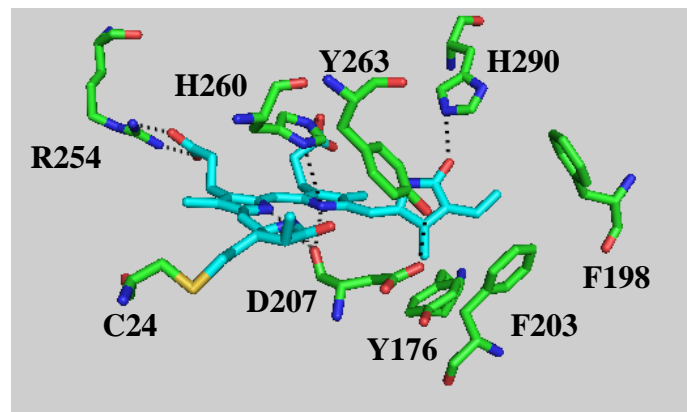


## 6. Funktionelle Gruppen in der Bindungstasche

Durch die Lösung der Kristallstruktur der  $P_r$  Form der „chromophor-bindung domain“ (CBD) des DrBphP Phytochroms des Bakteriums *Deinococcus radiodurans* (Wagner 2005) und des RpBphP Phytochroms von *Rhodospseudomonas palustris* (Yang 2007) wurde gezeigt, dass die an der Ausbildung der Protein-Chromophor Interaktionen beteiligten Aminosäuren der Bindungstasche in allen bekannten Phytochromsequenzen eine hohe Homologie aufweisen, obwohl die Sequenzhomologie ansonsten eher gering ist. Aufgrund der Konservierung dieser Aminosäuren kann man davon ausgehen, dass die Struktur der Bindungstasche, die Interaktionen mit dem Chromophor und der Mechanismus der Photokonversion für alle Phytochrome vergleichbar sind. In Abbildung 6.1 sind einige der streng konservierten Aminosäuren der Bindungstasche unter Einbeziehung einiger ihrer Wechselwirkung mit dem Chromophor dargestellt.



**Abbildung 6.1: Wechselwirkung von BV mit ausgewählten Aminosäuren der Bindungstasche von DrBphP**

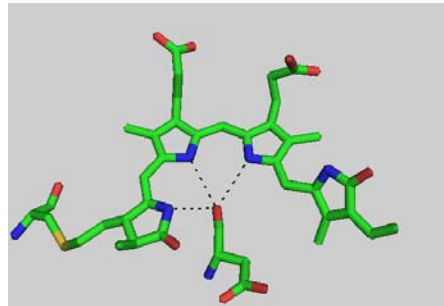
Darstellung des Chromophors BV und seine Wechselwirkungen (schwarze gestrichelte Linien) zu einigen streng konservierten Aminosäuren der Bindungstasche des DrBphP von *Deinococcus radiodurans* anhand des Eintrags 209B in der Protein Daten Bank (PDB: <http://pd-beta.rcsb.org/pdb/>). Die Farbe der Kohlenstoffatome des Chromophors sind türkis und ansonsten grün. Die Schwefelatome, Sauerstoffatome und Stickstoffatome sind gelb, rot und blau. Die Graphik wurde mit dem Programm PyMOL: <http://pymol.org/> erstellt.

Wie schon in Teilen dieser Arbeit und durch ergänzende Resonanz-Raman-Messungen gezeigt wurde, wird der Chromophor während Assemblierung auf einem der beiden mittleren Pyrrolstickstoffe protoniert und es kommt im Laufe der  $P_r$  nach  $P_{fr}$  Photokonversion zu einer transienten Deprotonierung des Chromophors. Der Aspartatrest D207 (Agp1: D197) und der Histidinrest H260 (H250) bilden Wasserstoffbrücken mit diesen beiden Pyrrolstickstoffen aus. Es liegt auf der Hand, dass diese beiden Aminosäuren zur Stabilisierung des protonierten Chromophors beitragen und auch bei der transienten Deprotonierung eine entscheidende Rolle spielen. Weiterhin zeigte der zu Y176 homologe Tyrosinrest von Cph1 (Agp1: Y166) bei Austausch durch einen Histidinrest eine geänderte Photochemie. Aus diesem Grund wurden in diesem Kapitel der Einfluss der Homologen Aminosäuren von D207 (197), H260 (H250) und Y176 (166) auf die photochromen Eigenschaften von Agp1 untersucht, wobei ein besonderes Augenmerk auf den Protonierungszustand des Chromophors gerichtet war.

### 6.1 Substitution des Aspartatrestes D197 durch Alanin

In der Kristallstruktur der CBD von DrBphP wurden 22 Aminosäuren gefunden, die innerhalb eines Radius von 4Å um den Chromophor liegen. Einer von ihnen ist der in allen Phytochrom-

men streng konservierte Aspartatrest D207 (Agp1: D197) (Abbildung 6.2). In Phycocyanin (Schirmer 1987), das spektral der P<sub>r</sub>-Form der Cyanobakteriellen Phytochrome gleicht, fungiert die Carboxylat Seitengruppe als Gegenion für den protonierten Chromophor PCB. Eine ähnliche Funktion des Aspartatrestes wird auch für Phytochrom angenommen, weshalb der Austausch durch Alanin zu einer erheblichen Störung der photochromen Eigenschaften führen sollte.

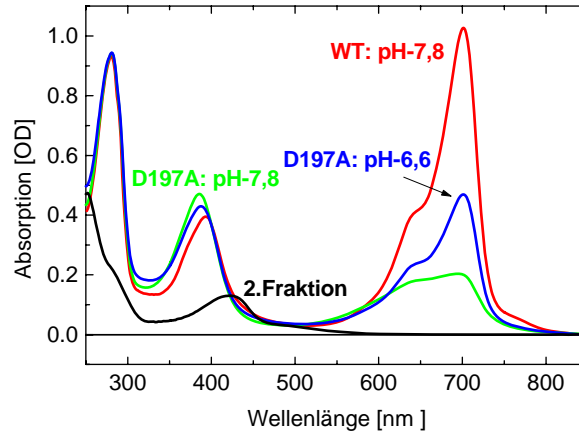


**Abbildung 6.2: Lage von Aspartats D207 zum Chromophor und seine Wechselwirkung mit diesem nach der in der PDB hinterlegten Kristallstruktur von DrBphP (209B)**

Die Expression von D197A (auf Basis von M15) und die Assemblierung mit BV wurde in der AG Lamparter durchgeführt (von Stetten 2007) und führte zu einem photochromen Addukt. Die Analyse mittels Zinkfluoreszenz zeigte, dass der Chromophor kovalent gebunden wurde. Allerdings deutet die im Vergleich zum WT (M15) verzögerte Assemblierung auf zurzeit unbekannte Effekte beim Einbau durch den Aminosäureaustausch hin (von Stetten 2007).

Beim Erwärmen einer gefrorenen Probe fiel eine größere Menge des Proteins als grüner Feststoff aus, was auf eine geringere Stabilität des Protein-Chromophor Komplexes im Vergleich zum WT schließen lässt, der wesentlich unempfindlicher gegenüber dieser Prozedur ist. Auffällig war, dass die Probe während des Auftauprozesses einen Farbwechsel von gelb im gefrorenen Zustand nach grün im flüssigen Zustand vollzog. Bei der chromatographischen Trennung (NAP-10, Sephadex G-fine) wurden zwei Fraktionen erhalten. Die erste grüne Fraktion enthielt das Holoprotein, während die zweite Fraktion ihr Absorptionsmaximum bei etwa 430 nm hatte, was wahrscheinlich auf Chromophorfragmente zurückzuführen ist (Abbildung 6.3 schwarze Kurve).

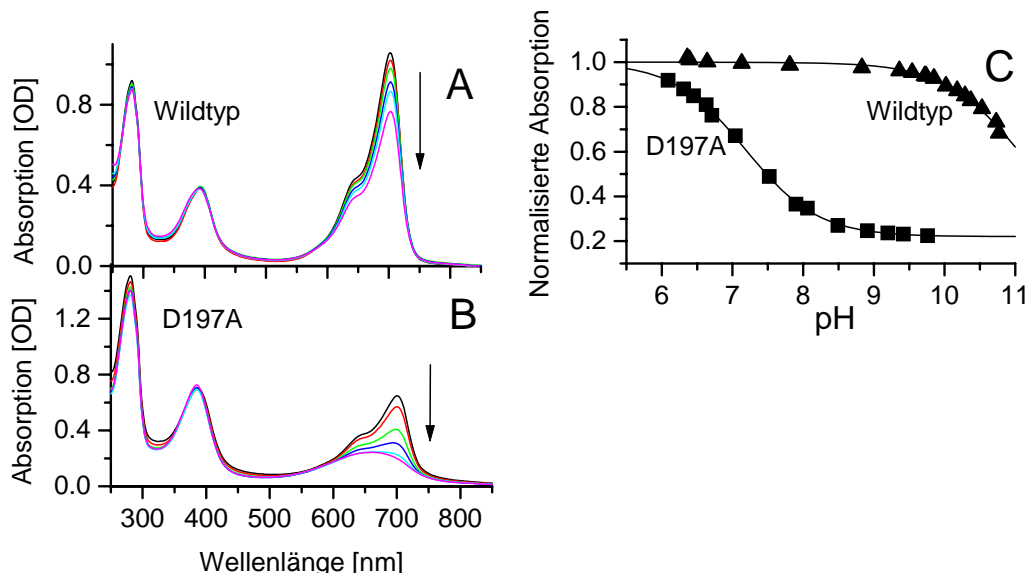
Die Elution erfolgte mit einer 50-mM-NaCl-Lösung ohne Pufferzusatz, was dazu führte, dass der pH-Wert des Eluats bei 6,6 lag. Wie der Vergleich mit dem auf die Absorption bei 280 nm skalierten Spektrums von M15-BV zeigt, weist D197A eine geringere Oszillatorstärke in der Q-Bande auf. Nach der Einstellung des pH-Werts auf 7,8 zeigte es sich, dass das Absorptionsspektrum stark pH-abhängig war. Aufgrund der geringeren Absorption in der Q-Bande bei dem höheren pH-Wert liegt die Oszillatorstärke der Q-Bande bei pH 7,8 nur noch bei etwa einem Viertel des WT und das Verhältnis der Absorption der Q- zur Soret-Bande, das beim WT ungefähr 2:1 beträgt, ist bei D197 umgekehrt (1:2). Weiterhin ist die Soret-Bande um etwa zehn nm kurzwellig zu der des WT verschoben und die pH-Wert Erniedrigung führt zu einer Verlagerung von Oszillatorstärke aus der Soret-Bande in die Q-Bande genau wie es auch bei der Assemblierung des WT beobachtet wird. Eine Erhöhung der Protonenkonzentration führt also zu einer Zunahme in der Absorption der Q-Bande, was darauf schließen lässt, dass der Chromophor protoniert wird. Das würde bedeuten, dass der pK-Wert dieser Protonierung bei D197A kleiner ist als beim WT.



**Abbildung 6.3: Absorptionsspektren von D197A nach chromatographischer Reinigung**

Absorptionsspektrum von Fraktion 1 nach der Reinigung mit einer Sephadex gefüllten Säule (D197A pH 6,6) und der zweiten Fraktion (schwarze Kurve). Absorptionsspektrum von D197A-BV nach Justierung des pH Wertes auf 7,8 (grüne Kurve) und des WT (M15, rote Kurve) bei pH 7,8. Die Kurve des WT wurde anhand der Absorption bei 280nm auf die von D197A skaliert. Bedingungen: 50 mM NaCl.

Zur Bestimmung des pK-Werts der Chromophorprotonierung wurde eine ungepufferte D197A-Lösung mit KOH titriert und bei mehreren pH-Werten ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Die Absorption der Q-Bande bei 702 nm wurde dann als Funktion des pH-Wertes aufgetragen und anschließend mit einer Henderson-Hasselbalch-Gleichung gefittet (Gl. 2.62). Der gefundene Wert von 7,2 liegt weit unter dem, der für den WT (11,1) gefunden wurde, was darauf schließen lässt, dass D197 für die Stabilität des protonierten Chromophors bei Agp1 von entscheidender Bedeutung ist.



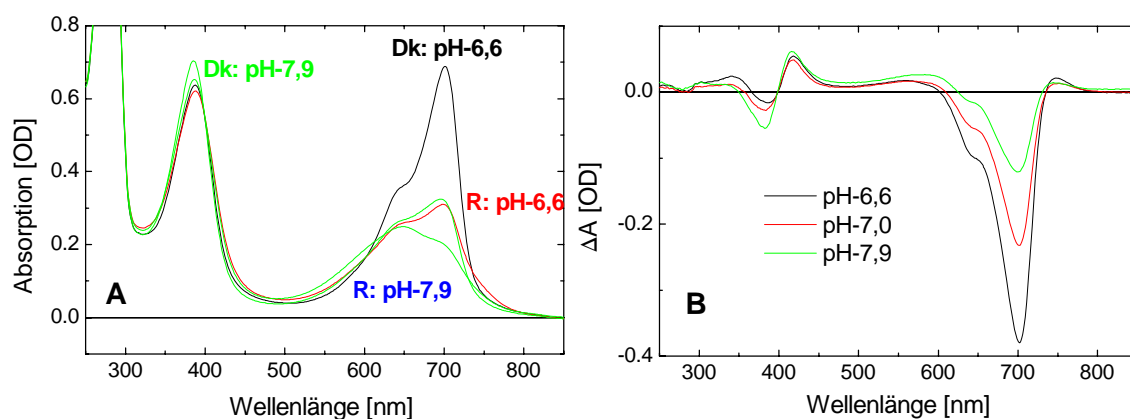
**Abbildung 6.4: pH-Abhängigkeit der Q-Bande von M15-BV und D197A-BV**

(A) Absorptionsspektren des Wildtyps (M15-BV) bei den pH-Werten 6,4; 8,9; 9,8; 10,2; 10,4 und 10,8. (B) Absorptionsspektren von D197A bei den pH-Werten 6,7; 7,1; 7,5; 7,9; 8,5 und 9,1. (C) Titrationskurve von Agp1-M15 und D197A. Die normalisierte Absorption der Q-Bande bei 702nm ist als Funktion des pH-Wertes aufgetragen. Der Fit mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung ergab für D197A eine pK von 7,2 und für den WT von 11,1 mit den Hill Koeffizienten von 0,85 und 0,88 für D197A und M15.

Etwa ab pH 9 wurde in den Absorptionsspektren von D197A keine Veränderung mehr beobachtet und die Spektren ähneln stark denen des freien Chromophors (BV), wobei das Ab-

sorptionsmaximums von D197A bei hohem pH im Vergleich zum freien Chromophor leicht kurzwellig verschoben ist (D197A: 650 nm; BV: 670 nm).

Die Exposition mit rotem Licht (LED: 680 nm) führt bei D197A zu einer Abnahme der Absorption in der Q-Bande. Wie man anhand der Absorptionsspektren (Abbildung 6.5 A) und anhand der Differenzspektren (Abbildung 6.5 B) beobachten kann, ist die Amplitude der Bleichung abhängig vom pH-Wert. Das Spektrum bei pH 6,6 nach sättigender roter Beleuchtung ist dem Dunkelspektrum bei pH 7,9 sehr ähnlich. Durch rote Beleuchtung bei pH 7,9 kann die Q-Bande noch weiter gebleicht werden, wobei ein Grad der Bleichung erreicht wird, der bei pH 6,6 auch durch längere Beleuchtung nicht erreicht wird. Dies spricht einerseits dafür, dass nur der protonierte Chromophor eine Photoreaktion zeigt, und andererseits, dass es ein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen Photoprodukt und Dunkelzustand gibt.

