

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung der Photokonversion am Beispiel der *Agrobacterium* Phytochrome Agp1 und Agp2.

Dabei wurde zunächst auf die Stereochemie des Chromophors Biliverdin in der Pr- und Pfr-Form von Agp1 eingegangen. Agp2 und Agp1 sind Antagonisten bezüglich der Dunkelreversion. Daher konnte durch die Untersuchung beider Photorezeptoren ein tieferer Einblick in die entscheidenden strukturellen Veränderungen am Chromophor während der Photokonversion gewonnen werden.

Die Stereochemie des Chromophors beeinflusst die Konformation des Proteins, was die Photokonversion, die Signalübertragung und die damit verbundene Reaktion auf den Umweltfaktor Licht möglich macht. Daher erfolgte im zweiten Teil dieser Arbeit die Untersuchung der Strukturveränderungen am Protein, die durch stereochemische Veränderungen am Chromophor, als Initiatoren der Photokonversion, hervorgerufen werden.

Die Erkenntnisse über die Photokonversion von Agp1 und Agp2 bieten auch eine Grundlage, um die Photokonversion anderer Phytochrome besser zu verstehen.

4.1. Konformation des Chromophors

Die Chromophorstereochemie in der Pr- und Pfr-Form von *Agrobacterium* Phytochrom wurde mit Hilfe arretierter Chromophore untersucht. Diese wurden von Katsuhiko Inomata von der Kanazawa Universität in Japan synthetisiert. Durch die Verwendung dieser Chromophore war eine neue Herangehensweise an die Fragestellung, welche Stereochemie der Chromophor vor und nach Bestrahlung einnimmt, möglich. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden Messungen zur Assemblierung, zur Chromophor-Protein Interaktion, zur Photokonversion, zur Autophosphorylierung, dem Verhalten während der Gelfiltration und der Abbaubarkeit durch Limitierte Proteolyse erhoben. Mit Hilfe dieser Daten konnte überprüft werden, ob das Protein durch die Assemblierung mit den verschiedenen arretierten Chromophoren eine Pr- oder Pfr-Form erhält. Daraus ließen sich Aussagen über die Stereochemie des Chromophors in den verschiedenen Bestrahlungszuständen von Agp1 bzw. den Mechanismus der Chromophorassemblierung ableiten. Außerdem war es möglich, mit Hilfe dieser Untersuchungen die Photokonversion besser zu verstehen.

Es wurden sechs verschiedene synthetische Chromophore mit Agp1 und Agp2 assembliert. Vier dieser Chromophore hatten eine blockierte Ring C/D Stereochemie, bei den anderen beiden waren die Ringe A und B arretiert. Alle 6 arretierten Chromophore interagieren mit Agp1-Apoprotein und bilden kovalente Addukte. Daher kann man annehmen, dass auch andere Phytochrome die gleichen oder ähnlich arretierte Chromophore aufnehmen. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein einer reaktiven C3-Seitenkette am Ring A. Im Fall von BV-bindenden Phytochromen wäre das eine Vinylgruppe und im Fall für PCB- und PΦB-bindenden Phytochromen eine Ethylidengruppe. Durch die Erzeugung einer stabilen Pr- bzw. Pfr-Konformation mit Hilfe arretierter Chromophore werden neue Möglichkeiten für die Phytochromforschung eröffnet. Pflanzen, die in der Chromophorsynthese defizient sind, können arretierte Chromophore aufnehmen und die Pflanzenphytochrome dadurch entsprechend unabhängig von den Lichtbedingungen eine Pr- oder Pfr-Form bilden. Dadurch können Pfr-Effekte deutlich von anderen Lichteffekten und von Effekten eines Pr-/Pfr-Zyklus unterschieden werden.

4.1.1. Assemblierung und Spektrale Eigenschaften von Agp1 mit 15Za, 15Ea, 15Zs und 15Es

Die Absorptionseigenschaften von Phytochrom-Addukten werden streng von der Stereochemie des Chromophors bestimmt. Somit können aus einem Vergleich der Absorptionsspektren detaillierte Informationen über die Konformation und Konfiguration des natürlichen Chromophores in der Chromophortasche erzielt werden. Das 15Za-Addukt von Agp1 ist der Pr-Form von BV-Agp1 oder 18EtBV-Agp1 am ähnlichsten. Daraus lässt sich schließen, dass Biliverdin in der Pr-Form eine C15=C16Z Konfiguration und C14-C15 *anti* Konformation einnimmt. Für Pflanzenphytochrome ist die Z-Konfiguration der C15=C16 Doppelbindung in der Pr-Form aus NMR Studien bekannt (Rüdiger et al., 1983). Untersuchungen mit Schwingungsspektroskopie ließen ebenfalls vermuten, dass die C14-C15 Einfachbindung eine *anti* Konformation einnimmt (Kneip et al, 1999). Die C14-C15 *syn* Konformation wurde jedoch ebenfalls diskutiert (Tokutomi et al, 1992). Der 15Ea-Chromophor bildet mit Agp1 ein Addukt, das ähnliche spektrale Eigenschaften hat, wie die Pfr-Form von BV-Agp1. Daraus kann man schließen, dass der Chromophor in der Pfr-Form eine C15=C16 *E* Konfiguration und eine C14-C15 *anti* Konformation hat. Die C15=C16 *E* Konfiguration der Pfr-Form von

Pflanzenphytochromen wurde ebenfalls durch NMR-Spektroskopie nachgewiesen (Rüdiger et al., 1983). Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen ließ die Interpretation von Resonanz Raman Spektren durch Dichtefunktionaltheorie Rechnungen vermuten, dass sich der Pfr-Chromophor in der C14-C15 *anti* Konformation befindet (Mroginski et al., 2004). Die Assemblierung von Agp1 mit 15*Ea* verläuft deutlich langsamer als mit anderen Chromophoren. Durch die langsame Assemblierung ist es möglich, auch Intermediate spektral zu erkennen. Das Assemblierungs-Addukt, das unmittelbar nach Mischung von Protein mit Chromophor entsteht, besitzt ein Absorptionsmaximum λ_{\max} von 727 nm. Der Wert für die Absorption dieses Maximums ist zu diesem Zeitpunkt relativ niedrig. Nach Beendigung des Assemblierungsprozesses hat das Addukt ein Absorptionsmaximum von 739 nm. Der Wert für die Absorption ist zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum Anfangswert relativ hoch.

