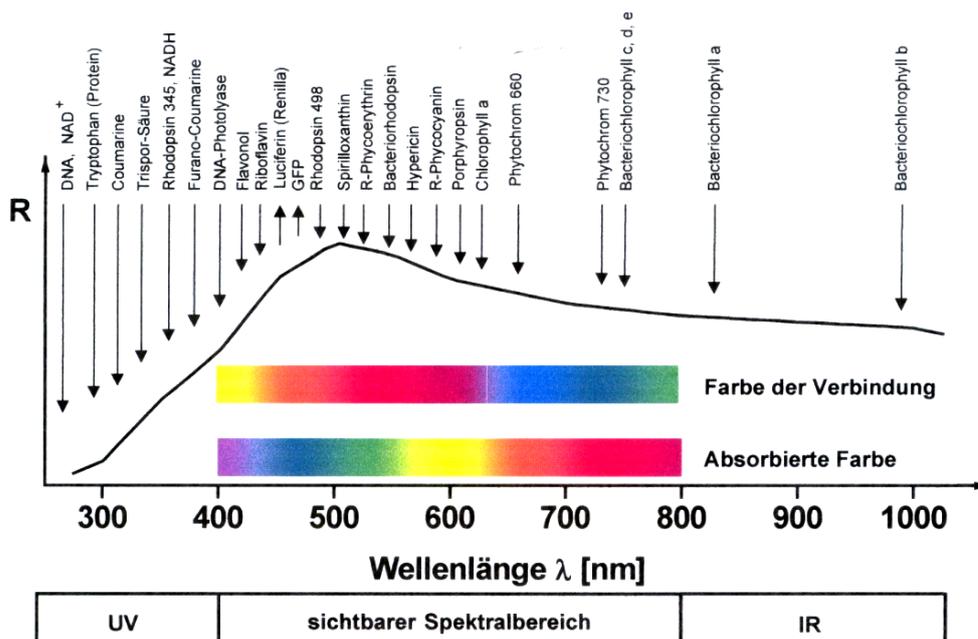


# 1. Einleitung

Die Sonne ist die wichtigste Quelle freier Energie für unseren Planeten. Mit der Entstehung des Photosynthese-Apparats vor etwa 2,5 Mrd. Jahren erfolgte der wesentliche Schritt der biologischen Evolution auf der Erde, um die elektromagnetische Energie der Sonne direkt in chemische Energie umzuwandeln (Röder 1999). Zuerst wurde die Energie durch die Spaltung von Schwefelwasserstoff ( $H_2S$ ) gewonnen, wie es heutige Purpurbakterien und Grüne Schwefelbakterien immer noch tun, und die damit als Relikte aus der Frühzeit der Evolution der Photosynthese angesehen werden können (Rauchfuß 2005, Heldt 2003). Die Verwendung von Wasser als Elektronendonator, wobei das Wasser unter Lichteinwirkung in Wasserstoff und Sauerstoff gespalten wird, führte zu einer drastischen Veränderung der Umweltbedingungen. Der bei der Photosynthese freiwerdende Sauerstoff reicherte sich in der Atmosphäre an und eröffnete so den energetisch wesentlich günstigeren Weg des aeroben Stoffwechsels. Weiterhin bildet sich aus dem atmosphärischen Sauerstoff durch energiereiche Strahlung der Sonne Ozon. Die gebildete Ozonschicht absorbiert einen Großteil der so genannten harten UV Strahlung, was letztendlich die Voraussetzung dafür war, dass sich das Leben auch auf dem trockenen Land ausbreiten konnte (Röder 1999).

Die Nutzung des Sonnenlichts als Energiequelle führte im Verlauf der Evolution zur Entwicklung und Optimierung von natürlichen photobiologisch aktiven Strukturen für alle Wellenlängen der Sonnenstrahlung.



**Abbildung 1.1: Intensitätsverteilung  $R$  des Sonnenlichtes auf der Erdoberfläche**

Weiterhin sind einige wichtige Farbstoffe und Chromophore aufgeführt, bei denen die Lage des Absorptionsmaximums durch Pfeile gekennzeichnet ist (Quelle: <http://www.schaumnest.de/wissen/farben-der-kampffische/exkurs-naturfarben.html>).

Die im Sonnenlicht steckenden Informationen sind Quantität, Qualität, Richtung, Dauer und Polarisation des Lichtes. Zählen der Photonen, Bestimmung des Verhältnisses verschiedener Wellenlängen, Bestimmung des Photonengradienten, Messung der Tageslänge und Messung des Dichroismus ermöglichen es, den Organismen diese Informationen zu gewinnen, sich durch entsprechende Reaktionen auf Änderungen ihrer Umwelt einzustellen und sich in ihr zu orientieren.

## 1.1 Photorezeptoren

Im Gegensatz zu den photosynthetischen Pigmenten (Chlorophylle, Carotinoide) und den Pigmenten, die als Lichtschutz oder der Anlockung dienen, bezeichnet man die Pigmente, die spezifisch der Lichtwahrnehmung dienen, als (sensorische) Photorezeptoren.

Photorezeptoren sind Chromoproteine, deren prosthetische Gruppe Farbstoffcharakter besitzen und deshalb oft als Chromophor bezeichnet wird. Die Einlagerung des Kofaktors in das Protein (Apoprotein) führt zum so genannten Holoprotein, wobei in einigen Fällen der Kofaktor kovalent mit dem Protein verknüpft wird. Die spektralen Eigenschaften werden vorwiegend durch den Chromophor bestimmt, wobei die Absorption von elektromagnetischer Strahlung im nahen ultravioletten, sichtbaren (400-700 nm) oder nahen infraroten Bereich an das Vorhandensein von konjugierten Doppelbindungen geknüpft ist. Durch die Einlagerung des Kofaktors in die Proteinmatrix werden die spektralen Eigenschaften des Chromophors moduliert. Erst dieses ausgeklügelte Wechselspiel zwischen Ligand und Protein führt dazu, dass die elektromagnetische Energie der Photonen in die chemische Sprache der Zellen übersetzt wird. Dabei wird die primäre Photoreaktion, meistens eine Isomerisierung, durch die Absorption von Licht der geeigneten Wellenlänge ausgelöst. Dieser erste Schritt induziert dann Konformationsänderungen im Protein, die besonders im peripheren Bereich des Proteins Bindestellen für andere Proteine erzeugen (Briggs & Spudich 2005).

Photorezeptoren sind Schaltermoleküle, die in zwei Hauptzuständen, einem dunkeladaptierten Grundzustand und einem licht induzierten Signalzustand existieren. Der Photozyklus beschreibt dann den Ablauf des durch Licht induzierten Wechsels zwischen diesen beiden Zuständen.

Da einzelne Pigmente aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften jeweils nur bestimmte Anteile des Spektrums absorbieren können, hat die Natur verschiedene Photorezeptoren mit unterschiedlichen Absorptionseigenschaften hervorgebracht. Diese können anhand der chemischen Struktur ihrer Chromophore in wenige Familien eingeteilt werden (Tabelle 1.1) (Hellingwerf 2000, van der Horst 2004, Briggs & Spudich 2005).

Photorezeptor Familie	Chromophore	Primäre Photochemie	Biologische Funktion
Rhodopsine	Retinal: Lineares Polyen	Trans $\Leftrightarrow$ cis und cis $\Leftrightarrow$ trans Isomerisierung	Sehsystem, Bakterielle Phototaxis, Circadiane Regulation
Phytochrome	Lineare Tetrapyrrole (P $\Phi$ B, PCB, BV)	Trans $\Leftrightarrow$ cis Isomerisierung	Photomorphogenese, Schattenvermeidung, Blühinduktion, Phototaxis etc.
Xanthopsine oder PYP	S-coumaryl Ester 4-OH-cinnamyl	Trans $\Leftrightarrow$ cis Isomerisierung	Phototaktischer Response, Regulation der Flavoid Synthese
Cryptochrome	Flavin & Antenne (FAD & 5,10-MTHF)	Elektronen und/oder Energie Transfer	Photomorphogenese, Blühinduktion, circadiane Regulation und Synchronisation
Phototropine	Flavin (2FMN)	FMN-cysteinyl Addukt Bildung	Phototropismus, Chloroplastenbewegung, Stromata Öffnung
Adenyl Cyclase	Flavin (2 FAD)	Blaulicht induzierte Cyclase	Photophobischer Response

Tabelle 1.1: Die wichtigsten Familien der sensorischen Photorezeptoren

Die bekannteste und am besten untersuchte Familie ist die der Rhodopsine. Bisher wurden mehr als 300 verschiedene Proteine dieser Familie identifiziert (Briggs & Spudich 2005). Sensor-Rhodopsin, das prominenteste Mitglied der Rhodopsin-Familie, katalysiert unter anderem den einzigen licht-sensitiven Schritt des Sehvorganges und gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), einer Proteinfamilie von Transmembran-Rezeptoren (Ernst 2002). Es besteht aus dem Protein Opsin (Ovchinnikov 1983) und der prosthetischen Gruppe 11-cis Retinal einem Derivat von Vitamin A (Hargrave 1983). Die Absorption eines Photons wandelt das 11-cis Retinal in das all-trans Retinal um. Danach wird eine Reihe von Intermediaten durchlaufen, durch die eine Kaskade von Reaktionen ausgelöst wird, die wiederum in einer Veränderung des Membranpotentials resultieren. Um das 11-cis Isomer zurück zu erhalten sind dann eine Reihe von enzymatischen Reaktionen erforderlich, wodurch der Zyklus komplettiert wird (Ernst 2002).

1985 konnte T.E. Meyer ein gelbes Protein aus dem halophilen, phototrophen Bakterium *Ectothiorhodospira (Halorhodospira) halophila* isolieren (Meyer 1985), das in einer darauf folgenden Studie als „Photoactive Yellow Protein“ (PYP) bezeichnet wurde (Mc Ree 1986). Aufgrund der dem Sensor Rhodopsin ähnelnden Photochemie (Hoff 1994a) und der Vorhersage einer ähnlichen Funktion (Sprenger 1993), wurden PYP-Proteine auch als Xanthopsine bezeichnet (Kort 1996). PYP ist ein etwa 14 kDa großer cytoplasmatischer Photorezeptor. Strukturuntersuchungen haben eine hohe Homologie der Tertiärstruktur von PYP- und PAS-Domänen aufgezeigt (mehr zu PAS-Domänen siehe unten). Nahezu die gesamte Aminosäuresequenz von PYP ist an der Ausbildung der PAS-Domäne beteiligt, weshalb PYP auch als einzelne PAS-Domäne mit einer 30 Aminosäure langen N-terminalen Erweiterung betrachtet werden kann. PYP ist das erste Protein der PAS-Domänen Familie, für das die 3-D-Struktur aufgeklärt wurde und das daher zum Prototypen der PAS-Domänen-Faltung erklärt wurde (Pellequer 1998). Der Chromophor, 4-Hydroxymethylsäure, ist über eine Thioesterbindung an die einzige Cysteingruppe des Proteins gebunden (Hoff 1994b). Die Aktivierung erfolgt durch Absorption von blauem Licht ( $\lambda_{\max}=446\text{nm}$ ) wodurch es zu einer partiellen Bleichung kommt (Meyer 1989). Dabei kommt es zu einer trans/cis-Isomerisierung der C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> Doppelbindung des Chromophors und zur Ausbildung des I<sub>0</sub>-Zustandes (Genick 1998, Groot 2003, Heyne 2005). Dieser zerfällt innerhalb einer Nanosekunde zum Intermediat I<sub>1</sub> (Groot 2003). Beim Übergang von I<sub>1</sub> nach I<sub>2</sub> wird der Chromophor protoniert (Imamoto 1997, Unno 2002 und 2003), wobei noch nicht geklärt ist, ob das Proton intramolekular übertragen oder vom Medium aufgenommen wird (Xie 2001, Borucki 2002). Aus I<sub>2</sub> bildet sich mit einer Lebensdauer von 3 ms das Intermediat I<sub>2</sub>' (Brudler 2001, Borucki 2002, Yeremenko 2006). Dieser Übergang ist mit relativ starken Konformationsänderungen des Proteins assoziiert (Rubinstenn 1998, Imamoto 2002, Sasaki 2002), und es wird angenommen, dass I<sub>2</sub>' der Signalzustand ist, der mit dem noch nicht gefundenen Response Regulator wechselwirkt (Cusanovich 2003). Danach geht der Signalzustand innerhalb von 400 ms in den Grundzustand über, wobei es zur Deprotonierung des Chromophors und zur Re-isomerisierung kommt (Devanathan 1998, Joshi 2005).

