

7. Das Hybrid Ppr aus *Rhodospirillum centenum*

Bei einer Studie über die biologische Rolle des Blaulichtrezeptors PYP („photoactive yellow protein“) fanden Bauer und Mitarbeiter im Purpurbakterium *Rhodospirillum centenum* eine PYP Domäne, die Teil eines größeren offenen Leserasters (ORFs „Open reading frame“) war und das für ein etwa 96 kD großes Protein kodierte (Jiang 1999). Eine Homologie-Recherche ergab, dass das Protein ein Hybrid von drei Domänen ist. Am N-terminalen Ende sitzt eine 135 AS große PYP-ähnlichen Domäne, gefolgt von einer 500 AS großen Domäne die starke Homologien zu den Chromophorbindingdomänen (CBD) der Phytochrome aufweist. Der C-terminale Teil besteht aus einer 250 AS großen Domäne, die Homologien zu den prokaryotischen Histidin Kinasen aufweist. Aufgrund der gefundenen Domänenstruktur wurde es als Ppr („PYP-phytochrome-related“) bezeichnet. Ppr ähnelt vom Aufbau her dem Protein Ppd (PYP/Phytochrome/diguanylate cyclase) aus *Thermochromatium tepidum*, das ebenfalls aus einer PYP und Phytochromdomäne aufgebaut ist, nur dass die C-terminale Domäne eine Diguanylat Cyclase statt der Histidin-Kinase ist (Kyndt 2004, 2005).

In der Studie von Jiang (Jiang 1999) konnte gezeigt werden, dass Ppr die Expression einer Polyketid Synthase (PKS) reguliert, die eine große Homologie zu den Chalkonsynthasen der Pflanzen hat. Chalkonsynthasen (CHS) katalysieren die Kondensation von drei Molekülen Malonyl CoA mit Coumaroyl CoA. Das Produkt, das dabei entsteht, ist Naringenin Chalkon, der Vorläufer aller Flavonoide. Die Chalkonsynthase steht somit am Anfang dieses Biosyntheseweges. In den Pflanzen wird die CHS-Expression durch rotes und blaues Licht über den Signaltransduktionsweg von Phytochrom und Cryptochrom reguliert (Martin 1993). Bauer und Mitarbeiter (Jiang et al. 1999) konnten zeigen, dass die Polyketid-Synthese durch weißes Licht verlangsamt wird. Da Ppr ein Hybrid aus einem Rot- und Blaulichtrezeptor ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die PKS von *Rhodospirillum* nur über Ppr reguliert wird (Jiang 1999). Bei den Studien an Ppr geht es nicht nur darum, die beiden photochromen Domänen zu untersuchen und mit ihren Homologen zu vergleichen, sondern es ist von besonderem Interesse, ob die beiden Domänen miteinander wechselwirken und sich gegenseitig beeinflussen.

7.1 Expression, Stabilität und Absorptionsspektren von Holo-Holo-Ppr

Durch Koexpression des Ppr-Gens mit den Genen für die BV-Synthese und die Holo-PYP-Bildung (für die kovalente Verknüpfung des Chromophors p-Hydroxy-Zimtsäure mit PYP wird ein extra Enzym benötigt) wurde das als Holo-Holo-Ppr bezeichnete Protein erhalten, bei dem p-Hydroxyzimtsäure und Biliverdin (BV) in ihre jeweiligen Domänen eingebaut worden waren (Kyndt 2007). Bei den folgenden Untersuchungen stellte sich heraus, dass Holo-Holo-Ppr instabil ist. Selbst bei einer Lagerung des gelösten Proteins bei 4°C wurde das Protein abgebaut, wobei es zur Abspaltung der PYP- und Teilen der Histidinkinase-Domäne kam (Kyndt 2007). Aus diesem Grund wurden die Proben zur Stabilisierung mit ca. 20 Prozent Glycerol versetzt und vermessen. Das Absorptionsspektrum von Holo-Holo-Ppr (ab hier mit Ppr bezeichnet) weist mehrere Absorptionsmaxima auf (Abbildung 7.1), ein Maximum bei 702 nm mit einer Schulter bei 650 nm und ein weiteres bei 400 nm mit einer Schulter bei 434 nm. Wie der Vergleich mit den beiden einzeln regenerierten Domänen von Ppr zeigt (Jiang 1999, Kyndt 2007) ist die Absorption bei 400 nm auf die Soret-Bande der Phytochrom-Domäne und die Schulter bei 434 nm auf die Absorption der PYP-Domäne zurückzuführen, während die Absorption um 700 nm auf die Q-Bande der Phytochromdomäne zurückzuführen ist. Dabei ist die Soret-Bande um etwa vier nm bathochrom verschoben im Vergleich zur einzeln regenerierten Phytochrom Domäne. Im Vergleich zum PYP-Konstrukt von Ppr (435 nm) ist das Maximum des Holo-Holo-Proteins der PYP-Domäne (434 nm) um ein nm bathochrom

verschoben, was aber auch eine Folge der Überlagerung mit der Soret-Bande der Phytochromdomäne sein kann. Das Spektrum von Holo-Holo-Ppr setzt sich also additiv aus den Spektren der beiden Einzeldomänen zusammen.

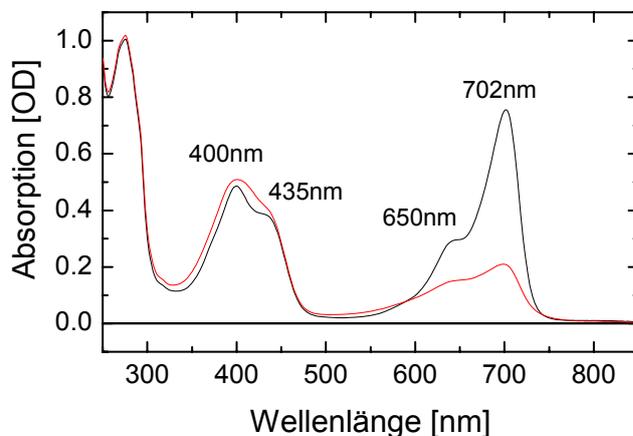


Abbildung 7.1: Absorptionsspektrum von Holo-Holo-Ppr vor und nach roter Beleuchtung
Absorptionsspektrum von Ppr nach Assemblierung mit BV und p-Hydroxy-Zimtsäure im Dunkeln (schwarz) und nach einer Minute roter Beleuchtung (LED, 680 nm) (rot). Bedingungen: 20 Prozent Glycerol, 400 mM NaCl, 150 mM Imidazol und 50 mM KPP, pH 7,0, 20°C.

7.2 Einfluss von blauem und rotem Licht auf das Absorptionsspektrum

Um Einflüsse durch das Raumlicht auszuschließen, wurden die Proben im Dunkeln vorbereitet. Die Spektren wurden thermostatisiert bei 20°C gemessen. Die Exposition mit rotem Licht der Wellenlänge 680 nm führt bei Holo-Holo-Ppr statt zu der bei anderen Phytochromen beobachteten bathochromen Verschiebung der Q-Bande (Borucki 2005; Lamparter 1997) nur zu einer Bleichung derselben. Gleichzeitig verbreitert sich die Soret-Bande, was zu einem charakteristischen Differenzspektrum (Abbildung 7.2 B) in diesem Bereich führt, das zwei positive Banden bei 383 und 415 nm aufweist mit einem Tal bei 400 nm. Nach der Exposition mit rotem Licht wurden weitere Spektren nach 2, 5, 10, 20, 30, 63, 90 und 150 min aufgenommen, wobei die Probe währenddessen unter Lichtausschluss im Photometer thermostatisiert gelagert wurden.

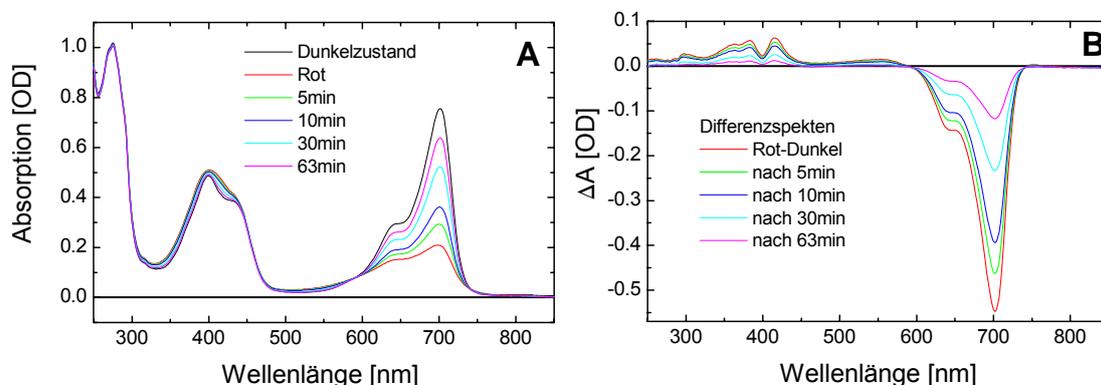


Abbildung 7.2: Absorption- und Differenzspektren von Ppr nach roter Beleuchtung
(A) Absorptionsspektren und die dazugehörigen Differenzspektren (B) der Dunkelreversion von Holo-Holo-Ppr nach roter Beleuchtung (LED 680 nm) zu den in der Abbildung angegebenen Zeitpunkten. Bedingungen: T=20°C; d = ein cm, pH 7, 20 Prozent Glycerol, 400 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 50 mM KPP.

Die Spektren und Differenzspektren in Abbildung 7.2 zeigen, dass es zu einer Dunkelrelaxation des Photoproduktes in den „P_r“-Zustand der Phytochromdomäne kommt, die bei den gewählten Bedingungen nach etwa zwei Stunden abgeschlossen war. Trägt man die Absorptionsmaxima dieser Spektren (702 nm) als Funktion der Zeit nach der roten Beleuchtung auf, erhält man die in Abbildung 7.3 dargestellte Kurve. Die Kurve lässt sich mit zwei Exponentialfunktionen fitten, wobei die beiden Zeitkonstanten von 16 und 54 min erhalten werden.