Verglichen mit der Pfr-Form kovalenter Addukte zeigt die Pfr-Form nicht-kovalenter Cph1-Phycocyanobilin und BV-Agp1-Addukte (geblockte oder mutierte kovalente Bindungsstelle), eine relativ geringe Absorption und einen Blaushift des Absorptionsmaximums λ_{\max} (Lamparter et al., 2002; Borucki et al., 2003). Wir gehen daher davon aus, dass der Übergang vom frühen zum späten 15*Ea*-Agp1-Addukt die Ausbildung einer kovalenten Bindung reflektiert. Diese Vermutung wurde durch einen Test auf kovalente Bindung bestätigt. Die Ergebnisse stimmen mit einer früheren Untersuchung, bei der Agp1 mit 15*E* BV assembliert wurde, überein (Lamparter and Michael., 2005). Während dieser Studien wurde eine Pfr-ähnliche Form gebildet, die nach Mischung von Protein und Chromophor eine sehr geringe Absorption und einen λ_{\max} Wert, der in den blauen Bereich verschoben wurde, aufwies. Auch in diesem Fall war der 15*E* Chromophor nicht kovalent an das Protein gebunden. Die Ausbildung der kovalenten Bindung erfolgte erst nach Dunkelreversion in 15*Z* konfiguriertes BV. Die verzögerte Ausbildung der kovalenten Bindung mit 15*Ea* kann folgendermaßen erklärt werden: Zuerst wird 15*Ea* schnell in die Chromophortasche aufgenommen. Vermutlich ist in der 15*Ea*-Konformation der Abstand zwischen der Cys-20 Sulfhydrylgruppe und der Ring-A-Vinylseitenkette des Chromophors sehr groß und daher die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer kovalenten Bindung vermindert. Bei diesem Modell wären temperaturbedingte Veränderungen in der Konformation von Protein und Chromophor für die Ausbildung einer kovalenten Bindung erforderlich. *In vitro* können nicht-kovalente Phytochrom-Addukte eine Photokonversion realisieren (Lamparter et al., 2002; Borucki et al., 2003). Dennoch besitzen alle bekannten Phytochrom Proteine einen kovalent

gebundenen Chromophor *in vivo*. Unsere Ergebnisse haben bestätigt, dass die kovalente Bindung für eine Pfr-Form mit optimalen spektralen Eigenschaften notwendig ist.

Die Ergebnisse mit den 15Zs- und 15Es-Chromophoren zeigen, dass Agp1 die Aufnahme von Chromophoren, deren Stereochemie von der natürlichen Stereochemie abweicht, „toleriert“. Allerdings sind die Absorptionsmaxima der 15Es- 15Zs-Agp1-Addukte deutlich zu kürzeren Wellenlängen verschoben.

Für diese Beobachtung gibt es drei mögliche Erklärungen.: (i) Die Absorptionsspektren beider Addukte sind denen von Häm-Addukten wie Cytochromen ähnlicher als denen von Phytochromen oder anderen Biliproteinen. Es könnte daher sein, dass beide arretierten Biline, im Vergleich zur gestreckten Konformation anderer Biline, eine helikale Konformation innerhalb der Agp1 Chromophortasche einnehmen.

(ii) Eine andere Erklärung wäre, dass es zu einem nucleophilen Angriff einer Aminosäureseitenkette auf Kohlenstoffatom 10 kommt, wodurch die benachbarte Doppelbindung verloren gehen würde. Dadurch würde das Konjugationssystem des Tetrapyrrol-Chromophors unterbrochen. Allerdings erscheint nach einer SDS Behandlung wieder eine Absorptionsbande im roten Wellenlängenbereich. Falls es zu der eben genannten Additionsreaktion kommt, muss diese in jedem Fall reversibel sein.

(iii) Die dritte Erklärung ergibt sich aus der Struktur von DrBphP.

Aus dieser Struktur lässt sich ableiten, dass ein Bilin mit einer C14-C15 *syn* Geometrie nicht exakt in die Chromophortasche passt, da der Ring D mit den umgebenden Aminosäuren zusammenstoßen würde. Man kann daher annehmen, dass die Ringe C und D der 15Es- und 15Zs-Chromophore deplaziert sind. Dadurch kommt es möglicherweise zu einer Verdrehung der C10-C11 Einzelbindung. Das wiederum führt zur Unterbrechung der Konjugation zwischen den π -Elektronensystemen der beiden Chromophorhälften. Diese Konstellation lässt ein Absorptionsmaximum im blauen Wellenlängenbereich erwarten, wie schon in einer Arbeit von Falk (1989) bzw. Falk et al (1987) gezeigt wurde, in denen chemische Modifikationen des C10-Kohlenstoffatoms am freien Bilin untersucht wurden.

Ein größerer Winkel als 30° zwischen den Ringen AB und CD könnte die blauen Absorptionsmaxima der 15Zs- und 15Es-Addukte erklären. Die extrem schnelle Assemblierung von 15Zs und 15Es weist darauf hin, dass sich die Art der Bindung dieser Chromophore von der anderer Chromophore unterscheidet. Die Assemblierung von 15Zs und 15Es ist offenbar durch eine geringere Aktivierungsenergie gekennzeichnet.

