingegangen werden.

1.1. Cryptochrome

Cryptochrome sind Blaulicht- und Ultraviolet-A-Licht-Photorezeptoren. Sie sind in vielen Pflanzen, aber auch in Tieren, dem Menschen und Bakterien zu finden. Das erste Cryptochrom wurde aus *Arabidopsis* isoliert. Aufgrund seiner photobiologischen, molekularen und genetischen Eigenschaften wurde gefolgert, dass es sich bei dem Protein um den lang gesuchten Blaulichtphotorezeptor handelt und er wurde als Cryptochrom 1 (Cry1) bezeichnet (Ahmad and Cashmore, 1993; Lin et al, 1995). Neben Cry1 wurde ein weiterer Vertreter der Cryptochrom Familie (Cry2) gefunden. Wie Cry1 beeinflusst Cry2 die Blaulicht-induzierte Kürzung des Hypokotyls, die Entwicklung der Keimblätter und die Anthocyaninproduktion (Lin et al, 1998; Ahmad et al., 1998). Im Gegensatz zu Cry1 ist Cry2 bei Lichtintensitäten $> 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ instabil. Die Expression vieler pflanzlicher Gene unterliegt einem Zirkadianen Rhythmus. Cry1 ist an der Regulation der zirkadianen Expressionsmuster beteiligt (Somera et al., 1998). Cryptochrome wurden auch in niederen Pflanzen, besonders den Cryptogamen, wie Farne Moose und Algen gefunden (Suetsugu and Wada, 2003). Im Farn *Adiantum capillus-veneris* werden durch Cryptochrome physiologische Prozesse, wie Apikalwachstum, Zellteilung und Sporenkeimung reguliert. Im Moos *Physcomitrella* regulieren die Cryptochrome Cry1 und Cry2 die pflanzliche Entwicklung durch Inhibition des Auxinsignalwegs (Schumaker and Dietrich, 1998).

Die vermutlichen Vorläufer der Cryptochrome sind Photolyasen. Hierbei handelt es sich um Flavoproteine, die eine Blau-/UV-A-lichtabhängige Reparatur von DNA-Schäden durchführen

(Sancar, 1994). Cryptochrome besitzen allerdings keinerlei DNA-Reparierungsaktivität. Alle Proteine der Cry/Photolyase Familie besitzen einen N-terminalen Photolyase-homologen Bereich (PHR), der für die Chromophorbindung und Lichtabsorption verantwortlich ist. Pflanzencryptochrome besitzen zusätzlich eine sogenannte CCT (Cry carboxy-terminal extension), die in Photolyasen nicht vorhanden ist (Chen et al., 2004). Die CCT-Domänen verschiedener Pflanzencryptochrome sind relativ unterschiedlich (Lin und Shalitin, 2003). Es konnten jedoch drei Sequenzmotive identifiziert werden. Dazu gehörten ein DQXVP Motiv, wobei es sich um einen Bereich mit sauren Resten handelte. Weiterhin fand man STAES als auch GGXVP-Sequenzen am C-terminalen Ende, die zusammengefasst als DAS Motiv bezeichnet werden. Durch die Untersuchung von Cryptochrom 1 (Cry1) und Cryptochrom 2 (Cry2) aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass das DAS-Motiv für die Cryptochromfunktion wichtig ist (Lin and Shalitin, 2003). Cryptochrome und Photolyasen verwenden zwei Chromophore. Das ist zum Einen ein FAD und zum Anderen ein Pterin bei Cryptochromen, bzw. ein Pterin oder Deazaflavin bei Photolyasen (Sancar, 2003). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zwischen Photolyasen und Cryptochromen können Schlüsse über die Funktionsweise der Letzteren gezogen werden. Vergleichende Analysen haben gezeigt, dass die Aminosäuren, die für einen lichtaktivierten Elektronentransfer notwendig sind, bei Photolyasen und Cryptochromen konserviert sind. Da Cryptochrome keine lichtabhängigen DNA-Reparationsmechanismen besitzen, wird ein Elektronentransfer zu einem anderen Substrat als der DNA angenommen. Cryptochrome funktionieren also auf zweierlei mögliche Weisen. Zum Einen kann das Redox-Signal-Substrat durch eine Redoxreaktion aktiviert werden, analog zu den Pyrimidin Dimeren für die CPD Photolyase (Cashmore et al., 1999). Zum Anderen könnte Licht eine intramolekulare Redoxreaktion bewirken, was eine Konformationsveränderung im Cryptochrom zur Folge hat, was wiederum zu einer Signalweiterleitung führt. Konformationsveränderungen am Protein, die aus einer Redoxreaktion resultieren, wurden für *Arabidopsis*- und *Drosophila*-Cryptochrome gefunden (Cashmore, 2003; Lin and Shalitin, 2003 und Liscum et al., 2003). Pflanzliche Cryptochrome wurden von Brautigam et al., (2004) und bakterielle Cryptochrome von Brudler et al., (2003) kristallisiert.

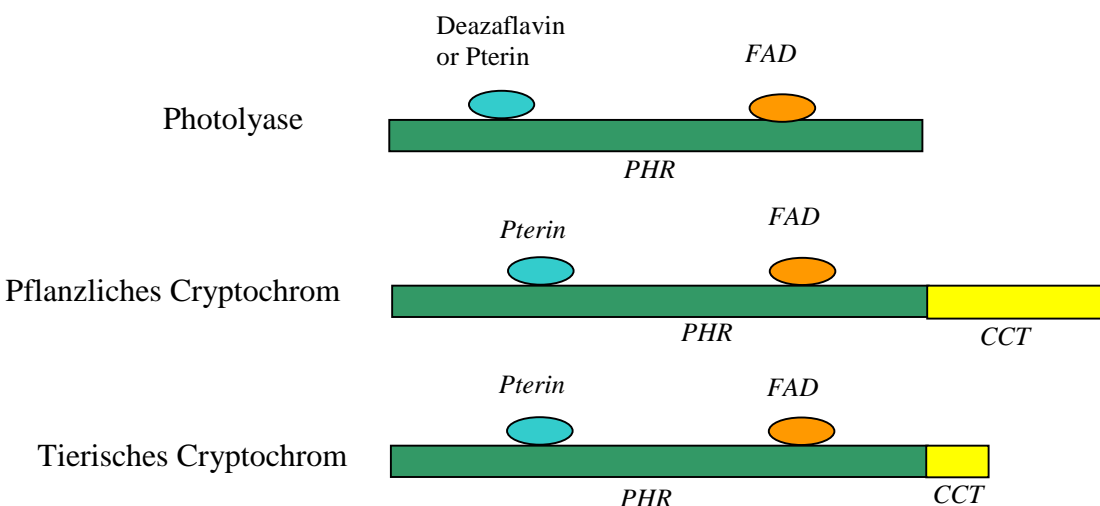


Abbildung 1: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen der DNA Photolyase/ Cryptochrom Familie. Photolyasen und Cryptochrome enthalten eine PHR Domäne (Photolyase Homology Region) mit den Chromophor-Bindestellen (Deazaflavin oder Pterin und FAD) für die Lichtabsorption. Die meisten pflanzlichen und einige tierische Cryptochrome enthalten eine Cry Carboxyl-Terminale Domäne (CCT).

1.2. Phototropine

Phototropine gehören ebenfalls zu den Blaulichtphotorezeptoren. Phototropin 1 (Phot1) induziert den Phototropismus des Hypokotyls und der Wurzel in *Arabidopsis* (Reymond P. et al., 1992; Liscum und Briggs, 1995a; Huala et al., 1997). Neben Phot1 wurde ein zweiter Photorezeptor, Phot2 für den Phototropismus in *Arabidopsis* entdeckt. (Ahmad et al., 1998b; Lasceve et al., 1999; Sakai et al., 2001). Phot2 reguliert außerdem die Chloroplastenbewegung (Kagawa et al., 2001) und induziert zusammen mit Phot1 die Stomataöffnung (Zeiger und Helper, 1977; Assmann et al., 1985; Zeiger, 2000; Kinoshita et al., 2001). Ein anderer durch Phot1 vermittelter physiologischer Effekt ist die Phosphorylierung von Calciumtransportern an der Plasmamembran, was zu Zelländerungen und Wachstumsunterschieden im Hypokotyl (Chentao, 2002) führt. Außerdem reguliert Phototropin zusammen mit Cryptochrom die Hypokotylinhibition (Folta und Spalding, 2001). Eine völlig neue Funktion von Phototropin wurde in der Alge *C. reinhardtii* demonstriert. Phototropin spielt eine wichtige Rolle bei der Blaulicht-abhängigen Entwicklung des sexuellen Lebenszyklus. Hierzu gehört die Umwandlung von Prägameten zu Gameten, die Hochregulation der Genexpression während der Gametogenese, Erhalt der Paarungstüchtigkeit, Zygotenreifung (Huang und Beck, 2003) und Veränderungen der Chemotaxis während der Anfangsphase des sexuellen Zyklus (Ermilova et al., 2004).

Phototropine bestehen aus einer Amino-terminalen Domäne für die Wahrnehmung von Licht und einer Carboxy-terminalen Ser/Thr Proteinkinase Domäne. Der N-terminale Teil der Phototropine beinhaltet zwei Domänen, die als LOV1- und LOV2 bezeichnet werden (LOV steht für *light, oxygen, voltage*) und mit der Familie der PAS-Domänen verwandt sind (Briggs and Christie, 2002) (Abbildung 2). Die LOV-Domänen binden ein einzelnes Flavin Molekül und durchlaufen eine photochemische Umwandlung nach Absorption von Blaulicht. Dabei bildet ein konservierter Cysteinrest eine transiente Bindung mit dem 4a Kohlenstoffatom des Flavin Cofaktors (Crosson and Moffat, 2002; Salomon et al., 2001). Die Ausbildung des Cystein-C(4a)-Adduktes führt zur Aktivierung der C-terminalen Serin/Threonin Kinase (Briggs and Christie, 2002)

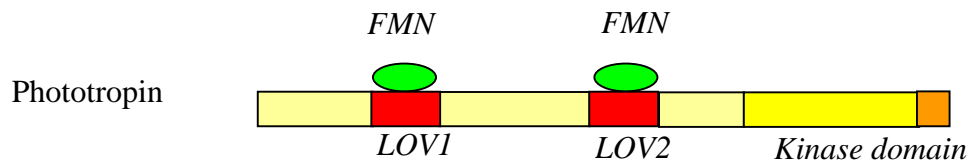


Abbildung 2: Die amino-terminale Domäne der Phototropine besteht aus zwei Sequenzwiederholungen LOV1 und LOV2. Blaues Licht bewirkt die kovalente Bindung der FMN-Chromophore in den LOV-Domänen. Die Carboxy-terminale Ser/Thr Proteinkinase Domäne wird daraufhin aktiviert und initiiert eine Signaltransduktion.