Cryptochrome wurden zunächst in Pflanzen identifiziert und erst nachfolgend in Bakterien, Pilzen, Tieren und dem Menschen (Ahmad 1993, Lin 1995). Pflanzliche Cryptochrom-Proteine haben ein Molekulargewicht von etwa 70 kDa und sind mit den DNA-Reparaturenzymen, den DNA-Photolyasen, verwandt (Sancar 1994). Selber besitzen sie keine DNA-Photolyase-Aktivität, sondern sie nutzen blaues Licht als Signal zur Steuerung zahlreicher Entwicklungsprogramme wie Photomorphogenese, Blütenbildung und der inneren Uhr (Briggs & Spudich 2005). Cryptochrome und Photolyasen verwenden zwei Chromophore (Sancar 2003), zum einen FAD (Flavinadenin-Dinukleotid) und zum anderen Pterin (Methenyl-tetrahydrofolatm, MTHF). Beide Chromophore sind nicht kovalent an das Apoprotein gebunden. Das FAD fungiert als essentieller Chromophor, wobei die Aktivierung

auf einem reversiblen Elektronentransfer beruht. Das Pterin hingegen überträgt seine Anregungsenergie strahlungslos mittels Förster-Transfer auf das FAD (Cashmore 1999).

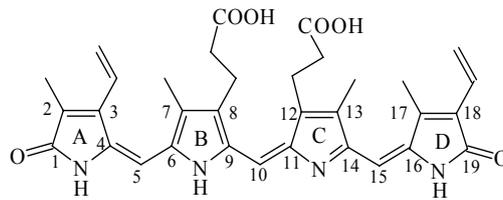
Phototropine repräsentieren die zweite Familie von Blaulichtrezeptoren. Ihr Name leitet sich von ihrer Beteiligung an der Regulation des Phototropismus ab (Reymond 1992; Briggs & Huala 1999; Lin 2002). Neben dieser Funktion sind sie aber auch an der Phototaxis der Chloroplasten (Kagawa 2001) und an der Regulation des Öffnens der Stomata beteiligt (Zeiger & Helper 1977; Kinoshita 2001). Phototropine sind aus zwei Domänen aufgebaut. Die Amino-terminale Domäne beinhaltet zwei LOV-Domänen (Light-Oxygen-Voltage) und ist für die Wahrnehmung des Lichtsignals zuständig. LOV-Domänen gehören zu der Familie der PAS Domänen (siehe unten), die Kofaktoren binden und Proteininteraktionen vermitteln (Christie 2007). Jede dieser LOV-Domänen kann als Chromophor ein FMN (Flavin-Mononukleotid) binden (Christie 1999). Der Chromophor ist im Grundzustand nicht kovalent gebunden, nach Absorption von blauem Licht hingegen wird der Chromophor transient kovalent an einen konservierten Cysteinrest der LOV-Domäne gebunden. Die Carboxy-Domäne ist eine Serin/Threonin Kinase, die nach der Lichtanregung eintretende Konformationsänderung ermöglicht eine ATP abhängige Autophosphorylierung an neun Stellen im Bereich der LOV Domänen (Briggs & Christie 2002). Phototropine sind somit licht-regulierte Proteinkinasen an deren Signalketten derzeit intensiv geforscht wird. Bei *Arabidopsis thaliana* sind zwei Gene bekannt, die für die Phototropine Phot1 und Phot2 kodieren (Briggs & Christie 2002, Celaya 2005). Analysen mit Phototropinmutanten haben gezeigt, dass Phot1 und Phot2 teilweise überlappende Rollen in der Regulation des Phototropismus einnehmen (Sakai 2001).

BLUF-Domäne (sensor of **blue light using FAD**) enthaltene Proteine bilden die dritte Blaulichtrezeptorfamilie die einen Flavinchromophor benutzen (Gomelsky & Klug 2002). Die lichtempfindliche Domäne umfasst circa 120 Aminosäuren und bindet FAD (Flavin-Adenine-Dinukleotid) als Chromophor. BLUF-Proteine kontrollieren eine Reihe lichtabhängiger Prozesse in Prokaryonten und niederen Eukaryonten, darunter die Transkription von Photosynthesegenen, den Metabolismus zyklischer Nukleotide sowie die Motilität einiger pathogener Mikroorganismen wie *Salmonella typhimurium* (Briggs & Spudich 2005, van der Horts 2004). Man unterscheidet kurze und so genannte komplexe BLUF-Proteine, bei denen Photosensor und Effektor auf derselben Polypeptidkette liegen (Gomelsky & Klug).

## 1.2 Tetrapyrrole und Biliproteine

Während das N-heterozyklische Pyrrol an sich eine außerordentlich stabile chemische Verbindung ist, ist es als Monomer oder auch als Di- oder Tripyrrolin in der Natur kaum zu finden. Tetrapyrrole hingegen kommen in der belebten Natur, mit Ausnahme einiger vorwiegend anaerober Bakterien, universell vor und werden deshalb auch als „Pigmente des Lebens“ bezeichnet (Battersby 2000). Die einzelnen Pyrrolringe sind dabei über so genannte Methin-Brücken, die formal aus einer Einfach- und einer Doppelbindung bestehen, mit-einander verknüpft. Die Doppelbindungen können in der Z- oder E-Konfiguration und die Einfachbindungen in der syn oder anti Konformation vorliegen (siehe Abbildung 1.2). Der weiten Verbreitung entsprechend findet man Tetrapyrrole mit den verschiedensten Funktionen. Zu den bekanntesten zählen die geschlossenen ringförmigen Tetrapyrrole, die Porphyrine und die mit ihnen verwandten Chlorine, Bacteriochlorine und Corrine. Sie sind meist als prosthetische Gruppen Bestandteil von Proteiden, das sind Proteine die noch eine prosthetische Gruppe beinhalten, und sind oft mit einem Metallatom wie Eisen oder Magnesium als Zentralatom koordiniert. Ihre Aufgaben reichen dabei vom Sauerstofftransport und der –speicherung beim Hämoglobin und Myoglobin über den Elektronen- und Energietransfer der Cytochrome und

Chlorophyll bis hin zur Katalyse biochemischer Reaktionen von Vitamin B<sub>12</sub> und Cytochrom P450 (Christen 1989).



**Abbildung 1.2: Die Struktur von linearen Tetrapyrrolen anhand des freien Biliverdins**

Die vier Pyrrolringe A, B, C und D sind über Methinbrücken miteinander verknüpft. Diese Doppel- und Einfachbindungen können unterschiedliche Konfigurationen bzw. Konformationen einnehmen. In der Abbildung liegt der Chromophor in der 5E, 10E und 15E Konfiguration und der 5 anti, 10 anti und 15 anti Konformation vor. Teilweise wird auch die Beschreibung EEEaaa oder 5Ea 10Ea und 15Ea verwendet.

Die offenkettigen linearen Tetrapyrrole entstehen durch die Ringöffnung von Häm. Diese Ringöffnung hat bei Tieren eine andere Bedeutung als bei Pflanzen und Photosynthese treibenden Bakterien (Rüdiger 1993). Im ersten Fall steht die Rückgewinnung von Eisen im Vordergrund und die linearen Tetrapyrrole sind dort Abbauprodukte, die als grüne und gelbe Farbstoffe in der Galle gefunden und zu Anfang des 19. Jahrhunderts aus Gallensteinen isoliert wurden (Thenard 1807, Berzelius 1808). Der grüne Farbstoff wurde Biliverdin und der gelbe als Gallenroth bzw. Bilirubin bezeichnet. Die Struktur als offenkettiges Tetrapyrrol und somit auch das Grundgerüst der übrigen Gallenfarbstoffe wurde 1933 durch Seidel und Fischer aufgeklärt (Seidel & Fischer 1933). Aufgrund des Fundorts werden die Gallenfarbstoffe auch nach dem englischen Wort für „bile“ (Galle) als Biline bezeichnet. Im Falle der Pflanzen steht die Biosynthese der offenkettigen Tetrapyrrole für Phycobiline und Phytochrom im Vordergrund (Rüdiger 1993).

In der Natur kommen Biline fast immer an Proteine gebunden vor. Der Komplex von Protein und Bilin als prosthetischer Gruppe wird als Biliprotein bezeichnet. Während die Proteinbindung der Biline bei Säugetieren nie kovalent ist (Serumalbumin), sind sie bei Pflanzen und Photosynthese treibenden Bakterien mit wenigen Ausnahmen immer kovalent verknüpft (Rüdiger 1993).

Die Biliproteine von Cyanobakterien und Rotalgen werden schon seit 150 Jahren untersucht. In diesen Photosynthese treibenden Bakterien und Algen kommen die als Phycobiliproteine bezeichneten Biliproteine in großer Menge vor und können bis zu 40 Prozent des Proteingehalts der Zelle ausmachen (Heldt 2003). Phycobiliproteine sind Bestandteile der Phycobilisome, die als Lichtsammelkomplexe in den Antennenstrukturen den zur Verfügung stehenden Wellenlängenbereich und den Absorptionsquerschnitt der Photosysteme I und II erweitern. In Pflanzen und Grünalgen wird diese Aufgabe durch die Lichtsammelkomplexe LHCI und LHCII (light harvesting complex) übernommen, die keine Biline, sondern Chlorophylle und Carotinoide enthalten (Heldt 2003). Phycobilisome sind hoch organisierte Komplexe, die aus verschiedenen Biliproteinen und Linkerpeptiden aufgebaut sind. Die Grundstruktur der Phycobiliproteine besteht aus einem Heterodimer ( $\alpha\beta$ ), das pro Untereinheit vier bis sechs Phycobiline bindet. Drei dieser Dimere aggregieren zu einem ringförmigen Trimer ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub>, von denen sich mehrere zu zylindrischen Stäbchen zusammensetzen. Dabei stehen sechs bis acht dieser Stäbchen senkrecht auf dem aus zwei bis fünf zylindrischen Untereinheiten angeordneten Kern, während der Kern selbst parallel zur Thylakoidmembran liegt (Heldt 2003).

