

3 ERGEBNISSE

3.1 Reinigung, Assemblierung und Quartärstruktur des Holophytochroms Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803

Teile dieser Arbeit wurde in Lamparter *et al.* (2001) veröffentlicht.

Der cyanobakterielle Photorezeptor Cph1 wurde als erstes beschriebenes prokaryotisches Phytochrom kloniert und gereinigt (Hughes *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 1997). Da zu diesem Zeitpunkt keine Quartärstruktur durch Röntgenanalyse eines Kristalls aus irgendeinem pflanzlichen Phytochrom zur Verfügung stand, wurde unter anderem die Kristallisation des Cph1 als Ziel gesetzt. Es ist bekannt, dass rekombinantes Cph1 zur Bildung von Aggregaten tendiert. Daher wurden die Expressions-, Extraktions- und Reinigungsbedingungen modifiziert, um so die Löslichkeit und Reinheit des Proteins zu optimieren. Die Anzuchtbedingungen und IPTG-Konzentration für die Induktion der Expression wurden optimiert, um so viel wie möglich nichtaggregiertes Protein zu gewinnen (s. 2.7). Durch die veränderten Bedingungen wurde die vollständige Reinheit des Photorezeptors Cph1 erreicht. Der Konformationswechsel des Holoproteins durch die Photokonversion und die Quartärstrukturdarstellung des Holopeptids wurden mit analytischer GFC bzw. präparativer NGE untersucht.

3.1.1 Assemblierungsreaktionen bei Einbindung der Chromophore PCB und PEB

Synechocystis Phytochrom Cph1 baut die Chromophore PCB, PEB und PΦB autokatalytisch ein (Abb. 3). Die spektralen Unterschiede zwischen PCB und PEB und die Art von Chromophor-Protein Verbindung (kovalent, nicht kovalent) wurden untersucht. Spektrale Messungen von PCB-Cph1- und PEB-Cph1-Assemblierungen wurden durchgeführt (Abb. 12). Die Spektren wurden 1 min nach Zugabe des Chromophors in Abständen von 2 min gemessen. Die Assemblierung mit PCB war deutlich schneller als mit PEB. In beiden Fällen wurde ein Intermediat in Form einer Schulter gesehen, die für die PCB-Cph1 Assemblierung bereits beschrieben wurde (Lamparter *et al.*, 1997). Dieses

Zwischenprodukt absorbiert bei einer höheren Wellenlänge als der freie Chromophor oder das Endprodukt nach vollständiger Assemblierung.