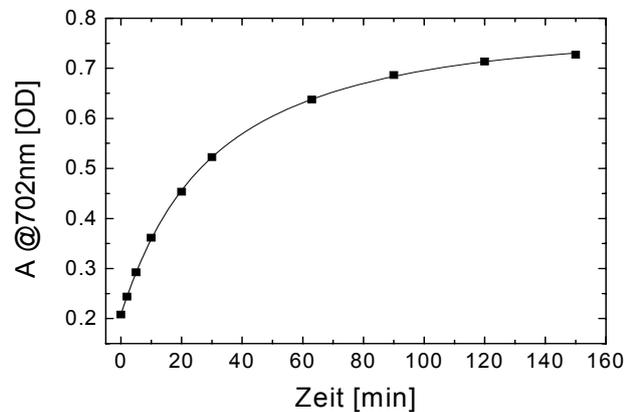


Abbildung 7.3: Absorption bei 702 nm nach roter Beleuchtung

Kinetik der Dunkelreversion von Holo-Holo-Ppr nach roter Beleuchtung. Es wurde die Absorption bei 702 nm der Spektren aus Abbildung 7.2 über die Zeit aufgetragen. Beim Fit (durchgezogene Linie) mit zwei Exponentialfunktionen wurden die Zeitkonstanten von 16 und 54 min erhalten. Bedingungen: siehe Abb. 7.2.

Während sich die Phytochromdomäne aufgrund der Lage der Q-Bande einzeln anregen lässt, bereitet die ausschließliche Anregung der PYP-Domäne aufgrund der Überlappung mit der Soret-Bande der Phytochromdomäne Probleme. Wie das Spektrum der Phytochromdomäne von Ppr zeigt, absorbiert die Soret-Bande bei 470 nm nicht mehr (Kyndt 2007). Aus diesem Grund wurde für die Anregung der PYP-Bande eine LED mit einem Emissionsmaximum bei 470 nm verwendet, mit der die ausschließliche Anregung der PYP-Domäne von Ppr gelang (Abbildung 7.4).

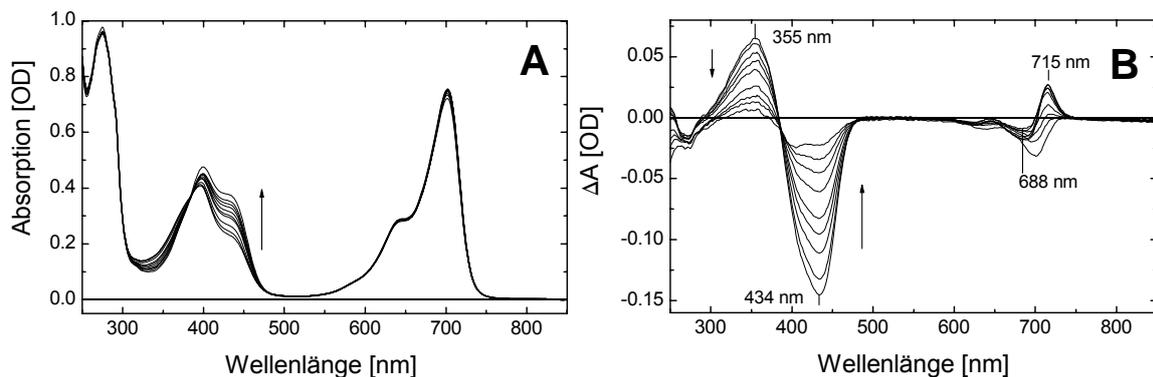


Abbildung 7.4: Absorptions- und Differenzspektren nach blauer Beleuchtung von Ppr

Absorptionsspektren (A) und die dazugehörigen Differenzspektren (B) der Dunkelreversion von Holo-Holo-Ppr nach blauer Beleuchtung (LED 470 nm) nach 0, 2, 10, 40, 121, 600, 1170, 1770, 3120 Minuten. Die Richtung der Änderung wird durch Pfeile angezeigt.

Bedingungen: 20°C (d=1cm), 20% Glycerol, 400mM NaCl, 150mM Imidazol, 50mM KPP, pH 7,0.

Da ein Einfluss der roten Beleuchtung auf die photochromen Eigenschaften der PYP-Domäne nicht ausgeschlossen werden kann, wurden die Messungen mit einer unbeleuchteten Probe angefertigt. Die Exposition mit blauem Licht verursacht eine Bleichung im Bereich von 435 nm, also dem Absorptionsmaximum der PYP-Bande, und eine Absorptionzunahme bei etwa 350 nm (Abbildung 7.4).

Überraschenderweise kommt es zusätzlich zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums der Q-Bande von einem nm ($702 \rightarrow 703$ nm) (Abbildung 7.4 A), die sich im Differenzspektrum durch die Absorptionsänderungen bei 688 und 715 nm manifestieren (Abbildung 7.4B). Das beobachtete Muster im Differenzspektrum der Q-Bande unterscheidet sich von dem Differenzspektrum nach roter Beleuchtung (Abbildung 7.2 B), was gegen eine Anregung der Soret-Bande der Phytochromdomäne spricht. Insgesamt sind die Änderungen in der Q-Bande sehr gering, wie die Absorptionsspektren zeigen, nichtsdestotrotz deutet die Änderung in der Q-Bande nach Anregung der PYP-Bande auf eine Interaktion der beiden photochromen Domänen von Ppr hin.

Zur Untersuchung der Dunkelreversion nach der blauen Beleuchtung wurden über einen Zeitraum von 52 Stunden Absorptionsspektren (20°C) aufgenommen (Abbildung 7.4). Das Spektrum nach 52 h Dunkelreversion zeigt, dass selbst nach dieser Zeitspanne der Ausgangszustand noch lange nicht erreicht ist. Damit zeigt die PYP-Domäne ein anderes photochromes Verhalten als zum Beispiel PYP aus *Ectothiorhodospira halophila*, das nach der Anregung mit blauem Licht einen Photozyklus durchläuft, der innerhalb von 140 bis 400 ms wieder zum Ausgangszustand führt (Devanathan 1998; Joshi 2005). Nach etwa 40 Stunden ändert sich der Verlauf des Differenzspektrums von Ppr (Daten nicht gezeigt), wie man auch anhand des Differenzspektrums nach 52 h in Abbildung 7.4 B beobachten kann. Dies könnte auf eine Aggregation oder eine beginnende Denaturierung des Proteins hinweisen, was wiederum bedeutet, dass der Ausgangszustand nicht vollständig zurückgebildet wird.

Zur Bestimmung der Kinetik der Dunkelreversion nach blauer Beleuchtung wurde die Absorption bei 433 und 357 nm, den Maxima der Differenzspektren als Funktion der Zeit aufgetragen. In Abbildung 7.5 sind die Verläufe mit einer linearen (A) und logarithmischen (B) Zeitachse dargestellt.

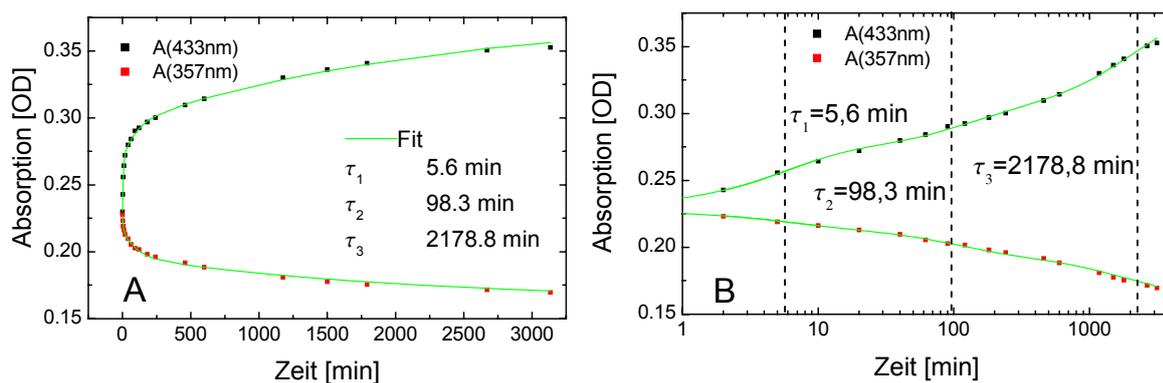


Abbildung 7.5: Absorption bei 433 und 357 nm nach blauer Beleuchtung

Darstellung der Absorptionsänderungen nach blauer Beleuchtung (LED 470 nm) von Holo-Holo-Ppr bei 357 und 433 nm mit einer linearen (A) und einer logarithmischen Zeitachse (B). Das Ergebnis des simultanten Fits der beiden Kurven ist durch vertikale gestrichelte Linien in B markiert. Bedingungen: siehe Abbildung 7.4.

Beide Kurven wurden simultan mit drei Exponentialfunktionen gefittet, wobei die Werte bei unendlicher Zeit festgelegt wurden, und zwar durch die Werte der Absorption des Dunkelspektrums bei 433 und 357 nm. Die Zeitkonstanten des Fits ergaben eine kurze Zeit von etwa fünf Minuten, eine mittlere von etwa 100 Minuten und eine sehr lange Zeit von 2.180 Minu-

ten. Das heißt für die Dunkelreversion des Photoproduktes der PYP Domäne werden drei Übergänge gefunden.

Die aus dem Fit erhaltenen Amplituden weisen für den langsamsten Übergang die größte Amplitude auf. Diese ist sogar größer als die Amplituden der beiden anderen Übergänge zusammen, was erklärt, warum auch nach 52 h immer noch ein großer Anteil der PYP-Bande gebleicht ist. Das heißt der letzte Schritt ist mit einer verhältnismäßig großen Absorptionsänderung verbunden.

7.3 CD Spektren von Holo-Holo-Ppr

Die CD-Spektren wurden wie bei Agp1 mit einem Jasco 500A bei einer Schichtdicke von einem cm, einer Auflösung von einem nm, der Sensitivity zwei m°/cm und der Zeitkonstante $64 \times 10^{-3}s$ angefertigt (Kap. 2.2.6). Die Spektren wurden auf Effekte des Puffers und des Mediums durch Differenzbildung der Spektren mit und ohne Protein korrigiert. Die recht schnelle Dunkelreversion nach roter Beleuchtung führt zu einer Entvölkerung des gebleichten Zustandes, während der Aufnahme eines CD-Spektrums. Um die Kinetik der Dunkelreversion zu verlangsamen und um einen höheren Anteil des gebleichten Zustandes zu akkumulieren, wurden die Messungen bei $10^{\circ}C$ durchgeführt.

