

3. Das Biliverdin Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV)

3.1 UV-Vis Spektren

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, weisen Tetrapyrrole zwei Absorptionsbanden (Falk 1989) auf, eine im blauen und die andere im roten Spektralbereich. Nach dem Modell von Gouterman (Gouterman 1959) wird die Absorptionsbande im blauen Spektralbereich als Soret-Bande und die Absorptionsbande im roten Spektralbereich als Q-Bande bezeichnet (Abbildung 3.1).

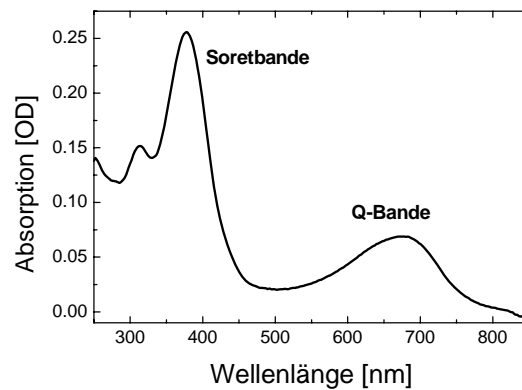


Abbildung 3.1: Absorptionsspektrum von freiem Biliverdin in 10mM NaPP Puffer bei pH 7,8
Das Absorptionsmaximum der Soret-Bande liegt bei 378 nm und das der Q-Bande bei 675 nm.

Während der Assemblierung des Apoproteins mit den Bilinen kommt es zu einer Verlagerung von Oszillatorstärke aus der Soret-Bande in die Q-Bande (d.h. die Extinktion der Q-Bande steigt) und einer langwelligeren Verschiebung des Absorptionsmaximums der Q-Bande.

Bei Agp1 ist die Assemblierung mit BV innerhalb einer Minute abgeschlossen (Lamparter 2002) und führt zum P_r -Zustand. Der gebildete P_r -Zustand zeigt drei Banden im UV-Vis Spektrum (Abbildung 3.2). Der „Proteinpeak“ bei etwa 280 nm, wird durch die aromatischen Aminosäure-Seitenketten von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan des Proteins hervorgerufen. Die Anzahl dieser Seitenketten ist für verschiedene Proteine charakteristisch, weshalb über diese Bande auch die Konzentration des Proteins bestimmt wird.

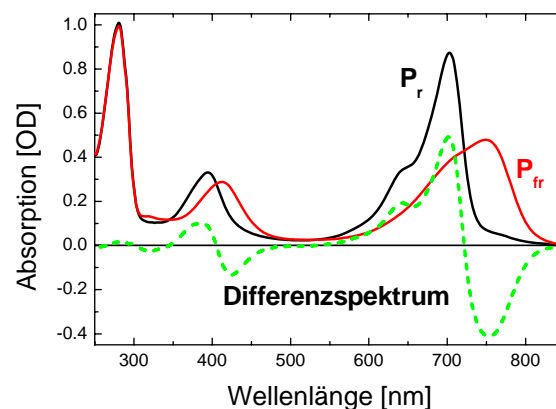


Abbildung 3.2: UV-Vis Spektren des mit BV assemblierten Phytochroms Agp1-FL

P_r bezeichnet das Spektrum nach Assemblierung im Dunkeln oder nach dunkelroter Beleuchtung (LD $\lambda_{\text{max}} = 785$ nm). P_{fr} bezeichnet das Spektrum nach Beleuchtung mit rotem Licht (LED $\lambda_{\text{max}} = 680$ nm). Die grüne Kurve ist das Differenzspektrum von $P_{fr} - P_r$. Bedingungen: 20mM Tris/HCl, pH 7,8 und $T=20^\circ\text{C}$

Das Absorptionsmaximum der Soret-Bande liegt bei 395 nm und das der Q-Bande bei 702 nm, deren Extinktionskoeffizient mit $90\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ angegeben wird (Lamparter 2002). Die Q-Bande hat noch eine Schulter, dessen Maximum etwa bei 650 nm liegt. Das Verhältnis der Absorption der Q-Bande (702 nm) und der 280 nm Bande liegt ungefähr bei 0,85. Das gebildete Agp1-BV Addukt ist photoaktiv und durch Bestrahlung mit rotem Licht bildet sich der P_{fr} -Zustand aus (Abb. 3.2). Im P_{fr} -Zustand sind die Absorptionsmaxima der Q- und Soret-Bande mit 750 bzw. 415 nm langwellig verschoben. Wie aus Abbildung 3.2 zu entnehmen ist, ist die Amplitude der Absorptionzunahme bei 750 nm in etwa so groß wie die der Absorptionsabnahme bei 702 nm (Verhältnis: $702/750 \sim 1.2$). Wie in der Einleitung erwähnt werden selbst durch sättigende Bestrahlung keine reinen Zustände erreicht, was sich im Spektrum nach roter Beleuchtung (P_{fr}) in der Schulter bei 702 nm und nach dunkelroter Beleuchtung im Fuß bei 750 nm äußert. Wie sich herausstellte ist der P_{fr} -Zustand von Agp1 nicht stabil und es kommt im Dunkeln zu einer Reversion in den P_r Zustand, die auch als Dunkelreversion bezeichnet wird (Lamparter 2002, Karniol 2002).

Die Photokonversionsversuche zeigten, dass die Quantenausbeute dieser Prozesse sehr gering ist. Insbesondere die Photokonversion von P_{fr} nach P_r hat mit $\Phi(P_{fr}-P_r) = 0.004$ eine sehr geringe Quantenausbeute ($\Phi(P_r-P_{fr}) = 0.078$) (Lamparter 2002). Aufgrund der niedrigen Quantenausbeute wurde für die gezielte Photokonversion nach P_r ein Diodenlaser mit hoher Intensität eingesetzt (LD = Laserdiode; $\lambda_{\text{max}}=785$ nm).

3.2 CD-Spektren des Chromophorbereiches von Agp1-FL-BV

CD-Spektren im Sichtbaren und nahen UV liefern wichtige Informationen über die Chiralität des Chromophors und dessen Wechselwirkung mit benachbarten aromatischen Aminosäuren der Bindungstasche. Die CD Spektren der P_r - und P_{fr} -Form von Agp1-FL-BV sind in Abbildung 3.3 gezeigt.

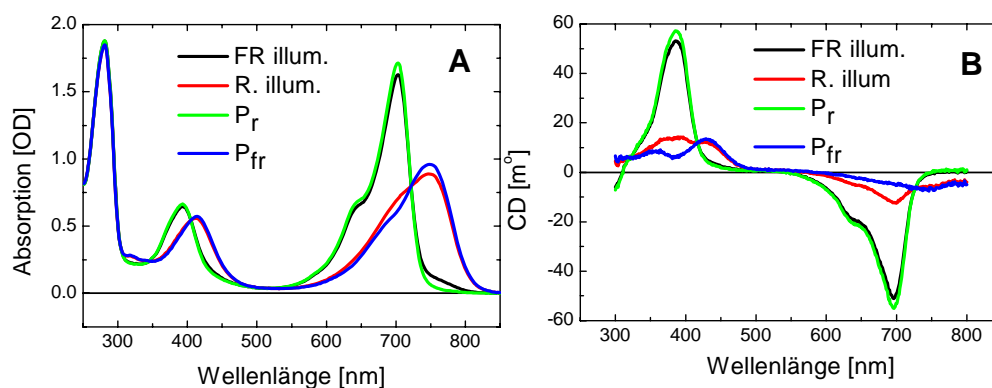


Abbildung 3.3: Absorptions- und CD-Spektren von Agp1-FL-BV im P_r - und P_{fr} -Zustand

(A) Absorptionsspektren von Agp1-FL-BV nach dunkelroter (FR) und roter (R) Beleuchtung bei pH 7,8, $T=20^\circ\text{C}$ und 20mM Tris. Die Spektren wurden bei einer Schichtdicke von 0,2 cm gemessen und dann auf 1cm Schichtdicke skaliert. Die reinen P_r und P_{fr} Spektren wurden unter der Annahme berechnet, dass sich nach FR 92 Prozent der Phytochrommoleküle und nach R 15 Prozent im P_r Zustand befinden. (B) CD-Spektren von Agp1-FL-BV nach dunkelroter (FR) und roter Beleuchtung (R) und der reinen P_r und P_{fr} Zustände mit der obigen Annahme. Bedingungen wie bei den Absorptionsspektren; $d=1\text{cm}$.

Die Messungen wurden wie unter 2.2.6 beschrieben in 20 mM Tris bei pH 7,8 mit einer ein cm Küvette durchgeführt. Für die Berechnung der reinen P_r - und P_{fr} -CD-Spektren wurde angenommen, dass sich nach dunkelroter Beleuchtung 92 Prozent der Phytochrommoleküle im P_r -Zustand befinden und nach roter Beleuchtung 15 Prozent. Als Kriterien dienten dabei die

Absorption bei 750 nm im Spektrum nach Dunkelroter Beleuchtung und die Schulter bei 700 nm im Spektrum nach roter Beleuchtung.

Die Elliptizität Θ ist proportional zum Unterschied der Extinktionskoeffizienten von links und rechts zirkular polarisiertem Licht ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$), was dazu führt, dass die Absorptions- und CD-Spektren denselben Verlauf haben. Dies wird auch im Fall des CD-Spektrums des P_r -Zustandes von Agp1-FL-BV so gefunden. Das Vorzeichen der jeweiligen Bande wird durch die Rotationsstärke bestimmt. So ist das Vorzeichen der Soret-Bande des P_r -Zustandes positiv und das der Q-Bande negativ. Anders als im Absorptionsspektrum sind die beiden Banden annähernd gleich groß, das heißt sie besitzen ungefähr die gleiche Rotationsstärke. Das CD-Spektrum des reinen P_r -Zustandes zeigt was Lage der Maxima und das Verhältnis der beiden Banden zueinander betrifft keine signifikanten Abweichungen zu dem CD-Spektrum nach sättigender dunkelroter Beleuchtung (FR).

Rotes Licht (LED 680 nm) führt zu einer Verringerung der Rotationsstärke in beiden Banden und zu einer Zunahme bei etwa 450 und 750 nm. Wie man im berechneten CD-Spektrum des reinen P_{fr} -Zustandes verfolgen kann verschwinden die beiden Banden bei 700 und 390 nm fast vollständig, und es zeigt sich, dass die Banden bei 450 und 750 nm eine geringere Rotationsstärke aufweisen als die Banden des P_r -Zustandes. Die stärkere Rotationsstärke des P_r -Zustandes führt dazu, dass deren Banden noch deutlich zu erkennen sind, obwohl nur noch 15 Prozent der Moleküle im P_r -Zustand vorliegen.

Das Spektrum des reinen P_{fr} -Zustandes weist im Bereich der Soret-Bande zusätzlich zu der bei 450 nm noch eine zusätzliche Bande bei 350 nm mit geringer Elliptizität auf. Während die Bande bei 450 und 750 nm die Soret- und Q-Bande des P_{fr} -Zustandes repräsentieren ist die Ursache dieser Bande zurzeit nicht klar.

3.3 Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion bei pH 7,8

Für die Aufnahme der transienten Absorptionsänderungen wurde der in Kap. 2.2.3.1 und 2.2.3.2 beschriebene Aufbau verwendet. Die Messungen erfolgten wie unter 2.2.3.3 beschrieben in einer 20 mM Tris Lösung bei pH 7,8 nach Anregung bei 695 nm (Pyridin 1 in PC). Insgesamt wurden Zeitspuren bei 35 verschiedenen Wellenlängen von 100 ns bis zu fünf Sekunden aufgenommen. Jede dieser Zeitspuren setzt sich aus zehn Einzelmessungen zusammen, die auf einer logarithmischen Zeitskala gemittelt wurden. Vor jeder Messung wurde die Probe für 20 Sekunden mit einer Laser Diode ($\lambda_{em} \approx 784$ nm) beleuchtet, wodurch die Probe zu mehr als 95 Prozent in die P_r -Form überführt wurde. Die erhaltenen Zeitspuren zeigten mehrere Änderungen im verwandten Zeitbereich, was auf eine Abfolge von spektralen Übergängen der P_r - nach P_{fr} -Photokonversion hindeutet. In Abbildung 3.4 sind die drei charakteristischen Zeitspuren der Wellenlängen 700, 725 und 750 nm dargestellt. Die 700 nm Zeitspur ist im frühen Zeitbereich zwischen zehn und 100 μ s negativ, man spricht in einem solchen Fall von einer Bleichung. Im weiteren Verlauf nimmt das Signal weiter ab bis die Bleichung im Minimum bei etwa 20 ms etwa doppelt so groß ist wie im frühen Zeitbereich. Ab da steigt das Signal ganz leicht an bis es bei etwa einer Sekunde wieder abfällt. Bei 725 nm wird für den frühen Zeitbereich zwischen zehn und 100 μ s ein positives Signal gefunden, dessen Amplitude in etwa der negativen der 700 nm Zeitspur entspricht. Das Signal fällt dann in zwei Schritten auf den Nullpunkt ab. Nach dem durchlaufen dieses Minimums bei etwa 20 ms steigt das Signal dann auf etwa die halbe Amplitude des frühen Zeitbereiches an. Das Anfangssignal der 750 nm Zeitspur ist positiv und in etwa halb so groß wie das bei 725 nm. Es steigt dann ab etwa ein ms in zwei Schritten an mit einem Zwischenplateau bei etwa 30 ms und erreicht bei einer Sekunde ein Plateau dessen Amplitude viermal so groß ist wie die des frühen Zeitbereiches.

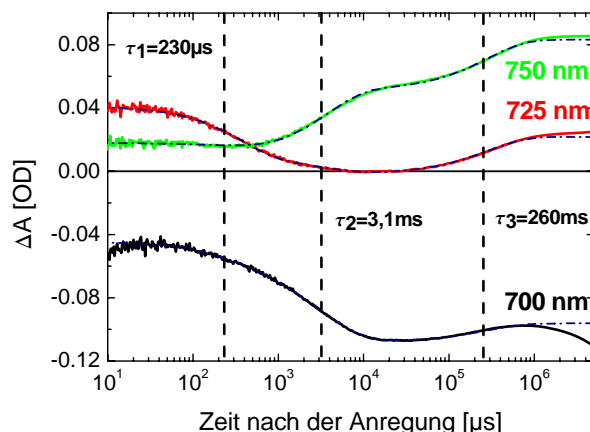


Abbildung 3.4: Transiente Absorptionsänderungen von Agp1-BV bei 700, 725 und 750 nm.