4.1.2. Proteinchemische Untersuchung der Agp1-Chromophor-Addukte

Konformationsänderungen bei der Photokonversion von BV-M15 lassen sich durch Gelfiltration nachweisen. Für BV-FL können die Unterschiede zwischen Pr und Pfr außer durch UV/vis-Spektroskopie auch durch limitierte Proteolyse und Autophosphorylierungs-Studien nachweisen werden. Die gleichen Untersuchungen für die Addukte aus M15 bzw. FL mit arretierten Chromophoren geben Hinweise darauf, ob das Protein die Konformation von Pr, Pfr oder eine andere Konformation einnimmt. Phosphorylierungsstudien zeigten, dass das Protein in Bezug auf die Kinaseaktivität vier unterscheidbare Formen annehmen kann, (i) die Form des Apoproteins, (ii) die Pr-Form, (iii) die Pfr-Form und (iv) die des 15Zs- oder 15Es-Adduktes. Die höchsten Phosphorylierungsaktivitäten hatten die 15Zs- und 15Es-Addukte, gefolgt von der des Apoproteins. Die Pr-Form wurde stärker phosphoryliert als die Pfr-Form. Aus früheren Phosphorylierungs-Studien mit Cph1 ist ebenfalls bekannt, dass die Phosphorylierungsaktivität von Pfr geringer ist als die von Pr und die für das Apoprotein am stärksten (Esteban et al., 2004). In einem Modell für Cph1 werden der C- und N-Terminus des dimerischen Phytochroms mit den Enden einer Wäscheklammer verglichen (Esteban et al, 2005). Bei diesem Modell vergrößert sich nach Pr- zu Pfr-Konversion der Abstand zwischen den beiden Histidinkinase-Untereinheiten, da die Interaktion zwischen den beiden N-terminalen Phytochromuntereinheiten nach Pr- zu Pfr-Photokonversion verstärkt wird. Dieses Modell scheint auch auf Agp1 anwendbar zu sein, da auch hier die Autophosphorylierungsaktivität in der Pfr-Form geringer ist als in der Pr-Form (Lamparter et al., 2000). Das Addukt aus Agp1 und 15Za besitzt eine ähnliche Phosphorylierungsaktivität wie die Pr-Form von Agp1 und das Addukt aus Agp1 und 15Ea besitzt die der Pfr-Form von Agp1, d.h. 15Za hat eine größere Phosphorylierungsaktivität als 15Ea.

Die ungewöhnlich hohe Autophosphorylierungsaktivität des 15Zs-Agp1als auch des 15Es-Agp1-Adduktes könnte damit erklärt werden, dass ein Einbau dieser Chromophore eine Vergrößerung des Abstands zwischen den beiden Chromophormodulen bewirkt. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Assoziation der Histinkinase-Untereinheiten und zu einer Erhöhung der Kinaseaktivität. Um den Einfluss der Stereochemie arretierter Chromophore auf die Agp1-Proteinkonformation durch Gelfiltration zu untersuchen, wurde das auf den N-Terminus gekürzte Deletionskonstrukt M15 verwendet.

Die Gelfiltrationsexperimente zeigten ebenfalls, dass das Protein mit dem *15Za*-Chromophor eine Pr-ähnliche Konformation annimmt, während das Addukt mit dem *15Ea*-Chromophor der Pfr-Form ähnelt. Eine Differenzierung zwischen M15-Apoprotein, der Pr-Form von BV-M15 und *15Za*-M15 war mit dieser Methode nicht möglich.

Die Limitierte Proteolyse mit Agp1 brachte unterschiedliche Proteolysemuster für die Pr-Form, die Pfr-Form und das Apoprotein hervor.

Nach Limitierter Proteolyse zeigte das *15Za*-Addukt ein ähnliches Proteolysemuster wie Agp1Pr, während das Proteolysemuster der Agp1 Apo-Form von den ersteren beiden verschieden war. Aus diesem Grund kann man annehmen, dass die Proteinkonformation des *15Za*-Adduktes ähnlich oder identisch mit der Pr-Form von Agp1 ist.

Allerdings stimmte das Proteolysemuster des *15Ea*-Adduktes nicht mit dem der Pfr-Form der BV- und 18EtBV-Addukte überein. Diese Entdeckung war überraschend, da das *15Ea*-Addukt sich spektral wie die Pfr-Form von Agp1 verhielt und auch gleiche Gelfiltrations- als auch Phosphorylierungseigenschaften wie die Pfr-Form von Agp1 besaß. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Proteolysemuster wäre, dass beim *15Ea*-Addukt der Chromophor in einer bestimmten Stereochemie eingefroren ist, während bei BV die Beweglichkeit um die C14-C15 Einfachbindung und die C15=C16 Doppelbindung erhalten bleibt. Durch eine strukturelle Dynamik, wie die Rotation um die C14-C15 Bindung ist die Konformation eines mit BV verknüpften Proteins möglicherweise nicht vollständig mit der des *15Ea*-Adduktes übereinstimmend.

Die Proteolysemuster der *15Zs*- und *15Es*-Addukte waren mit denen des Apoproteins vergleichbar. Auch während der SEC Läufe verhielten sich die *15Zs*- und *15Es*-Addukte wie Apoprotein und M15Pr. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden Addukte eine ähnliche Struktur wie das Apoprotein besitzen. Da die *15Zs*- und *15Es*-Addukte jedoch eine wesentlich stärkere Autophosphorylierungsaktivität besaßen als das Apoprotein, scheinen die Histidinkinase Untereinheiten bei diesen Addukten stärker miteinander assoziiert zu sein als beim Apoprotein.