In Abbildung 7.6 A sind die CD Spektren des Dunkelzustandes und nach roter Beleuchtung (LED 680 nm) dargestellt.

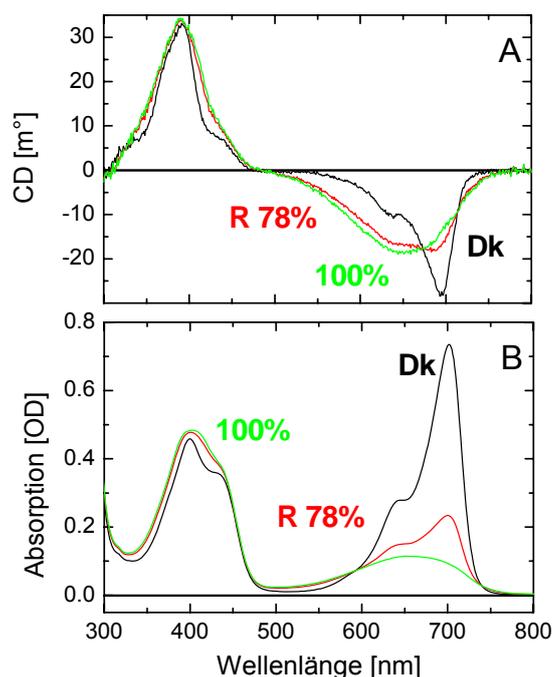


Abbildung 7.6: Absorptions- und CD-Spektren von P_r und nach roter Beleuchtung

CD (A) und Absorptionsspektren (B) von Holo-Holo-Ppr im Dunkeln (Dk) und nach roter Beleuchtung (R 78 Prozent) (LED 680 nm). Die CD-Spektren wurden auf Puffereinflüsse korrigiert. Unter der Annahme, dass die rote Beleuchtung zu einer Aktivierung von etwa 78Prozent führt, wurden die Spektren für 100 Prozent Aktivierung berechnet (grün).

Bedingungen: 20 Prozent Glycerol, 400 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 50 mM KPP, pH 7,0, d = ein cm, $T=10^{\circ}C$.

Das CD-Spektrum des Dunkelzustandes gleicht vom Verlauf her denen des P_r-Zustandes anderer Phytochrome. Das CD-Signal der Q-Bande ist negativ und das der Soret-Bande positiv und die Rotationsstärke der beiden Banden steht in etwa im Verhältnis 1:1. Bei etwa 430 nm weist das CD-Spektrum ein weiteres positives Signal auf, das analog zu den Absorptionsspektren auf die PYP-Domäne zurückzuführen ist, wie das CD-Spektrum des PYP-Konstruktes von Ppr zeigt (Abbildung 7.7). Das Verhältnis von Soret-Bande zur PYP-Domäne ist in den CD-Spektren größer als in den Absorptionsspektren (Abbildung 7.6 A und B). Das bedeutet, dass die Rotationsstärke der PYP-Domäne geringer ist als die der Soret-Bande der Phytochromdomäne.

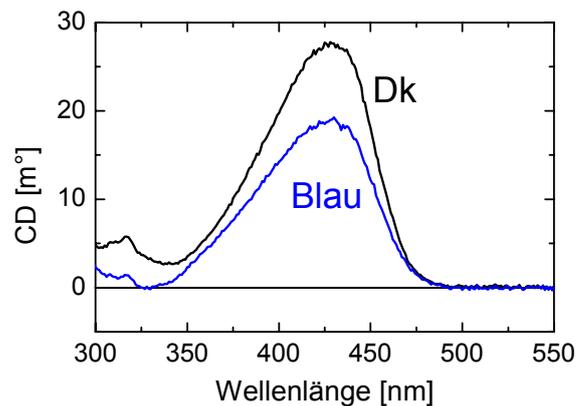


Abbildung 7.7: CD-Spektren von Ppr-PYP

Darstellung der CD-Spektren von Ppr-PYP im Dunkelzustand (Dk) und nach Beleuchtung mit blauem Licht (Blau/Kaltlichtlampe KL1500 e/5 mit dem Filter BG37).

Bedingungen: fünf Prozent Glycerol, zehn mM Mops, zehn mM NaCl, pH 7,0; RT.

Nach roter Beleuchtung nimmt das CD-Signal der Q-Bande bei 702 nm ab und im Bereich von 650 nm wird es größer (Abbildung 7.6 A). Gleichzeitig verbreitert sich das CD-Signal der Soret-Bande wie in der Absorption. Weiterhin verschwindet auch im CD-Spektrum des Photoproduktes bei 700 nm die Bande nicht vollständig, wobei die Rotationsstärke bei den bei 10°C aufgenommenen CD-Spektren geringer ist als bei den bei RT gemessenen Spektren (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund spricht vieles dafür, dass die Bande bei 702 nm dem Anteil entspricht, der nicht durch Photokonversion zum Photoprodukt umgewandelt wurde oder der schon durch Dunkelreversion wieder in den Ausgangszustand zurückgekehrt ist. Unter dieser Annahme wurde sowohl ein CD- als auch ein Absorptionsspektren berechnet bei dem 100 Prozent Ppr in das Photoprodukt umgewandelt wurden (grüne Kurve Abbildung 7.6) mit dem Kriterium, dass die Bande bei 702 nm verschwindet. Das berechnete CD-Spektrum des Photoproduktes gleicht im Verlauf dem des Photoproduktes der H250A-Mutante von Agp1 (Kap. 6), weshalb angenommen wird, dass in beiden Fällen ein ähnliches Produkt gebildet wird.

Blaues Licht (LED 470 nm) verursacht, wie aufgrund der geringen Rotationsstärke der PYP-Domäne zu erwarten war, nur eine geringe Änderung im CD-Signal im Bereich der PYP-Domäne (Abbildung 7.8), während es im Bereich der Phytochromdomäne zu keinen Änderungen führt. Auch beim PYP-Konstrukt von Ppr (Abbildung 7.7) führt blaues Licht nur zu einem geringen Rückgang der Rotationsstärke und ist somit konsistent mit dem Ergebnis des Holo-Holo-Ppr.

Weißes Licht, das alle Anteile des Lichtes enthält, führt bei Holo-Holo-Ppr zu anderen Absorptionsänderungen wie rotes und blaues Licht alleine (Kyndt 2007, Abbildung 7.8). Dies wird auf eine Interaktion der beiden Domänen miteinander zurückgeführt (Kyndt 2007). Um

diesen integrativen Effekt von rotem und blauem Licht auf die Änderungen im CD-Signal zu untersuchen, wurde eine Holo-Holo-Ppr-Probe zuerst mit blauem Licht und anschließend mit rotem Licht beleuchtet. Wie man anhand von Abbildung 7.8 A erkennen kann fällt die Abnahme der Rotationsstärke in der Q-Bande geringer aus, wenn die Probe vorher blauem Licht ausgesetzt war. Wie man anhand der Absorptionsspektren beobachten kann (Abbildung 7.8) wird die Oszillatorstärke weniger durch die blaue Vorbeleuchtung beeinflusst als die Rotationsstärke (Abbildung 7.8 A). Es wird aber bei beiden Messungen ein integrativer Effekt von blauem und rotem Licht auf das CD-Signal der Phytochromdomäne gefunden.

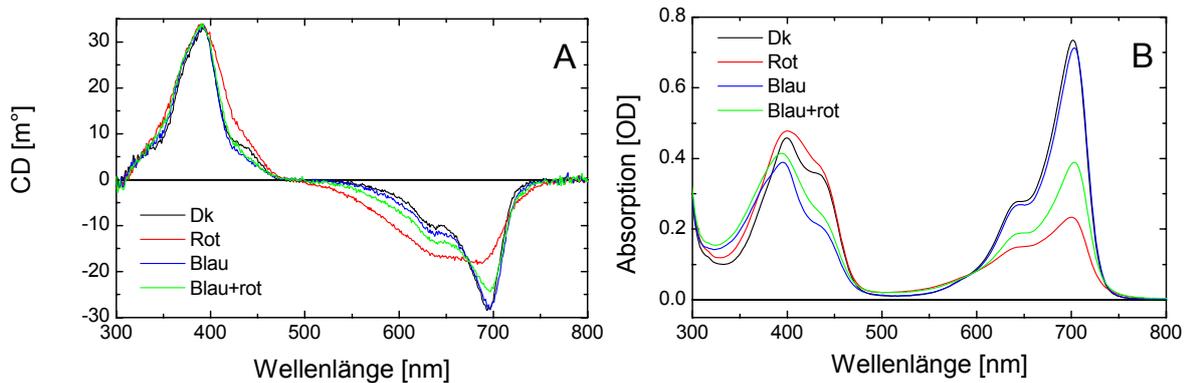


Abbildung 7.8: CD- (A) und Absorptionsspektren (B) von Holo-Holo-Ppr im Dunkeln (Dk), nach roter, blauer und blauer+ roter Beleuchtung Bedingungen wie bei Abbildung 7.6.

7.4 Transiente Absorptionsänderungen von Ppr nach Anregung der Phytochromdomäne

Für die transienten Messungen wurde die Phytochrom-Domäne von Holo-Holo-Ppr bei 695 nm angeregt (Farbstoff: Pyridin 1 in PC). Aufgrund der Tatsache, dass sich das Photoprodukt nicht durch Licht in den Dunkelzustand überführen ließ und der langsamen Dunkelreversion, erfolgte die Datenaufnahme wie folgt: Erst wurde die Hochspannung des Photomultipliers eingestellt, während die Probe vom Messlicht ausgeleuchtet wurde. Nach 30 min Dunkelreversion unter Ausschluss des Messlichtes wurde die Probe fünfmal hintereinander angeregt. Nach diesem Verfahren wurden Zeitspuren bei 640, 660, 675, 690, 700, 715, 725, 750 und 385 und 415 nm aufgenommen. In Abbildung 7.9 sind die Zeitspuren im Zeitbereich von zehn μ s bis fünf s dargestellt.