Die Zeitspuren wurden bei 20°C, pH 7,8 und mit 20 mM Tris/HCl aufgenommen. Die gestrichelten Kurven zeigen den Verlauf des simultanen Fit. Die jeweiligen Übergänge mit den Zeitkonstanten wie sie aus der SVD Analyse und dem simultanen Fit erhalten wurden sind mit vertikalen gestrichelten Linien dargestellt.

Unterhalb von einer Mikrosekunde weisen die Zeitspuren ein starkes Rauschen auf (nicht gezeigt) und oberhalb von einer Sekunde zeigen die Zeitspuren der Wellenlängen, die in der Nähe des Maximums der Q-Bande liegen (700 nm), eine starke Beeinflussung durch das Messlicht. Die Singulärwertzerlegung (SVD-Singular Value Decomposition, siehe Kap. 2.1.8) von allen gemessenen Zeitspuren wurde deshalb nur über den Zeitbereich von einer Mikrosekunde bis zu einer Sekunde vorgenommen. Die Singulärwertzerlegung (SVD) ergab vier relevante Komponenten, deren Basisspektren und Zeitspuren in Abbildung 3.5 A und B dargestellt sind.

Durch einen simultanen Fit der gewichteten Zeitspuren $s_i V_i(t)$ mit vier Exponentialfunktionen (Abbildung 3.5B) wurden die Zeitkonstanten $\tau_1=6,9 \mu\text{s}$, $\tau_2=230 \mu\text{s}$, $\tau_3=3,1 \text{ ms}$ und $\tau_4=260 \text{ ms}$ ermittelt. Aus den Amplituden des simultanen Fits und den Basisspektren U_i (Abb.3.5.A) werden dann die noch modellunabhängigen Amplitudenspektren $B_i(\lambda)$ berechnet (Abb.3.5C). Im einfachsten Fall eines sequentiellen Zyklus ohne Rückreaktion und weit auseinander liegenden Raten, stellt das zur Rate k_i gehörende Amplitudenspektrum $B_i(\lambda)$ das Differenzspektrum der beiden Intermediate, zwischen denen der Übergang stattfindet, dar.

Die erste Komponente ($\tau_1=6,9 \mu\text{s}$) zeigt nur eine kleine Amplitude (Abb. 3.5C) beim Emissionsmaximum des Lasers ($\sim 700\text{nm}$). Dies und dass die Komponente bei allen folgenden Messungen immer denselben kleinen Wert aufwies, deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Komponente um einen Artefakt der Blitzlichtanregung handelt. Aus diesem Grund werden ab jetzt nur die drei letzten Komponenten betrachtet die jetzt mit τ_1 - τ_3 bezeichnet werden (alt $\tau_2 \rightarrow$ neu $\tau_1 = 230\mu\text{s}$; alt $\tau_3 \rightarrow$ neu $\tau_2=3,1\text{ms}$ und alt $\tau_4 \rightarrow$ neu $\tau_3= 260\text{ms}$).

Die Amplitudenspektren stellen Differenzspektren dar. Positive Amplituden bedeuten, dass die Absorption in dem Bereich heruntergeht und negative Amplituden, dass die Absorption herauf geht. Die Absorptionsänderungen der ersten 230 μs Komponente sind durch eine positive Amplitude bei 725 nm und einer kleinen negativen unterhalb von 670nm charakterisiert (Abb.3.5C). Die Amplituden der Millisekundenkomponente ($\tau_2=3,1\text{ms}$) zeigen große positive und negative Werte bei 680nm und 760 nm. Die letzte Komponente hat eine negative Amplitude im Bereich von 650-800 nm und eine positive ($\sim 400 \text{ nm}$) und eine negative (410-450 nm) Amplitude in der Soretbande.

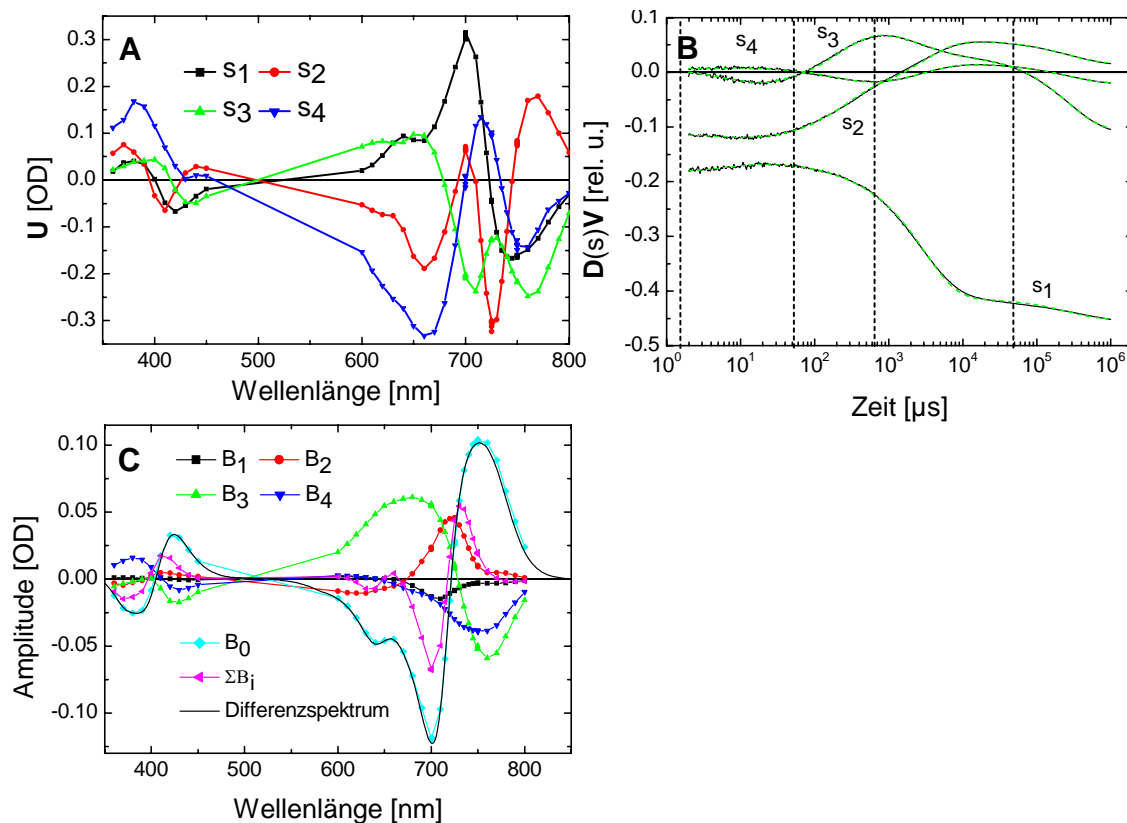


Abbildung 3.5: Basisspektren, Zeitspuren und Amplitudenspektren von Agp1-FL-BV

(A) SVD-Basisspektren $D(s)$ von Agp1-FL-BV der vier relevanten Komponenten; (B) Die dazugehörigen Zeitspuren $V_i(t)$ der SVD-Zerlegung (schwarze durchgezogenen Linien) der Kurven des simultanen Fits mit vier Exponentialfunktionen sind grün, die gestrichelten vertikalen Linien geben die Zeitkonstanten des simultanen Fits der Zeitspuren an; (C): Die aus den SVD-Basisspektren und den Amplituden des Fits der Zeitspuren berechneten Amplitudenspektren, B_1 - B_4 Amplituden der vier Komponenten, B_0 das extrapolierte Endspektrum, ΣB_i das extrapolierte Anfangsspektrum, die schwarze durchgezogene Linie ist das skalierte Differenzspektrum $P_{fr}-P_r$.

Das Amplitudenspektrum B_0 , das aus den Konstanten des Fits bestimmt wird, stellt das extrapolierte Endspektrum der Anregung des P_r -Zustandes dar. Dieses stimmt mit dem skalierten Differenzspektrum ($P_{fr}-P_r$) der stationären Spektren sehr gut überein (Abb.3.5C). Aufgrund der guten Übereinstimmung kann man davon ausgehen, dass die P_r -/ P_{fr} -Photokonversion innerhalb des gewählten Zeitbereiches der transienten Absorptionsmessungen abgeschlossen ist und dass der letzte Übergang bei 260 ms die Bildung von P_{fr} darstellt. Weiterhin gibt der Skalierungsfaktor des Differenzspektrums die Anregungseffizienz an, die in diesem Fall bei etwa 20 Prozent lag.

Die gefundenen Raten der drei Komponenten liegen relativ weit auseinander und es gibt keine Hinweise auf Rückreaktionen. Aus diesem Grund wurde eine sequentielle Abfolge der Intermediate angenommen. Für diese Abfolge wurden Intermediatspektren nach der „extrapolated difference method“ (Borucki 1999) berechnet, indem die Amplitudenspektren wie in Abbildung 3.6A angegeben addiert werden und mit dem auf die Anregungseffizienz skalierten Ausgangsspektrum multipliziert werden.

Die Berechnung wurde mit zwei Ausgangsspektren durchgeführt, einmal mit dem nach sättigender dunkelroter Beleuchtung erhaltenem P_r -Spektrum (Abbildung 3.6C) und mit dem reinen P_r -Spektrum (Abbildung 3.6D), bei dem angenommen wurde, dass sich nach sättigender dunkelroter Beleuchtung 92 Prozent im P_r und acht Prozent im P_{fr} -Zustand befinden.

3. Das Biliverdin-Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV)

Für den im Zeitbereich von zehn bis 100 μs gefundenen Zustand, dessen Bildung außerhalb des verwandten Auflösungsereich lag, wird ein Intermediatsspektrum berechnet bei dem das Absorptionsmaximum gegenüber dem P_r -Zustand leicht langwellig verschoben ist (702 nm \rightarrow 710 nm). Außerdem ist die Q-Bande dieses Intermediates im Vergleich zum P_r -Zustand leicht gebleicht. Die Absorption des Intermediates, das sich mit 230 μs bildet ($\tau_1 = 230 \mu\text{s}$) geht weiter zurück und das Maximum (690 nm) ist im Vergleich zum P_r -Spektrum kurzwellig verschoben. Bei der Bildung des Vorläufers von P_{fr} ($\tau_2 = 3,1 \text{ ms}$) kommt es zum ersten Mal zu einer Zunahme der Absorption im Bereich um 750 nm, während die bei 690 weiter abnimmt. Die langwellige Verschiebung der Absorption ist das Charakteristikum für die P_r/P_{fr} -Photokonversion. Und diese Verschiebung tritt schon bei der Bildung von Meta- R_C auf. Bei der P_{fr} -Bildung ($\tau_3 = 260 \text{ ms}$) kommt es dann vorwiegend zu einem Anstieg in der Absorption bei 750 nm, was zu einer geringen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 745 nm nach 748 nm führt.

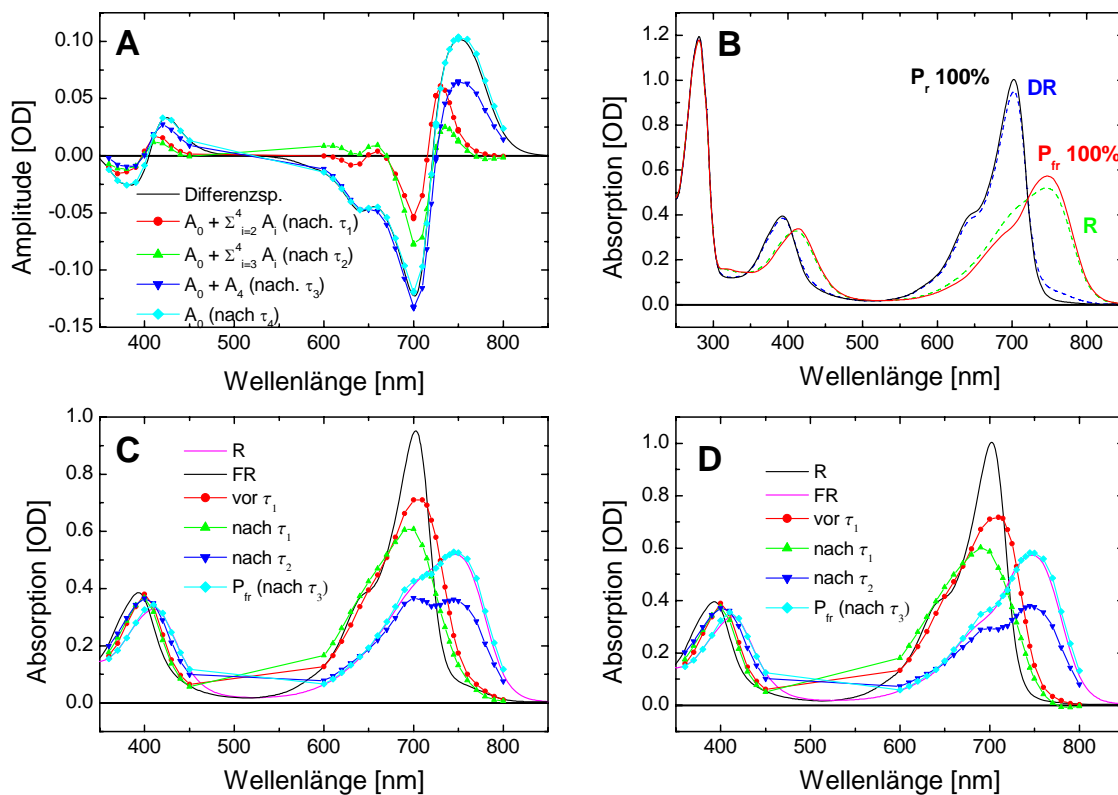


Abbildung 3.6: Amplituden-, Absorptions- und berechnete Intermediatsspektren von Agp1-BV
(A) Skaliertes Differenzspektrum $P_{fr}-P_r$ der stationären Messungen (schwarze durchgezogene Linie) und die extrapolierten Differenzspektren vor τ_1 (rot), nach τ_1 (grün), nach τ_2 (dunkelblau) und nach τ_3 (hellblau) dargestellt. **(B)** Absorptionsspektren von Agp1-FL-BV nach sättigender roter Beleuchtung (R) und dunkelroter Beleuchtung (DR) und für die reinen P_r und P_{fr} Zustände. **(C)** Berechnete Intermediatsspektren mit dem Ausgangsspektrum (R) nach roter Beleuchtung und einer sequentiellen Abfolge der Intermediate. **(D)** Wie in C berechnete Intermediatsspektren mit dem reinen P_r Zustand als Ausgangsspektrum.

Für die Intermediatsspektren vor und nach dem ersten Übergang ist es unerheblich welches Ausgangsspektrum verwendet wurde. Für das Vorläufer Intermediat von P_{fr} hingegen unterscheiden sich die beiden Spektren stark im Verhältnis der beiden Absorptionsbanden. Bei dem Spektrum das ausgehend vom reinen P_r -Zustand berechnet wurde ist die langwellige Komponente wesentlich stärker ausgeprägt.

