

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Bedeutung arretierter Bilin Derivate für die Untersuchung der Photokonversion bei Agp1 und Agp2

Teile dieser Arbeit wurden in Inomata et al., 2005 und Inomata et al., 2006 veröffentlicht.

Phytochrome sind Photorezeptoren, die eine reversible Photokonversion zwischen der Rotlicht-absorbierenden Pr-Form und der Dunkelrotlicht absorbierenden Pfr-Form durchlaufen. Die Absorption des Lichts erfolgt durch den Chromophor. Die Rotlichtabsorption initiiert eine *Z* zu *E* Isomerisierung um die C15=C16 Doppelbindung. Diese Isomerisierung wurde für pflanzliche Phytochrome nachgewiesen (Rüdiger et al., 1983). Die Rotlichtabsorption hat ebenfalls Bewegungen um die exozyklischen Einzelbindungen des Chromophors zur Folge. Im Prinzip kann jede Einzelbindung entweder eine *anti*- oder eine *syn*-Konformation einnehmen (Falk, 1989).

Die strukturellen Veränderungen des Chromophors während der Photokonversion wurden durch zahlreiche Arbeiten untersucht (Wagner et al., 2005; Andel et al., 2000; Mizutani, 1994; Kneip et al., 1999; Mroginski et al., 2004), trotzdem gibt es darüber noch keine klaren Vorstellungen. Eine hier angewandte Möglichkeit, die Chromophorstruktur in den verschiedenen Photozuständen von Agp1 besser zu verstehen, ergab sich durch die Synthese von sterisch arretierten Chromophoren, die mir von der AG Inomata (Japan) zugestellt wurden.

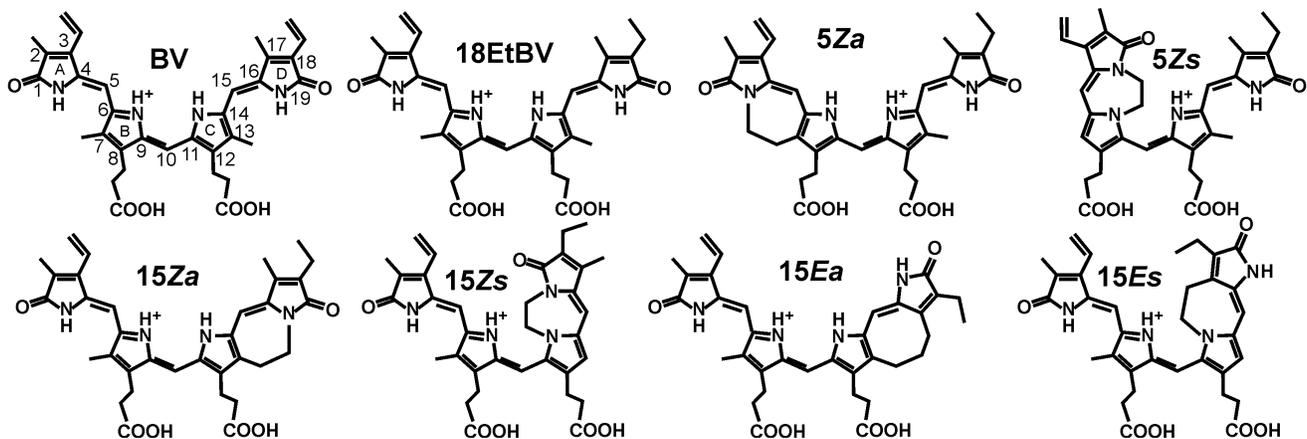
Die *Agrobacterium* Phytochrome Agp1 und Agp2 wurden mit verschiedenen Chromophoren assembliert. Anschließend wurde untersucht, welche Konformation das Protein durch die Assemblierung mit den entsprechenden arretierten Chromophoren einnimmt. Insgesamt kamen acht verschiedene Chromophore: Biliverdin (BV), 18,18'-dihydrobiliverdin (18EtBV), 15*Z-anti*-18EtBV (15*Za*), 15*Z-syn*-18EtBV (15*Zs*), 15*E-anti*-18EtBV (15*Ea*) und 15*E-syn*-18EtBV (15*Es*), 5*Z-syn*-18Et-BV (5*Zs*) und 5*Z-anti*-8Et-BV (5*Za*) zum Einsatz (Abbildung 14). BV ist der natürliche Chromophor von Agp1 (Lamparter et al., 2002). 18EtBV unterscheidet sich von BV durch eine Seitenkette an der C18-Position des Bilin-Gerüsts, welches eine Ethylgruppe in 18EtBV und eine Vinylgruppe in BV ist. Da die arretierten Chromophore aus technischen Gründen ebenfalls eine Ethylgruppe an der C18-Position besitzen, wurde 18EtBV neben Biliverdin ebenfalls als Kontrolle eingesetzt. Wie schon in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte (Lamparter et al., 2003), werden beide Chromophore kovalent vom Agp1- und Agp2-Apoprotein gebunden. Die Addukte zeigen eine

typische rot/ dunkelrot reversible Photokonversion bzw. eine dunkel/ dunkelrot reversible Konversion. Mit Hilfe der Chromophore 15Za, 15Zs, 15Ea und 15Es konnte einerseits überprüft werden, ob die Photokonversion bei *Agrobacterium* Phytochrom ebenfalls durch eine Z zu E Isomerisierung um die C15=C16 Doppelbindung des Chromophors eingeleitet wird. Andererseits konnte die Konformation des Chromophors um die C14-C15 Bindung in der Pr- und Pfr-Form von *Agrobacterium* Phytochrom geklärt werden. Mit Hilfe der 5Zs- und 5Za-Chromophore wurde die Konfiguration der C4=C5 Doppelbindung und die Konformation der C5-C6 Einzelbindung untersucht.

Der Übergang von der Pr- zur Pfr-Form ist spektral messbar und mit Konformationsveränderungen des Proteins verbunden, die unter geeigneten Bedingungen mit Hilfe von Methoden wie Gelfiltration und limitierter Proteolyse nachweisbar sind. Die meisten bakteriellen Phytochrome sind Histidinkinasen, bei denen die Kinaseaktivität durch lichtinduzierte Konformationsveränderungen des Proteins moduliert wird. Generell ist die Kinaseaktivität in der Pr-Form stärker und in der Pfr-Form schwächer, obwohl auch andere Phosphorylierungsmuster gefunden wurden (Bhoo et al., 2001; Lamparter et al., 2002; Yeh et al., 1997; Hübschmann et al., 2001).

Um zu überprüfen, ob Agp1-Apoprotein durch Assemblierung mit den entsprechenden arretierten Chromophoren eine Pr-, oder Pfr-Form einnimmt, wurden die Addukte mit UV/vis Spektroskopie sowie verschiedenen protein-analytischen Methoden untersucht und mit den entsprechenden BV Addukten verglichen.

Assemblierungsverlauf, Photokonversion sowie kovalente und nicht-kovalente Bindung und Histidinkinaseaktivität der Addukte aus Agp1 mit obigen Chromophoren werden im Folgenden für Agp1 beschrieben.



**Abbildung 14:** Chromophore, die für die Untersuchung verschiedener Eigenschaften von Agp1 und Agp2 mit synthetischen Chromophoren verwendet wurden.

### 3.1.1. Assemblierung von Agp1 mit synthetischen Chromophoren

*Agrobacterium* Phytochrom Agp1 gehört zu den Biliverdin (BV) bindenden Phytochromen und verknüpft seinen Chromophor Biliverdin kovalent an das Cystein 20 über die Ring-A-Vinyl Seitenkette von BV (Lamparter et al., 2002). Zu Beginn der Untersuchungen mit den arretierten Chromophoren sollte getestet werden, ob diese vom Agp1 Apoprotein gebunden werden können. Dabei sollte auch geprüft werden, wie gut sie in das Protein eingebaut werden und ob spektral aktive Addukte entstehen. Die Absorptionsspektren für die freien Chromophore (graue Linien) BV, 18EtBV, 15Za, 15Zs, 15Ea, 15Es sind in Abbildung 15, die für 5Zs und 5Za in Abbildung 16 dargestellt. Die freien Chromophore besitzen Absorptionsmaxima ( $\lambda_{\max}$ ) im blauen und im roten Wellenlängenbereich. Die Assemblierung der Chromophore durch Phytochrom lässt sich in der Regel spektral verfolgen. Die Absorptionsmaxima für freies BV in Basispuffer (50 mM Tris/Cl, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, pH=7,8) liegen bei etwa 380 nm bzw. 680 nm (Abbildung 15a). Nach Assemblierung des Apoproteins mit dem Chromophor verschieben sich beide Absorptionsmaxima zu längeren Wellenlängen, d.h. von 380 nm zu 400 nm bzw. von 680 nm zu 702 nm. Im roten Wellenlängenbereich kommt es nach Assemblierung außerdem zu einem deutlichen Anstieg der Absorption. Das Absorptionsmaximum im blauen Wellenlängenbereich wird als Soret-Bande, das im roten Wellenlängenbereich als Q-Bande bezeichnet. Wie in Lamparter et al. (2002) und Lamparter et al. (2003) beschrieben, hat das nicht-kovalente BV-Agp1 Addukt dasselbe Absorptionsmaximum wie das kovalente Addukt, aber der Extinktionskoeffizient des Ersteren ist geringer. Daher ist der Übergang vom nicht-kovalenten zum kovalenten Status durch einen Absorptionsanstieg gekennzeichnet. Aufgrund der oben dargestellten Veränderung des Absorptionsspektrums des freien Chromophors nach Einbau in das Apoprotein lässt sich der Assemblierungsverlauf der verschiedenen synthetischen Chromophore mit Agp1 spektral verfolgen. Die Geschwindigkeit, mit der die Absorption im Bereich der Q-Bande ihr Maximum erreicht, hängt davon ab, wie gut die synthetischen Biline in die Chromophortasche von Agp1 aufgenommen werden und eine kovalente Verknüpfung mit dem Cys 20 von Agp1 ausbilden. Indem man Agp1 Apoprotein mit einem der zu untersuchenden Chromophore mischt und dann anschließend sofort den Absorptionsanstieg der Q-Bande über die Zeit verfolgt, kann man Aussagen darüber treffen, ob und wie gut der Chromophor mit dem Protein assembliert. Dazu werden sofort nach Mischen von Protein und Chromophor und dann in 5 min Intervallen Spektren aufgenommen, bis der Wert für die Absorption nicht mehr steigt. Die Untersuchungen zur Assemblierung wurden mit dem vollständigen Agp1-Protein (FL) und allen in Abbildung 14

dargestellten Chromophoren durchgeführt. Für BV-Agp1 war die Assemblierung nach 1 min beendet, d.h. nach dieser Zeit erfolgte kein weiterer Anstieg der Absorption der Q-Bande (Abbildung 15a). Im roten Wellenlängenbereich lag das  $\lambda_{\max}$  von Pr bei 702 nm. Die Assemblierung mit 18EtBV war ebenfalls zwischen 1 und 5 min abgeschlossen (Abbildung 15b) und das Pr-Addukt hatte ein Absorptionsmaximum im roten Wellenlängenbereich bei 691 nm. Im Vergleich zu BV-Agp1 zeigte das Absorptionsmaximum von 18EtBV-Agp1 eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen. Der Grund dafür ist, dass 18EtBV an der C18 Position statt der Vinylgruppe eine Ethylgruppe trägt und daher im Vergleich zu BV ein kürzeres Konjugationssystem besitzt. Nach Mischen von Agp1 mit 15Za ergab sich ein ähnliches Assemblierungsmuster wie mit BV und 18EtBV. Das Spektrum des 15Za-Agp1-Adduktes hatte eine Pr-ähnliche Form. Das Absorptionsmaximum im roten Wellenlängenbereich erschien bei 714 nm (Abbildung 15c). Diese Absorptionsbande ist im Vergleich zur Pr-Form der BV und 18EtBV-Addukte stärker ausgeprägt. Außer den beiden Hauptabsorptionsbanden im roten und blauen Bereich, haben Phytochrome eine dritte Absorptionsbande im roten Spektralbereich. Diese erscheint bei kürzeren Wellenlängen als das rote Absorptionsmaximum und bildet in den Spektren der BV- und 18EtBV-Addukte eine Schulter vor der Hauptabsorptionsbande. Beim 15Za-Addukt erscheint diese Bande als dritter Peak mit einem Absorptionsmaximum bei 649 nm. Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen den drei verschiedenen Addukten ist das Absorptionsverhältnis zwischen den Haupt-Absorptionsbanden im roten und blauen Bereich. Dieses ist bei BV am kleinsten und bei 15Za am größten (Tabelle 15). Die Spektren der 15Zs- und 15Es-Addukte waren sehr ungewöhnlich. Sofort nach Mischung von Chromophor und Protein verschwand die Absorption im roten Bereich. Diese Messergebnisse weisen darauf hin, dass die Interaktion zwischen Protein und Chromophor sehr schnell erfolgt und nach einer Minute abgeschlossen ist. Die Addukte haben nur eine Absorptionsbande im blauen Wellenlängenbereich mit einem  $\lambda_{\max}$  bei 430 nm für 15Zs (Abbildung 15d) und 433 nm für 15Es (Abbildung 15f). Sofort nach dem Mischen von Protein und 15Ea erschien eine Absorptionsbande mit einem Absorptionsmaximum bei 727 nm. Die Absorption dieser Bande erhöhte sich weiter und verschob sich während einer bis zu 140 min verlängerten Inkubation zu 739 nm. Danach fanden keine weiteren spektralen Veränderungen mehr statt (Abbildung 15e). Nach dem Mischen von 15Ea mit Agp1 kommt es sofort zu einem Anstieg der Absorption im roten Wellenlängenbereich. Das zeigt, dass der Chromophor schnell in die Proteintasche aufgenommen wurde. Anschließende langsame spektrale Veränderungen weisen auf eine verzögerte zweite Reaktion hin, wobei es sich um die Ausbildung der kovalenten Bindung mit dem Cys 20 handeln könnte. In Kapitel 3.1.3. wird diese

Vermutung mit Hilfe von NAP Säulen Experimenten bestätigt. Nach abgeschlossener Assemblierung zeigte das *15Ea*-Agp1-Addukt (Absorptionsmaximum bei 739 nm) ein Spektrum, das mit dem von BV-Agp1 Pfr und noch besser mit dem von 18EtBV-Agp1 Pfr (Absorptionsmaxima bei 747 nm bzw 740 nm) vergleichbar ist. Die Positionen der Absorptionsmaxima im roten und blauen Wellenlängenbereich von 18EtBV Pfr und dem *15Ea*-Addukt unterschieden sich um 1 bzw. 10 nm. Die Position der Seitenschultern (3 nm Unterschied) und die rot/ blau Absorptionsverhältnisse sind für diese Chromophore ebenfalls ähnlich. Während der Assemblierungsstudien mit *5Za* und *5Zs* wurde nach dem Mischen von Protein und Chromophor ein Anstieg der Absorption im Bereich der Q-Bande beobachtet (Abbildung 16a und b). Das bedeutet, dass diese beiden synthetischen Chromophore ebenfalls in die Chromophortasche eingebaut werden. Die Assemblierung von Agp1 mit *5Za* war nach 20 min, die mit *5Zs* erst nach 30 min abgeschlossen. Die Addukte mit beiden Chromophoren zeigten jeweils ein Absorptionsmaximum im blauen und im roten Spektralbereich. Die Absorptionsmaxima der Q-Banden lagen für das *5Za*-Addukt bei 672 nm bzw. für das *5Zs*-Addukt bei 692 nm. Eine Minute nach dem Mischen von Agp1 mit *5Za* zeigte das Spektrum des entstandenen Adduktes hinter der Q-Bande eine kleine Schulter bei 710 nm, die jedoch im weiteren Assemblierungsverlauf verschwand. Die spektrale Messung der Absorptionsveränderungen nach dem Mischen von Agp1 mit den in Abbildung 14 dargestellten Chromophoren zeigte, dass diese zwar alle von Agp1 gebunden werden, für die vollständige Assemblierung mit dem Protein aber jeweils unterschiedlich viel Zeit benötigt wird. In Abbildung 17 ist der Zeitverlauf für die Assemblierung der verschiedenen Chromophore mit Agp1 dargestellt. Dazu wurde der Verlauf der Absorption beim jeweiligen  $\lambda_{\max}$  Wert der Pr-Form für entsprechenden Chromophor-Addukte dargestellt. Dieser Vergleich zeigt so erneut, dass *15Ea* mit Agp1 am langsamsten assembliert. *5Za* assembliert schneller als *5Zs*. Die Assemblierung von Agp1 mit *5Za* und *5Zs* erfolgt aber langsamer als mit BV, 18EtBV, *15Za*, *15Zs* und *15Es*.

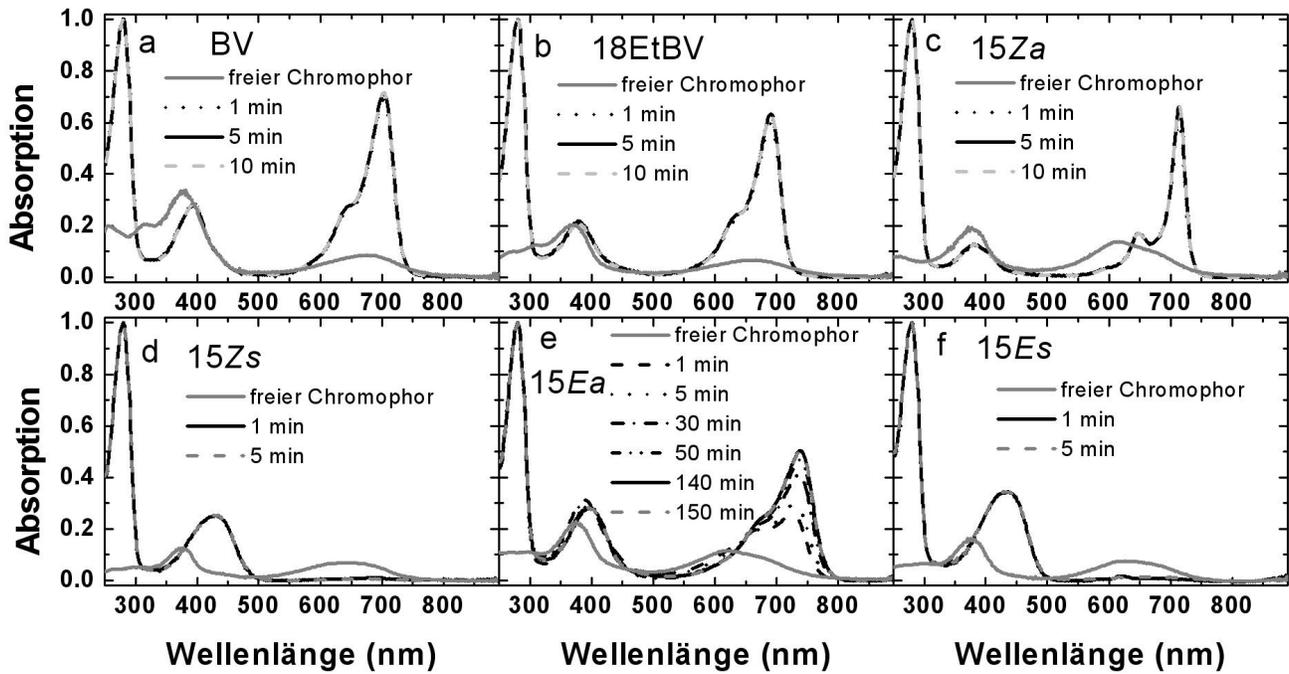


Abbildung 15: Spektren von freiem (a) BV, (b) 18EtBV, (c) 15Za, (d) 15Zs, (e) 15Ea, (f) 15Es in Basispuffer und Chromophorassemblierung mit Agp1. Apoprotein und Chromophor wurden gemischt und sofort ( $t = 1$  min) als auch nach verschiedenen Zeiten (in Legende angegeben) ein Spektrum aufgenommen. Die Konzentration des Apoproteins betrug  $\sim 10 \mu\text{M}$  außer im Fall von (b) 18EtBV, wo die Apoproteinkonzentration  $6 \mu\text{M}$  war. Die Chromophorkonzentration betrug  $8 \mu\text{M}$  im Fall von (a) BV,  $4 \mu\text{M}$  im Fall von (b) 18EtBV und  $\sim 5 \mu\text{M}$  in allen anderen Fällen. Holoproteinspektren wurden auf  $A_{280} = 1$  normalisiert. Die Spektren für den freien Chromophor wurden entsprechend angepasst.

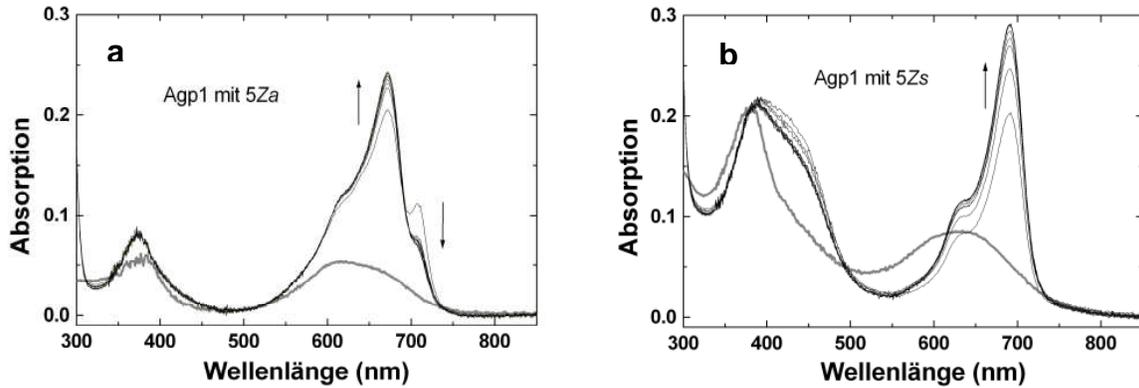


Abbildung 16: Assemblierung von Agp1 mit (a) 5Za- und (b) 5Zs-Chromophoren, UV/vis Spektroskopie. Nach Mischung von Protein und Chromophor wurden über eine Zeit von 50 min Spektren in 5 min Intervallen aufgenommen. Die Richtung der spektralen Veränderung wird durch Pfeile angezeigt, das Spektrum von freiem Chromophor in Basispuffer durch eine graue Linie.

