

4. Einfluss bestimmter Regionen des Proteins auf die P_r/P_{fr}-Photokonversion von Agp1

Die Z/E-Isomerisierung der C15-Doppelbindung des Chromophors zieht neben Konformations- und Konfigurationsänderungen des Chromophors auch strukturelle Veränderungen im Protein nach sich. Um näheren Aufschluss über den Einfluss verschiedener Domänen und Abschnitte des Proteins auf diese Änderungen zu erhalten, wurde in der Arbeitsgruppe von Tilman Lamparter verschiedene verkürzte Varianten von Agp1 hergestellt und mit dem Chromophor BV assembliert. In Abbildung 4.1 ist eine vollständige Übersicht aller Konstrukte dargestellt.

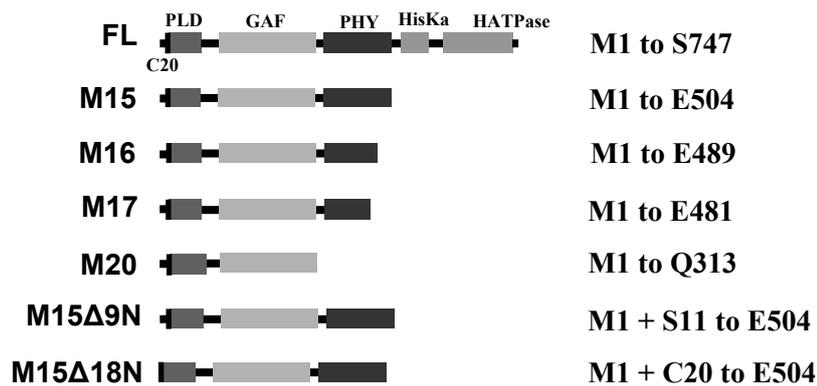


Abbildung 4.1: Nomenklatur und Domänenstruktur von Agp1 und den verkürzten Fragmenten

Alle Proteine wurden mit einem N-terminalen-6-Histidintag für die Reinigung mittels der Affinitätschromatographie exprimiert. FL bezeichnet das vollständige Agp1-Protein. Der von den verkürzten Fragmenten abgedeckte Bereich an Aminosäuren ist auf der rechten Seite der Abbildung angegeben. Die erste und letzte Aminosäure sind durch ihre Buchstabenkennung bezeichnet und die Zahlen geben die Position der Aminosäure innerhalb der Sequenz des vollständigen Proteins an.

Die Bezeichnung der jeweiligen Fragmente entstammt aus dem Labor von Tilmann Lamparter und wurde der Einfachheit halber beibehalten. Bei M15 wurde die C-terminale Histidinkinase, die für die Signalübertragung zuständig sein soll, entfernt, während alle Domänen des Chromophor Moduls erhalten bleiben. Von diesem Konstrukt kann man Aussagen über den Einfluss der Histidinkinase auf die Kinetik und anderer spektraler Eigenschaften gewinnen. Das M20-Fragment enthält nur noch die PLD- und GAF-Domäne, womit es dem Fragment des *Deinococcus radiodurans* Phytochrom DrBphP (Wagner 2005) und des *Rhodospseudomonas palustris* Phytochroms RpBphP3 (Yang 2007) entspricht, von denen die Kristallstrukturen gelöst wurden. Um die Bedeutung der ersten N-terminalen Aminosäuren zu untersuchen wurden die beiden Konstrukte M15Δ9N und M15Δ18N verwendet. Dem Konstrukt M15Δ18N fehlen alle Aminosäuren, die in der Sequenz vor dem für die kovalente Verknüpfung des Chromophors notwendige Cysteinrest liegen, außer dem für die Translation notwendigen Methioninrest. Die Expression und Löslichkeit einiger Fragmente war so gering, dass sie für eine weitere Untersuchung nicht in Frage kamen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit nur die Konstrukte M15, M20 und M15Δ18N untersucht.

4.1 Agp1-M15-BV: Einfluss der Histidinkinase

Dem Fragment M15 fehlt die für die Signaltransduktion notwendige Histidinkinase. Das Chromophor-Modul (bestehend aus PLD-, GAF- und PHY-Domäne), das laut den gelösten

Kristallstrukturen (Wagner 2005; Yang 2007) den Chromophor umschließt und das für die photochromen Eigenschaften zuständig ist, ist vollständig. Durch die lichtinduzierte Isomerisation wird jedoch eine Reaktionskaskade in Gang gesetzt, in Folge dessen auch die Konformation der Histidinkinase eine Änderung erfährt (Noack 2007). Aus diesem Grund sind spektrale Änderungen und vor allem Änderungen bei der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion bei M15-BV im Vergleich zum vollständigen Agp1 Protein (das ab hier die Bezeichnung FL erhält) nicht auszuschließen.

Wie schon beim FL-BV wurden Absorptionsspektren von M15-BV bei pH 7,8 in 20 mM Tris und bei 20°C aufgenommen. Die Spektren nach sättigender roter (P_{fr} , LED 680 nm) und dunkelroter Beleuchtung (P_r , LD 785nm) von M15-BV sind, was Verlauf und Lage der Absorptionsmaxima angeht, nahezu identisch mit denen von FL (Abbildung 4.2).

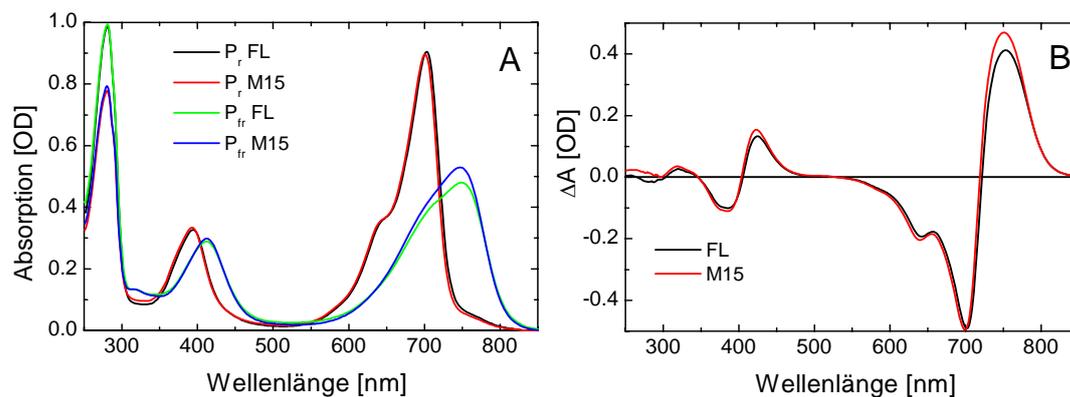


Abbildung 4.2: Absorptions- und Differenzspektren von Agp1-M15-BV

Absorptionsspektren (A) und die P_{fr} - P_r -Differenzspektren (B) von FL-BV und von M15-BV Mit P_r sind die Spektren nach sättigender dunkelroter Beleuchtung (LD 785 nm) und mit P_{fr} die Spektren nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680) bezeichnet. Bedingungen: 20°C, pH 7,8 und 20 mM Tris.

Wie zu erwarten war, geht das Verhältnis von Q-Bande (701 nm) und der Proteinbande (280nm) bei M15-BV zurück, wobei die Abnahme der Absorption bei 280 nm in etwa der Differenzen der Tryptophane und Tyrosine im Protein entspricht. Die Oszillatorstärke der P_{fr} -Form von M15-BV scheint etwas größer zu sein als beim FL, wie auch anhand des Differenzspektrums zu sehen ist. Die Skalierung erfolgte willkürlich anhand der Absorption der Q-Bande. Zurzeit kann nicht gesagt werden, ob der P_r - oder der P_{fr} -Zustand oder sogar beide einen veränderten Extinktionskoeffizienten im Vergleich zum FL besitzen. Auf jeden Fall gibt es hier einen Einfluss der Histidinkinase auf die Spektren. Quantität und Qualität dieses Einflusses können zurzeit nicht exakt bestimmt werden.

Die CD-Spektren der rot und dunkelrot beleuchteten Zustände wurden analog zu denen des FL aufgenommen. Qualitativ sahen die aufgenommenen CD-Spektren wie die des FL aus (nicht gezeigt). Auch bei M15-BV wurde nach roter Beleuchtung kein Vorzeichenwechsel in der Q-Bande des CD-Spektrums gefunden. Bei einem direkten Vergleich, bei dem die skalierten Spektren übereinander gelegt wurden, zeigte es sich, dass die CD-Spektren beider Zustände von M15-BV und FL was Rotationsstärke und Verhältnis der Bande zueinander nahezu identisch sind (nicht gezeigt). Anders als bei den Absorptionsspektren scheint sich die Histidinkinase bei den CD-Spektren nicht auszuwirken, so dass man sagen kann, dass die Stereochemie des Chromophors in FL und M15-BV für P_r und P_{fr} identisch ist.

Analog zu Kap. 3.3 wurde die Kinetik der P_r/P_{fr}-Photokonversion von M15-BV untersucht. Der Verlauf der Absorptionsänderungen bei den jeweiligen Wellenlängen entsprach denen des FL. Die SVD-Analyse ergab wie bei FL drei Komponenten, deren Zeitkonstanten aus dem globalen Fit mit $\tau_1=260 \mu\text{s}$, $\tau_2=2,7 \text{ ms}$, $\tau_3=210 \text{ ms}$ (FL: $\tau_1=230 \mu\text{s}$, $\tau_2=3,1 \text{ ms}$, $\tau_3=290 \text{ ms}$) bestimmt wurden. Im Großen und Ganzen stimmen die Zeiten von M15-BV und FL überein, nur die P_{fr}-Bildung ist bei M15 etwas schneller. Ob dieser Unterschied allerdings relevant ist, ist im Moment nicht klar. Bei den berechneten Amplitudenspektren von M15-BV können weder im Verlauf noch bei den Verhältnissen der Amplituden zueinander Abweichungen zu FL beobachtet werden (nicht gezeigt). Wie schon beim FL stimmen das extrapolierte Endspektrum B₀ und das skalierte P_{fr}/P_r-Differenzspektrum der begleitenden Absorptionsmessungen gut überein. Die Kinetik der P_r/P_{fr}-Photokonversion scheint also nur minimal durch die Histidinkinase beeinflusst zu sein, und es werden bei M15-BV wohl dieselben Intermediate mit den gleich spektralen Charakteristika durchlaufen werden wie beim FL.

Beim FL war die transiente Protonenabgabe ins Medium während der P_r-/P_{fr}-Photokonversion ein charakteristisches Merkmal. Aus diesem Grund wurde auch bei M15-BV analog zu FL (Kap. 3.5.1) das transiente Protonensignal einer ungepufferten M15-BV Probe bei pH 7,8 mit Hilfe des pH-Indikators Kresolrot gemessen. Auch bei M15 wird ein vergleichbares Protonensignal gefunden (Abbildung 4.3).

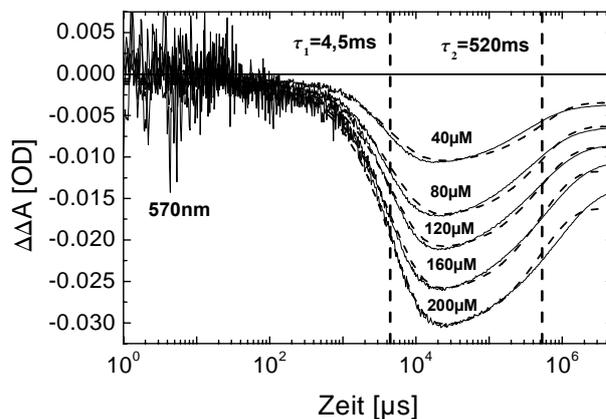


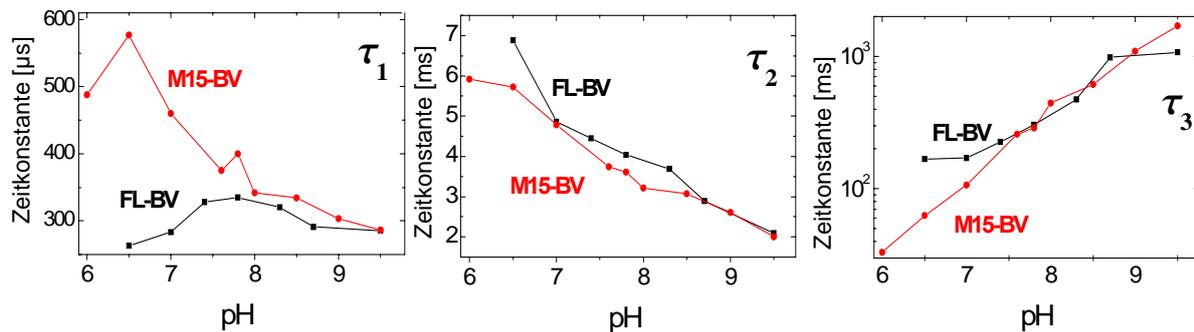
Abbildung 4.3: Farbstoffsignal bei 570nm von Kresolrot

Die auf die Proteinkonzentration korrigierten transienten Absorptionsänderungen des Farbstoffs Kresolrot bei 570 nm bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen der P_r-/P_{fr} Photokonversion von M15-BV (17,2 μM) bei pH 7,8, 20°C und 50 mM NaCl. Der Fit wird durch gestrichelte Kurven (lila) dargestellt und die vertikalen gestrichelten Linien geben die Zeitkonstanten des Fits an.

Die Protonenabgabe erfolgt mit einer Zeit von 4,5 ms und die Aufnahme mit 520 ms. Beide Zeiten stimmen in etwa mit den Zeiten des zweiten und dritten Überganges des Proteins, die bei den gleichen Bedingungen gemessen wurden, überein (Daten nicht gezeigt). Für die Stöchiometrie der maximalen Protonenabgabe wurde das korrigierte Farbstoffsignal verwendet. Für $\Delta A(\lambda_{\text{Dye}}, f \rightarrow \infty)$ wurden 58,5 mOD ermittelt und mit $\epsilon_{\text{Dye}}(570 \text{ nm}) = 50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{Agp1}}(750 \text{ nm}) = 50.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und $\Delta A_{\text{meas}}(750 \text{ nm}, 5 \text{ s}) = 65 \text{ mOD}$ ergab sich ein Wert von $0,9 \pm 0,1$ Protonen pro konvertiertem Molekül M15-BV. Beim FL betrug die Amplitude der Wiederaufnahme etwa ein Drittel. Bei M15-BV hingegen wurden circa 55 Prozent der vorher abgegebenen Protonen wieder aufgenommen. Dies bedeutet, dass die Histidinkinase einen direkten Einfluss auf die Wiederaufnahmegruppe hat.