1.3. Andere Blaulichtphotorezeptoren

In *Arabidopsis* wurden drei weitere neue Photorezeptoren, ZTL (Zeitlupe), FKF1 (Flavin-binding Kelch repeat F-box1) und LKP2 (LOV Kelch Protein 2) gefunden. Sie enthalten eine LOV Domäne, die FMN bindet und besitzen eine ähnliche Photochemie wie Phototropine. Es handelt sich um eine neue Klasse zirkadianer Photorezeptoren, die die Blühzeit in Pflanzen regulieren (Yanovsky und Kay, 2003). In dem Ascomyceten *Neurospora crassa* wurden zwei Photorezeptoren mit einer LOV-Domäne gefunden. Der Photorezeptor WC-1 bindet FAD als Chromophor und ist für viele Blaulichtantworten in dem filamentösen Pilz verantwortlich (Froehlich et al., 2002; He et al., 2002) WC-1 interagiert mit WC-2, um ein Heterodimer zu bilden, das als Licht-induzierter Transkriptionsfaktor agiert. Der Photorezeptor VIVID, ein kleines Protein (186 Aminosäuren) ermöglicht *Neurospora* auf unterschiedliche Tageslichtintensitäten zu reagieren (Schwerdtfeger und Linden, 2003). VIVID benutzt FAD oder FMN als Chromophor und unter blauem Licht wird ein kovalentes Flavin-Cysteinyll-Addukt gebildet. Da VIVID- nur das LOV-Motiv und keine weiteren Signaldomänen besitzt, ist es wahrscheinlich, dass das Lichtsignal durch Protein-Protein Interaktionen übertragen wird.

Zu Blaulichtrezeptoren gehören weiterhin Proteine mit BLUF Domänen (Gomelsky und Klug, 2002). Es handelt sich um einen neuen Typ Photorezeptor mit der FAD-bindenden Domäne BLUF (Blue Light Using FAD). Ein Photorezeptor dieser Familie wurde in *Euglena gracilis* identifiziert. *Euglena gracilis* ist ein Einzeller, der seine Schwimmrichtung entsprechend der Blaulichtintensität verändert (Iseki et al., 2002).

1.4. Rhodopsin

Rhodopsin ist auch unter der Bezeichnung Sehpurpur bekannt. Es katalysiert den einzigen lichtsensitiven Schritt des Sehvorgangs. Rhodopsin gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). Die GPCRs sind eine Proteinfamilie von Transmembran Rezeptoren, die ein extrazelluläres Signal (Bindung des Liganden) in ein intrazelluläres Signal (G-Protein Aktivierung) übertragen.

Rhodopsin besteht aus dem Protein Opsin (Ovchinnihov et al., 1983) und der prosthetischen Gruppe 11-cis Retinal (Hargrave et al., 1983; Nathans and Hognen, 1983). Retinal ist das lichtabsorbierende Pigmentmolekül und ein Derivat von Vitamin A. Rhodopsin liegt in Form einer 7-Transmembran-Helix Struktur in der Membran des äußeren Segments einer Stäbchenzelle vor. Nach Bestrahlung (Photonenabsorption) findet eine Photoisomerisierung um eine Kohlenstoff-Doppelbindung vom inaktiven Rhodopsin (11-cis) zum aktiven all-trans Retinal statt (Wald, 1968). Die Photoisomerisationskaskade erfolgt über 5 kurzlebige Intermediate. Trans-Retinal, wird anschließend wieder zu 11-cis Retinal rückkonvertiert, bevor es wieder in den Photozyklus eintritt. Photoangeregtes Rhodopsin löst eine enzymatische Kaskade aus, die in der Hydrolyse von GMP resultiert.

Das wiederum führt zu einer Schließung Kationen – spezifischer Kanäle innerhalb der Stäbchenzellmembran, die im Dunkeln normalerweise für den Na^+ - Ionen Influx offen sind (Molday and Kaupp, 2000). Die Hyperpolarisation bewirkt eine Weitergabe des Signals an andere Neuronen in der Retina. Die lichtinduzierte Verminderung des Calciumgehaltes fördert die Rückführung angeregter Neuronen in einen passiven Dunkelzustand und der Zyklus beginnt nach Lichtdetektion erneut. Die Kristallstruktur von Rinder-Rhodopsin, wurde im Jahr 2000 gelöst (Okada et al., 2000; Palczewski et al., 2001).

Mehr als 300 verschiedene Proteine aus der Familie der Rhodopsine werden zur Zeit in Eukaryonten und Prokaryonten beschrieben (Spudlich et al., 2000; Hellingwerf, 2002).

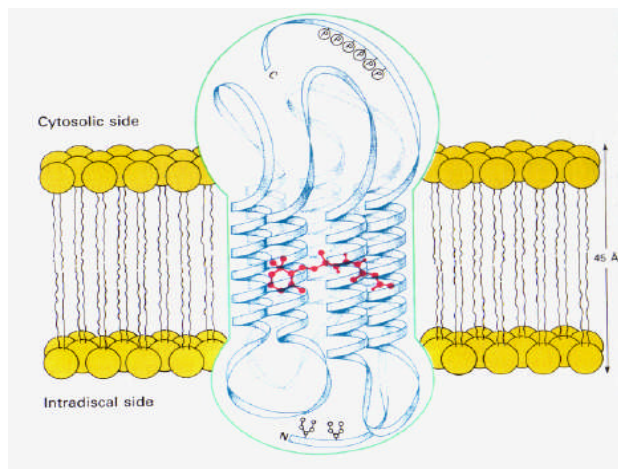


Abbildung 3: Position von 11-cis Retinal in Rhodopsin. (Abbildung aus Stryer; Biochemistry)

1.5. Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin (BR) ist das photosynthetische Pigment in Halobakterien (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973). Es agiert als lichtgetriebene Protonenpumpe, durch die Protonen durch die Membran aus der Zelle transportiert werden. Der daraus resultierende Protonengradient wird anschließend für die Synthese von ATP genutzt (Oesterhelt und Stoeckenius, 1973). Bakteriorhodopsin ist ein 7-Transmembran-Helix Protein. BR nimmt bis zu 50 % der Zelloberfläche von Halobakterien ein. Der Chromophor, ein Vitamin A Aldehyd (Spudlich et al., 2000) ist über eine Schiffsbasis an ein Lysin in der siebten Helix des Proteins gebunden. Nach Absorption eines Photons verändert das Retinamolekül seine Konformation, was in einer Konformationsveränderung des umgebenen Proteins und dem Auspumpen von Protonen resultiert. Bakteriorhodopsin hat eine rote Farbe und kann am effizientesten grünes Licht (500-650 nm; Absorptionsmaximum bei 568 nm) absorbieren (Oesterhelt, 1998; Varo, 2000). Die Kristallstruktur wurde durch Essen et al. (1998); Grigorieff et al. (1996); Luecke et al., (1999) gelöst.

1.6. Photoactive Yellow Protein (Xanthopsine)

Das Photoactive Yellow Protein (PYP) wurde zum ersten Mal von T.E. Meyer (Meyer, 1985) aus dem halophilen, phototrophen Bakterium *Ectothiorhodospira (Halorhodospira) halophila* isoliert. Bei diesem Protein handelt es sich um einen 14 kDa großen cytoplasmatischen Photorezeptor.

Das gesamte Photoactive Yellow Protein von *H. halophila* kann als eine einzelne PAS-Domäne mit einer 30 Aminosäure langen N-terminalen Erweiterung betrachtet werden. Es handelt sich um das erste Protein der PAS-Domänen Familie, für das die 3-D Struktur aufgeklärt wurde. Es wurde deshalb zum strukturellen Prototyp der PAS-Domänen Faltung erklärt (Pellequer et al., 1998).

Das Protein bindet Cumarsäure als Chromophor über eine Thiolesterbindung an das Cystein 69 (Baca et al., 1994; Haff et al., 1994a). Durch Anregung des Grundzustandes pG entsteht durch eine trans zu cis Isomerisierung des Chromophors das Intermediat pR. Als nächstes entsteht ein langlebiges Intermediat pB, das eine Lebenszeit von 400 ms hat, bevor es in den Grundzustand zurückgeht (Haff et al. 1995). Wahrscheinlich ist das pB Intermediat für die Signalleitung verantwortlich, indem es an einen Signalpartner bindet.

In *H. halophila* könnte PYP als Photorezeptor für Phototaxis wirken (Hoff et al., 1995; Sprenger et al., 1993). Die Xanthopsine aus *Rs. centenum* regulieren die Chalcon Synthese (Jiang et al., 1999).

1.7. Phytochrome

Phytochrome bilden eine große Familie von Photorezeptoren, die rotes und dunkelrotes Licht wahrnehmen und in Bakterien, Pilzen, Algen, niederen und höheren Pflanzen zu finden sind (Montgomery und Lagarias, 2002). Die photochemischen Eigenschaften von Phytochromen wurden ursprünglich mit Pflanzenphytochromen untersucht (Butler et al., 1959).

Alle Phytochrome nutzen einen linearen Tetrapyrrol (Bilin) als Chromophor, der dem Rezeptor ermöglicht, zwei durch Licht interkonvertierbare Konformationen anzunehmen. Eine inaktive Pr-Form (Rotlicht-absorbierend), die nach Bestrahlung mit rotem Licht in die aktive Pfr-Form (Dunkelrotlicht-absorbierend) umgewandelt wird. Umgekehrt kann die Pfr-Form nach Absorption von dunkelrotem Licht zu Pr umgewandelt wird. Die Pfr-Form kann ebenfalls im Dunkeln zu Pr konvertieren. Dieser Prozess wird Dunkelreversion genannt (Schäfer und Bowler, 2002).