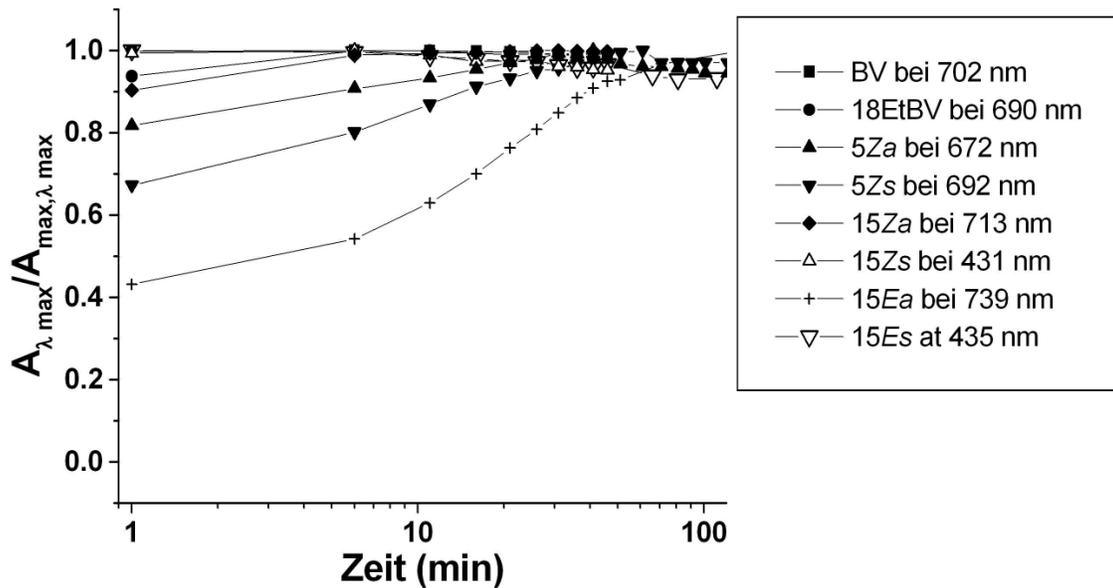


Abbildung 17: Zeitverlauf der spektralen Veränderungen während der Assemblierung von Agp1 mit allen in Abbildung 14 gezeigten Chromophoren.

### 3.1.2. Photokonversion der Addukte

Wie in früheren Arbeiten (Rüdiger et al., 1983) mit NMR Untersuchungen gezeigt wurde, findet während der Photokonversion von Pflanzenphytochromen eine *Z* zu *E* Isomerisierung um die C15=C16 Doppelbindung zwischen den Ringen C und D von Phytochromobilin (PΦB) statt. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus für alle Phytochrome universell ist, da sie ähnliche spektrale Eigenschaften besitzen. Ein direkter experimenteller Beweis dafür, dass die *Z* zu *E* Isomerisierung bei bakteriellen Phytochromen ebenfalls stattfindet, fehlt jedoch noch. Falls die Photokonversion von Agp1 ebenfalls durch eine *Z* zu *E* Isomerisierung eingeleitet wird, sollten alle Addukte mit Chromophoren, deren Beweglichkeit um die Doppelbindung zwischen den C15 und C16 Atomen blockiert ist (15*Za*, 15*Zs*, 15*Ea* und 15*Es*), im Licht keine Konversion von Pr zu Pfr bzw. von Pfr zu Pr machen. Tatsächlich erfolgten keine spektralen Änderungen für diese Addukte nach Bestrahlung mit rotem oder weißem Licht (Abbildung 18c-f). Die für diese Messungen verwendeten Bestrahlungsbedingungen erzeugten eine saturierende Photokonversion von BV- und 18EtBV-Addukten. Für BV-Agp1 und 18EtBV-Agp1 führt die Photokonversion nach Pfr zu einer bathochromen Verschiebung der roten Absorptionsbande um 52-nm bzw. 51-nm (Abbildung 18a und b). Bei den 5*Za*- und 5*Zs*-Addukten ist die *Z* zu *E* Isomerisierung nicht beeinträchtigt. Daher sollte eine Bestrahlung zu einer Veränderung im Absorptionsspektrum dieser Addukte führen. Durch einen Vergleich der Spektren des BV-Agp1-Adduktes mit denen der 5*Za*- und 5*Zs*-Addukte könnte eventuell die Frage geklärt werden, welche Konfiguration die C5-C6 Einfachbindung in der Pr- bzw. Pfr-Form einnimmt. In unserem Experiment bestrahlten wir die Addukte für 10 min mit Licht einer Wellenlänge von 655 nm ( $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ ). Das entspricht einer höheren Dosis, als für eine saturierende Photokonversion von BV- oder 18EtBV-Addukten notwendig wäre, um mögliche niedrige Quantenausbeuten während der Photokonversion auszugleichen. Die Bestrahlung des 5*Za*-Adduktes resultierte in einer Reduktion der Absorption bei 670 nm, einem leichten aber signifikanten Anstieg in Bereichen längerer Wellenlängen und einer Verbreiterung der Absorptionsbande bei 370 nm (Abbildung 19a). Offensichtlich konvertiert die Pr-ähnliche Form teilweise in eine Pfr-vergleichbare Form, die bei höheren Wellenlängen absorbiert aber einen ziemlich geringen Extinktionskoeffizienten hat. Die Bestrahlung des 5*Zs*-Addukts führte zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung kürzerer Wellenlängen (von 692 zu 636 nm) und einer Reduktion der Absorption in diesem spektralen Bereich (Abbildung 19b). Somit wird das Absorptionsmaximum des 5*Zs*-Adduktes nach Photokonversion in eine andere Richtung verschoben als für die BV-

(Abbildung 18b) und 5Za- (Abbildung 19a) Addukte. Eine lichtinduzierte Verschiebung des Absorptionsmaximums zu einer niedrigeren Wellenlänge wurde bereits bei dem Bakteriophytochrom BphP3 von *Rhodospseudomonas palustris* gefunden, bei welchem sich das Absorptionsmaximum von 705 nm zu 645 nm verschiebt (Giraud et al., 2005). Die Spektren der 5Za- und 5Zs-Addukte im Dunkeln ähneln beide dem der Pr-Form von BV-Agp1. Jedoch ähnelt nur das 5Za-Addukt der Pfr-Form von BV-Agp1.

**Tabelle 15: Charakteristische spektrale Parameter des Agp1 Chromophor-Adduktes. Das Pfr-Spektrum wurde aus dem Pr-Spektrum und dem Spektrum nach saturierender Rotlichtbestrahlung berechnet. Dafür wurden die relativen Pfr-Gehalte für BV und 18EtBV auf 90 bzw. 88% geschätzt. Die Position der Maxima (oder der Schultern) wurde durch eine +/- Null Durchgang (oder lokales Minimum) der ersten Ableitung des Absorptionsspektrums erhalten.**

Chromophor	$\lambda_{\max}$ im blauen Wellenlängenbereich	$\lambda_{\max}$ der Seitenschulter/ Seitenpeak im Roten Wellenlängenbereich	$\lambda_{\max}$ im roten Wellenlängenbereich	Absorptionsverhältnis rotes Maximum/ blaues Maximum
BV; Pr	393 nm	651 nm	701 nm	2.3
BV; Pfr	413 nm	702 nm	747 nm	1.4
18EtBV; Pr	382 nm	639 nm	691 nm	3.1
18EtBV; Pfr	406 nm	686 nm*	740 nm	2.0
15Za	385 nm	649 nm	714 nm	10.4
15Zs	430 nm			
15Ea	396 nm	683 nm	739 nm	1.8
15Es	433 nm			

\* Diese Schulter ist nur schwach ausgeprägt; die Position konnte nicht präzise bestimmt werden.

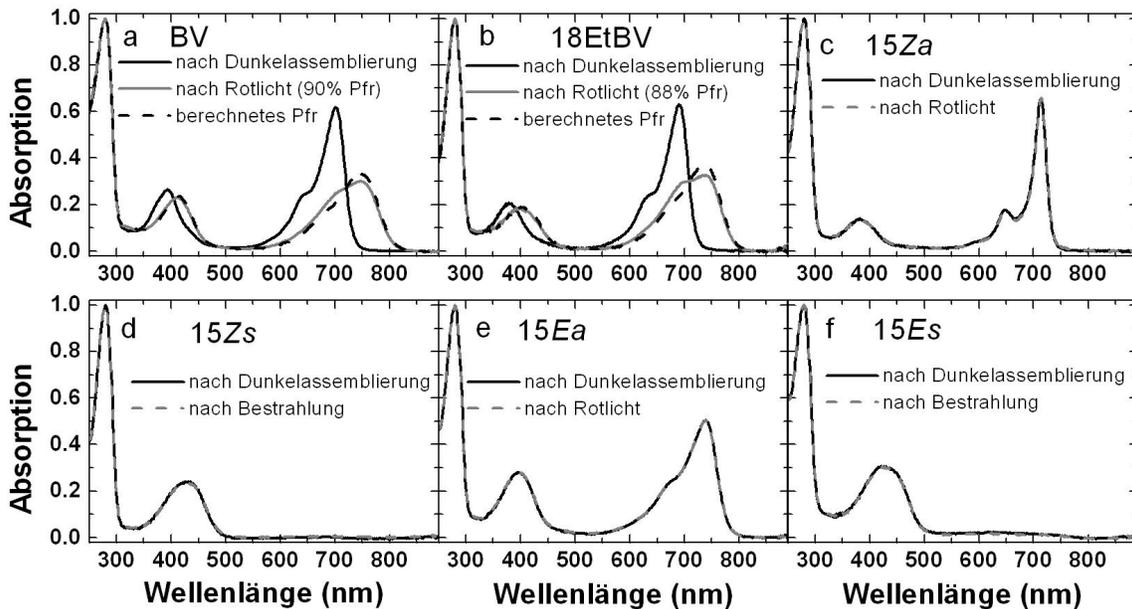


Abbildung 18: Photokonversion von Agp1-Addukten. Die (a) BV-, (b) 18EtBV-, (c) 15Za-, (e) 15Ea- Addukte wurden mit rotem Licht und die (d) 15Zs- und (f) 15Es-Addukte mit weißem Licht bestrahlt. Das Spektrum vor und nach der Bestrahlung ist in jeder Abbildung gezeigt. Nur das BV als auch das 18EtBV-Addukt machen Photokonversion. Addukte mit arretierten Chromophoren sind im Licht stabil. Im Fall der BV- und 18EtBV-Addukte wurden die Pfr-Anteile nach saturierender Rotlichtbestrahlung auf 90 bzw. 88 % geschätzt. Das Spektrum an reinem Pfr wurde berechnet und ebenfalls in der Abbildung angegeben (a, b). Protein- und Chromophorkonzentrationen entsprachen denen der Assemblierungsexperimente (Abbildung 15). Die Spektren wurden auf  $A_{280} = 1$  normalisiert.

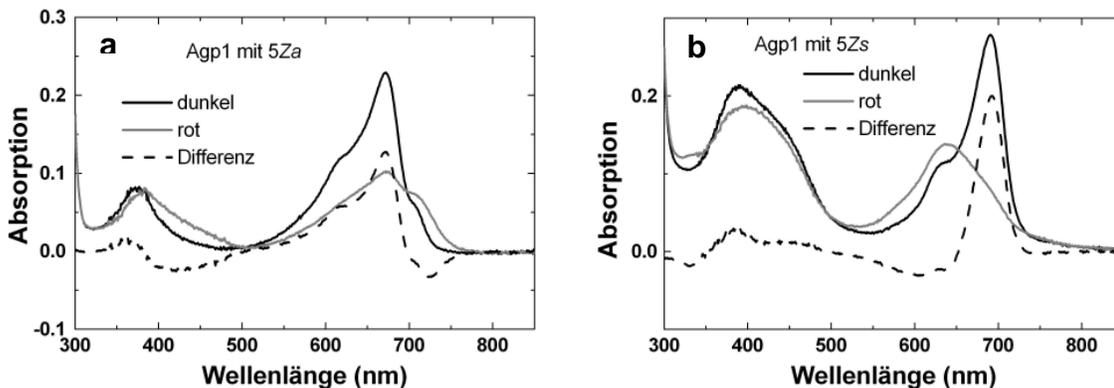


Abbildung 19: Photokonversion von Agp1-Addukten mit (a) 5Za und (b) 5Zs. Die Spektren wurden nach einer Dunkelassemblierung (scharze Linie) oder nach Bestrahlung für 10 min mit rotem Licht (655 nm;  $50 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; graue Linie) aufgenommen. Das „Dunkel - Rot“ Differenzspektrum wurde durch gestrichelte Linien angegeben.

### 3.1.3. Kovalente Bindung synthetischer Chromophore durch Agp1

In Kapitel 3.1.1. wurde gezeigt, dass Agp1 in der Lage ist, außer BV und 18EtBV auch synthetische arretierte Chromophore zu binden. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass während der Assemblierung von BV mit Agp1-Apoprotein die Ring A - Vinylseitengruppe von BV mit dem Schwefel von Cys 20 eine kovalente Verknüpfung bildet (Lamparter et al., 2004). Die kovalente Bindung des Chromophors an das Protein wurde auch für pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome nachgewiesen. Die Cystein-Chromophorbindung erfolgt bei PCB und PΦB jedoch über die Ring A-Ethylidenseitenkette (Rüdiger & Thümmler, 1994; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001). Somit ist neben der Aufnahme des Chromophors in die Chromophortasche des Proteins auch die Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung ein wichtiger und universeller Schritt bei der Assemblierung des Chromophors mit dem Phytochrom Protein. Im Folgenden wurde überprüft, ob die untersuchten synthetischen Chromophore kovalent an das Protein gebunden oder nur in die Proteintasche aufgenommen werden. Diese Untersuchung erfolgte mit Hilfe von „SDS-Entsalzungssäulen-Tests“. Durch die Zugabe von SDS wurden alle nicht kovalenten Interaktionen zwischen Protein und Chromophor zerstört. Bei der anschließenden Trennung über eine Entsalzungssäule eluiert der Chromophor nur im Falle einer kovalenten Verknüpfung mit dem Protein aus der Säule. Es zeigte sich, dass alle Chromophore quantitativ kovalent an Agp1 gebunden sind (Abbildung 20a-f und Abbildung 21a und b). Es wurden zusätzliche Experimente mit BV und 15Ea durchgeführt, in welchen die Protein-Chromophor-Inkubation nur 5 min betrug. Während unter diesen Bedingungen BV quantitativ gebunden wurde, war die Menge an gebundenem 15Ea ziemlich gering (Abbildung 20e). Dieses Ergebnis bestätigt die in Kapitel 3.1.1 geäußerte Annahme, dass die spektralen Veränderungen während der 15Ea-Assemblierung (Zunahme über einen Zeitraum von 90 – 100 min) die verzögerte Bildung einer kovalenten Bindung widerspiegeln. Die Assemblierung zwischen BV und Agp1 war spektral nach 1 min abgeschlossen, was mit der hier nachgewiesenen schnellen Ausbildung einer kovalenten Bindung einhergeht.

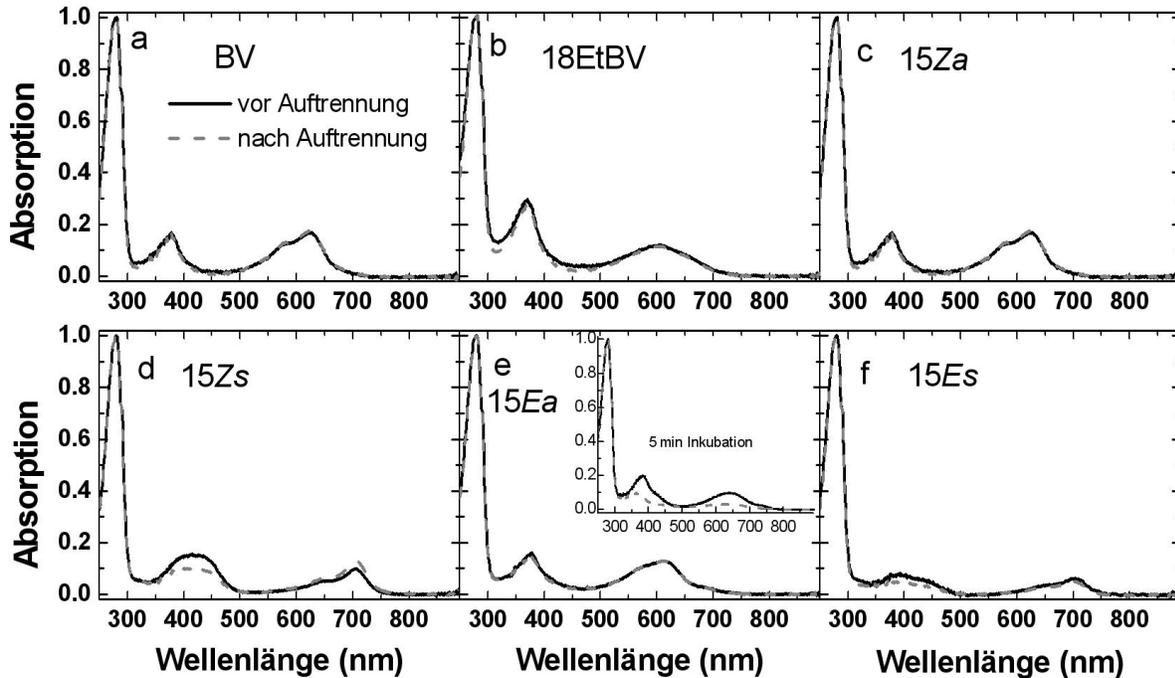


Abbildung 20: Kovalente Bindung des Chromophores bei (a) BV-, (b) 18EtBV-, (c) 15Za-, (d) 15Zs-, (e) 15Ea-, (f) 15Es-Addukten. Nach Mischung von Chromophor und Protein wurde SDS zu dem Gemisch dazugegeben, um nicht kovalente Bindungen zu dissoziieren. Die Proben wurden über Nacht inkubiert, außer bei Abbildung e (eingefügtes Diagramm). Hier betrug die Inkubationszeit 5 min. Anschließend wurde ein Teil der Proben über eine NAP-Säule gegeben. Normalisierte Spektren ( $A_{280} = 1$ ) vor und nach der Trennung sind in jeder Abbildung dargestellt. Der Vergleich beider Spektren zeigt, dass in allen Fällen, außer bei Abbildung e (eingefügtes Diagramm) der Chromophor zusammen mit dem Protein eluiert und damit kovalent an das Protein gebunden ist. Der spektrale Unterschied zwischen freiem Chromophor in Assemblierungspuffer (Abbildung 15) und den hier präsentierten Daten ist auf SDS zurückzuführen (wurde durch Kontrollmessungen gezeigt). Die Proteinkonzentration betrug immer 10  $\mu\text{M}$  und die Chromophorkonzentration 5  $\mu\text{M}$ .

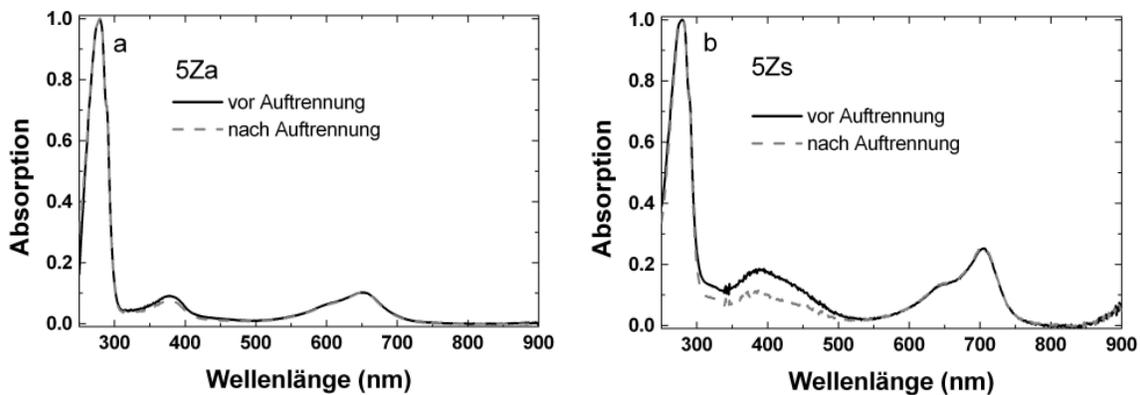
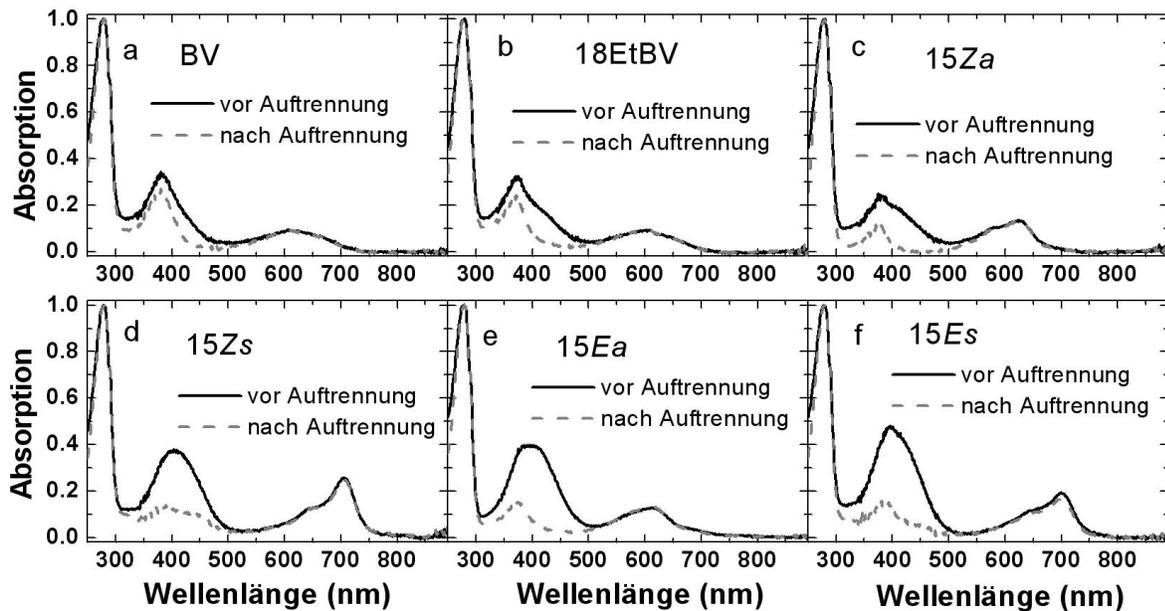


Abbildung 21: Kovalente Bindung des Chromophores bei (a) 5Za- und (b) 5Zs-Addukten. Das Vorgehen zur Bestimmung der kovalenten Bindung zwischen Protein und Chromophor ist in obiger Abbildung beschrieben.