## 1. Einleitung

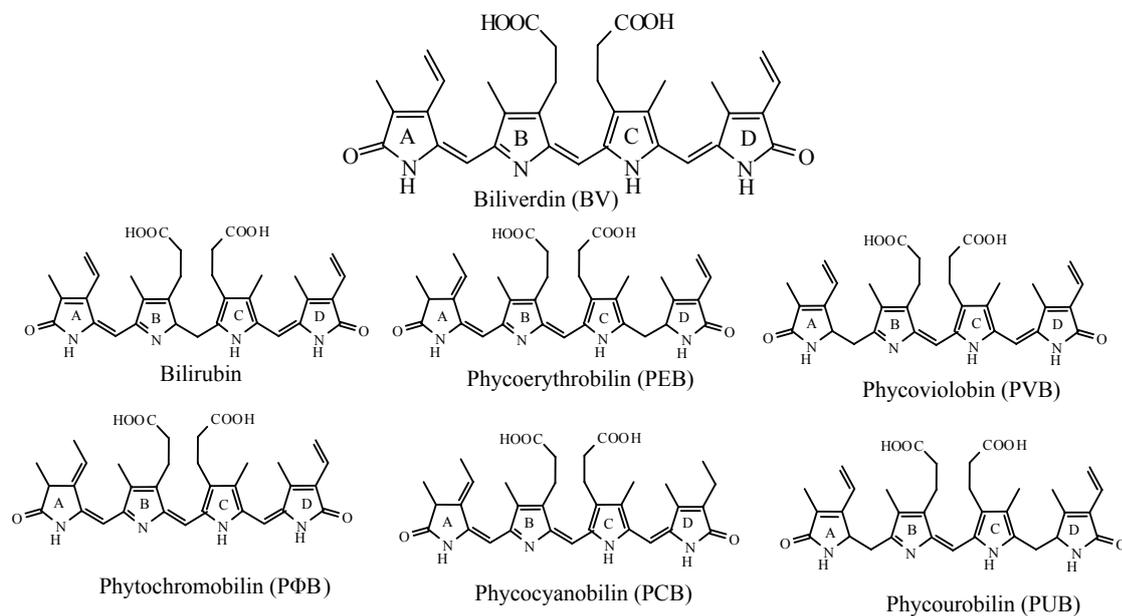
Die Phycobiline werden aufgrund ihrer optischen Eigenschaften in vier verschiedene Klassen eingeteilt (Heldt 2003).

- Phycoerythrine (PE):  $\lambda_{\max}=560-575$  nm,
- Phycoerythrocyanine (PEC):  $\lambda_{\max}=575-585$  nm,
- Phycocyanine (PC):  $\lambda_{\max}=610-640$  nm und
- Allophycocyanine (APC):  $\lambda_{\max}=650-655$  nm.

Die Anordnung der einzelnen Komponenten ist so, dass die hochenergetisch absorbierenden Biliproteine wie Phycoerythrine und Phycoerythrocyanine am weitesten vom Kern entfernt liegen, sich daran die Phycocyanine anschließen, und der Kern wird letztendlich von Allophycocyanin gebildet. Die Energie des absorbierten Lichts wird dabei mittels Förster Transfer auf das Chlorophyll übertragen.

Die jeweiligen Phycobiliproteine unterscheiden sich hauptsächlich durch die Art und Anzahl ihrer kovalent gebundenen Chromophore. In Struktur und Aufbau zeigen sie allerdings starke Ähnlichkeiten. Als Chromophor wurden bisher vier verschiedene Biline gefunden, die sich durch Lage und Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden, Phycocyanobilin (PCB), Phycoerythrobilin (PEB), Phycoviolobilin (PVB) und Phycourobilin (PUB) (Abbildung 1.3).

Die Biline sind kovalent über eine Thioetherbindung mit dem Apoprotein verknüpft. Die Bindung erfolgt zwischen der Sulfhydrylgruppe eines konservierten Cysteins des Apoproteins und der 3<sup>1</sup> Position der Ethylidengruppe des Chromophors. Die Verknüpfung von Protein und Chromophor erfolgt dabei in einigen Fällen autokatalytisch (Arciero 1988a), in anderen Fällen ist aber eine separate Lyase notwendig (Arciero 1988b, Fairchild 1992).



### Abbildung1.3: Struktur freier Biline

Biliverdin (BV), Bilirubin, Phycoerythrobilin (PEB), Phytochromobilin PΦB, Phycoviolobin (PVB) Phycocyanobilin (PCB) und Phycourobilin (PUB)

### 1.2.1 Optische Eigenschaften von Biliproteinen und beeinflussende Faktoren

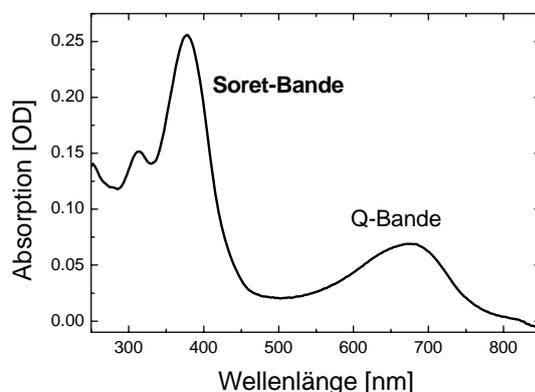
Wie oben schon erwähnt werden die spektralen Eigenschaften stark durch den Chromophor geprägt. So wird das Absorptionsmaximum entscheidend von der Größe des konjugierten  $\pi$ -Elektronensystems und im Falle der Biline von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen bestimmt. Anhand von denaturierten Proteinen wurde der Einfluss der unterschiedlichen Anzahl an konjugierten Doppelbindungen gezeigt. So absorbiert

- 3<sup>1</sup>-Cys-Phycocyanobilin (8 konjugierte Doppelbindungen) bei 663nm (Glazer & Fang 1973)
- 3<sup>1</sup>-Cys-Phycoviolobin (7 konjugierte Doppelbindungen) bei 594nm (Zhao & Sheer 1995)
- 3<sup>1</sup>-Cys-Phycoerythrobilin (6 konjugierte Doppelbindungen) bei 555nm (Glazer 1975) und
- 3<sup>1</sup>-Cys-Phycourobilin (5 konjugierte Doppelbindungen) bei 500nm (Alberte 1984).

1959 schlug Gouterman (Gouterman 1959) sein bis heute verwendetes Vier-Orbitalmodell zur Interpretation von Absorptionsspektren der Tetrapyrrole vor. Obwohl dieses Modell stark vereinfachend ist, werden die dort getroffenen Bezeichnungen bis heute verwendet. Tetrapyrrole zeigen nach Falk (Falk 1989) zwei Absorptionsbanden, eine im roten und eine im blauen Spektralbereich. Die Absorption im blauen Spektralbereich wird als Soret-Bande und die Absorption im roten Spektralbereich als Q-Bande bezeichnet (Abbildung 1.4).

Allerdings zeigt sich immer wieder, dass sich die Wellenlänge, der Extinktionskoeffizient und auch die photochromen Eigenschaften nach Einlagerung in die Proteinmatrix verändern.

Eine wichtige Rolle spielt dabei der Protonierungszustand des basischen Pyrrolstickstoffes. Die Protonierung dieses basischen Pyrrolstickstoffes führt zu einer Rotverschiebung des Absorptionsmaximums und einer Steigerung der Absorption (Falk 1989).



**Abbildung 1.4: Absorptionsspektrum von freiem Biliverdin in wässriger Lösung**

Das Absorptionsmaximum der Soret-Bande liegt bei 380 nm und das der Q-Bande bei etwa 680 nm.

Biline nehmen in wässriger Lösung eine zyklische-helikale Struktur ein (Scheer 1981). Die Aminosäurereste der Bindungstasche bestimmen beim Einbau des Chromophors in welcher Geometrie der Chromophor im Holoprotein vorliegt. Nimmt der Chromophor eine gestrecktere Konformation ein führt dies zu einer Verlagerung von Oszillatorstärke aus der Soret-Bande in die Q-Bande (Falk 1989).

Bei den Bilinen erfolgt die Konjugation über die Methinbrücken der Pyrrolringe. Eine durch die Bindungstasche bedingte Torsion der Ringe zueinander führt zu einer partiellen Entkopplung des konjugierten Systems. Wird der Torsionswinkel zu groß, führt das zu einer

vollständigen Entkopplung des konjugierten Systems und so zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums (Falk 1989).

Neben dem Einfluss auf den Extinktionskoeffizienten und das Absorptionsmaximum beeinflusst die Proteinumgebung auch das Fluoreszenzverhalten des Chromophors. So zeigt PCB in isoliertem Phycocyanin eine starke Fluoreszenz und kein photochromes Verhalten, während der gleiche Chromophor im cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 kaum fluoresziert, dafür aber photochrome Eigenschaften aufweist (Sineshchekov 1998). Die Energiebarriere für die Photochromie wird im Fall von Phycocyanin mit  $> 100\text{kJ/mol}$  angegeben und im Fall von Cph1 mit  $5\text{kJ/mol}$  (Sineshchekov 1995, Sineshchekov 1998). Ob ein Chromophor auf Lichtanregung mit Fluoreszenz oder einer photochemischen Reaktion reagiert, wird also ganz entscheidend durch die Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung bestimmt.

### 1.3 Phytochrome

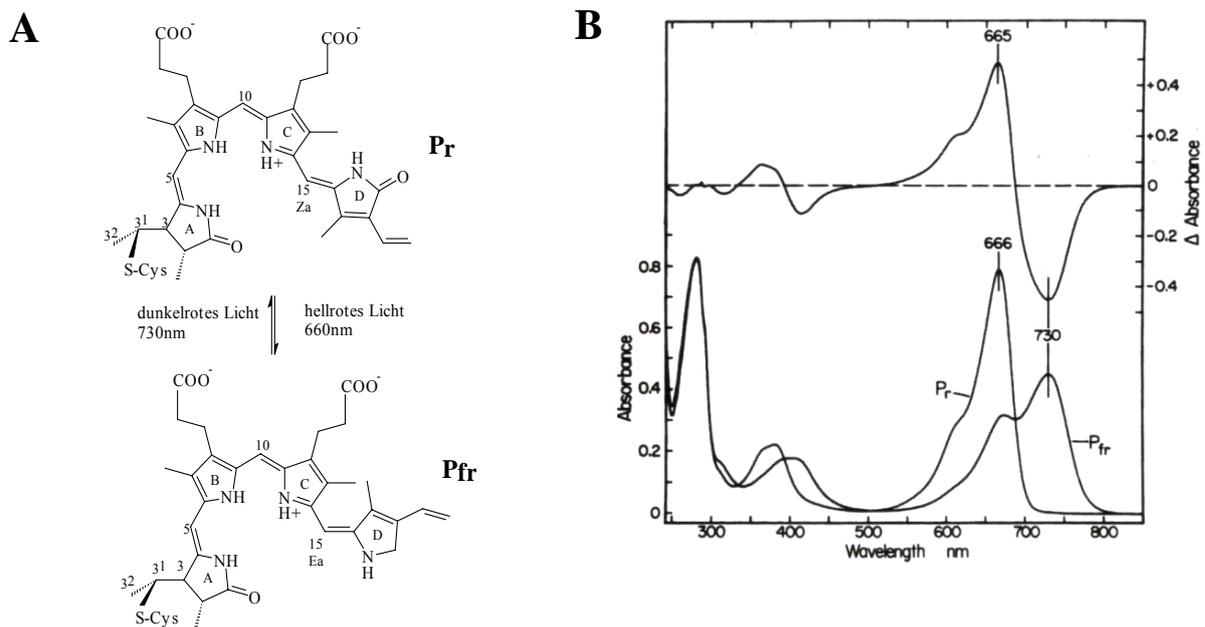
Die Biline sind kovalent durch eine Thioetherbindung mit dem Apoprotein verknüpft. Die Bindung erfolgt zwischen der Sulfhydrylgruppe eines konservierten Cysteins des Apoproteins und der 3<sup>1</sup> Position der Ethylidengruppe des Chromophors. Die Verknüpfung von Protein und Chromophor erfolgt dabei in einigen Fällen autokatalytisch (Arciero 1988a), in anderen Fällen ist aber eine separate Lyase notwendig (Arciero 1988b, Fairchild 1992).