Bei etwa 20 μ s wird bei 700 nm ein negatives ΔA und bei 725 nm ein positives ΔA gefunden, was darauf schließen lässt, dass analog zu Agp1 (Kap. 3) ein Lumi-R ähnliches Intermediat in diesem Bereich gebildet wird. Auch die Änderungen ab 20 μ s sind vergleichbar zu denen von Agp1 in diesem Zeitbereich. Darauf folgt bei den Zeitspuren ≤ 700 nm eine Zunahme des Signals, die bei den analogen Zeitspuren von Agp1 nicht beobachtet werden konnten. Ab drei bis vier Millisekunden nimmt die Absorption in nahezu allen Zeitspuren ab, was die fehlende bathochrome Verschiebung der Q-Bande erklärt. Die Änderungen ab 300 ms sind wie bei Agp1 (Kap. 3) auf das Messlicht zurückzuführen. Bei der 415 nm Zeitspur (Abbildung 7.9 B), die ein Minimum im Differenzspektrum repräsentiert, ist das ΔA von Anfang an vorhanden und ändert sich im weiteren Verlauf praktisch nicht mehr. Das positive Signal bei 385 nm ab etwa einer ms reflektiert hingegen die Verbreiterung der Soret-Bande, die mit dem letzten Übergang bei 47ms einhergeht. Der simultane Fit mit drei Exponentialfunktionen im Zeitbereich von 20 μ s bis 300 ms ergab drei Komponenten mit den Zeitkonstanten $\tau_1=95 \mu$ s, $\tau_2=350 \mu$ s und $\tau_3=47$ ms.

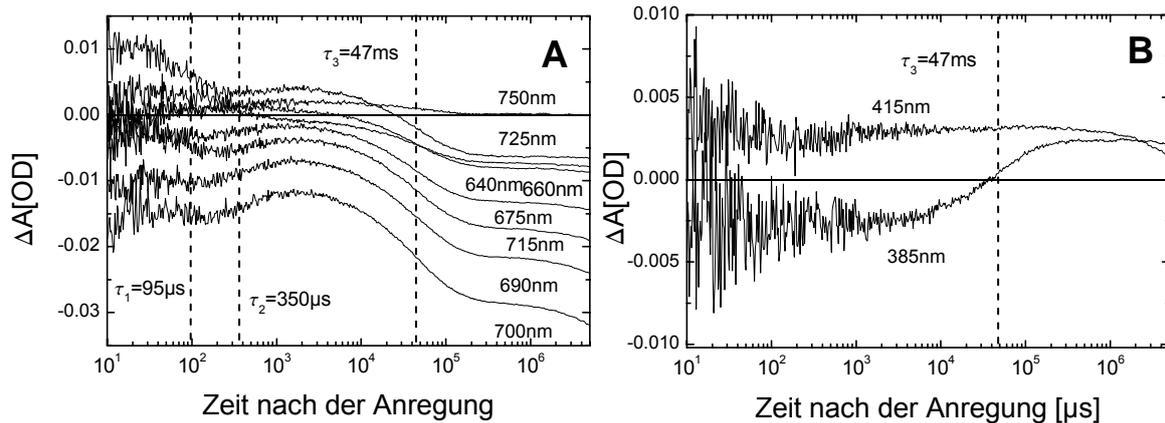


Abbildung 7.9: Transiente Absorptionsspektren von Holo-Holo-Ppr bei den angegebenen Wellenlängen nach Laseranregung bei 695 nm

Die jeweiligen Übergänge aus dem simultanen Fit sind in A durch vertikale gestrichelte Linien gekennzeichnet. Bedingungen: 20 Prozent Glycerol, 400 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 50 mM KPP, T=20°C, pH 7,0.

Die Amplitudenspektren, die sich aus den Amplituden des simultanen Fits ergeben, sind in Abbildung 7.10 dargestellt. Das extrapolierte Anfangsspektrum, das durch Summation der Amplituden aller Komponenten erhalten wird, ähnelt dem Lumi-R minus P_r-Differenzspektrum des WT von Agp1. Das Amplitudenspektrum der ersten Komponente (A₁=95 μs) zeigt, dass es zu einer Bleichung mit dem Maximum bei 720 nm kommt, wodurch es zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums kommt. Die Amplitude der zweiten Komponente (A₂=350 μs) ist durch eine Absorptionzunahme mit einem Maximum bei 700 nm gekennzeichnet und die dritte Amplitude ist vom Verlauf her spiegelsymmetrisch zur zweiten Amplitude, nur dass die Bleichung stärker ist als die vorhergehende Absorptionzunahme. Insgesamt werden nach Anregung der Phytochromdomäne von Ppr bei 695 nm drei Übergänge gefunden, von denen zumindest die ersten beiden Ähnlichkeiten mit den ersten beiden Übergängen von Agp1 aufweisen.

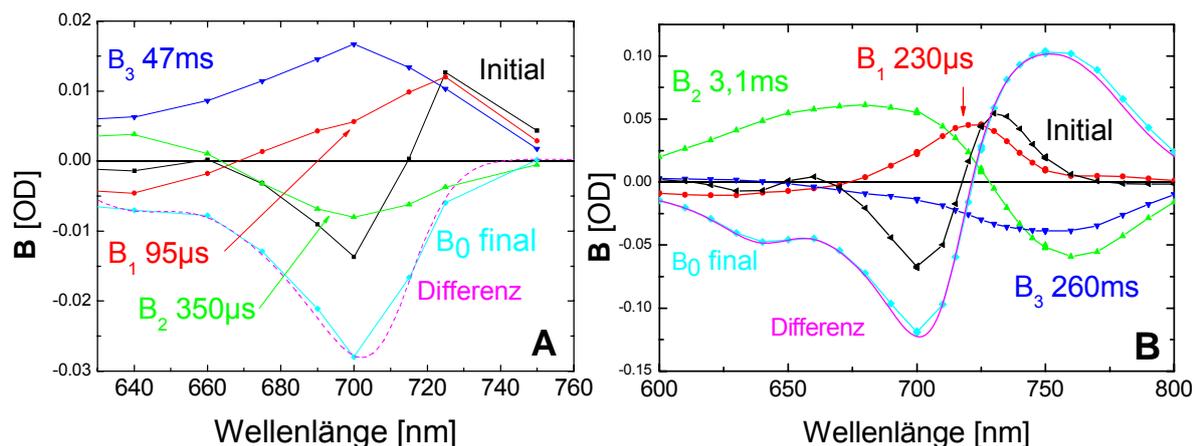


Abbildung 7.10: Vergleich der Amplitudenspektren von Ppr und Agp1

A: Amplitudenspektren des simultanen Fits der Daten von Abbildung 7.9, wie in der Abbildung angegeben, von Ppr nach Anregung bei 695nm.

B: Darstellung der Amplitudenspektren von Agp1-FL-BV nach Abbildung 3.5C zwischen 600 und 800nm.

7.5 Einfluss von blauem Licht auf die Kinetik

Die Absorptions- und CD-Spektren von Holo-Holo-Ppr nach roter Beleuchtung veränderten sich, wenn die Probe vorher blauem Licht ausgesetzt war. Aus diesem Grund wurden kinetische Messungen durchgeführt, wobei die Probe vor jeder Messung für 30 s mit der LED 470 nm beleuchtet wurde.

Wie der Vergleich der beiden Zeitspuren bei 700 nm mit und ohne blaue Vorbeleuchtung zeigt, wird die Kinetik der Phytochromdomäne stark durch die blaue Vorbeleuchtung beeinflusst, wobei der Einfluss auf die Amplitude der dritten Komponente am größten ist (Abbildung 7.11 und 7.12).

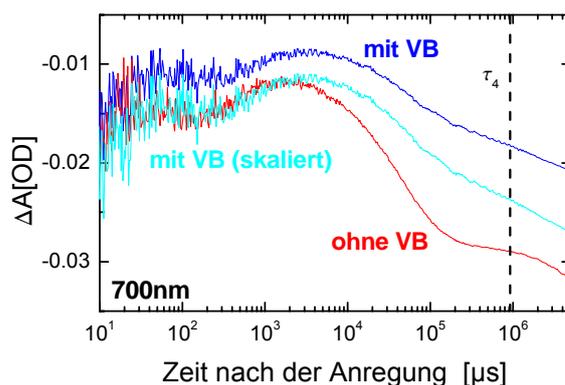


Abbildung 7.11: 700 nm Zeitspuren von Holo-Holo-Ppr mit und ohne blaue Vorbeleuchtung

Zeitspuren bei 700 nm von Holo-Holo-Ppr nach Anregung bei 695 nm nach 30 s blauer Vorbeleuchtung (mit VB; LED 470 nm) und ohne Vorbeleuchtung (ohne VB).

Die hellblaue Kurve ist die Kurve mit Vorbeleuchtung, die auf die Absorptionsänderungen bis eine ms der Kurve ohne Vorbeleuchtung skaliert wurde.

Wie eine Messung nach 30 min Dunkelrelaxation zeigte (Daten nicht gezeigt), ist der Effekt durch die blaue Vorbeleuchtung zumindest teilweise reversibel. Allerdings ist eine Zuordnung zu einer der Relaxationskomponenten im Augenblick nicht möglich. Es deutet aber einiges darauf hin, dass der Blaulichteffect mit der sehr langsamen Komponente verknüpft ist.

Die Zeitspuren mit blauer Vorbeleuchtung wurden analog zu denen ohne blaue Vorbeleuchtung von 20 μ s bis 300 ms simultan mit drei Exponentialfunktionen gefittet (siehe Tabelle 7.1). Der Vergleich der Zeitkonstanten in Tabelle 7.1 zeigt, dass die Zeiten aller Übergänge durch die blaue Beleuchtung größer werden. Eine Verbesserung des Fits wurde durch die Verwendung von vier Exponentialfunktionen erreicht. Die Zeitkonstante dieser zusätzlichen Komponente betrug 950 ms und konnte bei den Daten ohne Vorbeleuchtung nicht gefunden werden.