### 3.1.4. Stärke der nicht-kovalenten Interaktion synthetischer Chromophore mit Agp1

Wie durch Lamparter et al. (2002) gezeigt wurde, ist für die spektrale Aktivität von Phytochromen eine nicht-kovalente Verbindung zwischen dem Protein und dem Chromophor ausreichend. Die Stärke der nicht-kovalenten Verknüpfung zwischen Agp1 und den arretierten Chromophoren kann überprüft werden. Dazu wird die Chromophor-Bindestelle des Proteins mit DTNB blockiert und das Gemisch nach Chromophorassemblierung über eine Entsalzungssäule aufgetrennt. Alle sechs untersuchten Chromophore blieben während der Trennung quantitativ am Protein gebunden (Abbildung 22a-f), woraus man auf eine starke nicht-kovalente Interaktion zwischen den Chromophoren und Agp1 schließen kann.



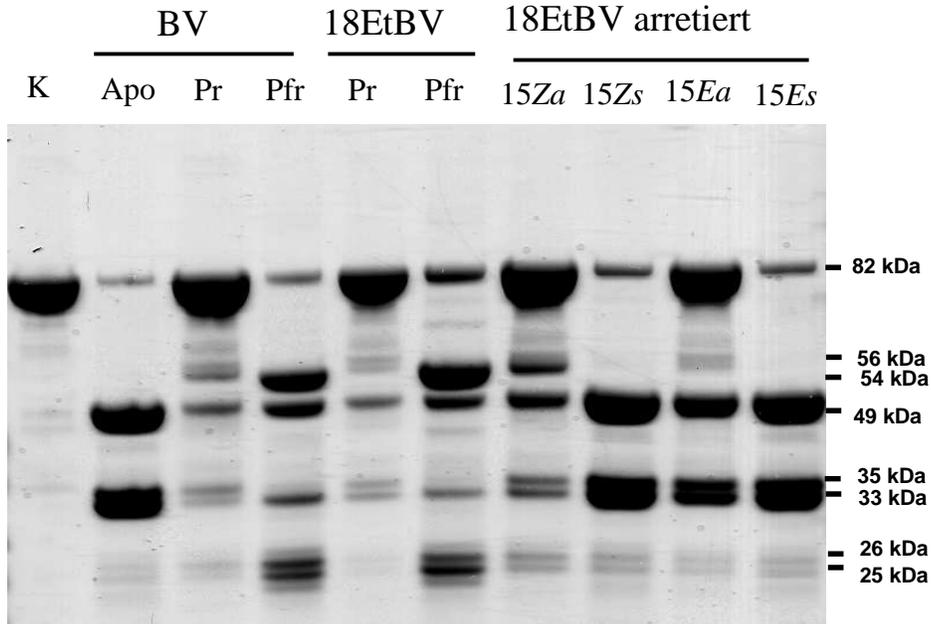
**Abbildung 22:** Nicht-kovalente Bindung des Chromophores bei (a) BV-, (b) 18EtBV-, (c) 15Za-, (d) 15Zs-, (e) 15Ea- und (f) 15Es-Addukten. Die kovalente Chromophorbindestelle des Proteins wurde mit DTNB blockiert und die Probe über eine Entsalzungssäule gegeben, um freies DTNB zu entfernen. Nach dem Mischen von Chromophor und geblocktem Protein wurde ein Teil der Probe erneut über eine Entsalzungssäule gegeben. Vor Messung eines UV/vis – Spektrums wurde SDS hinzugegeben, um den Einfluß des Proteins auf das Chromophorspektrum zu vermindern. Normalisierte Spektren ( $A_{280} = 1$ ) vor und nach der Trennung sind in jeder Abbildung angegeben. Der Vergleich beider Spektren zeigt, dass in jedem Fall der Chromophor zusammen mit dem Protein durch die Entsalzungssäule wandert und daher stark mit dem geblockten Protein interagiert. Nach der Reaktion von DTNB mit freien Sulfhydrylgruppen wird ein Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 412 nm gebildet. Dieses Produkt ist in den Proben „vor Auftrennung“ vorhanden, verschwindet aber nach der Trennung über Entsalzungssäulen. Aus diesem Grund ist die Absorption um 412 nm in den Proben „vor Auftrennung“ immer höher.

### 3.1.5. Proteinstrukturelle Untersuchungen von Addukten aus Agp1 und synthetischen Chromophoren

#### 3.1.5.1. Limitierte Proteolyse

Wie in verschiedenen Arbeiten (Jones et al., 1985; Grimm et al., 1988, Jones et al., 1985, Lagarias und Mercurio, 1985) gezeigt wurde, lässt sich durch limitierte Proteolyse überprüfen, ob Phytochrom in der Pr- und Pfr-Form eine unterschiedliche Konformation besitzt. Die strukturellen Unterschiede zwischen beiden Konformationen sind durch unterschiedliche Proteolysemuster nachweisbar. Durch eine Analyse der Fragmente lassen sich die Proteolyse-Schnittstellen ermitteln und somit Aussagen über die in der jeweiligen Form exponierten Proteinbereiche treffen. Ähnlich kann man auch vorgehen, wenn man herausfinden möchte, wie die Struktur des Proteins mit der Konformation des Chromophors zusammenhängt. Das Proteolysemuster von Agp1-Addukten mit arretierten Chromophoren, die in der Pr- bzw. der Pfr-Form fixiert sind, kann mit dem von BV-Agp1 Pr oder Pfr verglichen werden. So kann man untersuchen, ob das Protein durch Assemblierung mit den entsprechenden arretierten Chromophoren eine Pr- oder Pfr-Konformation einnimmt. Die Spektren der 15Za- und 15Ea-Agp1-Addukte ließen vermuten, dass das 15Za-Agp1-Addukt die Pr- und das 15Ea-Agp1-Addukt die Pfr-Konformation von BV-Agp1 bzw. 18EtBV-Agp1 annehmen. Hinweise darauf, dass das 15Za-Agp1 Konstrukt die gleiche Konformation wie die Pr-Form von BV-Agp1 besitzt, geben die Proteolysemuster von BV-Agp1 Pr, 18EtBV-Agp1 Pr und 15Za-Agp1 nach limitierter Proteolyse mit V8. Nach dem 3-stündigen Verdau mit V8 entstehen für die drei genannten Konstrukte gleiche Fragmente mit der Größe von 82 kDa (unverdautes Konstrukt), 56 kDa, 54 kDa, 49 kDa, 35 kDa, 33 kDa, 26 kDa und 25 kDa (Abbildung 23). Das 15Ea-Addukt besitzt zwar ähnliche spektrale Eigenschaften wie die Pfr-Form von BV-Agp1 und 18EtBV-Agp1, durch den Verdau des 15Ea-Adduktes mit V8 entsteht jedoch ein anderes Proteolysemuster als durch den Verdau der Pfr-Form der letzteren beiden Addukte (Abbildung 23). Während der Verdau von BV-Agp1 Pfr und 18EtBV-Agp1 Pfr zur Entstehung von 82 kDa, 54 kDa, 49 kDa, 33 kDa, 26 kDa und 25 kDa Fragmenten führt und wenig unverdautes Protein zurück bleibt, entstehen beim Verdau von 15Ea-Agp1 hauptsächlich 82 kDa, 49 kDa, 35 kDa und 33 kDa Fragmente und der größte Teil des Ausgangsproduktes bleibt unverdaut (Abbildung 23). Die 15Zs- und 15Es-Chromophore binden kovalent an Agp1, bilden aber kein typisches Pr- oder Pfr-Spektrum.

Beim Verdau der 15Zs- sowie 15Es-Addukte werden Fragmente mit der Größe von 82, 49, 35 und 33 kDa gebildet. Somit besitzen die 15Zs- und 15Es-Addukte dasselbe Proteolysemuster wie das Apoprotein, das die gleichen Fragmente aufweist (Abbildung 23). Es könnte also sein, dass diese Chromophore zwar kovalent gebunden werden, durch ihren Einbau die Struktur des Proteins aber nicht verändert wird, d.h. in der Apokonformation bleibt.



**Abbildung 23:** V8-Verdau der 15Za-, 15Zs-, 15Ea- und 15Es-Agp1-Addukte . Als Kontrollen wurden Agp1-Apoprotein, BV-Agp1 und 18EtBV-Agp1 Pr und Pfr ebenfalls mit V8 verdaut. BV-Agp1- und 18EtBV-Agp1 wurden entweder im Dunkeln inkubiert (Pr) oder mit rotem Licht bestrahlt (Pfr). Alle Addukte wurden für 3h mit V8 (Endkonzentration 0,01 mg/ml) behandelt. Der Verdau wurde mit 3 x SDS Probenpuffer abgestoppt und die Proben wurden für 5 min bei 95°C gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassieblau gefärbt. K = unbehandelte Agp1-Kontrolle. Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts vom Gel angegeben.

### 3.1.5.2. Ermittlung der Proteinkonformation durch Gelfiltration

Gelfiltration ist eine Methode, mit der Moleküle nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Form voneinander getrennt werden können. Dabei eluieren kleine kompakte Moleküle mit einem niedrigen Molekulargewicht schneller als langgestreckte mit einem großen Molekulargewicht. Somit können mit Hilfe dieser Methode Veränderungen am Protein, die während der Photokonversion stattfinden, detektiert werden. Mögliche Konformationsveränderungen wären z.B. die Dimerisierung von zwei Phytochrommolekülen oder die scheinbare Vergrößerung des Moleküls durch Exposition von bestimmten Domänen.

Untersuchungen von Esteban et al. (2005) zeigten, dass während der Gelfiltration eines N-terminalen Fragments von cyanobakteriellem Phytochrom Cph1 die Pfr-Form als Dimer und die Pr-Form als Monomer von der Säule eluierte. Das war ein Hinweis dafür, dass neben der lichtunabhängigen Dimerisierung in der Histidinkinase nach Photokonversion auch eine Dimerisierung im N-Terminus von Cph1 stattfindet.

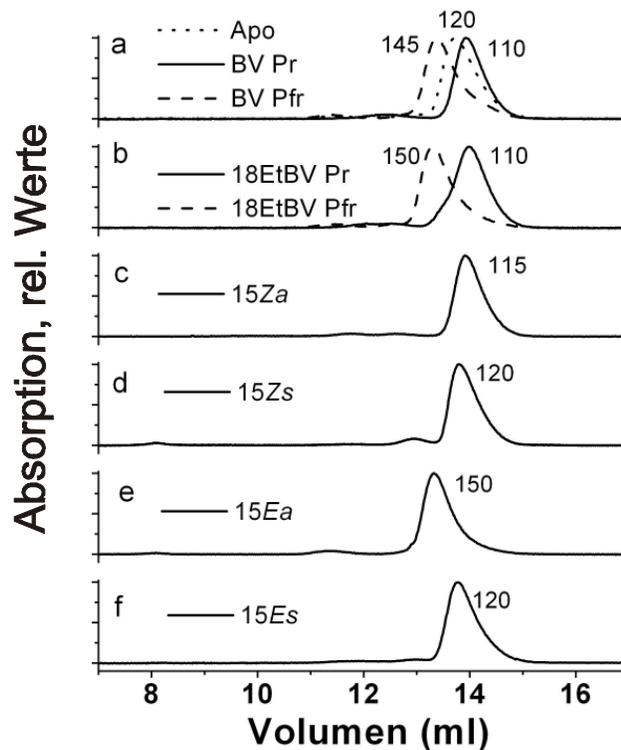
Wie in 3.2.4 dargestellt, eluiert das M15 Konstrukt, das durch Deletion der Histidinkinase entstanden ist in der Pfr-Form ebenfalls mit einem höheren apparenten Molekulargewicht von der Gelsäule als in der Pr-Form. Das unterschiedliche Laufverhalten von M15 Pr und M15 Pfr während der Gelfiltration lässt sich nutzen, um den Einfluss der Chromophorstruktur auf die Proteinkonformation zu überprüfen.

Die verschiedenen arretierten Chromophore wurden also mit M15-Apoprotein assembliert und die Elutionsprofile mit denen von M15-Apoprotein, BV-M15 Pr und BV-M15 Pfr verglichen. Die Ergebnisse für die Pr- und Pfr-Form von 18EtBV-M15 waren vergleichbar mit jenen des entsprechenden BV-Addukts (Abbildung 24a und b). 15Za-M15 eluierte mit einem apparenten Molekulargewicht von 115 kDa (Abbildung 24c) zwischen der Pr-Form von BV-M15 bzw. 18EtBV-M15 und dem M15-Apoprotein. Die Mobilitäten der 15Zs- und 15Es-Addukte waren vergleichbar mit denen des Apoproteins (Abbildung 24d und f), während die Mobilität des 15Ea-Adduktes vergleichbar mit der Pfr-Form des BV- und 18EtBV-Adduktes (Abbildung 24e) war.

Unbestrahltes 5Za- und 5Zs-M15 eluieren mit einem apparenten Molekulargewicht entsprechend der Pr-Form des BV-Adduktes (Abbildung 25). Nach Photokonversion veränderte sich das Elutionsprofil beider Addukte. Die Mobilität von 5Zs-M15 erhöhte sich leicht und das Elutionsmaximum verschob sich von 13,9 zu 13,7 ml. Das Elutionsvolumen von 5Zs-M15 verringerte sich nach Bestrahlung jedoch nicht so deutlich wie bei der BV-M15 Kontrolle, bei der

sich das Elutionsmaximum von 13,8 zu 13,2 ml verschob. Die Elutionsprofile in Abbildung 25 sind so normalisiert, dass die Flächen unter den Kurven identisch sind. Auf diese Weise gibt die Amplitude einen indirekten Eindruck über die Breite der Elutionspeaks. Die Bestrahlung führte zu einer Verbreiterung des Elutionspeaks für BV-M15 und 5Zs-M15, obwohl dieser Effekt für das letztere Addukt weniger deutlich war.

Das bestrahlte 5Za zeigte ein ungewöhnliches Elutionsprofil. Das Elutionsprofil umschloss den Peak des unbestrahlten Addukts, war aber wesentlich breiter als die Elutionsprofile aller anderen in dieser Arbeit untersuchten Chromophor-Addukte. Der Grund für diesen breiten Peak ist noch unklar, aber ein Hinweis darauf, dass das Protein nach Bestrahlung denaturiert wird. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass auch das 5Za-Addukt nicht eindeutig mit der Pfr-Form des BV-Adduktes vergleichbar ist.



**Abbildung 24:** Größenausschlusschromatographie mit M15 (erste 504 N-terminale Aminosäuren von Agp1), Apoprotein und Chromophor-Addukten. (a) Apoprotein und BV-Addukte; (b) 18EtBV-Addukte; (c) 15Za-Addukt; (d) 15Zs-Addukt, (e) 15Ea-Addukt, (f) 15Es-Addukt. Pr, nach Dunkelinkubation; Pfr, nach saturierender Rotlichtbestrahlung. Das apparente Molekulargewicht in kDa wird über jeder Spur angegeben.

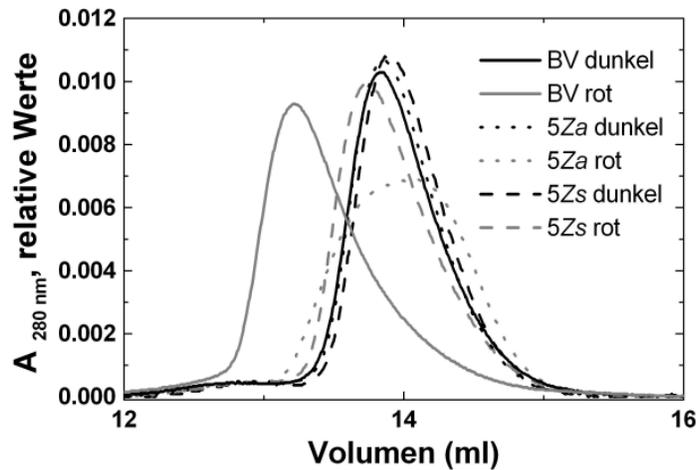
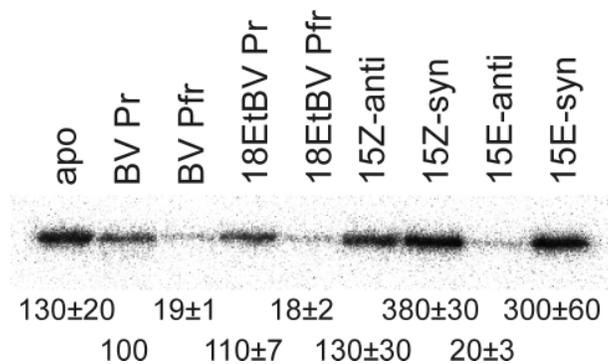


Abbildung 25: Gelfiltrations-Profile von BV-, 5Za- und 5Zs-M15-Addukten vor (dunkel) oder nach Rotlichtbestrahlung (rot). Die Absorptionswerte wurden so normalisiert, dass die Flächen unter den Kurven identisch sind.

### 3.1.6. Phosphorylierungsaktivität der Addukte aus Agp1 und arretierten Chromophoren

Die Phosphorylierungsaktivität der Histidinkinase von Agp1 ist lichtreguliert. Agp1 wird, wie Cph1, *in vitro* stärker in der Pr-Form phosphoryliert (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003). Im Folgenden wurde der Einfluss der arretierten Chromophore auf die Kinaseaktivität von Agp1 überprüft (Abbildung 26). Daraus kann wiederum abgeleitet werden, welchen Einfluss die Konformation des Chromophors auf die Struktur des Proteins besitzt. Für die Auswertung der Untersuchungen wurde die Aktivität von BV-Agp1-Pr gleich 100 % gesetzt. Die mittlere Aktivität des Apoproteins betrug 130 %. Diese leicht erhöhte Aktivität des Apoproteins stimmt mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen überein (Lamparter et al., 2002). Aufgrund von Variationen zwischen wiederholten Experimenten war der Unterschied zwischen Apo und Pr jedoch nicht signifikant. Nach Photokonversion zu BV-Agp1-Pfr verminderte sich die mittlere Aktivität auf 19%. Auch dieses Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen überein. Die Ergebnisse der Phosphorylierungsstudien mit dem 18EtBV-Addukt waren mit denen des BV-Addukts vergleichbar. Die mittlere Aktivität von Pr betrug 110 % und die von Pfr 18 %. Die mittlere Aktivität von 15Za betrug 130 % und war damit mit der des Apoproteins vergleichbar. Die Unterschiede zwischen dem 15Za-Addukt und der Pr-Form von BV und 18EtBV sind jedoch nicht signifikant. Die mittlere Aktivität des 15Ea-Addukts lag bei 20 % und war daher vergleichbar mit der Aktivität von BV-Agp1 Pfr und 18EtBV-Agp1 Pfr. Hierbei muss erwähnt werden, dass nach Assemblierung von Agp1 mit 15Ea alle Holoprotein-Moleküle einen Pfr-ähnlichen Zustand annehmen, während bei einer

Rotlichtbestrahlung von BV- und 18EtBV-Agp1-Addukten nur 90 % Pfr entstehen. Die Phosphorylierungsergebnisse mit 15Ea konnten somit zeigen, dass in der Pfr-Form restliche Phosphorylierungsaktivität verbleibt. Aus Experimenten mit Pr-/Pfr-Gemischen, wie man sie nach Bestrahlung von Addukten mit natürlichen Chromophoren erhält, sind solche eindeutigen Aussagen nicht ableitbar. Die 15Zs- und 15Es-Addukte wiesen eine außerordentlich hohe Phosphorylierungsaktivität, nämlich 380 % bzw. 300 % auf. Diese Daten zeigen, dass durch die Verknüpfung zwischen dem *syn*-Chromophor und Agp1-Apoprotein eine Proteinkonformation entsteht, die vom Apoprotein als auch der Pr- und Pfr-Form verschieden ist.