Wie bei FL wurde bei M15 ebenfalls die pH-Abhängigkeit der Kinetik der P_r-/P_{fr}-Photokonversion untersucht. Anders als beim FL wurden die Messungen alle mit einer Probe angefertigt. Dazu wurde der pH-Wert der ungepufferten Lösung (50 mM NaCl) jeweils durch Zugabe von HCl bzw. KOH eingestellt. Bei jedem pH-Wert wurde die Kinetik nach Laseranregung

bei 695 nm bei zehn verschiedenen Wellenlängen gemessen. Die gemessenen Zeitspuren wurden dann simultan gefittet. Aufgrund der geringen Datenmenge wurde auf die SVD-



Analyse verzichtet. Die pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten ergab für M15-BV ein ähnliches Bild wie beim FL (Abbildung 4.4).

Abbildung 4.4: pH-Abhängigkeit der Raten der P_r/P_{fr} -Photokonversion

Darstellung der Zeitkonstanten der P_r/P_{fr} -Photokonversion von FL-BV (FL) (schwarz) und M15-BV (rot) τ_1 , τ_2 und τ_3 . Die Werte für M15-BV wurden durch einen simultanen Fit von zehn Zeitspuren bei verschiedenen Wellenlänge ermittelt. Die Werte für FL resultieren aus der SVD-Zerlegung und dem Fit der Zeitspuren $V_i(t)$ mit drei Exponentialfunktionen. Bedingungen: FL: 20 mM Tris; M15: 50 mM NaCl.

Die pH-Abhängigkeit der Zeitkonstanten des zweiten (τ_2) und dritten (τ_3) Überganges von M15-BV ist nahezu identisch mit denen von FL (Abbildung 4.4). Einzig beim ersten Übergang wird ein Unterschied in der pH-Abhängigkeit zwischen M15-BV und FL gefunden. Während beim FL mit steigendem pH die Zeitkonstante erst größer und ab pH 7,8 wieder abnimmt (Abbildung 4.4 A), nimmt die Zeitkonstante von M15-BV mit steigendem pH-Wert kontinuierlich ab. Begleitend zu den zeitaufgelösten Messungen wurden bei jedem pH-Wert vor den transienten Messungen die Absorptionsspektren nach roter und dunkelroter Beleuchtung gemessen.

In Abbildung 4.5 sind die Spektren bei den verschiedenen pH-Werten nach dunkelroter und roter Beleuchtung dargestellt. Insgesamt kann für den P_r -Zustand in der Q-Bande eine Abnahme der Absorption ab etwa pH 8,5 beobachtet werden.

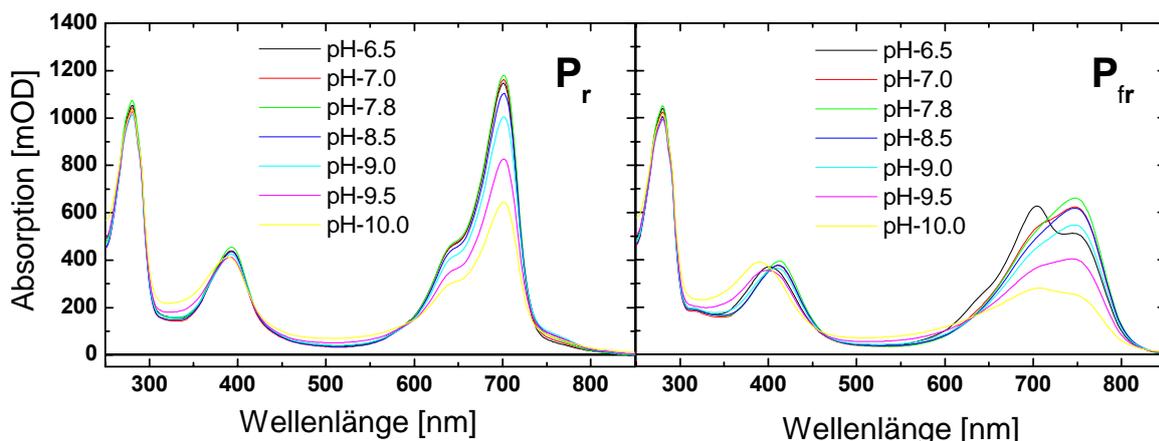


Abbildung 4.5: pH-Abhängigkeit der Absorptionsspektren von M15-BV

Die Spektren auf der linken Seite (P_r) wurden bei den in der Legende angegebenen pH-Werten nach sättigender dunkelroter Beleuchtung (LD 785 nm) aufgenommen und die auf rechten Seite nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680 nm). Bedingungen: 50 mM NaCl

Bei den Spektren nach roter Beleuchtung können zwei Trends beobachtet werden. Bei niedrigem pH nimmt der gebildete P_{fr} -Anteil immer mehr ab, wie man anhand der Abnahme der Absorption bei 750nm und der Zunahme der Absorption bei 700 nm erkennen kann. Bei hohem pH-Wert nimmt wie beim P_r -Zustand die Oszillatorstärke ab. Beim FL (Kap. 3.6) wurden bei den Absorptionsspektren des P_{fr} -Zustandes ähnliche pH-Abhängigkeiten gefunden, während für den P_r -Zustand keine pH-Abhängigkeiten gefunden wurden. Da die Messungen beim FL in gepufferten Lösungen gemacht wurden, kann es sein das der Puffer stabilisierend wirkt. Die gefundene Abnahme in der Absorption bei M15 könnte also lediglich eine Ausbleichung durch die Blitzlichtphotolyse sein. Um dies auszuschließen, wurde die pH-Abhängigkeit einer frischen Probe in einer ungepufferten Lösung im Dunkeln, also dem P_r -Zustand gemessen. Dazu wurde die Lösung zunächst auf den pH 6,4 eingestellt. Jeder weitere pH-Wert wurde durch die Titration mit einer Zehn-Millimolaren KOH-Lösung eingestellt und anschließend ein Spektrum aufgenommen. Wie Abbildung 4.6 zeigt wurde auch unter diesen Bedingungen eine Abnahme der Absorption in der Q-Bande bei steigendem pH-Wert gefunden.

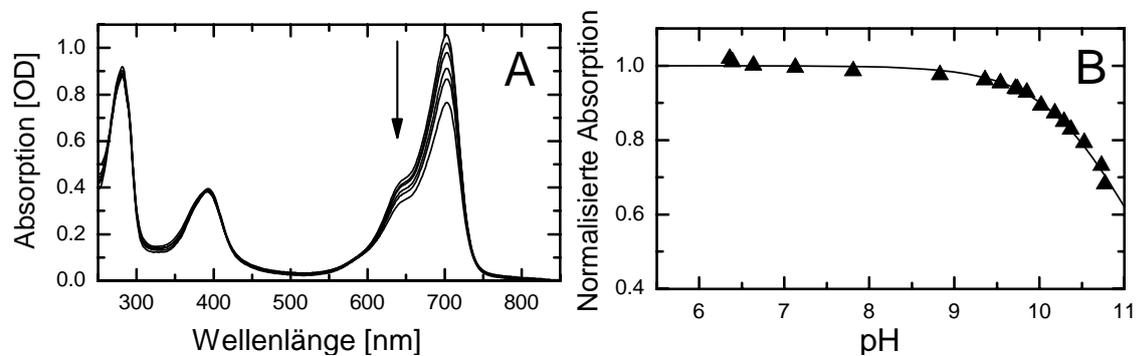


Abbildung 4.6: pH-Abhängigkeit der Q-Bande von M15-BV

(A) Absorptionsspektren von M15-BV bei den pH-Werten 6,4; 8,6; 9,8; 10,2; 10,4 und 10,8. Die Messungen erfolgten in einer ungepufferten Probe mit 50mM NaCl. Alle Arbeiten wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, so dass es zu keinen Artefakten durch die Photokonversion kommen konnte. Die pH-Werte wurden durch Titration von 10mM KOH eingestellt. Der Pfeil zeigt die Absorptionsabnahme an bei steigendem pH-Wert an.

(B) Titrationskurve von M15-BV, wobei die normalisierte Absorption des λ_{max} Wertes der Q-Bande gegen den pH-Wert aufgetragen wurde. Die normalisierte Absorption bei hohem pH wurde auf 0,2 gestellt. Der Fit mit einer Henderson-Hasselbalch Gleichung ergab einen pK Wert von 11,1.

Da die Protonierung des Chromophors zu einer höheren Oszillatorstärke führt und die Protonenkonzentration bei hohem pH-Wert laut Definition am geringsten ist, könnte dieses Verhalten auf eine Deprotonierung des Chromophors hindeuten. Aus diesem Grund wurde die Absorption als Funktion des pH-Wertes aufgetragen (Abbildung 4.6 B). Der anschließende Fit mit einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 2.62) ergab den pK-Wert von 11,1. Bei derselben Vorgehensweise wurden für die Absorptionsspektren von Abbildung 4.5 für den P_r -Zustand ein pK-Wert von 9,5 und für den P_{fr} -Zustand ein Wert von 9,7 ermittelt. Die Diskrepanz zwischen den beiden pK-Werten von 9,5 bis 11,1 könnte wie oben schon erwähnt an einer Ausbleichung durch die Blitzlichtphotolyse liegen, wodurch die Absorptionswerte schneller abfallen als bei der Probe die keinem Licht ausgesetzt war.

Insgesamt wurden zwischen M15 und dem FL einige Änderungen in den Spektren und der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion gefunden. Die gefundenen Abweichungen sind aber so gering, dass man wohl davon ausgehen kann, dass sich M15 und FL spektral und kinetisch nahezu gleich verhalten.

4.2 Agp1-M20-BV: Einfluss der PHY-Domäne

Wie oben schon erwähnt besteht das Fragment M20 nur noch aus der PLD- und GAF-Domäne des Chromophor Moduls (Abbildung 4.1). Im Vergleich zu M15 fehlt M20 also die PHY-Domäne, die ein Bestandteil des Chromophor Moduls ist, weshalb Auswirkungen auf die photochromen Eigenschaften zu erwarten sind. Mit dem Fragment M20 kann der Einfluss der PHY-Domäne auf die spektroskopischen Eigenschaften und die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion untersucht werden. M20 ist weiterhin von besonderem Interesse, da die Phytochromfragmente, die für die Lösung der Kristallstrukturen des *Deinococcus radiodurans* Phytochrom DrBphP (Wagner 2005) und des *Rhodospseudomonas palustris* Phytochroms RpBphP3 (Yang 2007) verwendet wurden, ebenfalls nur aus der PLD- und GAF-Domäne bestanden.

Für ein möglichst einheitliches Bild und um die entsprechenden Spektren gut mit einander vergleichen zu können, wurden die Standardmessungen alle in einer 20 mM Tris Lösung bei pH 7,8 und $T=20^\circ\text{C}$ angefertigt. Weiterhin wurden die Spektren von M20-BV, ab hier mit M20 bezeichnet, in Abbildung 4.7 skaliert. Die Absorption bei 280 nm setzt sich vorwiegend aus der Absorption der Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) zusammen, wobei der Extinktionskoeffizient von Tryptophan etwa viermal so groß ist wie der von Tyrosin. Aufgrund der Häufigkeit der beiden Aminosäuren sollte die Absorption von M20 etwa 44 Prozent der von M15 bei 280 nm ausmachen. Die Skalierung der Absorptionsspektren in Abbildung 4.7 von M20 erfolgte auf Grundlage dieser Extrapolation.

Der nach der Dunkelassembly von M20 mit BV erhaltene Zustand ähnelt spektral dem P_r -Zustand von M15-BV (ab hier mit M15 bezeichnet) und dem von FL (Abbildung 4.7 A). Das Absorptionsmaximum der Q-Bande liegt bei 701 nm, die Q-Bande weist aber eine erheblich geringere Oszillatorstärke auf wie die von M15. Weiterhin ist das Verhältnis von Q- und Soret-Bande bei M20 (1,7) im Vergleich zu M15 und FL (2,7) reduziert (Abbildung 4.7). Da bei der Assembly die Oszillatorstärke aus der Soret-Bande in die Q-Bande transferiert wird, ist das reduzierte Verhältnis ein Anzeichen dafür, dass die Interaktionen des Chromophors BV mit der Bindungstasche bei M20 im Vergleich zu M15 und FL verändert sind. Nichts desto Trotz wird bei der Assembly von M20 mit BV im Dunkeln ein Addukt gebildet, dass der P_r -Form von M15 und des FL sehr ähnelt.

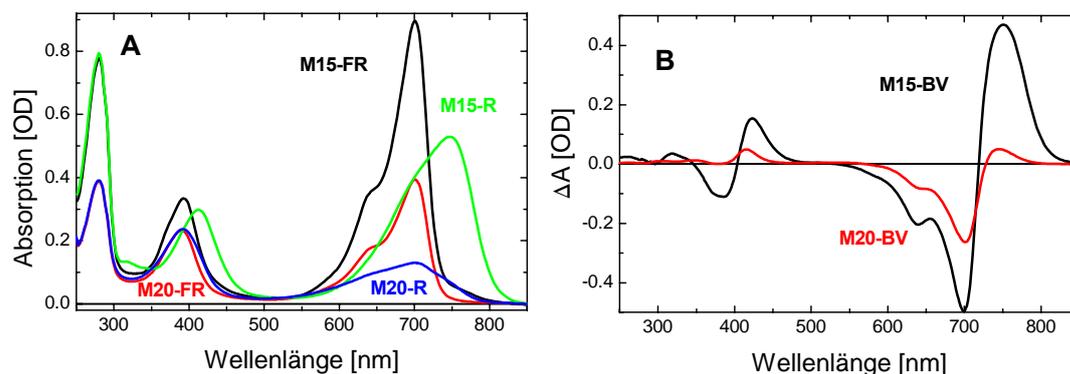


Abbildung 4.7: Absorptionsspektren (A) und P_{fr} - P_r -Differenzspektren (B) von M15 und M20-BV
Die Spektren wurden bei pH 7,8 in 20 mM Tris angefertigt. FR bezeichnet den Zustand nach sättigender dunkelroter Beleuchtung (LD 785 nm) oder im Fall von M20-BV den unbeleuchteten Zustand. Mit R sind die Zustände nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680 nm) beschrieben.