4.1.3. Assemblierung und Spektrale Eigenschaften von Agp2 mit 15Za, 15Ea, 15Zs, 15Es

Die spektralen Eigenschaften der Addukte aus Agp2 mit den Chromophoren 15Za, 15Ea, 15Zs und 15Es sind mit denen der entsprechenden Agp1-Addukte vergleichbar. Das 15Za-Addukt ähnelt spektral der Pr-Form und das 15Ea-Addukt der Pfr-Form, während die 15Zs- und 15Es-Addukte nur im blauen Wellenlängenbereich absorbieren. Wie für Agp1 erfolgte die Assemblierung von 15Zs und 15Es mit Agp2 äußerst schnell und die Absorptionsmaxima beider Addukte sind mit den entsprechenden Agp1-Addukten vergleichbar. Mögliche Gründe für die spektralen Eigenschaften der 15Zs und 15Es-Agp1 und -Agp2-Addukte wurden bereits in 4.1.1 erläutert. Neben den spektralen Eigenschaften der Agp2-Addukte mit arretierten Chromophoren wurde auch deren Assemblierungskinetik untersucht. Trotz ähnlicher spektraler Eigenschaften unterschieden sich die 15Za-, 15Ea-, 15Zs- und 15Es-Agp2-Addukte von den entsprechenden Agp1-Addukten hinsichtlich ihrer Assemblierungsraten. Die Unterschiede reflektieren verschiedene anfängliche Assoziationskonstanten. (i) Eine Ursache dafür könnten verschiedene anfängliche Abstände zwischen der Ring A Vinyl-Seitenkette und dem Schwefel des Chromophor-bindenden Cysteinrestes sein. (ii) Zum Anderen wäre es möglich, dass die Biline unterschiedlich gut in die Chromophortaschen der beiden Phytochrome passen. Im Vergleich zu Agp1, wo die Assemblierung von 15Ea im Vergleich zu den anderen Chromophoren am langsamsten erfolgte, war die Assemblierung von Agp2 mit 15Ea schneller als die mit 15Za. Das bedeutet, dass bei der Assemblierung von Agp2 mit 15Za bzw. mit 15Ea der anfängliche Vinyl-Cystein-Abstand für 15Za größer ist als für 15Ea, bzw. der 15Za-Chromophor schlechter in die Chromophortasche passt als der 15Ea-Chromophor. Die unterschiedlichen Assemblierungsraten der Chromophore 15Za und 15Ea mit den beiden *Agrobacterium* Phytochromen gehen mit der Tatsache einher, dass Agp1 im Dunkeln eine Pr und Agp2 eine Pfr-Form annimmt.

4.1.4. Eigenschaften der Addukte aus Agp1 und Agp2 mit 5Zs und 5Za

Das Spektrum und Absorptionsmaximum des 5Zs-Agp1-Adduktes ist mit dem der Pr-Form des 18EtBV-Adduktes, bzw. des BV-Adduktes vergleichbar. Das Absorptionsspektrum des 5Za-Agp1-Adduktes ist ebenfalls mit Pr vergleichbar, das Maximum liegt aber bei kürzeren Wellenlängen. Die daraus resultierende Vermutung, dass Bilverdin in der Pr-Form eine 5Zs-

Konformation einnimmt, wird durch die Kristallstruktur des *Deinococcus* Phytochrom von Wagner et al. (2005) bestätigt.

Die Bestrahlung des 5Zs-Adduktes bewirkte einen Blaushift des Absorptionsmaximums, während das Absorptionsmaximum des 5Za-Adduktes nach Bestrahlung in den roten Bereich verschoben wurde. Daher sind die spektralen Veränderungen während des Pr- zu Pfr-Übergangs mehr mit den Licht-induzierten Absorptionsveränderungen des 5Za-Adduktes als mit denen des 5Zs-Adduktes vergleichbar. Man kann vermuten, dass die C5-C6 Einzelbindung in der Pfr-Form eher die *anti* als die *syn* Konformation einnimmt.

Die 5Za- und 5Zs-Agp1-Addukte sind hinsichtlich ihres Verhaltens auf der SEC vergleichbar mit der Pr-Form von Phytochrom, zeigen aber beide nach Bestrahlung nicht das Verhalten einer Pfr-Form. Somit reflektiert das 5Zs-Modell zwar die Stereochemie des Pr-Chromophors, das 5Za-Modell aber nicht genau die Konfiguration/ Konformation der Pfr-Chromophore. Offenbar ist für die Ausbildung der Pfr-Form eine Drehung der Ringe A und B gegeneinander erforderlich. Diese Drehung ist mit den arretierten Chromophoren nicht möglich. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass während der Photokonversion von Pr zu Pfr eine Isomerisierung um die C4=C5 Doppelbindung stattfindet. Diese Isomerisierung ist bei 5Za und 5Zs verhindert. Bis jetzt gibt es jedoch keine Beweise für eine C4=C5E Konfiguration in der Pfr-Form.

Bei der Assemblierung von 5Zs mit Agp2 entsteht ein Pr-ähnliches Addukt, wie es auch bei Agp1 der Fall war. Interessant ist hierbei, dass 5Zs-Agp2 keine Dunkelkonversion in eine Pfr-ähnliche Form zeigt, obwohl die Z zu E Isomerisierung um die C15=C16 Doppelbindung sehr wahrscheinlich der erste Schritt bei der BV-Agp2 Dunkelkonversion ist. Diese Isomerisierung sollte in einem 5Zs-Agp2-Addukt nicht beeinträchtigt sein. Nach der Assemblierung von 5Za mit Agp2 entsteht ein Absorptionsspektrum, das ebenfalls Ähnlichkeit mit einer Pr-Form besitzt, dessen Maximum aber zu einer kürzeren Wellenlänge verschoben ist. Auch hier findet keine Dunkelkonversion statt. Agp2 assembliert mit 5Za wesentlich schneller als mit 5Zs. Das ist ein Hinweis darauf, dass 5Za besser in die Chromophortasche von Agp2 passt als 5Zs. Im Vergleich zum 5Za-Agp1-Addukt ist das Absorptionsmaximum des 5Za-Agp2-Adduktes in den blauen Wellenlängenbereich verschoben. Wie bei Agp1 induziert die Bestrahlung des 5Za-Adduktes eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den roten Wellenlängenbereich. Im Gegensatz dazu wird das Absorptionsmaximum des 5Zs-Adduktes nach Bestrahlung in den blauen Wellenlängenbereich verschoben. Dieser lichtinduzierte Blaushift ist dem Blaushift, der bei *Rhodospseudomonas palustris* (Giraud et al., 2005) beobachtet wurde sehr ähnlich. Das

ungewöhnliche Verhalten von RpBphP3 könnte dadurch erklärt werden, dass die Chromophortasche dieses Proteins den Ring A in einer festen Position hält. Das bestätigt die Ergebnisse, die auch schon mit Agp1 gefunden wurden und unterstreicht die Vermutung, dass in der Pr-Form eine C5-C6 *syn* und in der Pfr-Form eine C5-C6 *anti* Konformation vorliegt.