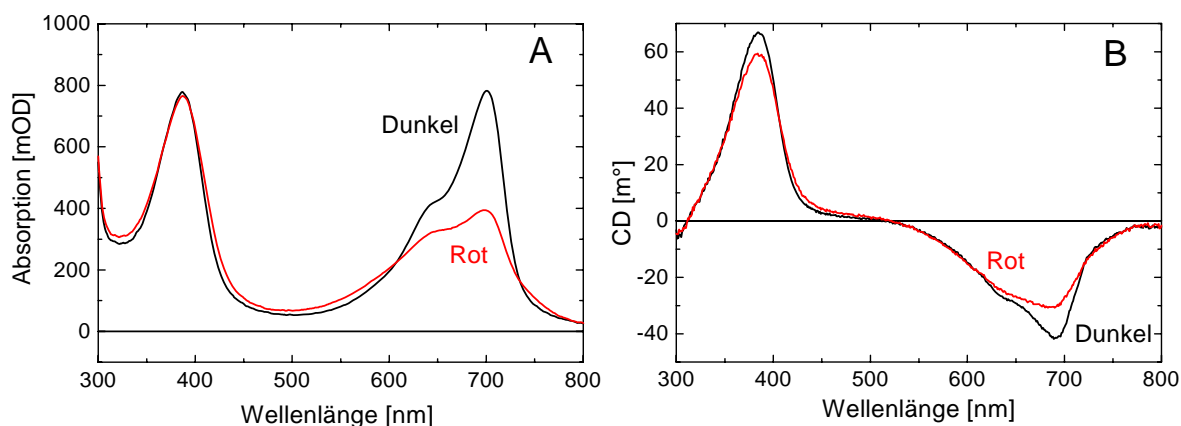


**Abbildung 6.5: Absorptions- und Differenzspektren von D197A-BV**

(A) Absorptionsspektren von D197A-BV im Dunkelzustand (Dk) und nach sättigender roter Beleuchtung (R) (LED 680 nm, zwei min) schwarz und die bei pH 7,9 grün dargestellt.

(B) Die Differenzspektren Rot-Dunkel bei den pH-Werten 6,6 (schwarz), 7,0 (rot) und 7,9 (grün). Bedingungen: 50 mM NaCl.

Das CD-Spektrum des Dunkelzustandes ähnelt was Vorzeichen und Form der Kurve angeht, dem CD-Spektrum des  $P_r$ -Zustandes des WT, was zu dem Schluss führt, dass die Chromophorgeometrie des Dunkelzustandes von D197A vergleichbar zu der des WT in  $P_r$  ist.



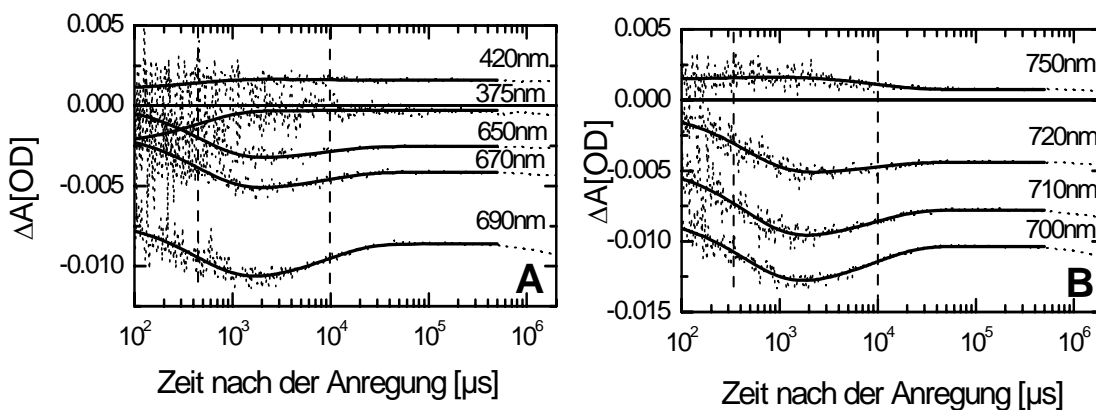
**Abbildung 6.6: Absorptions- und CD-Spektren von D197A**

(A) Absorptionsspektren von D197A des Dunkelzustandes und nach sättigender roter Beleuchtung (R= 680 nm)

(B) Die den Absorptionsspektren entsprechenden CD-Spektren. Bedingungen: 50 mM NaCl und pH 6,6

Durch die rote Beleuchtung kommt es zu einer Abnahme der Rotationsstärke in der Q-Bande, die in etwa der Absorptionsabnahme in den Absorptionsspektren entspricht. Die Absorption bei etwa 700 nm lässt darauf schließen, dass es sich hier um den Anteil des Dunkelzustands handelt. Aufgrund weiterer fehlender Änderungen scheint der Chromophor nach roter Beleuchtung eine vergleichbare Geometrie zu besitzen wie der Dunkelzustand.

Für genauere Aussagen über das Photoprodukt sollte die Kinetik der Photokonversion nach  $P_{fr}$  mittels Blitzlichtspektroskopie gemessen und mit der des WT verglichen werden. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Absorption wurden die transienten Messungen bei den pH-Werten 6,5; 7,0 und 7,8 durchgeführt. Wie schon beim arretierten Chromophor 5Zs konnte das Photoprodukt von D197A nicht durch Licht höherer oder niedriger Wellenlänge in den Ausgangszustand überführt werden. Aus diesem Grund wurde die Probe bei jedem Zyklus fünfmal hintereinander bei 695 nm angeregt und gemessen. Zwischen den Zyklen wurde die Probe für zehn Minuten im Dunkeln stehen gelassen, wobei sie aufgrund ihrer schnellen Dunkelreversion annähernd in den Dunkelzustand revertierte. Ein Vergleich zwischen einer Zeitspur mit einmaliger Anregung und einer mit der oben beschriebenen Vorgehensweise zeigte, dass es außer zu kleineren Amplituden zu keinen weiteren Änderungen im Verlauf der Zeitspuren kommt (Daten nicht gezeigt). Dass heißt durch die Anregung entstehen keine Photoprodukte, die die Kinetischen Messungen stören, sondern es kommt lediglich zu kleineren Amplituden, die auf die Entvölkerung des protonierten Zustandes zurückzuführen sind. In Abbildung 6.7 sind die Zeitspuren der Blitzlichtmessungen von D197A bei pH 6,5 gezeigt, bei dem der Chromophor nahezu vollständig protoniert vorliegen sollte.



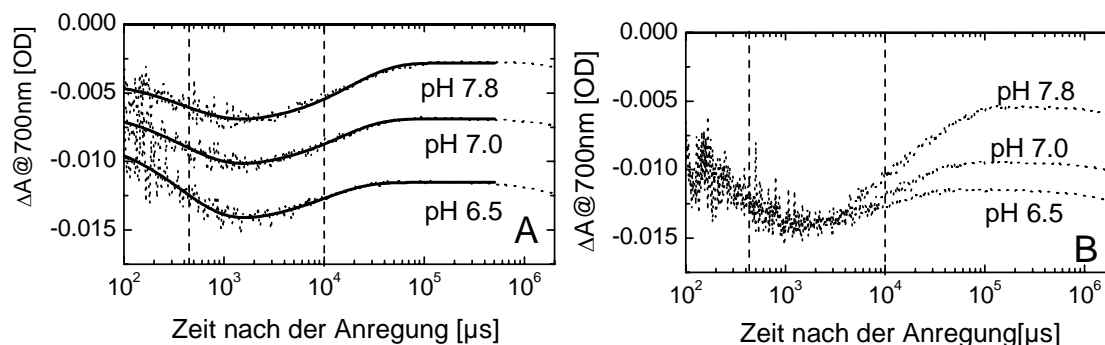
**Abbildung 6.7: Transiente Absorptionsänderungen von D197A bei pH 6,5 (20°C).**

Die Wellenlängen bei denen die Zeitspuren aufgenommen wurden sind in der Abbildung angegeben (gepunktete Kurven). Die Daten wurden simultan im Zeitbereich von 100  $\mu$ s bis 500 ms mit zwei Exponentialfunktionen gefittet (durchgezogene Linien). Die erhaltenen Zeitkonstanten (460  $\mu$ s und zehn ms) sind durch vertikale gestrichelte Linien dargestellt.

Die Absorptionsänderungen bei 700 nm betragen in etwa nur ein Fünftel von denen des WT bei pH 7,8, was auf eine geringere Quantenausbeute der Photokonversion des Dunkelzustandes von D197A schließen lässt. Aufgrund der kleineren Signale sind die Daten sehr verrauscht, wodurch die Interpretation der Daten zwischen 1 und 100  $\mu$ s erschwert wird. Beim WT konnten in diesem Zeitbereich für einige Wellenlänge die für die Lumi-R-Bildung charakteristischen Absorptionsänderungen beobachtet werden. Bei D197A können diese Änderungen nicht beobachtet werden (Ausschnitt nicht gezeigt). Insbesondere die positiven Signale bei Wellenlängen  $>720$  nm sind nicht zu verzeichnen, lediglich bei 750 nm kommt es ab 100  $\mu$ s zu einem leichten Anstieg in der Absorption.

Die entsprechenden Kurven bei den drei gemessenen pH-Werten unterscheiden sich lediglich in den Amplituden, zeigten aber ansonsten dieselben Absorptionsänderungen (siehe Abbil-

dung 6.8). Der simultane Fit der gemessenen Zeitspuren bei den drei pH-Werten zeigte, dass in den Zeitspuren zwei kinetische Komponenten stecken mit Zeitkonstanten zwischen 300-500  $\mu\text{s}$  ( $\tau_1$ ) und zehn bis 20ms ( $\tau_2$ ) (Tabelle 6.1). Die erste Komponente ist mit positiven Amplituden verbunden und reflektiert wohl die Bildung des Photoproduktes. Die zweite Komponente zeigt negative Komponenten die mit steigendem pH-Wert ansteigen (siehe Tabelle 6.1 und Abbildung 6.8).



**Abbildung 6.8: pH-Abhängigkeit der 700nm Zeitspuren von D197A**

(A) Transiente Absorptionsänderungen von D197A bei den angezeigten pH-Werten ( $T=20^\circ\text{C}$ ), gemessen bei 700 nm nach Blitzlichtanregung bei 695 nm (gepunktete Kurve). Jede Zeitspur wurde im Zeitbereich zwischen 100  $\mu\text{s}$  und 500 ms mit zwei Exponentialfunktionen gefittet (durchgezogenen Linien), woraus die Zeitkonstanten 430  $\mu\text{s}$  und 18 ms (pH 7,8), 410  $\mu\text{s}$  und 14 ms (pH 7,0) und 390  $\mu\text{s}$  und zehn ms (pH 6,5) erhalten wurden. (B) Zeigt die Zeitspuren von A nachdem sie auf die Bleichung bei  $\sim 2$  ms skaliert wurden. Die relative Amplitude der zweiten Komponente steigt dabei mit steigenden pH-Wert an, korrespondierend mit dem durch den pK-Wert 7,2 gegebenen Protonierungsgleichgewicht des Dunkelzustandes. Die Zeitkonstanten (Tabelle 6.1) sind durch vertikale Linien dargestellt.

	A1	$\tau_1$	A2	$\tau_2$	$\Delta A_{\text{max}}$	A2/ $\Delta A_{\text{max}}$
pH 6.5	0.0065	382 $\mu\text{s}$	-0.0031	10 ms	-0.0141	0.2207
pH 7.0	0.0047	369 $\mu\text{s}$	-0.0037	14 ms	-0.0101	0.3652
pH 7.8	0.004	302 $\mu\text{s}$	-0.0044	19 ms	-0.0069	0.6429

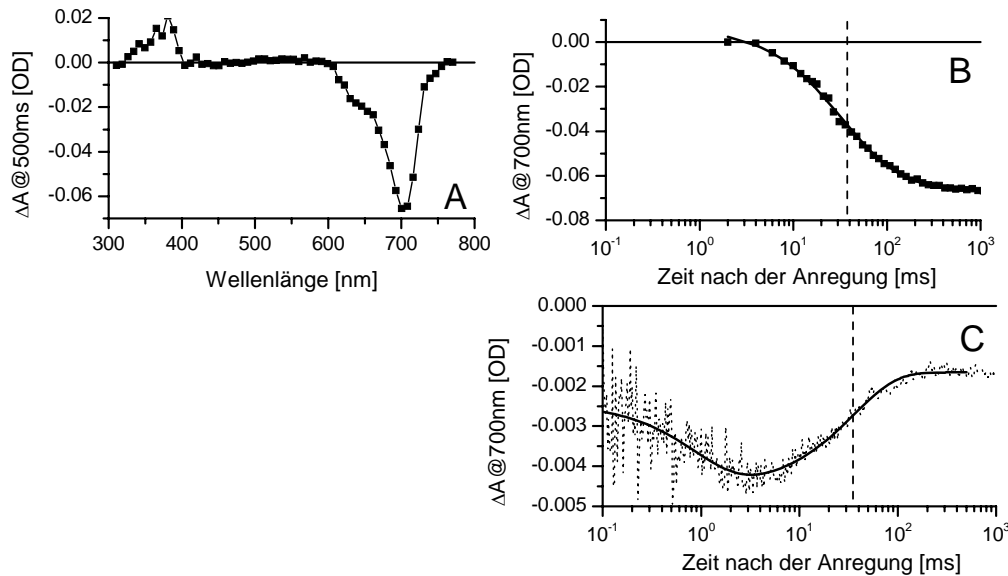
**Tabelle 6.1: Fit-Ergebnisse der 700 nm Zeitspuren bei verschiedenen pH-Werten**

Durch ein Stopped-Flow-Experiment (Abbildung 6.9), bei dem die Absorptionsänderungen nach einem pH-Sprung von 6,5 auf 7,9 gemessen wurden, wurde die Hypothese bestätigt, dass es sich bei der zweiten Komponente um eine Relaxation des Protonierungsgleichgewichtes des Chromophors im Dunkelzustand handelt, das durch die Blitzlichtanregung ausgelenkt wurde.

In Abbildung 6.9 B ist die Kinetik der Absorptionsänderung bei 700 nm nach dem pH-Sprung von 6,5 auf 7,9 dargestellt, die in etwa der zweiten Komponente des 700 nm Signals nach der Blitzlichtanregung bei pH 7,9 entspricht (Abbildung 6.9 C). Durch dieses Experiment wird nicht nur die Existenz des Protonierungsgleichgewichtes bestätigt, sondern es impliziert weiterhin, dass nur der protonierte Chromophor eine Photoreaktion zeigt.

Das bedeutet, dass bei D197A die Kinetik der Photokonversion nach  $P_{\text{fr}}$  nur aus einer Komponente ( $\tau_1 = 300\text{-}500 \mu\text{s}$ ) besteht. Die Zeitkonstante dieser Komponente stimmt in etwa mit der der Meta- $R_A$ -Bildung des WT überein (230  $\mu\text{s}$ ). Auch die Absorptionsänderungen bei den verschiedenen Wellenlängen weisen eine Ähnlichkeit zu denen der Meta- $R_A$ -Bildung beim WT auf, so dass die Möglichkeit besteht, dass es sich um einen der Meta- $R_A$ -Bildung des WT vergleichbaren Überganges handelt. Eine entsprechende Meta- $R_C$ - und  $P_{\text{fr}}$ -Bildung konnte bei

D197A jedoch nicht beobachtet werden, da die Kinetik nach dieser Komponente abbricht. Auch die mit der Meta-R<sub>C</sub>-Bildung einhergehenden Protonenabgabe konnte nicht beobachtet werden. Selbst bei pH 6,5, bei dem der Chromophor nahezu vollständig protoniert vorliegen sollte, konnte kein Protonensignal detektiert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass bei D197A kein Meta-R<sub>C</sub>-Intermediat gebildet wird.



**Abbildung 6.9: Relaxationskinetik des Protonierungsgleichgewichtes des Dunkelzustandes von D197A nach einem pH-Sprung von pH 6,5 nach 7,9**

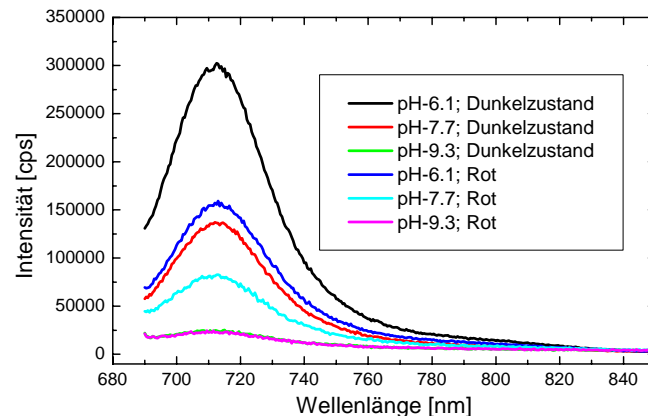
Die Daten wurden über neun Schüsse gemittelt. (A) zeigt die spektrale Änderung bei 500 ms. (B) die Kinetik der Absorptionsänderung bei 700 nm und (C) die Kinetik der transienten Absorptionsänderung bei 700 nm nach Blitzlichtanregung bei 695 nm für dieselbe Probe wie in A und B nach dem pH-Sprung (pH 7,9). Die vertikalen gestrichelten Linien in B und C markieren die gemeinsame Zeitkonstante von 35 ms. Bedingungen: D197A war in fünf mM Tris und 50 mM NaCl bei pH 6,5 gelöst und wurde 1:1 mit 100 mM Tris 50mM NaCl (pH 8,0) gemischt. Endkonzentration: 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10°C.