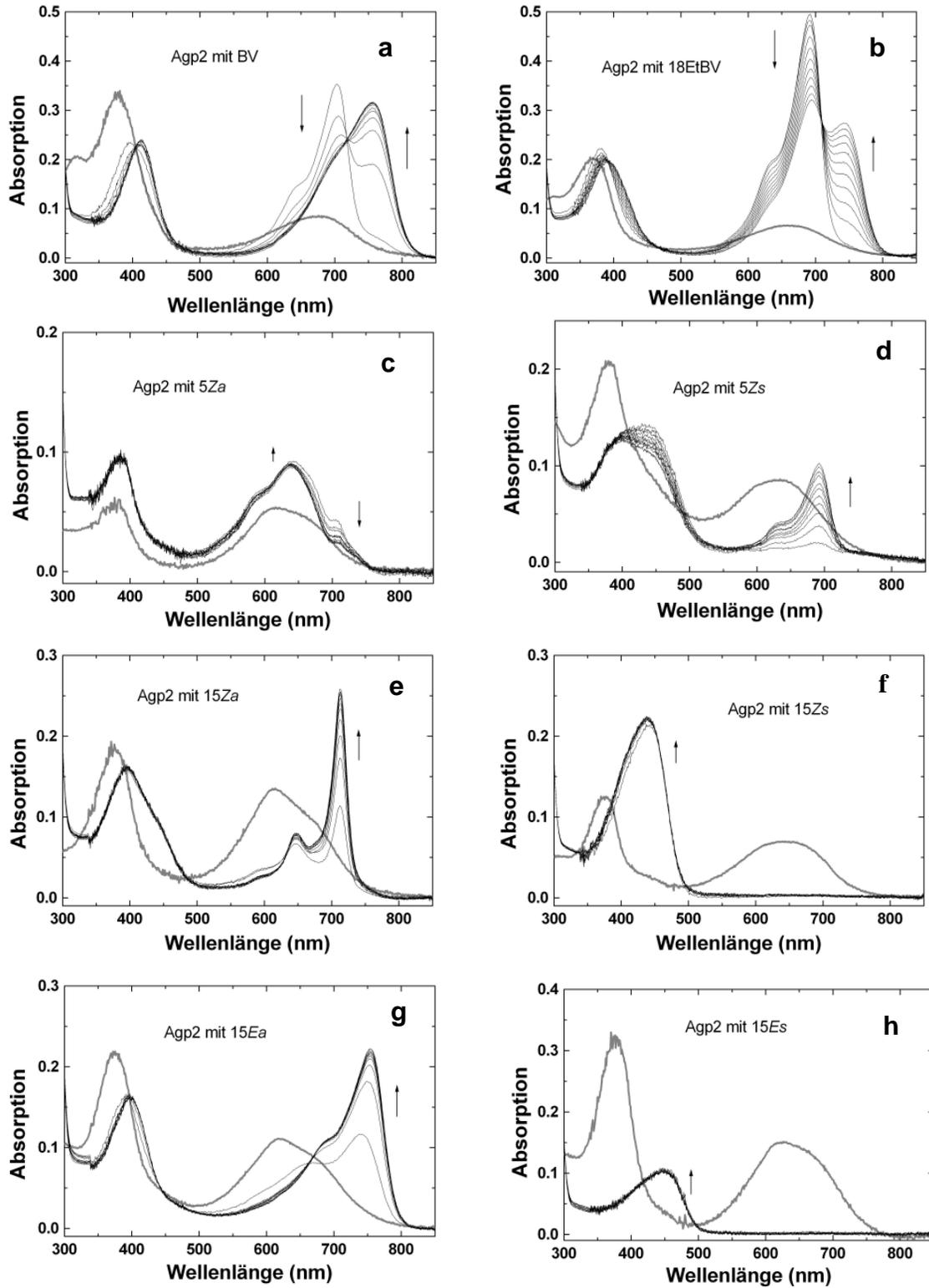
**Abbildung 26:** Autophosphorylierung von Agp1 Apoprotein und Chromophor-Addukten. Die BV und 18EtBV-Addukte wurden unbestrahlt (Pr) oder nach saturierender Rotlichtbestrahlung (Pfr) untersucht. Nach Inkubation mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  für 5 min, wurden die Proben auf ein SDS-Gel geladen, geblottet und durch Phosphorimaging analysiert. Die Flächen um die 85 kDa Agp1-Banden sind gezeigt. Die relativen Intensitäten (Mittel  $\pm$  S.F. für vier Experimente) sind unter jedem Blot gegeben.

### 3.1.7. Assemblierung von *Agrobacterium* Phytochrom Agp2 mit arretierten Chromophoren

Wie Agp1 gehört Agp2 zu den Biliverdin bindenden Phytochromen. Es verknüpft seinen Chromophor autokatalytisch an das Cys 13 über eine Ring-A-Vinyl Seitenkette von BV. Auch hier wurde untersucht, ob die synthetischen Chromophore von dem Protein gebunden werden, wie gut sie in die Chromophortasche eingebaut werden und ob spektral aktive Addukte entstehen. Die Assemblierung von Agp2 mit Biliverdin ist mit einer Dunkelkonversion von Pr zu Pfr verknüpft (Abbildung 27a). Ein ähnlicher Assemblierungsverlauf wurde ebenfalls nach dem Mischen von Agp2 mit 18EtBV gefunden (Abbildung 27b). Mit BV wurde die maximale Pr-Absorption direkt eine Minute nach dem Mischen von Agp2 mit dem Chromophor erhalten, was zeigt, dass die

Chromophor-Protein-Interaktion sehr schnell erfolgt. Anschließend sinkt die Absorption bei 700 nm ab und steigt dafür im Bereich um 750 nm wieder an. Nach etwa 70 bis 100 min wird ein stabiler Zustand erreicht. Eine Minute nach dem Mischen von 18EtBV und Agp2 war ebenfalls eine sehr hohe Pr-Absorption messbar. Danach stieg die Absorption bei 692 nm bis zu einem Zeitpunkt von 6 min weiter an und sank anschließend aufgrund der Dunkelkonversion wieder ab. Der Pr-Absorptionsanstieg reflektiert möglicherweise erneut den Übergang von der nicht-kovalenten zur kovalenten Bindung des Chromophors. Abbildung 28 zeigt den Zeitverlauf der spektralen Veränderungen während der Assemblierung und Dunkelreversion von Agp2 mit BV und 18EtBV. Dazu wurde der Verlauf der Absorption bei 703 nm und 755 nm für das BV-Addukt, sowie bei 692 nm und 740 nm für das 18EtBV-Addukt dargestellt. Die Wellenlängen entsprachen dem  $\lambda_{\max}$  der Pr- bzw. Pfr-Form der beiden Addukte. Die Darstellung zeigt, dass sowohl die Assemblierung als auch die Dunkelreversion mit 18EtBV langsamer verläuft als mit BV. Man sollte hierbei beachten, dass der einzige Unterschied zwischen BV und 18EtBV eine Substitution an der C18 Position ist, d.h. die Vinylgruppe in Biliverdin wird durch eine Ethylgruppe in 18EtBV ersetzt. Das ist der gleiche Unterschied, wie er auch zwischen P $\Phi$ B, dem natürlichen Chromophor von Pflanzen, und PCB, dem natürlichen Chromophor von Cyanobakterien, zu finden ist. Es wurde beobachtet, dass das P $\Phi$ B-Addukt des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 eine Dunkelreversion macht, während das PCB-Addukt kaum rückkonvertiert (Yeh et al., 1997). Die Chromophore 15Za, 15Zs, 15Ea und 15Es, 5Zs und 5Es wurden ebenfalls in das Agp2-Apoprotein eingebaut, was durch spektrale Veränderungen nach einer Mischung von Protein und Chromophor nachgewiesen werden konnte (Abbildung 27c-h). Darüber hinaus wurden SDS-Entsalzungssäulen-Tests durchgeführt. Diese zeigten, dass nach Abschluß der Assemblierung alle verwendeten Chromophore kovalent an das Protein gebunden wurden (Daten nicht gezeigt). Für keinen der arretierten Chromophore war die Assemblierung von einer Dunkelkonversion in eine andere Form begleitet. Die 15Za- und 15Ea-Addukte waren den entsprechenden Agp1-Addukten ähnlich und glichen spektral einer Pr- bzw. Pfr-Form. Die Assemblierung von 15Za mit Agp2 erfolgte weit langsamer als die von 15Ea, BV oder 18EtBV. Der Anstieg der Absorption während der Assemblierung von Agp2 mit 15Za war erst nach 24 h abgeschlossen, während die Assemblierung mit den andern drei Chromophoren nach 60 bis 300 min abgeschlossen war (Abbildungen 28 und 29). Die Messungen mit 15Za zeigen, dass die Ausbildung einer kovalenten Bindung in der Pr-Form möglich ist, während die langsame Assemblierung vermuten lässt, dass der Chromophor nicht gut in die Chromophortasche des Agp2 Apoproteins passt und somit die vollständige Assemblierung beträchtliche Konformationsveränderungen des

Proteins nötig macht. Der Einbau der Chromophore *15Zs* und *15Es* erfolgte wieder sehr schnell, und das Chromophor-Absorptionsspektrum veränderte sich sofort nach dem Mischen mit dem Protein. Anschließend erfolgten keine weiteren signifikanten Veränderungen. Die *15Zs*- und *15Es*-Addukte hatten ein Absorptionsmaximum im blauen Wellenlängenbereich und waren den entsprechenden Agp1-Addukten damit ähnlich. Nach Assemblierung von *5Zs* mit Agp2 entstand ein Pr-ähnliches-Addukt, wie es für Agp1 gefunden wurde. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass das *5Zs*-Agp2-Addukt keine Dunkelkonversion in eine Pfr-ähnliche Form zeigt. Man muss annehmen, dass die Z zu E Isomerisierung um die C15=C16 Doppelbindung höchstwahrscheinlich den ersten Schritt für die Agp2 Dunkelkonversion darstellt. Diese Isomerisierung ist in dem *5Zs*-Agp2-Addukt nicht eingeschränkt. Bei der Assemblierung von *5Za* entsteht sofort nach dem Mischen eine Absorptionsbande im 700 nm Bereich und verschwindet danach. Diese Besonderheit während der Assemblierung wurde sowohl für *5Za*-Agp2 und *5Za*-Agp1 gefunden. Agp2 assembliert mit *5Za* wesentlich schneller als mit *5Zs*. Während die Assemblierung mit *5Za* nach wenigen Minuten abgeschlossen war, stieg der  $\lambda_{\max}$  Wert für das Addukt aus Agp2 mit *5Zs* nach 100 min noch weiterhin leicht an. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass *5Za* besser in die Chromophortasche von Agp2 passt als *5Zs*. Das Absorptionsmaximum des *5Za*-Agp2-Addukts ist niedriger als das des *5Zs*-Agp1-Addukts. Das Erstere liegt bei 640 nm, das Letztere bei 672 nm. Für *5Za*-Agp2 konnte keine eindeutige Dunkelkonversion während der Assemblierung festgestellt werden, solange die Verminderung der Absorption bei 700 nm nicht als Hinweis für eine Dunkelkonversion verstanden wird. In Abbildung 29 wurde der Zeitverlauf der Assemblierung von Agp2 mit den arretierten Chromophoren *15Za*, *15Zs*, *15Ea* und *15Es*, *5Za* und *5Zs* vergleichend dargestellt. Dazu wurde der Verlauf der Absorption beim jeweiligen  $\lambda_{\max}$  Wert der Pr-Form für die entsprechenden Chromophor-Addukte dargestellt.



**Abbildung 27:** Assemblierung von Agp2 mit allen in Abbildung 14 dargestellten Chromophoren. Die Spektren während der ersten 51 min nach dem Mischen von Chromophor und Protein wurden in 5 min Intervallen (schwarze Linien) gemessen. Die Richtung der Absorptionsveränderungen wird durch Pfeile angezeigt.

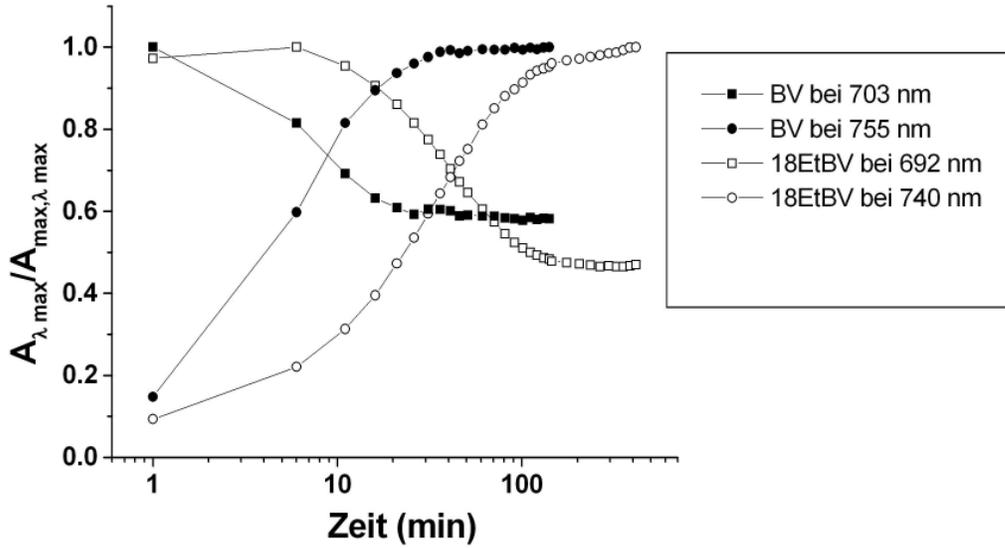


Abbildung 28: Zeitverlauf der spektralen Veränderung während der Assemblierung von Agp2 mit BV und 18EtBV.

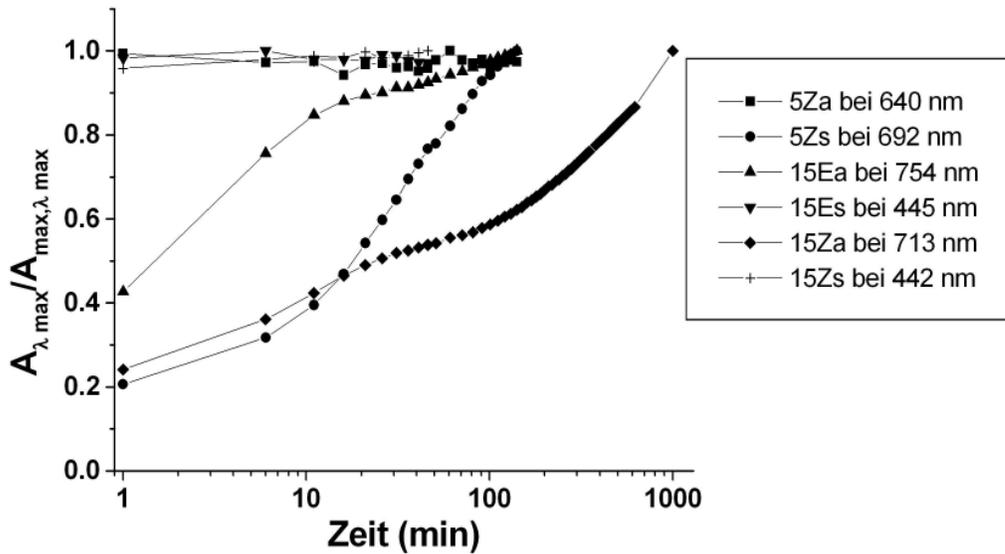


Abbildung 29: Zeitverlauf der spektralen Veränderung während der Assemblierung von Agp2 mit verschiedenen arretierten Chromophoren.

### 3.1.8. Photokonversion von Agp2-Addukten

Die Addukte aus *15Za*, *15Zs*, *15Ea* bzw. *15Es* und Agp2 zeigten wie die entsprechenden Agp1-Addukte während der Bestrahlung mit Licht ebenfalls keine Konversion von Pr zu Pfr bzw. von Pfr zu Pr. Damit konnte nachgewiesen werden, dass der Chromophor auch bei Agp2 in der Pr-Form eine *15Za*-, bzw. in der Pfr-Form eine *15Ea*-Stereochemie einnimmt, wodurch die Bedeutung der *Z*- zu *E*-Isomerisierung für die Photokonversion von Agp2 herausgestellt werden konnte.

Die Spektren der BV-, 18EtBV-, *5Za*-, *5Zs*-Agp2-Addukte vor und nach Bestrahlung sind in Abbildung 30a-d dargestellt. Nach Bestrahlung von BV- und 18EtBV-Agp2 mit dunkelrotem Licht entsteht eine Pr-Form. Zwischen beiden Addukten gibt es jedoch einen qualitativen Unterschied. Die relative Absorption von 18EtBV-Agp2 Pr ist deutlich höher als die von BV-Agp2 Pr. Die Bestrahlung des *5Zs*-Agp2-Adduktes mit Rotlicht resultierte in einem Blaushift des Absorptionsmaximums von 692 nach 675 nm. Damit war das Spektrum von *5Zs*-Agp2 dem von *5Zs*-Agp1 sehr ähnlich. Die Assemblierung mit *5Zs* führt somit zu einem Verlust der typischen spektralen Charakteristik von Agp2.

Die Bestrahlung des *5Za*-Agp2-Adduktes resultierte in einem Anstieg der Absorption um 700 nm. Ein Teil des *5Za*-Adduktes konvertiert also zu einer Form, die bei längeren Wellenlängen absorbiert. Damit erinnert die Photokonversion von *5Za*-Agp2 an eine Pr zu Pfr Photokonversion. Das Spektrum des Photoproduktes ist jedoch signifikant unterschiedlich vom Pfr-Spektrum des BV- oder 18EtBV-Adduktes.

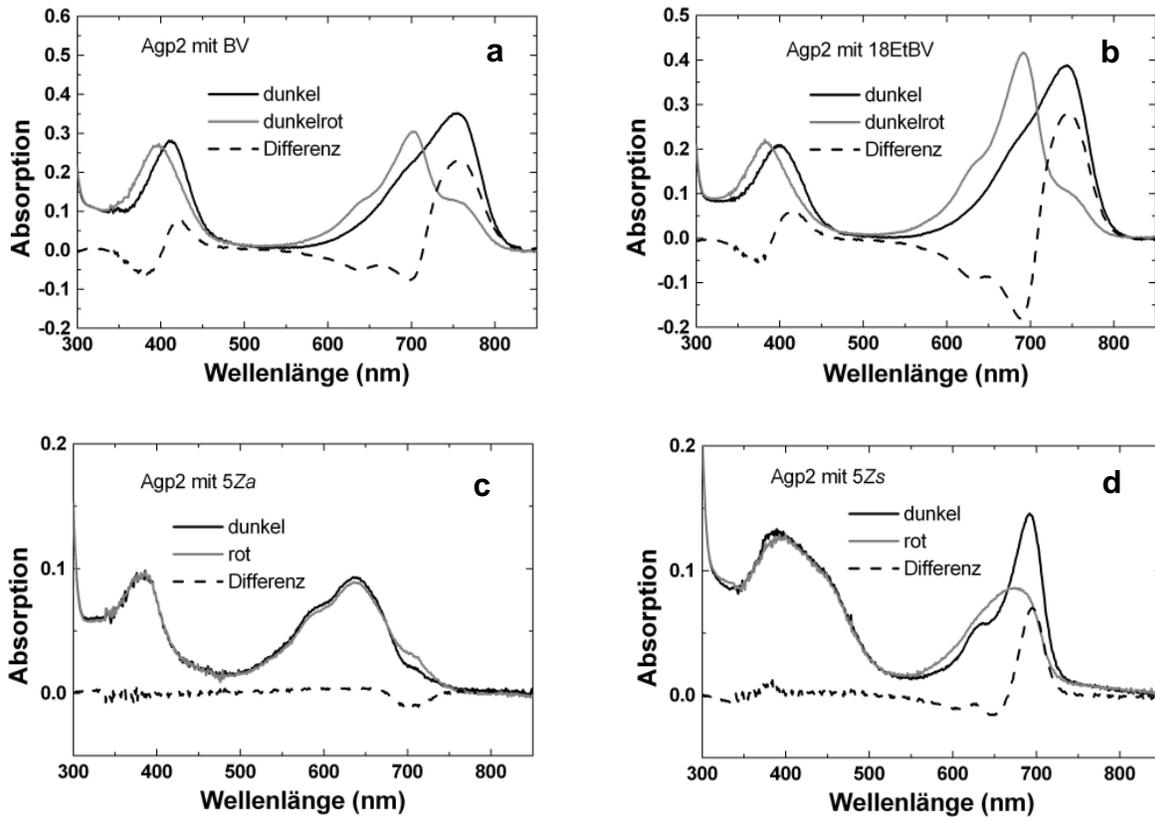


Abbildung 30: Photokonversion von Agp2-Addukten mit (a) BV, (b) 18EtBV, (c) 5Za und (d) 5Zs. Die Spektren wurden nach Dunkelassemblierung (schwarze Linie) oder nach Bestrahlung der Proben für 10 min mit entweder rotem Licht (c, d; 655 nm;  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder mit dunkelrotem Licht (a, b; 785 nm;  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) aufgenommen. Die „dunkel - rot“ oder „dunkel - dunkelrot“ Differenzspektren werden durch gestrichelte Linien dargestellt.

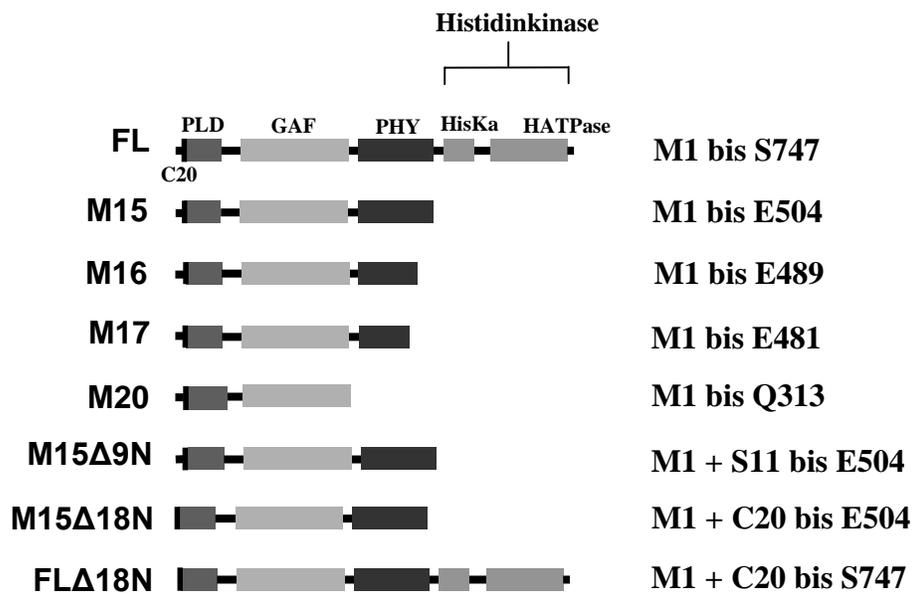
### 3.2. Photokonversion von Agp1 und Bedeutung der Proteindomänen

Wie in Teil 3.1 dieser Arbeit beschrieben, beginnt die Photokonversion von Phytochrom mit einer *Z* zu *E* Isomerisierung um die Doppelbindung zwischen den Ringen C und D des Bilinchromophors. Die Photoisomerisierung zieht neben Konformations- und Konfigurationsveränderungen des Chromophors auch strukturelle Veränderungen am Protein nach sich.