Das Spektrum nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680 nm) von M20 hingegen weicht stark von den P_{fr} -Spektren des FL und von M15 ab. Wie bei M15 nimmt die Absorption im

Bereich um 700 nm ab nimmt aber im langwelligen Bereich um 750 nm nur unwesentlich zu (Abbildung 4.7 B). Weiterhin ist die Soretbande nicht wie bei M15 langwellig verschoben (400nm \rightarrow 415nm), sondern es kommt lediglich zu einer Zunahme in der Absorption an der rechten Flanke der Soretbande (Abbildung 4.7. A, B).

Die CD-Spektren von M20 wurden analog zu den CD-Spektren von M15 und dem FL angefertigt mit dem Unterschied, dass in diesem Fall statt Tris-Puffer Natrium-Phosphat-Puffer (NaPP) verwendet wurde. Das CD-Spektrum des Dunkelzustandes ähnelt dem CD-Spektrum des P_r -Zustandes von M15 (Abbildung 4.8). Lediglich das Verhältnis der Rotationsstärke der Soret- zur Q-Bande ist zugunsten der Soret-Bande verschoben, wie dies auch schon bei den Absorptionsspektren beobachtet werden konnte.

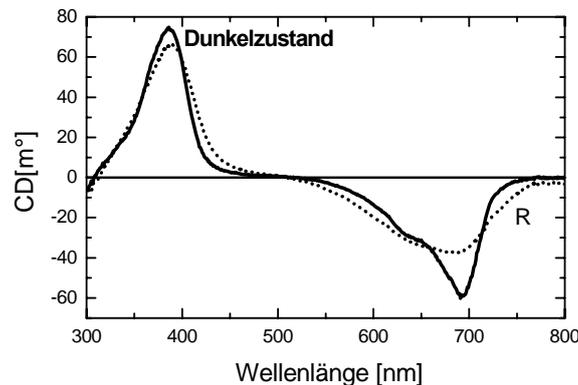


Abbildung 4.8: CD-Spektren von M20-BV des Dunkelzustandes (durchgezogene Linie) und nach roter Beleuchtung (R-gestrichelt) bei pH 7,8 in 10mM NaPP und einer Schichtdicke von einem cm

Das CD-Spektrum von M20 nach sättigender roter Beleuchtung entspricht nicht dem CD-Spektrum des P_{fr} -Zustandes von M15. Die Rotationsstärke der Soret-Bande nimmt im Vergleich zu M15 nur minimal ab und ist wie bei den Absorptionsspektren nur ein wenig langwellig verschoben. In der Q-Bande nimmt das Signal bei 700 nm ab und nimmt gleichzeitig an den Flanken leicht zu, was zu einer breiteren Bande führt. Damit ähnelt das CD-Spektrum dem des Photoproduktes der H250A -Punktmutante von Agp1 (Kap. 6). Auf jeden Fall weist der Zustand nach roter Beleuchtung von M20 im CD-Spektrum keine Ähnlichkeiten zu dem des P_{fr} -Zustandes des FL und von M15 auf.

Trotz entfernen der PHY-Domäne wird bei der Assemblierung mit BV ein Zustand gebildet, der der P_r -Form von M15 sehr stark ähnelt. Bei roter Beleuchtung hingegen wird ein Photoprodukt gebildet, dessen Absorptionsspektrum und CD-Spektrum stark von denen des P_{fr} -Zustand von M15 abweichen. Aus diesem Grund ist auch für die Kinetik nach Anregung bei 695 nm ein Unterschied im Vergleich zu M15 zu erwarten.

Wie bei M15 und dem FL wurde die Kinetik bei 35 Wellenlängen gemessen. Die Anregung erfolgte bei 640 nm mit dem Farbstoff DCM. Die Verwendung des Farbstoffes DMC anstelle von Pyridin 1 hatte keinerlei Auswirkung auf die Kinetik, was anhand von einer M15-Probe überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Da M20 durch dunkelrotes Licht (LD 785 nm) in den Ausgangszustand zurück konvertiert werden konnte, setzt sich jede Zeitspur aus zehn Laseranregungen pro Wellenlänge zusammen.

In Abbildung 4.9 sind die Zeitspuren bei 700 nm, 725 nm und 750 nm im Vergleich mit den Zeitspuren von M15 dargestellt. Der Vergleich der Zeitspuren bei 700, 725 und 750 nm von

M20 mit denen von M15 zeigt, dass es erhebliche Unterschiede bei den transienten Absorptionsänderungen der beiden Fragmente gibt. Die 700 nm Zeitspur (Abbildung 4.9 A) weist die meisten Gemeinsamkeiten mit M15 auf. Erst kommt es zu einer Abnahme, die in zwei Phasen erfolgt, wobei die Gesamtamplitude aber kleiner ist als bei M15. Bei ungefähr 50 ms kommt es dann zu einer Zunahme, wobei der Übergang wesentlich früher erfolgt als bei M15 (210 ms). Wie schon beim FL in Kap. 3.3 beschrieben ist die Abnahme ab etwa 100 ms ein Messlichtartefakt.

Bei 725 nm (Abb. 4.9 B) kommt es mit etwa 60 μ s zu einem Anstieg auf den bei etwa fünf ms ein Abnahme folgt, der unterhalb der Nulllinie geht. Wie bei 700 nm kommt es dann bei etwa 50 ms zu einem geringen Anstieg. Insgesamt weichen die Absorptionsänderungen bei 725 nm erheblich von denen von M15 ab. Die 750 nm Zeitspur (Abbildung 4.9 C) verzeichnet bei 60 μ s einen Anstieg auf den bei zwei bis drei ms ein Abfall folgt, der bei M15 nicht beobachtet werden kann. Ab 50 ms hingegen gibt es bei 750 nm keine Änderungen mehr. Betrachtet man die spektralen Änderungen der verschiedenen Wellenlänge zusammen, gibt es nicht nur erhebliche Unterschiede im Vergleich zum FL und M15, sondern es ist auch nicht auszumachen, ob bei M20 eines der Intermediate der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion des FL und M15 durchlaufen wird.

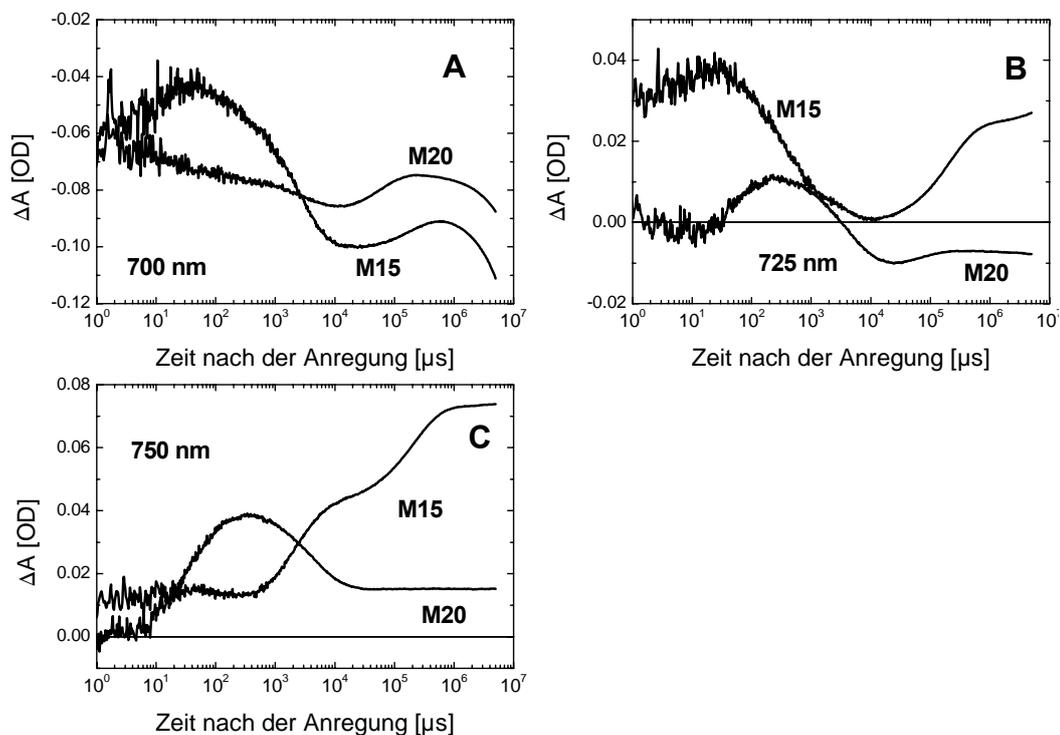


Abbildung 4.9: Zeitspuren von M15 und M20 bei 700 nm (A), 725 nm (B) und 750 nm (C)

Alle Zeitspuren wurden bei $T=20^\circ\text{C}$, bei einem pH von 7,8 und mit 20 mM Tris aufgenommen. M15 wurde bei 695 nm mit dem Farbstoff Pyridin1 angeregt und M20-BV bei 640 nm mit dem Farbstoff DMC (Radiant Dyes, Wermelskirchen).

Die SVD Zerlegung führte zu drei Komponenten. Der globale Fit der Zeitspuren $s_i V_i(t)$ ergab die drei Zeitkonstanten $\tau_1=66 \mu\text{s}$, $\tau_2=4,1 \text{ ms}$ und $\tau_3=48 \text{ ms}$. Die extrapolierten Amplitudenspektren (Abbildung 4.10) zeigen dann auch deutlich die Besonderheiten von M20.

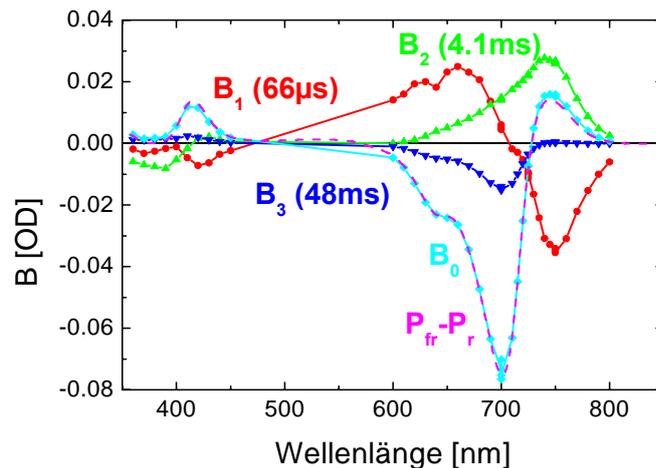


Abbildung 4.10: Amplitudenspektren von M20 bei pH 7,8, T=20°C und 20 mM Tris

B_1 bis B_3 sind die Amplitudenspektren der Übergänge τ_1 - τ_3 : B_0 ist das extrapolierte Endspektrum und die gestrichelte lila Kurve ist das skalierte Differenzspektrum der stationären Messungen.

Das Amplitudenspektrum der 66 μ s Komponente ist in etwa vergleichbar mit dem der $Meta-R_C$ -Bildung von M15 ($\tau_2=2,7$ ms), wobei die Senke bei 640 nm auf einen Artefakt des Anregungslasers hindeutet, der bei 640 nm emittiert. Die zweite und dritte Komponente von M20-BV ähneln keinem der Amplitudenspektren von M15 (Abbildung 3.5). Bei der zweiten Komponente mit der Übergangszeit von 4,1 ms, nimmt die Absorption im langwelligen Bereich ab, wobei die Form dieser Amplitude an das P_{fr} Spektrum von M15 und FL erinnert. Die dritte Komponente hingegen weist eine geringe Zunahme bei 700 nm auf, also im Bereich des P_r -Zustandes.

Aufgrund der großen Unterschiede in der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion zwischen M20 und FL/M15 war es interessant, ob es auch bei M20 nach Anregung im roten Spektralbereich zu der bei FL und M15 charakteristischen Protonenabgabe und Wiederaufnahme kommt. Aus diesem Grund wurde analog zu FL und M15 die Änderung des Protonierungszustandes des Farbstoffes Kresolrot nach Anregung bei 640 nm einer ungepufferten M20-Lösung gemessen. In Abbildung 4.11 sind die reinen Farbstoffsignale bei unterschiedlicher Farbstoffkonzentration dargestellt.

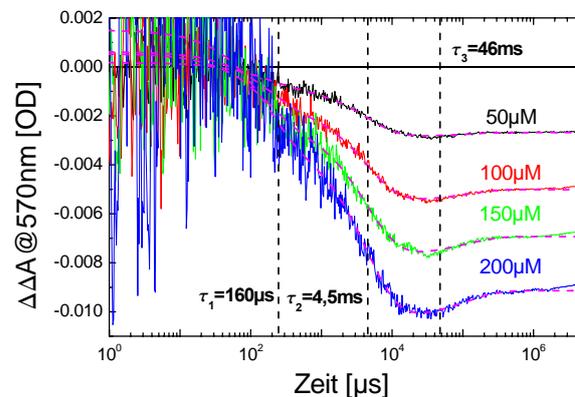


Abbildung 4.11: Farbstoffsignal bei 570nm von Kresolrot

Die auf die Proteinkonzentration korrigierten transienten Absorptionsänderungen des Farbstoffes Kresolrot bei 570 nm bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen nach Anregung bei 640 nm von M20-BV (17,2 μ M) bei pH-7,8, 20°C und 50 mM NaCl. Der Fit wird durch gestrichelte Kurven (lila) dargestellt und die vertikalen gestrichelten Linien geben die Zeitkonstanten des Fits an.