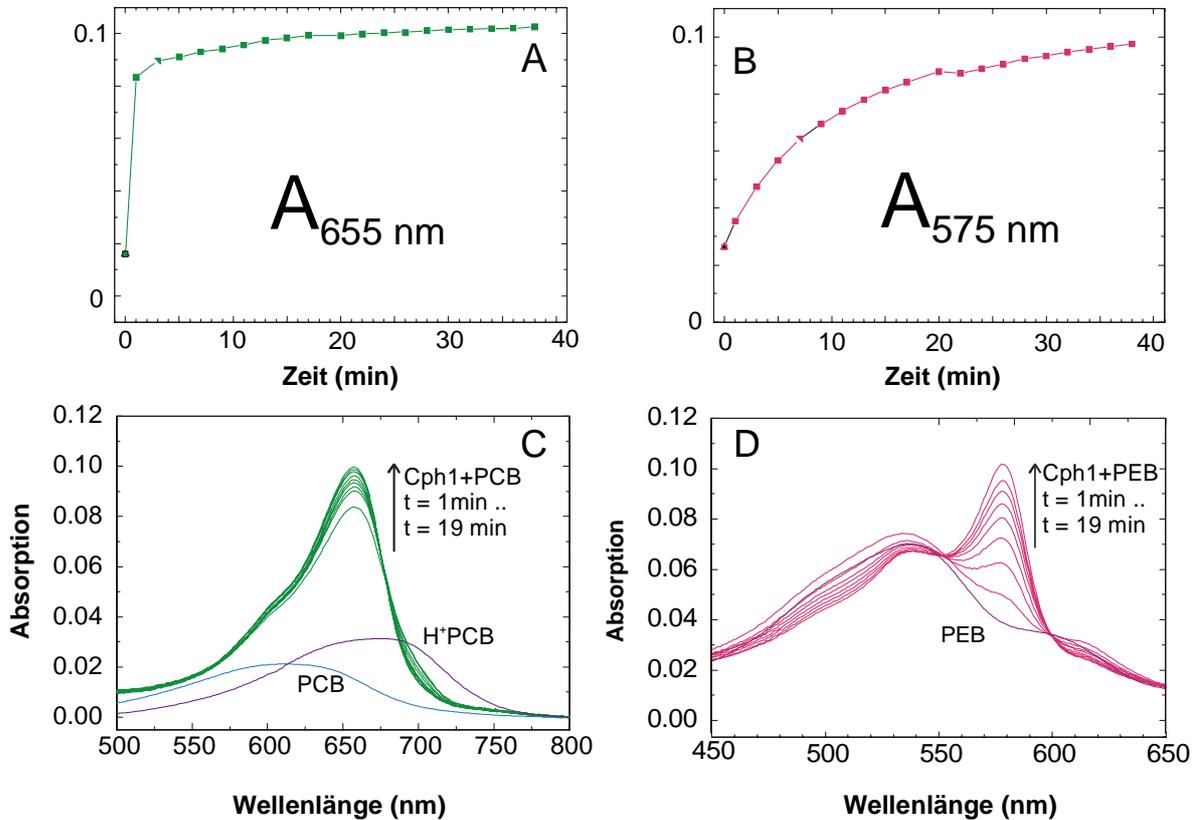


Abbildung 1: Assemblierungsreaktionen von 4 µM Cph1 mit 1.1 µM PCB (A und C) und 4 µM PEB (B und D). Spektren des freien Chromophors wurden in Assemblierungspuffer, pH 7.8 (PCB, PEB) und in saurem Puffer, pH 3 (H⁺PCB) gemessen. Die Absorptionzunahme während der Assemblierung wurde bei der entsprechenden λ_{\max} gemessen (B, D).

3.1.2 Extinktionskoeffizient des Holoproteins von Cph1

Der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{656 \text{ nm}}$ wurde durch PCB-Assemblierung bestimmt. Für die Bestimmung wurde eine Methode verwendet, die der von Bakteriorhodopsin ähnelt (Rehorek und Heyn, 1979). Die Messungen wurden von dem technischen Assistenten Norbert Michael durchgeführt. PCB wurde zu im Überschuss vorhandenen Apo-Cph1 gegeben. Nach vollständiger Assemblierung (100 min nach Zugabe des Chromophors) wurde die Absorption des Holoproteins mit der des PCBs in Methanol/HCl verglichen (Abb. 13).