Die geringe Quantenausbeute der Photokonversion impliziert, dass die Anregungsenergie des Chromophors auf andere Art wieder abgegeben wird. Die Fluoreszenz Emissionsspektren nach Anregung bei 680 nm von D197A bei den drei pH Werten 6,1; 7,7 und 9,3 sind in Abbildung 6.10 dargestellt.

Im Vergleich zum WT zeigt D197A eine starke Fluoreszenz, die mit abnehmendem pH-Wert stärker wird. Nach roter Beleuchtung nimmt die Fluoreszenz ebenfalls ab. Geht man davon aus, dass wie bei den transienten Absorptionsmessungen nur der protonierte Zustand eine Photoreaktion zeigt, müsste die Fluoreszenz nach roter Beleuchtung, dem verbliebenen protonierten Zustand von D197A entsprechen. Mit steigendem pH, also geringerem Protonierungsgrad, nimmt nicht nur die Fluoreszenz, sondern auch die Amplitude zwischen Dunkelzustand und Photoprodukt ab. Bei pH 9,3, bei dem der Chromophor nahezu deprotoniert vorliegt, ist die Fluoreszenz nicht nur nahezu verschwunden, sondern es kann auch kein Unterschied zwischen Dunkelzustand und Photoprodukt festgestellt werden. Legt man die Absorption bei 680 nm zugrunde, liegt die Fluoreszenz in etwa im Bereich des 15Za-Chromophors, bei dem die Isomerisation durch die Arretierung verhindert wurde. Das Fluoreszenzmaximum liegt bei 713 nm was bedeutet, dass es bei D197A zu einem Stokes-Shift von 15 nm kommt, der in etwa doppelt so groß ist, wie der des WT und der bisher nur bei tiefen Temperaturen gefunden wurde, bei dem die Photoreaktion durch die Energiebarriere blockiert war. Es spricht also vieles dafür, dass die geringe Quantenausbeute der Photoreaktion eine Folge der



hohen Fluoreszenz ist, was wiederum die Frage aufwirft, ob es bei D197A überhaupt zur einer dem WT vergleichbaren Photoreaktion kommt.

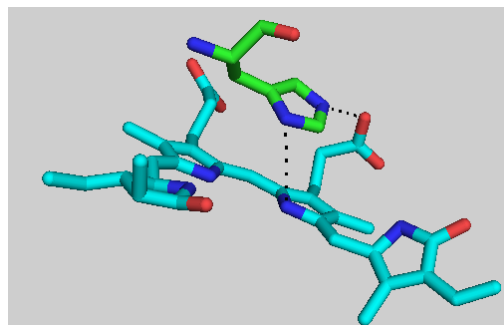


**Abbildung 6.10: Fluoreszenz-Emissionsspektren von D197A nach Anregung bei 680 nm**

Emissionsspektren bei den pH-Werten 6,1 7,7 und 9,3 des Dunkelzustandes und nach roter Beleuchtung nach Anregung bei 680nm von D197A. Die pH-Werte bei denen gemessen wurde sind in der Abbildung angegeben. Die Emissionen wurden auf die gleiche Absorption bei 680 nm normiert. In der Anregung wurde mit einer Spaltbreite von zwei nm ( $d = \text{vier mm}$ ) und in der Emission von zehn nm ( $d = \text{zehn mm}$ ) gemessen. Bedingungen: 20 mM Tris, 50mM NaCl.

### 6.2 Substitution des Histidinrestes H250 durch Alanin

Bei den Protonierungsschritten des Chromophors des Sensorrhodopsins spielen Histidine eine wichtige Rolle (Zhang 1997). In den beiden Kristallstrukturen der CBD des DrBphP und RpBphP3-Phytochroms wurden in der Bindungstasche mehrere konservierte Histidine lokalisiert (u.a. H260, H290). Für H260 wird prognostiziert, dass es an mehreren Wasserstoffbrücken beteiligt ist, die zur Stabilisierung des protonierten Chromophors führen.



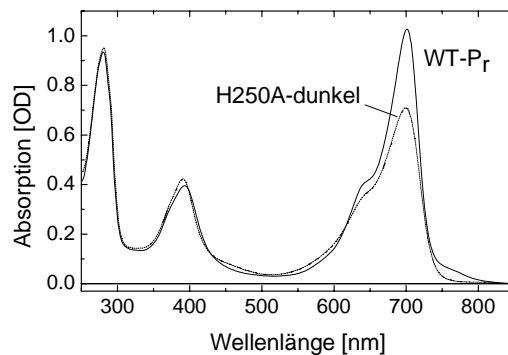
**Abbildung 6.11: Die Lage des Histidins H260 (Agp1: H250) zum Chromophor und seine Wechselwirkung mit diesem nach der in der PDB hinterlegten Kristallstruktur von DrBphP (209B)**

Ein Homologievergleich von 46 verschiedenen Phytochromsequenzen zeigte, dass es in allen Sequenzen einen homologen Histidinrest zu H260 von DrBphP gab. Weiterhin folgt dieses Histidin in der Sequenz bei den PCB und PΦB einbauenden Phytochromen direkt auf den für die kovalente Bindung des Chromophors notwendige Cystein. Aufgrund ihres fast neutralen pK-Wertes (6,0) sind Histidine ausgezeichnete Kandidaten für Protonentransferschritte und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken. Dies und der hohe Konservierungsgrad von H260 von DrBphP machen sie auch für Agp1 (H250) zu einem ausgezeichneten Untersuchungsge-



genstand. Der Austausch von H250 durch den aliphatischen Rest Alanin sollte jeglichen Protonentransfer und die Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindern. Wenn diese für die photochromen Eigenschaften von Agp1 wichtig sind, müsste die Punktmutante H250A schwere Defekte bei diesen aufweisen.

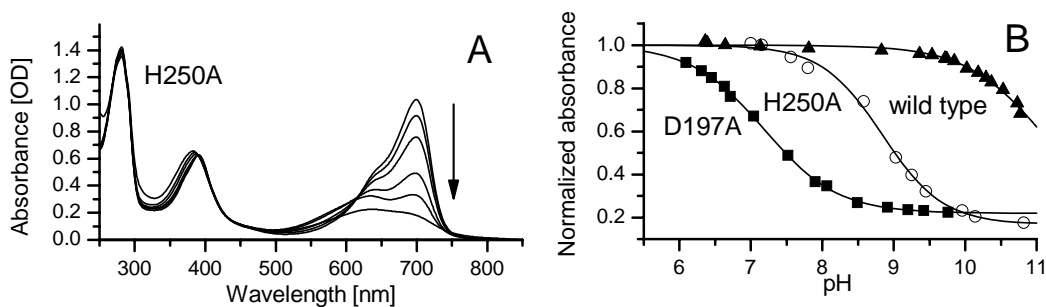
Wie D197A wurde auch H250A (auf M15 Basis) in der AG Lamparter exprimiert und gereinigt. Die Assemblierung mit BV erfolgte anders als bei D197A wesentlich schneller, war aber im Vergleich zum WT auch verzögert. Das Spektrum des im Dunkeln assemblierten BV-Adduktes von H250A weist vom Verlauf her alle Charakteristika des P<sub>r</sub>-Spektrums des WT auf (Abbildung 6.12). Der Vergleich zeigt, dass H250A eine geringere Oszillatorstärke in der Q-Bande hat und dass die Absorption der Soret-Bande beim WT etwas geringer ist.



**Abbildung 6.12: Vergleich der Absorptionsspektren von WT (M15-BV) und H250A-BV (M15)**

Das P<sub>r</sub>-Spektrum des WT wurde durch sättigender dunkelrote Beleuchtung (LD 785 nm) erhalten, während das Spektrum von H250A (gestrichelte Kurve) nach Assemblierung mit BV im Dunkeln gemessen wurde. Bedingungen: 50mM NaCl und pH 7,8.

Aufgrund der potenziellen Beteiligung von H250 zur Stabilisierung des protonierten Chromophors wurde die pH-Abhängigkeit der Absorption der Q-Bande analog zu der von D197A untersucht.



**Abbildung 6.13: pH-Abhängigkeit der Absorption der Q-Bande von H250A**

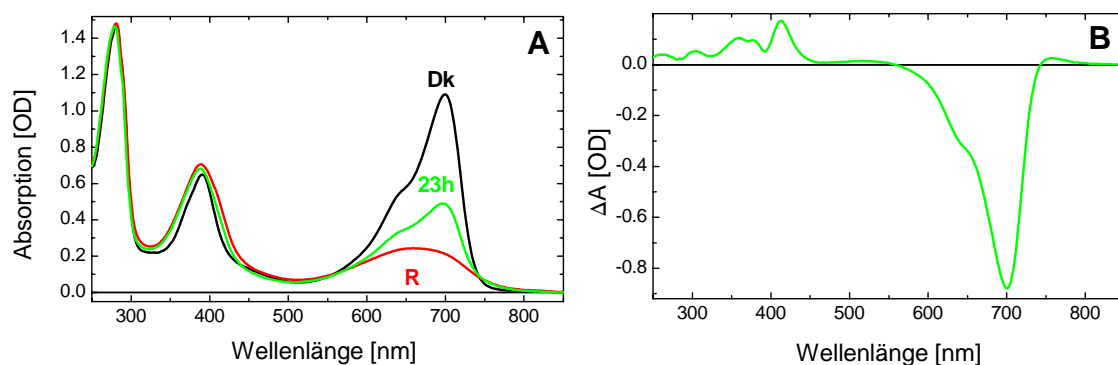
(A) Absorptionsspektren von mit BV assemblierten H250A (M15) bei den pH-Werten 7,0; 7,8; 8,6; 9,1; 9,5 und 10,8. Der Pfeil in Bild A zeigt die Richtung der Absorptionsabnahme an.

(B) Titrationskurven von WT (M15), D197A und H250A. Das normalisierte Absorptionsmaximum der Q-Bande ist als Funktion des pH-Wertes dargestellt. Die Kurven wurden mit einer Henderson-Hasselbalch Gleichung gefittet, wobei die pK-Wert 7,2 (D197A), 8,8 (H250A) und 11,1 (WT) erhalten wurden.

Nach Auftragen der Absorption der Q-Bande bei 702 nm als Funktion des pH-Wertes wurde für H250A eine vergleichbare Kurve wie bei D197A erhalten (Abbildung 6.13). Durch den Fit mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 2.6.2) wurde ein pK von 8,8 für

H250A erhalten, der damit zwischen dem von D197A (7,2) und dem WT (11,1) liegt (Abbildung 6.13 B).

Rotes Licht verursacht eine Bleichung der Q-Bande, wobei die Form der Q-Bande des Photoproduktes von H250A an den  $P_{bl}$ -Zustand von PhyA (Reiff 1985) und an das Photoprodukt von M20 von Agp1 (Kap. 4) erinnert. Die Soret-Bande des Photoproduktes ist im Vergleich zum Dunkelzustand stark verbreitert und weist eine höhere Absorption auf. Wie schon bei D197A kommt es auch bei H250A praktisch zu keiner Absorptionzunahme im Bereich um 750 nm, was besonders gut im Differenzspektrum zu beobachten ist.

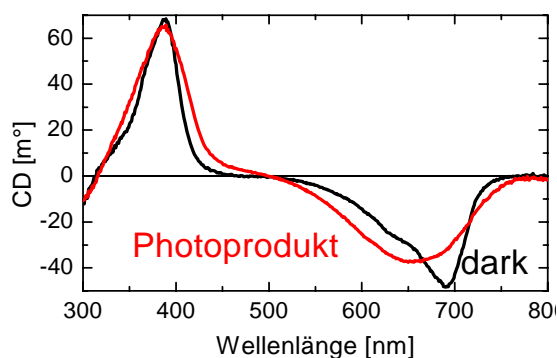


**Abbildung 6.14**

(A) Absorptionsspektrum des Dunkelzustandes (DK) von H250A und des Photoproduktes nach roter Beleuchtung (R). Die grüne Kurve ist das Absorptionsspektrum der rot beleuchteten Probe nach 23h Dunkelreversion. (B) Differenzspektrum des Photoproduktes und des Dunkelzustandes von H250A. Bedingungen: 50mM NaCl pH 7,8.

Anders als bei D197A ist die Dunkelreversion vom Photoprodukt in den Dunkelzustand sehr langsam. Während bei D197A bei pH 6,5 nach etwa 20 Minuten der Ausgangszustand erreicht war, ist bei H250A selbst nach 23 h erst ein geringer Teil des Ausgangszustandes erreicht (Abbildung 6.14 A grüne Kurve), was bedeutet, dass der Zustand nach roter Beleuchtung sehr stabil ist.

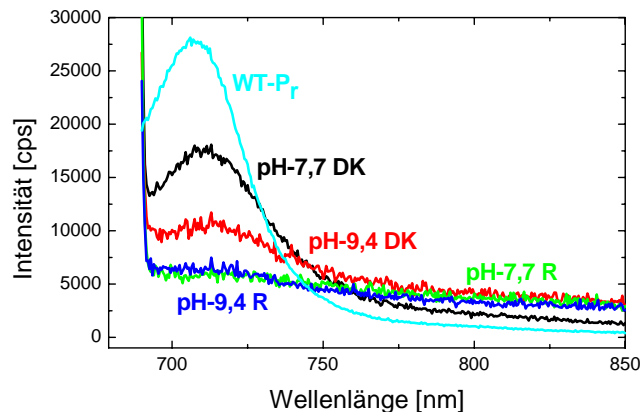
Das CD-Spektrum des Dunkelzustandes von H250A ähnelt wie schon bei D197A und M20 stark dem CD-Spektrum des  $P_r$ -Zustandes des WT (Abbildung 6.15). Das CD-Spektrum des Photoproduktes von H250A hat eine geringere Rotationsstärke in der Q-Bande und das Maximum ist kurzweilig verschoben. Insgesamt ist die Q-Bande verbreitert was zu einer leichten Zunahme der Rotationsstärke an beiden Flanken führt.



**Abbildung 6.15: CD-Spektren von H250A (M15) im Dunkelzustand und nach roter Beleuchtung (zwei min LED 680 nm) (Photoprodukt) bei pH 7,8 in 20mM Tris.**

Wie beim Absorptionsspektrum ist die 'Soret-Bande im Vergleich zum Dunkelzustand verbreitert. Im Vergleich zu D197A und M20 besteht die Q-Bande nur noch aus einer Spezies, während bei D197A und M20 angenommen wurde, dass der Peak im Bereich bei 700 nm auf den nicht angeregten Ausgangszustand zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass bei H250A die Photokonversion sehr effizient abläuft und mit nahezu 100% in das Photoprodukt überführt wird.

Für D197A zeigte es sich, dass die geringe Quantenausbeute der Photokonversion mit einer hohen Fluoreszenz einherging. Da bei H250A die Photokonversion anscheinend sehr effizient ist, würde das im Umkehrschluss bedeuten, dass die Fluoreszenz von H250A sehr gering sein müsste. Deshalb wurden die Emissionsspektren der H250A Mutante nach Anregung bei 680 nm bei den pH-Werten 7,7 und 9,4 für den Dunkelzustand und das Photoprodukt aufgenommen. Aus Abbildung 6.16 lässt sich entnehmen, dass die Fluoreszenz wie erwartet sehr gering ist. Der Vergleich mit der Fluoreszenz des P<sub>r</sub>-Zustandes des WT zeigt, dass sie sogar geringer ist als bei diesem. Wie schon bei D197A ist die Fluoreszenz pH-abhängig und scheint auch bei dieser Mutante mit dem Protonierungsgrad des Chromophors zu korrelieren. Die Fluoreszenz des Photoproduktes ist für beide pH-Werte nahezu null. Da das Photoprodukt auch keine Photoreaktion zeigt, muss die Desaktivierung des angeregten Zustandes auf einem strahlungsfreiem Weg erfolgen.