1.7.1. Phytochrom Chromophore

Pflanzenphytochrome nutzen P Φ B als Chromophor (Rüdiger und Thümmler, 1994; Wu et al., 1997; Terry, 1997; Zeidler et al., 1998). In Pflanzen wird P Φ B in den Chloroplasten synthetisiert und diffundiert danach in das Zytosol, wo die Assemblierung mit dem Apophytochrom

stattfindet. Der erste Schritt der Synthese von PΦB bzw. PCB in höheren Pflanzen und Cyanobakterien erfolgt durch die Oxigenierung von Häm zu Biliverdin IX (BV) durch eine ferredoxinabhängige Hämoxygenase. Biliverdin wird durch eine PΦB-Synthetase in 3E-PΦB konvertiert und anschließend zu 3Z-PΦB isomerisiert. (Muramoto et al., 1999). Bei Cyanobakterien wird BV durch eine PcyA (3Z-phycoerythrin-ferredoxin oxidoreductase) direkt zum PCB reduziert (Frankenberg et al., 2001). Die BV-Ring A-Doppelbindung wird reduziert und die Ring A-Vinylseitenkette wird zu einer Ethylidenseitenkette. Bei PCB wird zusätzlich der Vinyl-Rest des Ringes D zu einem Ethyl-Rest reduziert (Kohchi et al., 2001; Frankenberg et al., 2001).

In Bakterien und Pilzen, deren Phytochrome BV als Chromophor verwenden, wurden die Enzyme zur Umwandlung von Biliverdin in PCB und PΦB nicht gefunden. Das Enzym Hämoxygenase, das die Umwandlung von Häm in Biliverdin katalysiert, konnte in diesen Organismen nachgewiesen werden (Bhoo et al., 2001).

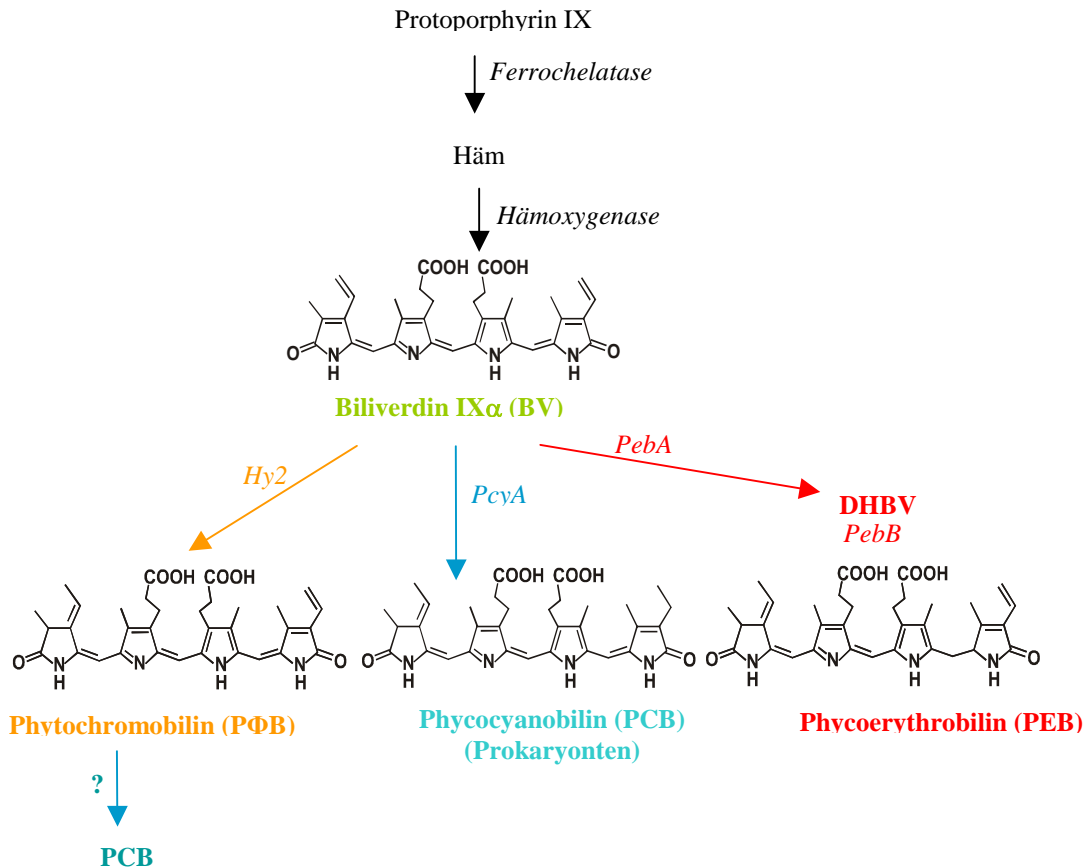


Abbildung 4: Tetrapyrrolvorstufen der Phytochrom- und Phycobiliproteinchromophore von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien nach Frankenberg *et al.* (2001). Biliverdin steht als Vorläufer und als natürlicher Chromophor für viele verschiedene Bakteriophytochrome aus Proteobakterien. Abkürzungen: HY2, Phytochromobilin-Synthase oder 3Z-Phytochromobilin-Ferredoxin-Oxidoreductase; PcyA, 3Z-Phycocyanobilin-Ferredoxin-Oxidoreductase; PebA,15,16-Dihydrobiliverdin-Ferredoxin-Oxidoreductase; PebB, 3Z Phycoerythrobilin-Ferredoxin-Oxidoreductase.

1.7.2. Pflanzliche Phytochrome

Phytochrome sind die am besten charakterisierte Gruppe pflanzlicher Photorezeptoren. Genetische und physiologische Studien haben gezeigt, dass Phytochrome an der Regulation verschiedener Bereiche der pflanzlichen Entwicklung und des Wachstums beteiligt sind. Dazu gehören die Regulation der Samenkeimung, die Keimlings-Deetiolierung, Wahrnehmung von Nachbarpflanzen und die Blühinduktion. In jeder Pflanze kommen mehrere Phytochrome vor, bei *Arabidopsis* sind es fünf (PhyA - PhyE) (Sharrock und Quail, 1989). Die funktionellen Unterschiede innerhalb der Familie von Photorezeptoren bewirken eine deutliche Sensitivität der Pflanzen gegenüber unterschiedlichen Lichtbedingungen. Phytochrome werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Lichtstabilität in zwei Typen klassifiziert. Die photolabilen TypI-Phytochrome

werden im Licht schnell abgebaut und die photostabilen TypII-Phytochrome sind im Licht relativ stabil. Das lichtlabile *Arabidopsis* PhyA ist ein TypI-Rezeptor. Es wird in Keimlingen, die im Dunkeln wachsen, akkumuliert. Es reguliert die Genexpression und Samenkeimung unter Schwachlichtbedingungen, bzw. in einer Umgebung mit einem hohem Dunkelrotlicht-Anteil (Casal et al., 1997). Kommen die Keimlinge ans Licht wird PhyA abgebaut (Nagy und Schäfer, 2002). Die anderen *Arabidopsis* Rezeptoren (PhyB - PhyE) sind TypII-Phytochrome und im Licht stabil (Sharrock and Clack, 2002).

Phytochrome sind Homodimere in Lösung. Jede Untereinheit enthält einen linearen Tetrapyrrol (3E)-phytochromobilin (PΦB) als Chromophor (Rüdiger und Thümmler, 1994). Das Phytochromprotein enthält zwei unterschiedliche Domänen: Die aminoterminalen photosensorische Domäne (Inputdomäne) und die regulatorische Outputdomäne, die bei der Dimerisierung und Aktivierung der Signaltransduktion beteiligt ist (Quail, 1997; Wagner et al., 1996). Während die photosensorischen Domänen verschiedener Organismen bis zu mindestens 50% Sequenzhomologie besitzen (Montgomery und Lagarias, 2002), ist die regulatorische Domäne weniger stark konserviert. Die Inputdomäne dient der Lichtperzeption und besitzt die Bilinlyaseaktivität, die für die autokatalytische Bindung des Chromophors an das Apoprotein notwendig ist (Lagarias und Lagarias, 1989). Sie besteht aus vier Subdomänen, die N-terminale P1-Domäne, eine PAS (Per-Arnt-Sim)-verwandte P2-Domäne (PLD), die Bilin-bindende P3 Domäne, auch GAF-Domäne genannt und die P4 Domäne, die auch als PHY-Domäne bezeichnet wird (Montgomery und Lagarias, 2002). Die GAF-Domäne oder auch Bilin Lyase Domäne (BLD) enthält einen konservierten Cysteinrest, der eine kovalente Bindung mit dem A-Ring des Chromophors ausbildet und die Bilinligationsreaktion katalysiert (Wu und Lagarias, 2000). Der Cysteinrest in der GAF-Domäne (Cystein 322 bei Haferphytochrom) ist in allen pflanzlichen und in manchen cyanobakteriellen Photorezeptoren wie Cph1 und CphA konserviert (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 2002). Andere cyanobakterielle Phytochrome und die Phytochrome von allen anderen Bakterien und Pilzen besitzen keinen Cysteinrest an der entsprechenden Position in der GAF-Domäne (Jorissen et al., 2002; Davis et al., 1999; Lamparter et al., 2002; Giraud et al., 2002). Die PHY-Domäne ist für die spektrale Integrität und die Stabilisierung der Pfr-Form von PhyB verantwortlich. Sie ist zwar nicht für die Signaltransduktion erforderlich, hat aber einen positiven Einfluss auf die Signalleitung (Oka et al., 2004). Die C-terminale Region eukaryotischer Phytochrome enthält zwei Subdomänen, die beide für die Signaltransduktion wichtig sind: Ein PAS-Modul und ein *His-kinase-like*-Modul (Histidinkinase-verwandte Domäne). Es wird