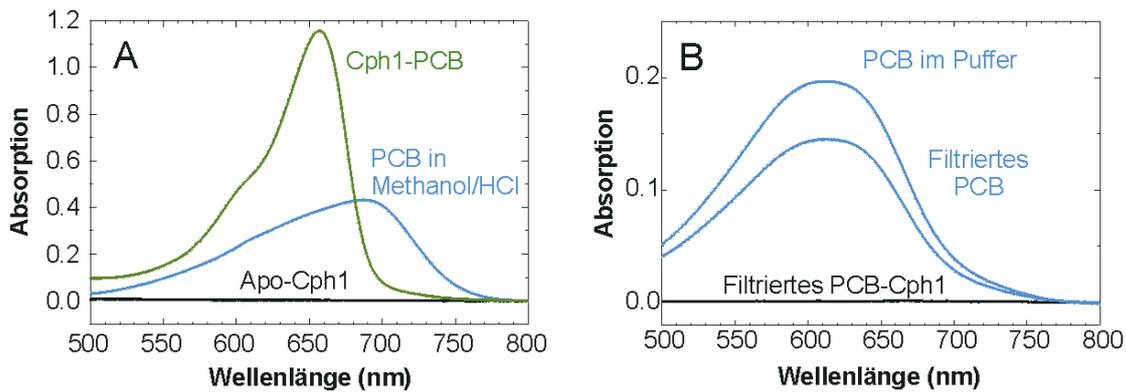


Abbildung 2: Messungen des Holo-Proteinextinktionskoeffizienten. (A) Holo-Cph1 im Vergleich zu PCB. (B) Cph1-PCB wurde ultrafiltriert, um die vollständige Assemblierung zu bestätigen. Als Kontrolle wurde ultrafiltriertes PCB verwendet. Die Messungen wurden drei Mal durchgeführt.

Der erhaltene Extinktionskoeffizient war etwa 2 mal höher als der von freiem PCB in Methanol/HCl. Der ursprüngliche $\epsilon_{\max,R} = 37\,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Cole et al., 1967) wurde auf $85\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ geändert.

3.1.3 Aggregation

Cph1 neigt dazu, während der Reinigung Aggregate zu bilden. Um diese Aggregation zu minimieren, wurden 48 Detergenzien getestet. Für alle Detergenzien wurde zunächst eine Konzentration von 1% getestet. Die Durchführung des Experiments ist in der Legende der Tabelle 4 beschrieben. Nach jedem Schritt wurden spektrale Messungen von Pellet und Überstand sowie analytische Gelfiltration mit dem löslichen Protein durchgeführt. Bei 42 Detergenzien waren die spektralen Eigenschaften von Cph1 verändert. Cph1 zeigte eine Senkung der Absorptionsmaxima bei 655-660 nm und eine Absorptionzunahme im Blaubereich oder eine indifferenzierte Absorption von 400 bis 800 nm. Die Photokonversion war sehr schlecht oder es gab gar keine. In manchen Fällen waren spektrale Störungen als Farbänderungen sofort mit dem Auge zu erkennen. Die Proben waren entweder lila, blau oder farblos. Nur 6 Detergenzien veränderten die spektralen Eigenschaften des Phytochroms nicht. Bei allen diesen Detergenzien war die Löslichkeit von Cph1 gegenüber der Kontrolle verbessert (Tabelle 4).

	% mehr lösliches PCB- Cph1
CHAPS	6,7
CYMAL-1	34
CYMAL-2	70
C-HEGA8	25
C-HEGA9	54
Natrium Cholat	60

Tabelle 1: Wirkung von verschiedenen Detergenzien auf die Löslichkeit des PCB-Cph1 (0,8 mg / ml). Nach Ammoniumsulfatfällung wurde das Pellet in Basispuffer (s. 2.3.5) mit 1% Detergenz resuspendiert und für 10 min bei 25 000 g zentrifugiert. Die Proben wurden nach 16 h bzw. 18 Tagen Inkubation bei 4 °C für 60 min erneut zentrifugiert. Nach jedem Schritt wurden die Absorptions-Spektren nach Bestrahlung mit Dunkelrot- oder Hellrot-Leuchtdioden (1 min) gemessen. Die Prozentangaben in der Tabelle ergaben sich aus dem Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle.