Überraschenderweise wurde auch hier eine Protonenabgabe ins Medium gefunden. Der Fit des Farbstoffsignals ergab, dass die Protonenabgabe mit 160 μ s und 4,5 ms erfolgt. Mit 46 ms kommt es dann zu einer Protonenaufnahme, die aber nur etwa zehn Prozent der vorher abgegebenen Menge entspricht. Die Zeitkonstanten des Protonensignals korrelieren in etwa mit denen, die für die Übergänge ohne Farbstoff gefunden wurden. Allerdings erfolgt die Protonenabgabe anders als bei M15 in zwei Schritten, wobei die größte Protonenabgabe mit dem zweiten Übergang, zu dessen Amplitude es bei FL und M15 kein Analogon gibt, erfolgt.

Die Protonenaufnahme (46 ms) korreliert mit dem dritten Übergang der Kinetik (48 ms), und nach dem dazugehörigen Amplitudenspektrum dieser Komponente wird Oszillatorstärke im Bereich des P_r -Zustandes gebildet. Dies führt zu der Hypothese, dass es sich bei der dritten Komponente um eine Relaxationskomponente handelt, bei der das Protonierungsgleichgewicht des Chromophors wieder eingestellt wird. Eine Voraussetzung für diese Hypothese ist, dass der pK-Wert des Chromophors möglichst in der Nähe des pH-Wertes liegt, bei dem die Messungen gemacht wurden. Aus diesem Grund wurden analog zu M15 die Absorptionsspektren des P_r -Zustandes bei aufsteigendem pH-Wert im Dunkeln gemessen. In Abbildung 4.12 sind sowohl einige Spektren bei ausgewählten pH-Werten dargestellt (Abbildung 4.12 A), wie auch der Verlauf des Absorptionsmaximums der Q-Bande als Funktion des pH-Wertes (Abbildung 4.12 B). Die Absorption der Q-Bande nimmt mit steigendem pH-Wert ab und der Fit der Kurve in Abbildung 4.12 B mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 2.62) ergab einen pK-Wert von 8,8.

Dieser Wert liegt nahe genug am pH-Wert von 7,8, so dass vieles dafür spricht, dass es sich bei der letzten Komponente um eine Relaxationskomponente handelt.

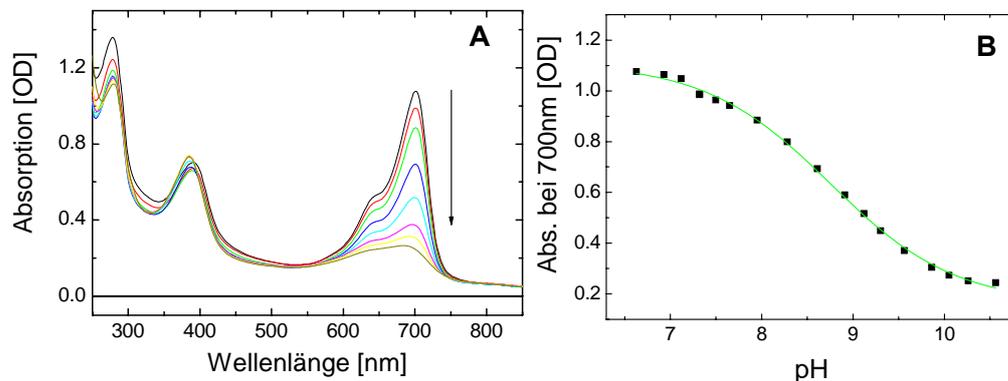


Abbildung 4.12: pH-Abhängigkeit der Absorption der Q-Bande

(A) Absorptionsspektren von M20-BV in 200 mM NaCl bei den pH-Werten 6,63; 7,32; 7,95; 8,61; 9,12; 9,56; 9,86 und 10,52. Die Richtung der Absorptionsänderung der Q-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

(B) Titrationskurve von M20-BV, wobei die normalisierte Absorption des λ_{\max} Wertes der Q-Bande gegen den pH-Wert aufgetragen wurde. Die normalisierte Absorption bei hohem pH wurde auf 0,2 gestellt. Der Fit mit der Henderson-Hasselbalch Gleichung ergab einen pK Wert von 8,8.

Weiterhin wurden Blitzlichtmessungen einer 200 mM NaCl Lösung von M20 ohne Puffer bei verschiedenen pH-Werten angefertigt. In Abbildung 4.13 sind einige 700 nm Zeitspuren der verschiedenen pH-Werten dargestellt. Die Zeitspuren wurden auf die gleiche Änderung nach 100 μ s skaliert, wodurch die relative Amplitude der Relaxationskomponente mit steigendem pH-Wert größer wird. Trägt man die Amplitude der Bleichung der dritten Amplitude gegen den pH-Wert auf, erhält man eine Henderson-Hasselbalch-Kurve, für die der pK-Wert mit 8,9 bestimmt wurde.

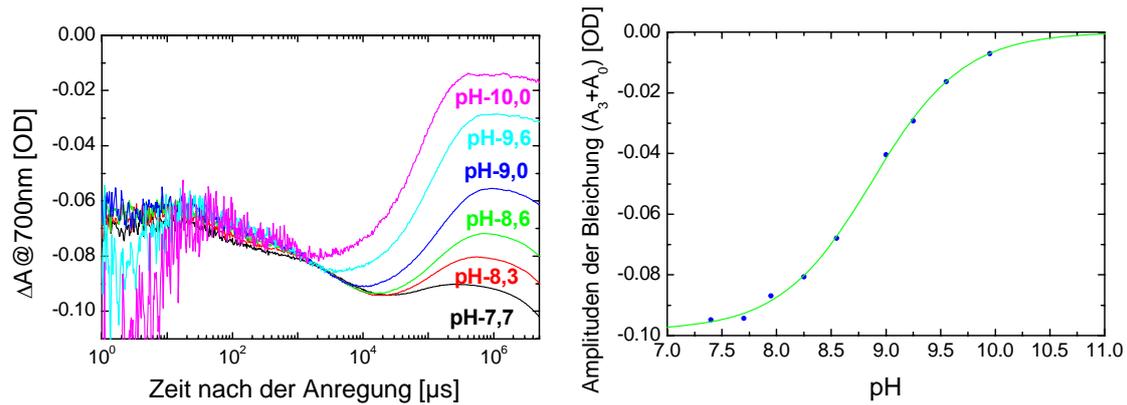


Abbildung 4.13: pH-Abhängigkeit der dritten Amplitude

(A) 700 nm Zeitspuren von M20-BV in einer 200mM NaCl Lösung bei den pH-Werten 7,7; 8,3; 8,6; 9,0; 9,6 und 10,0. Die Kurven wurden auf denselben Wert der Bleichung bei 100 μs skaliert.

(B) Auftragung der dritten Amplituden der Bleichung der 700 nm Zeitspuren gegen den pH-Wert. Der Fit mit der Henderson-Hasselbalch Gleichung ergab einen pK Wert von 8,9.

Mit zwei unabhängigen Experimenten wurde derselbe pK-Wert erhalten und in beiden Fällen sprechen die Ergebnisse dafür, dass der letzte Übergang der Kinetik nach roter Anregung von M20 einer Relaxationskomponente entspricht, bei der das durch die Blitzlichtanregung gestörte Protonierungsgleichgewicht des Chromophors wieder ausgeglichen wird.

Die hier angestellten Untersuchungen am Fragment M20 von Agp1 zeigten, dass die PHY-Domäne einen erheblichen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften von Agp1 hat. Während der im Dunkeln oder nach dunkelroter Beleuchtung gebildete Zustand bei allen durchgeführten Messungen eine geringere Oszillatorstärke aufwies, zeigten sich bei der Photokonversion nach roter Beleuchtung große Unterschiede zu der P_r/P_{fr} -Photokonversion von M15 und FL. Das heißt die PHY-Domäne ist an der P_{fr} -Bildung beteiligt und wird für die Ausbildung eines korrekten P_{fr} -Zustandes benötigt.

4.3 M15 Δ 18N: Einfluss der ersten 18 Aminosäuren

Um den Einfluss der Aminosäuren, die in der Sequenz vor dem für die kovalente Verknüpfung nötigen Cysteinrest liegen, zu untersuchen, wurden die verkürzten Varianten M15 Δ 9N und M15 Δ 18N von Agp1 im Labor der AG Lamparter exprimiert. Das Fragment M15 Δ 9N zeigte sowohl bei der Assemblierung mit BV als auch bei der Photokonversion, außer einer leicht verringerten Extinktion keine signifikanten Unterschiede zu FL und M15. Da die Aminosäuren 2-10 unter den Phytochromen auch nicht konserviert sind, wurde dieses Fragment im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Die Aminosäuren 11-19 hingegen sind unter den Phytochromen stärker konserviert. Die Assemblierung von M15 Δ 18N mit BV war mit 20 min dann auch im Vergleich zu FL und M15 (eine min) stark verlangsamt (Noack 2007), was auf eine Beteiligung der fehlenden N-terminalen 11-19 Aminosäuren bei der Assemblierung hindeutet. Das im Dunkeln assemblierte Addukt M15 Δ 18N-BV zeigt ein dem P_r -Zustand von FL vergleichbares Spektrum (Abbildung 4.14).

Der Vergleich mit M15 (Abbildung 4.14) zeigt das M15 Δ 18N-BV (ab hier mit Δ 18N bezeichnet) sowohl in der Soret- als auch in der Q-Bande eine wesentlich geringere Extinktion besitzt, was eventuell auf eine unvollständige Assemblierung hindeutet. Auch das Verhältnis von Q- zur Soret-Bande ist mit 1,7 geringer als das vom FL und M15 (\sim 2,7). Weiterhin ist die Soret-Bande im Vergleich zu M15 um etwa zehn bis 15 nm kurzweilig verschoben. Die bei-

den Banden im roten Spektralbereich sind bei M15-BV viel stärker getrennt als bei Δ 18N, was besonders gut im Differenzspektrum zu beobachten ist. Dies kann auf eine größere Bewegungsfreiheit des Chromophors hindeuten. Das würde bedeuten, dass der Chromophor in Δ 18N beweglicher ist als in M15. Nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680 nm) wird bei Δ 18N ein P_{fr} -ähnlicher Zustand gebildet (Abbildung 4.14 oben). Allerdings fällt die Absorption der P_{fr} -Bande im Vergleich zur P_r -Bande geringer aus als bei M15 und das Maximum der Bande ist im Vergleich zu M15 kurzwellig verschoben. Da sich das Spektrum nach roter Beleuchtung anteilig aus der P_r - und P_{fr} -Form zusammensetzt, kann diese Verschiebung auch durch einen höheren P_r -Anteil verursacht werden. Wie schon bei der P_r -Form von Δ 18N ist auch die Soret-Bande nach roter Beleuchtung um ca. 10 nm kurzwellig verschoben.

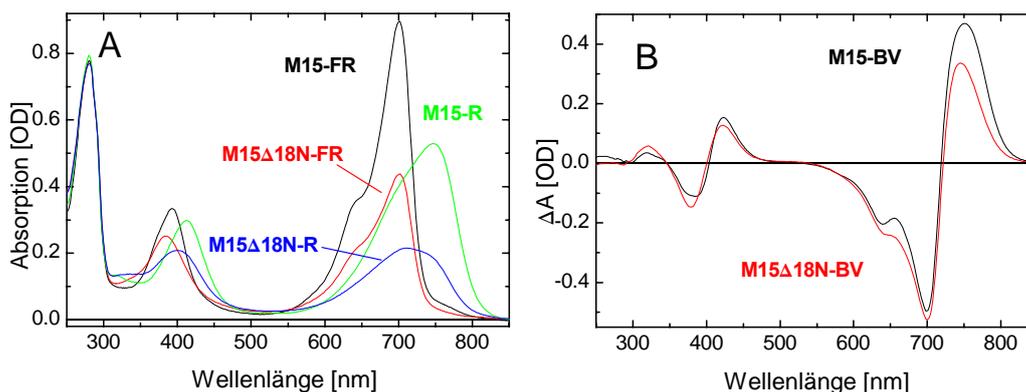


Abbildung 4.14: Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren von M15 und M15 Δ 18N
Absorptionsspektren (A) von M15 und M15 Δ 18N nach sättigender roter und dunkelroter Beleuchtung. Alle Spektren wurden auf dieselbe Absorption bei 280 nm skaliert. (B) Die entsprechenden P_{fr} - P_r -Differenzspektren, wobei die Differenzspektren so skaliert wurden, dass sie etwa dieselbe Differenz bei 700 nm aufweisen.

Ein ähnliches spektrales Verhalten wurde auch bei mit BV assemblierten M15 beobachtet, bei dem der Cysteinrest (C20) durch das Ellmans Reagenz (DTNB – 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) blockiert war (persönliche Mitteilung Berthold Borucki). Das heißt der BV Chromophor war nicht kovalent mit dem Chromophor verbunden. Diese Ähnlichkeit im spektralen Verhalten zum M15-DTNB-BV-Addukt und der Tatsache, dass die beiden Banden der Q-Bande verbreitert sind, also eine größere Beweglichkeit besitzen, führen zu der Hypothese, dass der Chromophor auch bei Δ 18N nicht kovalent mit dem Protein verknüpft sein könnte.

Um diese Hypothese zu testen, wurden die spektralen Eigenschaften und die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion der C20A Mutante von Agp1 auf Gemeinsamkeiten mit Δ 18N untersucht. Bei der Mutante C20A ist der Cysteinrest der Chromophorbindestelle durch einen Alanin ersetzt, weshalb der BV Chromophor nicht kovalent mit dem Protein verknüpft werden kann.

Die Spektren des BV-Adduktes der C20A-Mutante von FL zeigten im Vergleich mit FL die gleiche Abnahme der Extinktion wie sie zwischen M15 und Δ 18N gefunden wurde (nicht dargestellt). Der direkte Vergleich der Absorptionsspektren und der dazugehörigen Differenzspektren von FL-C20A-BV und Δ 18N (Abbildung 4.15) zeigt, dass die Spektren im Bereich der Q- und Soret-Bande nahezu identisch sind, was den Verdacht verstärkt, dass der Chromophor bei Δ 18N nicht kovalent verknüpft ist.