Phytochrome sind eine weit verbreitete Familie von Rotlichtrezeptoren. Die ersten Hinweise auf ein Photorezeptorsystem mit speziellen Eigenschaften gingen aus den Arbeiten von Garner (Garner & Allard 1920) hervor. Flint und Mitarbeiter zeigten dann, dass die Keimung von Salatsamen durch hellrotes Licht stimuliert und durch dunkelrotes Licht inhibiert wird (Flint & Mc Allister 1937). Borthwick untersuchte diesen Effekt genauer (Borthwick 1952) und stellte fest, dass die Keimung von Salatsamen davon abhing, welchem Lichtimpuls, hell- oder dunkelrot, die Samen zuletzt ausgesetzt waren. Daraus schloss er, dass es ein Pigment gibt, das in zwei ineinander überführbaren Formen vorliegen kann, einer hellrot und einer dunkelrot absorbierenden. 1959 konnte Butler (Butler 1959) zum ersten Mal Phytochrom in Pflanzenextrakten nachweisen und bestätigte die einzigartigen photoreversiblen Eigenschaften. Der Nachweis, dass es sich bei der prosthetischen Gruppe um ein Bilin handelt, erfolgte 1969 (Rüdiger & Correl 1969). Lange nahm man an, dass Phytochrome nur in Pflanzen vorkommen (phyto = griechisch für Pflanze). Aber in den vergangenen Jahren wurden zahlreiche homologe Sequenzen in Pilzen, Algen und Bakterien gefunden. Phytochrome sind also eine weit verbreitete Superfamilie die sich in fünf Klassen einteilen lässt: Pflanzliche Phytochrome, cyanobakterielle, bakterielle und pilzliche Phytochrome sowie ein Cluster von Phytochrom-ähnlichen Sequenzen (Rockwell 2006).

Die pflanzlichen Phytochrome sind die am besten charakterisierte Klasse dieser Familie. Im Zusammenspiel mit anderen Photorezeptoren steuern sie eine Reihe von Photomorphogenesen wie Keimung, Deetiolierung, Chloroplastendifferenzierung, Schattenvermeidungsreaktion, Blütenbildung, Ausbildung von Speicherorganen, Wahrnehmung von Lichtrichtung und Regulation zirkadianer Rhythmen (Schäfer & Nagy 2006). Vor allem in höheren Pflanzen wurden bis zu fünf verschiedene Isoformen gefunden, die sich in ihrer Sequenz, Stabilität und Konzentration in der Zelle unterscheiden und verschiedene Reaktionen steuern (Quail 1984). Diese Isoformen, die zuerst in *Arabidopsis thaliana* gefunden wurden (Sharrock & Quail 1989), werden mit PhyA-E bezeichnet und lassen sich in zwei Typen einteilen, die lichtlabilen Typen wie PhyA und die lichtstabilen Typen wie PhyB-E (Furuya 1993).

Phytochrome sind lösliche Dimere, deren prosthetische Gruppe Biline sind. Die pflanzlichen Phytochrome haben ein Molekulargewicht von ungefähr 118-127 kDa, während das Molekulargewicht der bakteriellen Phytochrome etwas geringer ist und etwa bei 85 kDa liegt (Rockwell 2006). Pro Untereinheit wird jeweils ein Chromophor kovalent über eine Thioetherbindung an einen konservierten Cysteinrest gebunden (Lagarias 1980). Da Phytochrome eine intrinsische Bilin-Lyase-Aktivität besitzen, erfolgt die kovalente Bindung autokatalytisch (Lagarias & Lagarias 1989).

Die photochromen Eigenschaften aller Phytochrome sind charakterisiert durch die beiden thermisch stabilen Zustände  $P_r$  (*Phytochrome red absorbing*) mit einem Absorptionsmaximum bei 660 nm, und  $P_{fr}$  (*Phytochrome farred absorbing*) mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 730 nm, die durch hellrotes bzw. dunkelrotes Licht reversibel ineinander umgewandelt werden können (Abb.1.5).



**Abbildung 1.5: Photokonversion von pflanzlichem Phytochrom PhyA**

(A) Struktur des gebundenen PΦB Chromophors in der  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Form. Es wurde nur die 15 Z/E Isomerisierung der Methinbrücke von Ring C und D berücksichtigt.

(B) Absorptionsspektren von gereinigtem Hafer-Phytochrom A nach dunkelroter ( $P_r$ ) und roter ( $P_{fr}$ ) Beleuchtung unten. Oben das Differenzspektrum der dunkelrot – rot beleuchteten Form (nach Vierstra und Quail 1983).

Der primäre photochemische Schritt ist eine Z/E-Isomerisierung für die  $P_r$ -/ $P_{fr}$ -Photokonversion bzw. für die  $P_{fr}$ -/ $P_r$ -Photokonversion eine E-/Z-Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung der Methinbrücke zwischen Ring C und D (Rüdiger 1983, Inomata 2005). Auf den primären Schritt folgt eine Serie von Chromophor-Protein-Interaktionen und Umlagerungen, durch die die biochemische Funktion des Holo-Proteins verändert wird. Die Lage der  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Absorptionsmaxima hängen in erster Linie vom eingebauten Chromophor ab. Da sich die beiden Absorptionsspektren überschneiden, führt selbst sättigende Beleuchtung mit hellrotem bzw. dunkelrotem Licht immer zu einem Photogleichgewicht. Die Lage des Gleichgewichtes gibt damit das Verhältnis zwischen dem hell- und dunkelroten Anteil des einfallenden Lichtes an. Das  $P_r$ -/ $P_{fr}$ -Verhältnis variiert dabei bei den verschiedenen Phytochromen, doch grundlegend gemein ist ihnen, dass die biologische Antwort durch das Verhältnis beider Formen determiniert ist (Rockwell 2006). Neben der Photokonversion zeigen einige Phytochrome noch eine langsame Dunkelreversion, die sowohl von  $P_{fr}$  nach  $P_r$  gehen kann wie beim bak-

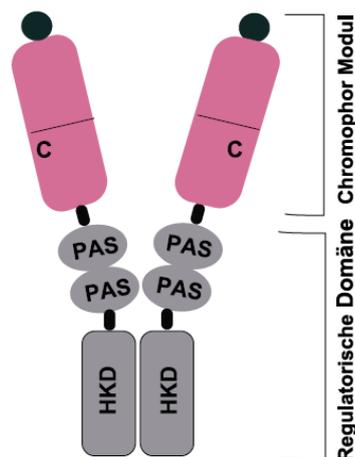
teriellen Phytochrom Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* als auch von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  wie beim aus demselben Organismus stammenden Agp2 (Karniol & Vierstra 2002).

In den pflanzlichen Phytochromen ist der  $P_{fr}$ -Zustand die aktive Form und löst die Signalkaskade aus. Bei einigen bakteriellen Phytochromen, wie z.B. Cph1 zeigt jedoch die  $P_r$ -Form die stärkere Phosphorylierungsaktivität für den Response Regulator (Yeh 1997).

### 1.3.1 Domänenstruktur von Phytochromen

Alle Phytochromfamilien besitzen im Wesentlichen einen homologen Aufbau. Die Dimere nehmen eine Y-förmige Quartärstruktur ein (Abb.1.6), wie elektronenmikroskopische und mit Röntgenkleinwinkelstreuung angefertigte Untersuchungen zeigen (Jones & Erickson 1989, Nakasako 2005, Evans 2006).

Jedes Monomer ist aus zwei Domänen aufgebaut. Die N-terminale photosensorische Domäne auch Chromophor-Modul genannt bindet den Chromophor und ist für die spektralen Eigenschaften des Phytochroms verantwortlich. In der Domänenstruktur nach Karniol & Vierstra (Karniol & Vierstra 2006) sitzt das Chromophor-Modul in den auseinander laufenden Spitzen des Y. Das Chromophor-Modul setzt sich aus bis zu vier Subdomänen, die mit P1 bis P4 bezeichnet werden zusammen (Abbildung 1.7).



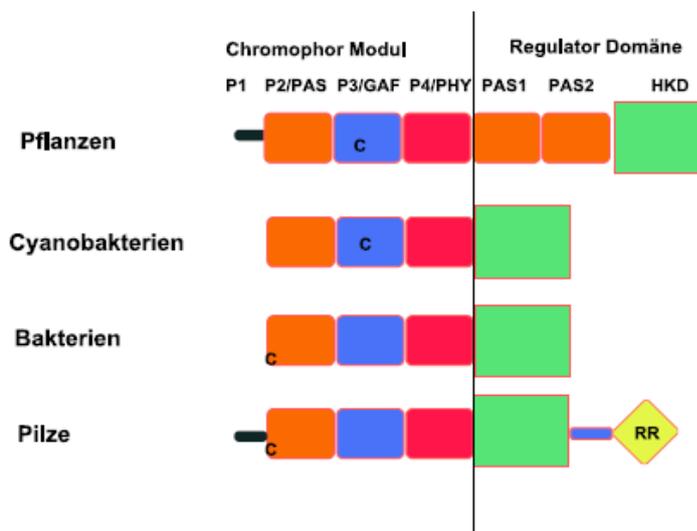
**Abbildung 1.6: Quartärstruktur von pflanzlichem Phytochrom nach Karniol und Vierstra 2006.**

C bezeichnet die konservierte Cysteinbindestelle. Phytochrom ist in  $P_r$  an der regulatorischen Domäne miteinander nicht kovalent verbunden, während das Chromophor Modul in den auseinander laufenden Spitzen sitzt.

P1 ist oft eine Serin reiche N-terminale Verlängerung und wird nur in den pflanzlichen und pilzlichen Phytochromen gefunden. Der Kernbestandteil des Chromophor-Moduls sind die in allen Phytochromen vorhandenen Subdomänen P2-4, die auch die höchste Sequenzhomologie innerhalb der Phytochromfamilie aufweisen (Rockwell 2006).

Bei P2 handelt es sich um eine PAS- oder PLD- („PAS Like Domain“) Domäne. PAS-Domänen wurden zuerst in einer Proteinfamilie von Transkriptionsregulatoren gefunden und wurden nach den Proteinen, in denen diese Sequenzen zuerst entdeckt wurden (**P**ER-period clock protein, **A**RNT- aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator und **S**IM-single minded von *Drosophila*) (Ponting 1997, Huang 1993, Montgomery & Lagarias 2002) benannt. PAS-Domänen binden oft kleine Liganden wie Flavine, Häm oder planare aromatische Moleküle oder sie spielen bei der Protein-Protein Interaktion eine wichtige Rolle

(Montgomery & Lagarias 2002). PAS-Domänen besitzen immer die gleiche Anordnung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt mit einem antiparallelen fünf-strängigem Faltblatt, das einen aromatischen Liganden enthalten kann. In Phytochromen ist die PAS-Domäne meist an der Bindungstasche und an der Licht Perzeption beteiligt. Auf die PAS-Domäne folgt die GAF-Domäne (P3). GAF- (cGMP spezifische Phosphodiesterase, cyanobakterielle Adenylatcyclase und Formateylase Transkriptionsfaktor FhlA,) Domänen sind strukturell mit den PAS-Domänen verwandt, binden ebenfalls oft kleine niedermolekulare Liganden und sind gleichermaßen in Signalproteinen zu finden (Aravind 1997, Montgomery & Lagarias 2002). In Phytochrom bilden sie den größten Teil der Chromophorbindungstasche und enthalten die Bilin-Lyase Funktion für die kovalente Bindung des Chromophors (Wu Lagarias 2000, Montgomery & Lagarias 2002, Rockwell 2006). Die PHY-Domänen (P4) leiten sich evolutionär von den GAF-Domänen ab und stellen eine für die Phytochromfamilie einzigartige Domäne dar. Für die spektroskopischen Eigenschaften der  $P_r$  Form scheint die PHY-Domäne nur eine mindere Bedeutung zu haben. Sie scheint vielmehr für das spektrale Feintuning und die  $P_{fr}$  Bildung und deren Stabilität zuständig zu sein (Oka 2004, Wagner 2005).