Im Allgemeinen wurde für unbehandeltes Cph1 ein Proteinverlust von 75 % nach 18 Tagen Inkubation festgestellt. Da Cph1 auch in Laufe der Zeit Aggregate bildet, wurden die Messungen nach verschiedenen Inkubationstagen durchgeführt. Nach 18 Tagen Inkubation bei 4 °C und Zentrifugation bei 25 000 g für 60 min wurde der Zustand des Proteins unter CYMAL-1, CHAPS und NTCH in Vergleich zu der Kontrolle PCB-Cph1 untersucht. Dafür wurden spektrale Messungen und GFC durchgeführt (Abb. 14). Höhere Ausbeuten an löslichem Holoprotein korrelierten nicht zwangsläufig mit einem homogenen Zustand des Proteins. Die Proben mit CYMAL-1 und NTCH zeigten einen Peak in dem Molekulargewichts-Bereich des PCB-Cph1-Dimers, während die relativ niedrige Beweglichkeit der CHAPS-behandelten Proben eher dem Monomer entsprach. Die Monomerisierung könnte durch Phosphorylierungsversuche mit CHAPS-behandeltem Cph1 getestet werden, in denen keine Phosphorylierung der Histidinkinase zu erwarten ist. Das ionische Detergenz Natriumcholat (NTCH) zeigte im Vergleich zu CYMAL-1 eine höhere Ausbeute des Proteins. Der Anteil von hochmolekularen Komponenten, ein

Anzeichen für die Bildung von Aggregaten, war bei NTCH-behandelten Proben stark reduziert.

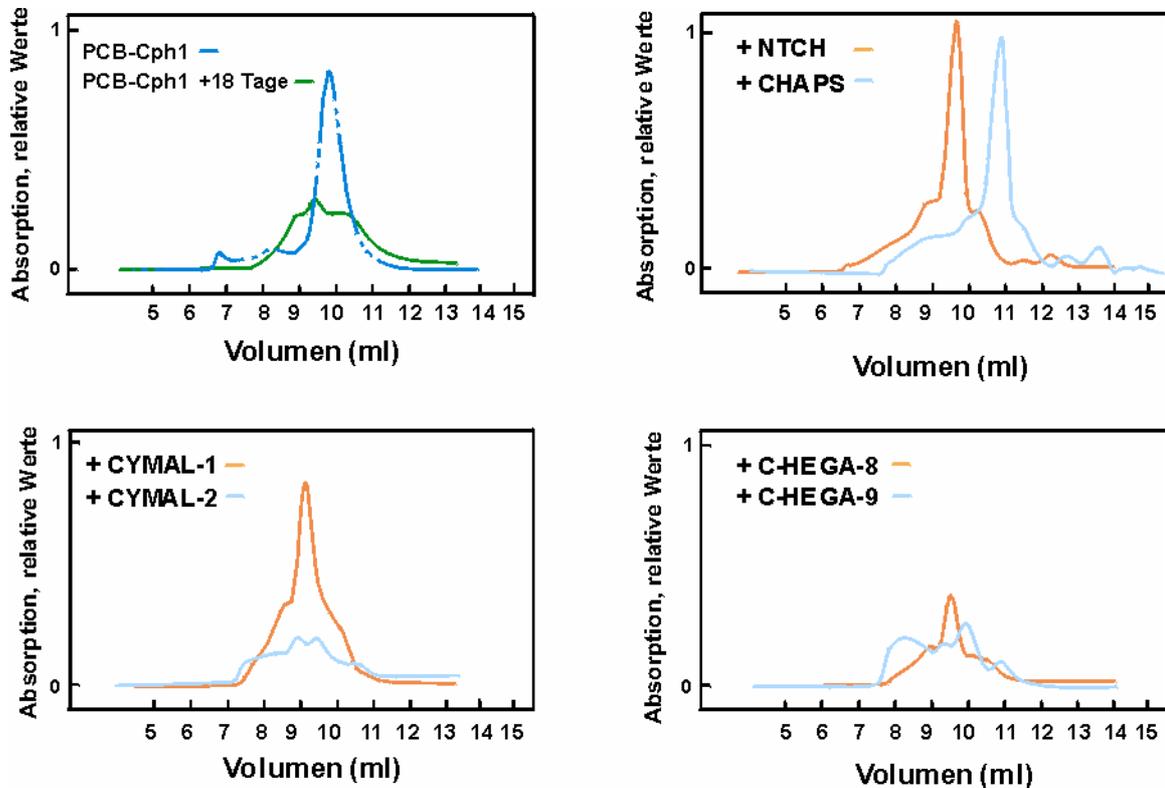


Abbildung 3: Analytische GFC von PCB-Cph1 18 Tage nach Reinigung und Behandlung mit 1% CYMAL-1, CYMAL-2, C-HEGA-8, C-HEGA-9, CHAPS oder NTCH und 4 °C Lagerung. Die Proben wurden 60 min bei 25 000 g zentrifugiert und vor Verwendung mit dunkelrotem Licht bestrahlt. Die Absorption wurde bei 655 nm gemessen.