Blaue Vorbeleuchtung	τ_1	τ_2	τ_3	τ_4
ohne	95 μ s	350 μ s	47 ms	-
mit	250 μ s	580 μ s	84 ms	-
mit	240 μ s	620 μ s	64 ms	950 ms

Tabelle 7.1: Zeitkonstanten der Fits der Daten mit und ohne blaue Vorbeleuchtung

In den Amplitudenspektren in Abbildung 7.12 sind die Amplituden der dritten und vierten Komponente im Fall der blauen Vorbeleuchtung aufgrund derselben Charakteristik als Summe dargestellt worden. Wie der Vergleich der Amplituden mit (leere Symbole) und ohne (ausgefüllte Symbole) blauer Vorbeleuchtung zeigt, sind alle Amplitudenspektren nach blauer Vorbeleuchtung kleiner als die ohne Vorbeleuchtung. Die kleinere Amplitude des extrapolierten Endspektrums (B_0) der Daten mit blauer Vorbeleuchtung ist konsistent mit der geringeren Bleichung der Q-Bande der Phytochromdomäne nach blauer und roter Beleuchtung.

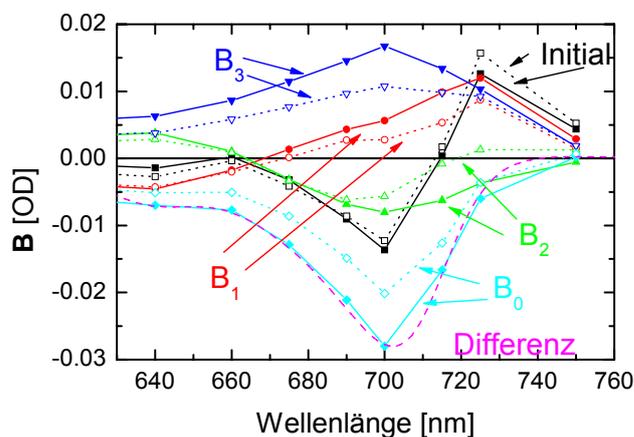


Abbildung 7.12: Amplitudenspektren von Ppr mit und ohne blauer Vorbeleuchtung

Darstellung der Amplitudenspektren des simultanen Fits der Daten von Abbildung 7.9 und den analogen mit blauer Vorbeleuchtung. Die gefüllten Symbole und durchgezogenen Linien sind die Spektren ohne blaue Vorbeleuchtung und die leeren Symbole und gestrichelten Linien sind die Spektren der Daten mit blauer Vorbeleuchtung.

Wie bei den stationären Absorptions- und CD-Messungen beeinflusst die gebleichte PYP-Domäne auch die transienten Absorptionsänderungen. Die bisher vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass der Blaulichteffekt mit der langsamsten Relaxationskomponente korreliert, was in weiteren Untersuchungen bestätigt werden sollte.

7.6 Das transiente Protonensignal der Phytochromdomäne

Die Messungen des Protonensignals werden mit ungepufferten Proben angefertigt. Dazu wird der Puffer und das Glycerin chromatographisch abgetrennt und die Probe mit 200 mM NaCl von der Säule (Sephadex G25 fine) eluiert. Wie schon bei Agp1 wurde der pH-Indikator Kresolrot (pK 8,2) verwendet, weshalb die ungepufferte Probe auf einen pH-Wert von 7,8, analog zu den Messungen von Agp1, eingestellt wurde.

Es wurden Zeitspuren bei 700 nm und 570 nm mit und ohne Farbstoff aufgenommen. Dabei wurde die Probe für jede Zeitspur viermal bei 695 nm angeregt. Nach jeweils zwei Anregungen erfolgte eine Dunkelreversion der Probe für 20 Minuten. Wie man anhand des Unterschiedes der Zeitspur bei 570 nm mit und ohne Farbstoff sehen kann (Abbildung 7.13 B), kommt es bei Ppr nach Anregung der Phytochromdomäne zu einer Protonenabgabe ins Medium. Die Protonenabgabe erfolgt in zwei Phasen mit den Zeitkonstanten von 590 μ s und 43 ms, wobei die Amplitude der ersten Komponente recht klein ist. Der Fit der 700 nm Zeitspur bei denselben Bedingungen ergab in diesem Zeitbereich zwei Übergänge mit den Zeitkonstanten von 220 μ s und 43 ms. Damit stimmen die beiden Phasen der Protonenabgabe in etwa mit dem zweiten und dritten Übergang des Proteins überein. Eine Protonenaufnahme zu einem späteren Zeitpunkt konnte nicht beobachtet werden.

In Abbildung 7.13 B und 7.14 ist qualitativ der Einfluss der blauen Vorbeleuchtung auf die Protonenabgabe dargestellt. Die gebleichte PYP-Domäne führt zu einer kleineren Amplitude der Protonenabgabe im frühen Zeitbereich. Allerdings wird das Signal ab 100 ms kontinuierlich größer und weist auch am Ende des Messbereiches noch eine große Steigung auf. Das könnte darauf hindeuten, dass auch bei gebleichter PYP-Domäne ein gleich großes Protonensignal erhalten wird, nur dass die Zeitkonstante in Gegensatz zur ungebleichten PYP-Domäne wesentlich größer ist. Die Messungen nach blauer Beleuchtung müssen allerdings erst noch bestätigt werden und eventuell unter Verwendung eines größeren Zeitbereiches ergänzt werden. Es besteht aber die Möglichkeit, dass die Protonenabgabe durch die gebleichte PYP-Domäne lediglich verzögert wird.

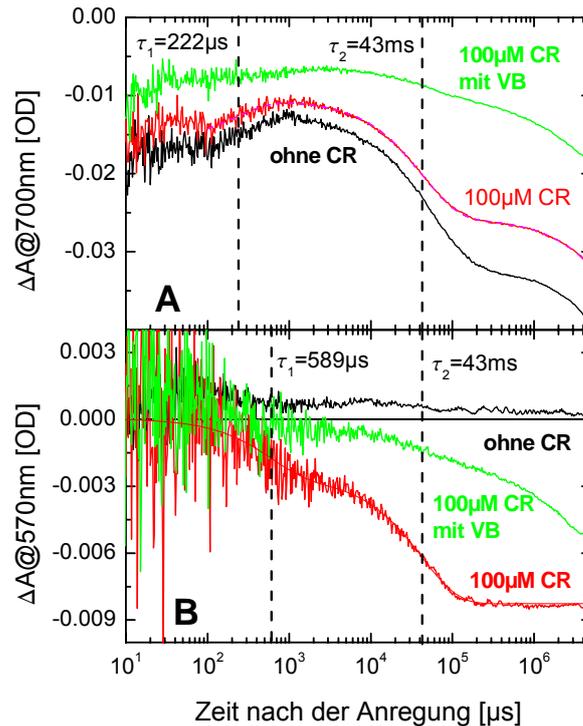


Abbildung 7.13: Absorptionsänderungen von Holo-Holo-Ppr bei 700 nm (A) und 570nm (B)

Die schwarzen Kurven (ohne CR) wurden ohne den Farbstoff Kresolrot und blauer Vorbeleuchtung angefertigt. Die roten Kurven wurden mit 100 μM Kresolrot ohne Vorbeleuchtung und die grünen Kurven mit 100 μM Kresolrot nach blauer Vorbeleuchtung (mit VB) gemessen. Die in der Abbildung angegebenen Zeitkonstanten beziehen sich auf den Fit der Kurven mit 100 μM Kresolrot ohne blaue Vorbeleuchtung. Bedingungen: 200 mM NaCl; pH 7,8; T=20°C.

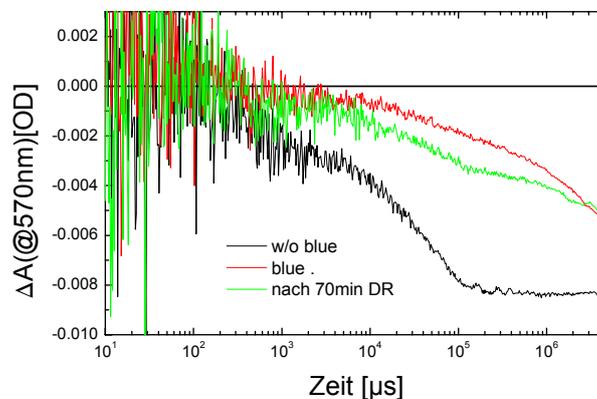


Abbildung 7.14: Einfluss der gebleichten PYP-Domäne auf das Protonensignal

Alle Zeitspuren wurden bei einer Kresolrot Konzentration von 100 μM bei 570 nm aufgenommen. Die schwarze Kurve (w/o blue) zeigt den Verlauf ohne blaue Vorbeleuchtung, die rote nach blauer Vorbeleuchtung und die grüne nach 70 min Dunkelreversion. Bedingungen wie bei Abbildung 7.13.

Wie man aus Abbildung 7.14 entnehmen kann, korreliert der Blaulichteffekt mit dem Grad der Bleichung der PYP-Domäne.

Nach 70 min Regeneration der Probe unter Lichtausschluss (grüne Kurve in Abbildung 7.14), ist es zur Zunahme des Protonensignals gekommen und der Kurvenverlauf entspricht dem der Kurve ohne Vorbeleuchtung. Wie sich herausstellte, war während der 70 Minuten andauernden Dunkelreversion der pH-Wert zu einem niedrigeren Wert von 7,4 gedriftet, so dass das Signal der grünen Kurve zu klein ist. Das bedeutet, dass die Regenerationsexperimente mit genau eingehaltenen Parametern wiederholt werden müssen.

7.7 Photoreversion der PYP-Domäne

Nach blauer Beleuchtung nimmt die Absorption unterhalb 400 nm aufgrund der Bildung des I₂-Intermediates zu, wie man anhand des Differenzspektrums in Abbildung 7.4 B erkennen kann. Die Soret-Bande der Phytochromdomäne absorbiert bei 340 nm praktisch nicht mehr. Deshalb wurde untersucht, ob das Photoprodukt der PYP-Domäne durch das UV Licht einer LED ($\lambda_{\max}=340$ nm) in den Ausgangszustand überführt werden kann.

In Abbildung 7.15 A ist die Bleichung der PYP-Domäne des Dunkelzustandes (Dk) durch blaues Licht (blau) dargestellt. Durch violettes Licht erfolgt eine Photoreversion, die zu einer schnelleren Zunahme der Absorption führt als durch die Dunkelreversion. Wie sich anhand der violetten Kurve gut verfolgen lässt (Abbildung 7.15 A), kann sogar ein großer Teil der Bleichung, der der langen Relaxationskomponente zuzuschreiben ist, durch Photokonversion mit violettem Licht wieder in den Ausgangszustand überführt werden.