vermutet, dass das PAS-Modul eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen spielt und die Bindestelle für noch uncharakterisierte Liganden ist (Montgomery und Lagarias, 2002). Der PAS-Modul besteht aus zwei PAS-Subdomänen. Wie in Chen et al. (2003) gezeigt werden konnte, sind beide Subdomänen für die Integrität des Kern-Lokalisations-Signals von PhyB verantwortlich. Die Untersuchungen führten ebenfalls zu der Erkenntnis, dass die Kern-Lokalisationsaktivität (NLS) durch eine lichtabhängige Interaktion der N-terminalen Bilin Lyase Domäne (BLD) und PHY-Domäne von PhyB mit der PLD gesteuert wird. In der Pr-Form wird die NLS in der PLD durch eine direkte Interaktion mit der BLD und PHY-Subdomäne unterdrückt. Die Photokonversion in die Pfr-Form bewirkt strukturelle Veränderungen in der BLD und PHY-Domäne, die eine geringere Interaktion mit der PLD zur Folge haben, was wiederum zur Aktivierung der NLS führt. Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass die C-terminale Domäne direkt für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Matsushita et al., 2003), haben Studien von Oka et al. (2004) gezeigt, dass ein N-terminales photosensorisches Fragment von PhyB als Licht-hypersensitiver Photorezeptor agiert, wenn es mit einem Kernlokalisierungssignal und β -Glucuronidase (GUS) fusioniert ist. Diese überraschenden Erkenntnisse zeigen, dass die C-terminale Domäne das Signal des Photorezeptors abschwächt, statt das Signal zu übertragen. Das Ende des C-Terminus von pflanzlichen Phytochromen ähnelt der Transmitter Domäne von Zwei-Komponenten-Histidinkinasen. Dieser *His-kinase like* Domäne fehlt das konservierte Histidin (Schneider-Poetsch et al., 1991). Nach Yeh und Lagarias (1998) sind eukaryotische Phytochrome Serin/ Threoninkinasen mit einer Histidinkinaseabstammung, die eine stärkere Phosphorylierung in der hellrot absorbierenden Form (Pfr) zeigen.

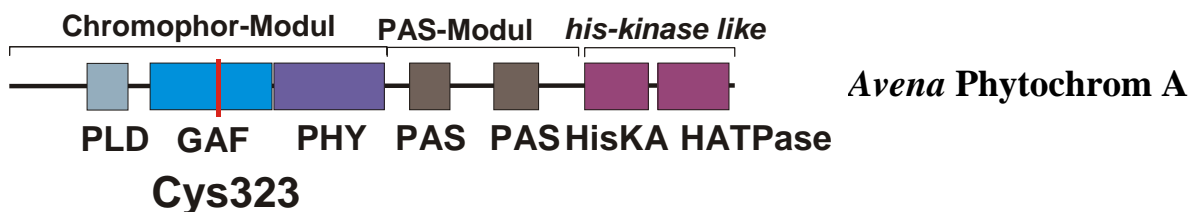


Abbildung 5: Phytochrom PhyA vom Hafer (*Avena*). Der Phytochromobilin Chromophor von Haferphytochrom ist kovalent an Cystein 323 gebunden.

1.7.2.1. Signalübertragung und interagierende Moleküle

Die meisten Phytochrom-gesteuerten Vorgänge während der Photomorphogenese resultieren aus Veränderungen in der Genexpression. Phytochrome aktivieren verschiedene Signalwege sowohl im Zytosol als auch im Zellkern (Chen et al., 2004; Schäfer and Bowler, 2002). Um die molekulare Wirkungsweise von Phytochrom besser zu verstehen, war es notwendig, die intramolekulare Lokalisierung des Photorezeptors als auch die Interaktion mit anderen Faktoren zu untersuchen. In verschiedenen Arbeiten konnte durch chimerische Fusion mit GUS (β -Glukuronidase) oder GFP (green fluorescent protein) gezeigt werden, dass Arabidopsis Phytochrom im Dunkeln im Zytoplasma lokalisiert ist und nach Lichtaktivierung in den Zellkern wandert (Sakamoto und Nagatani, 1996; Kirchner et al., 1999; Yamaguchi et al., 1999; Nagy und Schäfer, 2000; Kim et al., 2000; Gil et al., 2000, Nagatani, 2004), wo es sich zu „speckles“ zusammenlagert. Die Funktion dieser „speckles“ ist noch unbekannt. Die Konformationsveränderung von Pr zu Pfr ist für die Translokation erforderlich, was die funktionelle Bedeutung der Photokonversion hervorhebt. Es wurde gezeigt, dass die carboxyterminale Hälfte von Phytochrom Kernlokalisationsaktivität besitzt. Nach einem gegenwärtigen Modell unterdrückt die aminoternale Domäne die Kernlokalisation und hält das Phytochrom damit im Zytoplasma zurück. Nach Bestrahlung wird die Aktivität der aminoterminalen Domäne eingestellt, was konsequenterweise eine Lokalisation von Phytochrom in den Zellkern zur Folge hat (Nagatani, 2004). Nach Quail (2000) wirkt die aktive Form des Photorezeptors im Zellkern durch die Regulierung der Genexpression.

Mit Hilfe des *yeast two-hybrid systems* wurden drei Phytochrom interagierende Proteine entdeckt. Es handelt sich dabei um den Phytochrom Interagierenden Faktor 3 (PIF3) (Ni et al., 1998), ein Phytochrom Kinase Substrat (PKS1) (Frankhauser et al., 1999) und eine Nukleosid Diphosphat Kinase 2 (NDPK2) (Choi et al., 1999). PKS1 ist das am besten charakterisierte Phytochrom-interagierende Protein im Cytoplasma (Frankhauser et al., 1999). PKS1 interagiert mit der HKRD von sowohl PhyA als auch PhyB und kann durch Hafer PhyA *in vitro* phosphoryliert werden. Die Rolle der Phosphorylierung bei der Signaltransduktion *in vivo* und die Rolle von PKS1 sind noch ungeklärt. Der Interaktionspartner NDPK2 (=NDPKIa), wurde in Zytosol und Nukleus lokalisiert (Choi et al., 1999; Zimmermann et al., 1999). Die NDPK2 Aktivität steigt, wenn das Peptid mit der Pfr-Form von PhyA interagiert (Hamada et al., 1996; Tanaka et al., 1998; Ogura et al., 1999). Die Funktion von NDPK2 in Pflanzen ist ebenfalls noch

unbekannt. Das Protein ist bei anderen Organismen in verschiedene Entwicklungsprozesse involviert (Tanaka et al., 1998; Choi et al., 1999). Im Moment ist am meisten über die Signalleitung im Zellkern bekannt. Wenn aktiviertes Phytochrom in den Zellkern gelangt, bindet es verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie den bHLH (basic helix-loop-helix) – Faktor PIF3 (Quail, 2002). Dieser Faktor bindet G-box Elemente in der Promotorregion lichtregulierter Gene und stellt damit eine direkte Verbindung zwischen Phytochrom und der Transkriptionsregulation dar. Ein anderer bHLH Faktor ist HFR1. Es wurde gezeigt, dass HFR1 als positiver Regulator von Dunkelrot- und Blaulichtantworten direkt in den Lichtsignalweg involviert ist (Duek und Fankhauser, 2003). Eine weitere Form der Phytochromsignalleitung erfolgt über den Abbau von Proteinen, die die Photomorphogenese induzieren. Hierbei sind COP1, COP10 und COP9 beteiligt. COP1 besitzt eine E3 Ubiquitin-Ligase Aktivität, die COP1 selbst und andere interagierende Proteine, wie HY5 und LAF1 ubiquitinylieren kann. Dadurch erhalten diese Proteine einen „tag“, der ihre Erkennung und ihren Abbau durch CSN (COP9 *signalosome complex*) ermöglicht (Osterlund et al., 2002; Seo et al., 2003; Saijo et al., 2003; Holm et al., 2002). Es wird angenommen, dass Phytochrom die lichtregulierte Genexpression während der Photomorphogenese durch Inhibition der Proteolyse von positiv regulierenden Transkriptionsfaktoren wie HY5 unterstützt. Im Dunkeln befindet sich COP1 im Zellkern, wo es die Ubiquitinylierung dieser Proteine und damit ihren Abbau durch CSN bewirkt. Durch Belichtung wird die COP1-Konzentration im Zellkern vermindert, wodurch LAF1 und HY5 akkumulieren und damit die Photomorphogenese induzieren können (Subramanian et al., 2004). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass COP1 für die Akkumulation von PIF3 im Dunkeln verantwortlich ist (Bauer et al., 2003). COP1 reguliert nicht nur den Abbau oder die Akkumulation verschiedener Transkriptionsfaktoren im Dunkeln, sondern auch den Photorezeptorgehalt im Licht. Seo et al. (2004) konnte zeigen, dass COP1 für den Abbau von PhyA unter kontinuierlichem Rotlicht notwendig ist. Ein weiterer Negativregulator im Phytochromsignalweg ist DET1. DET1 interagiert möglicherweise mit dem aminoterminalen Teil des Histones H2B (Benvenuto et al., 2002). Offenbar reguliert DET1 die lichtinduzierte Genexpression durch Modulierung der Chromatinarchitektur. Die durch Phytochrome aktivierten Signalwege sind sehr komplex und miteinander verbunden. Einige dieser Signalwege involvieren Cry1 und Cry2, für die unter bestimmten Lichtbedingungen eine direkte Interaktion mit PhyA und PhyB gezeigt werden konnte (Ahmad et al., 1998; Mas et al., 2000). Die von Phytochromen ausgelösten Signalwege sind häufig mit denen anderer Faktoren (z.B. Hormone, Temperatur)

gekoppelt (Franklin und Whitelam, 2004). Die Vernetzung multipler Signale durch diese komplexen Prozesse bewirkt eine extrem gute Wahrnehmung von Umweltveränderungen durch die Pflanze.