3.4 Temperaturabhängigkeit der P_r/P_{fr} -Kinetik von Agp1-FL-BV

Für die Ermittlung der Temperaturabhängigkeit der P_r/P_{fr} Kinetik von Agp1-FL-BV wurden Zeitspuren bei 650, 700, 725, 735 und 750 nm bei den Temperaturen 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45°C sowohl in H_2O als auch in D_2O nach Anregung bei 695nm aufgenommen. In Abbildung 3.7 sind die Zeitspuren der verschiedenen Temperaturen für die Wellenlängen 725 und 700 nm in H_2O exemplarisch dargestellt. Wie aus Abbildung 3.7 zu entnehmen ist, weichen die Zeitspuren bei 40° und 45°C erheblich von den anderen ab, was wohl auf eine beginnende Denaturierung des Proteins zurückzuführen ist.

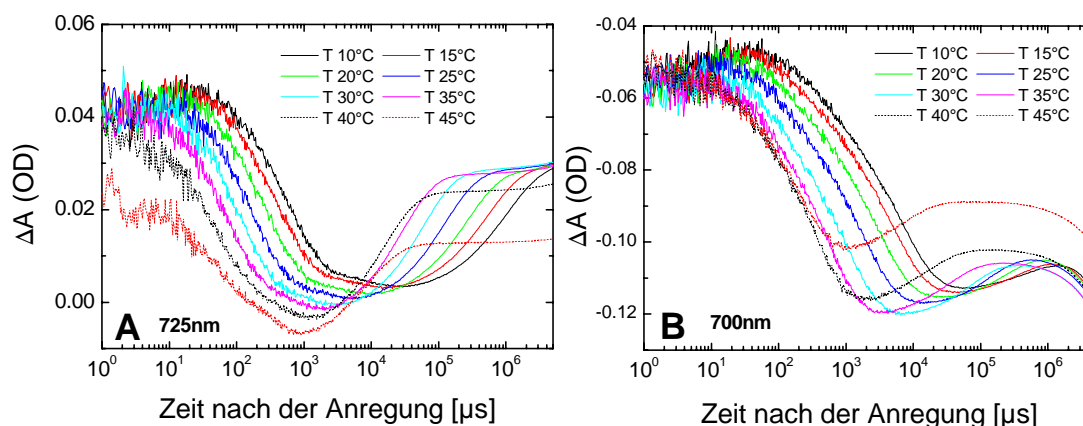


Abbildung 3.7: Temperaturabhängigkeit der Kinetik nach Anregung bei 695 nm

Zeitspuren bei 725 nm (A) und 700 nm (B) nach Anregung bei 695nm bei den Temperaturen 10°, 15°, 20°, 25°, 30°, 35°, 40° und 45° C. Bedingungen: 20 mM Tris, pH 7,8.

Die zu einer Temperatur gehörenden Zeitspuren wurden simultan gefittet und die erhaltenen Raten der jeweiligen Übergänge wie unter 2.2.5 beschrieben als natürlichem Logarithmus über $1/T$ aufgetragen. Die Steigung der Gl. 2.61 wurde über einen Fit mit der linearen Funktion $Y = A + BX$ ermittelt und daraus wurde die Aktivierungsenergie durch Multiplikation von R (Gaskonstante) mit der Steigung erhalten (Tabelle 3.1).

Lösung	Parameter	τ_1	τ_2	τ_3
H_2O	$E_A/kJ \cdot mol^{-1}$	67 ± 2	86 ± 4	109 ± 2
D_2O	$E_A/kJ \cdot mol^{-1}$	69 ± 3	85 ± 6	112 ± 5

Tabelle 3.1: Aktivierungsenergien der $P_r \rightarrow P_{fr}$ Photokonversion von Agp1-FL-BV

Wie man aus Tabelle 3.1 entnehmen kann werden für die Aktivierungsenergien der jeweiligen Übergänge in H_2O und D_2O nahezu dieselben Werte gefunden.

3.5 Protonierungsänderungen während der P_r/P_{fr} -Photokonversion

3.5.1 Das transiente Protonensignal der P_r/P_{fr} -Photokonversion

Protonentransferschritte spielen in der Photochemie und Aktivierung vieler Photorezeptoren eine wichtige Rolle (Emeis 1982, Parkes 1984, Dickkopf 1984, Olson 1992, Meyer 1993). Die meisten Protonenübertragungen sind intramolekular, d.h. es werden Protonen von einer

Gruppe des Protein-Chromophor Komplexes auf eine andere übertragen. Wie das Beispiel Bacteriorhodopsin zeigt (Alexiev 1995), werden diese intrinsischen Protonentransfers oft von Protonenabgaben oder -aufnahmen ins Medium begleitet. Um die Protonierungsänderungen im Medium verfolgen zu können, werden u.a. pH-Indikatoren eingesetzt, die bei Änderung des Protonierungszustandes unterschiedliche Absorptionsmaxima besitzen. Durch Messung der Absorption eines der beiden Zustände des Farbstoffes kann die Protonierungsänderung der Lösung direkt verfolgt werden. Für eine möglichst große Absorptionsänderung sollte der Umschlagspunkt (pK-Wert) des Farbstoffes möglichst nah am pH-Wert der Lösung liegen, bei dem gemessen wird.

Für die Messung der transienten Protonierungsänderungen von Agp1-FL-BV bei pH 7,8 wurde der pH-Indikator Kresolrot ($pK_a=8,2$) verwendet, dessen Absorptionsmaximum der deprotonierten Form bei etwa 570 nm und das der protonierten bei etwa 430 nm liegt (nicht gezeigt). Von der ungepufferten Agp1-FL-BV Probe (50 mM NaCl) wurden Zeitspuren bei 570, 700, 725 und 750 nm nach Anregung bei 695 nm bei den Kresolrotkonzentrationen 0, 40, 80, 120, 160 μM aufgenommen. Das Differenzsignal ($\Delta\Delta A$) der 570 nm Zeitspuren von Agp1-FL-BV mit und ohne Kresolrot, bei dem die Beiträge des Protein eliminiert werden, stellt das reine Farbstoffsignal dar (Abbildung 3.8B).

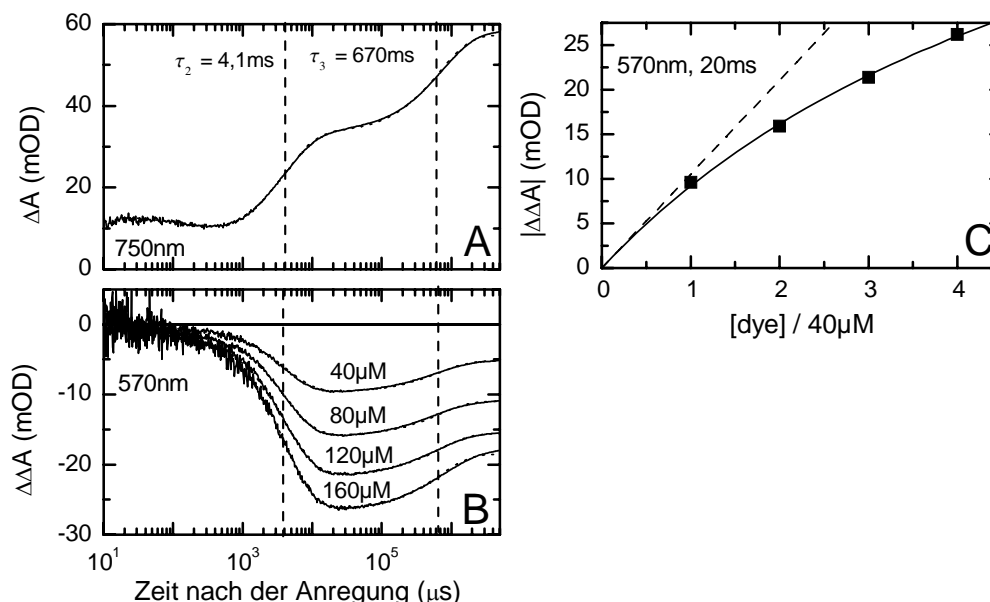


Abbildung 3.8: Transiente Protonierungsänderung des Farbstoffes Kresolrot bei 570nm

(A) Über alle Farbstoffkonzentrationen gemittelte transiente Absorptionsänderung von Agp1-FL-BV (16 μM) bei 750nm (50mM NaCl, pH 7,8). Das Ergebnis des Fits wird durch die vertikalen gestrichelten Linien wiedergegeben. (B) Die auf die Proteinkonzentration korrigierten transiente Absorptionsänderungen des Farbstoffs Kresolrot bei 570nm bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. (C) Die absoluten Werte des Farbstoffsignals bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen nach 20ms. Die durchgezogene Linie gibt den Fit der Daten mit Gl.2.48 wieder und die gestrichelte Linie stellt den Verlauf dar, wenn es zu keinem Sättigungseffekt kommen würde.

Für die P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1-FL-BV wird zuerst eine Abnahme des Signals gefunden (Abbildung 3.8B), was einer Protonenabgabe ins Medium entspricht. Daraufhin folgt eine Phase in der das Signal wieder ansteigt, in der also ein Teil der vorher abgegebenen Protonen wieder aufgenommen werden. Allerdings beträgt der Anstieg nur etwa 50 Prozent der vorangegangenen Abnahme des Signals, so dass es bei der P_r/P_{fr} -Konversion zu einer Nettoansäuerung im P_{fr} -Zustand kommt. Das Differenzsignal ließ sich mit zwei Exponentialfunktionen befriedigend beschreiben.

Die ermittelten Zeitkonstanten von 4,1 ms und 670 ms stimmen sehr gut mit denen des zweiten und dritten Übergangs der P_r/P_{fr} -Kinetik von Agp1-FL-BV nach roter Anregung bei denselben Bedingungen überein (Abbildung 3.8A). Die Stöchiometrie der Protonierungsänderung des Mediums wurde nach der in Kap. 2.2.4 beschriebenen Sättigungsmethode bestimmt. Dazu wurde das absolute auf Verdünnungseffekte und Ausbleichung korrigierte Farbstoffsignal bei 20ms als Funktion der relativen Farbstoffkonzentration aufgetragen und mit Gl. 2.48 gefittet. Mit den daraus erhaltenen Parametern $\Delta A(1)$ und p wurde für $\Delta A(\lambda_{Dye}, f \rightarrow \infty)$ der Wert von 68 mOD erhalten. Mit $\epsilon_{Dye}(570 \text{ nm}) = 50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{Agp1}(750 \text{ nm}) = 50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\Delta A_{meas}(750 \text{ nm}, \text{fünf s}) = 60 \text{ mOD}$ ergibt sich nach Gl. 2.49 eine Stöchiometrie von $1,1 \pm 0,2$ Protonen pro konvertiertem Agp1-Molekül.

3.5.2 Das stationäre Protonensignal der P_r/P_{fr} -Photokonversion

Wie schon bei Cph1 kommt es bei Agp1 bei der P_r/P_{fr} -Konversion zu einer Nettoansäuerung (van Thor 2001). Um diesen Nettoeffekt zu quantifizieren wurden stationäre Messungen mit der Sättigungsmethode (Kap. 2.2.4) mit dem Farbstoff Kresolrot bei pH 7,8 in 50 mM NaCl angefertigt.

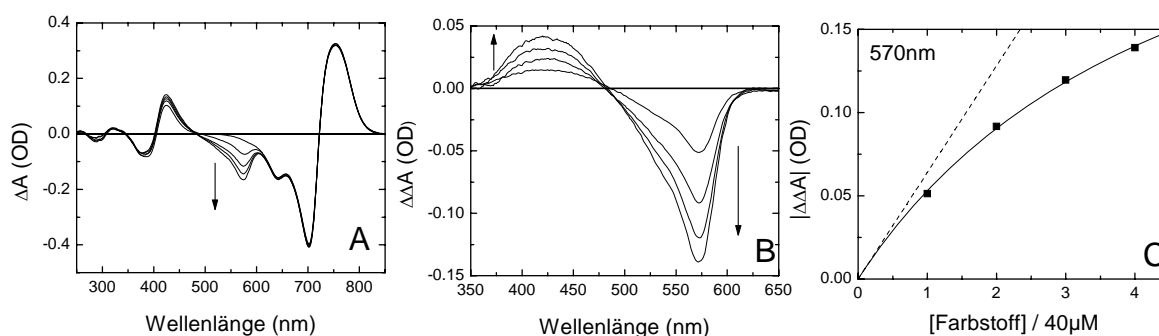


Abbildung 3.9: Stationäre Protonierungsänderung des Farbstoffes Kresolrot bei 570nm

Stationären Messungen der lichtinduzierten Protonierungsänderungen einer ungepufferten Agp1-FL-BV Lösung mit dem pH-Indikator Kresolrot, bei RT, pH 7,8; 50 mM NaCl und einer Proteinkonzentration von $\sim 17 \mu\text{M}$. (A) Die auf Verdünnungseffekte korrigierten P_{fr} - P_r -Differenzspektren mit 0, 40, 80, 120 und 160 μM Kresolrot. Der Pfeil zeigt die Zunahme des Differenzsignals bei 570 nm an. (B) Die reinen Differenzsignale des Farbstoffes, die durch Subtraktion des P_{fr} - P_r -Differenzspektrums ohne Farbstoff von denen mit 40, 80, 120 und 160 μM Farbstoff erhalten wurden. (C) Die absoluten Werte des Farbstoffes bei 570 nm die aus den doppelten Differenzen von B erhalten wurden. Der Fit nach Gl. 2.48 wird durch eine durchgezogene Linie verdeutlicht, während die gestrichelte Linie die Abhängigkeit des Farbstoffsignals ohne Sättigungseffekt darstellt.

In Abbildung 3.9A sind die P_{fr}/P_r -Differenzspektren ohne Farbstoff und mit steigender Farbstoffkonzentration dargestellt (0, 40, 80, 120, 160 μM Kresolrot). Mit steigender Farbstoffkonzentration steigt das Farbstoffsignal bei 570 nm an. In Abbildung 3.9B ist das reine stationäre Farbstoffsignal dargestellt. Die Amplituden sowohl der positiven wie auch der negativen Banden nehmen mit zunehmender Farbstoffkonzentration systematisch zu. Die Werte bei 570 nm wurden dann über der relativen Farbstoffkonzentration aufgetragen und mit Gleichung 2.48 gefittet (Abbildung 3.9C).

Für $\Delta A(\lambda_{Dye}, f \rightarrow \infty)$ wurde so der Wert von 0,31 OD ermittelt. Mit der Annahme, dass die reversible Änderung der Proteinkonzentration bei sättigender roter und dunkelroter Beleuchtung, etwa 85 Prozent des gesamten Proteins beträgt, erhält man für die Protonenstöchiometrie pro konvertierten Phytochrommolekül $0,8 \pm 0,2$.