Dieser Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, welche strukturellen Veränderungen auf der Ebene des Proteins während der Photokonversion stattfinden. Strukturelle Veränderungen auf der Ebene des Proteins lassen sich mit verschiedenen Protein-analytischen Methoden untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Konformationsveränderungen des Proteins mit Hilfe von Gelfiltration, limitierter Proteolyse und „crosslinking“ untersucht. Weiterhin sollte die Bedeutung verschiedener Proteindomänen für die Photokonversion überprüft werden. Dazu wurden verschiedene Deletionskonstrukte von Agp1 hergestellt und bezüglich der Chromophorassamblierung, Photokonversion und Dunkelreversion spektral untersucht. Mit einigen dieser Konstrukte wurden auch die oben genannten Protein-analytischen Methoden zur Überprüfung der Konformationsänderungen nach Photokonversion durchgeführt. Die untersuchten Konstrukte sind in Abbildung 31 dargestellt. Bei M15 wurde der komplette C-terminale Teil des Proteins (HisKa und HATPase) entfernt, während alle Domänen des photosensorischen Teils von Agp1 erhalten sind. Bei M16 und M17 wurde ebenfalls der C-terminale Teil des Proteins und zusätzlich die ersten 15 bzw. 23 C-terminalen Aminosäuren der PHY-Domäne entfernt. Das M20-Fragment enthält die PLD- und die GAF-Domäne. Damit ist das M20-Fragment vergleichbar mit der Chromophor-bindenden Domäne des *Deinococcus* Phytochrom DrBphP, welches von Wagner et al. (2005) für die Röntgenstrukturanalyse verwendet wurde. Um die Bedeutung der ersten N-terminalen Aminosäuren zu untersuchen, wurden zwei Konstrukte M15 $\Delta$ 9N und M15 $\Delta$ 18N verwendet, die die PAS-, GAF- und PHY-Domäne besitzen, wobei beim ersteren Konstrukt die Aminosäuren Gln 2 bis Met 10 und beim letzteren Konstrukt die Aminosäuren Gln 2 bis Ser 19 entfernt wurden. In einem weiteren Konstrukt FL $\Delta$ 18N sind ebenfalls die 18 N-terminalen Aminosäuren entfernt, aber alle anderen photosensorischen Domänen und die Histidinkinase erhalten.

Die verschiedenen Deletionskonstrukte wurden in *E. coli* Zellen exprimiert. Die Expressionsstärke und Löslichkeit der Konstrukte wurde dokumentiert und mit denen von Agp1

verglichen. Die Löslichkeit der Agp1-Mutanten wurde durch einen Vergleich des Proteingehalts im Überstand und Pellet von *French Press* aufgeschlossenen Zellen überprüft. Alle Proteine konnten in *E. coli* exprimiert werden, aber die Stärke der Expression war verschieden und die Löslichkeit der Proteine unterschiedlich gut. Die stärkste Expression wurde mit FL und M15 erzielt. Diese Konstrukte waren sehr gut löslich. Sowohl FL $\Delta$ 18N als auch M15 $\Delta$ 18N wurden nur schwach exprimiert (ca. 5% von Agp1) und ihre Löslichkeit im Rohextrakt war sehr gering. Die Expressionsausbeuten von M16 und M17 betragen 80-90% der Ausbeute mit Agp1, aber die Löslichkeit dieser Konstrukte war sehr gering. M20 zeigte eine Expressionsausbeute von 60-70 % und M15 $\Delta$ 9N von 40-50% verglichen mit der von Agp1. Die Löslichkeit von M20 war sehr gering, die von M15 $\Delta$ 9N vergleichbar mit M15.



**Abbildung 31: Nomenklatur und Domänenstruktur von Agp1 und den Deletionsmutanten M15, M16, M17, M20, FL $\Delta$ 18N, M15 $\Delta$ 9N, M15 $\Delta$ 18N. Alle Proteine wurden mit einem N-terminalen 6-Histidintag für die Affinitätschromatographie exprimiert. FL ist das vollständige Agp1 Protein. Der von den Deletionskonstrukten abgedeckte Bereich an Aminosäuren ist auf der rechten Seite der Abbildung angegeben. Die erste und letzte Aminosäure wurden durch einen Buchstaben abgekürzt. Die Zahl hinter dem Buchstaben gibt die Position der Aminosäure innerhalb der Gesamtsequenz an.**

### 3.2.1. Einfluss der Proteindomänen auf die Assemblierung des Chromophors durch Agp1

Für die Assemblierung des Chromophors mit dem Phytochrom Apoprotein ist die Aufnahme in die vom Protein gebildete Chromophortasche und die kovalente Bindung mit Cys 20 notwendig. Ob nach Deletion verschiedener Proteindomänen oder einzelner Aminosäuren die strukturellen Voraussetzungen für den Einbau des Chromophors in das Protein und die Ausbildung einer Pr-Form gegeben sind, wird im Folgenden untersucht. Der autokatalytische Einbau des Chromophors (Assemblierung) geht mit einer Veränderung der spektralen Eigenschaften des Chromophors einher. Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, kommt es nach Einbau des Chromophors zu einem Anstieg der Absorption um 700 nm (Q-Bande), die Absorption im Bereich von 400 nm (Soretbande) bleibt erhalten. Daher kann die Assemblierungskinetik durch Verfolgen des Absorptionsanstiegs bei 700 nm mit UV/vis Spektroskopie verfolgt werden. Dazu wird nach dem Mischen von Protein und Chromophor sofort und nach 5 min Abständen ein Spektrum aufgezeichnet (Abbildung 32). Die Assemblierung von FL und M15 war, wie in früheren Studien von Lamparter et al. (2002), 1-5 min nach Mischung von Protein und Chromophor abgeschlossen, d.h. dann erfolgte kein weiterer Anstieg der Absorption bei 700 nm. (Abbildung 32a und b). Auch die anderen Konstrukte bauten BV ein. BV assemblierte mit M15 $\Delta$ 9N und M15 $\Delta$ 18N (Abbildung 32g und h) in der gleichen Geschwindigkeit wie mit FL. Die Assemblierung mit FL $\Delta$ 18N war etwas langsamer und nach 20 min beendet (Abbildung 32f). Offenbar hat die Histidinkinase einen negativen Einfluss auf die Chromophorassemblierung, wenn die Sequenz N-terminal der Chromophorbindestelle fehlt. Alle drei im N-Terminus deletierten Konstrukte bildeten nach Assemblierung mit BV eine Pr-Form, die spektral mit der von FL vergleichbar war. Die Assemblierung von M20 mit BV dauerte relativ lange und war erst nach 60 min beendet (Abbildung 32e). Trotz der vollständigen Entfernung der PHY-Domäne wurde eine Pr-Form gebildet, die ähnliche spektrale Eigenschaften wie FL besitzt. Die Assemblierungsspektren von M16 und M17 waren ziemlich ungewöhnlich. Nach der Mischung von BV mit dem Protein stieg die Absorption bei 702 nm nur leicht an. Die Assemblierung war nach 20 min abgeschlossen (Abbildung 32c und d). Die Spektren zeigen zwar, dass der Chromophor in das Protein eingebaut wird, die spektrale Integrität ist jedoch deutlich beeinträchtigt. Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Protein-Faltung der M16- und M17-Konstrukte von der für die entsprechenden Bereiche des Agp1-Proteins abweicht. Die beiden Konstrukte sind ebenfalls schlecht löslich. Aus diesem Grund wurden M16 und M17 nicht

weiter analysiert. Die Assemblierungsstudien zeigten, dass eine Entfernung der ersten Aminosäuren den Chromophoreinbau nicht beeinträchtigen, während die PHY-Domäne einen positiven Einfluss auf die Ausbildung eines Protein-Chromophoradduktes hat.

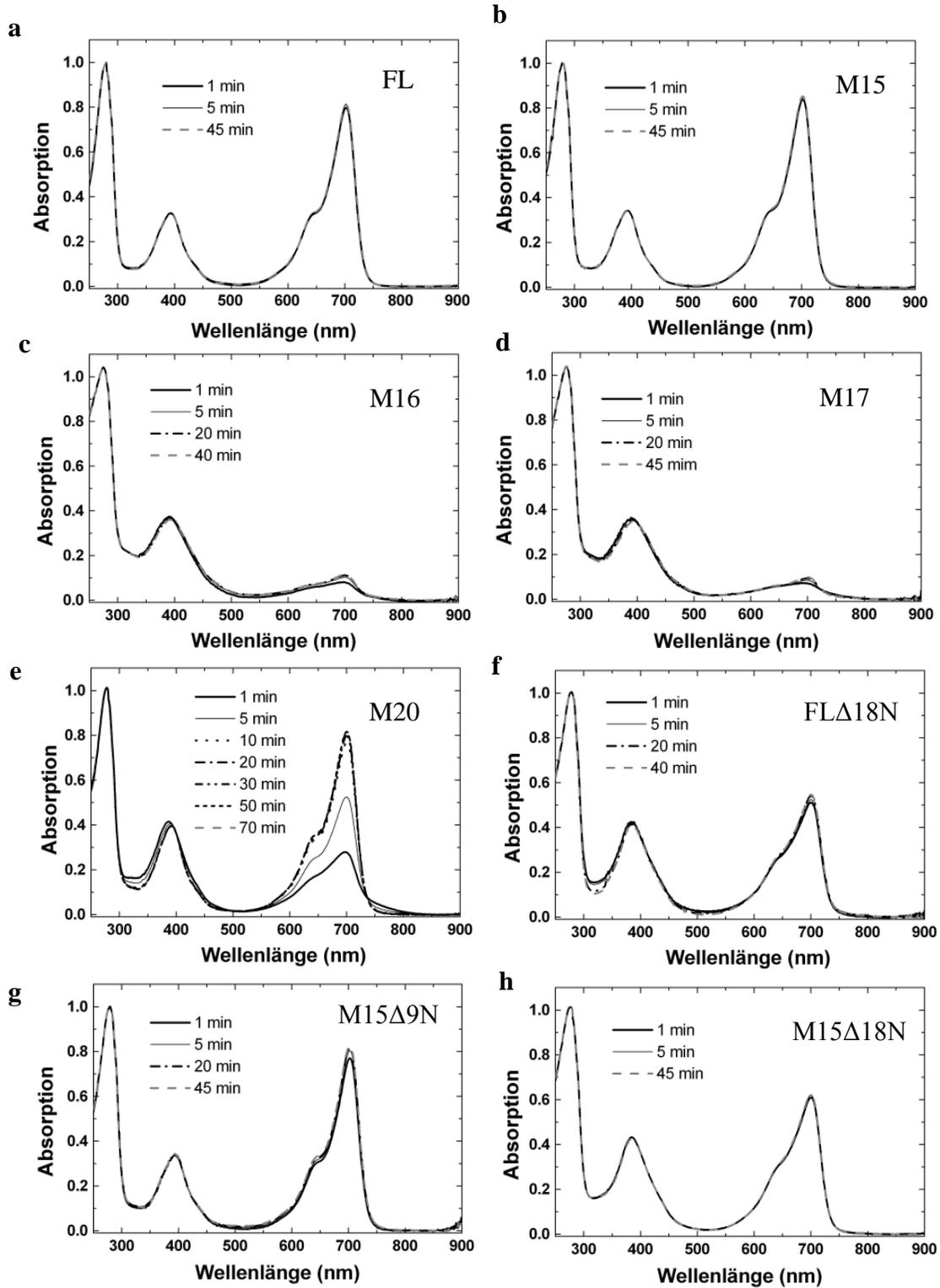


Abbildung 32: Spektrale Veränderungen während der Assemblierung von FL, M15, M16, M17, M20, FL $\Delta$ 18N, M15 $\Delta$ 9N und M15 $\Delta$ 18N mit Biliverdin. Die Konstrukte wurden mit BV gemischt und dann sofort, bzw. alle 5 min ein Spektrum gemessen. Im Fall von FL, M15, M16, M17, FL $\Delta$ 18N, M15 $\Delta$ 9N und M15 $\Delta$ 18N waren nur geringe oder keine spektralen Veränderungen nach 5 min messbar. Die vollständige Assemblierung von M20 dauerte 70 min. Die durchgehenden, gestrichelten und gepunkteten Linien repräsentieren die Absorptionsspektren zwischen 1 min und 70 min.

### 3.2.2. Einfluss der Proteindomänen auf die Photokonversion von Agp1

Nach Assemblierung von Agp1 mit BV wird die Pr-Form gebildet, die Pfr-Form entsteht durch Bestrahlung mit Rotlicht (Abbildung 33). Die Umwandlung von Pr zu Pfr wird als Photokonversion bezeichnet und lässt sich spektral messen. Abbildung 33a zeigt die Spektren der Pr- und Pfr-Form von Agp1. Das Pr-Spektrum von Agp1 besitzt eine Absorptionsbande im blauen Wellenlängenbereich um 400 nm (Soretbande) und eine im roten Wellenlängenbereich um 702 nm (Q-Bande). Die Photokonversion von Agp1 ist durch eine Verschiebung der Q-Bande von 702 zu 750 nm und eine Verschiebung der Soretbande von 400 zu 415 nm gekennzeichnet. Die gestrichelte Linie in Abbildung 33a-f stellt das Differenzspektrum dar, das sich aus der Differenz des Pr- und Pfr-Spektrums ergibt. Die Spektren von BV-M15 bzw. BV-M15 $\Delta$ 9N (Abbildung 33b und Abbildung 33e) sind sowohl in der Pr- als auch in der Pfr-Form mit denen von FL (Abbildung 33a) vergleichbar.

Das Spektrum von M20 (Abbildung 33c) ähnelt dem von FL (Abbildung 33a). Durch Photokonversion kommt es zu einer Verschiebung der Q-Bande von 700 nm zu 750 nm. Die Absorption im Bereich von 750 nm war bei M20 jedoch deutlicher geringer als bei den anderen Addukten. Die Position der Soret-Bande änderte sich nach Photokonversion nicht, jedoch stieg die Absorption in diesem spektralen Bereich an. Die spektralen Eigenschaften des M20 Photoproduktes sind vergleichbar mit denen anderer Phytochromfragmente, wie der Chromophor-bindenden Domäne von *Deinococcus* Phytochrom (Wagner et al., 2005), den N-terminalen 450 Aminosäuren von *Arabidopsis* Phytochrom B (Oka et al., 2004) und dem 39 kDa proteolytischen Fragment von Hafer Phytochrom (Kneip et al., 2000 und Reiff et al., 1985). Ein Intermediat des Photozyklus von Agp1, genannt meta-Rc hat ebenfalls vergleichbare spektrale Eigenschaften (Borucki et al., 2005). Die Pr-Form des FL $\Delta$ 18N und des M15 $\Delta$ 18N-Adduktes (Abbildung 33d und Abbildung 33f) ist spektral vergleichbar mit der von FL, aber der Extinktionskoeffizient der Q-Bande ist signifikant kleiner. Die Spektren der Pfr-Form dieser Addukte sind mit dem M20 Spektrum im Bereich der Q-Bande vergleichbar. Im Bereich der Soret-Bande ähnelt das Spektrum dieser Addukte dem des FL-Adduktes (Durch Photokonversion wird die Soret-Bande leicht in den längeren Wellenlängenbereich verschoben).

Durch die Photokonversionsstudien mit verschiedenen Agp1-Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, dass die ersten 9 N-terminalen Aminosäuren für die korrekte Pfr-Bildung nicht wichtig sind, während die Aminosäuren 11-19 dafür eine entscheidende Rolle spielen. Wie auch schon

für andere Phytochrome beobachtet wurde, ist die PHY-Domäne von Agp1 ebenfalls für die Pfr-Bildung bedeutend (Wagner et al., 2005; Oka et al., 2004). Sowohl die Deletion der ersten 11-19 AS, als auch der PHY-Domäne führen zu einer Verminderung der Pfr-Absorption bei 750 nm. Die Beeinträchtigung der spektralen Integrität von photokonvertierten FL $\Delta$ 18N-, M15 $\Delta$ 18N- und M20-Addukten entsteht möglicherweise dadurch, dass die Photokonversion unvollständig erfolgt. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Photoprodukt der Deletionskonstrukte M15 $\Delta$ 18N, FL $\Delta$ 18N und M20 um das Intermediat meta-R<sub>c</sub>. Die Umwandlung von meta-R<sub>c</sub> zu Pfr ist nur möglich, wenn sowohl die PHY-Domäne als auch die Aminosäuren 11-19 vorhanden sind.

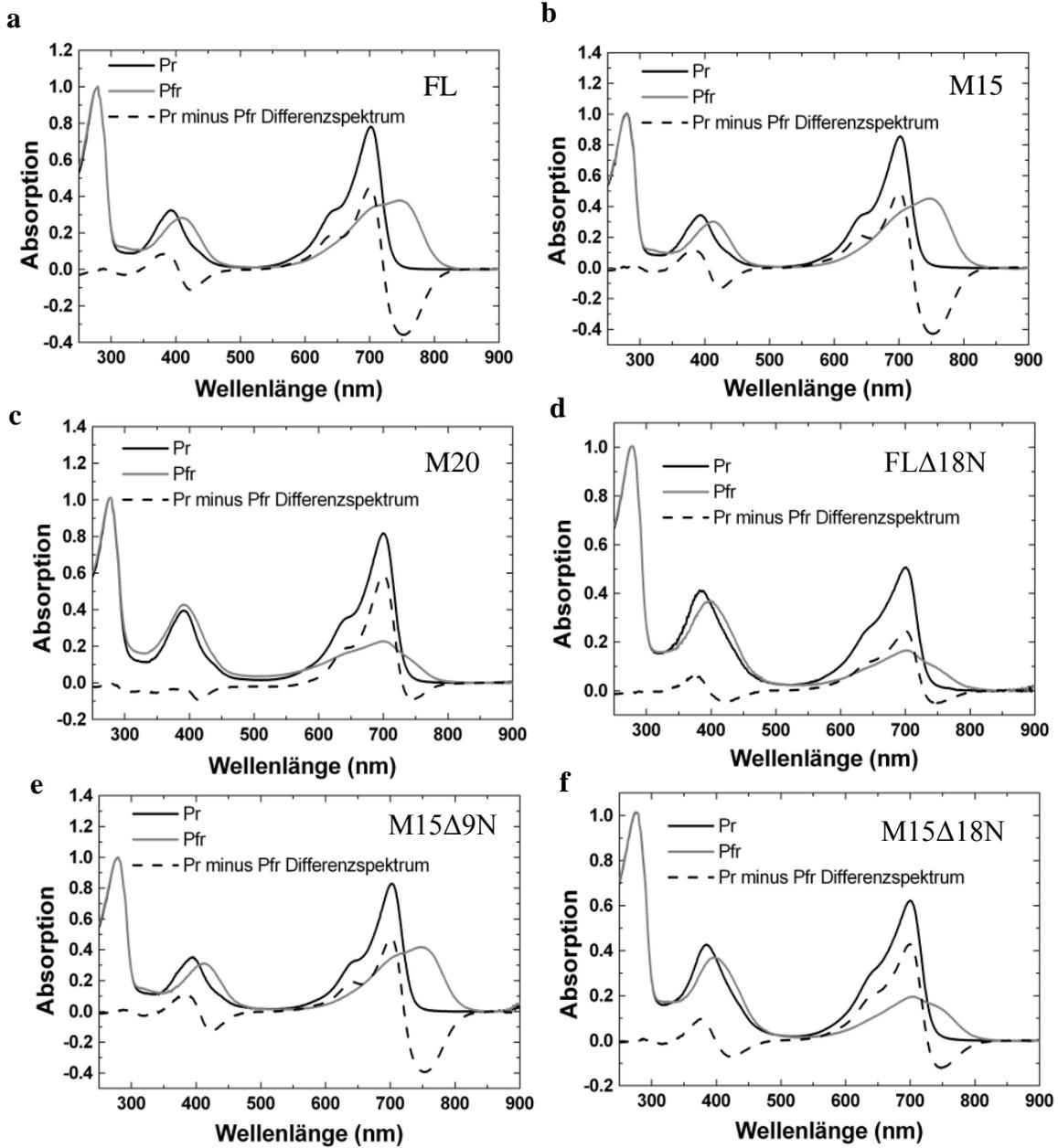


Abbildung 33: Spektren von BV-FL, BV-M15, BV-M20, BV-FL $\Delta$ 18N, BV-M15 $\Delta$ 9N und BV-M15 $\Delta$ 18N nach Dunkelinkubation und Rotlichtbestrahlung. Die gestrichelte Linie ist das Differenzspektrum, das sich aus der Differenz von Pr und Pfr ergibt. Das Pr-Spektrum wurde nach vollständiger Assemblierung im Dunkeln aufgenommen, das Pfr-Spektrum nach 5-minütiger Bestrahlung mit rotem Licht. Für die Konstrukte M20, FL $\Delta$ 18N und M15 $\Delta$ 18N wird das Spektrum nach Rotlichtbestrahlung als Pfr bezeichnet. Es handelt sich jedoch wahrscheinlich um das Intermediat meta-R<sub>c</sub>.

### 3.2.3. Bedeutung der Agp1 Domänen für die Stabilität der Pfr-Form

Wie andere Phytochrome konvertiert Agp1 im Dunkeln allmählich von Pfr zu Pr (Lamparter et al, 2002). Die Dunkelreversion wurde sofort nach sättigender Rotlichtbestrahlung durch Messung der Absorption bei 750 nm und über eine Zeit von 100 min verfolgt. In Abbildung 34 ist für FL und verschiedene Deletionskonstrukte der Zeitverlauf der Dunkelreversion dargestellt. Dazu wurde für die verschiedenen Konstrukte das Verhältnis aus dem Pfr-Anteil des Phytochroms zu bestimmten Zeitpunkten der Dunkelreversion zum Pfr-Anteil nach sättigender Rotlichtbestrahlung berechnet. Diese Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen. Durch einen Vergleich der Kurven für die verschiedenen Deletionskonstrukte mit der von FL konnten Aussagen über den Einfluss der Histidinkinase, PHY-Domäne und der ersten N-terminalen Aminosäuren auf die Stabilität von Pfr getroffen werden.

Die Dunkelreversion von Pfr zu Pr war bei FL stärker als bei M15. Das zeigt, dass die Histidinkinase einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Pfr im Dunkeln hat.

Die Dunkelreversion von M15 $\Delta$ 9N war bis zu einer Zeit von etwa 30 min geringer und anschließend etwas stärker als bei FL. Die Rückkonversion von M15 $\Delta$ 9N war gegenüber der von M15 erhöht. Das bedeutet, dass die ersten 9 Aminosäuren die Stabilität von Pfr positiv beeinflussen. Die Dunkelreversion war bei M15 $\Delta$ 18N und FL $\Delta$ 18N stark beschleunigt, was zeigt, dass die Aminosäuren 11-19 für der Pfr-Stabilität sehr wichtig sind. M20 hatte die niedrigste Dunkelreversionsrate. Die PHY-Domäne hat also einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Photoproduktes.