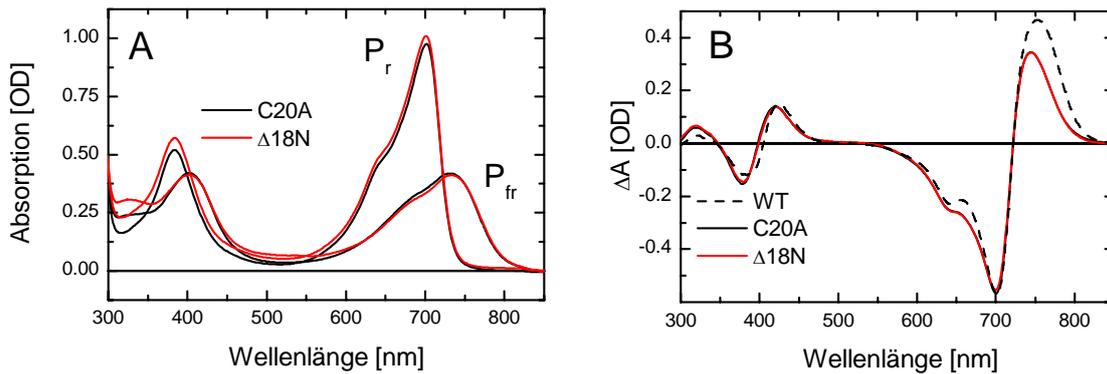


Abbildung 4.15: Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren von C20A und $\Delta 18N$
(A) Die auf die Absorption bei 700 nm skalierten Absorptionsspektren von FL-C20A-BV und M15- $\Delta 18N$ -BV des P_r - und P_{fr} -Zustandes.
(B) Differenzspektren des FL, C20A und $\Delta 18N$, die auf dieselbe Differenz bei 700 nm skaliert wurden. Bedingungen: FL und $\Delta 18N$: 20 mM Tris; pH 7,8; C20A: 20 mM Tris 50 mM NaCl pH 7,8.

Die CD-Spektren von $\Delta 18N$ (Abbildung 4.16) gleichen im Verlauf und Änderung nach roter Beleuchtung den CD-Spektren der P_r - und P_{fr} -Form des FL und M15. Bei der Rotationsstärke gibt es allerdings erhebliche Unterschiede. So beträgt die Rotationsstärke der P_r -Form von $\Delta 18N$ in der Soret-Bande nur etwa 66 Prozent von der von M15 und sogar nur 33 Prozent in der Q-Bande. Auch das Verhältnis von Q- zur Soret-Bande unterscheidet sich bei $\Delta 18N$ mit 1:2 erheblich im Vergleich zu M15-BV (1:1). Im CD-Spektrum das nach roter Beleuchtung von $\Delta 18N$ aufgenommen wurde, weist die Q-Bande ebenfalls eine geringere Rotationsstärke auf. Im Vergleich zu M15 ist die Bande bei 370 nm größer als bei 430 nm, was darauf hindeutet, dass bei $\Delta 18N$ weniger P_{fr} gebildet wird als bei M15.

Wie die auf dieselbe Absorption bei 700 nm skalierten CD Spektren von FL-C20A-BV und $\Delta 18N$ zeigen, sind die CD-Spektren wie schon die Absorptionsspektren nahezu deckungsgleich. Der nicht kovalent gebundene Chromophor der C20A-Mutante ruft also dieselben Änderungen in den CD-Spektren hervor wie sie bei $\Delta 18N$ gefunden werden. Die CD-Spektren sprechen also auch dafür, dass der Chromophor in $\Delta 18N$ nicht kovalent gebunden ist.

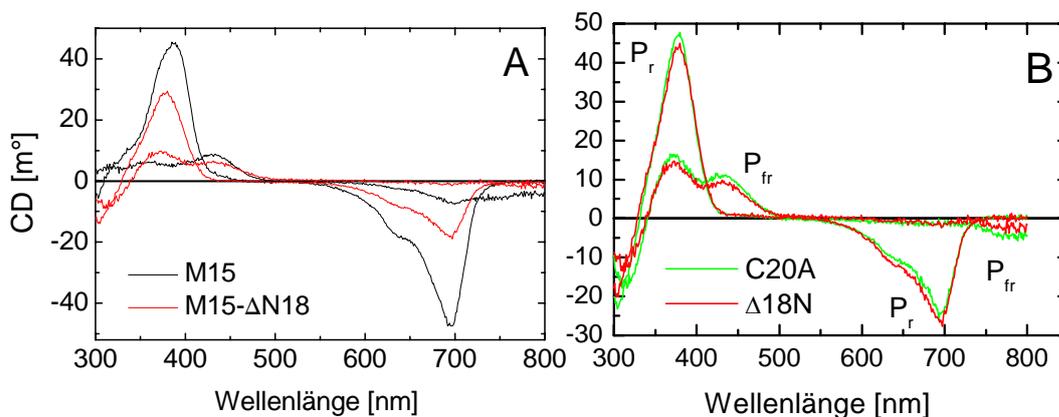


Abbildung 4.16: CD-Spektren von M15, M15- $\Delta 18N$ und C20A im Vergleich
(A) CD-Spektren von M15 und M15- $\Delta 18N$ der mit BV assemblierten P_r - und P_{fr} -Form. Die Skalierung erfolgte anhand der Absorption bei 700 nm der entsprechenden Absorptionsspektren bei einem cm Schichtdicke.
(B) Vergleich der CD-Spektren von M15- $\Delta 18N$ und C20A-FL der P_r - und P_{fr} -Form. Die Skalierung erfolgte analog zu der bei (A).

Die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion wurde für M15, Δ 18N und FL-C20A-BV wie oben beschrieben mittels Blitzlichtphotolyse bei jeweils gleichen Bedingungen untersucht.

In Abbildung 4.17A sind die Zeitspuren dieser Proben bei den drei charakteristischen Wellenlängen 700, 725 und 750 nm im Vergleich dargestellt.

Die Proben von Δ 18N und FL-C20A-BV bleichen während der Messungen stark aus, weshalb die Zeitspuren mittels eines linearen Faktors, der diese Ausbleichung kompensiert, skaliert wurden. Da die verschiedenen Proben in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen, wurden die Zeitspuren von Δ 18N und FL-C20A-BV für den Vergleich in Abbildung 4.17 A auf die anfänglichen Absorptionsänderungen von M15 (\sim zehn μ s) skaliert. Die Anregungseffizienz war bei allen drei Proben vergleichbar, so dass man annehmen kann, dass die Quantenausbeute der jeweiligen P_r -Zustände vergleichbar ist. Die Veränderungen im Zeitbereich von zehn bei 100 μ s sind bei allen drei Proben gleich. Diese Änderungen wurden bei FL als charakteristisch für die Bildung des Lumi-R Zustandes erkannt. Der Verlauf der Zeitspuren ist für alle drei Proben ähnlich. Während die Zeitspuren von Δ 18N und C20A nahezu deckungsgleich sind gibt es zu den Zeitspuren von M15 Abweichungen was die Zeit der Übergänge und deren Amplituden betrifft.

Von den drei Proben wurden jeweils acht Zeitspuren (380, 420, 650, 700, 725, 735 und 750 nm) simultan gefittet, wobei in allen Fällen drei Exponentialfunktionen ausreichen.

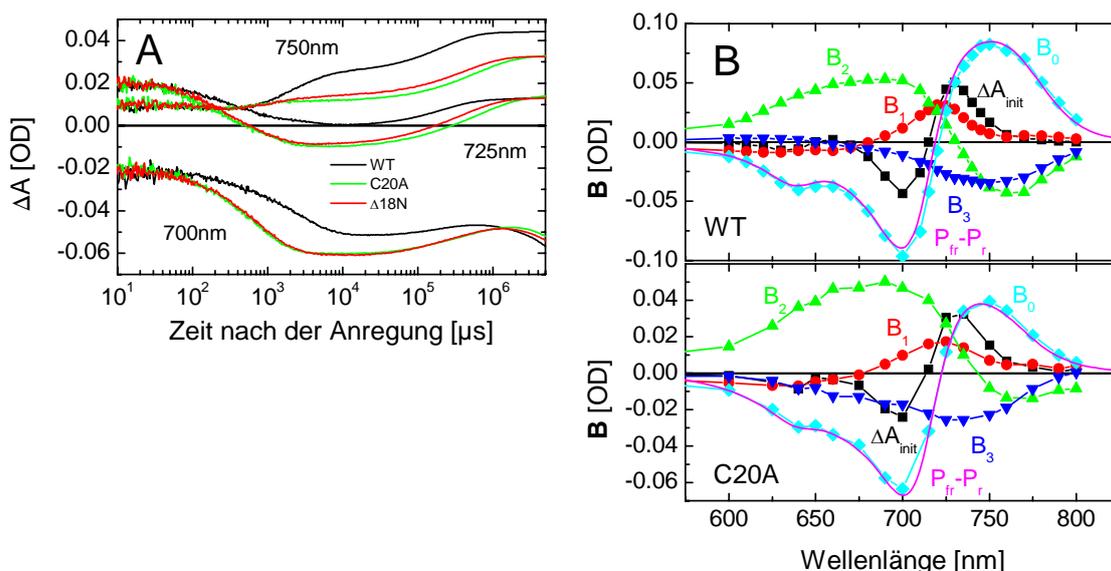


Abbildung 4.17: Vergleich der Zeitspuren und Amplitudenspektren des WT mit C20A und Δ 18N

(A) Darstellung der drei charakteristischen Zeitkurven bei 700, 725 und 750nm des M15 (schwarz), Δ 18N (rot) und C20A (grün). Die Kurven wurden auf denselben Wert bei zehn μ s skaliert, wobei die Kurven von Δ 18N und C20A noch mit einem linearen Faktor als Ausgleich für die Bleichung skaliert wurden. (B) Darstellung der berechneten Amplitudenspektren von M15 (WT) und C20A im Vergleich. Die Amplituden der drei Übergänge sind mit B_1 - B_3 bezeichnet, B_0 ist das extrapolierte Endspektrum, ΔA_{init} ist das extrapolierte Anfangsspektrum und $P_{fr}-P_r$ ist das auf die Anregung skalierte stationäre Differenzspektrum.

Dabei wurde bei beiden Mutanten eine Abnahme der Zeitkonstante der zweiten Komponente (siehe Tabelle 4.1), die der Bildung von Meta- R_C entspricht, um einen Faktor zwischen drei und vier im Vergleich zu M15-BV gefunden. Die Zeiten des ersten Übergangs waren indifferent und die Zeit des dritten Übergangs ist bei Δ 18N und C20A im Vergleich zu M15 geringfügig erhöht.

4. Einfluss bestimmter Regionen des Proteins auf die P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1

| | τ_1 | τ_2 | τ_3 |
|-----------------------|-------------|-------------|----------|
| Agp1-M15 | 280 μ s | 2.8ms | 220ms |
| Agp1-M15 Δ 18N | 230 μ s | 940 μ s | 290ms |
| Agp1-C20A | 120 μ s | 740 μ s | 360ms |

Tabelle 4.1: Zeitkonstanten des simultanen Fits mit drei Exponentialfunktionen der acht Zeitspuren bei 380, 420, 650, 675, 700, 725, 735 und 750 nm (Bedingungen: 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH7.8, 20°C)

Die Abweichungen, die zwischen den Zeitspuren von M15 und den beiden Mutanten gefunden wurden, äußern sich auch in den Amplituden, wie anhand der Amplitudenspektren von M15 und C20A (4.17 B) zu beobachten ist. Es ist aber auch deutlich, dass jedes Amplitudenspektrum von M15 ein mit ähnlichen spektralen Charakteristika entsprechendes Amplitudenspektrum in Δ 18N und C20A besitzt (B_0 - B_3).

Auch das extrapolierte Anfangsspektrum ΔA_{init} , das das Lumi-R - P_r -Differenzspektrum repräsentiert, ist sowohl in M15 als auch von den beiden Mutanten nahezu identisch. Trotz der spektralen und kinetischen Unterschiede kann man wohl davon ausgehen, dass dieselben Intermediate durchlaufen werden wie sie für FL in Kap. 3 und M15 in Kap. 4.1 beschrieben wurden.

Wie oben schon erwähnt ist die Photostabilität der beiden Mutanten im Vergleich zu M15 stark herabgesetzt. In Abbildung 4.18 A sind die Absorptionsspektren von Δ 18N vor den Blitzlichtmessungen und nach 110 Blitzen dargestellt. In der Q-Bande beträgt die Bleichung fast 50 Prozent. Zwischen 450 und 550 nm kommt es zu einem Anstieg in der Absorption, was von der Bildung von Photoprodukten des BV Chromophors herrühren könnte, die ein kleineres konjugiertes System besitzen. Bei C20A-BV (Daten nicht gezeigt) wurde in Bezug auf die Photobleichung ein ähnliches Verhalten gefunden. Bei Zugabe von frischem BV zu der ausgebleichten Probe von Δ 18N stieg die Absorption in der Q-Bande wieder an. Nach dem entfernen des überschüssigen Chromophors ist das Spektrum vergleichbar mit dem Ausgangsspektrum (Abbildung 4.18 A). Das Verhältnis der Absorptionsbanden von 700 zu 280 nm ist sogar etwas angestiegen im Vergleich zum Ausgangsspektrum, was darauf hindeutet, dass die Regenerierung nahezu vollständig ist. Die zur Kontrolle angefertigten Blitzlichtmessungen mit der regenerierten Probe zeigten nahezu keinen Unterschied zu den Messungen vor der BV Zugabe.

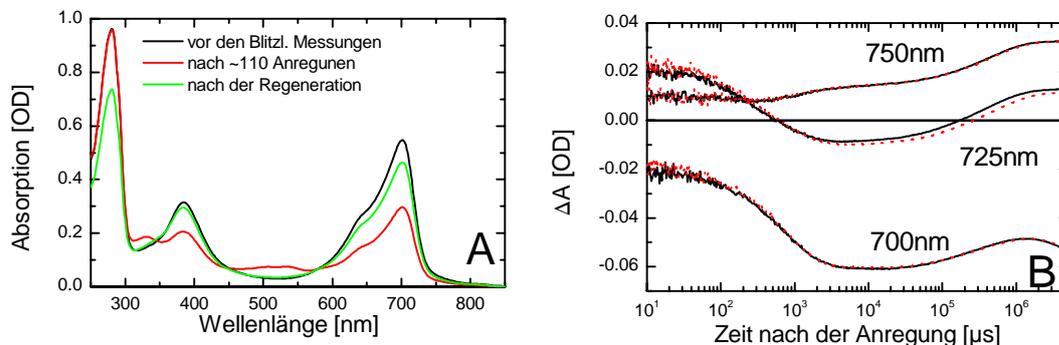


Abbildung 4.18: Regeneration von C20A

(A) Absorptionsspektren von Δ 18N vor (schwarz) und nach (rot) den Blitzlichtmessungen und nach der Regeneration mit frischem BV und der Reinigung mittels einer NAP-Säule (grün).