Alternativ wurden die Änderungen des pH-Wertes einer ungepufferten Agp1-FL-BV-Probe direkt mit einer pH-Elektrode während alternierender roter und dunkelroter Beleuchtung mit dem in Kap. 2.2.6 beschriebenen Aufbau gemessen. In Abbildung 3.10A sind exemplarisch

3. Das Biliverdin-Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV)

die lichtinduzierten pH-Änderungen einer ungepufferten Agp1-FL-BV Lösung (50 mM NaCl) bei pH 7,8 nach roter und dunkelroter Beleuchtung gezeigt.

Die Amplitude (ΔpH) nahm bei sukzessiver Zugabe von Tris-Puffer ab (Abbildung 3.10B). Der Fit mit Gl. 2.57 ergab den Wert von $0,68 \pm 0,07$. Bei der Kalibrierungsmessung ohne Protein stieg das Verhältnis der zugegebenen HCl und KOH Konzentration über der pH-Änderung mit steigender Pufferkonzentration an. Für die Steigung wurde nach Gl. 2.58 der Wert $15,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Konzentration der abgegebenen Protonen ins Medium beträgt demnach $10,3 \pm 1,5 \mu\text{M}$. Mit dem Umsatz der Photokonversion bei diesem Experiment von $22,5 \pm 1,0 \mu\text{M}$ ergibt sich eine Stöchiometrie von $0,5 \pm 0,1$ Protonen pro konvertiertem Phytochrom Molekül. Qualitativ ergeben beide Experimente innerhalb der Fehlergrenze dasselbe Ergebnis. Bei der P_r -/ P_{fr} -Photokonversion kommt es zu einer Nettoansäuerung von etwa 0,5-0,8 Protonen pro konvertiertem Molekül.

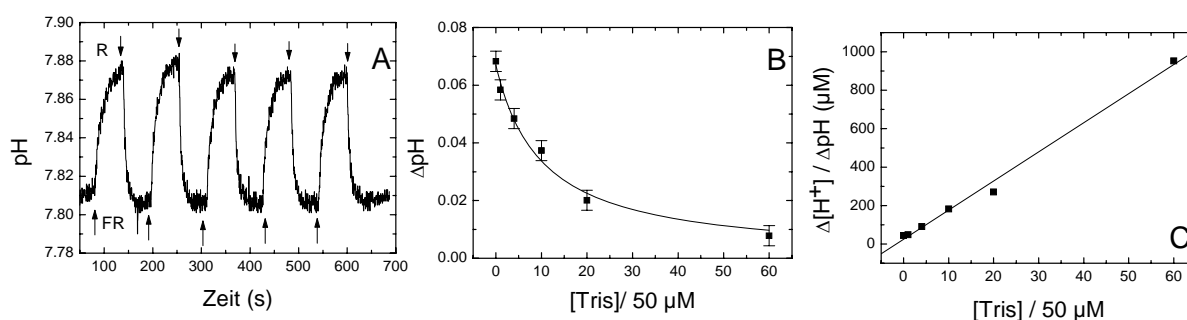


Abbildung 3.10:

(A) Die lichtinduzierten pH-Änderungen der Agp1-FL-BV Lösung bei Raumtemperatur, pH 7,8, 50 mM NaCl und einer Proteinkonzentration von etwa 25 μM . In der Abwesenheit von Puffer wurde nach rotem Licht (R) eine Ansäuerung und nach dunkelrotem Licht (FR) eine Alkalisierung gemessen. Der Beginn der Beleuchtung wird durch die Pfeile gekennzeichnet. (B) Abnahme der Amplituden der pH Änderungen als Funktion des zugegebenen Tris Puffers. Die durchgezogene Linie gibt den Fit nach Gl. 2.57 wieder. (C) Kalibrierungsmessung mit der pH-Elektrode ohne Protein. Das Verhältnis der zugegebenen HCl und KOH Konzentrationen über der pH Änderung steigt linear mit steigender Tris-Pufferkonzentration.

Die lichtinduzierten Änderungen des pH-Wertes wurden auch bei den pH-Werten 6,5; 7,0; 8,5 und 9,5 gemessen. Wie man anhand von Abbildung 3.11 beobachten kann, ist die Amplitude von ΔpH abhängig vom pH-Wert. So wurde bei den pH-Werten 7,0 und 7,8 die größte Amplitude beobachtet, während die Amplitude mit kleiner und größer werdendem pH-Wert kleiner wurde. Im alkalischen bei pH 9,5 waren kaum noch lichtinduzierte pH-Änderungen messbar.

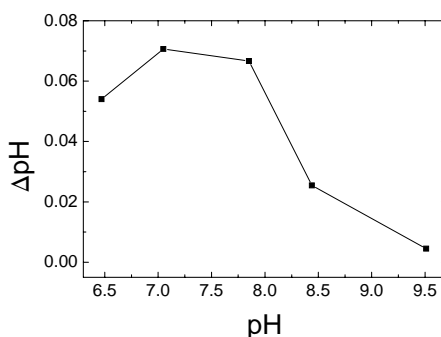


Abbildung 3.11: pH-Abhängigkeit der Amplituden der lichtinduzierten pH-Änderungen

Darstellung der Amplituden der lichtinduzierten pH-Änderungen einer 25 μM Agp1-FL-BV Lösung bei Raumtemperatur 50 mM NaCl bei den pH Werten 6,5; 7,0; 7,8; 8,5 und 9,5. Allerdings wurde die Kalibrierung nur für den pH-Wert 7,8 durchgeführt, so dass die Aussagen bei den anderen pH-Werten rein qualitativ sind.

3.6 pH-Abhängigkeit der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion

Wie die transienten Messungen mit der ungepufferten Agp-FL-BV-Lösung mit dem Farbstoff Kresolrot zeigten wurde mit dem zweiten Übergang der P_r/P_{fr} -Photokonversion ein Proton ins Medium abgegeben und mit der P_{fr} -Bildung etwa 0,5 Protonen von Agp1 wieder aufgenommen. Die Amplitude der daraus resultierenden Nettoansäuerung war pH-abhängig. Aus diesem Grund wurde die P_r/P_{fr} -Photokonversion bei den pH-Werten 6,5; 7,0; 7,4; 7,8; 8,3; 8,7 und 9,5 mittels Blitzlichtphotolyse untersucht.

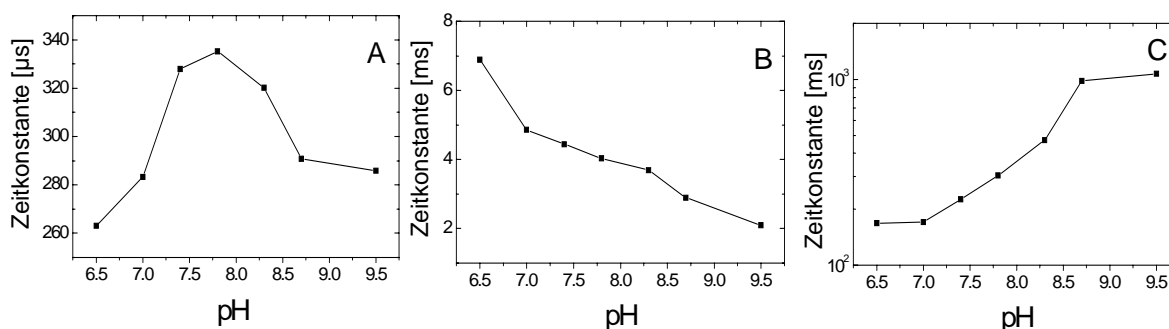


Abbildung 3.12: pH-Abhängigkeit der Raten der P_r/P_{fr} -Photokonversion

Darstellung der Zeitkonstanten, die aus der SVD-Zerlegung und dem simultanen Fit der Zeitspuren $V_i(t)$ mit drei Exponentialfunktionen resultieren, über dem pH-Wert. (A) τ_1 ; (B) τ_2 ; (C) τ_3

Alle Messungen wurden analog zu den Messungen bei pH 7,8 (Kap. 3.3) in 20 mM Tris angefertigt. Die gemessenen Zeitspuren wurden mittels SVD in die Hauptkomponenten zerlegt und die erhaltenen relevanten drei Zeitspuren simultan gefittet. In Abbildung 3.12 sind die Zeitkonstanten der drei Komponenten als Funktion des pH-Wertes aufgetragen.

Die Rate der ersten Komponente (Abbildung 3.12 A) hat bei pH 7,8 ein Maximum. Sowohl im sauren als auch alkalischen Bereich nimmt die Rate hingegen um 60-80 μs ab. Die Rate des zweiten Übergangs hingegen nimmt von sieben ms bei pH 6,5 bis zu zwei ms bei pH 9,5 kontinuierlich ab, während die Rate des dritten Übergangs mit steigendem pH-Wert kontinuierlich zunimmt. Diese pH-Abhängigkeit könnte mit der an diese Übergänge gekoppelte Protonenabgabe bzw. -aufnahme zu tun haben.

Aber nicht nur die Raten zeigten eine pH-Abhängigkeit, sondern auch die Spektren sind pH-abhängig. So konnte bei kleinem pH-Wert ein geringerer Anteil in die P_{fr} -Form überführt werden, wie der Vergleich der Absorptionsspektren des P_{fr} -Zustandes bei pH 7,8 und pH 6,5 zeigt (Abb. 3.13B). Bei pH 9,5 hingegen nimmt die Oszillatorstärke in der Q-Bande wieder ab, was wohl auf die Deprotonierung des Chromophors zurückzuführen ist.

Nach dunkelroter Beleuchtung hingegen ist der nicht konvertierte Anteil an P_{fr} bei hohem pH-Wert größer, die man anhand Absorption bei 750nm der Spektren beobachten kann (Abb. 3.13A). Bei steigender Protonenkonzentration nimmt außerdem die Oszillatorstärke der Q-Bande ab. Dies kann an der Aggregation des Proteins liegen, die auch zu einer höheren Streuung des Messlichtes führt wie man anhand der Spektren bei pH 6,5 und 7,8 im Bereich zwischen 300 und 370nm sehen kann.

Bei der Analyse der erhaltenen Amplitudenspektren zeigte es sich, dass das aus der Summe aller Amplituden extrapolierte Anfangsspektrum keine pH-Abhängigkeit aufwies. Für die Amplituden des ersten Überganges wurde ebenfalls keine pH-Abhängigkeit gefunden. Die Amplituden des zweiten und dritten Übergangs, die die Bildung und den Zerfall des Vorläufer-Intermediates von P_{fr} wiedergeben, zeigten eine pH-Abhängigkeit (Daten nicht gezeigt).

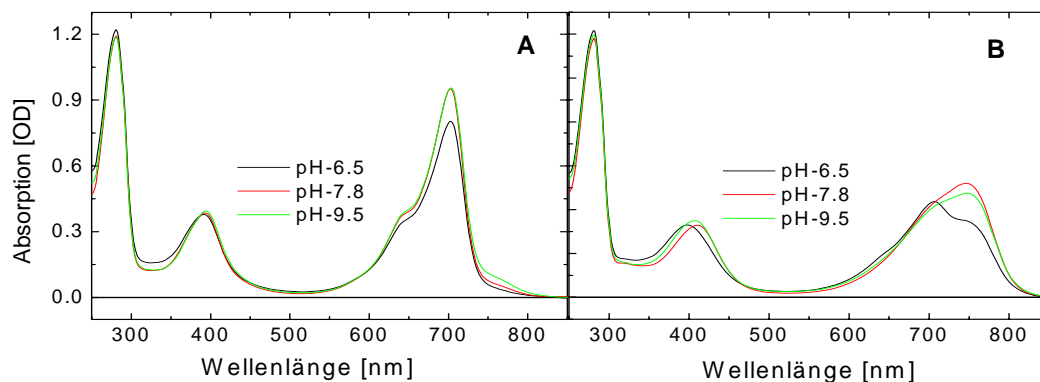


Abbildung 3.13: pH-Abhängigkeit der P_r - und P_{fr} -Absorptionsspektren von Agp1-FL-BV
 Absorptionsspektren des P_r - (A) und P_{fr} -Zustandes (B) bei den pH-Werten 6,5; 7,8 und 9,5. Alle Spektren wurden circa auf die gleiche Absorption bei 280 nm skaliert. Bedingungen: 20 mM Tris; RT.

3.7 Kinetischer Isotopeneffekt des H/D Austauschs der P_r -/ P_{fr} -Photokonversion

Aus der gefundenen pH-Abhängigkeit der transienten Messungen ist anzunehmen, dass an der Kinetik der P_r / P_{fr} -Photokonversion von Agp1 geschwindigkeitsbestimmende Protonentransferschritte beteiligt sind. Die Messung der Kinetik in D_2O und der Vergleich mit den H_2O -Messungen erlaubt die Identifizierung vorhandener kinetischer Isotopeneffekte. Dazu wurden die Blitzlichtmessungen analog zu denen in H_2O in 20 mM Tris bei einem pD von 7,8 und bei 20°C durchgeführt. Der H_2O -/ D_2O -Austausch wirkte sich sowohl auf die ermittelten Zeitkonstanten (Tabelle 3.2) als auch auf die Amplituden der P_r / P_{fr} -Konversion aus (Abbildung 3.14).

Lösungsmittel	τ_1	τ_2	τ_3
H_2O	230 μs	3,1 ms	260 ms
D_2O	440 μs	8,2 ms	340 ms
H/D-Effekt	1,9	2,6	1,3

Tabelle 3.2 Zeitkonstanten der $P_r \rightarrow P_{fr}$ Photokonversion von Agp1-FL-BV in H_2O und D_2O .

Für alle drei Komponenten wurde ein H/D Isotopeneffekt gefunden. Für den ersten Übergang beträgt er 1,9, für den zweiten 2,6 und für den dritten Übergang beträgt er 1,3. Wenn man die Amplitudenspektren auf die gleiche Anzahl konvertierter Moleküle skaliert ist sowohl die negative als auch die positive Amplitude des ersten Übergangs in H_2O 20 Prozent größer. Die 680 nm Amplitude des zweiten Übergangs hingegen zeigt keinen Lösungsmiteleinfluss, während die bei 760 nm in D_2O größer ist. Die Amplitude von 600-800 nm der P_{fr} -Bildung ist in H_2O 30 Prozent größer als in D_2O (Abb. 3.14).