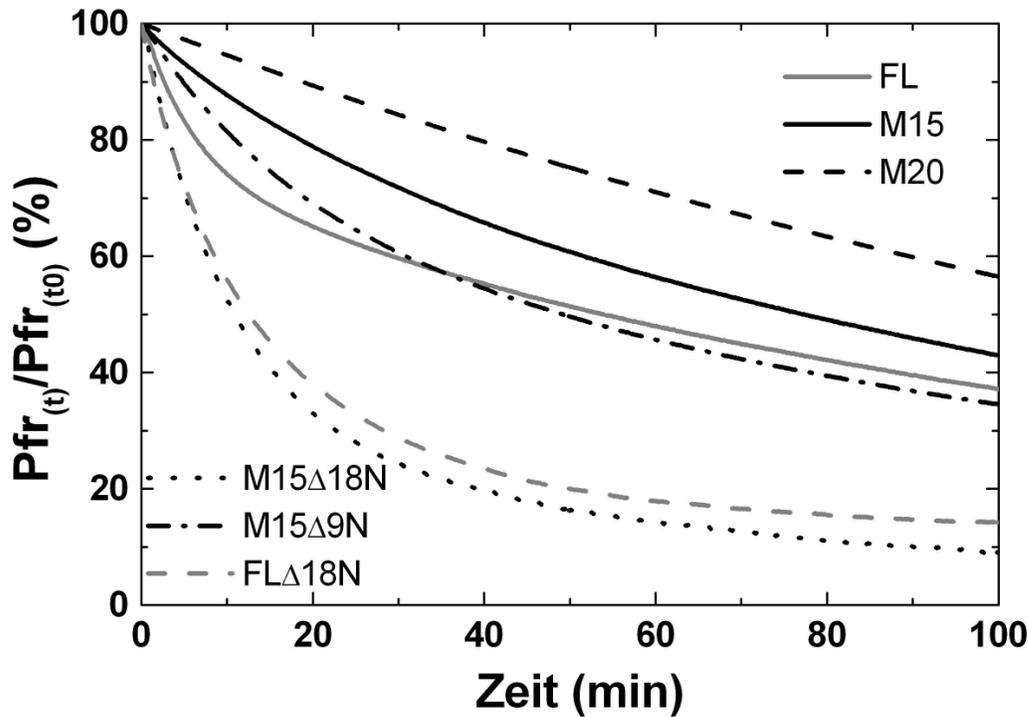


Abbildung 34: Dunkelreversion (Pfr zu Pr) von BV-FL, BV-M15, BV-M20, BV-M15Δ18N, BV-M15Δ9N, BV-FLΔ18N nach saturierender Rotlichtbestrahlung. Es wurde die Absorption bei 700 nm über eine Zeitspanne von 100 min mit einer Rate von 10 Messungen/min dokumentiert. Der Wert von 100 % entspricht dem Pfr-Anteil im Photogleichgewicht. Pfr (t = 0).

### 3.2.4. Gelfiltration mit FL und den Deletionskonstrukten

Während der Gelfiltrationsexperimente wurde die Mobilität des Apoproteins, der Pr- und Pfr-Formen von FL und der Agp1-Deletionskonstrukte M15, M20, FLΔ18N, M15Δ9N und M15Δ18N untersucht. Wie bereits in früheren Untersuchungen festgestellt wurde, zeigte das vollständige Agp1-Protein keine Mobilitätsunterschiede für das Apoprotein, die Pr- und Pfr-Form. Alle drei eluierten mit einem Molekulargewicht von 270 kDa (Abbildung 35a). Ähnlich verhielt sich auch FLΔ18N, bei dem das Apoprotein, sowie Pr- als auch Pfr-Form mit einem Molekulargewicht von 240 kDa eluierten (Abbildung 35d). Die scheinbaren Molekulargewichte für das M15 Apoprotein, sowie die Pr- und Pfr-Form betragen 87 kDa, 85 kDa und 120 kDa (Abbildung 35b). Ein qualitativ ähnliches Ergebnis erhielt man mit M15Δ9N, wo das Apoprotein und die Pr-Form mit dem scheinbaren Molekulargewicht von 81 kDa und die Pfr-Form mit 110 kDa eluierten (Abbildung 35e). Vermutlich sind die größeren apparenten Molekulargewichte der

Pfr-Formen von M15 und M15 $\Delta$ 9N auf eine Dimerisierung oder auf eine Konformationsänderung, die eine stärkere Interaktion mit der Säule bewirkt, zurückzuführen.

Die lichtinduzierte Veränderung der Mobilität ging bei M15 $\Delta$ 18N verloren. Sowohl das Apoprotein als auch die Pr- und Pfr-Form eluierten mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 83 kDa. Die N-terminalen Aminosäuren 11-19 sind also für die Konformationsveränderung von Agp1 während der Photokonversion von wichtiger Bedeutung. Andererseits könnte auch die im Vergleich zu M15 und M15 $\Delta$ 9N beschleunigte Dunkelreversion des M15 $\Delta$ 18N-Konstruktes (siehe Abbildung 34) die Ursache dafür sein, dass lichtinduzierte Konformationsveränderungen durch Gelfiltration nicht nachweisbar sind. Bei M20 zeigten sich geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen. M20 Apoprotein eluierte mit einem Molekulargewicht von 68 kDa, das nichtbestrahlte Addukt mit 61 kDa und das photokonvertierte Addukt mit 67 kDa (Abbildung 35c). Die Mobilitätsunterschiede zwischen dem Apoprotein, der Pr- und Pfr-Form waren bei M20 nicht mehr so deutlich wie bei M15. Die PHY-Domäne spielt für die Konformationsveränderungen während der Photokonversion von Agp1 ebenfalls eine entscheidende Rolle.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften kann man mit Hilfe der Gelfiltration erste Aussagen über die Quartärstruktur von Proteinen treffen. Durch einen Vergleich des scheinbaren Molekulargewichts im nativen Zustand mit dem berechneten Molekulargewicht des Monomers kann abgeschätzt werden, wie viele Untereinheiten im Phytochrommolekül miteinander verknüpft sind.

Im Fall von FL sind die Ergebnisse jedoch nicht schlüssig. Das scheinbare Molekulargewicht von 270 kDa für Agp1 kann folgendermaßen erklärt werden. Eine Phytochromeinheit wird durch zwei Untereinheiten von jeweils 85 kDa gebildet und die hohe Mobilität ist ein Resultat der nicht globulären Form des Dimers. Andererseits können auch mehr als zwei Untereinheiten miteinander verbunden sein. Die bisher untersuchten mikrobiellen Phytochrome sind Homodimere (Yeh et al., 1997; Park et al., 2000 und Bhoo et al., 2001), was vermuten lässt, dass die kleinste Untereinheit des Agp1 Proteins ein Dimer ist. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass zwei Dimere ein Tetramer bilden.

Der Nachweis von Dimeren und Oligomeren mit Hilfe der Gelfiltration ist limitiert. Während des Laufes durch die Gelsäule erfolgt eine starke Verdünnung des Proteins. Diese Verdünnung könnte zur Folge haben, dass schwach interagierende Untereinheiten dissoziieren. Ob Moleküle während des Laufes durch die Gelsäule miteinander assoziiert bleiben, hängt von ihrer

Dissoziationskonstante ab. Weiterhin spielt die Form der Moleküle für ihre Mobilität in der Säule eine wichtige Rolle. Aus diesen Gründen ist die genaue Quartärstruktur des Phytochroms mit dieser Methode nicht feststellbar. Deshalb wurden andere Methoden gewählt, um einen Einblick in die Quartärstruktur von Agp1 zu erhalten. Die Untersuchung der Dimerisierung von Agp1 durch „crosslinking“-Experimente wird im folgenden Kapitel beschrieben.

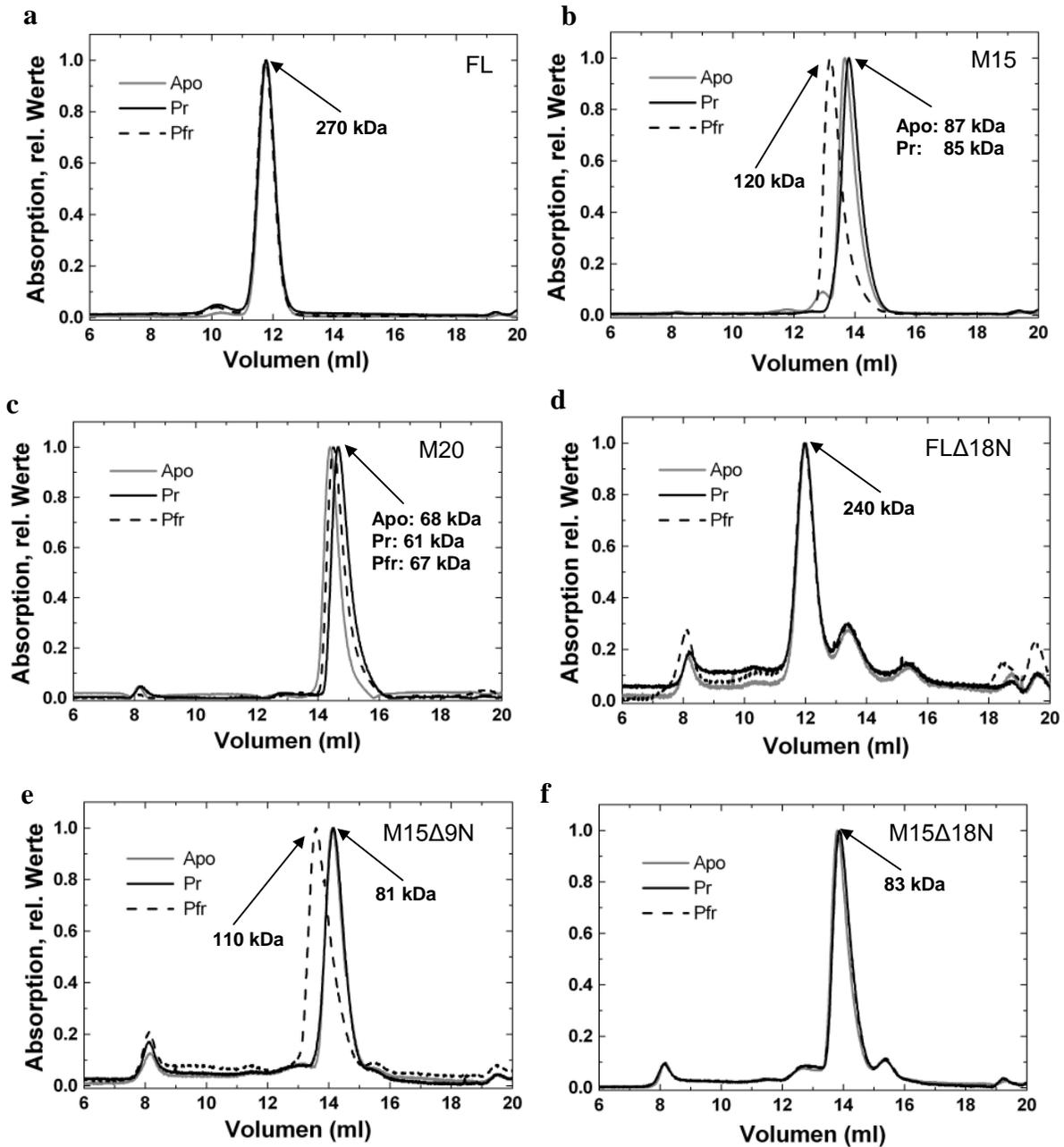


Abbildung 35: Größenausschlusschromatographie (SEC) mit FL, M15, M20, FLΔ18N, M15Δ9N, M15Δ18N, FL als auch die Deletionskonstrukte wurden über Ni-Affinitätschromatographie gereinigt. Für eine Vereinfachung des Vergleiches wurden alle Kurven vereinheitlicht. Apo, Apoprotein; Pr, Holoprotein nach Dunkelinkubation; Pfr, Holoprotein nach Rotlichtbestrahlung

### 3.2.5. Dimerisierung von FL und Deletionskonstrukten

Da die Proteinquartärstruktur durch Gelfiltration nicht genau bestimmbar ist, wurden „crosslinker“ Experimente durchgeführt. „Crosslinking“ ist ein Prozess der chemischen Verknüpfung zweier oder mehrerer Moleküle durch eine kovalente Bindung. Es dient der Analyse räumlicher Verhältnisse in Proteinen bzw. der Interaktion eines Proteins mit anderen Proteinen, Nukleinsäuren oder Lipiden. „Crosslinker“ enthalten reaktive Enden bezüglich spezifischer funktioneller Gruppen (z.B. primäre Amine, Schwefelwasserstoffe) von Proteinen und Molekülen, die miteinander vernetzt werden. Durch „crosslinker“ Studien kann die Konformationsänderung eines Proteins, in Form von inter- oder intramolekularen Interaktionen untersucht werden.

#### 3.2.5.1. Vorversuche

Nach einer erfolgreichen Verknüpfung von zwei Untereinheiten durch einen „crosslinker“ wandern diese mit dem apparenten Molekulargewicht eines Dimers in der SDS-Gelelektrophorese, da die kovalente Bindung durch SDS nicht zerstört wird. Es gibt verschiedene „crosslinker“, die entsprechend ihrer reaktiven Enden und ihrer Größe verschiedene Proteine unterschiedlich gut miteinander verknüpfen. Für die „crosslinking“ Untersuchungen wurden Vorversuche mit unterschiedlichen Agp1 Konzentrationen und drei verschiedenen „crosslinkern“ (Glutaraldehyd, Dimethylsuberimidat (DMS) und bis(Sulfosuccinimidyl)Suberate (BS<sup>3</sup>)) durchgeführt. Mit DMS war ein „crosslinking“ von Agp1 nicht möglich, d.h. auf dem SDS-Gel des mit DMS behandeltem Agp1 waren nur Monomere sichtbar. Mit BS<sup>3</sup> und Glutaraldehyd konnten bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml, einer Temperatur von 4°C und den „crosslinker“-Konzentrationen von 0,1 mM-10 mM Dimere nachgewiesen werden. Bei den Versuchen mit Glutaraldehyd waren bei „crosslinker“-Konzentrationen von 3,5-10 mM auch Oligomere sichtbar. Bei 18°C war die Reaktion mit beiden „crosslinkern“ effektiver, d.h. bei der gleichen Protein- und „crosslinker“-Konzentration entstand ein höherer Anteil an Dimeren und Oligomeren. Nach 3h Inkubationszeit bei 18°C mit 5 mM Glutaraldehyd und einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml haben nahezu alle Agp1 Proteinmoleküle eine „crosslinking“ Reaktion durchgeführt. Das unbehandelte Protein (Monomer) wandert auf dem SDS-Gel mit einem Molekulargewicht von 85 kDa. Die Glutaraldehyd behandelte Probe enthielt kein Monomer, zeigte aber zwei Hauptbanden bei 162 kDa und > 300 kDa (Abbildung 36a). Das

Molekulargewicht identifiziert die 162 kDa Bande eindeutig als Dimer. Die Bande > 300 kDa entspricht einem Tetramer oder einem größeren Oligomer. Die „crosslinking“ Daten bestätigen die Annahme, dass Agp1 Dimere bildet, zeigen aber auch, dass mehr als zwei Untereinheiten (wahrscheinlich Vielfache von zwei) miteinander verbunden sein können. Da durch die Vernetzung mit Glutaraldehyd bei 18 °C deutlichere und stärkere Dimer- und Oligomerbanden nachgewiesen werden konnten als mit BS<sup>3</sup>, wurde in den folgenden Experimenten Glutaraldehyd eingesetzt.

### **3.2.5.2. Lichtabhängige Interaktion der Moleküle von Agp1 und Agp1 Deletionskonstrukten**

Die folgenden „crosslinking“ Experimente wurden mit Apoprotein, dunkel assembliertem Holoprotein (Pr) und bestrahltem Holoprotein (Pfr) durchgeführt. Dabei wurden Proteinkonzentrationen zwischen 0,03 mg und 1 mg/ml untersucht (Abbildung 36). FL bildete bei allen Konzentrationen Dimere, d.h. die Monomerbande fehlte in allen Fällen (Abbildung 36a). Daraus kann man schließen, dass die Dissoziationskonstante für die Dimerisierung von FL weit unter 0,03 mg/ml liegt, d.h. unter  $\sim 0,3 \mu\text{M}$ . Oligomere wurden nur für hohe Proteinkonzentrationen gefunden. Die Dissoziationskonstante bewegt sich in diesem Fall in einer Größenordnung von 0,5-1 mg/ml, d.h. 5-10  $\mu\text{M}$ . Für FL wurden keine Unterschiede zwischen Apoprotein, nicht-bestrahltem und bestrahltem Addukt gefunden. Nicht „vernetzte“ M15 Monomere bewegen sich während der SDS – Gelelektrophorese mit einem apparenten Molekulargewicht von 55 kDa. Nach einer Behandlung mit Glutaraldehyd ist noch immer eine Monomerbande sichtbar, aber zusätzlich erscheinen Banden von 50 kDa, 110 kDa, 147 kDa und 193 kDa (Abbildung 36b). Vermutlich resultiert die 50 kDa Bande aus einem intramolekularen „crosslinking“ innerhalb einer Monomer Untereinheit. Die Kristallstruktur der Chromophorbindenden Domäne (CBD) von DrBphP zeigte, dass dieses Phytochromprotein einen kleeblattartigen Knoten bildet (Wagner et al, 2005). Vermutlich bildet Agp1 ebenfalls einen Knoten. Dieser wird durch das intramolekulare „crosslinking“ stabilisiert und bleibt daher nach SDS-Behandlung erhalten. Die 110 kDa, 147 kDa und 193 kDa Banden sind aufgrund ihrer Mobilität auf dem SDS-Gel Dimere, Trimere und Tetramere. Die Dimerbande und die 50 kDa Bande wurde unter allen gewählten Versuchsbedingungen erhalten, während die Trimer- und Tetramerbanden nur bei den Ansätzen mit höheren Proteinkonzentrationen sichtbar waren. Für Proteinkonzentrationen zwischen 0,03 mg/ml und 0,13 mg/ml war die Dimerbande in der Pfr-Form stärker ausgeprägt als die entsprechende Bande in der Apo- oder Pr-Form. Daraus lässt sich

schließen, dass die Assoziation zwischen den beiden Dimeruntereinheiten in der Pfr-Form stärker ist als in der Pr-Form. Die stärkere N-terminale Dimerisierung in der Pfr-Form erklärt die Pr-/Pfr-Mobilitätsunterschiede, die für M15 während der Gelfiltration gefunden wurden. Sie ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die für cyanobakterielles Phytochrom Cph1 gefunden wurden (Esteban et al., 2004). Bezüglich der Dimerbildung waren die „crosslinking“ Ergebnisse für M15 $\Delta$ 9N von mit denen von M15 vergleichbar. Das bedeutet, dass in dem Konzentrationsbereich zwischen 0,03 und 0,25  $\mu$ g/ml mehr kovalente Dimere in der Pfr- als in der Pr-Form nachweisbar waren. Ein intramolekular „verknüpftes“ Produkt mit einer etwas höheren Mobilität als das Monomer war ebenfalls bei M15 $\Delta$ 9N sichtbar, wenn es auch mit einer geringeren Effizienz gebildet wurde. Für M15 $\Delta$ 9N wurden keine Oligomere gefunden, was zeigt, dass die 9 N-terminalen Aminosäuren eine Assoziation der M15 Untereinheiten vermitteln. (Abbildung 36d). M15 $\Delta$ 18N Monomere wandern während der SDS-Gelelektrophorese mit einem Molekulargewicht von 55 kDa. Vernetzte Dimere wurden für alle getesteten Proteinkonzentrationen gefunden. Bei niedrigen Konzentrationen war die Pfr-Dimer-Bande etwas stärker als die Pr-Dimer Bande. Daher findet auch bei diesem Konstrukt eine konformationsabhängige Dimerisierung statt. Mit der Gelfiltration waren keine Lichteffekte nachweisbar, was möglicherweise auf die schnelle Rückkonversion dieses Konstruktes zurückzuführen ist. Dieses Konstrukt bildete keine Oligomere (Abbildung 36e). Banden, die aus einem intramolekularen „crosslinking“ resultieren, d.h. etwas kleiner als 55 kDa sein müssten, waren in diesem Fall nicht sichtbar. Die Kleeblattstruktur des *Deinococcus* Phytochrom entsteht dadurch, dass die 35 N-terminalen Aminosäuren oberhalb der PAS-Domäne eine Schleife durchlaufen, die durch eine Verbindung zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt 9 und der  $\alpha$ -Helix 7 der GAF-Domäne gebildet wird (Wagner et al., 2005). Vermutlich ist Ile 31 von Agp1 ein Teil dieses Knotens. Alle Aminosäuren N-terminal von Ile 31 liegen wahrscheinlich außerhalb des Knotens. Glutaraldehyd reagiert durch eine Aldolreaktion mit Aminosäuren, die eine freie Aminogruppe besitzen (Downer, 1985). In M15 $\Delta$ 18N gibt es N-terminal von Ile 31 keine Aminosäure mit einer stickstoffhaltigen Seitenkette. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Knotenstruktur in diesem Konstrukt durch Glutaraldehyd nicht stabilisiert wird. Nach einem „crosslinking“ von M20 entstanden Monomere, Dimere, Trimere und Tetramere mit einem Molekulargewicht von 33 kDa, 75 kDa, 112 kDa und 151 kDa (Abbildung 36c). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Apoprotein, der Pr- und Pfr-Form für alle getesteten Proteinkonzentrationen. Die PHY-Domäne ist also für die stärkere N-terminale Assoziation der Dimeruntereinheiten in der

Pfr-Form von Bedeutung. Die Dimerbande war im Vergleich zu den Monomer- und Oligomerbanden für alle Konzentrationen am stärksten ausgeprägt. Es gab keine Hinweise für ein intramolekulares „crosslinking“ während der Versuche mit M20. Das deutet darauf hin, dass die Stabilisierung des Knotens durch eine Interaktion der ersten N-terminalen Aminosäuren mit der PHY-Domäne erfolgt.