(B) Die Blitzlicht induzierten Absorptionsänderungen von Δ 18N vor (schwarz) und nach (rot) der Regeneration mit frischem BV. Die Zeitspuren der regenerierten Probe wurden auf die gleichen anfänglichen Änderungen skaliert.

Von der Photobleichung ist also nur der Kofaktor betroffen, z.B. nicht kovalent gebundenes Biliverdin, das die Chromophorbindingstasche verlassen hat.

Wie schon beim FL und den anderen Mutanten wurde der Protonentransfer ins wässrige Medium mit dem pH-Indikator Kresolrot bei C20A und Δ 18N untersucht. Bei beiden Mutanten wurde, wie schon beim FL (Kap. 3) und bei M15, erst eine Protonenabgabe ins Medium gefunden auf die eine Protonenaufnahme aus dem Medium erfolgt (Abbildung 4.19).

Da die Amplitude der Protonenaufnahme kleiner ist als die der Abgabe kommt es in beiden Fällen zu der auch bei FL und M15 beobachteten Nettoansäuerung. Kinetisch sind die Protonenabgabe und -aufnahme mit dem zweiten und dritten Übergang, also mit der Bildung und dem Zerfall des Intermediates Meta- R_C , gekoppelt. Der simultane Fit der Farbstoffkurven mit den Zeitspuren bei 700 und 750 nm ergab für Δ 18N die Zeitkonstante 960 μ s und 490 ms und für C20A 1,1 ms und 340 ms, in der Abbildung durch die vertikalen gestrichelten Linien dargestellt.

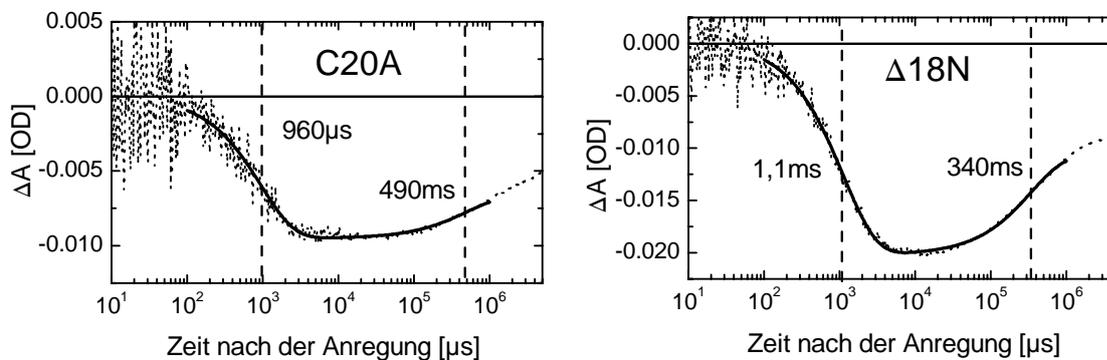


Abbildung 4.19: Farbstoffsignal von Kresolrot bei 570nm

Die gepunkteten Linien sind die aus den Zeitspuren mit und ohne Farbstoff berechneten reinen Farbstoffsignale, bei einer Farbstoffkonzentration von 100 μ M. Bedingungen: 50 mM NaCl, pH-7,8 und T=20°C. Die Farbstoffsignale wurden simultan mit der 750 nm Zeitspur bei C20A und der 700nm Zeitspur bei Δ 18N gefittet. Für das Farbstoffsignal wurden nur zwei Exponentialfunktionen benötigt, wobei die Zeitkonstanten durch die vertikalen gestrichelten Linien markiert sind.

Bei den Untersuchungen wurde ein Einfluss der N-terminalen Aminosäuren 2-19 auf die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion und die spektralen Eigenschaften gefunden. Da die Änderungen im Vergleich zu M15 nahezu identisch zu denen von der C20A Mutante von Agp1 waren, wurde die Hypothese erstellt, dass der Chromophor in der Δ 18N ebenfalls nicht kovalent gebunden war, wie dies mittels Zink Fluoreszenz in der AG Lamparter später nachgewiesen wurde. Die Entfernung der N-terminalen Aminosäuren 2-19 führt also in erster Linie dazu, dass der Chromophor nicht kovalent gebunden wird, obwohl der dafür notwendige Cysteinrest vorhanden ist.

4.4 Diskussion

Durch die Photokonversion der verschiedenen Phytochrome wird eine große Anzahl lichtgesteuerter Prozesse in Pflanzen, Bakterien und Pilzen eingeleitet. Der Mechanismus der Photokonversion auf molekularer Ebene ist bisher noch nicht aufgeklärt. In diesem Kapitel wurden mehrere mit BV assemblierte verkürzte Fragmente von Agp1 mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht, um näheren Aufschluss über die Beteiligung und Funktion der entfernten Abschnitte auf die spektroskopischen Eigenschaften und die Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion von Agp1 zu erhalten.

4.4.1 Die Histidinkinase

Phytochrome sind Homodimere (Yeh 1997; Park 2000; Bhoo 2001), deren Dimerisierung über die carboxyterminale Domäne erfolgt (Jones & Quail 1986). Eine zusätzliche N-terminale Dimerisierung konnte bei Cph1 (Esteban 2004) und Agp1 (Noack 2007) in Abhängigkeit vom Photozustand gefunden werden.

Der Mutante M15 fehlt die komplette Histidinkinase, wohingegen das Chromophor-Modul vollständig erhalten bleibt. Da die spektralen Eigenschaften in erster Linie durch den Chromophor und seine Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der Chromophorbindingstasche entstehen und es auch eine N-terminale Dimerisierung gibt, sind durch das Entfernen der Histidinkinase keine großen spektralen Änderungen bei M15 zu erwarten. Da es aber bei der gegenseitigen lichtinduzierten Umwandlung der P_r - und P_{fr} -Form zu Konformationsänderungen kommt, die auch auf die Histidinkinase übertragen werden, kann ihre Entfernung durchaus zu Veränderungen in der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion führen.

Wie erwartet, zeigten dann auch die stationären Spektren nach roter und dunkelroter Beleuchtung von M15 im Vergleich zum FL keine großen Unterschiede auf. Nur im Differenzspektrum, das anhand der P_r -Bande skaliert wurde, gab es bei der P_{fr} -Bildung einen Unterschied zum FL. Zurzeit ist allerdings nicht klar, wie signifikant dieser Unterschied ist oder wie man ihn erklären kann. Da die Skalierung anhand der P_r -Bande erfolgte, ist noch nicht einmal klar, für welchen Zustand die Oszillatorstärke von M15 größer ist. Bei den CD-Spektren hingegen konnte, was Rotationsstärke und Verhältnis der Banden zueinander betrifft, kein Unterschied zum FL festgestellt werden. Man kann also davon ausgehen, dass bei M15 und FL der Chromophor nicht nur in derselben Konfiguration und Konformation vorliegt, sondern, dass der Chromophor auch dieselbe Stereochemie einnimmt.

In der Kinetik der P_r/P_{fr} -Photokonversion wurden bei M15 nahezu identische spektrale Änderungen gefunden wie bei FL. Nur die Zeitkonstanten, die der Meta- R_C -Bildung ($3,1 \rightarrow 2,7$ ms) und P_{fr} -Bildung entsprechen ($290 \rightarrow 210$ ms), waren bei M15 etwas kleiner. Ob der Effekt in den Zeitkonstanten wirklich echt ist, ist im Moment aber eher zweifelhaft. Die Bestimmung der Zeitkonstanten, insbesondere durch die Verwendung der logarithmischen Zeitskala, ist nicht so exakt, dass man anhand der vorhandenen Zahlen von einer signifikanten Änderung sprechen kann. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Histidinkinase zu einer Beschleunigung dieser beiden Übergänge führt. Auch bei PhyA und PhyB der Kartoffel kam es durch entfernen der Histidinkinase zu einer schnelleren P_{fr} -Bildung (Remberg 1998). Bei Cph1 hingegen waren die Zeiten beim vollständigen und C-terminal verkürzten Fragment gleich (van Thor 2001). Anhand dieser unterschiedlichen Daten ist es schwierig zu sagen, ob die geringfügig kürzeren Zeitkonstanten bei Agp1 durch die fehlende Histidinkinase verursacht werden. Wenn aber doch, kann man sich den Einfluss der Histidinkinase so erklären, dass durch das Entfernen Masse entfernt wird, die bei Konformationsänderungen bewegt werden müssten, weshalb die strukturellen Änderungen im Chromophor-Modul ohne Histidinkinase schneller vonstatten gehen.

Auf jeden Fall scheinen sich diese Änderungen nicht spektral auszuwirken, da die berechneten Amplitudenspektren keinen Unterschied zu denen des FL zeigen. Weiterhin wird auch bei M15 das charakteristische Muster der lichtinduzierten Protonierungsänderung im Medium von Agp1 gefunden. Mit der Meta- R_C -Bildung wird ungefähr ein Proton ins Medium abgegeben und mit der P_{fr} -Bildung erfolgt eine teilweise Wiederaufnahme dieses Protons. Einzig die Amplitude der Wiederaufnahme fällt bei M15 mit 55 Prozent größer aus als beim FL (40 Prozent). Bei fehlender Histidinkinase wird also ein größerer Anteil der Protonen wieder aufgenommen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Histidinkinase die Wiederaufnahmegruppe umgibt und durch die Entfernung der Histidinkinase die Gruppe in eine andere Umgebung (z.B. polarer) kommt, wodurch die Wiederaufnahme erleichtert wird. Insgesamt ist der Unter-

schied jedoch nicht sehr groß, und es kommt wie bei FL auch bei M15 nicht zu einer vollständigen Wiederaufnahme.

Ein interessanter Effekt ist, dass die P_{fr} -Bildung bei den Messungen mit Kresolrot stark verzögert ist (520 ms mit Farbstoff 209 ms ohne Farbstoff). Dies ist ein direkter Einfluss des pH-Indikators Kresolrot, da die P_{fr} -Bildung in ungepufferten Lösungen ohne Kresolrot diese Verzögerung nicht aufweist. Die Ursache dieser Verzögerung ist zurzeit nicht bekannt und erfordert weitere Studien.

Bei M15 wurde dieselbe pH-Abhängigkeit der P_r/P_{fr} Photokonversion gefunden wie bei FL. Im Unterschied zum FL zeigte bei M15 auch die Zeit des ersten Übergangs eine pH-Abhängigkeit. Auch der H/D-Isotopeneffekt des ersten Übergangs von FL deutete auf einen ratenbegrenzenden Protonentransferschritt hin. Umso überraschender war es, dass keine eindeutige pH-Abhängigkeit für diesen Übergang gefunden wurde. Das dies nun bei M15 möglich ist, könnte erst einmal an der fehlenden Histidinkinase liegen, aber auch daran, dass die kinetischen Messungen alle in einer ungepufferten Lösung angefertigt wurden, so dass diese Effekt leichter zu messen ist. Um diese Diskrepanz aufzulösen, sind wohl noch weitere Messungen nötig.

Die Spektren, die bei jedem pH-Wert vor den kinetischen Messungen angefertigt wurden, wiesen sowohl in P_r als auch in P_{fr} eine Abnahme der Absorption in der Q-Bande bei steigendem pH-Wert auf. Ein ähnlicher Effekt wurde auch schon beim FL gefunden, allerdings war er dort nicht so stark ausgeprägt. Da mit steigendem pH-Wert die Protonenkonzentration abnimmt, lag hier der Verdacht nahe, dass die Absorptionsabnahme durch die Deprotonierung des Chromophors verursacht wird. Anhand von Modellverbindungen konnte Falk (Falk 1989) zeigen, dass die Protonierung des Chromophors zu einer Zunahme der Oszillatorstärke der Q-Bande führt. Der pK-Wert für die Deprotonierung des Chromophors wurde sowohl für P_r als auch für P_{fr} mit etwa 9,5 bestimmt. Bei einer anschließenden Messung, bei der die Probe im Dunkeln titriert wurde, also nur der P_r -Zustand gemessen wurde, wurde ein pK-Wert von 11,1 gefunden, wie bei einer analogen Messung bei FL. Da bei den ersten Experimenten bei den jeweiligen pH-Werten auch Blitzlichtmessungen erfolgten, kann es zu einer Bleichung gekommen sein. Diese akkumuliert mit jedem weiteren pH-Wert, wodurch es dann zu geringeren Absorptionswerten kommt. Da beim zweiten Experiment die Probe nicht hin- und zurück konvertiert wurde, fehlt diese Ausbleichung. Aus diesem Grund ist wohl der mit 11,1 bestimmte pK-Wert der exaktere Wert. Dafür spricht auch, dass bei den gepufferten Proben des FL, kein starker pH-Effekt gefunden wurde. Auch bei Cph1 wurde eine pH-abhängige Abnahme der Absorption beobachtet (van Thor 2001), die mit der Deprotonierung des Chromophors erklärt wurde. Für die P_r -Form wurden allerdings zwei pK-Werte bestimmt nämlich 7,6 und 9,8, während sich für die P_{fr} -Form nur ein pK von 9,2 bestimmen ließ. Der zweite pK-Wert des P_r -Zustandes von 7,6 wurde einer anderen protonierbaren Gruppe zugesprochen, z.B. einem Histidinrest des Proteins. Ansonsten gehen die Autoren davon aus, dass der pK-Wert der Deprotonierung des Chromophors bei etwa 9,5 liegt. Damit gibt es eine erhebliche Diskrepanz zwischen den gefundenen pK-Werten von Agp1 (11,1) und Cph1 (9,5). Eine Ursache für diesen Unterschied könnte der unterschiedliche Chromophor sein (Cph1: PCB; Agp1:BV). Da aber auch die Stabilität verschiedener Phytochrome bei extremen pH-Werten variiert, könnte der Unterschied zwischen Cph1 und Agp1 auch auf das unterschiedliche Proteingerüst und Varianzen in der Bindungstasche herrühren.