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur pflanzlicher, cyanobakterieller, bakterieller und pilzlicher Phytochrome**

Das Chromophor-Modul setzt sich aus einer PAS-, GAF- und PHY-Domäne zusammen. Mit C wurde die Cysteinbindestelle gekennzeichnet. HKD bezeichnet die Histidinkinasedomäne und RR steht für „Response Regulator“.

Die zweite Domäne ist die C-terminale regulatorische Domäne, die an der Dimerisierung und der Aktivierung der Signaltransduktion beteiligt ist. Die regulatorische Domäne ähnelt bei den meisten Phytochromen der Transmitter Domäne von Zwei-Komponenten-Histidinkinasen (HKD). Bei den pflanzlichen Phytochromen handelt es sich um Serin/Threoninkinasen mit einer Histidinkinaseabstammung (Yeh & Lagarias 1998), bei denen mehrere Substrate der Kinasereaktion identifiziert werden konnten (Fankhauser 1999).

Oftmals ist das den Antwortregulator kodierende Gen Bestandteil des Phytochrom Operons oder direkt in der Phytochromsequenz C-terminal integriert wie bei FphA aus *Aspergillus nidulans*. Für PhyA und PhyB aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass ihre C-Termini austauschbar und die jeweiligen N-Termini für die Spezifität verantwortlich sind (Wagner 1996).

In Pflanzenphytochromen ist die regulatorische Domäne durch die so genannte „hinge“- oder Schanier-Region mit dem Chromophor Modul verknüpft. Diese „hinge“-Region ist gegenüber Proteasen am empfindlichsten und wird dementsprechend als erstes angegriffen (Esteban 2005).

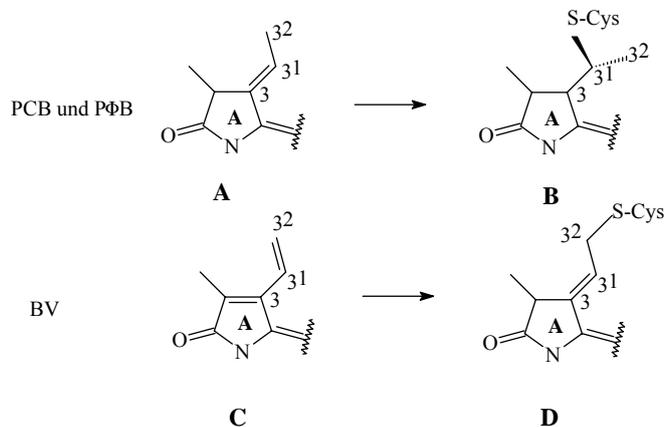
Eine weitere Besonderheit bei pflanzlichen Phytochromen ist das PAS-Modul, das aus zwei sich dem Chromophor-Modul anschließenden PAS-Domänen besteht. Sie spielen wohl eine wichtige Rolle bei der Protein-Protein Interaktion und sind Bindestelle für noch uncharakterisierte Liganden (Montgomery & Lagarias 2002, Park 2000).

### 1.3.2 Chromophor und Chromophorbindestelle

Bisher wurden in Phytochromen unter natürlichen Bedingungen drei verschiedene Biline gefunden. Das Phytochromobilin (PΦB) der pflanzlichen Phytochromen, das Phycocyanobilin (PCB) der cyanobakteriellen Phytochrome und das stärker oxidierte Biliverdin IXα (BV) der bakteriellen und pilzlichen Phytochrome.

Alle linearen Tetrapyrrole werden durch eine katalytische Ringöffnung aus Häm gebildet. Das erste Produkt dieser Ringöffnung ist Biliverdin IXα und wird durch verschiedene Ferredoxin abhängige Bilin-Reduktasen reduziert, wobei je nach Reduktase die reduzierten Biline PCB, PΦB oder PEB entstehen (Frankenberg 2001, Tu & Lagarias).

Bei der Reduktion wird die Vinylgruppe von BV des Ringes A an Position 3 zu einer Ethylidengruppe bei PCB und PΦB, was sich auf die kovalente Verknüpfung auswirkt (Abbildung 1.8). PCB und PΦB sind an Position C3<sup>1</sup> der Seitenkette kovalent mit einem konservierten Cysteinrest verknüpft, während die kovalente Verknüpfung von Biliverdin an Position C3<sup>2</sup> der Seitenkette erfolgt (Lagarias 1980, Lamparter 2001, Park 2000b, Wu 2000, Lamparter 2004b, Wagner 2005; Abbildung 1.8).



**Abbildung 1.8: Änderung der elektronischen Struktur von Ring A durch die kovalente Bindung**  
 Oben links Ring A von BV im ungebundenen Zustand und rechts daneben nach kovalenter Verknüpfung. Unten PCB/PΦB vor und nach kovalenter Verknüpfung. Bei den Chromophoren PCB/PΦB wird durch die kovalente Verknüpfung das konjugierte  $\pi$ -System verringert, während es bei BV gleich groß bleibt.

In beiden Fällen erfolgt die kovalente Bindung an eine Sulfhydrylgruppe eines konservierten Cysteins (Abbildung 1.8). Mit dem unterschiedlichen Oxidationszustand des Chromophors wechselt auch die Position des konservierten Cysteinrestes an den die Chromophore gebunden werden. Eine Ausnahme davon bildet das *Deinococcus radiodurans* Phytochrom DrBphP, das sowohl PCB als auch BV kovalent bindet (Davis 1999, Bhoo 2001, Karniol 2005, Wagner 2007). Bei Phytochromen die als natürlichen Chromophor PCB und PΦB

benutzen liegt der Cysteinrest in der GAF-Domäne unmittelbar vor einem streng konservierten Histidin, ab hier als Position A bezeichnet. Bei den BV einbauenden Phytochromen hingegen liegt die Chromophorbindestelle am N-Terminus vor der PAS-Domäne (Position B) (Lamparter 2004b). Auffällig ist, dass das Fehlen des Cysteins an Position A immer mit der Verwendung von BV als Chromophor korreliert. Dabei scheint die Ethylidengruppe für eine kovalente Verknüpfung mit dem Cystein an Position A nötig zu sein und eine Vinylgruppe für die Bindung an Cystein an Position B. Ob das auf einen unterschiedlichen Mechanismus für die kovalente Bindung hinweist, ist zurzeit nicht geklärt, da über den Mechanismus der Assemblierung bisher sehr wenig bekannt ist (Li 1995, Borucki 2003). Für CphB aus *Calothrix* und Agp1 aus *Agrobacterium* konnte gezeigt werden, dass sie auch PCB und PΦB einbauen, allerdings nicht kovalent, und photochromes Verhalten zeigen (Quest 2004, 2007). Die kovalente Verknüpfung ist also nicht Voraussetzung für die Photochromozität. Weiterhin konnte bei CphB und Agp1 kovalent gebundenes BV durch PCB verdrängt werden (Quest 2007, Lamparter 2003), woraufhin Quest den Schluss zog, dass die kovalente Verknüpfung mit Biliverdin reversibel ist (Quest 2007).

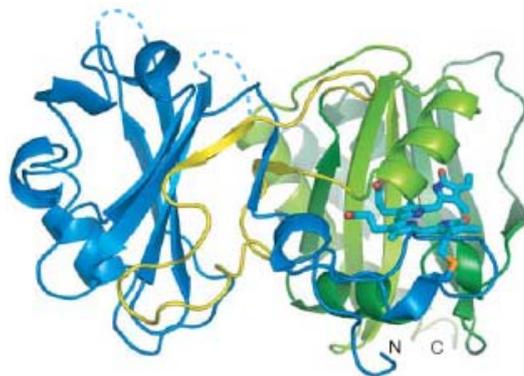
Anhand von Cph1 (Borucki 2003) konnte dargestellt werden wie die Assemblierung von Apoprotein mit dem Chromophor PCB verläuft. Zuerst lagert sich der zyklische (ZZZsss) Chromophor an das Apoprotein an. Dieser Vorgang ist so schnell, dass er bisher zeitlich nicht aufgelöst werden konnte. Im zweiten Schritt kommt es wohl zu einer partiellen Streckung des Chromophors, wahrscheinlich von der ZZZsss in die ZZZssa Konformation/Konfiguration, und zu einer Protonierung des basischen Pyrrolstickstoffes (Falk 1989, Göller 2005, Strauss 2005). Spektral bedeutet das eine Zunahme der Oszillatorstärke und eine langwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums. Dass der Chromophor nach der Assemblierung sowohl in  $P_r$  als auch in  $P_{fr}$  protoniert ist, wurde schon vorher durch verschiedene Schwingungsspektroskopischen Studien gezeigt (Foerstendorf 2000+2001, Kneip 1999). Wu und Lagarias schlugen in ihrer Arbeit von 2000 vor (Wu 2000), dass ein Proton eines sauren Aminosäurerestes auf den Chromophor, während der Assemblierung übertragen wird. Auf jeden Fall ist der Chromophor bei diesem Schritt noch nicht kovalent mit dem Protein verknüpft, wie Parallelversuche mit einer blockierten Bindestelle zeigten (Borucki 2003). Beim dritten Schritt kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 25 nm (Borucki 2003). Bei der kovalenten Verknüpfung von Chromophor und Protein wird bei PCB bzw. PΦB anders als bei BV, eine am konjugierten System beteiligte Doppelbindung reduziert (Abbildung 1.8), was eine Blauverschiebung des Absorptionsmaximums zur Folge hat, wie sie hier gefunden wird.

Bei diesem Schritt kommt es also zu Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Chromophor und Protein. Die Ausbildung der kovalenten Bindung anhand der Blauverschiebung des Absorptionsmaximums zu verfolgen, ist allerdings nur bei den reduzierten Chromophoren möglich. Beim oxidierten Chromophor Biliverdin wird während der kovalenten Verknüpfung keine am konjugierten System beteiligte Doppelbindung reduziert. Bleibt festzuhalten, dass bei der Assemblierung der Chromophor zuerst in seiner  $P_r$ -Konformation/Konfiguration eingebaut wird, selbst bei Phytochromen, bei den der Grundzustand die  $P_{fr}$ -Form ist, wie bei Agp2 (Karniol & Vierstra 2003). Weiterhin deuten die Daten daraufhin, dass es zu einer Protonierung des Chromophors kommt und dass der Chromophor eine gestrecktere Konformation einnimmt. Das Resultat ist eine Zunahme der Oszillatorstärke und eine langwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zum freien Chromophor.