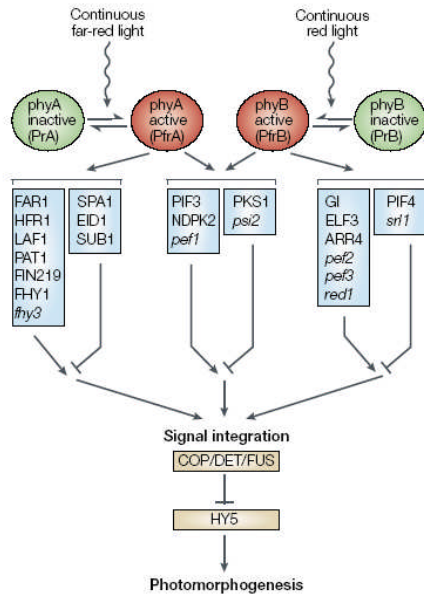


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema des PhyA und PhyB Signalweges, der aus genetischen und molekularbiologischen Studien abgeleitet wurde (Quail, 2002). Die früheren Signalwegkomponenten konvergieren bei der COP/DET/FUS-Gruppe oder oberhalb davon. Die COP/DET/FUS-Gruppe reguliert HY5 oder nachfolgende Komponenten negativ. ARR4, *Arabidopsis* Response Regulator 4; COP, Constitutively Photomorphogenic; DET, De-etiolated; EID1, Empfindlicher Im Dunkelroten Licht 1; ELF3, Early Flowering 3; FAR1, Far-Red Impaired Response 1; FHY1, Far-Red Elongated Hypocotyl 1; FIN219, Far-Red Insensitive 219; FUS, Fusca; GI, Gigantea; HFR1, Long Hypocotyl in Far-Red; HY5, Long Hypocotyl 5; LAF1, Long After Far-Red Light 1; NDPK2, Nucleoside Diphosphat Kinase 2; PAT1, Pythochrome A Signal Transduction 1; PIF3–4, Phytochrome- Interacting Factor 3–4; PKS1, Phytochrome Kinase Substrate 1; SPA1, Suppressor oF PhyA 1; SUB1, Short Under Blue Light 1; *fhy3*, far-red elongated hypocotyl 3; *pef1–3*, phytochrome signalling early flowering 1–3; *psi2*, phytochrome signalling 2; *red1*, red elongated 1; *srl1*, short in red light 1.

1.7.3. Bakterielle Phytochrome

Die typischen bakteriellen Phytochrome (BphPs) sind den pflanzlichen Phytochromen ähnlich. Die cyanobakteriellen Phytochrome Cph1 (*Synechocystis* sp. PCC6803), AphA, AphB (*Anabaena* sp. PCC7120), CphA und CphB (*Calothrix* sp. PCC7601), verschiedene bakterielle Phytochrome BphP (*Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc), Agp1 und Agp2 (*Agrobacterium tumefaciens*) bilden eine Gruppe von prokaryotischen Photorezeptoren, welche durch eine konservierte N-Terminus-Domäne, sowie ein C-terminales Histidinkinase-Modul

charakterisiert sind. Die N-terminale Domäne enthält wie die pflanzlichen Phytochrome eine GAF- und eine PHY-Domäne. Die PHY-Domäne ist für die korrekte Bildung und Stabilisierung der Pfr-Form notwendig, wie anhand der Chromophor-Binde-Domäne von *Deinococcus radiodurans* Phytochrom gezeigt werden konnte (Wagner et al., 2005). Am N-Terminus fehlt gegenüber pflanzlichen Phytochromen ein Serin-reiches Modul. Das könnte die Blauverschiebung vom Pfr-Spektrum bei PΦB-Addukten erklären (Montgomery und Lagarias, 2002). Nicht alle bakteriellen Phytochrome besitzen eine Histidinkinase Domäne. Das *BrBphP* aus *Bradyrhizobium* z.B. besitzt eine PAS-ähnliche Domäne (PAC). Diese PAC vermittelt wahrscheinlich eine lichtregulierte Protein/Protein-Interaktion (Giraud et al., 2002). Manche Phytochrome wie Cph1 (Lamparter et al., 1997) oder CphA (Jorissen et al., 2002b) haben wie die pflanzlichen Phytochrome das Chromophor-bindende Cystein in der GAF-Domäne. Vielen bakteriellen Phytochromen fehlt jedoch dieses konservierte Cystein. Dazu gehören CphB (Jorissen et al., 2002b), alle Phytochrome von Purpurbakterien und nicht photosynthetischen Eubakterien (BphP) (Davis et al., 1999; Bhoo et al., 2001) und die agrobakteriellen Phytochrome Agp1 und Agp2 (Lamparter et al., 2002). Agp1, Agp2, CphB, *DrBphP*, *PaBphP* etc. besitzen ein konserviertes Cystein am N-Terminus, welches die Chromophorbindestelle ist (Lamparter et al., 2002). Im Vergleich zu den Phytochromen mit der Chromophorbindestelle in der GAF-Domäne, haben Agp1 und auch andere bakterielle Phytochrome wie *DrBphP* und CphB ein nach Rot verschobenes Absorptionsmaximum (685 nm). Das Maximum von BV-Agp1 liegt sogar bei 702 nm. Zwei Phytochrome aus dem Pilz *Neurospora crassa*, (*NcBph1/2*), passen zu dieser Gruppe, wobei zusätzlich eine C-terminale Responsregulator Domäne zu erkennen ist.

1.7.3.1. Cyanobakterielle Phytochrome

Cyanobakterielle Phytochrome verwenden PCB (Hübschmann et al., 2001a) oder wie kürzlich gezeigt BV (Quest et al., 2004) als natürlichen Chromophor.

Als erstes prokaryotisches Phytochrom wurde Cph1 (*cyanobacterial phytochrome 1*) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 exprimiert und charakterisiert (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997). Dieses etwa 85 kDa große Apoprotein bindet den Chromophor PCB autokatalytisch an das Cys 259 und führt die für pflanzliche Phytochrome typische Hellrot/Dunkelrot Photokonversion durch. Nach Lamparter et al. (1997); Yeh et al. (1997) und Lamparter et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass Cph1 außer mit PCB auch kovalent mit PΦB und PEB *in vitro* assembliert. Im

Unterschied zu pflanzlichen Phytochromen kann Cph1 sehr gut in *E.coli* exprimiert werden, was spätere biochemische und biophysikalische Studien erleichtert hat (Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997; Park et al., 2000c; Lamparter et al., 2001; Gambetta und Lagarias, 2001; Landgraf et al., 2001; Hübschmann et al., 2001a). Cph1 wurde und wird von mehreren Gruppen als Modellphytochrom verwendet. Mit Cph1 wurden Signaltransduktion (Yeh et al., 1997; García et al., 2000), Photoisomerisierung (Heyne et al., 2002), Assemblierungs-Reaktionen mit verschiedenen Chromophoren (Borucki et al., 2003), Dimerisierung (Otto et al., 2003, Esteban et al., 2005, Strauss et al., 2005), Chromophoränderungen während der Photokonversion (van Thor et al., 2001) und Konformationsänderungen (Remberg et al., 1997) untersucht. Cph1 ist das erste Phytochrom, in dem eine Kinase- und Phosphotransferaseaktivität nachgewiesen wurden (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001). Analysen von Cph1 mit verschiedenen spektroskopischen Methoden zeigen, dass die physikochemischen Eigenschaften des Cph1 denen der Phytochrome aus höheren Pflanzen, wie z.B. PhyA aus Hafer ähneln (Remberg et al., 1997; Sineshchekov et al., 1998a; Foerstendorf et al., 2000; Sineshchekov et al., 2002b; Heyne et al., 2002; Borucki et al., 2003.). Die cyanobakteriellen Phytochrome sind typischerweise nach *in vitro* Phosphorylierung stärker in der Pr-Form phosphoryliert (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Hübschmann et al., 2001b). Die Pr-Form von Cph1-PCB phosphoryliert Rcp1 *in vitro* (Yeh et al., 1997), während die Pfr-Form kein Phosphat auf den Responsregulator überträgt. Die Regulation der *cph1-rcp1*-mRNA Expression zeigt eine Rolle des Cph1 bei der Kontrolle von Prozessen, die für die Anpassung im Licht-Dunkel- bzw. Dunkel-Licht-Übergang nötig sind (García et al., 2000).

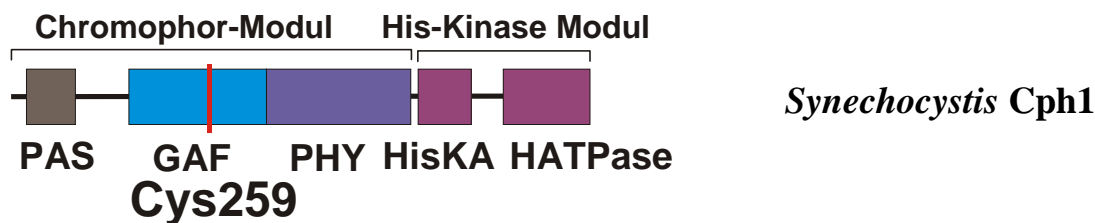


Abbildung 7: Phytochrom Cph1 des Cyanobakteriums *Synechocystis*. In *Synechocystis* Cph1 ist Phycoyanobilin kovalent an Cystein 259 gebunden.

Neben Cph1 kommt in *Synechocystis* ein zweites Phytochrom vor, das als Cph2 bezeichnet wird (Park et al., 2000b; Wu und Lagarias, 2000). Cph2 und den cyanobakteriellen Phytochromen Cph2a, Cph2b und Cph2c aus *Nostoc punctiforme* fehlt der erste Teil der pflanzlichen N-Terminus-Domäne. Sie besitzen mehrere GAF-Domänen. Die GAF-Domäne am N-Terminus hat

ein hochkonserviertes Cystein und ähnelt der GAF-Domäne aus Pflanzen und Cph1 (Montgomery und Lagarias, 2002). Manche der anderen Cystein-enthaltenden GAF-Domänen können *in vitro* Biline kovalent binden. Die Addukte sind jedoch nicht photoaktiv (Wu und Lagarias, 2000). Cph2 enthält eine Chromophor-Binde-Domäne bei dem Cys 129 und eine andere bei dem Cys 1022, von denen Cys 129 die Biline *in vitro* bindet (Park et al., 2000b). Beide Chromophorbindungsdomänen zeigen Bilinlyaseaktivität, haben aber nur ein Hellrot/Dunkelrot photoreversibles Addukt. Mit Ausnahme von Cph2 von *Synechocystis sp.* PCC6803 besitzen alle Phytochrome der Cph2 Familie eine Histidinkinase-Domäne.