Die bei kleinem pH-Wert gefundene reduzierte P_{fr} -Bildung von M15 stimmt hingegen mit der des FL überein. Wie beim FL führt die Nettoansäuerung bei der P_r/P_{fr} -Photokonversion, zu einer Verschiebung des P_r/P_{fr} -Gleichgewichtes in Richtung P_r bei hoher Protonenkonzentration, also niedrigem pH. Anhand der transienten Daten scheint es so als ob bei M15 ein größerer Anteil der vorher abgegebenen Protonen wieder aufgenommen wird. Bei den stationären Elektrodenmessungen wurden jedenfalls größere pH-Änderungen bei denselben pH-Werten

gemessen. Dies kann auf eine stärkere Pufferwirkung des FL Proteins hindeuten. Eine Kalibrierung ist in diesem Fall unabdingbar und müsste im Rahmen weiterer Untersuchungen nachgeholt werden.

Alles in allem bleibt festzuhalten, dass die spektralen und kinetischen Eigenschaften von M15 wie erwartet im Großen und Ganzen denen des FL entsprechen. Auch bei der Assemblierung, der Dunkelreversion und der limitierten Proteolyse (Noack 2007) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen M15 und FL festgestellt. Damit verhält sich das Chromophor-Modul von Agp1 wie das von Cph1, bei dem zwischen dem vollständigen Protein und dem um die Histidinkinase verkürzten Protein keine Unterschiede festgestellt werden konnten (van Thor 2001). Auch für das Chromophor-Modul des Haferphytochroms PhyA wurde bei FTIR Messungen keine Unterschied zum vollständigen Protein gefunden (Förstendorf 2001), weshalb insgesamt der Schluss zu ziehen ist, dass die Histidinkinase nur einen minimalen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften und die Kinetik der Photokonversion hat. Die Histidinkinase ist eher für die Dimerisierung verantwortlich und der Ort an dem die Phosphorylierung stattfindet (Lamparter 2002/Noack 2007).

4.4.2 Die PHY-Domäne

4.4.2.1 Einfluss auf den Dunkelzustand

Die PHY-Domäne ist eine Phytochrom spezifische Domäne, die in der Sequenz auf die GAF-Domäne folgt. Für die verschiedensten Phytochrome wurde berichtet, dass die PHY-Domäne für eine vollständige P_{fr} -Bildung benötigt wird (Reiff 1985; Oka 2004; Montgomery 2002; Cherry 1993, Kneip 2000). Auch für Agp1 konnte bei den Untersuchungen an Agp1-M20, dem die Histidinkinase und die PHY-Domäne fehlt, sowohl im Labor der AG Lamparter als auch bei den hier präsentierten Daten ein starker Einfluss der PHY-Domäne auf die spektroskopischen Eigenschaften beobachtet werden.

So dauerte die Assemblierung mit BV mit 60 Minuten (Noack 2007) sehr viel länger als bei FL und M15, wo diese innerhalb von einer Minute abgeschlossen war. Das ist in sofern überraschend, da der Chromophor in den beiden gelösten Kristallstrukturen des *Deinococcus* und des *Palustris* Phytochrom (Wagner 2005; Yang 2007) nahezu vollständig von der GAF-Domäne umschlossen wird. Da nach Wu (Wu et al. 2000) die Bilin Lyase in der GAF-Domäne angesiedelt ist, ist eine direkte Beteiligung der PHY-Domäne an der autokatalytischen Verknüpfung eher unwahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist die Beteiligung der PHY-Domäne an der Stabilisierung der Struktur der GAF-Domäne durch intermolekulare Wechselwirkungen der beiden Domänen miteinander. Der BV Chromophor wird während seines Einbaus protoniert (Kneip 1999; Falk 1989) und es kommt zu einer syn-/anti-Drehung um die 14,15-Einfachbindung des Chromophors, wodurch der Chromophor eine gestrecktere Konfiguration einnimmt (Borucki 2005; Wagner 2005). Eine Möglichkeit besteht nun darin, dass die PHY-Domäne die Gruppe der GAF-Domäne, die das Gegenion des protonierten Chromophors trägt, stabilisiert. Durch die fehlende Fixierung dieser Gruppe ist die Ausbildung dieser Salzbrücke dann durch z.B. größere Beweglichkeit erschwert, wie die langsame Assemblierung anzeigt, aber nicht ausgeschlossen, da letztendlich doch ein Zustand ausgebildet wird, der dem P_r -Zustand von FL und M15 sehr ähnlich sieht. In der Arbeit von Yang über die Struktur des *Palustris* Phytochroms RpBphP3 wird anhand von Modellierungen spekuliert, dass mehrere Aminosäuren der GAF-Domäne sowohl mit dem Chromophor als auch mit der PHY-Domäne in Kontakt stehen. Eine dieser Aminosäuren ist das Asp216, dessen Äquivalent D197 von Agp1 auch in dieser Arbeit näher untersucht wurde (Kapitel 6). Da auch der pK-Wert des Chromophors für den P_r -Zustand von M20 mit 8,8 stark herabgesetzt ist im Vergleich zu M15 (11,1), spricht vieles dafür, dass der protonierte Chromophor nicht nur durch eine oder mehrere Aminosäuren der GAF-Domäne fixiert wird, sondern dass die PHY-

Domäne an der Stabilisierung dieses Zustandes beteiligt ist. Auch bei der Punktmutante H250A von Agp1 war der pK-Wert des Chromophors vergleichbar herabgesetzt (8,8). Die Mutante zeigte eine geringere Absorption des Dunkelzustandes und eine geänderte Photokonversion (von Stetten 2007, Kap.6). Die Stabilisierung des protonierten Chromophors spielt also eine besondere Rolle sowohl bei der Assemblierung als auch bei der Photokonversion. Bis zur Aufklärung der Struktur eines Phytochromfragmentes, dass die PHY-Domäne beinhaltet und so Aussagen über die Funktion zulässt sind das letztendlich alles nur Spekulationen.

Trotz der auftretenden Probleme von M20 bei der Assemblierung wird ein P_r ähnliches Addukt gebildet, das lediglich eine geringere Oszillatorstärke aufweist. Auch das CD-Spektrum dieses Zustandes zeigt den bei FL und M15 gefundenen Verlauf, so dass man daraus schließen kann, dass der Chromophor in M20 dieselbe Konfiguration und Konformation einnimmt wie bei FL und M15. Die verringerte Oszillator- bzw. Rotationsstärke in der Q-Bande könnte durch die fehlende Stabilisierung der PHY-Domäne verursacht werden, ein Effekt der auch durch den nicht kovalent gebundenen Chromophor von C20A hervorgerufen wird (siehe Kap. 4.2.3). Interessant ist, dass bei den beiden Fragmenten M16 und M17 von Agp1, bei denen nur Teile der PHY-Domäne fehlten (siehe Abbildung 4.1), kein photochromes Addukt erhalten wurde (Noack 2007). Dieses Verhalten wird mit einer Missfaltung des Proteins erklärt, da auch die Löslichkeit dieser Fragmente stark herabgesetzt ist und sie laut SEC („Size Exclusion Chromatography“) zur Aggregation neigen. Wieso ein solches Verhalten nicht auch bei M20 auftritt, bei dem ja die PHY-Domäne vollständig fehlt, ist im Augenblick unklar.

4.4.2.2 Einfluss auf die Photokonversion

Während nach der Assemblierung noch ein P_r-ähnliches Addukt gebildet wird, weist das Photoprodukt nach roter Beleuchtung kaum Ähnlichkeiten mit dem P_{fr}-Zustand von M15 und FL auf. Das Photoprodukt hat eine geringere Absorption im Vergleich zum P_r-Zustand und zeigt eine leichte Zunahme im dunkelroten Spektralbereich auf. Ein ähnliches spektrales Verhalten nach roter Beleuchtung wurde bei den Phytochrom Fragmenten von *Deinococcus radiodurans* und *Palustris* gefunden (Wagner 2005, 2006; Yang 2007), dem 450 AS Fragment von *Arabidopsis* Phy B (Oka 2004), und dem durch proteolytischen Abbau entstandene 39kDa-Fragment des Haferphytochroms (Kneip 2000; Reiff 1985), denen ebenfalls die PHY-Domäne fehlte. Weiterhin weist das Spektrum des Photoproduktes von M20 Ähnlichkeiten zu dem bei tiefen Temperaturen eingefangene Meta-R_C Intermediat von Agp1-FL auf. Dieser Befund führt zu der Vermutung, dass der Photozyklus bei M20 im Meta-R_C Zustand blockiert ist (Noack 2007). Bei der Betrachtung der kinetischen Daten und den daraus berechneten Amplitudenspektren, kommen aber Zweifel auf, ob es sich bei dem Photoprodukt um Meta-R_C handelt. Da bisher keine anderen kinetischen Daten von Phytochromen mit fehlender PHY-Domäne vorliegen, ist man auf den Vergleich mit den kinetischen Daten von Agp1-FL dieser Arbeit angewiesen.

Bei FL und M15 wurden im frühen Zeitbereich bei zehn Mikrosekunden typische Absorptionsänderungen gefunden, die dem Lumi-R Intermediates zugeschrieben werden. Die Zeitspuren von M20 (Abbildung 4.9) wiesen in diesem Zeitbereich keine vergleichbaren Änderungen auf. Dies kann entweder bedeuten, dass bei M20 kein Lumi-R Zustand durchlaufen wird, oder dass der Zerfall von Lumi-R schon unterhalb der Auflösungsgrenze stattfindet.

Die erste Komponente der Kinetik von M20 ($\tau_1=66 \mu\text{s}$) ähnelt im Amplitudenspektrum dem der Meta-R_C-Bildung von FL und M15. Auffällig ist auf jeden Fall, dass mit diesem Übergang eine Absorptionszunahme im langwelligen Bereich zu beobachten ist, die bei FL und M15 erst mit der Meta-R_C-Bildung gefunden wird. Die Frage, die sich hier stellt, ist, ob mit

dem ersten Übergang von M20 ein Meta-R_C ähnliches Intermediat gebildet wird. Im Vergleich zu FL und M15 wäre die Meta-R_C-Bildung dann erheblich beschleunigt (66 µs/3,1 ms). Allerdings spricht die geringe Amplitude der Protonenabgabe gegen einen analogen Schritt, da bei FL und M15 die Meta-R_C-Bildung immer mit einer großen Protonenabgabe verbunden war. Wie dem auch sei, es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit dem ersten Übergang ein Meta-R_C ähnliches Intermediat gebildet wird. Für die sich anschließende Komponente hingegen, bei der die Absorption im dunkelroten Spektralbereich wieder abnimmt, gibt es kein Analogon bei FL und M15. Beim mit Trypsin verdauten Haferphytochrom A (39kDa) wurden bei tiefen Temperaturen Zustände erhalten, die denen von Lumi-R und Meta-R_A ähneln (Reiff 1985). Anstelle von Meta-R_C wurde jedoch ein Zustand erhalten der mit P_{bl} (bleached) bezeichnet wurde und es wurde kein P_{fr} gebildet. Bei den Resonanz Raman Untersuchungen an diesem Fragment von Kneip (Kneip et al. 2000) wurde hingegen nur P_{bl} erhalten. Das RR Spektrum der P_{bl}-Form wies mehr Ähnlichkeiten mit dem Meta-R_C-Spektrum des 124kDa-Fragmentes auf als mit der P_{fr}-Form. Weiterhin deuteten die Daten auf eine stärkere Flexibilität des Chromophors hin. Das Absorptionsspektrum der P_{bl}-Form ähnelt stark dem des Photoproduktes von M20, es weist eine Verbreiterung der Soret-Bande im Vergleich zum P_r-Zustand auf und die Absorption in der Q-Bande ist stark herabgesetzt (Reiff 1985). Allerdings zeigt das Spektrum des Photoproduktes von M20 eine stärkere Absorption bei etwa 700 nm, was auf einen größeren P_r-Anteil schließen lässt. Auch das Spektrum der H250A-Mutanten von Agp1 ähnelt dem Spektrum von P_{bl}, wobei bei H250A allerdings keine Absorptionzunahme im langwelligen Bereich bei 750 nm beobachtet werden kann (von Stetten 2007, Kap. 6). Der 4,1-ms-Übergang von M20 könnte also der P_{bl}-Bildung entsprechen. Bei dem 39kDa-PhyA-Fragment (Reiff 1985) wurden bei tiefen Temperaturen Zustände erhalten die spektral Lumi-R und Meta-R_A ähneln. Die Blitzlichtmessungen geben für M20 keinen Hinweis auf diese beiden Intermediate, es ist allerdings nicht auszuschließen, dass diese sehr schnell zerfallen und deshalb nicht im aufgelösten Zeitbereich liegen. Eine schnelle Meta-R_C-Bildung wäre dann nicht auszuschließen und könnte demnach mit dem ersten Übergang (66µs) von M20 erfolgen. Der darauf folgende Übergang könnte dann aufgrund der Analogien zu den Spektren von P_{bl} des 39kDa-Fragmentes (Reiff 1985; Gärtner 1996) von Phytochrom A die Bildung eines Analogons zu P_{bl} sein. Ein gebleichtes Intermediat wurde auch schon bei anderen Studien gefunden (Rüdiger 1984; Iwakami 1996), allerdings nie bei intaktem Phytochrom, und es trat immer anstelle von Meta-R_C auf, oder es stand im Gleichgewicht mit Meta-R_C (Rüdiger 1985). Da auch die RR-Daten (Kneip 2000) eine starke Ähnlichkeit zwischen P_{bl} und Meta-R_C zeigen ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Entfernung der PHY Domäne statt zu Meta-R_C zu einem P_{bl}-ähnlichen Zustand führt. Es würde also folgende Kinetik durchlaufen:



Wobei die beiden ersten Schritte nicht aufgelöst werden konnten.