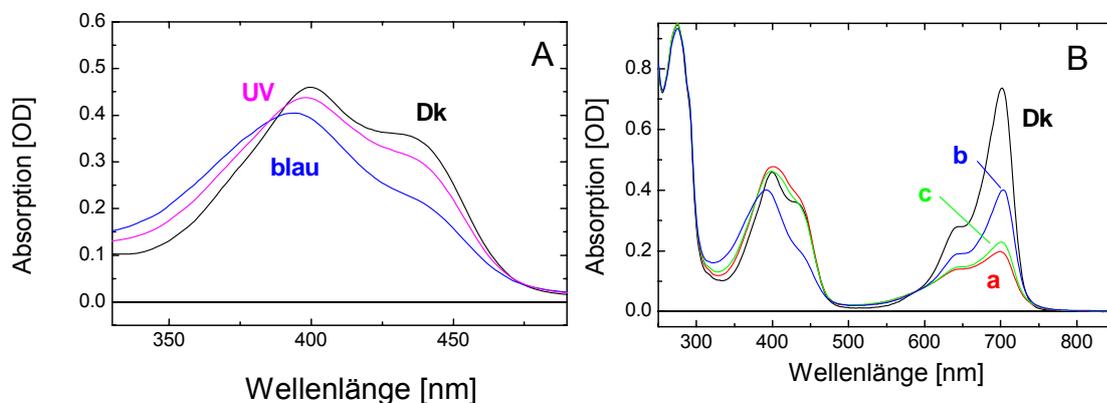


Abbildung 7.15: Photoreversion der PYP-Domäne und Einfluss auf die Phytochrom-Domäne

(A) Absorptionsspektren zwischen 300 und 490 nm des Grundzustandes (Dk), nach blauer Beleuchtung (blau, 470nm) und nach vier min UV-Licht Exposition (LED 340 nm) (violett).

(B) Darstellung der Bleichung der Q-Bande durch rotes Licht (zwei min LED 680 nm): (a) des Dunkelzustandes (rote Kurve), (b) bei gebleichter PYP-Domäne (zwei min LED 470 nm, nach 10 min DR, blaue Kurve) und (c) nach Photoreversion der PYP-Domäne durch violettes Licht (zwei mal zwei min LED 340 nm, grüne Kurve).

Die Messungen wurden alle mit einer Probe angefertigt, die zuerst rotem Licht ausgesetzt war. Da für die weiteren Messungen nicht auf die vollständige Regeneration der Phytochromdomäne gewartet wurde, sind die Absorptionsänderungen im Bereich der Q-Bande der Phytochromdomäne schwer zu deuten und wurden in Abbildung 7.15 A nicht dargestellt.

In Abbildung 7.15 B ist der Einfluss der PYP-Domäne auf die Bleichung der Q-Bande der Phytochrom-Domäne dargestellt. Wie schon in den Kapiteln 7.2 und 7.3 hängt der Grad der

Bleichung der Q-Bande der Phytochrom-Domäne vom Bleichungsgrad der PYP-Domäne ab. Nach der Photoreversion der PYP-Domäne durch violettes Licht, lässt sich die Q-Bande wieder annähernd so stark bleichen (grüne Kurve Abbildung 7.15 B), wie bei ungebleichter PYP-Domäne (rote Kurve Abbildung 7.15 B). Das bedeutet, dass es durch das UV Licht nicht nur zur Photoreversion des I₂-Zustandes der PYP-Domäne in den Grundzustand kommt, sondern dass auch der Blaulichteffekt der PYP-Domäne auf die Bleichung der Q-Bande der Phytochromdomäne aufgehoben wird.

Bei den hier beschriebenen Experimenten handelt es sich um die ersten Messungen zur Photoreversion mittels UV-Licht. Ob mit der Photoreversion der PYP-Domäne alle in diesem Abschnitt beschriebenen Effekte, die durch die Bleichung der PYP-Domäne hervorgerufen werden, rückgängig gemacht werden können, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Es ergibt sich aber zumindest die Möglichkeit, dass die PYP-Domäne auch in vivo durch UV-Licht reguliert wird, was einige interessante Fragen aufwirft und neue Studienansätze nach sich zieht.

7.8 Diskussion

7.8.1 Die spektralen Eigenschaften des Dunkelzustandes von Holo-Holo-Ppr

Das Protein Ppr („PYP-Phytochrome-related“) des Purpurbakteriums *Rhodospirillum centenum* ist ein Hybrid aus einer PYP-, Bakteriophytochrom- und Histidinkinase-Domäne (Jiang 1999; Kyndt 2004). Die beiden photochromen Domänen konnten jeweils mit ihren spezifischen Chromophoren regeneriert werden (Jiang 1999; Kyndt 2007). Im Fall der PYP-Domäne ist das die p-Hydroxyzimtsäure und das Addukt absorbiert im blauen Spektralbereich mit einem Maximum bei 435 nm (Jiang 1999). Das Biliverdin-Addukt (BV) zeigt alle Charakteristika der P_r-Spektren der bakteriellen Phytochrome (Kyndt et al 2007). Auch die Absorptionsmaxima der Q- und Soret-Bande entsprechen mit 701 und 396 nm denen anderer BV einbauender Phytochrome (Karniol 2003; Lamparter 2002; Bhoo 2001, Kap.3).

Das Holo-Holo-Ppr, bei dem beide Domänen regeneriert wurden und mit dem die oben beschriebenen Experimente durchgeführt wurden, vereinigt die spektralen Eigenschaften der beiden Domänen im Grundzustand miteinander. So kommt es, dass das Dunkelspektrum von Holo-Holo-Ppr im Bereich der Soret-Bande der Phytochromdomäne eine Schulter bei 434 nm aufweist, die wie der Vergleich mit den einzeln regenerierten Domänen zeigt, auf die PYP-Domäne zurückzuführen ist (Jiang 1999; Kyndt 2007). Während sich das Absorptionsmaximum der Q-Bande der Phytochrom-Domäne beim Holo-Holo-Ppr im Vergleich zum Apo-Holo-Ppr nicht verändert, weichen die Absorptionsmaxima der Soret-Bande und der PYP-Domäne von den einzeln regenerierten Domänen ab. Dies kann an der Überlappung der beiden Spektren in diesem Bereich liegen, kann aber auch ein Hinweis auf eine Interaktion der beiden Domänen sein.

Auch das CD-Spektrum des Dunkelzustandes von Holo-Holo-Ppr vereinigt die Eigenschaften der beiden Domänen im Grundzustand miteinander. So stimmen die Vorzeichen und das Amplitudenverhältnis der Banden der Phytochrom-Domäne mit denen anderer Phytochrome im P_r-Zustand überein (Song 1979; Litts 1983; Björling 1991; Borucki 2003). Das CD-Spektrum des PYP-Konstruktes (Abbildung 7.7) ist vom Vorzeichen und Form der Bande mit dem von PYP aus *Ectothiorhodospira halophila* (ab hier als E-PYP bezeichnet) vergleichbar (Borucki 2005a).

Die Daten der Absorptions- und CD-Spektren sprechen dafür, dass die Phytochromdomäne mit BV einen P_r-ähnlichen Zustand ausbildet und die PYP-Domäne einen dem Grundzustand des E-PYP ähnlichen Zustand ausbildet. Der Vergleich des Holo-Holo-Ppr mit den beiden

Einzeldomänen von Ppr (Jiang 1999, Kyndt 2007) zeigt, dass sich die spektralen Eigenschaften der beiden Domänen mehr oder weniger additiv verhalten. Lediglich die leicht verschobenen Absorptionsmaxima im blauen Spektralbereich könnten auf eine Interaktion der beide Domänen hinweisen, sind aber wahrscheinlich eher ein Effekt, der durch die Überlappung der beiden Einzelspektren entsteht.

7.8.2 Anregung der Phytochrom-Domäne

Rotes Licht führte bei Ppr statt zu der erwarteten bathochromen Verschiebung der Q-Bande nur zu einer Bleichung, wie sie auch bei verschiedenen Defektmutanten anderer Phytochrome beobachtet wurde (Rockwell 2006). Gleichzeitig wurde eine leichte Absorptionszunahme und eine Verbreiterung der Soret-Bande beobachtet. Damit führt rotes Licht bei den stationären Spektren von Ppr zu vergleichbaren spektralen Änderungen wie bei der H250A-Mutante von Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* (Kap. 6; von Stetten 2007). Wie der Vergleich der Differenzspektren von Holo-Holo-Ppr und Agp1-H250A nach roter Beleuchtung in Abbildung 7.18 A zeigt, weisen gerade die Differenzspektren im Bereich der Soret-Bande die gleichen Änderungen auf.

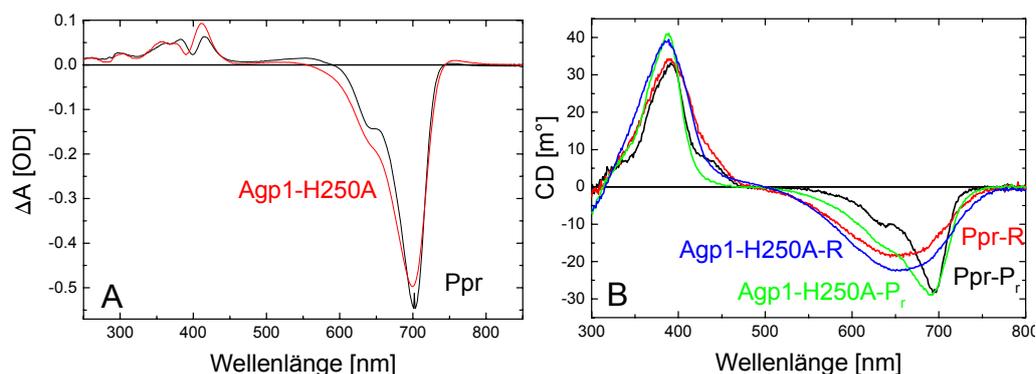


Abbildung 7.18: Vergleich der Differenz- und CD-Spektren von Ppr und H250A von Agp1

(A) Vergleich der Differenzspektren (Rot beleuchtet – Dunkelspektrum) von Holo-Holo-Ppr und Agp1-H250A.