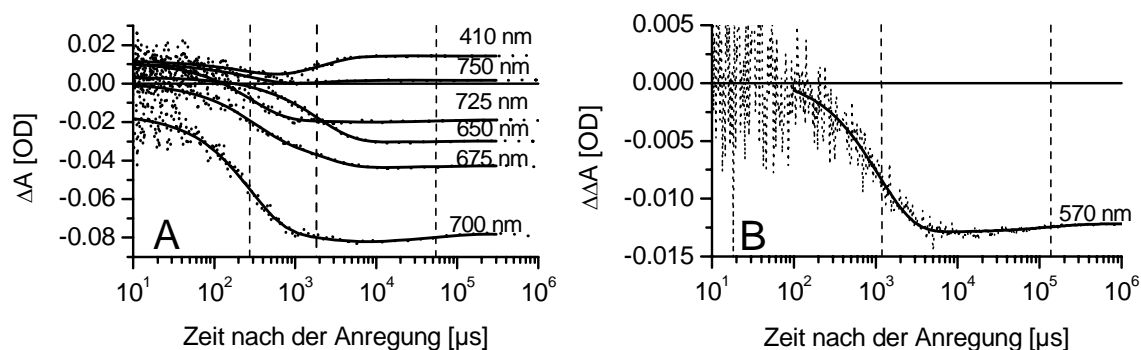
**Abbildung 6.16: Fluoreszenzemissionsspektren von H250A bei verschiedenen pH-Werten**

Fluoreszenzemissionsspektren von H250A bei den pH-Werten 7,7 und 9,4 des Dunkelzustandes und des Photoproduktes nach roter Beleuchtung nach Anregung bei 680 nm. Die Emissionen wurden auf die gleiche Absorption bei 680 nm normiert. In der Anregung wurde mit einer Spaltbreite von zwei nm ( $d = \text{vier mm}$ ) und in der Emission von zehn nm ( $d = \text{zehn mm}$ ) gemessen. Bedingungen: 20 mM Tris, 50m M NaCl.

Das Photoprodukt von H250A nach roter Beleuchtung unterscheidet sich stark von dem P<sub>fr</sub>-Zustand des WT. Deshalb war es interessant wie sich die Kinetik der transienten Absorptionsänderungen im Vergleich zum WT verhält. Dazu wurde die Kinetik mittels Blitzlichtphotolyse nach Laseranregung bei 695 nm untersucht. Aufgrund seiner langsamen Dunkelreversion und der Tatsache, dass keine Photoreversion möglich war, wurde die Probe bei jeder Wellenlänge nur einmal angeregt. Das heißt die Zeitspuren setzen sich, anders als bei vorherigen Messungen, nicht aus mehreren Anregungen zusammen, sondern sie repräsentieren die transienten Absorptionsänderungen nach einmaliger Anregung. Selbst bei dieser Art der Messung war, die Anzahl der Zeitspuren begrenzt, da mit jeder Anregung ein Teil der Probe in das Photoprodukt überführt wurde, was die Ausgangskonzentration bei den weiteren Messungen herabsetzte.

In Abbildung 6.17 A sind einige der Zeitspuren bei den angezeigten Wellenlängen dargestellt. Anders als bei D197A ähnelt die Kinetik von H250A mehr der des WT. Trotz des starken Rauschens, das seine Ursache in der Einzelanregung hat, können im Bereich zwischen zehn

und 100  $\mu\text{s}$  die für den Lumi-R-Zustand des WT charakteristischen Absorptionsänderungen beobachtet werden. Für den simultanen Fit der Zeitspuren wurden drei Exponentialfunktionen benötigt mit den Zeitkonstanten 280  $\mu\text{s}$ , zwei ms und 50 ms. Dabei ähneln die beiden ersten Übergänge bei 280  $\mu\text{s}$  und zwei ms sehr stark denen der Meta- $R_C$ -Bildung des WT. Allerdings fehlt die beim WT beobachtete Absorptionzunahme bei den Wellenlänge  $>720$  nm, so dass die Kinetik der beiden Übergänge nicht identisch ist mit denen der Meta- $R_C$ -Bildung des WT. Die 50 ms Komponente scheint analog zu der zweiten Komponente von D197A eine Relaxationskomponente zu sein, bei der es zu einer Wiederherstellung des durch die Laseranregung gestörten Protonierungsgleichgewichtes des Chromophors im  $P_r$ -Zustand kommt.



**Abbildung 6.17: Transiente Absorptionsänderungen von H250A und transientes Farbstoffsignal von Kresolrot bei 570nm**

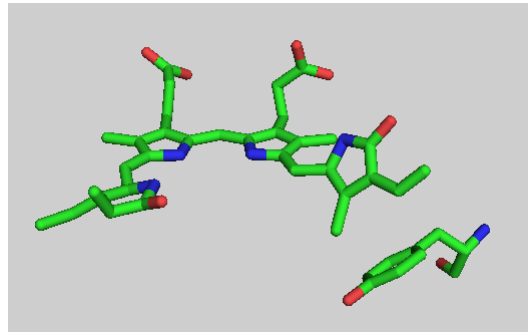
(A) Transiente Absorptionsänderungen von H250A bei pH 7,8 bei den angezeigten Wellenlängen nach Laseranregung bei 695 nm (gepunktete Kurven). Die Zeitspuren wurden im Zeitbereich zwischen zehn  $\mu\text{s}$  und 300 ms simultan mit drei Exponentialfunktionen gefittet (gepunktete Kurven), wobei die durch vertikale gestrichelte Linien markierten Zeitkonstanten von 280  $\mu\text{s}$ , zwei ms und 50 ms erhalten wurden. (B) Farbstoffsignal (Kresolrot) nach Laseranregung bei 695 nm von H250A nach Korrektur auf Anregung des Proteins. Der Fit mit zwei Exponentialfunktionen (durchgezogenen Linie) ergab die durch die vertikalen gestrichelten Linien markierten Zeitkonstanten von 1,1 und 140 ms.

Bei H250A konnte im Gegensatz zu D197A eine Absorptionsänderung des pH-Indikators Kresolrot bei 570 nm nach Laseranregung bei 695 nm beobachtet werden (Abbildung 6.17B). Mit etwa 1,1 ms erfolgt eine Protonenabgabe ins Medium und korreliert damit ziemlich gut mit der zweiten Komponenten (zwei ms) der Kinetik von H250A und mit der Protonenabgabe des WT ( $\sim$ drei ms). Allerdings konnte anders als beim WT keine relevante Protonenaufnahme beobachtet werden, was mit der Beobachtung im Einklang steht, dass es bei H250A zu keiner  $P_{fr}$ -Bildung kommt. Aufgrund der transienten Absorptionsänderungen und der Tatsache, dass mit 1,1 ms eine Protonenabgabe erfolgt, lassen den Schluss zu, dass das Photoprodukt von H250A dem Meta- $R_C$ -Zustand des WT recht ähnlich sein sollte. Der Austausch von H250 hat also nicht so weit reichende Folgen auf die Photochromen Eigenschaften und die Kinetik der  $P_{fr}$ -Photokonversion wie die der D197A Mutante. Während bei D197A nicht völlig klar ist, ob nach der Anregung bei 695 nm überhaupt Intermediate der Kinetik des WT durchlaufen werden, verläuft die Kinetik von H250A fast bis zum Meta- $R_C$ -Intermediat wie beim WT. Nichtsdestotrotz gibt es zwischen beiden Mutanten einige Gemeinsamkeiten, die auf einen vergleichbaren Einfluss hindeuten.

### 6.3 Substitution des Tyrosinrestes Y166 durch Histidin

Auf der Suche nach spezifischen Aminosäureresten im Apoprotein der Phytochrome, die für das spektrale Feintuning und die photochemische Aktivität verantwortlich sind fand Lagarias, dass durch die Substitution von Y176 (Agp1: Y166) durch Histidin beim cyanobakteriellen

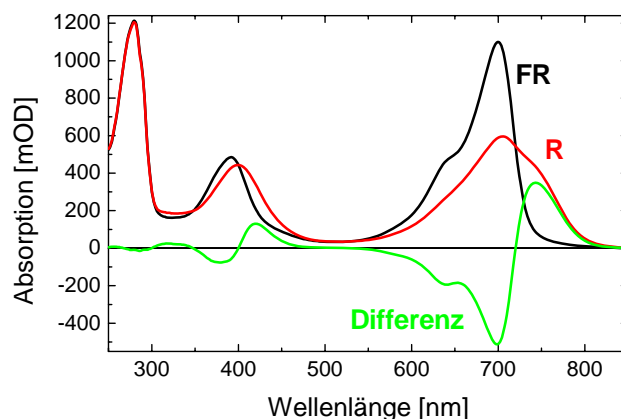
Phytochrom Cph1 die Photoreaktion zugunsten der Fluoreszenz stark herabgesetzt ist (Fischer 2004). In den beiden gelösten Kristallstrukturen der CBD des DrBphP und RpBphP3 Phytochroms ist dieser Tyrosinrest Bestandteil der Umgebung von Ring D in der Bindungstasche. Zusammen mit anderen Aminosäuren bildet er eine Art Höhle, in der es genug Platz für die notwendige Z/E-Isomerisierung des Chromophors gibt. Bei Agp1 befindet sich die homologe AS auf Position 166. Da bei Cph1 die Photoreaktion durch die Substitution stark eingeschränkt war konnte man annehmen, dass dieses Tyrosin eine Schlüsselaminosäure für die Photoreaktion ist. Durch spektrale und kinetische Untersuchungen an der analogen Substitution Y166H bei Agp1 sollte diese Hypothese näher untersucht werden.



**Abbildung 6.18:** Die Lage des Tyrosins Y176 (Agp1: Y166) zum Chromophor nach der in der PDB hinterlegten Kristallstruktur von DrBphP (209B)

Bei Expression von Y166A (auf M15 Basis) und bei der Assemblierung von BV wurden keine Unterschiede gegenüber dem WT festgestellt. Die Assemblierung mit BV im Dunkeln führt spektral zu einem  $P_r$  ähnlichen Addukt mit einem Absorptionsmaximum bei 700 nm. Das R/B-Verhältnis (Q-/Soret-Bande) ist mit dem des WT vergleichbar. Die Oszillatorstärke der Q-Bande im Vergleich zur Absorption bei 280 nm ist bei Y166H kleiner ( $<1$ ) als beim WT ( $>1$ ). Das zeigt, dass die Substitution von Y166H Auswirkungen auf die Wechselwirkungen des Chromophors mit den Aminosäuren der Bindungstasche hat, infolge dessen es zu einer geringeren Oszillatorstärke in der Q-Bande kommt.

Sättigende rote Beleuchtung (LED 680 nm) führt zu einem  $P_{fr}$  ähnlichen Spektrum, das allerdings im Vergleich zum WT einen höheren  $P_r$  Anteil zu besitzen scheint (Abbildung 6.19 + 6.21), wie man anhand der starken Absorption bei 700 nm sehen kann.

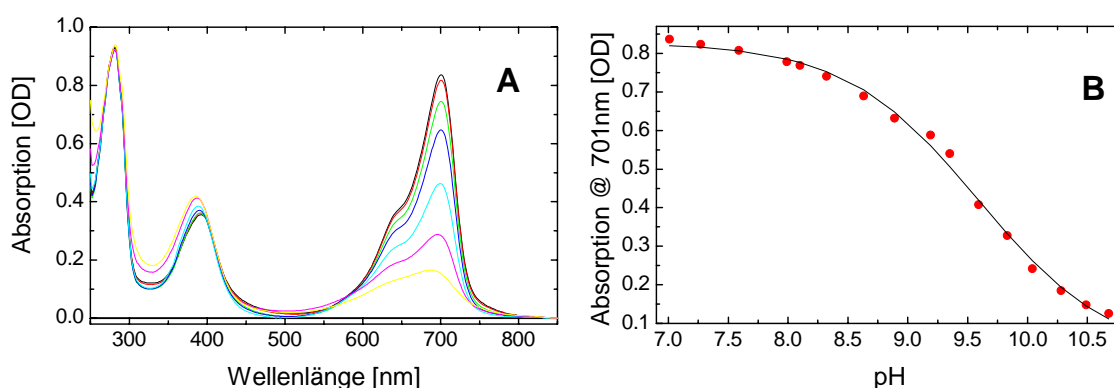


**Abbildung 6.19: Absorptions- und Differenzspektren von Agp1-Y166H**

Absorptionsspektren von Y166H nach dunkelroter Beleuchtung (FR) und nach roter Beleuchtung (R). Die grüne Kurve ist das Differenzspektrum von R-FR. Bedingungen: zehn mM NaPP, Y166H, pH 7,8.

Auch das Verhältnis der beiden Banden im Differenzspektrum ist auf die Seite der  $P_r$ -Bande verschoben, was auf eine geringere  $P_{fr}$ -Bildung oder auf einen geringeren Extinktionskoeffizienten der  $P_{fr}$ -Form von Y166H schließen lässt. Das würde bedeuten, dass die Photokonversion nach  $P_{fr}$  nicht so effizient ist wie beim WT.

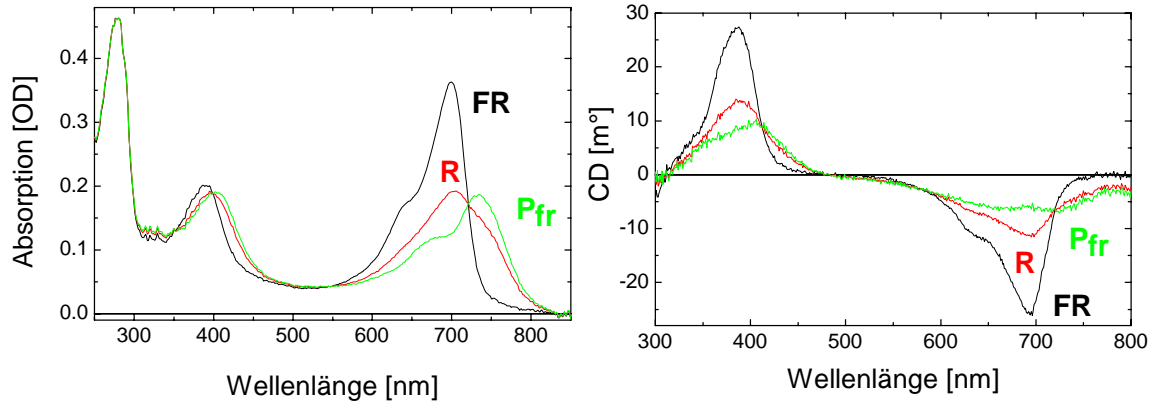
Aufgrund der gemachten Erfahrungen, dass sich der pK-Wert des protonierten Chromophors durch Substitution einzelner Aminosäuren der Bindungstasche ändert, und der Tatsache, dass Y166H im  $P_r$ -Spektrum eine reduzierte Oszillatorstärke in der Q-Bande aufweist, wurde die pH-Abhängigkeit der Absorption in einer ungepufferten 200 mM NaCl Lösung durch eine Titration im Dunkeln untersucht. In Abbildung 6.20 A sind die Absorptionsspektren bei einigen ausgewählten pH-Werten dargestellt und in Abbildung 6.20 B ist die Absorption der Q-Bande bei 702 nm als Funktion des pH-Wertes aufgetragen. Der durch den Fit erhaltene pK-Wert lag bei 9,6. Wie schon bei den beiden Punktmutanten D197A und H250A ist der pK-Wert des protonierten Chromophors im Dunkelzustand durch die Substitution Y166H verringert.



**Abbildung 6.20: pH-Abhängigkeit der Absorption der Q-Bande der Y166H Mutante von Agp1**  
**(A)** Absorptionsspektren von Y166H-BV (M15-BV) bei den pH Werten 7,0; 8,0; 8,6; 9,2; 9,6; 10,0 und 10,7.  
**(B)** Titrationskurve von Y166H. Die normalisierte Absorption des Maximums der Q-Bande ist als Funktion des pH Wertes aufgetragen. Der Fit mit der Henderson-Hasselbalch Gleichung ergab für Y166H einen pK von 9,6 (WT-11,1). Bedingungen: 200 mM NaCl.