### 1.3.3 Kristallstruktur von Phytochrom

Um die Photochemie und die damit verbundenen strukturellen Zusammenhänge von Phytochromen zu untersuchen, war man bisher auf indirekte Methoden angewiesen. 2005 gelang in dieser Hinsicht ein Durchbruch mit der Lösung einer Kristallstruktur eines Fragmentes des bakteriellen Phytochroms (DrBphP) aus *Deinococcus radiodurans* (Wagner 2005, Wagner 2007). Das DrBphP-Fragment bestand aus der PAS- und GAF-Domäne des Chromo-phormoduls und wird als „chromophore binding domain“ (CBD) bezeichnet. Kristallisiert wurde es nach der Assemblierung mit Biliverdin in der P<sub>r</sub>-Form, wie die Kontrollspektren des Fragmentes in Lösung zeigten. Allerdings zeigte das Fragment eine eingeschränkte Photokonversion nach P<sub>fr</sub>. Dies weist auf einen wichtigen Beitrag der PHY-Domäne zur P<sub>fr</sub>-Bildung hin. 2007 konnten Moffat und Mitarbeiter (Yang 2007) ebenfalls die Kristallstruktur eines Fragmentes des bakteriellen Phytochroms (RpBphP3) aus *Rhodospseudomonas palustris* lösen. Wie schon bei DrBphP handelt es sich hierbei um die CBD des Proteins. RpBphP3 ist eines von fünf Phytochromen, die in *Rhodospseudomonas palustris* gefunden wurden und ist an der Synthese des Lichtsammelkomplexes LH4 beteiligt (Giraud 2005). RpBphP3 ist in sofern besonders, da es nach roter Beleuchtung nicht zur üblichen langwelligen Verschiebung kommt, sondern zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums bezüglich der P<sub>r</sub> Form. Dieses Photoprodukt wird daher mit P<sub>nr</sub> (near red) bezeichnet (Giraud 2005).

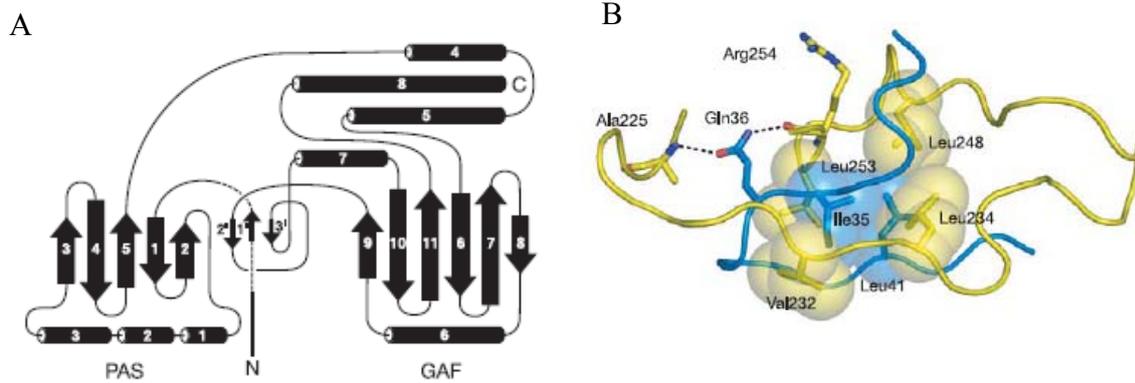
Die Tertiärstruktur der beiden Fragmente der Kristallstrukturen entsprach der Faltung einer PAS- und einer GAF-Domäne (Abbildung 1.9 und 1.10a), wobei der Chromophor nahezu vollständig von der GAF-Domäne umschlossen wurde.



**Abbildung 1.9: Dreidimensionale Struktur der CBD (chromophore binding domain) von *Deinococcus radiodurans* (aus Wagner 2005)**

Es wurden die typischen Faltungen einer PAS-Domäne (blau) und einer GAF-Domäne (grün) gefunden. Der Biliverdin Chromophor (ebenfalls blau) ist tief in die GAF-Domäne eingelagert. In gelb ist die Lasso-Struktur, die an der Knotenstruktur beteiligt ist.

Eine Überraschung war die Entdeckung eines kleeblattförmigen Knotens, der aus einer Insertion in der GAF-Domäne und Aminosäuren die in der Sequenz vor der PAS-Domäne liegen gebildet wird. Stabilisiert wird der Knoten durch einen hydrophoben Kern an dem einige streng konservierte hydrophobe Aminosäuren beteiligt sind. Die strenge Konservierung der an der Knotenstruktur beteiligten Aminosäuren, lässt auf eine wichtige Funktion für die Photokonversion schließen.

**Abbildung 1.10**

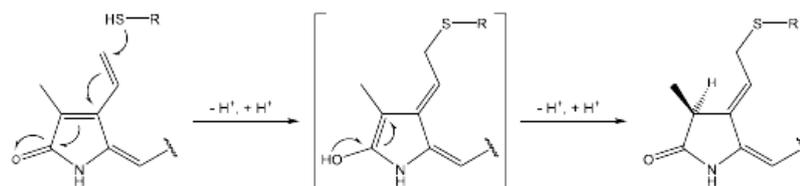
(A) Topologische Darstellung der einzelnen Sekundärstrukturelemente der CBD von *Deinococcus radiodurans*.

(B) Struktur des Knotens mit den am hydrophoben Kern beteiligten Aminosäuren (aus Wagner 2005)

Eine Hypothese besagt, dass der Knoten den Kontakt zwischen PAS- und GAF-Domäne stabilisiert und dadurch die Bewegungsfreiheitsgrade des Proteins einschränkt, um unerwünschte Desaktivierungskanäle zu schließen. Bisher wurden solche Knotenstrukturen nur in einigen wenigen anderen Proteinen gefunden (Taylor 2000, Nureki 2002, Taylor 2003, Zarembinski 2003, Mallam 2005), wobei die Funktion des Knoten bisher aber nicht geklärt ist.

Aus beiden Strukturen war zu entnehmen, dass der Chromophor, wie bei Biliverdin inkorporierenden Phytochromen erwartet (Lamparter 2004a, Lamparter 2004b, Karniol 2005), an den Cysteinrest im N-terminalen Bereich vor der PAS-Domäne kovalent gebunden ist, C24 bei DrBphP und C28 bei RpBphP3, und zwar über eine Thioetherbrücke an Position C3<sup>2</sup> der Vinylseitenkette des Chromophors.

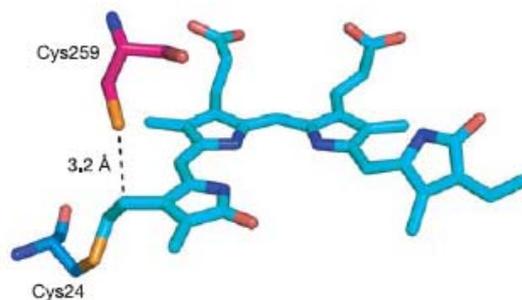
Zwischen der höher aufgelösten Kristallstruktur von DrBphP (Wagner 2007) und Berechnung der Elektronendichte unter Annahme eines planaren Ringes A, zeigten sich einige unerklärliche Abweichungen. Erst durch Eliminierung der Doppelbindung zwischen C2 und C3 des Chromophors konnten diese Abweichungen behoben werden. Als Folge davon ist Ring A um 15° zu der von Ring B und C gespannten Ebene herausgedreht und der Kohlenstoff C2 ist tetraedrisch. Um das im Vergleich zu PCB und PΦB größere konjugierte System von BV zu erhalten, wurde eine Doppelbindung zwischen C3 und C3<sup>1</sup> (Abbildung 1.11) moduliert.



**Abbildung 1.11: Elektronische Umlagerung in Ring A während der kovalenten Verknüpfung**  
Modell nach Quest 2007, für den Fall, dass sich die verbliebene Doppelbindung nach der kovalenten Verknüpfung zwischen C3 und C3<sup>1</sup> befindet

Dadurch konvertiert BV zu 2(R),3(E)-PΦB wenn es mit dem Apoportein von DrBphP konjugiert ist und ist somit ein Stereoisomer von PCB und PΦB nur mit der gegenteiligen Chiralität an Position C2 (Abbildung 1.11).

Modellierungen mit der zweiten möglichen Bindestelle in der GAF Domäne zeigen, dass diese in unmittelbarer Nähe zur C3 Vinylgruppe des Chromophors liegen würde (Wagner 2005, Abbildung 1.12). Ein Umschalten zwischen den beiden Bindestellen scheint also nur vom Vorhandensein des jeweiligen Cysteins an der einen oder anderen Position abzuhängen.



**Abbildung 1.12: Darstellung des an Cystein 24 gebundenen BV Chromophor**

In Magenta ist die zweite hypothetische Bindestelle in der GAF-Domäne dargestellt, die nach den Modellierungen in unmittelbarer Nähe der Vinylseitenkette des Chromophors liegen würde (aus Wagner 2005).

Weiterhin zeigten die Strukturen, dass der Chromophor tief in der GAF-Domäne eingebettet ist und die PAS-Domäne und der N-terminale Teil außer der Bindestelle keinen Kontakt zum Chromophor haben. Die Aminosäuren dieser Bindungstasche, die mit dem Chromophor in Kontakt treten, sind in den meisten Fällen hoch konserviert. Besonders ist hierbei das so genannte DIP-Motiv zu nennen, eine Abfolge der Aminosäuren Asp-Ile-Pro (D207/I208/P209) in der GAF-Domäne. Der Prolinrest bewirkt einen Knick im Proteingerüst, wodurch der Aspartatrest (D207) in die Nähe des Chromophors gelangt (Wagner 2005). Überraschenderweise weist die Carboxylatgruppe der Seitenkette von D207 vom Chromophor weg, womit sie als Gegenion des protonierten Chromophors ausscheiden würde (Wagner 2005, Yang 2007). Die Carbonylgruppe des Proteinrückgrats des Aspartats hingegen ist laut Struktur an einem Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt (Wagner 2005), das mit den Stickstoffen der Pyrrole in Verbindung steht, womit D207 doch eine Rolle bei der Stabilisierung des protonierten Chromophors spielen kann. Beiden Fragmenten die für die Kristallisation verwendet wurden fehlt die für eine vollständige Konversion nach P<sub>fr</sub> benötigte PHY Domäne. In beiden Strukturen (Wagner 2005, Yang 2007) weist die Carboxylatgruppe der Seitenkette von D207 in einen Bereich in dem keine Strukturelemente liegen. Dies führte zu der Spekulation (Yang 2007), dass dies eine geeignete Position wäre, an der die PHY-Domäne anschließen könnte. In beiden Strukturen wurde die Konformation/Konfiguration des Chromophors in P<sub>r</sub> als 5Zs10Zs15Za bestimmt. Die Frage, ob diese Geometrie für alle Phytochrome dieselbe ist, oder ob zum Beispiel die cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochrome in P<sub>r</sub> eine 5Za10Zs15Za Konformation einnehmen (Mroginski 2004, 2007) wie es nach Dichtefunktionalrechnungen vorgeschlagen wurde, kann im Augenblick nicht beantwortet werden. Auf jeden Fall weichen in beiden Strukturen die Chromophore von der planaren Geometrie ab. Ring A und D sind um 15° bzw. 40-45° aus der BC Ebene herausgedreht (Wagner 2006, Yang 2007). Man kann also sagen, dass der Chromophor durch das Protein in einer gespannten Konformation gehalten wird.