(B) Vergleich der CD-Spektren von Holo-Holo-Ppr und Agp1-H250A des Dunkelzustandes und nach roter Beleuchtung. Die Spektren von Agp1-H250A wurden auf die gleiche Rotationsstärke der Q-Bande des Dunkelspektrums von Ppr skaliert.

Auch das berechnete CD-Spektrum des Photoproduktes von Ppr gleicht stark dem der H250A-Mutante von Agp1 (Abbildung 7.18 B), was vermuten lässt, dass der Chromophor der beiden Photoprodukte eine vergleichbare Chiralität aufweist.

Bei den transienten Absorptionsänderungen von Ppr nach roter Anregung konnten bei etwa 20 μ s vergleichbare Änderungen beobachtet werden, wie bei der Lumi-R-Bildung von Agp1. Auch das aus den Amplituden extrapolierte Anfangsspektrum ist vergleichbar mit dem von Agp1 (Abbildung 7.10), was zu der Hypothese führt, dass die Phytochrom-Domäne von Ppr in diesem Zeitbereich einem dem Lumi-R-Intermediat anderer Phytochrome (Borucki 2005; von Stetten 2007; Seibeck 2007) vergleichbaren Zustand ausbildet. Das Amplitudenspektrum der 95 μ s Komponente von Ppr weist große Übereinstimmungen mit dem des Lumi-R nach Meta-R_A Überganges von Agp1 auf und zeigt wie dieses eine hypsochrome Verschiebung (Borucki 2005). Die beiden folgenden Amplituden weisen nur geringe Ähnlichkeiten mit denen der Meta-R_C- und P_{fr}-Bildung von Agp1 auf (Abbildung 7.10). Ähnlich wie bei der Meta-R_C Bildung von Agp1 (Kap.3) zeigt die zweite Amplitude von Ppr eine Absorptionszunahme,

allerdings bei 700 nm, d.h. bei kürzeren Wellenlängen als bei Agp1. Beim folgenden Übergang kommt es genau im Bereich um 700 nm zu einer Abnahme der Absorption, die über das hinausgeht, was vorher gebildet wurde. Die mit der Meta-R_C-Bildung von Agp1 einhergehende Absorptionzunahme oberhalb von 720 nm konnte, ähnlich wie bei den Zeitspuren der H250A-Mutante von Agp1 nicht beobachtet werden (Kap. 6, von Stetten 2007). Bei H250A bestand die Kinetik für das Photoprodukt aus zwei Übergängen bei 280 μ s und 2,0 ms, wobei ein gebleichtes Photoprodukt gebildet wird, das in den Schwingungsspektroskopischen Untersuchungen Ähnlichkeiten mit dem Meta-R_C-Intermediat aufwies (Piwowarski 2007; von Stetten 2007). Die transienten Absorptionsmessungen an Ppr zeigten, dass den Lumi-R- und Meta-R_A-Intermediaten von Agp1 vergleichbare Intermediate durchlaufen werden. Die darauf folgenden Übergänge bei 350 μ s und 47 ms unterscheiden sich dann aber von denen der Meta-R_C- und P_{fr}-Bildung von Agp1 und von denen der Bildung des Photoproduktes der H250A-Mutante von Agp1. Allerdings sind diese beiden Übergänge der Kinetik von Ppr ($\tau_2=350$ μ s und $\tau_3=47$ ms) mit einer Protonenabgabe ins Medium verbunden. Beim WT von Agp1 war die Protonenabgabe an die Bildung von Meta-R_C gekoppelt (Borucki 2005). Da auch die H250A-Mutanten eine Protonenabgabe zeigte, wurde angenommen, dass das Photoprodukt Meta-R_C ähnlich ist (von Stetten 2007). In beiden Fällen wurde für die Protonenabgabe jedoch nur eine Komponente gefunden, während bei Ppr die Protonenabgabe in zwei Schritten erfolgt, wobei die Amplitude des ersten Übergangs verhältnismäßig klein und nicht echt ist. Es kann zurzeit noch nicht gesagt werden, ob diese erste Komponente der Protonenabgabe ein Äquivalent der Komponente von Agp1 ist. Aufgrund mangelnder Datenlage kann auch nicht gesagt werden, ob die bei Agp1 gefundene Protonenabgabe bei der Meta-R_C-Bildung immer in einem Schritt oder ob sie nicht auch in zwei Schritten erfolgen kann. Es besteht auch die Möglichkeit, dass eine der beiden Abgabekomponenten bei Ppr eine ganz andere Ursache hat als die für Agp1 vorgeschlagene (Kap.3, Borucki 2005). Zu einer Klärung könnten schwingungsspektroskopische Untersuchungen des Photoproduktes und wenn möglich der Intermediate der Kinetik nach roter Beleuchtung von Ppr sorgen. Anhand der vorliegenden Daten scheint es so, als ob der zweite und dritte Übergang von Ppr aufgrund der spektralen Gemeinsamkeiten und der gefundenen Protonenabgabe, der Bildung des Photoproduktes der H250A-Mutante von Agp1 entsprechen. Das dieser Übergang in zwei Schritten erfolgt ist wohl auf das unterschiedliche Proteingerüst zurückzuführen.

Auf jeden Fall bildet die Phytochromdomäne mit BV einen P_r-ähnlichen Zustand aus, der nach Anregung mit rotem Licht zu einem Photoprodukt führt, dass in den CD- und Absorptionsspektren denen der H250A-Mutante von Agp1 ähnelt. In der Kinetik von Ppr nach roter Anregung werden dem Lumi-R- und Meta-R_A-Intermediat von Agp1 vergleichbare Zustände durchlaufen. Im Gegensatz zu der H250A-Mutante erfolgt die Ausbildung des Photoproduktes über zwei Übergänge, die analog zu dem Übergang der H250A-Mutante mit einer Protonenabgabe gekoppelt sind. Weiterhin konnte sowohl bei Ppr als auch bei der H250A-Mutante keine Protonenaufnahme beobachtet werden (von Stetten 2007), die bei Agp1 mit der P_{fr}-Bildung erfolgt (Borucki 2005).

7.8.3 Die fehlende P_{fr} Bildung bei Ppr

Mit BV bildet die Phytochrom-Domäne von Ppr im Dunkeln einen dem P_r-Zustand anderer Phytochrome vergleichbaren Zustand aus (Vierstra 2005). Rotes Licht führt weder bei der Phytochrom-Domäne alleine, noch beim Holo-Holo-Ppr zu der bei anderen Phytochromen beobachteten Ausbildung des P_{fr}-Zustandes (Kyndt 2007). Anders als bei vielen Substitutionsmutanten (von Stetten 2007; Wagner 2008; Hahn 2006) oder verkürzten Phytochromfragmenten (Reiff 1985; Oka 2004) ist die Ursache der fehlenden P_{fr}-Bildung bei Ppr unbekannt. In der Sequenz sind alle bekannten Aminosäuren, die essentiell für die P_{fr} Bildung sind, vor-

handen. Auch die notwendigen Domänen, wie die PHY-Domäne, sind bei Ppr vorhanden. Die Frage, wieso die Phytochrom-Domäne von Ppr nach roter Beleuchtung kein P_{fr} ausbildet, kann zurzeit also nicht beantwortet werden. Eine Möglichkeit wäre, dass die P_{fr} -Bildung durch die PYP-Domäne von Ppr verhindert wird. Ob dies möglich ist und welcher Mechanismus dabei zugrunde liegt, müssen zukünftige Studien zeigen.

Wie schon in Kapitel 4 und 6 beschrieben führt die Substitution anderer Aminosäuren bei den Phytochromen Agp1 (D197A; von Stetten 2007) oder DrBphP (Y263H; Wagner 2008) zu Photoprodukten, die spektral dem Holo-Holo-Ppr ähneln. Auch das P_{bl} -Intermediat, das nach roter Beleuchtung des durch Trypsinverdau erhaltenen 39 kDa großen Fragmentes von PhyA entsteht (Reiff 1985), zeigt dieselben spektralen Eigenschaften wie das Photoprodukt von Holo-Holo-Ppr. Das Resonanz Raman-Spektrum (RR) dieses Intermediates wies große Ähnlichkeiten mit dem des Meta- R_c -Intermediates auf (Kneip 2000). Auch bei der H250A-Mutante von Agp1 stimmte das RR-Spektrum im relevanten Bereich mit dem Meta- R_c -Spektrum des WT überein (von Stetten 2007). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass alle die gleiche Stereochemie des Chromophors aufweisen und der Chromophor deprotoniert vorliegt. Alle Daten der Phytochrom-Domäne von Ppr sprechen ebenfalls dafür, dass der Chromophor im Photoprodukt von Ppr ebenfalls diese Stereochemie einnimmt und der Chromophor deprotoniert vorliegt. Die Stereochemie des Chromophors des Photoproduktes ist zurzeit Gegenstand zahlreicher Studien und noch nicht endgültig geklärt. Aufgrund der Ähnlichkeit des Spektrums mit dem des freien Chromophors besteht die Möglichkeit, dass der Chromophor in der Bindungstasche eine zyklische Konformation einnimmt, was wie der Fund eines Porphyrins in der Bindungstasche von Cph1 zeigt durchaus im Rahmen der Möglichkeiten liegt (Fischer 2005). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Ringe C und D so gegeneinander verdreht vorliegen, dass sie einen Torsionswinkel von 90° aufweisen, was zur Entkopplung des π -Systems von Ring D führt. Auf jeden Fall muss es einen Unterschied im Proteingerüst von Ppr geben, der dazu führt, dass die P_{fr} -Bildung unterbunden wird.

7.8.4 Das Photoprodukt der PYP-Domäne

Die CD-Spektren der PYP-Domäne von Ppr sind, was Verlauf und Vorzeichen angeht, vergleichbar mit denen des PYP aus *Ectothiorhodospira (Halorhodospira) halophila* dem Prototyp der PYPs (Borucki 2005a). Die Änderungen im CD-Spektrum nach blauer Beleuchtung sind nur gering, was darauf hindeutet, dass sich die Chiralität des Chromophors nicht signifikant ändert. Zusammen mit der geringen Rotationsstärke im Vergleich zur Soret-Bande führt das dazu, dass die Änderungen der PYP-Domäne im CD-Spektrum von Holo-Holo-Ppr kaum wahrzunehmen sind.