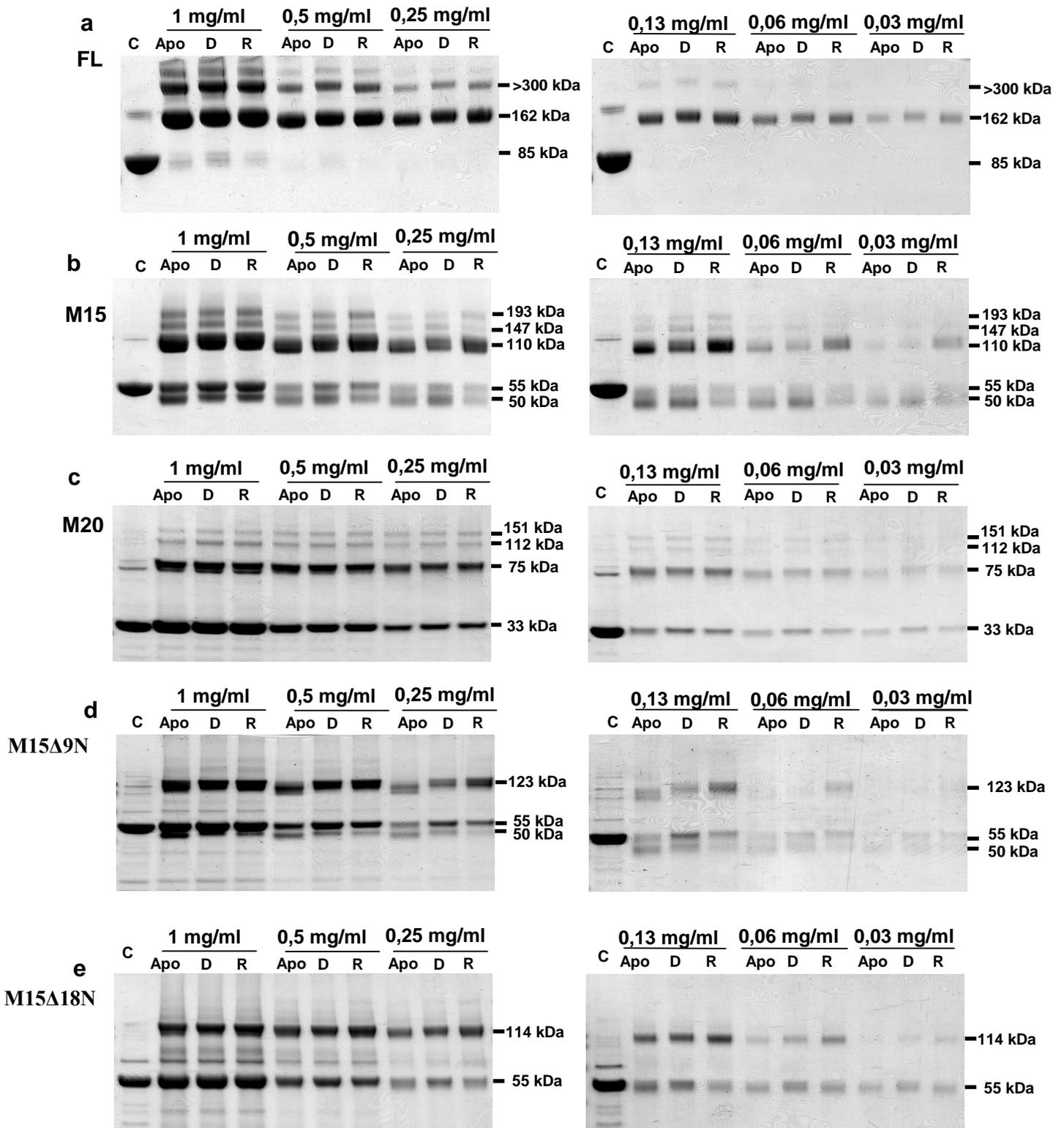


Abbildung 36: Mit Glutaraldehyd behandeltes Phytochrom. Das „crosslinking“ wurde für FL (a), M15 (b), M20 (c), M15Δ9N (d) und M15Δ18N (e) durchgeführt. Phytochrom wurde mit 5 mM (Endkonzentration) Glutaraldehyd gemischt und für 3h inkubiert. Die Proben wurden auf ein NuPage-Gel (4-12%) aufgetragen. Für das „crosslinking“ wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen (Konzentrationen sind über dem Gel angegeben) verwendet. Das „crosslinking“ wurde mit Apophytochrom und Holophytochrom in der Pr- und Pfr-Form untersucht. C = unbehandelte Kontrolle. Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts von den Gelen angegeben.

### 3.2.6. Kombination von Gelfiltration und „crosslinking“

Wie in Kapitel 3.2.4. beschrieben, können mit der Gelfiltration Konformationsveränderungen, die mit der Photokonversion von Phytochrom einhergehen, nachgewiesen werden. Mit dieser Methode war eine eindeutige Zuordnung der Peaks im Gelfiltrationsprofil zu einem Monomer, Dimer oder Oligomer jedoch nicht möglich. Die Kombination von „crosslinking“ und Gelfiltration ermöglicht eine bessere Interpretation der Gelfiltrationsprofile von Agp1 und Deletionsmutanten, d.h. eine Zuordnung der Peaks zu Monomeren oder Dimeren.

Dafür wird während der Gelfiltration von „crosslinktem“ Protein das Eluat in Fraktionen gesammelt und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Monomer, Dimer- oder Oligomerbanden auf dem SDS-Gel werden anschließend den entsprechenden Peaks in den Elutionsprofilen zugeordnet. Mit Glutaraldehyd-behandeltes FL eluiert mit zwei Peaks von der Gelfiltrations-Säule, die einem Molekulargewicht von 640 kDa bzw. 260 kDa entsprechen. Nicht Glutaraldehyd-behandeltes FL eluierte mit 270 kDa von der Säule. Wie mit anschließender SDS-Gelelektrophorese gezeigt wurde, können die Peaks bei 260 kDa bzw. 270 kDa eindeutig einem Dimer zugeordnet werden. Der größte Anteil von FL eluiert daher als Dimer von der Säule (Abbildung 37a). Die Fraktionen unter dem 640 kDa Peak enthalten die mit SDS-Gelelektrophorese nachgewiesenen > 300 kDa Oligomere. Im Vergleich zur nicht Glutaraldehyd-behandelten Probe ist dieser Peak im Elutionsprofil der Glutaraldehyd-behandelten Probe stark vergrößert. Das bedeutet, dass die Oligomere des nicht vernetzten Agp1 eine hohe Dissoziationskonstante besitzen und während der Verdünnung auf der Gelsäule zerfallen. Die Oligomere können durch Glutaraldehyd stabilisiert werden. Die Elutionsprofile von Glutaraldehyd-behandeltem Agp1-Fl Pr und Pfr waren nicht deutlich unterschiedlich, wie es auch für die Pr- und Pfr-Form von nicht Glutaraldehyd-behandeltem Agp1-FL der Fall war. Wurde M15 Pr mit Glutaraldehyd behandelt, zeigte das Elutionsprofil drei Peaks mit unterschiedlichen Molekulargewichten von 340 kDa, 140 kDa und 80 kDa (Abbildung 37b). Das Elutionsprofil von nicht vernetztem M15 Pr zeigte nur einen Peak bei 85 kDa. Mit SDS-Gelelektrophorese konnten die Fraktionen unter dem 80 kDa Peak als Monomere (55 kDa auf dem SDS-Gel) und intramolekular verknüpfte Monomere (50 kDa auf dem SDS-Gel) identifiziert werden. Der 140 kDa SEC Peak enthielt beide monomerische Formen und das vernetzte Dimer, welches mit 2 deutlich getrennten Banden um 110 kDa auf dem SDS-Gel erschien. Mit dem 140 kDa SEC Peak eluierten also verknüpfte und nicht verknüpfte Dimere zusammen. Das zeigte, dass das

crosslinking von M15 unvollständig erfolgte. Der Vergleich der Elutionsprofile von Glutaraldehyd-behandeltem und nicht Glutaraldehyd-behandeltem M15 Pr zeigte, dass das nicht verknüpfte Protein mit dem Monomerpeak des verknüpften Proteins (80 kDa) coeluierte und M15 Pr sich also monomerisch verhält. Das Protein der 340 kDa Peakfraktion war mit SDS-Page nicht nachweisbar. Die Untersuchung von M15 Pfr mit Gelfiltration ergab ein Elutionsprofil mit zwei Peaks von 340 und 140 kDa. Durch SDS-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass der letztere Peak verknüpfte Dimere enthält (Abbildung 37b). Nicht Glutaraldehyd-behandeltes M15 Pfr eluierte mit 120 kDa von der Gelsäule. Der Vergleich der Gelfiltrations-Profile zwischen Glutaraldehyd-behandeltem und nicht Glutaraldehyd-behandeltem M15 Pfr zeigte, dass nicht verknüpftes M15 in der Pfr-Form als Dimer eluiert. Die Stärke der Interaktion zwischen zwei Molekülen hängt von ihrer Dissoziationskonstante und der Konzentration der Proteinlösung ab. Während der Gelfiltration erfahren die auf die Säule aufgetragenen Proben eine Verdünnung. Dimere mit einer hohen Dissoziationskonstante tendieren dazu, sich während des Laufs voneinander zu trennen. Aus den Gelfiltrationsergebnissen mit M15 kann man daher schließen, dass die beiden Untereinheiten eines Dimers in der Pfr-Form stärker miteinander assoziiert sind als in der Pr-Form. Das erklärt auch das in Kapitel 3.2.4. entdeckte unterschiedliche Laufverhalten von M15 Pr und M15 Pfr während der Gelfiltration. M15 $\Delta$ 9N verhielt sich bezüglich der Dimerisierung ähnlich wie M15. Glutaraldehyd-behandeltes M15 $\Delta$ 9N Pr eluierte mit zwei Peaks von 131 kDa und 77 kDa von der Gelsäule (Abbildung 38b). Auch hier handelte es sich bei dem ersten Peak wahrscheinlich um das Dimer und bei dem zweiten um das Monomer. Glutaraldehyd-behandeltes M15 $\Delta$ 9N Pfr eluierte mit einem Peak von 118 kDa von der Gelsäule. Wie bei M15 eluierte bei M15 $\Delta$ 9N Pr das nicht verknüpfte Konstrukt nahezu mit dem Monomerpeak des verknüpften Produktes. Die Pfr-Form von M15 $\Delta$ 9N eluierte zusammen mit dem Dimerpeak der verknüpften Pfr-Form von M15 $\Delta$ 9N. Damit konnten die Erkenntnisse aus Kapitel 3.2.5.2. bestätigt werden, nach denen die M15 $\Delta$ 9N Dimeruntereinheiten stärker in der Pfr- als in der Pr-Form miteinander assoziiert sind. Das Gelfiltrations-Profil von M15 $\Delta$ 9N zeigte keinen deutlichen Oligomerpeak. Aus den SDS-Gelen mit „vernetztem“ Protein in Kapitel 3.2.5.2. ging bereits hervor, dass M15 $\Delta$ 9N keine Oligomere bildet. Glutaraldehyd-behandeltes M15 $\Delta$ 18N Pr und Pfr eluierten von der SEC in Form von zwei Peaks entsprechend 136 kDa und 81 kDa, wobei mit dem jeweils ersten Peak wahrscheinlich das Dimer und mit dem zweiten Peak das Monomer eluierte (Abbildung 38c). Der Versuch zeigte, dass M15 $\Delta$ 18N unvollständig verknüpft wird, d.h. ein Großteil der Moleküle bleibt trotz der Behandlung mit Glutaraldehyd

monomerisch. Sowohl in der Pr- als auch Pfr-Form wanderte das nicht-verknüpfte M15 $\Delta$ 18N zusammen mit dem Monomerpeak des verknüpften Produktes. Während des „crosslinking“-Experiments in 3.2.5.2. konnte für M15 $\Delta$ 18N eine etwas stärkere Dimerisierung in der Pfr-Form als in der Pr-Form nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass das nicht Glutaraldehyd-behandelte M15 $\Delta$ 18N in der Pr-Form als auch in der Pfr-Form als Monomer eluierte, kann bedeuten dass (i) die Assoziation zwischen zwei Dimeruntereinheiten bei M15 $\Delta$ 18N nach Bestrahlung nicht so stark ist wie bei M15 Pfr oder (ii) diese Dimerisierung auf Grund der starken Rückkonversion von M15 $\Delta$ 18N Pfr zu M15 $\Delta$ 18N Pr durch Gelfiltration nicht nachweisbar ist. Wie bei M15 $\Delta$ 9N war bei M15 $\Delta$ 18N ein nur wenig stark ausgeprägter Oligomerpeak zu erkennen. Glutaraldehyd-behandeltes M20 eluiert in der Pr-Form mit einem 76 kDa und 56 kDa Peak und in der Pfr-Form mit einem 76 kDa und einem 61 kDa Peak (Abbildung 38a). Die Peaks sind besonders in der Pfr-Form nur schwach voneinander getrennt. Die Zuordnung des nicht Glutaraldehyd-behandeltem M20Pr und Pfr zu dem ersteren Dimer- oder dem letzteren Monomerpeak ist deshalb erschwert. Tendenziell scheint jedoch eine Elution der Pr- und Pfr-Form von nicht Glutaraldehyd-behandeltem M20 mit dem Monomerpeak zu erfolgen. Aus der SDS-Page mit Glutaraldehyd-behandeltem Protein war ersichtlich, dass die Assoziationsstärken der M20 Dimeruntereinheiten in der Pr- und der Pfr-Form vergleichbar sind. Also ist auch die PHY-Domäne für eine starke Interaktion von Dimeruntereinheiten nach Bestrahlung wichtig. Durch SDS-Gelelektrophorese mit Glutaraldehyd-behandeltem M20 Protein konnten Oligomere nachgewiesen werden. Die Elutionsprofile von verknüpftem und nicht verknüpftem M20 zeigten ebenfalls einen gering ausgeprägten Oligomerpeak.

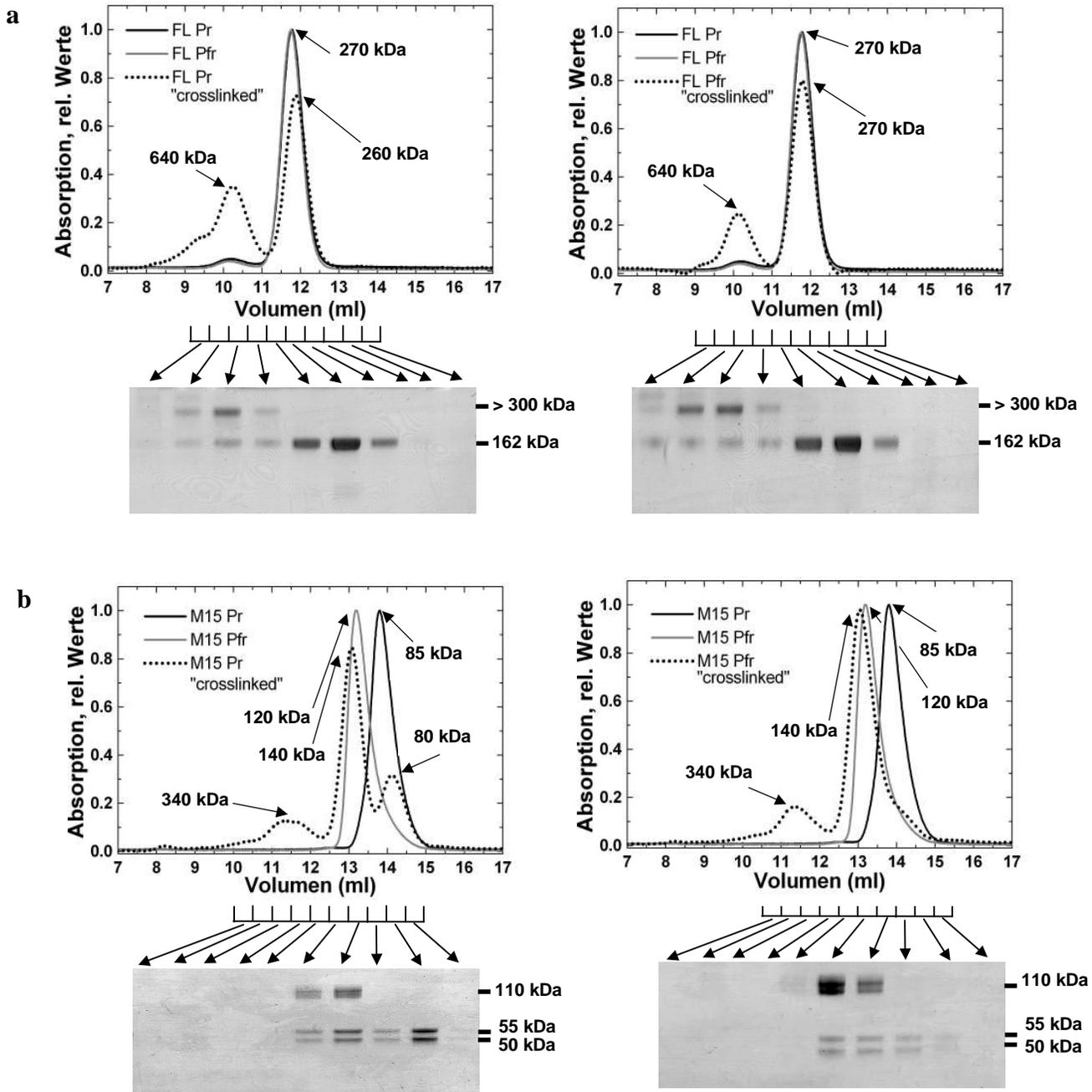


Abbildung 37: Gelfiltration von FL (a) und M15 (b) (durchgehende Linien (Pr, schwarze Linie; Pfr, graue Linie) und FL bzw. M15 „crosslinked“ (gepunktete Linie)). Die Proben wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen auf eine Gelfiltrations-Säule aufgetragen und das Eluat bei 280 nm gemessen. Für eine Vereinfachung des Vergleichs wurden alle Kurven auf Einheitlichkeit skaliert mit einem Faktor, der das Absorptionsmaximum von nicht Glutaraldehyd-behandeltem Protein auf 1 korrigiert. Das Glutaraldehyd-behandelte Protein wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und auf ein NuPage-Gel aufgetragen. Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts von den NuPage-Gelen angegeben. Im Gelfiltrations-Profil sind die scheinbaren molekularen Gewichte, mit denen das Phytochrom eluiert, neben den Peaks angegeben. Die NuPage-Gele mit den Fraktionen sind den entsprechenden Gelfiltrations-Profilen zugeordnet. Dadurch lassen sich die Gelfiltrations-Peaks einem Monomer- bzw. Dimer-Peak zuordnen.

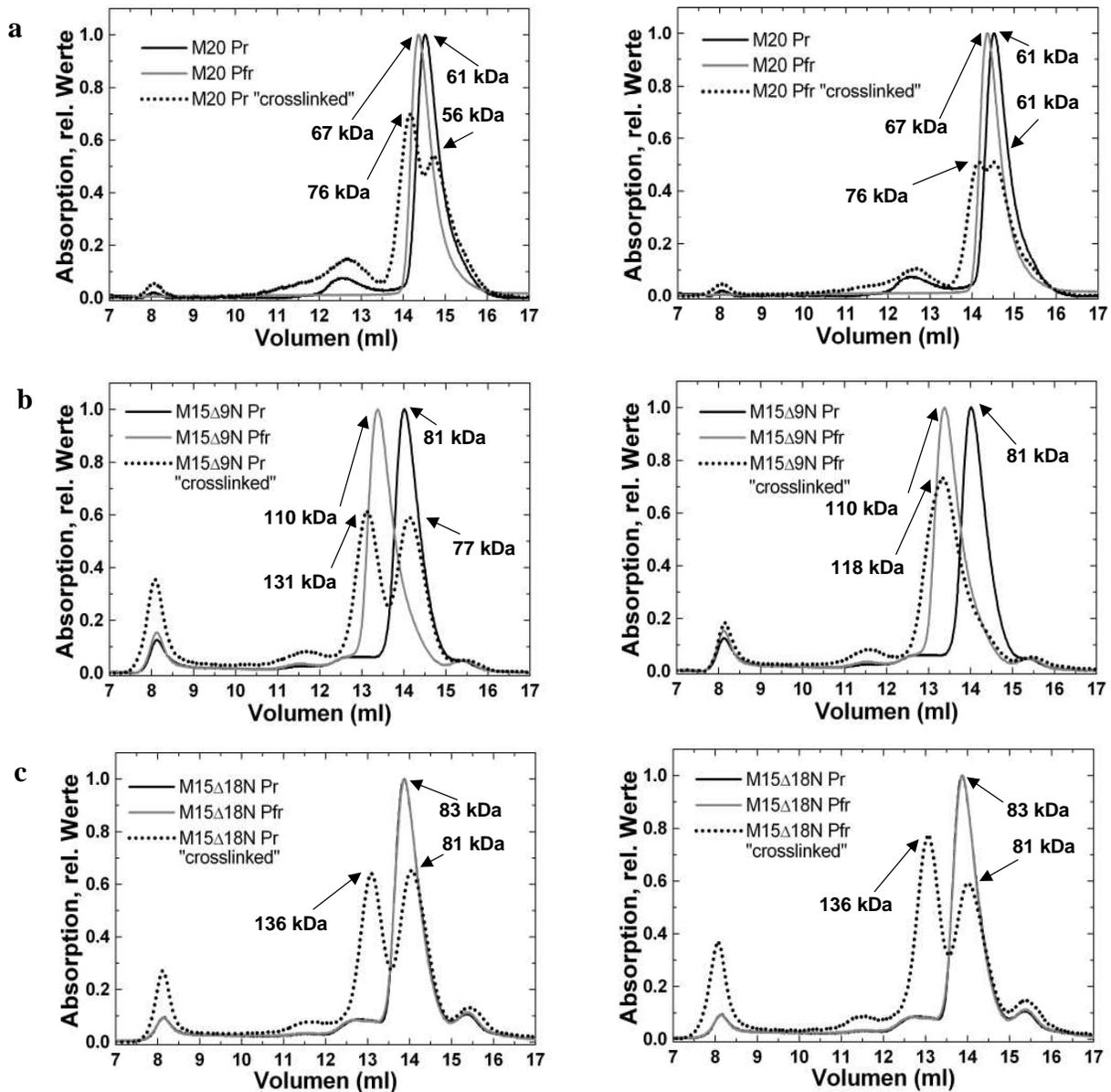


Abbildung 38: Größenausschlusschromatographie von Glutaraldehyd-behandeltem und nicht Glutaraldehyd-behandeltem Phytochrom vor und nach Bestrahlung (Pr bzw. Pfr). M20 (a), M15 $\Delta$ 9N (b) und M15 $\Delta$ 18N (c) nicht „crosslinked“ (durchgehende Linien (Pr, schwarze Linie; Pfr, graue Linie) und „crosslinked“ (gepunktete Linie) wurden unter nicht-denaturierenden Bedingungen auf eine SEC-Säule aufgetragen und das Eluat bei 280 nm gemessen. Für eine Vereinfachung des Vergleichs wurden alle Kurven auf Einheitlichkeit skaliert mit einem Faktor, der das Absorptionsmaximum von nicht Glutaraldehyd-behandeltem Protein auf 1 korrigiert. Im SEC-Profil sind die scheinbaren molekularen Gewichte, mit denen das Phytochrom eluiert, neben den Peaks angegeben. Aus einem Vergleich von Glutaraldehyd-behandeltem und nicht Glutaraldehyd-behandeltem Protein im SEC-Profil lassen sich Aussagen machen, ob sich das Phytochrom in der Pr- und Pfr-Konformation monomeric oder dimerisch verhält.