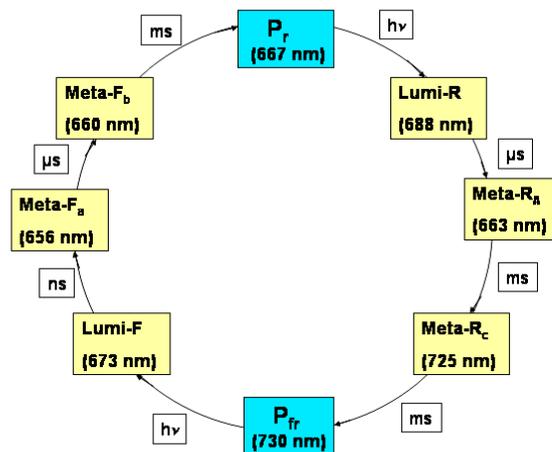
Von großem Interesse sind die Aminosäuren, die sich um Ring D des Chromophors befinden und mit ihm in Kontakt treten, da durch die Z/E Isomerisierung der 15,16 Doppelbindung

Ring D zu großen Änderungen der Chromophor Protein Wechselwirkungen führt. Für H290 (DrBphP) wurde z.B. eine elektrostatische Wechselwirkung mit der Carbonylgruppe von Ring D gefunden, bei der die Frage ist ob diese durch die Isomerisierung gebrochen wird, oder ob über diese attraktive elektrostatische Verbindung eine Änderung der Proteinkonformation ausgelöst wird. Weiterhin bilden große hydrophobe Aminosäuren eine Art Tasche in der sich Ring D befindet, und diesen vor der wässrigen Phase schützen. Insgesamt haben die beiden Strukturen neue Einsichten in die Chromophorgeometrie, die Chromophor-Protein Interaktionen gebracht und so die Erforschung des Mechanismus der Photokonversion von Phytochrom ein deutliches Stück weitergebracht.

### 1.3.4 Photozyklus

Bisher konnte nur die Kristallstruktur des  $P_r$  Zustandes, bei der noch dazu die PHY-Domäne fehlt, kristallisiert werden. Dennoch ergaben sich in Kombination mit anderen Methoden neue Ansatzpunkte für weitere Studien des molekularen Mechanismus der Photokonversion von Phytochrom.

Die photochemischen Konversionsprozesse der Phytochrome wurden intensiv untersucht. Zeitaufgelöste Absorptionmessungen, tieftemperatur- und schwingungsspektroskopische Methoden haben zur Identifikation mehrerer Intermediate der  $P_r$  nach  $P_{fr}$  und  $P_{fr}$  nach  $P_r$  Photokonversion geführt. Die Benennung der Intermediate erfolgte dabei in Analogie zum Rhodopsin System mit Lumi-R, Meta- $R_A$ , Meta- $R_C$ , Lumi-F und Meta-F (Abbildung 1.13).



**Abbildung 1.13: Darstellung des Photozyklus von Phytochrom A ( Briggs und Spudich 2005)**

Die beiden Dunkelzustände  $P_r$  und  $P_{fr}$  sind blau unterlegt, während die Intermediate mit ihren Absorptionsmaxima gelb unterlegt sind. Zwischen den Intermediaten sind die ungefähren Zerfallszeiten angegeben.

Der erste Schritt der Photokonversion ist die Z/E-Isomerisation der 15,16-Doppelbindung (Rüdiger 1983, Mizutani 1994, Andel 1996). Bei der Photokonversion nach roter Beleuchtung ist der erste stabile elektronische Grundzustand, der sich bildet, das Intermediat Lumi-R. Die Stereochemie des Chromophors im Lumi-R Zustand, soll der des  $P_{fr}$  Zustandes sehr nahe kommen, wie mehrere FT-IR Studien zeigten (Foerstendorf 1996, 2000, 2001, Rockwell 2006). Zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen im Femto- bis Pikosekundenbereich haben für die Lumi-R Bildung eine Reihe von angeregten Zuständen gefunden (Holzwart

1992, Bischoff 2000, 2001, Anel 1997, Heyne 2002, Schumann 2007). Die Studien unterscheiden sich mitunter gravierend in Anzahl der gefundenen Übergänge und ihrer mechanistischen Einordnung. Übereinstimmend sind die Studien darin, dass auf dem Weg nach Lumi-R eine Energiebarriere überwunden werden muss, die der Grund für die geringe Quanteneffizienz der Photokonversion der Phytochrome sein soll, und darin, dass sich Lumi-R innerhalb von 25-50 ps ausbildet. Bis auf von Thor 2007, der noch eine zusätzliche Änderung an der Methinbrücke AB postuliert, zeigen alle Studien, dass die Isomerisation der 15,16-Doppelbindung der erste und einzige lichtabhängige Schritt der Photokonversion ist. Auf die Lumi-R Bildung folgt eine Reihe von thermischen Relaxationen im Mikro- bis Millisekunden Bereich. Aus Lumi-R bildet sich innerhalb von einigen hundert Mikrosekunden Meta-R<sub>A</sub>, das innerhalb weniger Millisekunden zum P<sub>fr</sub> Vorläufer Meta-R<sub>C</sub> zerfällt (Song 1999, Remberg 1997, Anel 1996, Forstendorf 2001). Mit der Meta-R<sub>C</sub> Bildung kommt es zur ersten deutlichen langwelligen Verschiebung des Absorptionsmaximums, weshalb der Meta-R<sub>A</sub> → Meta-R<sub>C</sub> Übergang ein Schlüsselschritt bei der Bildung von P<sub>fr</sub> sein könnte. P<sub>fr</sub> bildet sich dann innerhalb von einigen hundert Millisekunden aus Meta-R<sub>C</sub>. Bei der P<sub>fr</sub> nach P<sub>r</sub> Photokonversion, die wesentlich weniger detailliert untersucht wurde, wurden bisher die Intermediate Lumi-F und Meta-F identifiziert (Abbildung 1.13) (Rockwell 2006). Trotz zahlreicher vor allem schwingungsspektroskopischer Untersuchungen sind molekulare und mechanistische Details die während der Photokonversion ablaufen nahezu unbekannt. So ist es bis heute umstritten, ob die Isomerisation der 15,16-Doppelbindung die einzige Konformationsänderung des Chromophors während der Photokonversion ist.

Anel (Anel 2000) postulierte, dass es zusätzlich zur Isomerisation der 15,16-Doppelbindung noch eine Rotation der 14,15-Einfachbindung der Methinbrücke zwischen Ring C und D kommt. Aber wie eine Studie mit Chromophoren, bei denen die Methinbrücke zwischen Ring C und D in verschiedenen Konfigurationen und Konformationen fixiert waren (Inomata 2005), gezeigt hat, ist die Konformation der C/D-Methinbrücke in P<sub>r</sub> 15 Za und in P<sub>fr</sub> 15 Ea. Es kommt also nicht zu einer zusätzlichen Rotation der Einfachbindung der C/D-Methinbrücke, was durch Dichtefunktionalrechnungen (Mroginski 2004) bestätigt wird.

In der gleichen Arbeit (Mroginski 2004) wurde eine Rotation der Einfachbindung der Methinbrücke zwischen den Ringen A und B postuliert. Fraglich war aber, ob es sich dabei um eine anti-syn oder syn-anti Drehung handelt. Die Berechnungen ergaben nämlich für die A/B Brücke eine 5Za-Konformation. In nachfolgenden Arbeiten wurde die Gültigkeit der Konformation der A/B-Brücke aber auf pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome eingeschränkt (Mroginski 2006). Bei den beiden BV einbauenden Phytochromen DrBphP und RpBphP3 liegt die A/B-Brücke in der 5Zs-Konformation vor (Wagner 2005, Yang 2007), weshalb man davon ausgehen kann, dass dies für alle BV einbauenden Phytochrome gilt. Unterstützt wird die These der Rotation um die Einfachbindung der A/B-Brücke durch eine NMR-Studie mit <sup>15</sup>N gelabeltem PCB Chromophor in Cph1 (Rohmer 2006). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Umgebung der beiden Pyrrolstickstoffe der Ringe A und D während der Photokonversion ändern. Die einfachste Interpretation ist, dass die gefundenen Änderungen durch die Z/E-Isomerisation der C/D-Brücke und einer Rotation der A/B-Brücke zustande kommen.

Am Photozyklus anderer Photorezeptoren wie Rhodopsin und PYP sind einer oder mehrere Protonentransferschritte beteiligt (Emeis 1982, Dickopf 1998, Parkes 1984, Meyer 1993, Hendricks 1999). Auch bei Phytochrom gibt es Hinweise darauf, dass am Photozyklus Protonentransferschritte beteiligt sind. Schwingungsspektroskopische und NMR-Studien kommen zu dem Schluss, dass der Chromophor sowohl in P<sub>r</sub> als auch in P<sub>fr</sub> auf allen Pyrrolstickstoffen protoniert und damit positiv geladen ist (Foerstendorf 1996, Kneip 1999, Strauss 2005). Mizutani (Mizutani 1994) interpretierte seine Daten dahingehend, dass der

Chromophor nach der Z/E-Isomerisation deprotoniert wird und auch in  $P_{fr}$  deprotoniert bleibt. Kneip hingegen interpretierte seine Daten so, dass der Chromophor sowohl in  $P_r$  und  $P_{fr}$  als auch in allen Intermediaten protoniert bleibt. Beim cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 wurde nicht nur ein H/D-Isotopeneffekt während der  $P_r$ -/ $P_{fr}$ -Photokonversion gefunden, sondern auch eine transiente Protonenabgabe und teilweise Wiederaufnahme (Remberg 1997, von Thor 2001). Ob das Proton allerdings vom Chromophor stammt konnte nicht gezeigt werden. Die Beteiligung von Protonentransferschritten an der  $P_r$ -/ $P_{fr}$ -Konversion und die Suche und die Bestimmung der daran beteiligten Aminosäuren ist ein Teil dieser Arbeit.

## 1.4 *Agrobacterium tumefaciens*

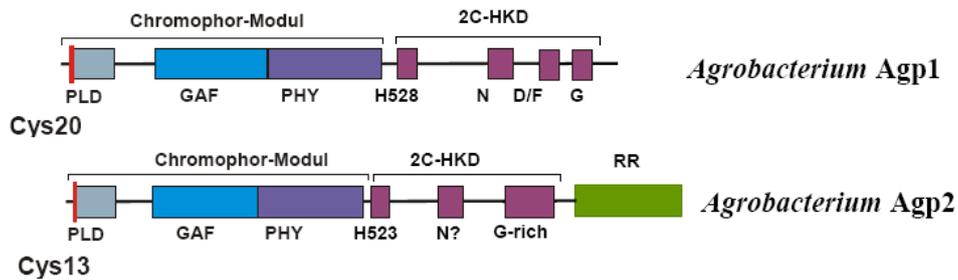
### 1.4.1 Allgemeines

*Agrobacterium tumefaciens* ist ein gramnegatives Bodenbakterium aus dem Reich der Bacteria und der Familie der Rhizobiaceae. Das Bakterium ist ein Pflanzenpathogen und besitzt ein Ti-Plasmid (Ti – Tumor induced) als extrachromosomales Element. Mit den darauf liegenden Virulenzgenen gelingt es *Agrobacterium* DNA über Verletzungen der Pflanze in die Pflanzenzellen einzuschleusen (Gelvin 2003). Durch den Gentransfer werden Tumore, so genannte Wurzelhalsgallen („crown-galls“), induziert. Im frühen Stadium der Infektion erscheinen diese als kleine, weiße Vorsprünge am Spross-Wurzel-Übergang der befallenen Pflanzen und werden mit zunehmender Größe dann fleckig- dunkelbraun und können einen Durchmesser von 30 cm erreichen. Aufgrund der Eigenschaft zum Gentransfer wird *Agrobacterium tumefaciens* in der Gentechnik zum vektorvermittelten Gentransfer eingesetzt. Dabei werden die Tumorgene z.B. durch Resistenzgene ersetzt (Gelvin 2003, Valentine 2003).