Wie die CD-Spektren sind auch die Absorptionsspektren der PYP-Domäne von Ppr mit der des Grundzustandes von E-PYP (*Ectothiorhodospira*-PYP) vergleichbar (Meyer 1985; Jiang 1999). Das Absorptionsmaximum liegt bei 446 nm und die Anregung mit blauem Licht führt zu einer Bleichung. Anders als Phytochrome durchlaufen PYPs einen Photozyklus, bei dem es zur Ausbildung mehrerer Intermediate mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima kommt (Groot 2003; Joshi 2005). So wird zuerst ein I_1 -Zustand gebildet mit einem Absorptionsmaximum bei 460 nm, der dann zu I_2 (370 nm) zerfällt und aus dem sich dann I_2' (350 nm) bildet. Von diesem wird angenommen, dass es sich um den Signalzustand handelt, der dann innerhalb von 400 ms in den Dunkelzustand übergeht (Cusanovich 2003; Devanathan 1998; Joshi 2005).

Beim PYP-Konstrukt von Ppr, das nur aus der isolierten PYP-Domäne besteht, führte blaues Licht ebenfalls zur Bleichung. Anders als beim E-PYP dauert es aber etwa 4,5 min bis der Dunkelzustand wieder erreicht war (Kyndt 2004, 2007). Beim Holo-Holo-Ppr verläuft die

Dunkelrelaxation der PYP-Domäne sogar über drei Übergänge mit Zeitkonstanten von 6, 98 und 2.178 Minuten, wobei mit dem letzten Übergang die größte spektrale Änderung einhergeht. Dies stimmt in etwa mit den Messungen von Kyndt (Kyndt et al 2007) überein (3,8 und 46 min), nur dass bei diesen Studien die langsamste Komponente nicht gefunden wurde, was unter anderem auf die kürzere Messzeit zurückzuführen ist.

Im Differenzspektrum nach blauer Beleuchtung kann man nicht nur eine Bleichung bei 433 nm beobachten, sondern auch eine Absorptionzunahme bei 356 nm. Dies ist in Analogie zu E-PYP auf die Bildung eines I_2 - oder eines I_2' -artigen Zustandes zurückzuführen (Brudler 2001; Borucki 2002; Yermenko 2006). Bei E-PYP geht die Bildung des Signalzustandes mit großen Strukturänderungen des Proteingerüsts einher (Rubinstenn 1998; Imamoto 2002; Sasaki 2002), wobei es zur Exposition von einer Reihe von hydrophoben Aminosäureresten kommt (Meyer 1989; Borucki 2002). Die dabei gebildete hydrophobe Oberfläche ist ideal geeignet, über hydrophobe Wechselwirkungen an andere hydrophobe Oberfläche zu binden. Auch die PYP-Domäne von Ppr bildet nach blauer Beleuchtung den Signalzustand I_2 oder I_2' aus, wie die Absorptionzunahme bei 357 nm zeigt. Anders als bei E-PYP scheint dieser „Signalzustand“ eine sehr lange Lebensdauer zu besitzen. Die Frage, die sich jetzt stellt, ist, mit welchem anderen Protein interagiert die aktivierte PYP-Domäne oder kommt es sogar zu einer intramolekularen Interaktion mit der Phytochrom-Domäne von Ppr?

7.8.5 Interaktion der beiden Domänen von Holo-Holo-Ppr

Phytochrome sind photochrom und können durch rotes bzw. dunkelrotes Licht zwischen den beiden Zuständen P_r und P_{fr} hin und her konvertieren (Rockwell 2006). Zusätzlich zu diesem Mechanismus wird oft eine Dunkelreversion, je nach Phytochrom in den P_r - oder P_{fr} -Zustand, gefunden (Karniol 2002). Der durch rotes bzw. dunkelrotes Licht verursachte Wechsel zwischen der P_r - und P_{fr} -Form ist eines der Hauptcharakteristika von Phytochromen (Rockwell 2006). Die Phytochrom-Domäne von Ppr wird durch rotes Licht nur gebleicht und kann nicht durch dunkelrotes Licht wieder in den P_r -Zustand überführt werden. Damit die Phytochrom-Domäne von Ppr eine vergleichbare Funktion ausüben kann wie andere Phytochrome, müsste sie schnell zwischen dem P_r - und dem gebleichten Zustand hin und her konvertieren können. Bei den in dieser Arbeit dargestellten In-vitro-Versuchen regenerierte der P_r -Zustand innerhalb von zwei Stunden. In der Studie von Kyndt (Kyndt et al 2007) konnten gezeigt werden, dass die Dunkelreversion der Q-Bande bei 702 nm durch blaues Licht beschleunigt wurde. Dies spricht für eine intramolekulare Interaktion zwischen der aktivierten PYP- und der Phytochrom-Domäne. Auch die Absorptionsänderung in der Q-Bande nach Exposition mit blauem Licht spricht für eine solche Interaktion. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Q-Bande bei gebleichter PYP-Bande nicht mehr so stark bleichen lässt. Das heißt der Grad der Bleichung der Phytochrom-Domäne wird durch die PYP-Domäne beeinflusst.

Auch die Kinetik der Phytochrom-Domäne wird durch die gebleichte PYP-Domäne verändert. Vor allem der Übergang der zum Photoprodukt führt erfährt eine starke Änderung, was eine geringere Bleichung zufolge hat, wie die Amplitudenspektren dieses Überganges zeigen (Abbildung 7.12). Das heißt, der aktivierte Zustand der PYP-Domäne wirkt sich auf alle Übergänge der Phytochrom-Domäne aus, wobei der Einfluss auf den letzten Übergang besonders groß ist. Wie die Experimente nach 30 bzw. 70 Minuten Dunkelreversion zeigen, scheint der Blaulichteffekt reversibel zu sein. Dabei korreliert der Blaulichteffekt nach den vorliegenden Daten mit der langsamsten Komponente der Dunkelreversion der PYP-Domäne. Eine Bestätigung dieser Korrelation muss aber durch weitere Messungen noch erhärtet werden.

Ppr reguliert die Polyketid-Synthese (Jiang1999). Die Aktivität von Ppr wird nach den bisher vorliegenden Ergebnissen sowohl durch rotes Licht als auch durch blaues Licht reguliert, wobei der Zustand der PYP-Domäne den der Phytochrom-Domäne beeinflusst. Die Spekulation, dass beide Domänen miteinander interagieren, kann durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Der nächste Schritt muss nun sein, diese mit dem isolierten Protein gemachten Ergebnisse auch in der Zelle zu bestätigen, also zu zeigen, dass die Polyketid-Synthese die hier festgestellte Abhängigkeit von blauem und rotem Licht hat.

Die Erkenntnis, dass die Bleichung der PYP-Domäne durch die Exposition mit violetterem Licht rückgängig gemacht werden kann, könnte noch von großer Bedeutung sein. Wie sich zeigte, lässt sich die gebleichte PYP-Domäne durch violetteres Licht wieder nahezu in den Ausgangszustand überführen. Das führt gleichzeitig zur Aufhebung des Blaulicht-Effekts auf die spektralen Eigenschaften der Phytochrom-Domäne. Anders als zunächst angenommen, wird die Lebensdauer des „aktivierten Zustandes“ der PYP-Domäne nicht nur über die Dunkelreversion reguliert, sondern auch durch die Exposition von violetterem Licht. Die Studien zur Photoreversion durch violetteres Licht stehen noch am Anfang, und selbst wenn sich die Regulation der PYP-Domäne über das violette Licht in vivo nicht bestätigen sollte, werden die kinetischen Untersuchungen der PYP-Domäne vereinfacht, da die Probe nach blauer Beleuchtung schnell wieder in den Grundzustand überführt werden kann.

7.8.6 Strukturelle Unterschiede von Ppr-PYP und E-PYP

Von E-PYP und dem PYP-Konstrukt von Ppr liegen bereits Kristallstrukturen vor (Borgstahl 1995; Rajagopal 2003). Der Vergleich der beiden Strukturen des Dunkelzustandes zeigt (Kyndt 2004), dass die Aminosäuren die den Chromophor umgeben streng konserviert sind und alle relevanten Aminosäuren auch in der Sequenz von Ppr vorkommen.

Der Unterscheid zwischen E-PYP und Ppr-PYP liegt in der β_4 - β_5 -Schleife, die die wichtigen Aminosäuren wie D97, F98, Q99 und M100 enthält (Kyndt 2004). Diese Schleife liegt bei Ppr in einer anderen Konformation vor, was zu einer höheren Exposition des Chromophors mit dem Lösungsmittel führt. Weiterhin fehlen zwei Wasserstoffbrücken zwischen Y94 und C69 und R52 und F98, wobei die Daten so interpretiert werden, dass die Ppr-PYP-Struktur in der M100-Region mehr dem Signalzustand als dem Dunkelzustand des E-PYP ähnelt (Kyndt 2004). Es hat sich gezeigt, dass die Aminosäure M100 von E-PYP eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung des Dunkelzustandes spielt. So war die Wiederherstellung des Dunkelzustandes bei der M100A-Mutante von E-PYP um bis auf das Tausendfache verzögert. Dies wird auf die katalytischen Fähigkeiten in Bezug auf die Cis-Trans Isomerisation zurückgeführt, die durch die Polarisierbarkeit des Schwefels und durch die Positionierung oberhalb des aromatischen Ringes des Chromophors verursacht wird (Devanathan 1998; Kumauchi 2002).

Die Sequenz der PYP-Domäne von Ppr zeigt jedoch, dass die äquivalente Aminosäure zu M100 vorhanden ist. Die Ursache für die langsame Wiederherstellung des Dunkelzustandes muss also an der veränderten Position des Methioninrestes in Ppr liegen. Im Detail ist der Mechanismus allerdings noch nicht verstanden (Kyndt 2004). Auf jeden Fall wird die Lebensdauer des Signalzustandes der PYP-Domäne von Ppr durch die angesprochenen Unterschiede verlängert. Wird dabei wie bei E-PYP durch Konformationsänderungen eine hydrophobe Region exponiert, könnte diese an die Phytochrom-Domäne binden. Dies müsste an oder in der Nähe der Bindungstasche geschehen, wodurch es zu der beobachteten Rotverschiebung in der Q-Bande kommt. Dazu müsste die PYP-Domäne aber von vornherein in der Nähe der Bindungstasche liegen und dieser Nachweis steht noch aus.