Die optimale Konzentration von NTCH wurde durch Vergleich mit der Cph1-Kontrolle mittels spektraler Messungen und analytischer GFC bei 0,1 % ermittelt. Das Holo protein blieb mehrere Tage bei 4 °C stabil ohne nennenswerte Unterschiede in der analytischen GFC. Nach Verwendung von NTCH nahm der Anteil an löslichem Protein bis auf 14 % zu. Da NTCH die Aggregation des Cph1 verhindert, wurde es in allen Extraktions- und Reinigungspuffern weiterverwendet.

3.1.4 Optimierung der Reinigung

Ein zweites Ziel war die Optimierung der Reinigung. Bei der Affinitätschromatographie wurden Proteine mit Cph1 mitgereinigt, die auf einer SDS-PAGE detektiert wurden (Abb. 15). Um Cph1 von diesen Proteinen zu trennen, wurde nach der

Affinitätschromatographie eine präparative Gelfiltration (s.2.7.2.3) durchgeführt (Abb. 16).

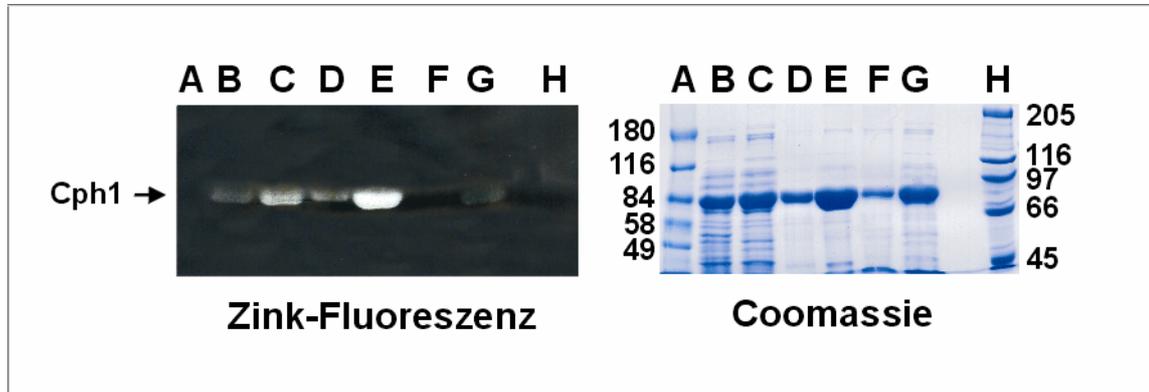


Abbildung 4: Zinkfluoreszenz und Coomassie Färbung verschiedener Schritte Cph1 Reinigung. Pellet und Überstand nach der Extraktion (G bzw. B), Ammoniumsulfatfällung (F bzw. C), Affinitätschromatographie (D) und anschließender Ammoniumsulfatfällung (E) genommen. Das Pellet wurde immer in dem gleichen Volumen Basispuffer wie der entsprechende Überstand resuspendiert. Für jede Spur wurden 15 μ l Probenpuffer mit 15 μ l Probe gemischt. Als Marker wurden PSM (A) und HMW (H) verwendet.