Das CD-Spektrum des dunkelrot beleuchteten Zustandes von Y166H gleicht was Verlauf und Rotationsstärke angeht dem des  $P_r$ -Zustandes des WT (Abbildung 6.21). Auch das Verhältnis der beiden Banden zueinander liegt bei etwa 1:1 (WT: 1:1). Sättigende rote Beleuchtung führt wie im Fall der Absorptionsspektren zu einem CD-Spektrum, in dem noch ein erheblicher  $P_r$ -Anteil steckt. Mit der Annahme, dass im Spektrum nach dunkelroter Beleuchtung (FR) etwa 98 Prozent  $P_r$  und im Spektrum nach roter Beleuchtung (R) etwa 28 Prozent  $P_r$  enthalten sind, wurde ein „reines“  $P_{fr}$ -Spektrum berechnet, das dem  $P_{fr}$ -Spektrum des WT sehr nahe kommt. Beim WT wurde eine gute Näherung durch die Annahme erreicht, dass der  $P_r$ -Anteil nach roter Beleuchtung noch 15 Prozent beträgt. Das berechnete CD-Spektrum des reinen  $P_{fr}$ -Zustandes von Y166H weist vor allem in der Soret-Bande einige Unterschiede zum WT auf.

Dies deutet darauf hin, dass es durch die Substitution zu Änderungen der elektronischen Wechselwirkungen im  $P_{fr}$ -Zustand kommt, die zu einem veränderten Spektrum führen. Da aber gerade in der Q-Bande die CD- und Absorptionsspektren große Übereinstimmungen mit denen des WT aufweisen, scheint es sich bei Y166H nicht um eine substantielle Störung zu handeln.

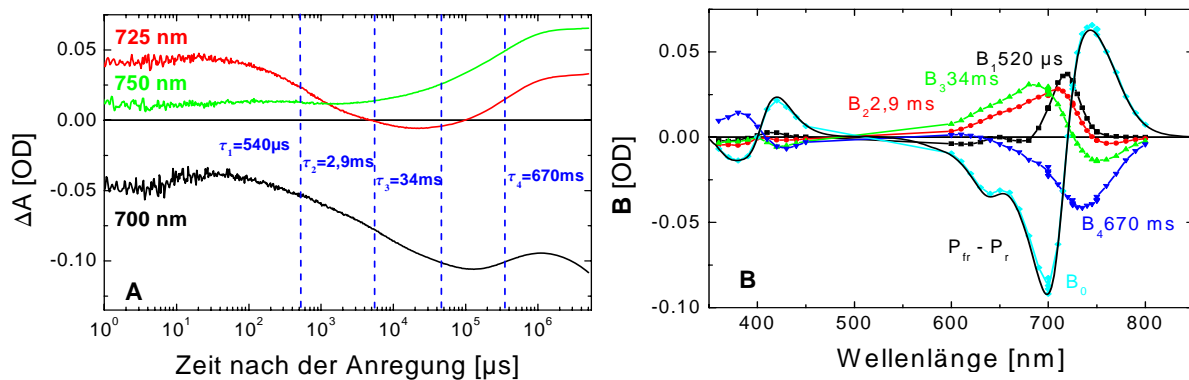


**Abbildung 6.21: Absorptions- und CD-Spektren der Y166H Mutante von Agp1**

(A) Absorptionsspektren des dunkelrot (FR) und rot (R) beleuchteten Zustands von Y166H. In grün ist das berechnete Spektrum für den reinen  $P_{fr}$  Zustand gezeigt unter der Annahme das in FR 98% und in R 28%  $P_r$  enthalten sind.

(B) CD-Spektren nach dunkelroter (FR) und roter (R) Beleuchtung von Y166H. In grün das analog zum Absorptionsspektrum berechnete CD-Spektrum des reinen  $P_{fr}$  Zustandes. Bedingungen: 20mM Tris 50mM NaCl, pH 7,8. Die Absorptionsspektren wurden bei einer Schichtdicke von 5mm und die CD-Spektren mit einer Schichtdicke von 1cm aufgenommen.

Anhand der Absorptions- und CD-Spektren kann man sehen, dass die Photokonversion von Y166H nach  $P_{fr}$  nicht so effizient ist wie beim WT und dass es zu geringen Abweichungen in den spektralen Eigenschaften kommt. Aus diesem Grund wurden analog zum WT die Absorptionsänderungen nach Laseranregung bei 640 nm zwischen einer  $\mu$ s und fünf s gemessen. Die erhaltenen Zeitspuren zeigten, was den Verlauf angeht, große Ähnlichkeit mit denen des WT (Abbildung 6.22 A). So können zwischen zehn und 100  $\mu$ s die für den Lumi-R-Zustand charakteristischen Absorptionsänderungen beobachtet werden.



**Abbildung 6.22: Zeitspuren bei 700, 725 und 750 nm und Amplitudenspektren von Y166H**

(A) Die transienten Absorptionsänderungen bei den Wellenlänge 700, 725 und 750nm von Y166H nach Laseranregung bei 695nm. Die vertikalen gestrichelten Linien zeigen die Zeitkonstante des globalen Fits der Zeitkurven, die nach der SVD Zerlegung erhalten wurden.

(B) Die aus den SVD-Basispektren und den Amplituden des Fits der Zeitspuren berechneten Amplitudenspektren,  $B_1$ - $B_4$  der vier Komponenten.  $B_0$  ist das extrapolierte Endspektrum und die schwarze durchgezogene Kurve ist das skalierte Differenzspektrum  $P_{fr}-P_r$ .

Bei der genaueren Analyse mittels SVD-Zerlegung und simultanen Fit wurden jedoch vier spektrale Übergänge gefunden mit den Zeitkonstanten  $\tau_1=540 \mu$ s,  $\tau_2=2,9$  ms  $\tau_3=34$  ms und  $\tau_4=670$  ms. Die Amplitudenspektren der 540  $\mu$ s Komponente und der 670 ms Komponenten ähneln denen der Meta- $R_A$ -Bildung ( $\tau_1=260 \mu$ s) und  $P_{fr}$ -Bildung ( $\tau_3=209$  ms) des WT, was auf vergleichbare Änderungen bei diesen Übergängen schließen lässt (Abbildung 6.22 und 6.23).

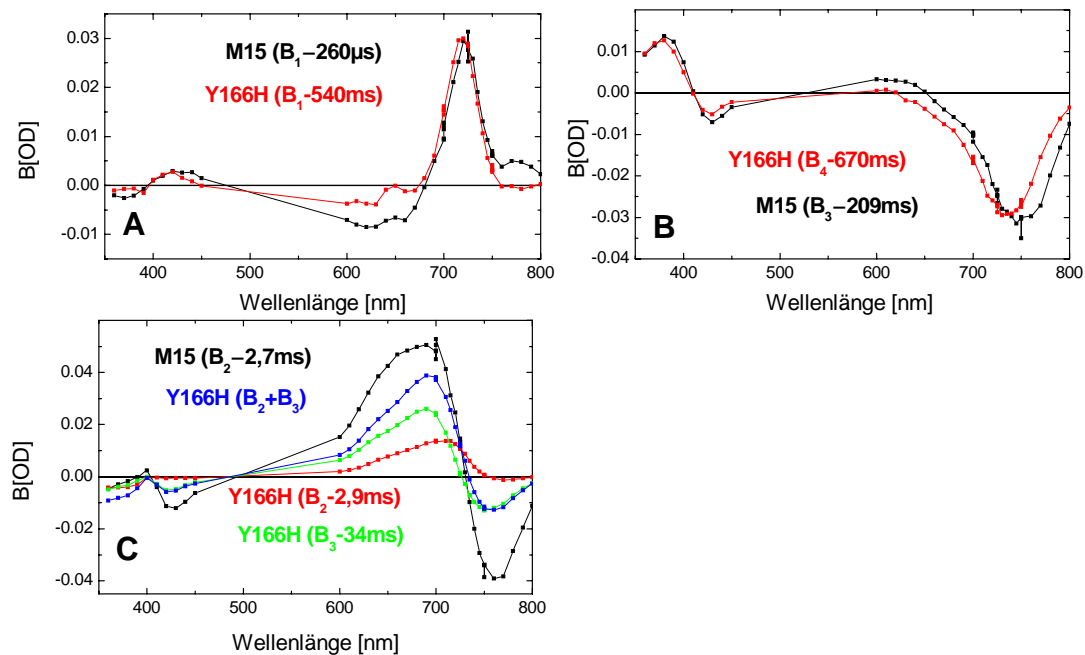


## 6. Funktionelle Gruppen in der Bindungstasche

Die Kinetik beider Übergänge ist durch die Substitution des Tyrosins verlangsamt (Zeiten in Abbildung 6.23), im Falle der  $P_{fr}$ -Bildung sogar um den Faktor 3.

Der Vergleich der jeweiligen Amplituden mit den entsprechenden des WT, zeigte dass sich diese in etwa entsprechen. Das bedeutet, dass die beiden Amplitudenspektren  $B_2$  und  $B_3$  von Y166H der Meta- $R_C$ -Bildung des WT entsprechen.

Wie in Abbildung 6.23 C gezeigt, führt die Addition der beiden Amplituden  $B_2$  und  $B_3$  von Y166H zu einer Amplitude die der Amplitude  $B_2$  des WT gleicht (Abbildung 6.23 C). Die Meta- $R_C$ -Bildung von Y166H verläuft also anders als der WT über zwei spektrale Übergänge. Während die Zeitkonstante des zweiten Überganges von Y166H (2,9 ms) in etwa der der Meta- $R_C$ -Bildung des WT entspricht (3,1 ms) ist die Zeit des dritten Überganges um einen Faktor 10 größer (34 ms).



**Abbildung 6.23: Vergleich der Amplitudenspektren von Y166H und WT (M15)**

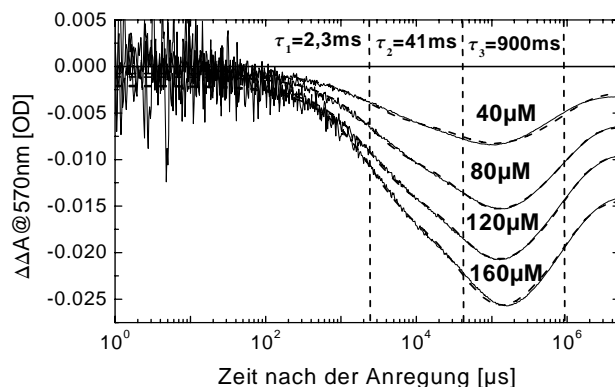
(A) Vergleich der Amplitudenspektren  $\tau_1$  von WT und  $\tau_1$  von Y166H. (B) Vergleich der Amplitudenspektren  $\tau_3$  des WT und  $\tau_4$  von Y166H. (C) Vergleich der Amplitudenspektren  $\tau_2$  des WT mit  $\tau_2$  und  $\tau_3$  von Y166H und der Summe von  $\tau_2$  und  $\tau_3$  von Y166H.

Die Amplitudenspektren wurden nach SVD-Zerlegung der Zeitkurven des WT und Y166H aus den Amplituden des Fits der Zeitspuren und den Basisspektren berechnet. Die Zeitspuren von Y166H wurden mit 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8 und  $T=20^\circ\text{C}$  angefertigt und die des WT mit 20 mM Tris, pH 7,8 und  $T=20^\circ\text{C}$ .

Beim WT war die Meta- $R_C$ -Bildung mit einer Protonenabgabe ins Medium verbunden. Aufgrund der Tatsache, dass die Meta- $R_C$ -Bildung bei Y166H über zwei Übergänge verläuft, war es interessant die Protonierungsänderungen von Y166H nach Anregung im roten Spektralbereich zu untersuchen. Wie das reine Protonensignal in Abbildung 6.24 zeigt wurde auch für Y166H eine Protonenabgabe gefunden auf die eine teilweise Wiederaufnahme folgt.

Anders als beim WT wurden für den Fit des Farbstoffsignals drei Exponentialfunktionen benötigt. Die Protonenabgabe erfolgt mit zwei Übergängen mit den Zeitkonstanten  $\tau_1=2,3\text{ms}$ ,  $\tau_2=41\text{ms}$ , die hervorragend mit den beiden Zeiten des zweiten und dritten Überganges übereinstimmen. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass es bei Y166H zur Ausbildung eines Meta- $R_C$  ähnlichen Zustands kommt, der allerdings anders als beim WT über zwei Übergänge verläuft, bei denen in beiden Fällen eine Protonenabgabe erfolgt. Nach einer Abschätzung wird auch in diesem Fall etwa ein Proton pro konvertiertem Molekül Y166H abge-

geben. Die Protonenaufnahme erfolgt mit etwa 900 ms und beträgt wie beim WT etwa 50 Prozent der vorher abgegebenen Menge. Wie schon bei den vorherigen Messungen ist der letzte Übergang in Anwesenheit des Farbstoffes Kresolrot stark verzögert. Bis auf die Aufspaltung der Protonenabgabe wird für Y166H also ein dem WT vergleichbares Muster der Protonenänderung im Medium gefunden.



**Abbildung 6.24: Transientes Farbstoffsignal von Kresolrot bei 570nm von Y166H**

Die auf die Proteinkonzentration von Agp1-M15-Y166H korrigierten transienten Absorptionsänderungen des Farbstoffs Kresolrot bei 570 nm bei verschiedenen Farbstoffkonzentrationen 40, 80, 120 und 160  $\mu\text{M}$ . Die Zeitkonstanten des Fits dieser Kurven werden durch die gestrichelten vertikalen Kurven dargestellt. Bedingungen: 50 mM NaCl pH 7,8.

Bei Untersuchung der pH-Abhängigkeit der  $P_r/P_{fr}$ -Kinetik von Y166H bei den pH-Werten 6,6 und 9,2 zeigten alle Raten dieselbe pH-Abhängigkeit wie der WT. Die Erhöhung des pH-Wertes führt zu einer Beschleunigung des ersten Überganges und zu einer Verlangsamung der  $P_{fr}$ -Bildung. Der zweite und dritte Übergang, die der Meta- $R_C$ -Bildung des WT entsprechen, weisen beide eine Beschleunigung durch die pH-Wert Erhöhung auf. Das heißt beide Übergänge werden, wie die Meta- $R_C$ -Bildung des WT, bei geringerer Protonenkonzentration im Medium beschleunigt, was für den gleichen ratenlimitierenden Protonentransferschritt der beiden Übergänge spricht.

pH-Wert	$\tau_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	$\tau_2$ [ms]	$\tau_3$ [ms]	$\tau_4$ [ms]
6,6	725	12	70	203
7,8	540	2,9	34	670
9,2	335	1,2	25	1647

Tabelle 6.2: Zeitkonstanten von Y166H nach Fit mit vier Exponentialfunktionen bei den pH Werten 6,6, 7,8 und 9,2.

Insgesamt sind die durch die Substitution Y166H bei Agp1 hervorgerufenen Änderungen nur gering. Die Substitution führt zu einer reduzierten Oszillatorstärke im  $P_r$ -Zustand und zu einer geringeren  $P_{fr}$ -Bildung. Weiterhin ist der pK-Wert des protonierten Chromophors im Vergleich zum WT von 11,1 auf 9,6 herabgesetzt, was für eine Beteiligung von Y166 an der Stabilisierung des protonierten Chromophors spricht.

Die Kinetik der  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion ist insgesamt verlangsamt und die Meta- $R_C$ -Bildung verläuft im Gegensatz zum WT über zwei spektrale Übergänge.

## 6.4 Diskussion

### 6.4.1 Bedeutung der Aminosäure D197

#### 6.4.1.1 Bildung und Stabilität des Holoproteins

Trotz der Substitution von Aspartat 197 durch Alanin wird ein Apoprotein exprimiert, das mit BV ein photochromes Addukt bildet und bei dem der Chromophor, wie die Versuche mittels Zink-Fluoreszenz zeigten, kovalent verknüpft wird (von Stetten 2007). Die Absorption im Bereich um 700 nm des gebildeten Holoproteins bei pH 7,8 ist im Vergleich zum WT sehr gering. Es zeigte sich auch, dass D197A wesentlich empfindlicher ist gegenüber Denaturierung und Aggregation wie der WT, was sich anhand der großen Menge ausgefallenen Proteins nach Auftauen einer D197A-Probe zeigte. Bei der Trennung durch Chromatographie wurde eine zweite gelb gefärbte Fraktion erhalten. Aufgrund der Farbe und des Laufverhaltens auf der Chromatographiesäule handelt es sich wohl um nicht kovalent gebundenen Chromophor. Die gelbe Färbung spricht für eine Reduktion der Methinbrücke zwischen den Ringen B und C, was auch durch Zugabe von DTT zu freiem BV erreicht werden kann (persönliche Mitteilung T. Lamparter). Eine nähere Analyse dieser zweiten Fraktion steht aber noch aus, und es ist fraglich, ob dadurch Erkenntnisse über den Mechanismus von Agp1 gewonnen werden können. Wichtiger wäre es zu klären, ob und wann der Chromophor abgespalten wurde. Es besteht ja immer noch die Möglichkeit, dass ein bestimmter Prozentsatz des Chromophors nicht kovalent eingebaut wird. Auf jeden Fall ist das Holoprotein durch die Substitution erheblich instabiler als der WT.