4.1.5. Stereochemie des Chromophors von *Agrobacterium* Phytochrom

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen mit den arretierten Chromophoren lassen den Schluss zu, dass Agp1 und Agp2 in der Pr-Form die Stereochemie 5Zs/10Zs/15Za und in der Pfr-Form die Stereochemie 5Ea/10Zs/15Ea oder 5Za/10Zs/15Ea haben.

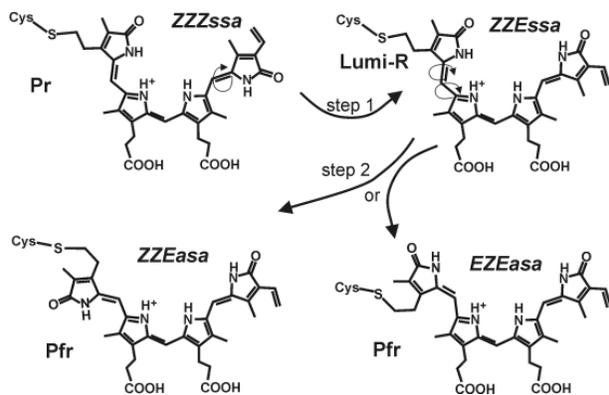


Abbildung 43: Aus den Untersuchungen abgeleitete Stereochemie der Agp1 und Agp2 Chromophore während der Pr- zu Pfr-Umwandlung. Schritt 1 besteht in der schnellen C15=C16 Z zu E Isomerisierung, die zur Ausbildung eines lumi-R Photoprodukts führt. Während der Konversion von lumi-R zu Pfr (Schritt 2) verändert sich die Stereochemie der C5 Methin Brücke. Das beinhaltet entweder eine Rotation um die C5-C6 Einzelbindung (von *syn* zu *anti*) und/ oder eine Z zu E Isomerisation der C4=C5 Doppelbindung. Hier sind zwei Möglichkeiten dargestellt.

4.2. Diskussion Photokonversion von Agp1 und Bedeutung der Proteindomänen

Die Phytochrom Photokonversion leitet eine große Zahl lichtgesteuerter Prozesse in Pflanzen, Bakterien und Pilzen ein. Der Mechanismus der Photokonversion ist auf molekularer Ebene noch nicht aufgeklärt. Die Untersuchung lichtinduzierter Konformations-Änderungen kann helfen, diesen Vorgang besser zu verstehen.

Im besonderen Fokus dieser Untersuchungen stand der Einfluss der Photokonversion auf die Quartärstruktur des Phytochroms, d.h. die Frage, ob bestimmte Domänen von Proteinuntereinheiten nach Bestrahlung stärker miteinander assoziiert sind. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass mikrobielle Phytochrome Homodimere sind (Yeh et al., 1997; Park et al., 2000b; Bhoo et al., 2001) und die Dimerisierung über die carboxyterminale Domäne erfolgt (Jones und Quail, 1986). Eine zusätzliche N-terminale Dimerisierung in Abhängigkeit vom Photozustand des Phytochroms konnte z.B. in der Arbeit von Esteban et al. (2004) nachgewiesen werden.

Da viele bakterielle Phytochrome lichtregulierte Histidin-Kinasen sind, gestatteten diese Untersuchungen auch einem Einblick in die Mechanismen, die in die Modulation der Histidin-Kinase involviert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass strukturelle Veränderungen am Protein, wie die Exposition bestimmter Proteinbereiche und die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinuntereinheiten wichtig für die spektralen und biochemischen Eigenschaften von Phytochrom sind. Außerdem wurde mit Hilfe verschiedener Agp1-Fragmente die Bedeutung bestimmter Proteindomänen und Aminosäuren für Konformationsveränderungen während der Photokonversion nachgewiesen. Die untersuchten Proteindomänen und Aminosäuren und ihr Einfluss auf die spektralen und strukturellen Eigenschaften des Proteins werden im Folgenden diskutiert.

4.2.1. Histidinkinase

Die Histidinkinase ist für die molekularen Eigenschaften des Agp1-Dimers wichtig.

Untersuchungen zur Dimerisierung von FL und M15 zeigten, dass beim ersteren Konstrukt durch das „crosslinking“ unter den gegebenen experimentellen Bedingungen fast alle Moleküle miteinander verknüpft werden. Bei M15 bleibt ein Teil der Moleküle unverknüpft. Dieses Ergebnis stellt die Histidinkinase als einen wichtigen Ort für die Dimerisierung von Agp1

eindeutig heraus. Wie an M15 gezeigt werden konnte, erfolgt auch eine Dimerisierung im N-terminalen Bereich von Agp1. Die Interaktion zwischen den Untereinheiten ist jedoch schwächer als bei FL und ebenfalls abhängig von der Protein-Konformation, d.h. in der Pfr-Form ist die Interaktion zwischen den Untereinheiten stärker als in der Pr-Form. Im Vergleich dazu liegt FL unabhängig von der Bestrahlungsform als Dimer vor. FL Monomere können nicht nur zu Dimeren, sondern auch zu Oligomeren verknüpft werden. Diese Oligomerisierung ist aber sehr schwach und verschwindet nach Verdünnung fast vollständig. Die Histidinkinase hat einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Pfr, wie durch einen Vergleich von FL und M15 gezeigt werden konnte. Bei Pflanzenphytochromen hängt die Dunkelreversion von der Dimerbildung ab (Hennig & Schäfer, 2001). Möglicherweise spielt die N-terminale Dimerisierung für die Geschwindigkeit der Rückkonversion eine entscheidende Rolle. Es besteht die Möglichkeit, dass die Histidinkinase eine Abschwächung der N-terminalen Interaktion in FL verursacht, indem sie die Chromophormodule in eine unterschiedliche Orientierung zueinander drängt und damit die Rückkonversion fördert.