Spektrale Messungen bei 260 nm bestätigten, dass die Fraktion mit der höchsten Mobilität (190 ml) mitgereinigte DNA enthält. Die Cph1-enthaltenen Fraktionen (250-280 ml Elutionsvolumen) wurden vereinigt. Danach wurde ein 100 μ l Aliquot durch eine analytische GFC untersucht. Das Elutionsprofil dieser Probe zeigte zwei Peaks (Elutionsvolumen; Peak 1= 10.1 ml, Peak 2= 11.6 ml). Das berechnete Molekulargewicht (Peak 1= 199 kDa, Peak 2= 407 kDa) entspricht dem der Dimer bzw. Tetramerform des Cph1. Der erstes Peak könnte der Schulter, die bei der präparativen GFC zu sehen ist, entsprechen. Ein anderer Parameter, um die Reinheit des Cph1 darzustellen, ist der SAR (*Specific Absorbance Ratio*). Dieser Wert berechnet sich aus dem Verhältnis zwischen der Absorption bei λ_{max} der Pr-Form und der Absorption bei 280 nm. Durch Einsatz von Detergens und Gelfiltration wurde ein ursprünglicher SAR von 0.55 auf 1.0 erhöht (Abb. 17, A). Das Absorptionsmaximum des Holoproteins nach gesättigter Dunkelrotbestrahlung (Pr- λ_{max}) lag bei 659-660 nm. Wenn Cph1 als Apoprotein gereinigt und danach assembliert wurde, lag Pr- λ_{max} bei 656 nm. Cph1 wurde auch mit PEB assembliert. PEB-Cph1 zeigt keine Photokonversion, weil PEB die Doppelbindung zwischen Ring C und D fehlt

(Abb.3). Statt dessen zeigt das PEB-Addukt eine hohe Fluoreszenz-Quantenausbeute (Li et al., 1995; Murphy und Lagarias, 1997).

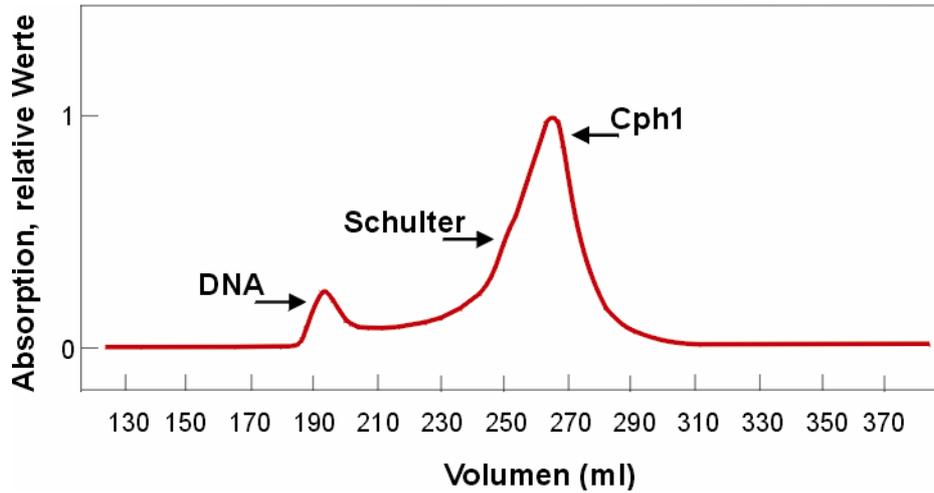


Abbildung 5: Präparative Gelfiltrationschromatographie von affinitätschromatographiegereinigtem Cph1. Die Fraktion mit dem Spitzenpeak (10 ml mit 3-6 mg/ml) wurde für weitere Messungen verwendet.

Der höchste SAR für ein PEB-Addukt lag bei 1.16. Weil dieses Addukt keine Photokonversion macht, könnte es eine einfachere Kristallisierung ermöglichen.