D_2O -Lösungen weisen eine höhere Viskosität als H_2O -Lösungen auf. Um auszuschließen das es sich bei den gefunden Effekten um Viskositätseffekte handelt, wurden die kinetischen Messungen analog zu den H_2O -Messungen, mit einer 0,2 Molaren Sucrose (Saccharose) Lösung (H_2O), die die gleiche Viskosität wie die D_2O -Lösung hat, angefertigt. Der Vergleich der kinetischen Daten mit und ohne Sucrose zeigte keinen signifikanten Unterschied für die Kinetik und die Amplituden (Daten nicht gezeigt). Das führt zu dem Schluss, dass es sich bei den durch H/D-Austausch gefundenen Änderungen um reine Isotopeneffekte handelt.

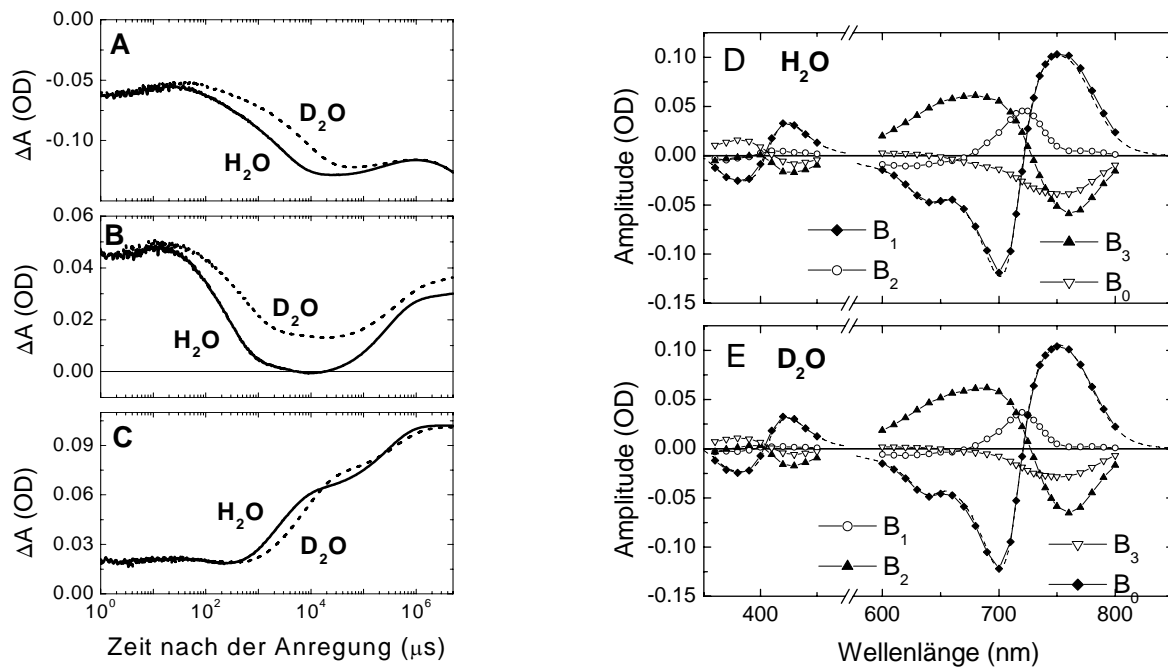


Abbildung 3.14: Zeitspuren der P_r/P_{fr} -Photokonversion bei 700, 725 und 750nm in H_2O und D_2O und dazugehörigen Amplitudenspektren

Darstellung der Zeitspuren bei 700nm (A), 725 nm (B) und 750nm (C) nach Anregung bei 695 nm. Die H_2O - und D_2O -Zeitspuren wurden auf dieselbe Anzahl konvertierter Moleküle normiert. Auf der rechten Seite sind die Amplitudenspektren $B_i(\lambda)$ für die Messungen in H_2O (D) und in D_2O (E) dargestellt. Die Zeitkonstanten sind in Tabelle 3.1 angegeben. Die gestrichelte Linie ist das stationäre P_{fr} - P_r Differenzspektrum, das auf B_0 skaliert wurde.

3.8 Diskussion

3.8.1 Absorptionsspektren von Phytochrom und ihre Absorptionsmaxima

Phytochrome sind eine weit verbreitete Familie von Rotlichtrezeptoren (Rockwell 2006), die in den beiden Zuständen P_r und P_{fr} vorliegen können. Die Chromophore der Phytochrome sind lineare Tetrapyrrole, die auch als Biline bezeichnet werden. Bisher wurden in Phytochromen drei unterschiedliche Biline gefunden die sich in ihrem Oxidationszustand und in der kovalenten Verknüpfung mit dem Protein unterscheiden (Abbildung 3.15A). Während pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome Phytychromobilin ($P\Phi B$) bzw. Phycocyanobilin (PCB) an einen konservierten Cysteinrest in der GAF-Domäne binden, ist das weniger reduzierte Biliverdin (BV) bei bakteriellen und pilzlichen Phytochromen über eine Thioetherbrücke an einen konservierten Cysteinrest in der PAS- oder PLD-Domäne assoziiert. Bei den ersten beiden erfolgt die kovalente Verknüpfung an Position C3¹ des Chromophors, während BV an Position C3² verknüpft wird, was vermutlich am Unterschied der C3-Seitenkette der Chromophore liegt (BV: Vinylgruppe; PCB, $P\Phi B$: Ethylidengruppe; Abbildung 3.15). Trotz der unterschiedlichen Verknüpfung besitzen alle Phytochrome, auch das in dieser Arbeit untersuchte Agp1, vergleichbare Absorptionsspektren (Vierstra und Quail 1983, Hughes 1997, Bhoo 2001) mit einer Absorptionsbande im blauen Spektralbereich, der so genannten Soret-Bande, und einer im roten Spektralbereich, der so genannte Q-Bande, die sich lediglich in der Lage der Absorptionsmaxima unterscheiden. Dabei korreliert die Lage der Absorptionsmaxima qualitativ mit der Größe des konjugierten Systems der eingebauten Chromophore. So liegt das Absorptionsmaximum der BV bindenden Phytochrome (Davis 1999, Bhoo 2001, Lamparter 2002) im P_r -Zustand bei etwa 700 nm, das der $P\Phi B$ bindenden bei etwa 670 nm (Vierstra

3. Das Biliverdin-Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV)

1983) und das der PCB bindenden bei etwas 660 nm (Hughes 1997), wobei die Zahl der am konjugierten System beteiligten Doppelbindungen von zehn über neun nach acht abnimmt.

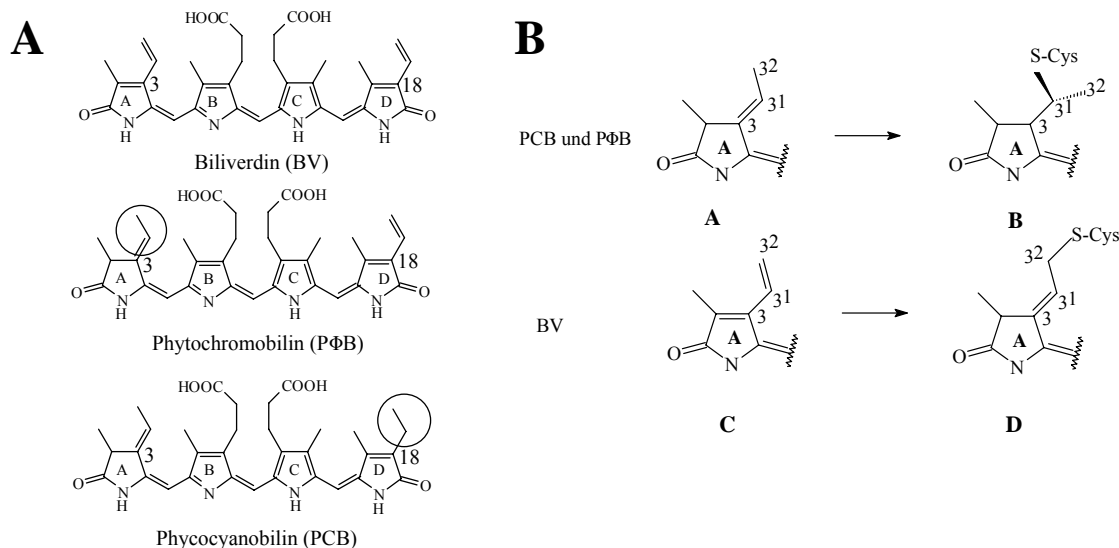


Abbildung 3.15: Natürliche Chromophore der Phytochrome und elektronische Struktur von Ring A vor und nach der kovalenten Bindung

(A) Struktur von ungebundenem Biliverdin (BV), Phycocyanobilin (PCB) und Phytochromobilin (PΦB). Die Positionen 3 und 18 sind mit den entsprechenden Zahlen gekennzeichnet. Durch die Kreise wird der Unterschied in der Struktur zum vorherigen Chromophor angezeigt. (B) Struktur von Ring A der Chromophore PCB, PΦB (A, B) und BV (C, D) vor (A, C) und nach (B, D) der kovalenten Verknüpfung.

Allerdings nimmt das Absorptionsmaximum nicht linear mit der Größe des konjugierten Systems zu. Die Feinabstimmung der Spektren wird durch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und der Polarität der Umgebung des Chromophors beeinflusst, die wiederum von der Orientierung des Chromophors und der Struktur der Bindungstasche abhängen. Agp1 bildet auch mit PCB und PΦB photochrome Addukte, wobei es aber nicht zur kovalenten Verknüpfung der Chromophore kommt. Bei Cph1 kommt es bei der kovalenten Verknüpfung der PCB und PΦB Chromophore zu einer kurzwelligen Verschiebung des Absorptionsmaximums (Borucki 2003), da das konjugierte System dabei verkürzt wird (Abbildung 3.15 B). Aus diesem Grund sollten der kovalent gebundene BV-Chromophor und der nicht kovalent gebundene PΦB-Chromophor dieselbe elektronische Struktur aufweisen (Abbildung 3.15 A+B) und somit dasselbe Absorptionsmaximum in Agp1 aufweisen, was in etwa auch der Fall ist (Tabelle 3.3). Das zeigt, dass beide Chromophore dieselben Wechselwirkungen mit der Bindungstasche eingehen.

Addukt	Agp1-BV	Agp1- PΦB	Agp1-PCB	Agp1-V249C-PCB
Absorptionsmaximum der Q-Bande in P _r	701 nm	697 nm	685nm	654 nm
Verknüpfung	kovalent	nicht kovalent	nicht kovalent	kovalent

Tabelle 3.3: Absorptionsmaxima von Agp1 mit verschiedenen Bilin-Chromophoren nach Lamparter 2003.

Das Absorptionsmaximum des nicht kovalenten PCB-Adduktes von Agp1 hingegen ist im P_r-Zustand aufgrund der reduzierten Doppelbindung der C18-Vinylgruppe um etwa zehn nm kurzwellig verschoben. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums entspricht damit der die

zwischen Cph1-PCB- und PhyA-P Φ B gefunden wurde (Hughes 1997, Vierstra & Quail 1983). Die Mutante V249C von Agp1 besitzt den für die kovalente Verknüpfung von PCB und P Φ B notwendigen Cysteinrest (Kap. 1.3.3). Das kovalent verknüpfte PCB-Addukt dieser Agp1 Mutante wies ein Absorptionsmaximum von 654 nm auf (Tabelle 3.3). Es kommt also zu einer kurzwelligen Verschiebung von etwa 30 nm, obwohl das konjugierte System nur um eine Doppelbindung verkürzt wurde, wie zwischen den beiden nicht kovalenten Addukten Agp1-PCB und Agp1-P Φ B. Der Grund für diese große Verschiebung kann eine durch die kovalente Verknüpfung von PCB geänderte Orientierung des Chromophors in der Bindungstasche sein. Eine andere Möglichkeit ergibt sich aus den bereits gelösten Röntgenstrukturen der CBDs (siehe Kap. 1.3.4) der Phytochrome DrBphB und RpBphP3 aus *Deinococcus radiodurans* und *Rhodospseudomonas palustris* (Wagner 2007, Yang 2007). In beiden Fällen war Ring A um 15° und Ring D um etwa 40° aus der von den Ringen B und C gespannten Ebene herausgedreht. Wie in Kap. 1.2.2 beschrieben führt die Torsion von Strukturelementen die am konjugierten System beteiligt sind zu einer partiellen Entkopplung dieser mit dem konjugierten System. Da Ring D stärker herausgedreht ist als Ring A kann man sich leicht vorstellen, dass sich die Verkürzung des konjugierten Systems bei Ring D weniger stark auswirkt als bei Ring A, da Ring D stärker entkoppelt ist als Ring A. Wenn dem so ist spielen Torsionen der Methinbrücke eventuell auch eine große Rolle bei der P_r/P_{fr}-Photokonversion, bei der es zu einer langwelligen Verschiebung von circa 50 nm kommt.

Nichts desto Trotz kann man aufgrund der starken Gemeinsamkeiten der Absorptionsspektren der verschiedenen Phytochrome und insbesondere der verschiedenen Addukte von Agp1, wohl davon ausgehen, dass die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Bindungstasche für alle Phytochrome von genereller Natur sind.

3.8.2 CD-Spektren von Phytochromen

3.8.2.1 CD-Spektren des P_r-Zustandes von Phytochrom

CD-Spektroskopie im sichtbaren und nahem UV-Bereich ist im Vergleich zur Absorptionsspektroskopie eine empfindlichere Methode um die Geometrie des Chromophors und seiner Wechselwirkungen mit benachbarten aromatischen Aminosäuren in der Bindungstasche des Chromophors zu beobachten. In mehreren Studien wurde der Zirkulardichroismus (CD) von pflanzlichen Phytochromen und dem cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 für den Chromophorbereich zwischen 300 und 800 nm mittels CD-Spektroskopie untersucht (Song 1979, Litts 1983, Vierstra 1987, Björling 1992, Borucki 2003). Der Vergleich der CD-Spektren des P_r-Zustandes weist für alle untersuchten Phytochrome ein vergleichbares Muster auf (Abbildung 3.16).

So ist die Rotationsstärke der Q-Bande negativ, die der Soret-Bande positiv und die Amplituden beider Banden sind in etwa gleich groß (Litts 1983, Borucki 2003). Auch das CD-Spektrum des P_r-Zustandes von Agp1-FL-BV stimmt was Verlauf, Vorzeichen und Verhältnis der beiden Banden betrifft mit diesem Muster überein. Lediglich in der Rotationsstärke werden leichte Unterschiede gefunden, so ist die Rotationsstärke der Q-Bande bei Agp1-BV etwa um den Faktor 2 größer als bei Cph1 (PCB), während die des Haferphytochroms PhyA in etwa der von Agp1 entspricht (Litts 1983).

Insgesamt kann man aufgrund der guten Übereinstimmung der CD-Spektren des P_r-Zustandes der unterschiedlichen Phytochrome davon ausgehen, dass der Chromophor immer die gleiche Stereochemie und damit die gleiche Chiralität besitzt.