4.2.2. *hinge* Region

In Agp1 wird die *hinge* Region zwischen der Histidin-Kinase und dem Chromophor-Modul in der Pfr-Form besonders stark exponiert. Das konnte durch die Ergebnisse aus Experimenten mit Limitierter Proteolyse gezeigt werden.

Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Limitierte Proteolyse mit cyanobakteriellem Cph1 gefunden (Esteban et al., 2005). Da die *hinge* Region auch bei pflanzlichen Phytochromen nach Bestrahlung stark exponiert ist (Park et al, 2000), handelt es sich dabei möglicherweise um ein universelles Phänomen.

4.2.3. PHY-Domäne

Untersuchungen mit FL und M20 haben gezeigt, dass die PHY-Domäne für die Ausbildung einer spektral intakten Pfr-Form notwendig ist. Das Spektrum von M20, dem Konstrukt ohne PHY-Domäne, ähnelt nach der Dunkelassemblierung dem Spektrum von FL Pr und M15 Pr. Das Spektrum des Photoproduktes von M20 unterscheidet sich deutlich von den Spektren der FL und M15 Photoprodukte. Der Unterschied ergibt sich aus einer verminderten Absorption von M20 im Bereich der Q-Bande. Das Photoprodukt-Spektrum ähnelt dem des eingefrorenen meta-R_c Intermediates (Borucki et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für die spektralen Eigenschaften

von M20 ist die Blockierung der Photokonversion von M20 in diesem Zwischenstadium. Andere Arbeiten zeigten ebenfalls, dass die PHY-Domäne für die Ausbildung einer spektral intakten Pfr-Form notwendig ist (Song, 1999; Wagner et al., 2005; Oka et al., 2004).

Während meiner Untersuchungen konnten außerdem andere Informationen über die Funktion der PHY-Domäne von Agp1 gewonnen werden. Die langsame Assemblierung von M20 zeigte, dass die PHY-Domäne für diesen Prozess und daher für die Bildung von Pr ebenfalls verantwortlich ist.

„Crosslinking“ Daten zeigten, dass die PHY-Domäne mit einem Bereich zwischen den Aminosäuren 10 bis 19 interagiert, der sich N-terminal der Chromophor-Bindestelle am Cystein 20 befindet. Das „crosslinkte“ Monomer zeigte während der SDS-Gelelektrophorese eine etwas höhere Mobilität als das Monomer, das nicht mit Glutaraldehyd behandelt wurde. Diese höhere Mobilität mag aus der kovalenten Stabilisierung eines Knotens, wie er bei der Kristallstruktur von DrBphP gefunden wurde (Wagner et al., 2005), resultieren.

Durch „crosslinking“ und Gelfiltrations-Experimente mit M15 konnte gezeigt werden, dass es zu einer lichtabhängigen stärkeren Interaktion zwischen den N-terminalen Bereichen von Agp1 kommt. Die Phy-Domäne ist in die durch Bestrahlung ausgelösten Konformations-Änderungen involviert, die zu einer verstärkten Interaktion zwischen den N-terminalen Bereichen von Agp1 führen. Diese Erkenntnis resultiert aus der vergleichenden Untersuchung von Agp1-M15 und M20 mit Gelfiltration und crosslinking. Die PHY-Domäne könnte somit die Proteinregion sein, die den Pfr-abhängigen Kontakt mit der Partneruntereinheit ausbildet. Da auch das M20 Konstrukt durch Glutaraldehyd kovalent zu Dimeren verknüpfbar ist, könnte die Kontaktstelle aber auch in der GAF- oder PAS-Domäne liegen. Die PHY-Domäne leistet jedoch einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung der Pfr-Form und der damit verbundenen lichtabhängigen stärkeren Assoziation zwischen den Dimer-Untereinheiten bei M15.

Dieser Einfluss der PHY-Domäne auf die N-terminale Dimerisierung ist auch daher sehr wahrscheinlich, da die PHY-Domäne für die vollständige Photokonversion in Pfr notwendig ist, wie bereits durch spektroskopische Messungen nachgewiesen werden konnte. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass durch limitierte Proteolyse nachgewiesen werden konnte, dass der C-terminale Teil der PHY-Domäne in der Pfr-Form von FL stärker exponiert wird, als in der Pr-Form. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass dieser Teil der PHY-Domäne als Pfr-abhängige Dimerisationsstelle dient. Dafür würde eher der N-terminale Bereich dieser Domäne in Frage kommen.

Um den Bereich der Pfr-abhängigen Interaktion einzugrenzen, sind weitere „crosslinking“- und Sequenzierungs-Studien notwendig.

Neben der Bedeutung für die Ausbildung der Pfr-Form ist die PHY-Domäne auch für die Dunkelkonversion wichtig. Die Rückkonversion von M20 war im Vergleich zu der von M15/FL stark verzögert. Somit scheint die PHY-Domäne die Dunkelreversion zu fördern. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass der Photozyklus bei M20 vermutlich nicht vollständig erfolgt, sondern nur bis zum Intermediat meta-R_c. Die Rückkonversion erfolgt bei M20 also nicht von Pfr aus, sondern von meta-R_c. Das könnte ebenfalls die Ursache für die verzögerte Dunkelreversion sein.