#### 6.4.1.2 Molekulare Bedeutung von D197

Die erste grüne Fraktion der chromatographischen Trennung enthielt, wie die Spektren zeigten, das Holoprotein. Allerdings wies die Q-Bande bei pH 7,8 eine geringere Oszillatorstärke auf und das Absorptionsmaximum der Soret-Bande war um zehn nm hypsochrom zu dem des WT verschoben. Weiterhin war die Absorption der Soret-Bande im Vergleich zum WT größer, so dass das Verhältnis von Q- und Soret-Bande bei D197A kleiner war. Durch Absenken des pH-Wertes gelang es Oszillatorstärke aus der Soret-Bande in die Q-Bande zu verlagern, ein Effekt der ansonsten bei der Assemblierung von Apoprotein und Chromophor beobachtet wird und der vor allem der Protonierung des Chromophors zugeschrieben wird (Falk 1989). Anhand der Resonanz Raman Daten der D197A-Mutante von Agp1 konnte gezeigt werden, dass bei Erniedrigung des pH-Wertes die Bande der N-H-Deformationsschwingung bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  zunimmt, die der protonierten kationischen Form des Chromophors entspricht. Gleichzeitig mit der Zunahme der Bande bei  $1570\text{ cm}^{-1}$  nimmt die Intensität der Bande bei etwa  $1595\text{ cm}^{-1}$  ab, die als C=C Streckschwingung der Methinbrücken des deprotonierten Chromophors interpretiert wird (von Stetten 2007). Das heißt bei D197A kommt es bei einer Verringerung des pH-Wertes zur Protonierung des Chromophors. D197 ist also an der Stabilisierung des protonierten Chromophors beteiligt und die Substitution durch Alanin führt zu einer Erniedrigung des pK-Wertes des protonierten Chromophors von 11,1 (WT) auf 7,2 (von Stetten 2007). Damit könnte D197 eine ähnliche Funktion haben wie ein Aspartatrest im Phycobiliprotein Phycocyanin, bei dem das Aspartat als Gegenion für den protonierten Chromophor fungiert (Schirmer 1987). Auch bei Dichte-Funktional-Theorie-Rechnungen wurden die spektralen Eigenschaften von Phycobiliproteinen durch Ladungstransfer von einem Aspartat auf den Chromophor erklärt (Wan 2005, Ren 2006).

Allerdings zeigte es sich, dass in den beiden veröffentlichten Strukturen der CBD („Chromophor Binding domain“) von Phytochrom, die Carboxylgruppe, des zu D197 homologen

Aspartatrestes, vom Chromophor wegzeigt (Wagner 2005, 2006; Yang 2007) und somit nicht als Gegenion für die positiv geladenen Pyrrolstickstoffe auf den Ringen B und C in Frage kommt. Zwar bildet die Carbonylgruppe des Peptidgerüsts Wasserstoffbrücken mit dem Chromophor aus, diese müssten aber auch nach der Substitution erhalten bleiben, so dass die Substitution kaum einen Einfluss auf den Protonierungszustand des Chromophors haben dürfte. Allerdings fehlte den zur Kristallisation verwandten Fragmenten die für die Photokonversion wichtige PHY-Domäne. Die Kontaktstellen der PHY-Domäne mit der CBD sind bisher nicht bekannt. Aber im Bereich des zu D197 homologen D216 von RpBphP3-Phytochroms (Yang 2007) zeigte es sich, dass die Aminosäuren der Bindungstasche den Chromophor nicht so dicht umschließen, weshalb angenommen wurde, dass D216 an der Kopplung von Chromophor und PHY-Domäne beteiligt ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass in Lösung, anders als im Kristall, ein anderes Rotationsisomer vorliegt, bei dem die Carboxylgruppe zum Chromophor zeigt. Welche dieser Möglichkeiten zutrifft oder, ob es noch andere Möglichkeiten gibt, kann wohl erst beantwortet werden, wenn die Kristallstruktur eines Phytochromfragmentes gelöst wird, das die PHY-Domäne mit einschließt. Wie dem auch sei, die Substitution von D197 durch Alanin hat einen starken Einfluss auf die Stabilität des protonierten Chromophors. Weiterhin führt die Protonierung des Chromophors zu einem  $P_r$  ähnlichen Spektrum, was zeigt, dass die spektralen Eigenschaften stark durch den Protonierungsgrad des Chromophors bestimmt werden. Die Frage die sich jetzt stellt ist, wo das Proton herkommt. Die einfachste Erklärung wäre, dass es aus dem Medium aufgenommen wird, die andere Möglichkeit ist, dass es einen intramolekularen Transfer gibt.

D207 von DrBphP ist laut den Strukturdaten (209B, Wagner 2006) an einem Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt und die Carboxylgruppe bildet eine Wasserstoffbrücke mit Tyrosin 263 aus (Abbildung 6.1). Durch die Substitution D207A kommt es zur Störung dieser Wasserstoffbrücke, was eine Veränderung des gesamten Wasserstoffbrückennetzwerkes zur Folge haben könnte, was sich auf den pK-Wert der abgegebenen Gruppe oder des Chromophors auswirkt. Allerdings konnte bisher in der Bindungstasche keine Aminosäure identifiziert werden, die als Protonenabgabegruppe in Frage kommt, außer D207 selbst, wobei die falsche Orientierung der Carboxylgruppe ein ungelöstes Problem ist. So bleibt die Herkunft des Protons im Augenblick ungeklärt, bis weitere Daten hier für Aufklärung sorgen können.

Die Chiralität des Chromophors im Dunkelzustand des Chromophors von D197A scheint mit der des  $P_r$ -Zustandes des WT vergleichbar zu sein, wie die großen Übereinstimmungen der beiden CD-Spektren zeigen. Auch bei einer homologen Mutation des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 wurde mittels CD-Spektroskopie im UV-Bereich kein Unterschied in der Sekundärstruktur zum WT gefunden (Hahn 2006), so dass angenommen werden kann, dass die Substitution nicht zu einer unterschiedlichen Faltung des Proteins führt. Die CD- und Absorptionsspektren bei niedrigem pH-Wert zeigen, dass die spektralen Eigenschaften des  $P_r$ -Zustandes wesentlich weniger empfindlich auf Änderungen in der Proteinmatrix reagieren wie im Fall der Photokonversion.

### 6.4.1.3 Das Photoprodukt von D197A

Anders als beim Dunkelzustand von D197A weist das Photoprodukt nach roter Beleuchtung keine Gemeinsamkeiten mit dem  $P_{fr}$ -Zustand des WT auf. Es kommt zwar wie beim WT zu einer Bleichung, aber die  $P_{fr}$  charakteristische Absorptionzunahme bei Wellenlängen oberhalb von 720 nm kann nicht beobachtet werden (von Stetten 2007). Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei den homologen Mutationen von D207A in Cph1 (Hahn 2007), D207A in DrBphB (Wagner 2008) und D216A in RpBphP3 (Yang 2007) beobachtet, bei denen ebenfalls keine bathochrome Verschiebung der Q-Bande zu beobachten war.

Die Amplitude der Bleichung bei D197A nahm mit kleiner werdendem pH-Wert zu. Wie man anhand der Spektren bei unterschiedlichen pH-Werten sehen kann, wird der Eindruck vermittelt, dass bei kleinem pH-Wert trotz kontinuierlicher Beleuchtung ein größerer Anteil im protonierten Zustand verblieb. Da es keine Anzeichen dafür gibt, dass es durch das rote Licht zu einer Rückreaktion des Photoproduktes kommt, scheint sich bei kontinuierlicher Beleuchtung ein Gleichgewicht zwischen dem protonierten und deprotoniertem Zustand auszubilden. Da der Anteil des protonierten Zustandes mit kleiner werdendem pH-Wert steigt, nimmt damit auch die Amplitude der Bleichung zu. Dies bedeutet gleichzeitig, dass nur der protonierte Zustand eine Photoreaktion zeigt. Setzt man die Bleichung der  $P_r$ -Bande in Relation zur Absorption der  $P_r$ -Bande des Ausgangszustandes, erhält man für D197A und WT in etwa das gleiche Verhältnis ( $\sim 0,55$ ), was bedeutet, dass die Quantenausbeute der Photoreaktion in etwa gleich groß ist.

### 6.4.1.4 Die transienten Änderungen nach Anregung des $P_r$ -Zustandes

Die transienten Absorptionsänderungen nach roter Beleuchtung zeigen für D197A ein bisher nicht beobachtetes Verhalten. Es werden zwei spektrale Übergänge gefunden mit den pH-abhängigen Zeitkonstanten von 300-400  $\mu\text{s}$  und zehn bis 20 ms. Wie das pH-Sprung-Experiment von pH 6,5 nach 7,9 und die zunehmende Amplitude bei steigendem pH-Wert zeigen, handelt es sich bei der zweiten Komponente (zehn bis 20 ms) um eine Relaxationskomponente, bei der das Gleichgewicht zwischen protoniertem und deprotoniertem Chromophor wieder eingestellt wird. Somit verbleibt für die Bildung des Photoproduktes von D197A genau ein Übergang übrig. Die Zeitkonstante dieses Überganges beträgt etwa 300-400  $\mu\text{s}$  und liegt damit bei einer rein kinetischen Betrachtung im Bereich der  $\text{Meta-R}_A$ -Bildung des WT ( $\tau_1=260 \mu\text{s}$ ). Wie der Übergang des WT ist die Amplitude dieses ersten Überganges von D197A positiv. Auch die relative Größe der Amplitude, gleiche Laseranregung vorausgesetzt, stimmt in beiden Fällen ansatzweise überein. Anhand dieser Übereinstimmungen spricht erst einmal vieles dafür, dass die Photoreaktion von D197A zu einem  $\text{Meta-R}_A$  ähnlichen Zustand führt. Dagegen spricht, dass die für die  $\text{Lumi-R}$ -Bildung, den Vorläufer von  $\text{Meta-R}_A$ , charakteristischen spektralen Änderungen bei den Wellenlängen  $\lambda > 720 \text{ nm}$  im Zeitbereich unterhalb von 100  $\mu\text{s}$  bei D197A nicht beobachtet werden konnten. Das bedeutet, dass: (a) entweder gar kein  $\text{Lumi-R}$  gebildet wird, (b) ein dem  $\text{Lumi-R}$  ähnlicher Zustand mit einer anderen spektralen Charakteristik gebildet wird, (c) die  $\text{Lumi-R}$  Bildung vor dem aufgelösten Zeitbereich stattfindet oder (d) die Änderungen durch das starke Rauschen nicht eindeutig identifiziert werden können. Allerdings waren auch beim 5Zs-Addukt von Agp1 (Kapitel 5) die absoluten Absorptionsänderungen in diesem Zeitbereich sehr klein und trotzdem konnten die für die  $\text{Lumi-R}$ -Bildung charakteristischen Absorptionsänderungen beobachtet werden. So kann die Frage, ob im Fall von D197A überhaupt ein  $\text{Lumi-R}$  ähnlicher Zustand gebildet wird, nicht endgültig beantwortet werden. Für den Fall das kein  $\text{Lumi-R}$ -Zustand gebildet wird, ist es fraglich, ob die beobachteten Absorptionsänderungen zu einem  $\text{Meta-R}_A$  ähnlichen Intermediat führen. Ein weiteres Problem ist das CD-Spektrum des Photoproduktes von D197A. Dieses weist dieselben Vorzeichen in den Banden auf wie der Ausgangszustand, lediglich die Rotationsstärke hat im Vergleich zum Dunkelzustand abgenommen. Beim 5Zs-Addukt führte die rote Beleuchtung zu einer Umkehrung des Vorzeichens in beiden Banden, was mit der geänderten Chiralität durch die Z/E-Isomerisation erklärt wurde. Anhand der Daten wurde angenommen, dass die Kinetik des 5Zs-Adduktes aufgrund seiner Arretierung zwischen  $\text{Meta-R}_A$  und  $\text{Meta-R}_C$  blockiert ist und erst die Änderung der Stereochemie der Methinbrücke zwischen den Ringen A und B zu den CD-Spektren des  $P_{fr}$ -Zustandes führen würde. Wenn das Photoprodukt von D197A ein  $\text{Meta-R}_A$  ähnlicher Zustand ist, müsste man im CD-Spektrum ebenfalls diesen Vorzeichenwechsel der Banden finden können, was aber nicht der Fall ist. Das bedeutet entweder, dass die beim 5Zs-Addukt gemachte Interpretation

falsch ist, oder das Photoprodukt von D197A ist nicht Meta-R<sub>A</sub> ähnlich. Zur Klärung ob es einen Vorzeichenwechsel der CD-Banden gibt, wäre es, wie schon erwähnt, nötig zeitaufgelöste CD-Messungen anzufertigen. Bis dahin lässt sich die Frage, wie das CD-Spektrum des WT im Lumi-R und Meta-R<sub>A</sub> Zustand aussieht, nicht klären.

Noch komplizierter wird die Sache dadurch, dass das RR-Spektrum des Photoproduktes von D197A dem des Meta-R<sub>C</sub> Intermediates des WT (Borucki 2005) stark ähnelt (von Stetten 2007). Das heißt der Chromophor liegt danach in der ZZE-Konfiguration vor und ist deprotoniert (von Stetten 2007). Allerdings wurde noch nicht gezeigt, wie sich die Bandenintensität mit dem pH-Wert ändert und es gibt auch dadurch eine beachtliche Fehlerquelle, dass es sich bei den eingefangenen Zuständen um ein Gemisch aus verschiedenen Intermediaten und dem Grundzustand handelt. Für den Erhalt des reinen Intermediates müssen die übrigen Anteile abgezogen werden, was bei den schwach verstärkten Banden rasch zu größeren Änderungen führen kann. Ein weiteres Problem ist, dass beim WT nur ein Intermediat eingefangen werden konnte, nämlich Meta-R<sub>C</sub>, sodass man nicht sagen kann, wie die RR-Spektren der anderen Zustände aussehen. Wie dem auch sei, aufgrund der transienten Absorptionsdaten erscheint es eher unwahrscheinlich, dass bei D197A ein Meta-R<sub>C</sub>-artiger Zustand gebildet wird, da die damit einhergehende charakteristische bathochrome Verschiebung der Q-Bande nicht beobachtet werden kann. Auch die fehlende Protonenabgabe ins Medium spricht gegen eine Meta-R<sub>C</sub>-Bildung. Allerdings wurde aufgrund der Ähnlichkeit der RR-Spektren des Photoproduktes von D197A mit dem Meta-R<sub>C</sub>-Zustand des WT spekuliert, dass deshalb keine Protonenabgabe beobachtet wird, weil es sich bei D197 um die Abgabegruppe handelt. Diese Variante kann auch für den Fall, dass das Photoprodukt nicht Meta-R<sub>C</sub> ähnlich ist, nicht ausgeschlossen werden, und die Klärung dieser Frage ist ein lohnendes Ziel.

Aufgrund der transienten Absorptionsänderungen müsste die Bildung aber auf einem andern Pfad erfolgen als beim WT, da D197A nur eine Komponente mit einer Zeitkonstante von etwa 300  $\mu$ s aufweist und keine Millisekundenkomponente. Auch die fehlende bathochrome Verschiebung der Q-Bande kann nicht durch die fehlende Protonenabgabegruppe erklärt werden. Weiterhin kamen FTIR Studien an der Mutante D197A von Agp1 zu dem Schluss, dass sich das Photoprodukt von D197A von dem Meta-R<sub>C</sub> Zustand des WT unterscheidet (Piwoarski 2007).