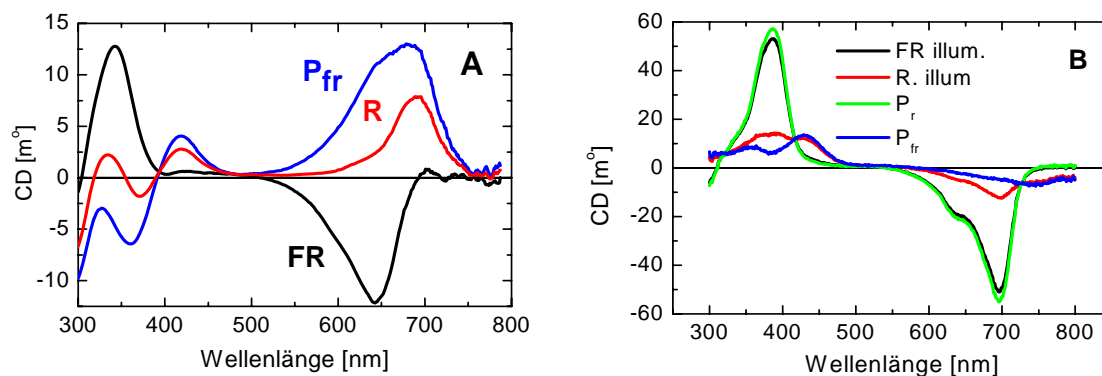


Abbildung 3.16: CD Spektren von Cph1-PCB (A) und Agp1-BV (B)

Die Spektren nach roter Beleuchtung sind mit R und die nach dunkelroter Beleuchtung mit FR bezeichnet. Die mit P_r und P_{fr} bezeichneten Spektren sind die der für die reinen P_r und P_{fr} Zustände berechneten CD-Spektren.

3.8.2.2 CD-Spektren des P_{fr}-Zustandes

Anders als die CD-Spektren des P_r-Zustandes unterscheiden sich die CD-Spektren der verschiedenen Phytochrome im P_{fr}-Zustand. So kommt es bei den pflanzlichen Phytochromen durch die Photokonversion von P_r nach P_{fr} zu einem Wechsel des Vorzeichens der Q-Bande. Zusätzlich ist die Rotationsstärke im Vergleich zum P_r-Zustand zurückgegangen. Noch stärker sind die Änderungen im Bereich der Soret-Bande. Es werden zwei positive Banden bei 358 und 430 nm gefunden und eine negative bei 300 nm (Litts 1983). Bei Cph1, für das zum ersten Mal auch das CD-Spektrum des reinen P_{fr}-Zustandes berechnet wurde (Borucki 2003), kommt es in der Q-Bande auch zu einem Vorzeichenwechsel. Anders als bei pflanzlichem Phytochrom ist die Rotationsstärke aber nicht reduziert, sondern in etwa gleich groß wie im P_r-Zustand. Auch in der Soret-Bande unterscheiden sich die beiden Spektren. Wie bei pflanzlichem Phytochrom erscheint bei Cph1 im P_{fr}-Zustand eine positive Bande bei 430 nm, die Bande bei 360 nm ist im Gegensatz zu Cph1 negativ. Vom Verlauf her stimmen die beiden Spektren überein, im Detail gibt es aber Unterschiede, die entweder von der unterschiedlichen Struktur der beiden Chromophore oder auf Unterschiede in der Bindungstasche zurückzuführen sind.

Das CD-Spektrum von Agp1-FL-BV (Abbildung 3.16) ist im Soret-Bereich vergleichbar mit dem von PhyA aus *Avena sativa* (Litts 1983). Die bei PhyA und Cph1 beobachtete Umkehr des Vorzeichens in der Q-Bande fehlt bei Agp1 aber völlig. Weiterhin ist die Rotationsstärke der Q-Bande im Vergleich zum P_r-Zustand erheblich reduziert. Dieser Unterschied ist umso überraschender da die CD-Spektren der P_r-Form aller Phytochrome mit Ausnahme der Rotationsstärke nahezu identisch waren.

In Lösung nehmen Biline eine zyklische helikale Struktur ein (Falk 1989, Knipp 1998), doch im CD-Spektrum werden keine Banden gefunden. Das wird damit erklärt, dass der Chromophor beide Schraubenformen mit gleicher Wahrscheinlichkeit einnehmen kann und sie sich somit im CD-Spektrum kompensieren. Erst der Einbau des Chromophors führt zu einer festen Konfiguration/Konformation des Chromophors, die durch die Interaktion mit den Aminosäuren der Bindungstasche induziert wird.

In der Arbeit von Björling (Björling 1992), in der das Haferphytochrom Phy A mittels zeit aufgelöster CD-Spektroskopie untersucht wurde, wird die Meinung vertreten, dass die Änderungen im CD-Spektrum zwischen 300 und 800 nm vorwiegend auf die asymmetrischen Dipol-Interaktionen des Chromophors mit den aromatischen Aminosäuren des Proteins zurückzuführen sind. Dabei stützt sich die Argumentation auf experimentelle und theoretische Studien an anderen Protein-Chromophor-Systemen wie Hämoglobin (Häm) und Rhodopsin (Re-

tinal) (Hsu 1971, Kropf 1973, Waggoner 1971). Gerade beim Häm ist es aber fraglich, ob es aufgrund seiner geschlossenen Ringstruktur ein gutes Modell für offenkettige Tetrapyrrole abgibt. Nichts desto trotz kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden.

Beim cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 (Borucki 2003) wurde der Vorzeichenwechsel der Banden als ein durch die Z/E-Isomerisierung verursachter Wechsel der Chiralität des Chromophors gedeutet. Die Interpretation stützte sich dabei auf theoretischen Berechnungen von C. Scharnagl (Scharnagl 1983). Nach diesen Berechnungen kehrt sich das Vorzeichen der langwelligen Bande durch umklappen der C/D-Methinbrücke bei gleichzeitigem festhalten der anderen Ringe des Tetrapyrrols um (Scharnagl 1983). Auch beim Biliprotein Phycoerythrocyanin aus *Mastiglocladus laminosus* wurde im CD-Spektrum eine Umkehr des Vorzeichens nach der Photokonversion gefunden (Zhao & Scheer 1995). Der Chromophor Phycoviolobin von Phycoerythrocyanin ist wie die Chromophore der Phytochrome ein Bilin, bei dem allerdings das konjugierte System nur über die Ringe B, C und D reicht (Abbildung 1.3). Durch Licht kommt es wie bei den Chromophoren der Phytochromen zu einer Z/E-Isomerisierung der Methinbrücke zwischen Ring C und D. Weiterhin haben Dichtefunktional Rechnungen der α -Untereinheit des Biliproteins C-Phycocyanin gezeigt, dass die Hauptbande im roten Bereich durch die elektronische Anregung der π -Elektronen des Chromophors entsteht (Wan 2005, 2006).

Unter Einbeziehung dieser Ergebnisse wird die Hypothese aufgestellt, dass die Z/E-Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung des Chromophors zum Wechsel der Chiralität führt und somit die Umkehrung des Vorzeichens des CD-Signals verursacht.

Der fehlende Vorzeichenwechsel bei der P_r/P_{fr} -Photokonversion in den CD-Spektren von Agp1 kann damit allerdings nicht geklärt werden.

Bei den kovalent verknüpften PCB- und P Φ B-Addukten der Agp1 Mutante V249C wurde der Vorzeichenwechsel in der Q-Bande nach roter Beleuchtung gefunden, während die nicht kovalent verknüpften PCB- und P Φ B-Addukten wie das BV-Addukt keinen Vorzeichenwechsel während der Photokonversion zeigten (persönliche Mitteilung Berthold Borucki). Dass heißt der Vorzeichenwechsel tritt erst nach der kovalenten Verknüpfung des PCB- bzw. P Φ B-Chromophors auf. Nun gibt es zwei Möglichkeiten: (A) die kovalente Bindung führt zu einer anderen Orientierung von PCB und P Φ B in der Bindungstasche von Agp1 oder (B) die Struktur von Ring A nach der kovalenten Verknüpfung ist für das unterschiedliche Verhalten im CD verantwortlich.

Variante A erscheint eher unwahrscheinlich, da sich die CD-Spektren des P_r -Zustandes aller Addukte durch die kovalente Bindung nur unwesentlich ändern. Wahrscheinlicher scheint Variante B zu sein. Wie man aus Abbildung 3.15B entnehmen kann ist Ring A von PCB und P Φ B nach der kovalenten Verknüpfung nicht mehr am konjugierten System beteiligt. Ring A von BV war in der Kristallstruktur des DrBphP um 15° zu Ring B und C verdreht. Es besteht also die Möglichkeit, dass der Torsionswinkel von Ring A im Fall von BV zum CD-Signal beiträgt, da dieser noch zum konjugierten System gehört. Ähnlich verhält es sich bei nicht kovalenten PCB- und P Φ B-Addukten, wohingegen das CD-Signal des kovalent verknüpften PCB und P Φ B Chromophors nur durch den Torsionswinkel von Ring D bestimmt wird. So führt die Z/E Isomerisierung der C/D-Methinbrücke von PCB und P Φ B zu einer Umkehrung des Vorzeichens der Q-Bande. Beim BV hingegen besitzen die Torsionswinkel der A/B- und C/D-Methinbrücke im P_{fr} -Zustand unterschiedliche Chiralität, die dann analog zum freien Chromophor zur Kompensation des CD-Signals führen.

Dichtefunktionalrechnungen (Mroginski 2004), Untersuchungen mit ^{15}N -NMR von Cph1 (Strauss 2005) und FTIR Studien (Förstendorf 2000, 2001) belegen, dass es im Verlauf der Photokonversion von P_r nach P_{fr} zu Änderungen des Winkels der A/B-Methinbrücke kommt,

ebenso wie die in Kapitel 5 beschriebenen Untersuchungen mit dem 5Zs Chromophor, bei dem die A/B-Methinbrücke arretiert ist.

Der CD-Signal des kovalenten BV-Adduktes in P_{fr} wäre also eine Folge der unterschiedlichen Chiralität der A/B- und C/D-Methinbrücke, die sich gegenseitig kompensieren, während das CD-Spektrum der Q-Bande des P_{fr} -Zustandes der kovalent gebundenen PCB- und PΦB-Addukt nur durch die Chiralität der C/D-Methinbrücke bestimmt wird, da Ring A nicht am konjugierten π -System partizipiert. Ob diese Hypothese korrekt ist, sollte sich durch CD-Messungen anderer Phytochrome zeigen, die ebenfalls BV kovalent binden. Allerdings liegen solche Daten bisher nicht vor.

3.8.3 Die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1-FL-BV

Die beiden stabilen Formen P_r und P_{fr} können durch Absorption von rotem (R) bzw. dunkelrotem (DR) Licht reversibel ineinander umgewandelt werden. Die Photoreaktion des Tetrapyrrol Chromophors ist eine Z/E-Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung der Methinbrücke zwischen Ring C und D (Rüdiger 1983, Inomata 2005). Diese Isomerisierung initiiert mehrere Protein-Chromophor-Interaktionen. Um exakte Aussagen über den molekularen Mechanismus dieser Umwandlung machen zu können, ist eine genaue Kenntnis der strukturellen Änderungen des Chromophors und seiner Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Bindungstasche erforderlich.

Aus diesem Grund wurden pflanzliche Phytochrome und das cyanobakterielle Phytochrom Cph1 mit verschiedensten spektroskopischen Methoden untersucht (Rüdiger 1985, Braslavsky 1997, Kneip 1999, Remberg 1997, van Thor 2001, Rockwell 2006). Dabei wurden generelle Merkmale und Übereinstimmungen gefunden, die zu dem Schluss führen, dass der molekulare Mechanismus der Photokonversion für alle Phytochrome vergleichbar ist.

Der natürliche Chromophor der bakteriellen Phytochrome ist das BV (Davis 1999, Bhoo 2001, Lamparter 2002, Karniol & Vierstra 2003), das kovalent an einen Cysteinrest in der PLD-Domäne gebunden wird. Bei den pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen werden die Chromophore kovalent mit einem Cystein verknüpft das in der GAF-Domäne liegt (Lamparter 2003). Trotz des großen Abstandes in der Sequenz haben Modellierungen anhand der Struktur von DrBphP gezeigt, dass beide Cysteine in der Struktur in unmittelbarer Nähe liegen würden (Wagner 2005). Es ist aber nicht auszuschließen, dass die unterschiedliche Verknüpfung sich auf die Photokonversion auswirkt.

Über die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion BV einbauender bakterieller Phytochrome war zu Beginn dieser Arbeit sehr wenig bekannt. Von besonderem Interesse war es, ob die Kinetik von Agp1-BV mit der anderer Phytochrome vergleichbar ist, oder ob die Photokonversion z.B. durch die unterschiedliche elektronische Struktur des BV Chromophors beeinflusst wird. Würde eine vergleichbare Kinetik gefunden, könnte man von einem generellen molekularen Mechanismus der P_r/P_{fr} -Photokonversion ausgehen. Aus diesem Grund wurde die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion des BV einbauenden Phytochroms Agp1 im Zeitbereich der thermischen Relaxationen (Mikrosekunden bis Sekunden) untersucht (Kap.3.3).

3.8.3.1 Die frühen Absorptionsänderungen („initial bleach“)

Die zeitaufgelösten Messungen mittels Laserangeregter Blitzlichtspektroskopie ergaben bei pH 7,8 für Agp1-FL-BV vier relevante Komponenten, mit den dazugehörigen Zeitkonstanten sieben μ s, 230 μ s, 3,1 ms und 260 ms. Die erste Komponente (sieben μ s) wies im Amplitudenspektrum nur eine kleine negative Amplitude im Bereich des Emissionsmaximums des

Lasers auf (~ 700 nm). Dies und die Tatsache, dass die Komponente in weiteren Messungen bei verschiedenen Bedingungen nahezu unverändert blieb, z.B. beim H/D-Isotopenaustausch, lässt vermuten, dass diese Komponente eher einem Artefakt der Laseranregung zuzuschreiben ist. Die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1 im Zeitbereich von einer Mikrosekunde bis fünf Sekunden besteht demnach aus drei Übergängen mit den Zeitkonstanten $230\mu\text{s}$, $3,1$ ms und 260 ms.