Die anderen cyanobakteriellen *phytochrome-like proteins* wie RcaE, PlpA, PisJ1 und CikA enthalten GAF-, Histidinkinase- und/oder Responsregulator-Domänen. In *Calothrix sp.* PCC7601 wurden zwei Gene *cphA* (Locus AF309559) und *cphB* (LocusAAL76161), die für zwei Phytochrome CphA und CphB kodieren, gefunden (Jorissen et al., 2002b). CphA und CphB sind Repräsentanten bakterieller Phytochrome, die unterschiedliche Chromophore binden (Quest et al., 2004). CphA bindet PCB kovalent an ein Chromophor bindendes Cystein in der GAF-Domäne. CphB ist ein typischer Vertreter der B-Typ Bphs. Diese Gruppe bakterieller Phytochrome kann nicht nur PCB, sondern auch BV einbauen. BV wird kovalent an ein Cystein in der PLD Domäne gebunden. Als weitere cyanobakterielle Phytochrome sind AphA und AphB aus *Anabena sp.* PCC7120 bekannt (Wu und Lagarias, 2000; Montgomery und Lagarias, 2002).

Vor und parallel zu der Entdeckung der „echten“ prokaryotischen Phytochrome wurden andere Proteine entdeckt, welche partielle Ähnlichkeit mit Phytochromen aufweisen. Diese Phytochrom-ähnlichen Proteine (*phytochrome-related proteins* oder *phytochrome-like proteins*) genannt, wurden nur in Cyanobakterien gefunden. Zu dieser Gruppe gehören RcaE aus *Fremyella diplosiphon* (Kehoe und Grossman, 1996), PlpA (Wilde et al., 1997), PisJ1 (Yoshihara et al., 2000) aus *Synechocystis sp.* PCC6803 und CikA aus *Synechococcus elongatus* (Schmitz et al., 2000). Diese Photorezeptoren enthalten alle eine GAF-Domäne, Histidinkinase- und/ oder Responsregulator-Domäne, sind ansonsten aber sehr unterschiedlich aufgebaut.

1.7.3.2. Andere bakterielle Phytochrome

Als weitere prokaryotische Phytochrome wurden zunächst *DrBphP* aus *Deinococcus radiodurans* und *PaBphP* aus *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt (Davis et al., 1999). *DrBphP* und *PaBphP* enthalten eine Histidinkinase-Domäne. Sie wurden, wie die cyanobakteriellen Phytochrome, als durch Licht regulierte Histidinkinasen beschrieben und ähneln anderen „Zwei-Komponenten

Signalsystem“ Sensoren (West und Stock, 2001). *DrBphP*, *PaBphP* und andere Bakteriophytochromgene gehören zu einem Operon, das ein Hämoxygenase-Gen für die Synthese von Biliverdin, sowie ein Responsregulatorgen enthält. *DrBphP* bindet kovalent verschiedene Biline wie PCB, PΦB (Davis et al., 1999), PEB oder BV, welches der natürliche Chromophor ist (Bhoo et al., 2001). Wie bei *DrBphP* ist BV auch der natürliche Chromophor der proteobakteriellen Phytochrome (Bhoo et al., 2001; Lamparter et al., 2002). In *Agrobacterium tumefaciens* gibt es zwei Phytochrome Agp1 und Agp2, die in Kapitel 1.7.3.3. ausführlicher beschrieben sind.

Es wurden ebenfalls Phytochrome unter anderem in *Rhodospseudomonas palustris* (RpBphP), *Pseudomonas putida* (BphP2) und *Rhizobium leguminosarium* (R/BphP) gefunden. Die Phytochrome BrBphP und RpBphP enthalten nach früheren Publikationen keine Histidinkinase-Domäne am C-Terminus, aber hochkonservierte Regionen einer PAS-Domäne (Giraud et al., 2002). Die Phytochrome BphP2, R/BphP und RpBphP enthalten ähnlich wie Agp2 eine Responsregulatordomäne am C-Terminus (Giraud et al., 2002). In *Rhodospseudomonas palustris* gibt es fünf weitere Phytochrome, welche eine Histidinkinase enthalten. Die Funktion der meisten bakteriellen Phytochrome ist noch nicht bekannt. Bei *Bradyrhizobium* ORS278 und *Rhodospseudomonas* ist die Bildung des photosynthetischen Apparates unter der Kontrolle von Bakteriophytochrom, welches als Pr-Form dessen Synthese aktiviert (Giraud et al., 2002).

1.7.3.3. *Agrobacterium*-Phytochrome Agp1 und Agp2

Das Genom von *Agrobacterium tumefaciens* wurde von Goodner et al. (2001) und von Wood et al. (2001) veröffentlicht. Es enthält zwei Gene, die für Phytochrom-homologe Proteine kodieren. Diese Proteine werden als Agp1 und Agp2 bezeichnet. Die Frage, welche Bedeutung ein Photorezeptor in einem solchen landwirtschaftlich und genetisch bedeutsamen Bakterium besitzt, war der Grund für umfangreiche biochemische Analysen der Eigenschaften von rekombinantem *Agrobacterium* Phytochrom. Nach Zambre et al. (2003) wird der Gentransfer von *Agrobacterium* zu *Arabidopsis thaliana* und *Phaseolus acutifolius* durch Licht gefördert. Von Oberpichler et al. (2005) wurden Phytochrom Einzel- und Doppel- „knockout“ Mutanten hergestellt und bezüglich der Wachstumsrate und der Virulenzaktivität charakterisiert. In Flüssigkultur zeigten die Doppelmutanten eine reduzierte Wachstumsrate, während die Einzelmutanten sich bezüglich des Wachstums nicht signifikant vom Wildtyp unterschieden. Die Virulenzfähigkeit der Bakterien wurde durch das Ausschalten der Phytochrome nicht beeinflusst. Alle Phytochrom Mutanten von

Agrobacterium waren sowohl im Licht als auch im Dunkeln in der Lage, an Karottenscheiben und Blättern der *Kalanchoe* Pflanze Tumore zu induzieren. Neben diesen ersten physiologischen Studien wurden auch Untersuchungen zu den spektralen Eigenschaften von Agp1 und Agp2 im Rohextrakt durchgeführt. Die Differenzspektren der nativen Holoproteine ähnelten jenen von rekombinantem BV-Agp1 und BV-Agp2. Die Rückkonversion von Holo-Agp1 und -Agp2 verläuft von Pfr zu Pr bzw. von Pr zu Pfr. Trotz ähnlicher spektraler Eigenschaften von natürlichem und rekombinantem *Agrobacterium tumefaciens* Phytochrom konnten signifikante Unterschiede, besonders zwischen natürlichem und rekombinatem Agp2 gefunden werden. Es zeigte sich, dass die spektralen Eigenschaften von Agp2 durch unbekannte Komponenten im Extrakt beeinflusst werden (Oberpichler et al., 2005).

Es wurden in den letzten Jahren zahlreiche Untersuchungen zur Struktur von Agp1 durchgeführt (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003). Agp1 wird als durch Licht regulierte Histidinkinase definiert. Es hat eine Domänenanordnung, die für bakterielle Phytochrome typisch ist (Lamparter et al, 2004), ähnlich wie Cph1 von *Synechocystis sp.* (Lamparter et al, 1997) oder BphP von *Deinococcus radiodurans*. Es enthält eine GAF-Domäne, eine PHY-Domäne, ein His-Kinase-Modul und eine PLD (*PAS-like*)-Domäne. Die Letztere erstreckt sich bei Agp1 N-terminal von Pro 24 bis Trp 82 und beginnt damit kurz hinter der Chromphorbindestelle, die sich am Cys 20 befindet (Lamparter et al, 2004) Die PLD-Domäne scheint ein Teil der Chromophortasche zu sein und ist zusammen mit der GAF-Domäne für die Lyase-Funktion, Chromophorinteraktion und Photokonversion verantwortlich. Agp1 wird *in vitro* wie Cph1 stärker in der Pr-Form phosphoryliert (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003).

Agp2 besitzt eine PLD-, GAF- und eine PHY-Domäne und funktioniert ebenfalls als Histidinkinase, verwendet jedoch ein individuelles Zweikomponenten Kinasemotiv, das nach Photokonversion zu Pr reprimiert wird. Die His-Kinase besitzt wenig Homologie zu bekannten Histidinkinasen. Sie hat ein konserviertes Histidin (His-523) in einem H-box-ähnlichen Motiv. Dieses ist für den Phosphortransfer wichtig. Am Ende der C-terminalen Domäne von Agp2 befindet sich ein Responsregulator (Karniol und Vierstra, 2003). Die Kinaseaktivität von Agp2 ist in der Pfr-Form größer als in der Pr-Form. Die Tatsache, dass beide Phytochrome als Apoprotein eine höhere Autophosphorylierungsaktivität besitzen als die Holophytochrome, weist darauf hin, dass der Chromophor die Kinaseaktivität unterdrückt (Karniol und Vierstra, 2003).

Nach Lamparter et al. (2003) binden Agp1 und Agp2 Biliverdin (BV) als Chromophor. Die kovalente Chromophor-Cys 20-Bindung bei Agp1 wird über die Ring A - Vinylseitenkette im BV

hergestellt (Lamparter et al., 2004). Diese bildet eine Thioether - Bindung mit dem Schwefel des Cysteinrests. Im Gegensatz dazu erfolgt die Cystein-Chromophorbinding bei PΦB und PCB in Pflanzen (Rüdiger and Thümmler, 1994) und Cyanobakterien (Lamparter et al, 1997; Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001) über eine Ring A – Ethylidenseitenkette .

Bei dem Einbau von BV in das Agp1-Apoprotein verschiebt sich das Maximum der roten Absorptionsbande des Chromophors von 680 nm zu etwa 700 nm. Nach Rotlichtbestrahlung zeigte das Addukt die für Phytochrome typische Photokonversion von Pr zu Pfr, welches ein Absorptionsmaximum bei 755 nm hat. (Lamparter et al., 2002). Die Pfr-Form von Agp1 ist instabil und konvertiert im Dunkeln langsam zurück zu Pr (Lamparter et al., 2002).

Agp2 assembliert ebenfalls mit BV, wobei die kovalente Bindung mit dem Cys 13 erfolgt. Bei der Assemblierung im Dunkeln wird zunächst eine Pr-Form mit einem Absorptionsmaximum bei 698 nm gebildet, die jedoch sofort nichtphotochemisch zu Pfr umgewandelt wird, so dass nach wenigen Stunden HoloAgp2 komplett in der Pfr-Form vorliegt. Die Agp2 Pfr-Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei 755 nm (Karniol und Vierstra, 2003).