4.2.4. PAS- und GAF-Domäne

Die PAS- und GAF-Domäne sind in allen untersuchten Agp1-Deletionskonstrukten enthalten. Das M20 Konstrukt besteht aus der PAS- und GAF-Domäne und den 19 Aminosäuren N-terminal der Chromophorbindestelle am Cystein 20. Das M20 Fragment ist mit der von Wagner et al. (2005) kristallisierten Chromophorbindedomäne (CBD) von DrBphP vergleichbar. Durch das Konstrukt M20 konnte gezeigt werden, dass die PAS- und GAF-Domäne ausreichend sind, um Biliverdin zu binden und eine spektral aktive Pr-Form auszubilden. Durch Bestrahlung mit rotem Licht kann das Konstrukt M20 photokonvertiert werden. Im Vergleich zu FL und M15 ist M20 gegen einen proteolytischen Abbau resistent. Das bedeutet, dass dieses Proteinfsegment sehr kompakt gestaltet ist und der Protease wenig Angriff bietet. Hierbei sollte erwähnt werden, dass der Trypsinverdau mit gereinigtem Pflanzenphytochrom zur Entstehung eines relativ stabilen 33 kDa Fragments führt, das spektrale Eigenschaften wie M20 besitzt (Reiff et al., 1985).

Eine leichte Veränderung der Proteinkonformation von M20 durch Bestrahlung konnte mit Gelfiltration nachgewiesen werden. Durchs „crosslinking“ konnten für M20 Dimere nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen den beiden Dimeruntereinheiten ist jedoch offenbar nicht lichtabhängig.

Von Oka et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass Phytochrom gesteuerte Prozesse bei Pflanzen durch ein Protein induziert werden können, das aus dem N-Terminus mit der PAS- und GAF-Domäne von Pflanzenphytochromen besteht, wenn dieses mit einem Kernlokalisierungssignal und Dimerisierungs-Peptid fusioniert ist. Die lichtabhängige Konformationsänderung in diesem

Fragment eines pflanzlichen Phytochroms ist möglicherweise der Auslöser für den bis jetzt unbekanntesten ersten Schritt der Signaltransduktion.

Möglicherweise ist die lichtabhängige N-terminale Dimerisierung bei Agp1 für eine Signaltransduktion wichtig. Jedoch sind die GAF- und die PAS-Domäne von Agp1 allein nicht für die lichtabhängige stärkere N-terminale Dimerisierung ausreichend. Dazu wird zusätzlich die PHY-Domäne benötigt.

4.2.5. N-terminale Aminosäuren

Die Bedeutung der N-terminalen Aminosäuren wurde durch die Konstrukte M15 Δ 9N und M15 Δ 18N untersucht. Wie durch unsere Experimente gezeigt wurde, sind die Aminosäuren, N-terminal von der Chromophorbindestelle nicht für die Chromophor-Assemblierung notwendig. M15 Δ 18N baut den Chromophor mit derselben Geschwindigkeit ein wie FL und M15.

Die klonierten Konstrukte ermöglichen es, zwischen zwei Bereichen N-terminal der Chromophorbindestelle zu unterscheiden, den Aminosäuren 2 bis 10 und den Aminosäuren 11 bis 19. Die Aminosäuren 2 bis 10 sind unter Phytochromen nicht konserviert. Durch eine Entfernung dieser Aminosäuren werden die spektralen Eigenschaften des Konstruktes nicht signifikant verändert. Allerdings ist die Dunkelreversion bei M15 Δ 9N beschleunigt. Offensichtlich tragen die ersten 9 N-terminalen Aminosäuren zur Stabilisierung von Pfr bei.

Die Aminosäuren 2 bis 10 sind in die Oligomerisierung von M15 involviert. Das M15 Δ 9N Konstrukt bildet nicht wie M15 Glutaraldehyd-stabilisierte Tetramere. Unter den 9 Aminosäuren gibt es zwei negativ geladene Glu und zwei positiv geladene Arg Reste. Man kann vermuten, dass die Oligomerisierung durch ionische Kräfte hervorgerufen wird. Die Oligomerisierung könnte, wie die Dimerisierung, ein Grund für die Stabilisierung der Pfr-Form sein. Nach (Hennig & Schäfer, 2001) ist die Dunkelreversion pflanzlicher Phytochrome von der Dimerbildung abhängig. Die Aminosäuren 11 bis 19 sind unter den Phytochromen stärker konserviert als die ersten 9 Aminosäuren. Wie gezeigt werden konnte, sind sie für die Bildung der Pfr-Form wichtig. Nach Dunkelassemblierung ist das Absorptionsspektrum von M15 Δ 18N mit dem von M15 bzw. Fl vergleichbar. Das Spektrum des M15 Δ 18N Photoproduktes ist im Bereich der Q-Bande dem von M20 ähnlich. Daher sind die Aminosäuren 11 bis 19 ebenso wie die PHY-Domäne für die korrekte Bildung von Pfr verantwortlich. Wie „crosslinking“-Versuche mit M15, M15 Δ 9N, M15 Δ 18N und M20 gezeigt haben, findet ein intramolekulares „crosslinking“ zwischen der

PHY-Domäne und den 11-19 N-terminalen Aminosäuren statt. Eine intramolekulare Interaktion zwischen den N-terminalen Aminosäuren und den distalen C-terminalen Aminosäuren wurde von Park et al. (2000) für die Pr-Form pflanzlicher Phytochrome beschrieben.

Durch limitierte Proteolyse wurde gezeigt, dass auch bei M15 Δ 18N lichtinduzierte Konformations-Veränderungen stattfinden. Auch hier wird die PHY-Domäne nach Bestrahlung stärker exponiert und dadurch die Pfr-Form stärker abgebaut als die Pr-Form. Interessanterweise wird die PHY-Domäne bei M15 Δ 18N Pfr etwas stärker verdaut als bei M15 Pfr.