### 3.2.7. Limitierte Proteolyse mit FL und den Deletionskonstrukten M15, M20 M15 $\Delta$ 18N und M15 $\Delta$ 9N

Strukturelle Unterschiede zwischen dem Agp1 Apoprotein, sowie der Pr- und Pfr-Form von Agp1 wurden mit limitierter Proteolyse untersucht. Die gleichen Experimente wurden ebenfalls mit den Deletionsmutanten M15, M20, M15 $\Delta$ 18N und M15 $\Delta$ 9N durchgeführt. Die letzteren Versuche sollten Hinweise geben, welche Teile des Proteins nach Photokonversion exponiert sind. Während meiner Studien wurden Agp1-Konstrukte mit Trypsin und der Endoproteinase GluC (V8) verdaut und die Fragmente durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Zn-Fluoreszenz konnten alle Fragmente, bei denen der Chromophor durch die Proteolyse nicht entfernt wurde, nachgewiesen werden.

Während einer V8 Proteolyse von FL entstanden Fragmente von 55 kDa, 50 kDa, 33 kDa und 24 kDa (Abbildung 39a). Die Verdauemuster von Apoprotein, der Pr- und Pfr-Form waren deutlich verschieden. Verdautes Apoprotein enthielt nur 50 kDa und 33 kDa Fragmente. Ein großer Teil der Pr-Probe blieb unverdaut. Es waren geringe Mengen von 55 kDa, 50 kDa und 33 kDa Fragmenten erkennbar. Der Pfr-Verdau enthielt alle vier genannten Fragmente und etwas unverdautes Protein. Während der V8 Proteolyse von M15 wurden Fragmente mit 50 kDa und 33 kDa gebildet (Abbildung 40a). M15 Apoprotein wurde vollständig zu einem 50 kDa Fragment verdaut. Mit V8 behandeltes M15 Pr wurde nur wenig abgebaut, es entstanden aber geringe Mengen eines 50 kDa Fragments. Die Pfr-Form wurde zu einem 50 kDa und einem 33 kDa Fragment abgebaut. Außerdem blieb auch ein Teil des Ausgangsproduktes (55 kDa) erhalten. Beim Verdau von M15 $\Delta$ 18N entstanden ein 54 kDa, 49 kDa und 33 kDa Fragment (Abbildung 40c). M15 $\Delta$ 18N Apoprotein wurde vollständig zu dem 49 kDa Fragment abgebaut und Pr nur teilweise, d.h. ein Großteil des unbestrahlten Holophytochroms blieb unverdaut. Die Pfr-Form wurde fast komplett zu dem 49 kDa und dem 33 kDa Fragment abgebaut. Insgesamt war das V8 Proteolysemuster von M15 $\Delta$ 18N mit dem von M15 vergleichbar, aber die Pfr-Form wurde beim ersteren Konstrukt stärker abgebaut als beim letzteren. Man kann daher annehmen, dass die Entfernung der ersten 19 N-terminalen Aminosäuren zu einer stärkeren Exposition der V8-Schnittstellen in der Pfr-Form führt. M20 wurde unter den gegebenen Bedingungen von V8 nicht verdaut (Abbildung 40d). Dieses Konstrukt besitzt also eine sehr kompakte Struktur, bei der die Proteolyse-Schnittstellen vor dem Proteaseangriff geschützt sind. Mit Hilfe der Zn-Fluoreszenzmessung und LC/MS/MS-Analysen ließen sich Aussagen über die Positionen der von der Protease genutzten Schnittstellen machen.

Die 55 kDa Fragmente, die aus dem V8-Verdau der Pr- und Pfr-Form von FL stammen, entsprechen wahrscheinlich dem M15 Konstrukt. Sie enthalten den Chromophor und besitzen die gleiche Mobilität auf dem SDS-Gel wie M15. Analysen mit LC/MS/MS geben Hinweise darauf, dass die C-terminale Aminosäure des 55 kDa Fragments Glu511 ist. Diese Position liegt dicht bei der *hinge* Region, die sich zwischen dem Chromophormodul und der Histidinkinase befindet. Die exakte Schnittstelle konnte allerdings nicht bestimmt werden und könnte auch einige Aminosäuren C-terminal von Glu511 lokalisiert sein. Die 50 kDa und 33 kDa Fragmente aus dem FL und M15 Verdau enthalten ebenfalls den Chromophor. Die V8 Schnittstelle, die zur Ausbildung des 50 kDa Fragments führt, liegt wahrscheinlich im C-terminalen Bereich der PHY-Domäne. Das 33 kDa Fragment hat auf dem SDS-Gel die gleiche Mobilität wie M20. Deshalb liegt die V8 Schnittstelle dieses Fragments im Übergangsbereich von der GAF- zur PHY-Domäne. In Abbildung 39c sind die Proteinbereiche von Agp1, die durch die 55 kDa, 50 kDa und 33 kDa Fragmente abgedeckt werden, gekennzeichnet. Das 24 kDa Fragment des FL Pfr-Verdau enthält keinen Chromophor und wurde beim M15 Verdau nicht gefunden. Daher handelt es sich hierbei vermutlich um einen Teil der Histidinkinase.

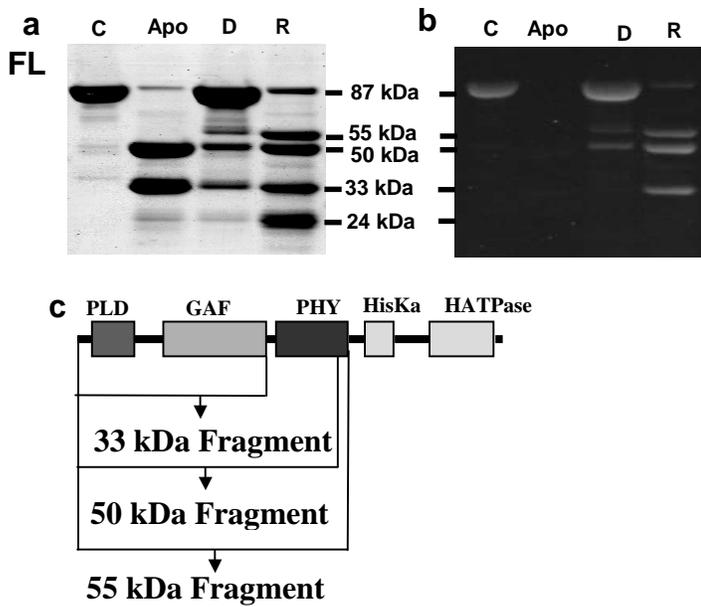


Abbildung 39: V8-Verdau von Agp1, SDS-Page. (a) Coomassiefärbung. (b) Zn<sup>2+</sup>-induzierte Fluoreszenz. Holo-Agp1 wurde im Dunkeln inkubiert (Pr) oder mit Rotlicht bestrahlt (Pfr). Apo-Agp1 und Holo-Agp1 in der Pr- und Pfr-Form wurden für 3h mit V8 behandelt. C = unbehandelte Kontrolle. Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts bzw. links von den Gelen angegeben. (c) Struktur von Agp1 und proteolytischen Fragmenten (55 KD Fragment, 50 KD Fragment, 33 KD Fragment). Für die Sequenzierung wurden die Proteolysefragmente aus dem Coomassiegel ausgeschnitten und mit LC/MS/MS analysiert.

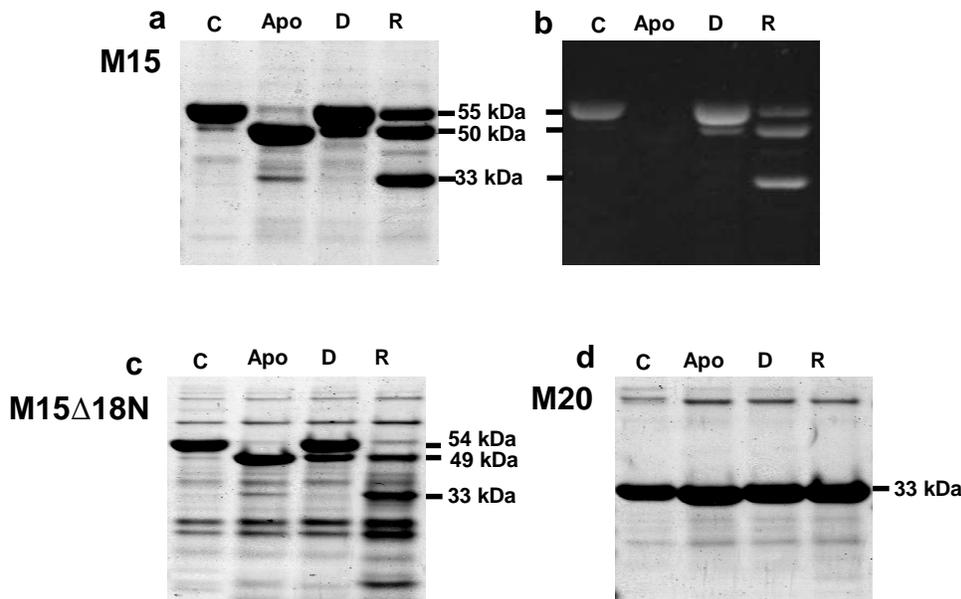


Abbildung 40: V8 Verdau verschiedener Agp1-Konstrukte, SDS-Page (a) M15 (Coomassiefärbung), (b) M15 (Zn<sup>2+</sup> - induzierte Fluoreszenz), (c) M15Δ18N und (d) M20. Die Deletionskonstrukte von Agp1 wurden im Dunkeln inkubiert (Pr) oder mit rotem Licht bestrahlt (Pfr). Die Apo-Agp1-Deletionskonstrukte und die Holo-Agp1-Deletionskonstrukte in der Pr- und Pfr-Form wurden für 3h mit V8 behandelt. C = unbehandelte Kontrolle. Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts bzw. links von den Gelen angegeben.

In einem weiteren Versuch wurden die Konstrukte FL, M15, M20 und M15 $\Delta$ 18N mit Trypsin verdaut. Während des Trypsinverdaus (0,6  $\mu$ g/ml) entstanden aus FL Apoprotein drei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 50 kDa, 33 kDa und 24 kDa. Mit der Pr- als auch der Pfr-Form des Holoproteins wurden 74 kDa, 63 kDa, 55 kDa und 50 kDa Fragmente erhalten. Bei der Pfr-Form entstanden zusätzlich noch 33 kDa, 24 kDa und 20 kDa Fragmente (Abbildung 41a). Da die 74 kDa, 63 kDa, 55 kDa, 50 kDa und 33 kDa Fragmente Zn<sup>2+</sup>-Fluoreszenz zeigten, mussten sie durch eine Spaltung C-terminal vom Chromophor entstanden sein. Die Schnittstellen, die zur Entstehung des 74 kDa und 63 kDa Fragments führten, liegen also in der Histidinkinase, während die 55 kDa und 50 kDa Fragmente aus einer Schnittstelle in der *hinge* Region und der PHY-Domäne resultierten. Das 33 kDa Fragment hatte die Größe von M20 und stammte aus einer Spaltung zwischen der GAF- und der PHY-Domäne. Die 24 kDa und 20 kDa Fragmente zeigten keine Zn<sup>2+</sup>-Fluoreszenz, d.h. sie enthielten keinen Chromophor mehr.

Die Ergebnisse der Trypsin-Proteolyse sind insofern mit den Ergebnissen der V8-Proteolyse vergleichbar, als dass die Pfr-Form von FL stärker abgebaut wird als die Pr-Form und die *hinge* Region als auch eine Region innerhalb des C-terminalen Teils der PHY-Domäne in der Pfr-Form stärker exponiert sind als in der Pr-Form. Da beim Apoprotein von FL die 74 kDa, 63 kDa und 55 kDa Banden im Proteolysemuster nicht sichtbar waren, lässt sich vermuten, dass die Histidinkinase zusammen mit einem kleinen Teil der PHY-Domäne entfernt wurde, was zur Entstehung des 50 kDa Fragments führte. Andererseits könnte es sein, dass die bei Pr und Pfr erkennbaren 74 kDa, 63 kDa und 55 kDa Fragmente beim Apoprotein sehr schnell abgebaut wurden und deshalb unter den gewählten Bedingungen nicht mehr im Proteolysemuster erkennbar waren. Der Trypsinverdau mit M15 führte zur Bildung von 50 kDa und 33 kDa Fragmenten (Abbildung 41b). Im Fall vom Apoprotein wurde der größte Teil des Proteins zu dem 50 kDa Fragment abgebaut, während im Fall der Pr- und Pfr-Form ein Großteil des M15 Konstruktes (55 kDa Fragment) unverdaut blieb und ein geringer Teil eines 50 kDa Fragments gebildet wurde. Die Pfr-Form wurde etwas stärker verdaut als die Pr-Form. In allen drei Fällen entstand das 33 kDa Fragment, auch wenn es anteilmäßig am stärksten beim Pfr-Verdau zu finden war. Das Proteolysemuster für den Trypsinverdau mit M15 $\Delta$ 18N-Apoprotein und der Pfr-Form zeigte ein 50 kDa Fragment und das unverdaute Konstrukt, sichtbar als 55 kDa Bande. M15 $\Delta$ 18N Pr wurde nach 30 min Proteolyse mit Trypsin nicht verdaut (Abbildung 41d). M20 Apoprotein, Pr und Pfr wurden durch Trypsin nicht abgebaut. Für alle drei M20-Formen war auf dem SDS-Gel deshalb nur eine 33 kDa Bande sichtbar (Abbildung 41c). In einem weiteren

Versuch sollte überprüft werden, ob FL, M15 und M20 durch eine höhere Trypsinkonzentration stärker abgebaut werden und damit die Unterschiede zwischen Apoprotein, Pr und Pfr noch deutlicher hervortreten. Die Trypsinkonzentration wurde dazu von 0,6 µg/ml auf 30 µg/ml erhöht. Dabei wurde FL als Apoprotein und in der Pfr-Form hauptsächlich zu einem 33 kDa Fragment abgebaut. Agp1 Pr wurde weniger stark abgebaut als die anderen beiden Formen, da außer dem 33 kDa Fragment zusätzlich noch ein 55 kDa Fragment auf dem Gel sichtbar war. In allen drei Fällen blieb kein Ausgangsprodukt mehr übrig (Abbildung 42a). Zusätzlich entstanden beim Apoprotein, der Pr- und Pfr-Form geringe Mengen eines 24 kDa und eines 19 kDa Fragments. Beim Verdau des Apoproteins wurden zusätzlich zwei weitere sehr kleine Fragmente (Größe nicht mehr bestimmbar) und für die Pr- und Pfr-Form jeweils das kleinere dieser beiden Fragmente gebildet. Für M15 war das Proteolysemuster ähnlich zu dem von FL. Das Apoprotein und die Pfr-Form wurden vollständig zu 33 kDa, 24 kDa und 19 kDa Fragmenten abgebaut. Diese Fragmente wurden zwar auch für die Pr-Form gebildet, aber ein Teil des Ausgangsproduktes blieb in Form des 55 kDa Fragments erhalten (Abbildung 42b). Auch hier wurden wieder für das Apoprotein zwei sehr kleine (Größe nicht mehr mit dem Marker bestimmbar) Fragmente und für Pr und Pfr jeweils das kleinere der beiden Fragmente gebildet. Bei M20 wurde ein geringer Anteil der Pr- und Pfr-Form zu einem 19 kDa Fragment abgebaut. Der größte Teil der Ausgangsprodukte blieb jedoch erhalten. Das M20 Apoprotein wurde etwas stärker als die Pr- und Pfr-Form verdaut. Dabei wurden das 19 kDa Fragment und drei weitere sehr kleine Fragmente gebildet (Abbildung 42c). Die Proteolyseschnittstellen sind bei M20 zwar nur wenig exponiert, durch eine höhere Proteasekonzentration kann M20 jedoch abgebaut werden.

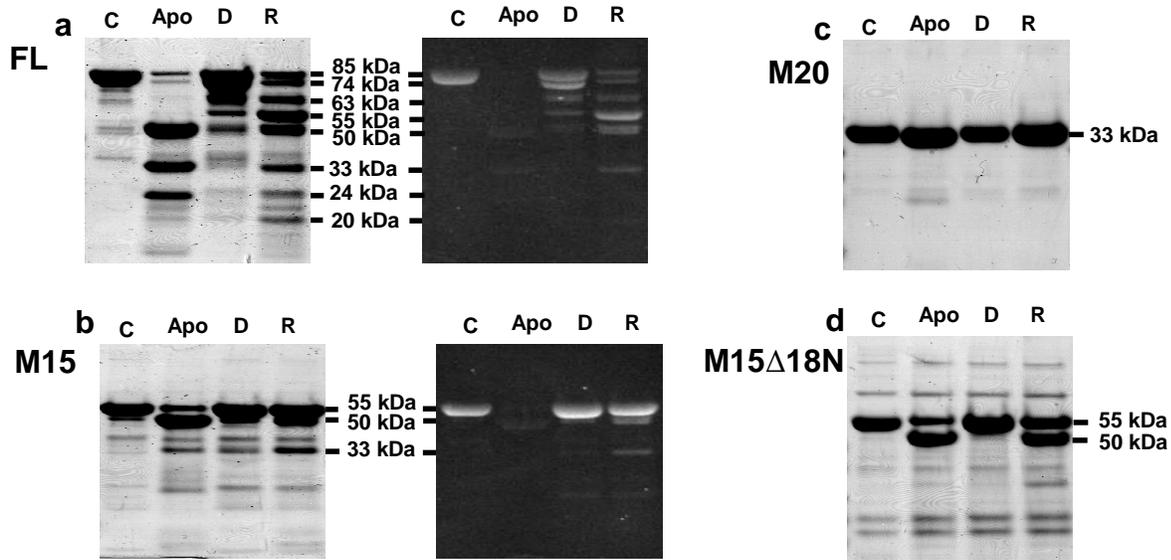


Abbildung 41: Trypsin - Verdau von (a) FL, (b) M15, (c) M20 und (d) M15Δ18N; SDS-Page. Die Deletionskonstrukte von Agp1 wurden im Dunkeln inkubiert (Pr) oder mit rotem Licht bestrahlt (Pfr). Die Apo-Agp1-Deletionskonstrukte und die Holo-Agp1-Deletionskonstrukte in der Pr- und Pfr-Form wurden für 0,5h mit Trypsin (Endkonzentration 0,6 µg/ml) behandelt. C = unbehandelte Kontrolle; Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts bzw. links von den Gelen angegeben. (a) und (b), Links: Coomassie-Gel. Rechts: Zn<sup>2+</sup> - induzierte Fluoreszenz. (c) und (d), Für M15Δ18N und M20 wurde die Zn<sup>2+</sup>-induzierte Fluoreszenz nicht gemessen.

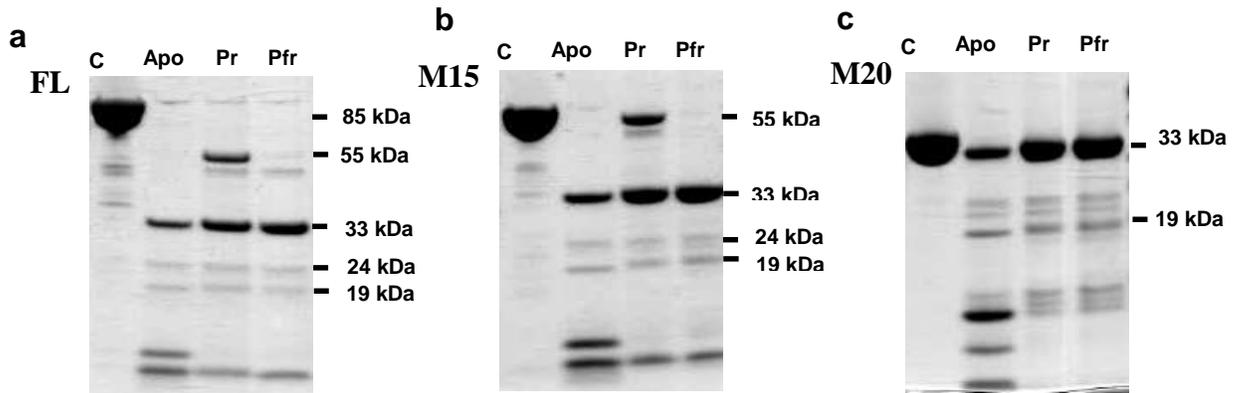


Abbildung 42: Trypsin - Verdau von (a) FL, (b) M15 und (c) M20; SDS-Page. Die Deletionskonstrukte von Agp1 wurden im Dunkeln inkubiert (Pr) oder mit rotem Licht bestrahlt (Pfr). Die Apo-Agp1-Deletionskonstrukte und die Holo-Agp1-Deletionskonstrukte in der Pr- und Pfr-Form wurden für 0,5 h mit Trypsin (Endkonzentration 30 µg/ml) behandelt. C = unbehandelte Kontrolle; Das scheinbare Molekulargewicht (kDa) der einzelnen Fragmente ist rechts von den Gelen angegeben.