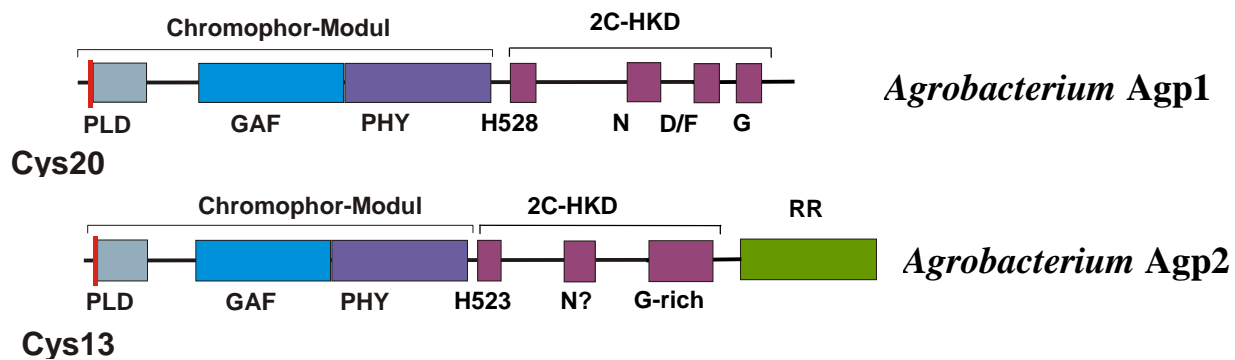


Abbildung 8: Phytochrome Agp1 und Agp2 des α -Proteobakteriums *Agrobacterium tumefaciens*. Der Chromophor Biliverdin ist beim Agp1 am Cys20 , beim Agp2 am Cys13 gebunden. Die Zwei-Komponenten Histidin Kinase Domäne (2C-HKD) besitzt H-, N-, D/F und G-„Boxes“ bei Agp1 und die H-„box“, möglicherweise eine N-„box“ und eine Glycin-reiche Domäne bei Agp2

1.7.4. Kristallstruktur von Phytochrom

In den letzten Jahren wurde zahlreiche Versuche unternommen, die dreidimensionale Struktur von Phytochrom durch Röntgenstrukturanalyse zu bestimmen. Kürzlich gelang es Wagner et al. (2005), die dreidimensionale Struktur der Chromophor-bindenden Domäne (CBD) von *Deinococcus radiodurans* Phytochrom aufzuklären. Das Konstrukt umfasst die ersten 312 N-

terminalen Aminosäuren des Phytochrom Photorezeptors (DrBphP), die die chromophorbindende Domäne (DrCBD) dieses Photorezeptors bilden und enthält somit die PAS- und GAF-Domäne. Die Kristallisation der CBD erfolgte nach Assemblierung mit Biliverdin und im Pr-Grundzustand. Dieses Konstrukt stellt ein gut lösliches und spektral aktives Fragment von *Deinococcus* Phytochrom dar, das ein normales Pr-Spektrum bildet. Die PAS-Domäne bildet 5 antiparallele β -Faltblätter, die auf einer Seite durch 3 α -Helices flankiert werden. Die Aminosäuren der GAF-Domäne bilden sechs antiparallele β -Faltblätter, die von einem Bündel aus drei und einem Bündel aus zwei α -Helices flankiert werden. Eine überraschende Entdeckung der Kristallstruktur von DrCBD war ein Kleeblatt Knoten. Dieser wird dadurch geformt, dass die 35 N-terminalen Aminosäuren oberhalb der PAS-Domäne eine Schleife durchlaufen, die durch eine Verbindung zwischen dem β -Faltblatt 9 und der α -Helix 7 der GAF-Domäne gebildet wird. Das DrCBD Modell bestätigt Cys 24 als Chromophorbindesstelle und zeigt, dass der Chromophor eine *5Zsyn* *10Zsyn* und *15Zanti* Konfiguration besitzt.

Es zeigte sich, dass die Aminosäuren, die in Kontakt zum Chromophor stehen und die PAS- und GAF-Domänen bilden hoch konserviert sind (Karniol et al, 2005).

oder zur Ausbildung des Kleeblattknotens beitragen. Spezifische Beispiele sind das Asp-Ile-Pro Motiv an der Bilin bindenden Tasche, polare Reste, die mit den beiden Biliverdin Propionsäure Gruppen interagieren (Arg 254, Ser 272 und Ser 274), sperrige hydrophobe Reste, die den Raum um den D-Ring umgeben (Phe 198, Phe203, Tyr 176 und Tyr 263) und Reste, die den hydrophoben Kern des Knotens bilden. Daher kann man vermuten, dass die Formierung des Knotens eine Eigenschaft aller Phytochrome ist. Vermutlich trägt der Knoten zur Stabilisierung des Kontaktes zwischen der PAS- und der GAF-Domäne bei und reduziert die Beweglichkeit des Proteins, was der Vermeidung unerwünschter Energieverluste auf Grund von Schwingungen und größeren Domänenbewegungen nach Photoisomerisierung dient. Die Einschränkung der Beweglichkeit der N-terminalen Domäne mag ebenfalls zu einer korrekten Orientierung von Cys 24 für eine effiziente Konjugation mit Biliverdin beitragen.

1.7.5. Strukturelle Veränderungen während der Photokonversion

Der erste wichtige Schritt für die Übertragung eines Lichtsignals in eine Signalkaskade und Regulation auf genetischer Ebene ist die Photokonversion. Nach Rüdiger et al. (1983) ist bekannt, dass bei Pflanzenphytochromen die Pr-/Pfr-Umwandlung mit einer *Z* zu *E* Isomerisierung zwischen den Ringen C und D des Chromophors beginnt. Aufgrund kinetischer

Studien nimmt man an, dass diese Isomerisierung den ersten und den einzigen lichtabhängigen Schritt der Photokonversion darstellt. Nach der Photoisomerisierung des Chromophors entstehen verschiedene spektrale Intermediate. Mit Hilfe der Resonanz Raman Spektroskopie und der IR Spektroskopie konnten wichtige Einblicke in lichtinduzierte strukturelle Veränderungen des Chromophors gewonnen werden. Die spektralen Intermediate während der Umwandlung von Pr zu Pfr wurden für das *Avena sativa* Phytochrom von Eilfeld und Rüdiger, (1985) entdeckt und benannt. Die generellen strukturellen Änderungen des Chromophores während der Photokonversion sind für Cph1, Agp1 und PhyA vergleichbar. Nach Rotlichtbestrahlung entsteht als erstes Produkt des Photozyklus lumi-R, anschließend meta-R_A und als Vorgänger von Pfr meta-R_C (Abbildung 9). Für Agp1 wurde gezeigt, dass es während der Entstehung von meta-R_C zu einer Deprotonierung des Chromophors kommt. Bei der Bildung von Pfr wird der Chromophor wieder reprotoniert (Borucki et al., 2005).

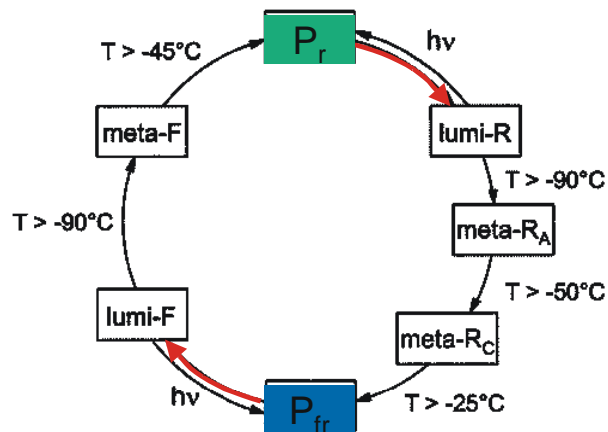


Abbildung 9: Photozyklus von Phytochrom etabliert für PhyA, Cph1 und Agp1 (Abbildung nach Eilfeld und Rüdiger, (1985)). Da Phytochrome typischerweise zwei thermostabile Formen, Pr und Pfr besitzen, müssen pro Photozyklus mindestens 2 Photonen absorbiert werden. Die spektralen Intermediate bei der Umwandlung von Pr zu Pfr werden als lumi-R, meta-R_A und meta-R_C bezeichnet.

Der Übergang von lumi-R zu den späteren Intermediaten ist mit Sicherheit durch weitere Veränderungen der Chromophor Stereochemie begleitet. Diese wurden in verschiedenen Arbeiten untersucht z.B. Falk (1989) Andel et al. (2000), Mroginski et al. (2004). Um diese Veränderungen besser zu verdeutlichen, soll im folgenden kurz die Struktur des Chromophor-Tetrapyrrols (Butler et al., 1959 und Siegelman et al., 1966) beschrieben werden. Die vier Pyrrol-Ringe des Chromophors sind miteinander über jeweils eine Kohlenstoffdoppel- und Kohlenstoff-

einzelbindung verknüpft. Vor und nach Bestrahlung des Chromophors nehmen die Doppel- und Einzelbindungen zwischen den Tetrapyrrolringen bestimmte Konfigurationen bzw. Konformationen ein, die in den letzten Jahren intensiv mit Methoden wie Resonanz Raman Spektroskopie (Mroginski et al., 2004) oder Kristallisation (Wagner et al., 2005) untersucht wurden.

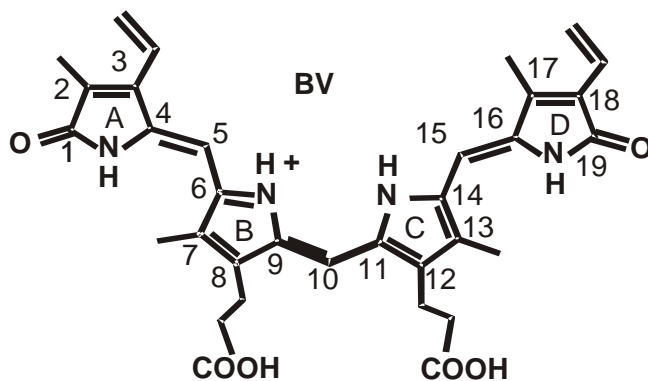


Abbildung 10: Struktur des Phytochrom Chromophors am Beispiel von Biliverdin. Die vier Ringe A, B, C und D des Tetrapyrrols sind durch Kohlenstoffeinz- und Doppelbindungen miteinander verknüpft. Die Kohlenstoffatome sind nummeriert.