### 1.4.2 Die Phytochrome Agp1 und Agp2 aus *Agrobacterium tumefaciens*

2001 wurde von Goodner und Wood das Genom von *Agrobacterium tumefaciens* veröffentlicht (Goodner, Wood 2001). Bei der Analyse wurden zwei offene Leseraster gefunden, die für Phytochrom homologe Proteine kodieren und die als Agp1 (AtBphP1) und Agp2 (AtBphP2) (Lamparter 2002, Karniol und Vierstra 2003) bezeichnet wurden. Die Frage, welche Funktion ein solcher Photorezeptor in einem landwirtschaftlich und genetisch bedeutsamen Bakterium hat, führte zu zahlreichen Untersuchungen dieser beiden Proteine. Nach Zambre (Zambre 2003) wird der Gentransfer von *Agrobacterium* zu *Arabidopsis thaliana* durch Licht gefördert. Doppel-„knock-out“-Mutanten zeigten in vitro auch eine reduzierte Wachstumsrate, während die Einzelmutanten allerdings kein verändertes Wachstumsverhalten zeigten (Oberpichler 2006). Die Virulenz der Bakterien wurde jedoch von keinem der beiden Phytochrome beeinflusst. Neben diesen physiologischen Untersuchungen wurden auch die spektralen Eigenschaften von Agp1 und Agp2 sowohl in vivo als auch in vitro untersucht. Dabei zeigte sich, dass die spektralen Eigenschaften von Agp2 durch unbekannte Komponenten im Extrakt beeinflusst werden (Oberpichler 2006).

Die Domänenstruktur von Agp1 (Abbildung 1.14) entspricht denen der bakteriellen Phytochrome von Abbildung 1.7. Sie enthält eine GAF-, eine PHY- und PLD-Domäne und ein His-Kinase-Modul, weshalb Agp1 als durch Licht regulierte Histidinkinase definiert wird. Wie schon bei anderen bakteriellen Phytochromen zeigt die  $P_r$ -Form eine stärkere Phosphorylierungsaktivität und scheint somit der aktivierte Zustand zu sein (Lamparter 2002, Karniol & Vierstra 2003). Das Chromophor Modul von Agp2 ist nahezu analog zu Agp1. Das Histidin-Kinase-Modul hingegen besitzt wenig Homologie mit bekannten His-Kinasen. Auffällig ist der am Ende der Sequenz befindliche Response Regulator (RR).



**Abbildung 1.14: Domänenstruktur von Agp1 und Agp2 aus *Agrobacterium tumefaciens* (Quelle T. Lamparter)**

Lamparter hat gezeigt (Lamparter 2003), dass Biliverdin der natürliche Chromophor von Agp1 und Agp2 ist und kovalent gebunden wird. Der konservierte Cysteinrest, an den der Chromophor kovalent gebunden wird sitzt dabei in der Sequenz vor der P2-Domäne, bei Agp1 an Position 20 und bei Agp2 an Position 13.

Der Einbau von BV in das Apoprotein von Agp1 bewirkt eine langwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums von etwa 680 nach 700-703 nm, je nach Bedingungen. Durch Bestrahlung mit hellrotem Licht wird die gebildete P<sub>r</sub>-Form in die P<sub>fr</sub>-Form konvertiert, die bei 750 nm absorbiert (Lamparter 2002). Die P<sub>fr</sub> Form von Agp1 ist jedoch thermisch instabil und kehrt durch Dunkelrelaxation langsam in die P<sub>r</sub> Form zurück.

Die Assemblierung von Agp2 mit BV führt zu einem P<sub>r</sub> -Zustand mit einem Absorptionsmaximum bei 698 nm, der allerdings mit einer Halbwertszeit von 15 Minuten thermisch in die P<sub>fr</sub> Form konvertiert, der auch der Grundzustand von Agp2 ist. Die P<sub>fr</sub> Form lässt sich nicht vollständig durch dunkelrote Beleuchtung in die P<sub>r</sub> -Form überführen, und revertiert mit einer Halbwertszeit von fünf Minuten in die P<sub>fr</sub>-Form (Karniol & Vierstra 2003).

### 1.5 Ppr aus *Rhodospirillum centenum*

1999 wurde im Purpurbakterium *Rhodospirillum centenum* ein Protein gefunden, das aufgrund seiner Domänenstruktur als Ppr („PYP-phytochrome-related“) bezeichnet wurde (Jiang 1999) und das die Expression der Polyketid-Synthase (PKS) reguliert. Wie der Name schon sagt ist Ppr ein Hybrid das sich aus einer bakteriellen Phytochromdomäne und einer vorgelagerten PYP Domäne zusammensetzt (Abbildung 1.15).



**Abbildung 1.15: Domänenstruktur von Ppr mit der vorgelagerten PYP-Domäne seinem Chromophor Modul („Bilin-attachment“) und der Kinase Domäne (Quelle Jiang 1999).**

Die Phytochrom-Domäne setzt sich aus dem Chromophormodul und einer Histidin-Kinase-Domäne zusammen, womit sich Ppr von Ppd aus *Thermochromatium tepidum*, das ebenfalls aus einer Phytochromdomäne mit einer vorgelagerten PYP-Domäne besteht (Cusannovich & Meyer 2003) unterscheidet. Die PYP-Domäne konnte mit p-Hydroxyzimtsäure rekonstituiert werden, dem Chromophor von PYP aus *Halorodospira halophila*, ab hier mit WT PYP bezeichnet, und führte zum erwarteten gelben Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 434nm. Der richtige Chromophor für die Phytochrom-Domäne wurde mit BV erst gefunden, nachdem bekannt wurde, dass auch BV als Chromophor in Phytochromen vorkommt (Jiang 1999). Bisher wurde Ppr vorwiegend mit stationärer UV-Vis-Spektroskopie untersucht, wobei festgestellt wurde, dass die PYP-Domäne durch blaues Licht und die Phytochrom-Domäne durch rotes Licht gebleicht wird (Jiang 1999, Kyndt 2004). Damit zeigen beide Domänen ein anderes Verhalten als PYP WT oder andere Phytochrome, die mit einigen wenigen Ausnahmen (Giraud 2005) alle nach roter Beleuchtung  $P_{fr}$  bilden. Beide gebleichten Zustände zeigten eine Dunkelreversion DR. Die Kinetik der DR der Phytochrom-Domäne wurde dabei durch die Bleichung der PYP Domäne beeinflusst (Kyndt 2007) Auf dieser möglichen Wechselwirkung der beiden photochromen Domänen lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Phytochrome lassen sich durch dunkelrotes bzw. rotes Licht reversibel in die beiden thermisch stabilen Zustände  $P_r$  ( $r = \text{rot}$ ) und  $P_{fr}$  ( $fr = \text{far red}$ ) überführen. Ausgehend vom  $P_r$ -Zustand, führt die Absorption von rotem Licht zu einer Z/E Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung des Chromophors. Der erste elektronische Grundzustand nach Beleuchtung mit rotem Licht ist Lumi-R. Nach Lumi-R erfolgt eine Reihe von thermischen Relaxationen bei denen diverse Intermediate durchlaufen werden. Trotz zahlreicher vor allem schwingungsspektroskopischer Untersuchungen ist über den molekularen Ablauf und dem Mechanismus dieser Zustände bisher wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion des bakteriellen Phytochroms Agp1 und der Phytochrom-Domäne von Ppr spektroskopisch und kinetisch zu untersuchen und dabei Aufschluss über mechanistische Details zu erlangen.

Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf eventuellen transienten Protonentransferschritten, wie sie auch bei anderen Photorezeptoren wie PYP, Rhodopsin oder beim cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 gefunden werden. Dazu wird die Kinetik mit transientser Absorptionsspektroskopie untersucht. Um Übergänge zu identifizieren, an denen Protonentransferschritte beteiligt sein könnten, wird die pH-Abhängigkeit der Kinetik der  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion untersucht. Durch H/D-Isotopenaustausch soll untersucht werden, ob einzelne Übergänge einen kinetischen Isotopeneffekt aufweisen wie er für protonenabhängige Schritte erwartet würde. Durch den Einsatz von pH-Indikatoren in ungepufferten Lösungen soll die Kinetik eventueller Protonierungsänderungen verfolgt werden und, wenn möglich, bestimmten Übergängen der Photokonversion zugeordnet werden. In diesem Zusammenhang sollen auch eine Reihe von Punktmutanten untersucht werden, bei denen streng konservierte saure D- und E- Aminosäuren der Bindungstasche, die als potenzielle Protonendonoren oder -akzeptoren in Frage kommen, substituiert wurden.

Weiterhin sollen spezifische Mutationen in der Bindungstasche des Chromophors, wie die streng konservierte Aminosäure H250 oder Y176, untersucht werden, um Aufschlüsse über den molekularen Mechanismus der Photokonversion von Phytochrom zu erlangen.

Bei Cph1 und anderen Phytochromen hat sich gezeigt, dass die photochromen Eigenschaften der Phytochrome durch die Domänen des Chromophor-Moduls bestimmt werden. Aus diesem Grund sollen für die kinetischen und spektralen Untersuchungen mehrere N-terminal und C-

terminal verkürzte Varianten von Agp1 verwendet werden. Die daraus gewonnenen Daten sollen bei der Lokalisierung relevanter Bereiche für die photochromen Eigenschaften von Agp1 und Phytochromen allgemein helfen.

Die Cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochrome bauen PCB bzw. PΦB als natürlichen Chromophor ein. Der natürliche Chromophor von Agp1 ist BV. Agp1 bildet aber auch mit den Chromophore PCB und PΦB nicht kovalente photochrome Addukte. In allen Phytochromen sind die natürlichen Chromophore kovalent gebunden, daher ist es von besonderem Interesse zu untersuchen, wie sich die kovalente Bindung auf die Kinetik der Photokonversion auswirkt. Dazu kommt eine Variante von Agp1 zum Einsatz, bei der die Bindestelle durch Substitution entfernt wurde (C20A). Dadurch, dass Agp1 die verschiedensten Chromophore einbaut, kann auch der Einfluss verschiedener Substituenten des Chromophors auf die Photokonversion untersucht werden.

Der erste Schritt der Photokonversion von Phytochromen ist die Z/E- oder E/Z-Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung der Methinbrücke zwischen den Ringen C und D. Durch Einsatz von Chromophoren bei denen die Stereochemie der Methinbrücken fixiert sind, sollen offene Fragen bezüglich weiterer Konformations- und Konfigurationsänderungen des Chromophors während der Photokonversion geklärt werden.

Die CD-Spektroskopie hat erhebliche Vorteile gegenüber der Absorptionsspektroskopie und liefert einen höheren Informationsgehalt. CD-Spektren liefern im Sichtbaren und nahem UV wichtige Informationen über die Chiralität des Chromophors und deren Wechselwirkung mit benachbarten aromatischen Aminosäuren in der Bindungstasche. So kommt es bei der Photokonversion von Cph1-PCB zur Umkehrung der Händigkeit, wie der Vorzeichenwechsel der Rotationsstärke zeigt.

Mittels stationärer CD-Spektroskopie soll untersucht werden, ob ein ähnliches Verhalten auch bei Agp1-BV auftritt. Durch Vergleich mit den PCB- und PΦB-Addukten können generelle Aussagen über die Chiralität der Chromophore in der Bindungstasche von Phytochromen getroffen werden. Deshalb sollen von allen bisher erwähnten Proteinen und Bilinanaloga auch CD-Messungen im Chromophorbereich angefertigt werden, um Aussagen über die Rolle der Stereochemie des Chromophors machen zu können.

Bei Ppr zeigte sich, dass es zu einer Interaktion der PYP- und der Phytochrom-Domäne kommt. Da bisher nur wenige stationäre und zeitaufgelöste Daten vorliegen, soll diese Wechselwirkung mittels Blitzlichtspektroskopie und CD-Spektroskopie genauer untersucht und charakterisiert werden. Vor allem die Änderungen der Phytochrom-Domäne von Ppr können mit denen von Agp1 in Relation gesetzt werden, wodurch eventuell neue Kenntnisse über den allgemeinen Mechanismus von Phytochromen gewonnen werden können.