Alle Kurzzeitspektroskopischen Untersuchungen über die angeregten Zustände der P_r/P_{fr} -Photokonversion kommen zu dem Schluss, dass sich der erste elektronische Grundzustand, Lumi-R, innerhalb weniger Pikosekunden ausbildet (Sineshchekov 1995, Ansel 1997, Bisschoff 2001, Heyne 2002, Schuhmann 2007). Bei Agp1 soll die Lumi-R Bildung mit einer Zeitkonstante von etwa 40 ps erfolgen (Schuhmann 2007), was bedeutet, dass sie bei den vorliegenden Daten der Blitzlichtspektroskopie außerhalb des aufgelösten Zeitbereiches liegt. Gleichzeitig war die Bildung von Lumi-R bei allen Untersuchungen mit einer Abnahme der Absorption und einer bathochromen (langwelligen) Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zum P_r -Zustand verbunden. Auch die Absorptionsspektren, der bei tiefen Temperaturen erhaltenen Lumi-R Intermediate, wiesen diese spektroskopischen Merkmale auf (Eilfeld 1985; Kneip 1999). Die zeitaufgelösten Absorptionmessungen der thermischen Relaxationen (μs -s) fanden für den Zerfall von Lumi-R je nach Phytochrom und Bedingungen Werte zwischen fünf und $270\mu\text{s}$ (Eilfeld 1989, Zhang 1992, Remberg 1997, Schmidt 1997, van Thor 2001). Das extrapolierte Amplitudenspektrum für den Anfangszustand (Abbildung 3.5C) von Agp1-FL-BV weist eine Absorptionsabnahme bei 700 nm und eine Zunahme bei etwa 710 nm auf. Das berechnete Intermediatenspektrum (Abbildung 3.6 C rote Kurve) für die anfänglichen Änderungen („initial bleach“) ist im Vergleich zum P_r -Zustand langwellig verschoben und weist eine geringere Absorption auf, genau wie es für den Lumi-R Zustand der anderen Phytochrome beschrieben wurde. Auch die Zeitkonstante des Zerfalls dieses Zustandes liegt mit $230\mu\text{s}$ in dem Bereich der für den Zerfall von Lumi-R gefunden wurde. Deshalb kann man in Analogie zu den pflanzlichen Phytochromen annehmen, dass die Absorptionsänderungen gegenüber dem P_r -Zustand zwischen zehn bis $100\mu\text{s}$, charakteristisch für das Lumi-R Intermediat sind, das sich mit etwa 40 ps bildet und mit $230\mu\text{s}$ zerfällt. Mittels Tieftemperatur-spektroskopie konnte im Fall von Agp1 kein dem Lumi-R entsprechendes Intermediat eingefangen werden (Borucki 2005). Aus diesem Grund bieten sich die anfänglichen Absorptionsänderungen bei den Wellenlängen 700 , 725 und 750 nm zur Identifizierung des Lumi-R Intermediates bei späteren Messungen an (siehe Kapitel 4,5 und 6).

3.8.3.2 Zuordnung der gefundenen Übergänge

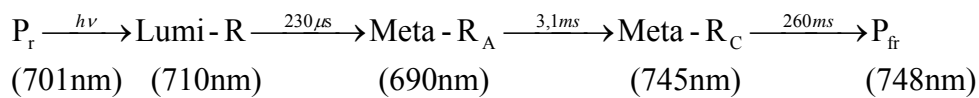
Anhand der 750nm Zeitspur aus Abbildung 3.4 kann man gut erkennen, dass die Photokonversion von P_r nach P_{fr} in dem gewählten Zeitbereich abgeschlossen ist, da nach zwei Sekunden keine weiteren Absorptionsänderungen mehr beobachtet wurden. Bei den Wellenlängen, bei denen der P_r -Zustand absorbiert, sind im späten Zeitbereich noch Änderungen feststellbar, die aber auf das Messlicht zurückzuführen sind, die den P_r -Zustand weiter entvölkern. Auch das Amplitudenspektrum B_0 (Abbildung 3.5 C), welches das extrapolierte Endspektrum darstellt und hervorragend mit dem skalierten Differenzspektrum der stationären Absorptionmessungen übereinstimmt (Abbildung 3.5 C), zeigt an, dass die P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1-FL-BV innerhalb des ausgewählten Zeitbereiches beendet ist. Somit beschreibt der Übergang τ_3 (260ms) die P_{fr} -Bildung. Das bedeutet, dass bei Annahme einer linearen Abfolge von Intermediaten außer Lumi-R noch zwei weitere Intermediate in der P_r/P_{fr} -Kinetik von Agp1 gibt, die mit $230\mu\text{s}$ bzw. $3,1$ ms gebildet werden.

Bei tiefen Temperaturen wurden bei Phytochrom A aus *Avena sativa* für die P_r/P_{fr} -Photokonversion bis zu vier Intermediate gefunden, Lumi-R unterhalb von -100°C , Meta- R_A

3. Das Biliverdin-Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV)

unterhalb von -65°C , Meta- R_C unterhalb von -25°C und Meta- R_b (Eilfeld 1985). Das Intermediat Meta- R_b wurde anstelle von Meta- R_C nur bei teilweise verdautem Protein (Eilfeld 1985) gefunden. Da das Intermediat Meta- R_b nur bei veränderten Phytochromen oder bei extremen Bedingungen (z.B. pH) gefunden wurde (Eilfeld 1985, Iwakami 1996), gehört es wohl nicht zu den regulären Intermediaten. Lässt man das Intermediat Meta- R_b außen vor stimmt die Anzahl der gefundenen Intermediate mit der Anzahl der Übergänge der Kinetik von Agp1-FL-BV überein. Sowohl die Studien mittels zeitaufgelöster Absorptionsspektroskopie (Sineshchekov 1995) als auch die Studien bei denen die Intermediate bei tiefen Temperaturen eingefangen wurden, zeigten das bei pflanzlichen Phytochromen drei Intermediate während der P_r/P_{fr} -Photokonversion durchlaufen werden, die als Lumi-R, Meta- R_A und Meta- R_C bezeichnet werden (Briggs und Spudich 2005).

Aufgrund der gefundenen Übereinstimmung zwischen Agp1-FL-BV und pflanzlichem Phytochrom wird für die Kinetik von Agp1-FL-BV die vorläufige Zuordnung gemacht:



Wie schon oben erwähnt, konnte für Agp1-FL-BV wie auch für Cph1 (Förstendorf 2000) kein Lumi-R Zustand bei tiefen Temperaturen eingefangen werden (Borucki 2005). Erst ab einer Temperatur von -25°C wurden spektrale Änderungen beobachtet (Borucki 2005), also bei der Temperatur bei der bei pflanzlichem Phytochrom das Intermediat Meta- R_C eingefangen wurde (Eilfeld 1985). Das Spektrum dieses bei -25°C erhaltenen Zustandes absorbierte im langwelligen Bereich bei 745 nm (Borucki 2005). Das Differenzspektrum aus dem erhaltenen Zustand und dem P_{fr} -Zustand zeigte große Ähnlichkeiten zum Amplitudenspektrum B_4 (Abbildung 3.5 C) des 260 ms Überganges der Blitzlichtmessungen. Eine noch bessere Übereinstimmung wurde erzielt, wenn man für den Vergleich ein Spektrum heranzog, das zu 85 Prozent aus B_4 und zu 15 Prozent aus B_3 bestand (Borucki 2005). Angesichts dieser Tatsachen und das die Bildung dieses Zustandes mit 3,1 ms und der Zerfall dieses Zustandes mit 260 ms in dem Bereich liegt in dem auch Meta- R_C von PhyA gebildet wird und zerfällt (Eilfeld 1989, Braslavsky 1997, Schmidt 1998) ist die oben gemachte Zuordnung für diesen Übergang wohl richtig gewählt, da auch das Resonanz Raman Spektrum dieses Intermediates mit dem des Meta- R_C Intermediates von PhyA im relevanten Bereich große Analogien zeigten (Borucki 2005, Kneip 1999).

Das Absorptionsmaximum des angenommenen Meta- R_A Intermediates ist mit 690 nm im Vergleich zu Lumi-R zu kürzeren Wellenlängen verschoben (Abbildung 3.6 C, D). Eine hypsochrome Verschiebung wird auch für das Meta- R_A Intermediat von Phy A gefunden (Rüdiger 1985). Außerdem stimmen die gefundenen Lebensdauern dieses Zustandes mit der von Meta- R_A von Phy A überein. Alles in allem lässt sich festhalten, dass die Kinetik von Agp1-FL-BV wohl über drei Intermediate verläuft die in Analogie zu pflanzlichem Phytochrom mit Lumi-R, Meta- R_A und Meta- R_C bezeichnet wurden.

Die aus der Temperaturabhängigkeit berechneten Aktivierungsenergien der P_r/P_{fr} -Photokonversion steigen mit der Abfolge der Relaxationsprozesse. Nur für den Zerfall von Lumi-R gibt es einen Vergleichswert für das Phytochrom A aus *Avena sativa* und der liegt mit 50-60 kJ/mol (Aramendia 1987) unter dem in diesem Fall gefundenen von 67 kJ/mol. Gerade deshalb ist es überraschend, dass man anders als bei PhyA keinen Lumi-R und Meta- R_A Zustand bei tiefen Temperaturen einfangen konnte (Borucki 2005). Dies kann eigentlich nur bedeuten, dass die Photoreaktion bei tiefen Temperaturen blockiert ist, also die Aktivierungsenergie für den Lumi-R Zustand zu groß ist, oder dass die beiden Intermediate aufgrund der überlappenden Spektren effizient durch Photokonversion zurück konvertiert werden können. Gerade bei

Agp1 überlappen die berechneten Intermediatspektren wesentlich stärker als bei pflanzlichem Phytochrom.

3.8.3.3 Vergleich mit Cph1 und Evolution von Phytochromen

In der Kinetik des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 aus *Synechocystis sp.* wurde im Vergleich zu Agp1 und PhyA ein zusätzlicher Übergang gefunden (Remberg 1997, van Thor 2001). Bei tiefen Temperaturen konnten jedoch nur zwei Intermediate eingefangen werden, die durch Vergleich mit pflanzlichem Phytochrom als Meta-R_A und Meta-R_C identifiziert wurden. Beim Vergleich der Amplitudenspektren von Cph1 und Agp1 (Abbildung 3.19) sieht es so aus, wenn man die Größenverhältnisse ausblendet, als ob B₁ und B₂ bei Agp1 und Cph1 vertauscht sind. Die Amplituden des dritten und vierten Überganges von Cph1 hingegen sehen so aus, als ob sie aufaddiert in etwa der Amplitude des dritten Überganges von Agp1 entsprechen würden. Es könnte also sein, dass bei Cph1 die ersten beiden Intermediate im Vergleich zu Agp1 vertauscht sind, aber in beiden Fällen der Meta-R_C-Zustand gebildet wird, da die FTIR Daten dieses Intermediates bei Cph1 denen der pflanzlichen Phytochrome und Agp1 stark ähneln (Förstendorf 2000). Der P_{fr}-Zustand wird dann aus diesem Intermediat gebildet, wobei bei Cph1 zwei Übergänge durchlaufen werden, während bei Agp1 anscheinend nur einer durchlaufen wird. Das bei Agp1 veränderte Amplitudenspektrum der P_{fr}-Bildung in D₂O deutet auf ein Gleichgewicht hin bei dem die mikroskopischen Raten der Hin- und Rückreaktion unterschiedliche Isotopeneffekte aufweisen. Also könnte die Bildung von P_{fr} in beiden Fällen gleich verlaufen nur dass bei Cph1 das Gleichgewicht so liegt, dass es makroskopisch zu einem weiteren Übergang kommt.

Man kann also festhalten, dass die Kinetik der P_r/P_{fr}-Photokonversion von pflanzlichem Phytochrom und von Agp1-BV große Gemeinsamkeiten aufweisen, während sich die von Cph1-PCB davon unterscheidet. Dies könnte wie von Lamparter vorgeschlagen (Lamparter 2004b) wurde auf eine konvergente Evolution der cyanobakteriellen (PCB-Cphs) und pflanzlichen Phytochrome hinweisen. Demnach wären zuerst die Vorläufer der heutigen BV einbauenden bakteriellen Phytochrome (BV-BphPs) entstanden aus denen dann unabhängig voneinander die cyanobakteriellen (PCB-Cphs) und pflanzlichen Phytochrome hervorgegangen sind.

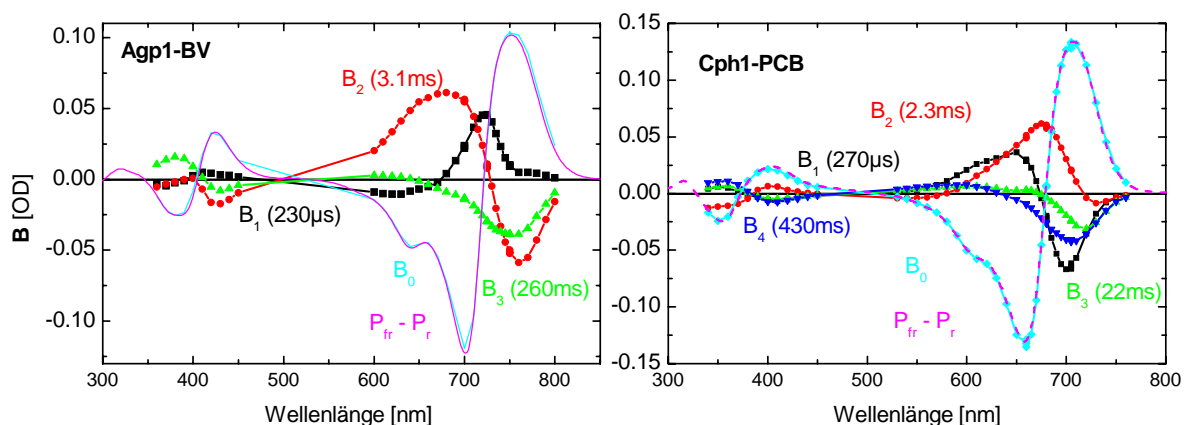


Abbildung 3.19: Amplitudenspektren und stationäre Differenzspektren von Agp1-BV-FL (links) Cph1-PCB (rechts).

Darstellung der Amplitudenspektren B₁, B₂, B₃ und B₀ wie in der Graphik angegeben und das skalierte stationäre Differenzspektrum. Alle Daten wurden bei vergleichbaren Bedingungen aufgenommen: 20°C, 20mM Tris 50mM NaCl und pH 7,8.