Die C4=C5 und C9=C10 und C15=C16 Doppelbindungen von Biliverdin nehmen in der Pr-Form eine Z Konfiguration ein (Wagner et al, 2005). Während der Photokonversion kommt es ebenfalls zu Bewegungen um die exozyklischen Einzelbindungen. Prinzipiell kann jede Einzelbindung entweder eine *syn* oder eine *anti* Konformation einnehmen (Falk, 1989).

Die Konformation der Einzelbindungen in der Pr-, Pfr-Form und bei den verschiedenen Intermediaten wurde mit Schwingungsspektroskopie untersucht. Diese Ergebnisse waren bis jetzt jedoch noch nicht eindeutig und wurden unterschiedlich interpretiert. So wurde z.B. vermutet, dass die Pfr-Bildung von einer *syn/anti* Rotation um die C14-C15 Einzelbindung begleitet ist (Andel et al., 2000). Kürzliche Interpretationen von Resonanz Raman Spektren durch Dichtefunktionaltheorie-Rechnungen ließen vermuten, dass die C14-C15 Einzelbindung während des gesamten Photozyklus in der *anti* Konformation ist (Mroginski et al., 2004). Die Kristallstruktur von *Deinococcus* Phytochrom zeigte, dass die C5-C6 Einzelbindung in der Pr-Form in der *syn* Konformation ist (Wagner et al., 2005). Im Ergebnisteil 3.1 dieser Arbeit werden durch Untersuchungen mit arretierten Chromophoren weitere Aussagen zur Konformation der

C14-C15 bzw. C5-C6 Einzelbindung bzw der Konfiguration der C15=C16 Doppelbindung von BV in der Pr- und Pfr-Form getroffen.

Die Photoisomerisierung des Chromophors und seine anschließende Relaxation bewirken strukturelle Veränderungen des Proteins, die letztendlich der Auslöser für die Signaltransduktion sind. Durch verschiedene Protein-analytische Untersuchungen, wie z.B. Gelfiltration und Limitierte Proteolyse konnte eine Veränderung der Proteinkonformation nach Umwandlung von Pr zu Pfr nachgewiesen werden (Esteban et al. (2004); Lagarias und Mercurio (1985), Jones et al. (1985), Grimm et al. (1988), Park et al. (2000)).

Eine Art der strukturellen Veränderung betrifft die Stärke der Interaktion zwischen zwei Phytochromuntereinheiten. Dies soll am Beispiel Cph1 veranschaulicht werden. Während der Gelfiltration eluiert das Cph1 *full length* Protein als Dimer. Wie in Esteban et al. (2004) gezeigt wurde, eluiert ein N-terminales 58 kDa Fragment von Cph1 in der Pr-Form als Monomer, während dieses Fragment in der Pfr-Form als Dimer eluiert. Das ist ein Hinweis darauf, dass ebenfalls eine konformationsspezifische Dimerisierung in der Chromophorbindenden Domäne stattfindet. Darüber hinaus zeigte Esteban et al. (2004), dass die Pfr-Form von Cph1 nach Limitierter Proteolyse mit Trypsin ein anderes Proteolyse-Muster als die Pr-Form aufweist, was ebenfalls bedeutet, dass sich die Konformation des Proteins nach Photokonversion verändert.

In einer Arbeit von Strauss et al. (2005) wurde mit Hilfe der Analytischen Ultrazentrifugation nachgewiesen, dass der N-terminale Teil von Cph1 sowohl in der Pr-Form, als auch in der Pfr-Form als Dimer vorliegt, dass die (Pfr)₂ Dimere aber stabiler sind als die (Pr)₂ Dimere.

Untersuchungen zur Protein-Konformation vor und nach Photokonversion wurden auch für pflanzliche Phytochrome durchgeführt. Bei Haferphytochrom wurde während der Gelfiltration festgestellt, dass die Pr-Form von Hafer Phytochrom später als die Pfr-Form von der Säule eluiert (Lagarias und Mercurio, 1985). Nach limitierter Proteolyse mit den vier Endoproteasen Trypsin, Clostripain, Subtilisin und Thermolysin entstand für die Pfr-Form ein anderes Proteolysemuster als für die Pr-Form. Dabei zeigte sich die Pfr-Form gegenüber dem Proteaseabbau stabiler als die Pr-Form. Konformationsveränderungen während der Photokonversion von Hafer Phytochrom wurden ebenfalls in Arbeiten von Jones et al. (1985) und Grimm et al. (1988) nachgewiesen, wo die Peptidmuster von Pr und Pfr nach limitierter Proteolyse unterschiedlich waren. Dabei konnte mit Hilfe von Edmann Sequenzierung bzw. Westernblot festgestellt werden, dass andere Teile des Proteins vor oder nach Bestrahlung exponiert werden. So wurde nach Jones et al. (1985), Lagarias und Mercurio (1985) und Grimm et al. (1988) festgestellt, dass die N-terminale Domäne

des Hafer Phytochroms in der Pr-Form stärker exponiert ist als in der Pfr-Form. Grimm et al. (1988) konnten zeigen, daß die C-terminale Domäne in der Pfr-Form stärker exponiert ist als in der Pr-Form.

In einem Review von Park et al. (2000) wird ein Modell beschrieben, das strukturelle Veränderungen von Phytochrom B während der Photokonversion und daraus resultierende Interaktionen mit Responsregulatoren beschreibt. Durch „crosslinking“ Versuche konnte gezeigt werden, dass die N- und C-terminalen Peptide in der Pr-Form miteinander interagieren und die *hinge* region dadurch verdecken. Nach Bestrahlung verschwindet diese Interaktion, die *hinge* region wird exponiert und Serin-598 wird in der Pfr-Form phosphoryliert, bzw. können interagierende Faktoren wie PIF3 und NDPK2 gebunden werden. Eine stärkere Exponierung der C-terminalen Domäne von Phytochrom B in der Pfr-Form wurde durch Experimente mit Limitierter Proteolyse bestätigt, bei denen die Pfr-Form stärker abgebaut wurde als die Pr-Form. Trotz dieser zahlreichen Studien zur Konformation von Phytochrom in der Pr- und Pfr-Form ist der Mechanismus der Pr zu Pfr Umwandlung noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.8. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, strukturelle Veränderungen des Chromophors und des Proteins während der Photokonversion von *Agrobacterium* Phytochrom zu charakterisieren. Um zu untersuchen, welche Konformation und Konfiguration der Chromophor in der Pr- bzw. Pfr-Form des Holo proteins einnimmt, wurden synthetische Chromophore verwendet, die in einer bestimmten Konfiguration bzw. Konformation arretiert sind. Dabei war einerseits die Methin-Brücke zwischen Ring C und D in allen vier möglichen Anordnungen (15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es) und andererseits die Methin-Brücke zwischen den Ringen A und B in zwei Anordnungen (5Za und 5Zs) fixiert. Die Überlegung war, mit Hilfe biochemischer und spektrophotometrischer Untersuchungen zu überprüfen, ob die jeweiligen Addukte die charakteristischen Eigenschaften der Pr- oder Pfr-Form besitzen. Dazu wurden die Assemblierungsgeschwindigkeit und die spektralen Eigenschaften der Addukte überprüft. Die Konformation der Holo proteine wurde durch Experimente wie limitierte Proteolyse und Gelfiltration untersucht. Außerdem wurden Aussagen über die Apoprotein-Chromophor-Wechselwirkung und Autophosphorylierungsaktivität der jeweiligen Addukte getroffen. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war es, Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen Agp1 und Agp2 herauszuarbeiten. Agp1 konvertiert im Dunkeln von Pfr zu Pr, Agp2 konvertiert im Gegensatz dazu von Pr zu Pfr. Aufgrund spektraler Ähnlichkeiten könnte man vermuten, dass die Pr zu Pfr Konversion von Agp2 durch eine C15=C16 Z-E Isomerisierung hervorgerufen wird. Ein direkter Beweis fehlt jedoch noch.

Die strukturellen Veränderungen des Chromophors ziehen Konformationsveränderungen am Protein nach sich. Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit diesen strukturellen Veränderungen sowie der Bedeutung einzelner Proteindomänen für die Photokonversion. Dazu wurden verschiedene Deletionskonstrukte von Agp1 untersucht. Eine vergleichende Untersuchung der Autoassemblierung, Photokonversion und spektralen Integrität von Pr und Pfr sollte helfen, Aussagen darüber zu machen, wie gut die Deletionsmutanten in der Lage sind, die Chromophore einzubauen, sowie die korrekte Pr- und Pfr-Form anzunehmen. Im Rahmen der spektralen Untersuchungen war es auch wichtig, die Stabilität der Pfr-Form durch Messung der Rückkonversion zu testen. Während der Photokonversion von Agp1 stattfindende Konformationsveränderungen sollten mit Hilfe der limitierten Proteolyse untersucht werden. Die Proteolysemuster lassen Aussagen über den Einfluss des Chromophoreinbaus und der Photoisomerisierung auf die Proteinstruktur zu. Einige der entstandenen Fragmente sollten

sequenziert werden, um Aussagen über den genauen Ort der Schnittstellen und damit über die exponierten Proteinbereiche treffen zu können. Um herauszufinden, welche Proteindomänen die Unterschiede zwischen Apo-Protein, Pr und Pfr hervorrufen, waren Experimente dieser Art mit dem vollständigen Agp1 Protein, als auch mit den Deletionskonstrukten geplant. Weitere Aussagen darüber, ob Konformationsveränderungen während der Chromophorassembly und Photokonversion stattfinden, sollten Untersuchungen mit Gelfiltration liefern. Im Rahmen dieser Untersuchungen war geplant, eine N-terminale Dimerisierung von Agp1 in Abhängigkeit vom Photozustand des Phytochroms zu überprüfen. Da die Mobilität von Proteinen während der Gelfiltration auch von der Molekülform und der Interaktion mit der Säule abhängt, sollten diese Studien durch „crosslinking“ Experimente ergänzt werden. Da zum „crosslinking“ von Phytochrom bisher nur wenige Kenntnisse vorliegen, wurde diese Methode für Agp1 etabliert. Dabei wurden verschiedene „crosslinker“ getestet und die Effektivität des „crosslinkings“ in Abhängigkeit von der Protein- und „crosslinker“-Konzentration sowie der Temperatur überprüft.