#### 6.4.1.5 Strukturelle und mechanistische Implikationen

In der Arbeit von Wagner (Wagner et al 2008) wurde D207 durch eine ganze Reihe verschiedener Aminosäuren ersetzt. Bei nahezu allen Substitutionen konnte keine Meta-R<sub>C</sub>- und P<sub>fr</sub>-Bildung beobachtet werden. Auch D207E, bei der nur die Länge der Seitenkette variiert wurde, zeigte einen photochemischen Defekt. Im Gegensatz zu allen anderen Substitutionen zeigte das Photoprodukt aber eine Absorptionzunahme im Bereich der P<sub>fr</sub>-Absorption und das Photoprodukt ähnelt ansatzweise dem des M20-Fragmentes von Agp1 und der CBD von DrBphP (Wagner 2005), bei denen die PHY-Domäne fehlten. Die Daten wurden dahingehend interpretiert, dass eine genaue Positionierung von D207 für die Photokonversion notwendig ist und dass die saure Seitenkette ein Kandidat ist, die das Pyrrol Wasserstoffatom als einen Protonenkanal benutzt (Wagner 2008). Die Substitution D207E zeigt bei DrBphP denselben photochemischen Defekt wie die fehlende PHY-Domäne, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass hier dieselbe Störung vorliegt. Von dieser Substitution liegen bisher keine zeitaufgelösten Daten vor. Um zu untersuchen, ob D207E (Agp1: D197E) und die PHY-Domäne denselben Einfluss haben, wäre es sinnvoll die transienten Absorptionsmessungen beim dem Agp1-Homologen oder mit den entsprechenden Mutanten des DrBphP durchzuführen und miteinander zu vergleichen. Dies könnte vielleicht auch zur Klärung beitragen, wieso rotes Licht bei D207E und den anderen Substitutionen von DrBphP zu unterschiedlichen

Photoprodukten führt. Die Carboxylgruppe der Seitenkette an Position 207 des DrBphP scheint also für die Bildung eines bathochrom Verschiebenen Photoproduktes essentiell zu sein.

Interessanterweise zeigte die Histidin-Substitution von Y263 des DRBphP Phytochroms denselben photochemischen Defekt wie die meisten D207 Substitutionen (Wagner 2008). Die Wasserstoffbrücke zwischen diesen beiden Resten spielt anscheinend bei der Photokonversion eine entscheidende Rolle. Wie diese Rolle aussieht, ist zurzeit ungewiss, genauso wie die Photoreaktion bei der D197A-Substitution bei Agp1 molekular aussieht. Das es zur Deprotonierung des Chromophors kommt, scheint aufgrund des starken Rückgangs der Oszillatorstärke nach roter Beleuchtung klar zu sein, da die Protonierung wie gezeigt zu einer Zunahme der Absorption geführt hat. Das es sich bei dem Photoprodukt von D197A um ein Meta-R<sub>C</sub> ähnliches Intermediat handelt, wie anhand des RR-Spektrums des Photoproduktes vermutet, scheint aufgrund der zeitaufgelösten Daten eher unwahrscheinlich. Diese würden aufgrund der gefundenen Analogien zu denen des WT für die Bildung eines Meta-R<sub>A</sub>-artigen Zustandes sprechen. Allerdings steht diese Interpretation im Konflikt mit den Daten des 5Zs-Chromophors, insbesondere mit den CD-Spektren des Photoproduktes.

Ein weiterer interessanter Befund ist, dass obwohl die Photokonversion von D197A mit einer vergleichbaren Effizienz wie beim WT abläuft, bei D197A eine stärkere Fluoreszenz gefunden wird. Diese nimmt bei roter Beleuchtung und bei Erhöhung des pH-Wertes ab, was dafür spricht, dass nur der protonierte Chromophor Fluoreszenz zeigt. Das heißt die Fluoreszenz steigt nicht auf Kosten der Photokonversion, sondern sie muss auf Kosten eines anderen Deaktivierungskanal steigen. Auf jeden Fall zeigt es, dass es durch die Substitution zu Änderungen beim angeregten Zustand im Vergleich zum WT kommt, so dass es nicht auszuschließen ist, dass der angeregte Zustand in einen anderen Zustand übergeht wie beim WT. Ob das geschieht und wie dieser Zustand aussieht, könnte eventuell eine genauere Untersuchung mittels Ultrakurzzeitspektroskopie ergeben.

Die Probleme der Interpretation dieser Mutante liegen daran, dass die Interaktion mit der PHY Domäne nicht geklärt ist, die wie in Kapitel 4 gezeigt einen großen Einfluss auf die Photokonversion hat. Eine direkte Kopplung von PHY Domäne über die Carboxylgruppe des Aspartatrestes scheint aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens bei der Photokonversion von D197A und M20 erst einmal unwahrscheinlich, aber die Ähnlichkeiten von D207E und der CBD von DrBphP sprechen für eine solche Interaktion. Weiterhin problematisch ist es, dass außer dem Meta-R<sub>C</sub>-Intermediat keine anderen Intermediate des WT von Agp1 eingefangen werden konnten und dass keine zeitaufgelösten CD-Daten vorliegen.

Die in dieser Arbeit angefertigten Daten zeigen aber, dass D197 an der Stabilisierung des protonierten Chromophors im Dunkelzustand beteiligt ist und D197 essentiell für die Bildung von P<sub>fr</sub> ist. Nimmt man an, dass die Photokonversion von D197A erst analog zu der des WT verläuft und dann stecken bleibt, muss D197 direkt oder indirekt an den Vorgängen beteiligt sein, die zur bathochromen Verschiebung der Absorption bei der P<sub>fr</sub>-Bildung führen.

### 6.4.2 Bedeutung der Aminosäure H250

#### 6.4.2.1 Auswirkungen der Substitution auf den Dunkelzustand (P<sub>r</sub>)

Wie schon bei D197A führt auch bei H250A die Assemblierung mit BV zu einem photochromen Addukt, bei dem der Chromophor kovalent mit dem Protein verknüpft ist (von Stetten 2007). Damit steht es in einer Reihe mit dem BV bindenden DrBphP und CphB Phytochrom aus *Deinococcus radiodurans* und *Fremyella disploisphan*, bei denen es bei der homologen



Substitution (DrBphP: H260A; CphB: H267A), ebenfalls zur kovalenten Verknüpfung des Chromophors kam und zu Ausbildung eines  $P_r$ -ähnlichen Zustandes (Quest 2007; Wagner 2008).

Die Assemblierung bei H250A ist im Vergleich zum WT verzögert (WT: ~20 s; H250A zwei min, D197A 20 min). Obwohl die Assemblierung schneller erfolgt als bei D197A ist eine Beteiligung von H250 zur Ausbildung eines  $P_r$ -ähnlichen Zustandes beteiligt (von Stetten 2007).

Das gebildete Holoprotein weist wie bei den homologen Substitutionen von DrBphP und CphB (Quest 2007; Wagner 2008) ein  $P_r$ -ähnliches Spektrum auf, wobei in allen Fällen die Soret-Bande im Verhältnis zur Q-Bande größer war als beim WT. Die Q-Bande wies wie bei D197A eine pH-Abhängigkeit auf, wobei der pK in diesem Fall bei 8,8 liegt. Das RR-Spektrum des Dunkelzustandes wies bei pH 7,8 noch eine kleine Bande bei  $1599\text{ cm}^{-1}$  auf, die auf die C=C Streckschwingung der Methinbrücken des deprotonierten Chromophors zurückgeführt wird. Das stimmt mit der Titrationskurve des Absorptionsmaximums der Q-Bande überein, wonach bei pH 7,8 ein Teil des Chromophors deprotoniert vorliegen sollte. Aufgrund dieser Daten wird auch bei H250A angenommen, dass die gefundene Titrationskurve mit dem pK-Wert von 8,8 der Protonierung des Chromophors entspricht. Das heißt auch die Substitution H250A führt zu einer Erniedrigung des pK-Wertes des protonierten Chromophors, sodass H250 ebenso wie D197 zur Stabilisierung des protonierten Zustandes beiträgt. Das CD-Spektrum des Dunkelzustandes von H250A stimmt mit dem des  $P_r$ -Zustandes des WT gut überein, so dass man sagen kann, dass in H250A bei pH 7,8 der Chromophor annähernd die gleiche Stereochemie einnimmt wie der WT und im gleichen protonierten Zustand vorliegt. Der zu H250 homologe Histidinrest H260 in DrBphP bildet laut den Strukturdaten ((1ZTU) über ein Wassermolekül Wasserstoffbrücken mit den Pyrrolstickstoffen der Ringe A, B und C aus. Durch die Substitution von H260 durch Alanin kommt es mit Sicherheit zu einer Störung dieses Wasserstoffbrückennetzwerkes, was sich wiederum auf die Stabilität des protonierten kationischen Chromophors auswirkt.

#### 6.4.2.2 Das Photoprodukt von H250A

Wie schon bei D197A führt die Beleuchtung mit rotem Licht zu einem gebleichten Zustand und die  $P_{fr}$ -charakteristische Absorptionzunahme bei Wellenlängen oberhalb 720 nm kann nicht beobachtet werden, weshalb zuerst angenommen wurde, dass die Photoprodukte von D197A und H250A gleich sind. Allerdings unterscheiden sich die Spektren der beiden Photoprodukte. Während bei D197A die Absorption bei 700 nm noch auf den Ausgangszustand hinweist, scheint die Photokonversion bei H250A in sein Photoprodukt nahezu vollständig abzulaufen. Damit gleicht das Spektrum des gebildeten Photoproduktes von H250A noch stärker dem  $P_{bl}$ -Zustand des Haferphytochroms PhyA (Rüdiger 1985), das mit dem Meta- $R_c$  Intermediat im Gleichgewicht stand. Die RR-Daten dieses  $P_{bl}$ -Zustandes wiesen starke Ähnlichkeiten zum Meta- $R_c$ -Zustand auf (Kneip 2000). Insofern ist es nicht überraschend, dass das RR-Spektrum von H250A im Großen und Ganzen mit dem des Meta- $R_c$ -Zustandes des WT übereinstimmt. Da auch D197A ein ähnliches photochromes Verhalten zeigte, wurde angenommen, dass es sich in beiden Fällen um einen Meta- $R_c$ -ähnlichen Zustand handelt. Allerdings weisen die beiden Photoprodukte eine Reihe von Unterschieden auf, die daran zweifeln lassen. Während das Photoprodukt von D197A je nach pH-Wert etwa innerhalb einer Stunde im Dunkeln in den Ausgangszustand zurück konvertierte, war diese Dunkelreversion des Photoproduktes von H250A wesentlich langsamer. Selbst nach 23 Stunden war erst etwa ein Drittel in den Ausgangszustand zurück konvertiert (Abbildung 6.14).

Diese langsame Dunkelreversion könnte auch dafür verantwortlich sein, dass bei kontinuierlicher Beleuchtung der komplette  $P_r$ -Zustand in das Photoprodukt umgewandelt wird, im Ge-

gensatz zu D197A, bei dem anscheinend ein Gleichgewicht zwischen Ausgangszustand und Photoprodukt gebildet wird.

Auch das Fluoreszenzverhalten von D197A und H250A zwischen 700 und 720 nm ist unterschiedlich. Während bei D197A eine sehr starke Fluoreszenz im Dunkelzustand gefunden wird, ist die Fluoreszenz von H250A sehr gering, was wie schon erwähnt auf Unterschiede des angeregten Zustandes hinweist. Wie bei D197A scheint aber auch bei H250A nur der protonierte Zustand zu fluoreszieren, was sowohl an der abnehmenden Fluoreszenz mit steigendem pH-Wert und bei der nicht mehr vorhandenen Fluoreszenz des Photoproduktes zu beobachten war. Hier zeigt sich ein weiterer Unterschied zwischen D197A und H250A. Für das Photoprodukt von H250A ließ sich unabhängig vom pH-Wert keine Fluoreszenz mehr feststellen, während das Photoprodukt von D197A noch fluoreszierte, wobei die Fluoreszenz allerdings mit steigendem pH-Wert abnahm. Bei H250A führt die Photokonversion zu einem stabilen deprotonierten Zustand, während das Photoprodukt von D197A wesentlich kurzlebiger ist. Das muss noch nicht bedeuten, dass es sich um unterschiedliche Zustände handelt, es besteht ja auch die Möglichkeit, dass durch den fehlenden Histidinrest, die Aktivierungsenergie dieses Intermediates so hoch ist, dass nur ein kleiner Teil die nötige thermische Energie erhält, die zur Dunkelreversion nötig ist.

Auch das Photoprodukt von M20 weist im CD- und Absorptionsspektrum Ähnlichkeiten zum Photoprodukt von H250A auf. Allerdings weist das Absorptionsspektrum von M20 oberhalb von 720 nm eine Zunahme in der Absorption auf und das Photoprodukt von M20 lässt sich, anders als das von H250A, durch Beleuchtung mit dunkelrotem Licht wieder in den Ausgangszustand überführen.

### 6.4.2.3 Die transienten Absorptionsänderungen von H250A

Die transienten Absorptionsänderungen weisen was die Kinetik und die Amplituden angeht mehr Gemeinsamkeiten mit dem WT auf als die von D197A. Anders als bei D197A können die für die Lumi-R-Bildung charakteristischen Absorptionsänderungen beobachtet werden. Auch die beiden ersten Übergänge von 270  $\mu$ s und 2,0 ms weisen sehr große Ähnlichkeiten mit denen der Meta-R<sub>C</sub>-Bildung des WT auf. Wie beim WT wird bei H250A auch eine Protonenabgabe ins Medium gefunden, deren Zeitkonstante in etwa der des zweiten Überganges entspricht. Es spricht also vieles dafür, dass die Photokonversion von H250A bis zu einem Meta-R<sub>C</sub>-ähnlichen Intermediat verläuft. Das Fehlen jeglicher Zunahme der Absorption im dunkelroten Bereich und die fehlende Wiederaufnahmekomponente beim Farbstoffexperiment sprechen dafür, dass die Photokonversion auf dem Weg nach Meta-R<sub>C</sub> entweder blockiert ist, oder dass ein anderes Intermediat dem Meta-R<sub>C</sub> ähnliches Intermediat gebildet wird, dass ohne Substitution von H250 nicht gebildet wird. Es sprechen also alle Daten dafür, dass das Photoprodukt von H250A Meta-R<sub>C</sub> ähnlich ist und die Wahrscheinlichkeit das es sich dabei um ein dem P<sub>bl</sub>-Intermediat des pflanzlichen Phytochroms PhyA analoges Intermediat handelt (Rüdiger 1985; Kneip 2000) ist aufgrund der spektralen Übereinstimmungen sehr groß.