Eine Annahme geht davon aus, dass die Exposition der PHY-Domäne und ihr damit einhergehender stärkerer proteolytischer Abbau in der Pfr-Form durch ihre Interaktion mit den N-terminalen Aminosäuren hervorgerufen wird. Diese kann somit widerlegt werden. Die PHY-Domäne wird auch nach Entfernung der N-terminalen Aminosäuren exponiert. Die Interaktion der PHY-Domäne mit den N-terminalen Aminosäuren scheint die PHY-Domäne sogar teilweise vor dem proteolytischen Abbau zu schützen. Die lichtinduzierte stärkere N-terminale Assoziation zwischen zwei M15 Δ 18N Monomeren war durch „crosslinking“ nicht so deutlich nachweisbar wie für M15 und M15 Δ 9N. Diese N-terminale Assoziation wird also möglicherweise durch die intramolekulare Interaktion der PHY-Domäne mit den 11 bis 19 N-terminalen Aminosäuren gefördert. Die Dunkelkonversion von M15 Δ 18N ist im Vergleich zu M15 stark erhöht. Somit haben die ersten 19 Aminosäuren, insbesondere der Bereich von Ser11 bis Ser 19 eine große Bedeutung für die Stabilisierung von Pfr. Bei M20 war die Rückkonversion im Vergleich zu M15/FL stark verzögert, was bedeutet, dass die PHY-Domäne diesen Vorgang beschleunigt. Die PHY-Domäne und die ersten N-terminalen Aminosäuren beeinflussen die Dunkelkonversion also gegensätzlich. Somit sind diese beiden Proteinbereiche Antagonisten durch deren Zusammenspiel die Formierung und die Rückkonversion der Pfr-Form gesteuert wird.

4.2.6. Modell für die Proteinkonformationsänderungen während der Photokonversion von Agp1

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich folgendes Modell für die Konformations-Veränderungen von Agp1 während der Photokonversion ableiten:

Agp1 ist ein Dimer, dessen Untereinheiten an der Histidinkinase miteinander verknüpft sind. Die N-terminalen Aminosäuren bilden eine intramolekulare Interaktion mit der PHY-Domäne. Möglicherweise trägt diese Interaktion zur Ausbildung der Chromophortasche bei. In der Pr-

Form sind die Histidinkinase-Untereinheiten stark miteinander assoziiert, was die hohe Autophosphorylierungsaktivität von Agp1 in der Pr-Form erklärt.

Nach Photokonversion interagiert der N-terminale Teil des Phytochroms stärker mit dem korrespondierenden Teil des Dimers. Diese Dimerisierung wird vermutlich durch die GAF-Domäne oder den N-terminalen Teil der PHY-Domäne vermittelt. Durch diese stärkere N-terminale Interaktion der beiden GAF- bzw. N-terminalen PHY-Domänen werden die beiden C-terminalen PHY-Domänen exponiert. Das bewirkt wiederum eine Exposition der *hinge* Region und eine stärkere Entfernung der Histidin-Kinase-Untereinheiten voneinander. Durch die Entfernung der Histidin-Kinase-Untereinheiten voneinander wird die Autophosphorylierungsaktivität von Agp1 Pfr vermindert.

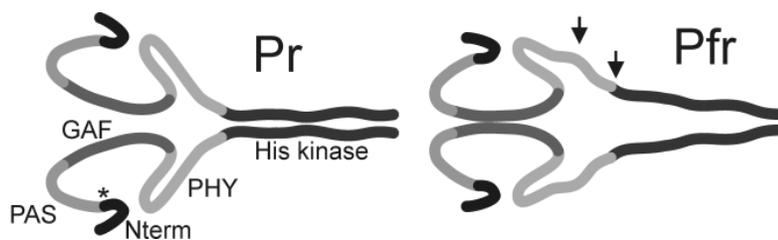


Abbildung 44: Modell für die Protein-Konformation von Agp1 in der Pr- und Pfr-Form. In dem Modell wurden folgende Überlegungen berücksichtigt: (i) Der N-terminale Teil „(Nterm)“ und die PHY-Domäne interagieren miteinander. (ii) Beide Untereinheiten bilden ein Dimer, wobei die Dimerisierung durch die Histidinkinase vermittelt wird („His kinase“). (iii) Beide Chromophor Module (N-terminaler Teil einschließlich der PHY-Domäne) interagieren in der Pfr-Form stärker miteinander als in der Pr-Form. Dadurch rücken diese Teile der Monomere dichter zusammen. (iv) Die mit Pfeilen gekennzeichneten Bereiche sind besonders in der Pfr-Form exponiert, wie durch V8 und Trypsin Proteolyse gezeigt werden konnte. (v) Die Autophosphorylierung ist in der Pfr-Form schwächer als in der Pr-Form, da sich die Histidinkinase Untereinheiten nach Bestrahlung voneinander entfernen.

Andere Arbeiten (Esteban et al., 2004; Park et al., 2000) zeigten ähnliche Erkenntnisse für die Pr- und Pfr-Konformation von Phytochrom.

Nach Esteban et al. (2004) wird auch bei Cph1 die *hinge* Region in der Pfr-Form etwas stärker exponiert als in der Pr-Form. Cph1 besitzt in der Pfr-Form eine geringere Autophosphorylierungs-Aktivität als in der Pr-Form (Esteban et al. 2004). Der Grund dafür ist auch hier eine stärkere Entfernung der Histidinkinase-Untereinheiten voneinander nach Bestrahlung mit rotem Licht.

Ein Modell von Park et al. (2000) beschreibt für pflanzliche Phytochrome ebenfalls eine stärkere Exposition der *hinge* Region nach Photokonversion. Diese wird dadurch ausgelöst, dass eine

intramolekulare Interaktion zwischen den N-terminalen Aminosäuren und den distalen C-terminalen Aminosäuren aufgelöst wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten helfen, die Konformation des *Agrobacterium* Phytochroms Agp1 in der Pr- und Pfr-Form und damit die strukturellen Veränderungen während der Photokonversion besser zu verstehen. Für detaillierte Aussagen sind weiterführende Untersuchungen notwendig, die Aufschluss darüber geben, wo sich der Bereich für die N-terminale Dimerisierung befindet oder welcher Bereich des Phytochroms für die Signalübertragung notwendig ist.