Das CD-Spektrum des Photoproduktes weist keinerlei Ähnlichkeiten zum P_{fr}-Spektrum von FL und M15 auf. Da das CD-Spektrum des Intermediates Meta-R_C nicht bekannt ist, können keine Vergleiche angestellt werden. Das CD-Spektrum des Photoproduktes der Mutante H250A von Agp1, das auch schon ein ähnliches Spektrum wie das Photoprodukt von M20 hatte (Kap. 6), ähnelt dem CD Spektrum des Photoproduktes von M20 sehr stark. Einzig der Anteil im langwelligen Bereich von M20 weist auf einen Unterschied hin. Dieser könnte allerdings anteilig eines Gleichgewichtes vom vorher gebildeten Meta-R_C Zustand herrühren. In allen anderen Arbeiten in denen P_{bl} gefunden wurde, wurde ein Gleichgewicht zwischen P_{bl} und Meta-R_C vermutet (Eilfeld 1985; Iwakami 1996). P_{bl} wäre demnach ein Zustand der dann gebildet wird, wenn die Meta-R_C- oder P_{fr}-Bildung gestört ist, eine molekulare Erklärung liegt derzeit noch nicht vor. Das Spektrum von P_{bl} erinnert stark an das Spektrum des freien BV, das deprotoniert ist und eine zyklische Konformation einnimmt. Eine Deprotonierung würde

auch im Einklang mit dem gefundenen Protonensignal stehen, dass eine Abgabe ins Medium mit der Bildung dieses Zustandes zeigt. Die aus den RR-Daten vermutete Flexibilität des Chromophors würde eine zyklische Konformation nicht ausschließen. Und schließlich wurde bei Cph1 sogar ein Porphyrin anstelle eines linearen Bilins in der Chromophorbindungstasche gefunden (Fischer 2005).

Letztendlich sind das aber alles Hypothesen, die durch weitere Experimente erst bestätigt werden müssten. Es könnte auch sein, dass bei M20 eine völlig andere Kinetik mit bisher unbekanntem Intermediaten durchlaufen wird. Klar ist nur, dass durch die Entfernung der PHY-Domäne die P_{fr} -Bildung verhindert wird.

Die von Noack gefundene langsamere Dunkelreversion von M20 im Vergleich zu FL (Noack 2007) und M15, muss nicht bedeuten, dass die PHY-Domäne die Dunkelreversion beschleunigt. Der Unterschied kommt vielmehr dadurch zustande, dass die Dunkelreversion aus verschiedenen Zuständen erfolgt, wenn dies nicht über denselben Mechanismus erfolgt resultieren dabei schnell Unterschiede in der Kinetik der Dunkelreversion.

Klar hingegen ist der letzte Übergang der Kinetik von M20 bei 48 ms. Sowohl die pH-Abhängigkeit der letzten Amplitude wie auch der pK-Wert des Chromophors von 8,8 deuten darauf hin, dass dieser Übergang einer Relaxationskomponente des Gleichgewichtszustandes des protonierten Chromophors ist, der durch die Laseranregung ausgelenkt wurde. Auch das Amplitudenspektrum, das genau der Form des P_r -Zustandes entspricht, und die leichte Protonenaufnahme, die mit diesem Übergang gekoppelt ist, sprechen dafür, dass hier eine Gleichgewichtsrelaxation stattfindet.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die PHY-Domäne wahrscheinlich über Wechselwirkungen mit dem DIP-Motiv der GAF-Domäne – Einfluss auf die Stabilität des protonierten Chromophors ausübt, was sich in der längeren Assemblierungsdauer und der verringerten Absorption in der Q-Bande äußert. Noch drastischer ist der Einfluss der PHY-Domäne bei der Photokonversion. In Analogie zu anderen Phytochromen wird kein P_{fr} gebildet, sondern stattdessen eine Zustand der mit P_{bl} bezeichnet wird. Ob auf dem Weg dahin die Intermediate Lumi-R, Meta- R_A und Meta- R_C der Kinetik der Photokonversion nach roter Anregung durchlaufen werden, ist im Augenblick nicht klar. Wenn der erste Übergang der Meta- R_C Bildung entspricht, wäre diese auf jeden Fall erheblich beschleunigt im Vergleich zu FL und M15 und zeigt, dass die PHY-Domäne schon an den frühen Übergängen der Photokonversion beteiligt ist.

4.4.3 Die N-terminalen Aminosäuren

Um den Einfluss der N-terminalen Aminosäuren, die vor der Chromophorbindestelle (C20) liegen, zu untersuchen, wurden in der AG Lamparter die Konstrukte M15 Δ 9N, M15 Δ 18N und FL Δ 18N hergestellt, denen die Aminosäuren 2-10 bzw. 2-19 und im Fall der M15 Konstrukte die Histidinkinase fehlten (Abbildung 4.1). Das Konstrukt M15 Δ 9N verhielt sich in allen Untersuchungen der AG Lamparter wie M15. Da die Aminosäuren 2-10 nur eine geringe Homologie innerhalb der Phytochromfamilie aufweisen wurde dieses Fragment in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Zwischen FL Δ 18N und M15 Δ 18N wurden in der AG Lamparter keine signifikanten Unterschiede gefunden, was die in Kap. 4.1 gemachte Aussage bestätigt, dass die Histidinkinase nahezu keinen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften hat. Aus diesem Grund wurde nur das mit BV assemblierte Konstrukt M15 Δ 18N untersucht.

Die angefertigten spektroskopischen Untersuchungen mit M15 Δ 18N wiesen große Ähnlichkeiten zu denen von M15 auf. Die gefundenen Unterschiede waren jedoch, wie sich durch einen Vergleich anhand von analogen Messungen mit der Punktmutante C20A herausstellten,

für einen nicht kovalent gebundenen Chromophor charakteristisch. Die nicht kovalente Verknüpfung des Chromophors konnte letztlich in der AG Lamparter durch SDS Zugabe und chromatographischer Trennung einwandfrei nachgewiesen werden.

Aufgrund der Datenlage kann eine zumindest partielle kovalente Verknüpfung nicht ausgeschlossen werden. Während der Elution von der NAP-Säule kommt es zu einer starken Verdünnung der Probe, so dass eine kleine Menge an gebundenem Chromophor nur schwer nachzuweisen ist. Eine katalytische Beteiligung der Aminosäuren zwei bis 19 hingegen scheint aufgrund der geringen Konservierung dieser Aminosäuren und der Tatsache, dass nach momentanem Stand der Forschung die Bilin-Lyase-Aktivität in der GAF-Domäne lokalisiert ist (Wu 2002), eher unwahrscheinlich. Leichter vorstellbar ist es, dass die Aminosäuren elf bis 19 durch die Ausbildung von Wechselwirkungen mit anderen Strukturelementen des Proteins die Cysteinbindestelle (C20) fixieren. Ohne diese Fixierung ist die Beweglichkeit zwischen Cysteinrest und Chromophor für eine kovalente Bindung zu groß. In der Arbeit von Noack (Noack 2007) wurde bei „Crosslinking“ Experimenten gezeigt, dass die N-terminalen Aminosäuren in Kontakt zur PHY-Domäne stehen. Durch eine nicht kovalente Wechselwirkung zwischen diesen Aminosäuren, insbesondere der Lysinrest 16 kommt da in Frage (Noack 2007), mit der PHY-Domäne könnte C20 in der für die kovalente Verknüpfung notwendigen Position gehalten werden.

Auf jeden Fall führt die nicht kovalente Verknüpfung des Chromophors zu geringen, aber charakteristischen Unterschieden bei den spektralen Eigenschaften. So war die Oszillatorstärke nach Assemblierung im Dunkeln in beiden Konstrukten im Vergleich zu M15 und FL reduziert. Dies kann entweder auf einen verringerten Einbau hindeuten oder auf eine größere Beweglichkeit des Chromophors aufgrund der fehlenden kovalenten Verknüpfung. Dies würde auch die Verbreiterung der Q-Bande erklären, da solch eine Verbreiterung oft durch größere Bewegungsfreiheitsgrade entstehen, weshalb Absorptionsmessungen bei tieferen Temperaturen zu schärferen Spektren führen, da dort die Beweglichkeit herabgesetzt ist. Auch die geringe Rotationstärke in der Q-Bande deutet in diese Richtung. Durch die fehlende kovalente Verknüpfung ist die Chromophorkonformation variabler, was nach der in Kapitel 3 gestellten Hypothese bedeuten würde, dass die Winkel zwischen den Ringen C und D sowie A und B im statistischen Mittel kleiner sind als bei M15 und FL.

Trotz der fehlenden kovalente Bindung des Chromophors kommt es bei M15 Δ 18N und C20A (Lamparter 2001) zur P_F-Bildung. Auch in anderen Fällen konnte gezeigt werden, dass die Photokonversion durch die fehlende Kovalente Verknüpfung nicht verhindert wird (Lindner 2000; Jorissen 2002; Lamparter 2001; Lamparter 2002; Borucki 2003). In all diesen Fällen wurde die kovalente Verknüpfung durch Blockierung des Cysteins (Lamparter 2001; Borucki 2003) oder durch Veränderungen des Chromophors (Lindner 2000) oder durch Austausch des Cysteins (Lamparter 2002) verhindert. Unter natürlichen Bedingungen hingegen ist bei Phytochromen kein Fall bekannt bei dem der Chromophor nicht kovalent mit dem Protein verknüpft war. Die Frage die sich daraus ergibt ist, warum wird der Chromophor immer kovalent verknüpft, wenn die Photokonversion auch ohne sie erfolgt?

Die Kinetik der Photokonversion nach roter Anregung zeigt bei M15 Δ 18N nahezu den gleichen Verlauf wie bei M15, weshalb man davon ausgehen kann, dass bei M15 Δ 18N dieselben Intermediate durchlaufen werden wie bei M15 und FL. Allerdings sind die Amplituden bei M15 Δ 18N kleiner, was wie schon bei den Absorptions- und CD-Spektren mit der größeren Beweglichkeit des Chromophors erklärt werden kann. Weiterhin ist die Meta-R_A- und insbesondere die Meta-R_C-Bildung im Vergleich zu M15 beschleunigt. Wobei die Abnahme der Zeitkonstante von 280 μ s bei M15 über 230 μ s bei M15 Δ 18N zu 120 μ s bei C20A der Meta-R_A Bildung und analog bei der Meta-R_C-Bildung dafür sprechen, dass bei M15 Δ 18N der Chromophor noch anteilig kovalent gebunden ist.

Wie aus den Ergebnissen mit dem in der 5Zs-Konformation/Konfiguration arretierten Chromophors in Kapitel 5 gefolgert wird, soll es bei der Meta-R_C-Bildung zu einer Rotation der 5,6-Einfachbindung oder zu einer Z/E-Isomerisierung der 4,5-Doppelbindung der Methinbrücke kommen. Diese Änderungen der Geometrie der A/B-Methinbrücke scheinen ohne kovalente Verknüpfung schneller ablaufen zu können, so dass man sagen kann, dass durch die kovalente Verknüpfung, z.B. aufgrund des Gegengewichtes, des Chromophors, diese Änderung behindert wird. Die Frage wie diese Konformations- bzw. Konfigurationsänderung des Chromophors induziert werden, kann im Augenblick nicht beantwortet werden.

Die P_{fr}-Bildung ist bei M15Δ18N etwas langsamer als bei FL. Ob dieser Unterschied allerdings signifikant ist, ist zurzeit nicht klar. Wie schon bei M15 und FL wird auch bei M15Δ18N und C20A die charakteristische Protonenabgabe und Wiederaufnahme gefunden. Dass heißt die fehlende kovalente Bindung des Chromophors äußert sich lediglich in einer etwas reduzierten P_{fr}-Bildung, wobei die Kinetik ansonsten alle bei M15 und FL gefundenen Charakteristika aufweist. Für die photochromen Eigenschaften scheint es also egal zu sein, ob der Chromophor kovalent gebunden ist oder nicht. Wieso sind ist bei allen bisher untersuchten Phytochromen der Chromophor kovalent gebunden?

Eine Erklärung dafür könnte die bei den Blitzlichtmessungen gefundene starke Ausbleichung von C20A und M15Δ18N sein. Während der Photokonversion kommt der Chromophor anscheinend etwas aus der Bindungstasche heraus und kann im Fall fehlender kovalenter Verknüpfung wegdiffundieren. Die kovalente Verknüpfung würde diese Diffusion verhindern und sorgt so für eine effiziente Photokonversion. Da der freie Chromophor in Lösung recht instabil ist, wird somit auch die Lebensdauer des Phytochrommoleküls erhöht. Weiterhin werden durch die Fixierung überflüssige Bewegungen des Chromophors vermieden, was wiederum zu einer effizienteren Photokonversion führt, obwohl diese Effizienz unter natürlichen Bedingungen keine so große Rolle zu spielen scheint. Bei Cph1 wurde in der Bindungstasche sogar ein Porphyrin gefunden (Fischer 2005) was verdeutlicht, wie tolerant die Bindungstasche gegenüber verschiedenen Substraten ist. Die kovalente Verknüpfung könnte also durch Bindung des Chromophors für einen Ausschluss anderer Substrate sorgen, durch dessen Bindung das Phytochrommolekül inaktiv werden würde.

Bei M15Δ18N war die Dunkelreversion im Vergleich zu FL und M15 stark beschleunigt (Nock 2007). Dies könnte ein weiterer Grund für eine kovalente Verknüpfung sein. Wenn auch bei der C20A Mutante eine schnelle Dunkelreversion gefunden würde, würde das dafür sprechen, dass der P_{fr}-Zustand durch die kovalente Verknüpfung stabilisiert wird. Damit würde sich die Lebensdauer des P_{fr}-Zustand erhöhen, was sich dann auf die Signaltransduktion auswirken würde. Leider stehen die Daten über die Dunkelreversion von C20A noch aus. Aber bei mit DTNB behandeltem Agp1, bei dem die Cysteinbindestelle durch das DTNB blockiert wurde, wurde auch eine beschleunigte Dunkelreversion beobachtet werden (persönliche Mitteilung Berthold Borucki). Ansonsten ist die Frage über den Sinn der kovalenten Verknüpfung des Chromophors noch offen.