### 6.4.2.4 Strukturelle und mechanistische Implikationen

Die Kinetik der transienten Messungen, die beobachteten Amplituden der Übergänge, die Protonenabgabe ins Medium und das dem Meta-R<sub>C</sub> des WT ähnliche RR-Spektrum von H250A deuten darauf hin, dass H250A nach roter Beleuchtung einen Meta-R<sub>C</sub>-ähnlichen Zustand ausbildet. Im Bereich der P<sub>fr</sub>-Bande kommt es zu keinerlei Zunahme in der Absorption, weshalb H250 wohl direkt an dem molekularen Mechanismus beteiligt ist, der zur bathochromen Verschiebung der Absorption führt. Die Resonanz-Raman-Daten des Photoproduktes

sprechen für einen deprotonierten Chromophor. Laut der Kristallstruktur (1ZTU) ist das zu H250 von Agp1 homologe H260 von DrBphP an einem Wasserstoffbrückennetzwerk beteiligt, an dem auch die Pyrrolstickstoffe der Ringe A, B und C des Chromophors beteiligt sind. Wie die Daten von H250A und den andern homologen Substitutionen von anderen Phytochromen zeigen (Davis 1999; Hahn 2006; Quest 2007; Wagner 2008), wirkt sich die Substitution auf den  $P_r$ -Zustand nur geringfügig aus. Das heißt das gefundene Wasserstoffbrückennetzwerk an dem H250 beteiligt ist, scheint für die Bildung des  $P_r$ -Zustandes und die ersten Schritte der Photokonversion nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Der Vergleich der zeitaufgelösten Absorptionsänderungen des 5Zs-Adduktes und von H250A zeigt, dass die Photokonversion des 5Zs-Adduktes und von H250A anfangs gleich verlaufen. Während das 5Zs-Addukt aufgrund seiner Arretierung in einem Meta- $R_A$  ähnlichen Zustand hängen bleibt, geht die Photokonversion bei H250A über diesen hinaus, wie der zweite Übergang bei zwei ms und die Protonenabgabe anzeigen. Beim 5Zs-Addukt gab es für die Blockierungen zwei Interpretationen. Erstens, dass es aufgrund der Ethylenbrücke keine Konformationsänderung der A/B-Methinbrücke gibt und das die fehlende Partiaalladung auf dem Pyrrolstickstoff des Ringes B die Photokonversion blockiert. Wie die Substitution von H260Q von DrBphP und von Cph1 (Wagner 2008; Hahn 2006) und von H324Q des PhyA Phytochroms (Bhoo 1997) zeigen, führt diese Substitution nicht zum Verlust der Fähigkeit,  $P_{fr}$  zu bilden. Die sterischen Eigenschaften und die Fähigkeit von Glutamin zur Wasserstoffbrückenbildung sind vergleichbar mit denen des Histidins. Dies deutet daraufhin, dass die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken der Schlüssel für die Funktion von H250 und seinen Homologen ist. Es wird weiterhin spekuliert, dass H250 die Gruppe ist, die für die Reprotonierung des Chromophors verantwortlich ist. Wie in dieser Arbeit aber schon mehrfach gezeigt, führt die Protonierung des Chromophors vorwiegend zur Absorptionzunahme. Die bathochrome Verschiebung kann also damit nicht erklärt werden. Weiterhin deuten die Daten daraufhin, dass die Reprotonierung erst beim Meta- $R_C$  nach  $P_{fr}$ -Übergang stattfindet, also erst nachdem es mit der Meta- $R_C$ -Bildung zur bathochromen Verschiebung der Absorption gekommen ist. H250 und seine Homologen müssen also an molekularen Schritten beteiligt sein, die zu einer bathochromen Verschiebung in der Absorption führen. Da Histidine oft an Protonentransfers beteiligt sind, ist es leicht vorstellbar, dass es einen Schlüsselschritt im molekularen Mechanismus der Photokonversion gibt, bei dem es vorher zu einem Protonentransfer kommen muss. Wie dieser Schritt aussieht und ob H250 dabei ein Proton aufnimmt oder abgibt, müssen weitere Studien zeigen. Vieles spricht jedoch dafür, dass Drehungen oder Verringerungen von Torsionswinkeln der Methinbrücken des Chromophors an diesem Prozess beteiligt sind. Aber auch die Ausbildung von Charge-Transfer Komplexen ist oft mit starken Farbänderungen verbunden.

Auf jeden Fall ist H250 und seine Homologen an der Stabilisierung des protonierten Zustandes im Dunkelzustand beteiligt und eine der Schlüsselaminosäuren, für die  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion, wie die strenge Konservierung dieses Histidins auch erwarten ließ.

## 2.4.3 Bedeutung der Aminosäure Y166

### 2.4.3.1 Die Photokonversion von Y166H

Die Substitution Y166H bei Agp1 führt zu einem photochromen Addukt mit einem kovalent gebundenen Chromophor (private Mitteilung T. Lamparter). Wie schon in anderen Fällen nimmt die Oszillatorstärke der Q-Bande durch die Substitution ab. Die Titration des  $P_r$ -Zustandes unter Lichtausschluss zeigte auch bei Y166H, dass der pK des protonierten Chromophors im Vergleich zum WT herabgesetzt ist (WT: 11,1; Y166H: 9,6). Obwohl Y166 laut den Strukturdaten der CBD des DrBphP und RpBphP3 nicht am Wasserstoffbrückennetzwerk

mit den protonierten Pyrrolstickstoffen beteiligt ist, trägt das Tyrosin zur Stabilisierung des protonierten Chromophors bei. Das heißt, die spektralen Eigenschaften des  $P_r$ -Zustandes kommen durch ein multiples Zusammenspiel mehrerer funktioneller Gruppen in der Bindungstasche zustande und die Substitution einer dieser Gruppen führt in den meisten Fällen zu einer Verringerung der Oszillatorstärke im  $P_r$ -Zustand.

Im Gegensatz zu den Substitutionen D197A und H250A von Agp1 führt rote Beleuchtung bei Y166H zur bathochromen Verschiebung der Absorption und zur Ausbildung des  $P_{fr}$ -Zustandes. Das geringe Verhältnis der Änderungen von  $P_r$  zu  $P_{fr}$  im Differenzspektrum und der Verlauf des Spektrums nach roter Beleuchtung deuten darauf hin, dass bei Y166H weniger  $P_{fr}$  gebildet wird wie beim WT. Das heißt die kontinuierliche rote Beleuchtung führt zu einem anderen  $P_r/P_{fr}$ -Verhältnis wie beim WT. Außer eine geringeren Effizienz der Photo-konversion nach  $P_{fr}$  könnte dafür auch eine höhere Quantenausbeute für die Rückreaktion des gebildeten  $P_{fr}$ -Zustandes verantwortlich sein, was dann zu einem anderen Gleichgewicht zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  führt. In Abbildung 6.28 ist das Spektrum des reinen  $P_{fr}$ -Zustandes dargestellt unter der Annahme, dass sich nach roter Beleuchtung noch 28 Prozent im  $P_r$ -Zustand befinden. Wie man aber besonders gut an der Soret-Bande des CD-Spektrums des berechneten reinen  $P_{fr}$ -Spektrum sehen kann, gibt es Unterschiede zum  $P_{fr}$ -Spektrum des WT, sodass auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen außer dem geänderten Gleichgewicht zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$ . Ansonsten zeigen die Absorptions- und CD-Spektren, dass der  $P_r$ -Zustand nahezu identisch ist mit dem des WT und die rote Beleuchtung zu einem  $P_{fr}$  ähnlichen Zustand bei Y166H von Agp1 führt.

### 2.4.3.2 Kinetik von Y166H

Die transienten Absorptionsänderungen von Y166H verlaufen ähnlich wie die vom WT. Erst durch die SVD-Zerlegung zeigte es sich, dass die transienten Absorptionsänderungen von Y166H über einen spektralen Übergang mehr verlaufen als beim WT. Wie der Vergleich der Amplituden von Y166H und WT zeigt, weist der erste Übergang ( $\tau_1=540 \mu\text{s}$ ) große Ähnlichkeiten mit der Meta- $R_A$ -Bildung und der vierte Übergang ( $\tau_4=670 \text{ ms}$ ) große Ähnlichkeiten mit der  $P_{fr}$ -Bildung des WT auf. Die Zeitkonstanten sind zwar im Vergleich zu denen des WT etwas größer, sind aber aufgrund der allgemein langsameren Kinetik von Y166H akzeptabel. Aus diesen Grund kann man davon ausgehen, dass beim ersten Übergang von Y166H ein Meta- $R_A$ -ähnliches Intermediat und beim letzten Übergang ein  $P_{fr}$ -artiger Zustand gebildet werden. Das heißt, die beiden anderen Übergänge beschreiben die Meta- $R_C$ -Bildung. Beide Übergänge zeigen, wie der Vergleich der Amplituden gezeigt hat, ähnliche spektrale Änderungen wie die bei der Meta- $R_C$ -Bildung des WT. Auch die Zeitkonstante des zweiten Überganges ( $\tau_2=2,9\text{ms}$ ) entspricht in etwa der des WT (2,7 ms), wohingegen die zweite etwa um einen Faktor 10 größer ist (34 ms). Noch deutlicher sind die Ähnlichkeiten der spektralen Übergänge wenn man die Summe der zweiten und dritten Amplitude mit der zweiten des WT vergleicht. Es fällt aber auch auf, dass bei Y166H eine geringere Absorptionzunahme im Bereich von 750 nm stattfindet wie bei der Meta- $R_C$ -Bildung des WT. Weiterhin erfolgt die Protonenabgabe bei Y166H mit zwei Übergängen (2,3 ms und 41 ms) deren Zeitkonstanten gut mit dem zweiten und dritten Übergang der Messungen ohne Farbstoff übereinstimmen. Aus diesen Daten kann der Schluss gezogen werden, dass mit dem zweiten und dritten Übergang von Y166H ein Meta- $R_C$ -ähnliches Intermediat gebildet wird, dass im Vergleich zum Meta- $R_C$ -Intermediat des WT eine geringere Absorption bei 750 nm aufweist. Die Meta- $R_C$ -Bildung bei Y166H erfolgt also mit zwei spektralen Übergängen.

Das RR-Spektrum des eingefangenen Intermediates von Y166H zeigte, dass der Chromophor teilweise protoniert ist (persönliche Mitteilung D. von Stetten). Deshalb wurde angenommen, dass dieser Unterschied auf einen unterschiedlichen Protonentransfer bei der Meta- $R_C$ -Bildung

zurückzuführen ist. Aber die Messung der Kinetik bei den pH-Werten 6,6 und 9,2 zeigten nur den schon beim WT gefundenen Einfluss auf die Raten der Übergänge und den bekannten Einfluss auf die Amplituden. Vor allem wurde kein unterschiedliches Verhalten in Abhängigkeit des pH-Wertes für den zweiten und dritten Übergang gefunden. Das bedeutet, dass die Änderungen in der Meta- $R_C$ -Bildung von Y166H wohl nicht durch geschwindigkeitsbegrenzende Protonentransferschritte verursacht werden. Insgesamt waren alle Schritte der Kinetik von Y166H gegenüber dem WT verlangsamt. Ob dies auf einen sterischen Effekt zurückzuführen ist, oder ob es sich dabei um geänderte elektrostatische Wechselwirkungen handelt, die während der Photokonversion nach  $P_{fr}$  stattfinden, kann im Augenblick nicht gesagt werden.

Auf jeden Fall wird die  $P_{fr}$ -Bildung durch die Substitution von Y166H nicht verhindert, anders als bei der homologen Substitution Y176H des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 (Fischer 2004). Aber auch bei Agp1 führt die Substitution des Tyrosins 166 durch Histidin zu einem Einfluss auf das Absorptionsspektrum des  $P_{fr}$ -Spektrums wie sich anhand der berechneten reinen Absorptions- und CD-Spektren zeigt. Die Unterschiede sind wohl vorwiegend eine Folge der Aufspaltung der Meta- $R_C$ -Bildung in zwei spektrale Übergänge, die beide mit einer Protonenabgabe ins Medium gekoppelt sind.

### 2.4.3.3 Strukturelle Implikation

Anders als die analoge Substitution des zu Y166 homologen Tyrosins 176 des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1, führt diese bei Agp1 nicht zum Verlust der Fähigkeit  $P_{fr}$  zu bilden. Obwohl die Assemblierung von Y176H mit PCB spektral zu einem  $P_r$ -Zustand führte, zeigte diese Mutante statt der Photokonversion eine starke Fluoreszenz (Fischer 2004, 2005). Damit zeigte diese Mutante ein ähnliches photochromes Verhalten wie die Phycobiliproteine in den Lichtsammelkomplexen (Scheer 1981), die anstelle der Photokonversion eine starke Fluoreszenz zeigen. Mechanistisch wurde der Wechsel von Photokonversion zur Fluoreszenz von Y176H so gedeutet, dass der Histidinrest die Z/E-Isomerisierung der C15-Methinbrücke verhindert. Dabei soll das Histidin eine Wasserstoffbrücke mit einer anderen Aminosäure ausbilden, wodurch es zur Blockade von Ring D kommt (Fischer 2004). Auch beim *Arabidopsis* Phytochrom PhyA wurde bei der homologen Substitution ein Wechsel von der Photokonversion zur Fluoreszenz gefunden. Bei dem bakteriellen Phytochrom PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* (Tasler 2005), das wie Agp1 BV als Chromophor einbaut, und bei Agp1 konnte dieser Wechsel hingegen nicht beobachtet werden (Daten der Fluoreszenz von Agp1 nicht gezeigt). Das heißt, dass die Substitution des Tyrosins durch Histidin zu einem unterschiedlichen Effekt führt. Bei Cph1 und PhyA wird durch die Substitution die Photoreaktion, die Z/E-Isomerisierung, verhindert und der angeregte Zustand geht durch Abgabe von Strahlung in den Grundzustand über. Ob es sich dabei um die bei Fischer beschriebene sterische Blockierung handelt, kann im Moment nicht eindeutig beantwortet werden (Fischer 2004), vor allem da die Photokonversion bei den BV einbauenden Phytochromen PaBphP und Agp1 nicht blockiert wurde. Dies könnte bedeuten, dass trotz des hohen Konservierungsgrades dieses Tyrosins, die Bindungstaschen der unterschiedlichen Phytochromfamilien sich punktuell so unterscheiden, dass die Substitution aufgrund dieser Unterschiede zu anderen Effekten führt. Aus diesem Grund führt wahrscheinlich auch die Analyse der Strukturdaten des DrBphP und RpBphP3 zu keinem Erfolg, da der natürliche Chromophor dieser Phytochrome BV ist. Andererseits kann auch die unterschiedliche kovalente Verknüpfung von PCB und PΦB einerseits und BV andererseits für dieses Verhalten verantwortlich sein, indem die Chromophore dadurch anders in der Bindungstasche positioniert werden. Dadurch, dass bei Cph1 und PhyA bereits die Photokonversion blockiert ist, kann auch nicht gesagt werden, ob die Substitution dort einen vergleichbaren Einfluss auf die Kinetik hätte, wie er in dieser Arbeit bei Agp1 gefunden wurde. Zwar ist bei Agp1 die Photokonversion nicht blockiert, aber alle Übergänge

sind bei Y166H im Vergleich zum WT verlangsamt und die Bildung des Meta-R<sub>C</sub>-ähnlichen Intermediates erfolgt in zwei spektralen Übergängen. Wie schon an anderer Stelle erwähnt, sind Aussagen wie sich eine Substitution auf die Photokonversion auswirkt rein spekulativ, da noch nicht bekannt ist welche Interaktionen der Chromophor mit der Bindungstasche in den jeweiligen Intermediaten eingeht.

Interessanterweise wird aber bei der Substitution von Y176 durch Phenylalanin (F) bei Cph1 (Fischer 2005), das sich von Tyrosin nur durch die Hydroxylgruppe des Tyrosins unterscheidet, gar kein photochromes Addukt gebildet. Das Addukt nach der Assemblierung erinnert spektral an das Photoprodukt von H250A von Agp1 (Fischer 2005; von Stetten 2007). Das bedeutet, dass ohne diese Hydroxylgruppe von Y176 gar kein P<sub>r</sub>-Zustand gebildet wird. Hydroxylgruppen sind prädestiniert dafür, dass sie an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken beteiligt sind, das heißt, das Tyrosin 176 von Cph1 über die Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrücke ausbildet, die essentiell für die Ausbildung des P<sub>r</sub>-Zustandes ist. Die zu Y176 von Cph1 homologe Aminosäure in DrBphP und RpBphP3 ist nach der Kristallstruktur (1ZTU) an der hydrophoben Umgebung von Ring D des Chromophors beteiligt (Wagner 2005,2006; Yang 2007). Für sie ist aber keine Wasserstoffbrücke beschrieben, die für die Ausbildung des P<sub>r</sub>-Zustandes notwendig wäre. Wie schon oben könnte die Erklärung für diesen Mangel daran liegen, dass Y176 in Cph1 anders in der Bindungstasche liegt und andere Interaktionen ausbildet. Auf jeden Fall wäre es von Interesse, ob die Substitution Y166F bei Agp1 zu einem ähnlichen Effekt wie bei Y176F in Cph1 führt.

Tyrosin Y185 von RpBphP3 und Y176 von DrBphP sind laut den Strukturdaten vorwiegend an der hydrophoben Umgebung von Ring D des Chromophors beteiligt. Wie die Substitution von Y176 von Cph1 durch einen Histidinrest und Phenylalanin zeigte, spielt dieses Tyrosin eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung des P<sub>r</sub>-Zustandes, worauf auch der verminderte pK-Wert des Chromophors bei Agp1 bei der analogen Substitution hinweist. Weiterhin wirkt sich die Substitution bei Agp1 auf die Kinetik der Photokonversion nach P<sub>fr</sub> aus, was zeigt dass dieser Rest nicht nur die hydrophobe Tasche bildet, sondern auch während der Photokonversion Interaktionen mit dem Chromophor eingeht.