Das heißt die Hypothese, dass die pflanzlichen Phytochrome von cyanobakteriellen Endosymbionten vererbt wurden, die in den Plastiden der Pflanzenzellen aufgegangen sind (Herd-

man 2000, Montgomery 2002), stimmt nicht. Vielmehr scheinen die BV-BphPs eine Art Stammvater der Biline einbauenden photochromen Pigmente zu sein, da der verwendete Biliverdin Chromophor auch das erste Produkt der Ringöffnung von Häm ist. Der Vorläufer der BV-BphPs könnte sich aus einem Protein mit einer GAF-Domäne entwickelt haben, zu dem im Laufe der Evolution die verwandten PAS- und PHY-Domänen dazukamen. Aus diesem Stammvater der Phytochrome entwickelten sich dann die Phytochrome der Cyanobakterien und Pflanzen. Das Absorptionsspektrum der P_r -Form der BV-BphPs überlappt nur in geringem Masse mit dem der Chlorophylle, die der PCB-Cphs hingegen viel stärker, weshalb das Photogleichgewicht der PCB-Cphs viel stärker durch Anwesenheit von Chlorophyll beeinflusst wird. Die pflanzlichen Phytochrome beeinflussen viele Schritte der Photomorphogenese. Bei den PCB-Cphs sind bisher noch nicht sehr viele Effekte bekannt. Beide synthetisieren aber Chlorophyll, weshalb der Wechsel von BV zu den reduzierten Chromophoren PCB und PΦB wohl mit der Fähigkeit des Organismus zur Photosynthese zusammenhängt, da dieser Wechsel zu einem zu kürzeren Wellenlängen verschobenen Absorptionsmaximum gegenüber den BV-BphPs führt. Mit dem Wechsel zu den reduzierteren Chromophoren ist es auch zu einem Wechsel des Cysteins für die kovalente Verknüpfung des Chromophors gekommen (Kap 3.8.1). Dies könnte mit der unterschiedlichen C3 Seitenkette der Chromophore zu tun haben und der unterschiedlichen Chiralität von C2 des Chromophors.

3.8.4 Protonentransferschritte bei Phytochrom

Phytochrome sind ein Mitglied der Familie der Photorezeptorproteine (Kap.1.1). Bei einigen Mitgliedern dieser Familie, wie Rhodopsin (Emeis 1982, Parkes 1984, Dickkopf 1998, Olson 1992) und PYP (Meyer 1993, Hendricks 1999) spielen intramolekulare Protonentransferschritte zwischen Chromophor und Protein sowie transiente Abgaben und Aufnahmen von Protonen aus dem Medium eine wichtige Rolle im Mechanismus der Aktivierung und Bildung des Signalzustandes. Im Falle der licht-getriebenen Protonenpumpe Bakteriorhodopsin zum Beispiel ist die Deprotonierung des Chromophors kinetisch mit der Abgabe eines Protons ins externe Medium durch einen Aminosäurerest der extrazellulären Oberfläche gekoppelt (Alexiev 1995). Die Deprotonierung der Schiffischen Base führt dabei zu einer starken Verschiebung des Absorptionsspektrums nach kürzeren Wellenlängen.

Über eventuelle Protonentransferschritte bei Phytochromen sind bisher nur wenige Daten verfügbar. Bei PhyA der Erbse wurde mittels pH-Elektrodenmessungen bei der P_r/P_{fr} -Photokonversion eine reversible Alkalisierung des Mediums im pH-Bereich zwischen 5,2 und 7,5 und eine Ansäuerung im Bereich zwischen 7,5 und 8,9 gefunden (Tokutomi 1982, 1988). Bei einem verkürzten Fragment desselben Phytochroms, dem die PHY-Domäne fehlte, wurde keine Alkalisierung mehr gefunden. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die PHY-Domäne einen Aminosäurerest besitzt, der als Protonenakzeptor fungiert, bei dem Konformationsänderungen eine Verschiebung des pK-Wertes induzieren. Da bei diesem Fragment auch weiterhin eine Ansäuerung gefunden wurde, werden die Protonenabgabe und die Protonenaufnahme durch unterschiedliche Domänen des Proteins verursacht.

Beim cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 hingegen zeigte sich ein ganz anderes Bild. Hier wurde beim Übergang von P_r nach P_{fr} eine Nettoansäuerung im pH-Bereich zwischen sechs und neun gefunden. Dabei reichte die Ansäuerung von 0,1 Protonen pro konvertiertem Phytochrommolekül bei pH 9 bis zu 0,6 Protonen bei pH 6 (van Thor 2001). Auch bei den stationären pH-Messungen von Agp1-FL-BV dieser Arbeit wurde im pH-Bereich von 6,5 bis 9,5 eine Nettoansäuerung also eine Protonenabgabe ins Medium gefunden. Wie schon bei Cph1 ist die Amplitude der Nettoansäuerung pH-abhängig. Bei pH 7 ist die Amplitude am größten und nimmt dann bei höheren pH-Werten sukzessive ab, bis sie bei pH 9,5 kaum noch messbar ist. Anders als bei Cph1 kann die exakte Stöchiometrie der Protonen, aufgrund der fehlenden

Kalibrierung nicht angegeben werden, qualitativ zeigen aber beide Phytochrome ein ähnliches Verhalten.

3.8.4.1 Kinetik und molekulare Ursachen der Protonentransferschritte bei Agp1

Die Kinetik der Änderung der Protonenkonzentration des Mediums bei der P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1 konnte mithilfe des Farbstoffes Kresolrot (pK 8,2) gemessen werden. Dabei zeigte es sich, dass mit einer Zeitkonstante von etwa fünf ms ziemlich exakt ein Proton ins Medium abgegeben wird. Diese Zeit korreliert hervorragend mit der Bildung des Meta- R_C -Zustandes (Abbildung 3.8). Nahezu alle Schwingungsspektroskopischen Untersuchungen an Phytochromen zeigten, dass der Chromophor sowohl in P_r als auch in P_{fr} auf allen Pyrrolstickstoffen protoniert ist (Andel 1996, Kneip 1999, Mroginski 2004). Auch bei den Resonanz Raman (RR) Messungen an Agp1 wurde für den P_r und P_{fr} Zustand die für die protonierte (kationische) Form des Chromophors charakteristische N-H Deformationsschwingung bei 1574 bzw. 1555 cm^{-1} beobachtet (Borucki 2005). Durch einen H/D-Isotopenaustausch verschiebt diese Bande zu etwa 1080 cm^{-1} und es kommt weiterhin zu einer Verschiebung von fünf bis sieben Wellenzahlen der C=C Streckschwingung der C-D-Methinbrücke. In den RR-Spektren des Intermediates Meta- R_C fehlte sowohl die N-H-Deformationsschwingung als auch die H/D-Abhängigkeit der C=C Streckschwingung (Borucki 2005), was bedeutet, dass der Chromophor des Intermediates Meta- R_C deprotoniert vorliegt. Wann der Chromophor deprotoniert wird, kann mit den vorliegenden Daten nicht eindeutig gesagt werden, da bei den Tieftemperaturmessungen keine weiteren Intermediate erhalten wurden. Beim cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 konnte aber ebenfalls die Abgabe genau eines Protons ins Medium gemessen werden (van Thor 2001). Wie bei Agp1 erfolgt die Abgabe mit der Millisekundenkomponente, die wahrscheinlich die Bildung von Meta- R_C beschreibt. Sowohl bei Agp1 als auch bei Cph1 wird für den Übergang, bei dem die Protonenabgabe erfolgt, ein H/D-Isotopeneffekt gefunden, 2,7 bei Cph1 (Remberg 1997) und 2,6 bei Agp1 (Borucki 2005), der auf einen ratenbegrenzenden Protonentransferschritt hindeutet. Anders als bei den RR-Messungen von Agp1 werden die FTIR-Daten der Intermediate von Cph1 wie auch die der pflanzlichen Phytochrome allerdings so gedeutet, dass der Chromophor in den beiden Intermediaten Meta- R_A und Meta- R_C protoniert ist. Allerdings könnte die Lage der ($C_{19}=O$) Carbonylbande, die mit dem konjugierten System des Chromophors gekoppelt ist, bei 1690 cm^{-1} darauf hinweisen, dass der Chromophor in Meta- R_C in seiner neutralen deprotonierten Form vorliegt, was bedeuten würde, dass der Chromophor während der Bildung von Meta- R_C deprotoniert wird. Da diese Verschiebung auch bei pflanzlichem Phytochrom beobachtet wurde (Förstendorf 1996, 2001), kann im Augenblick nicht ausgeschlossen werden, dass bei allen Phytochromen der Chromophor im Meta- R_C -Zustand deprotoniert vorliegt. Der große H/D-Isotopeneffekt der Meta- R_C -Bildung und die pH-Abhängigkeit der Zeitkonstante dieses Überganges deuten stark darauf hin, dass die Meta- R_C -Bildung zumindest bei Agp1 mit einer Deprotonierung des Chromophors gekoppelt ist. Damit ist aber nicht gesagt, dass das abgegebene Proton das des Chromophors ist. Die exakte Korrelation der Protonenabgabe mit der Meta- R_C Bildung lassen eher darauf schließen, dass dieses Proton von einer Aminosäure auf der Proteinoberfläche abgegeben wird, da das Proton erst aus der Bindungstasche heraus diffundieren müsste, um im Medium detektiert werden zu können. Auf jeden Fall scheint die Protonenabgabe bei Agp1 charakteristisch für die Meta- R_C -Bildung zu sein.

Sowohl bei Agp1 als auch bei Cph1 erfolgt mit der P_{fr} -Bildung eine Aufnahme von Protonen aus dem Medium. Die Zahl der dabei aufgenommenen Protonen beträgt aber nur etwa ein Drittel bis die Hälfte, der bei der Meta- R_C Bildung abgegebenen Protonen. Durch die Differenz der abgegebenen und der wieder aufgenommen Protonen kommt es insgesamt zu einer Ansäuerung, wie sie auch bei den stationären Messungen gefunden wurde. Diese erhöhte Protonenkonzentration ist auch für die geringere P_{fr} -Bildung bei niedrigem pH verantwortlich, wie man anhand der Absorptionsspektren in Abbildung 3.13 sehen kann.

3. Das Biliverdin-Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV)

Die RR-Daten des P_{fr} -Zustandes von Cph1 und Agp1 (Remberg 1997, Borucki 2005) zeigen, dass der Chromophor in seiner protonierten kationischen Form vorliegt. Bei RR-Untersuchungen mit dem 114 kDa-Fragment des Erbsenphytochroms PhyA wurde anhand der Daten die Hypothese aufgestellt, dass der Chromophor bei der Meta- R_C -Bildung deprotoniert wird und auch in P_{fr} deprotoniert bleibt (Mizutani 1994). Die fehlende Ansäuerung bei begleitenden pH-Elektrodenmessungen wurde mit einer Gruppe erklärt, die das abgegebene Proton bei der P_{fr} Bildung wieder aufnimmt. Es gibt also unterschiedliche Interpretationen von RR-Daten, die ein einheitliches Bild verhindern. RR-Daten erlauben weiterhin nur eine bedingte Aussage darüber, ob es zur vollständigen oder zu einer partiellen Reprotonierung kommt. Bei ^{15}N -NMR-Messungen von Cph1, wird anhand der Verschiebungen davon ausgegangen, dass alle Pyrrolstickstoffe protoniert sind (Rohmer 2006). Würde in P_{fr} die Reprotonierung nur teilweise von statten gehen, müsste diese durch Aufspaltung der Peaks im NMR-Spektren zu sehen sein, was aber nicht der Fall ist. Deshalb scheint es plausibel, dass die Protonierung des Chromophors in P_{fr} vollständig ist. Demnach muss es einen Aminosäurerest geben, der eine Verschiebung seines pK-Wertes erfährt z.B. durch eine Konformationsänderung des Proteins.

Da an der P_{fr} -Bildung zumindest ein Protonentransferschritt beteiligt ist, war es umso überraschender, dass für die P_{fr} -Bildung sowohl bei Agp1 als auch bei Cph1 nur ein geringer H/D-Isotopeneffekt von 1,2 bzw. 1,3 (Remberg 1997, Borucki 2005) gefunden wurde. Solch eine Änderung der Kinetik deutet statt auf einen direkten Protonentransfer eher auf allgemeine Änderungen der Wechselwirkungen zwischen Protein und Lösungsmittel hin. Die starke pH-Abhängigkeit der Zeitkonstante des Überganges nach P_{fr} von Agp1 hingegen weist auf einen ratenbegrenzenden Protonentransferschritt hin. Dieser Konflikt lässt sich im Moment nicht auflösen. Allerdings deutet auch der Einfluss des H/D-Austausches auf die Amplitudenspektren und die pH-Abhängigkeit darauf hin, dass bei der P_{fr} -Bildung Protonen transferiert werden.

Für die Bildung des Meta- R_A -Zustandes wird bei Agp1 (Borucki 2005) und bei Cph1 (Remberg 1997) ein kinetischer Isotopeneffekt durch den H/D-Austausch gefunden. Die Größe des Effektes von 1,9 im Falle von Agp1 und 2,7 im Falle von Cph1 lassen auch für die Meta- R_A -Bildung einen Protonentransferschritt vermuten. Wie ein solcher Schritt aussieht ist bisher aber völlig unbekannt. Nach den bisherigen Daten, kann es sich dabei aber nur um einen Transfer von Protonen innerhalb der Proteinmatrix handeln. Bei pflanzlichem Phytochrom wurde für den Lumi-R Zerfall ein Wert von 1,2 gefunden, was eher auf Umlagerungen von Wasserstoffbrücken hinweist (Aramendia 1987). Noch komplizierter wird die Lage, wenn man die Kinetik der Protonenabgabe der kovalenten PCB- und PΦB-Addukte der Agp1 Mutante V249C betrachtet (nicht gezeigt). In beiden Fällen wurde qualitativ die Abgabe von einem Proton ins Medium beobachtet, die in etwa mit der Bildung von Meta- R_C korrelieren (persönliche Mitteilung von Berthold Borucki). Auf diese Abgabe wurde aber, anders als beim BV-Addukt und bei Cph1, keine Wiederaufnahme gemessen. Da bisher keinen RR-Daten dieser Addukte vorliegen, kann über den Protonierungszustand des Chromophors im Augenblick nur spekuliert werden, es ist aber wahrscheinlich, dass der Chromophor sowohl in der P_r - als auch in der P_{fr} -Form dieser beiden Addukte in der protonierten Form vorliegt. Die wahrscheinlichste Erklärung für die fehlende Wiederaufnahme des Protons ist, dass der pK-Wert der Gruppe die das Proton bei der P_{fr} -Bildung aufnimmt vom BV-Addukt abweicht.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es bei Agp1-FL-BV zu einer transienten Abgabe von Protonen ins Medium kommt. Diese ist mit der Meta- R_C -Bildung gekoppelt und mit der anschließenden P_{fr} -Bildung erfolgt eine Reprotonierung des Chromophors, wobei es zur teilweisen Wiederaufnahme des vorher abgegebenen Protons kommt. Da auch bei Cph1 ähnliche Effekte gefunden werden, kann davon ausgegangen werden, dass das bei Agp1 gefundene Muster charakteristisch für die P_r/P_{fr} -Photokonversion von Phytochromen allgemein ist.