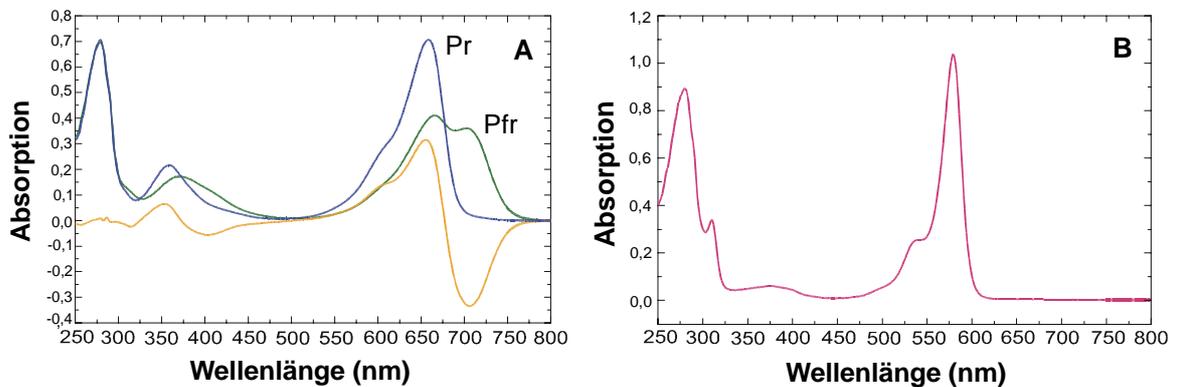


Abbildung 6: UV-VIS-Spektrum des Holoprotein Cph1 als PCB-Addukt (A) und PEB-Addukt (B). In A wurden die spektralen Messungen nach gesättigter dunkelroter (-Pr) oder hellroter (-Pfr) Bestrahlung durchgeführt. Danach wurde ein Differenzspektrum zwischen beiden Kurven (Pr und Pfr) berechnet. Das Wert SAR für PCB- (A_{659}/A_{280}) und PEB-Addukt (A_{579}/A_{280}) lag bei 1.0. bzw. 1.16.

3.1.5 Gelfiltrationschromatographie: Konformationsänderung des Holoproteins bei der Photokonversion

Affinitätsgereinigtes Cph1 wurde durch analytische GFC untersucht. Dabei wurde Apoprotein, PCB-Cph1-Pr und Pfr verglichen. (Abb. 18). Die Unterschiede zwischen Pr und Pfr deuten auf lichtinduzierte Konformationsänderungen hin. Diese können entweder durch eine veränderte Form oder unterschiedliche Interaktionen mit der Gelmatrix erklärt werden. Der Unterschied im Laufverhalten zwischen der Pr-Form und dem Apoprotein wurde bestätigt (Lamparter et al., 1997; Park et al., 2000c).

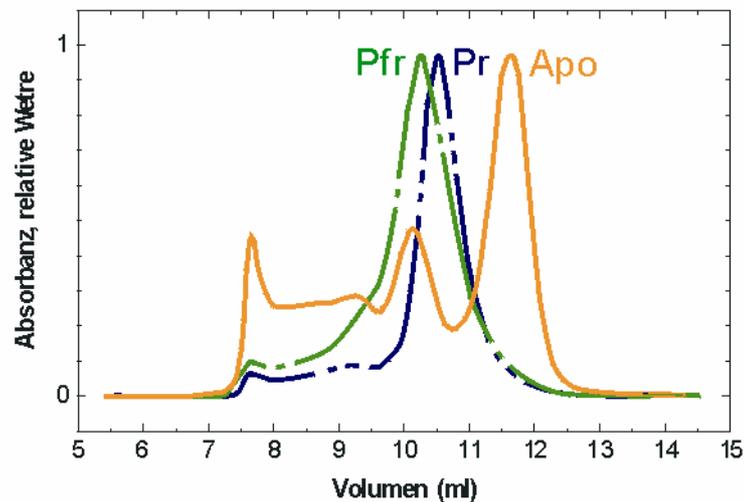


Abbildung 7: Gereinigtes Cph1 Apo- und Holoproteinelutionsprofil nach analytischer GFC. 150 μ l Probe wurden vor Verwendung für 1 min mit Dunkelrot- oder Hellrotlicht bestrahlt. Das Apoprotein wurde bei 280 nm gemessen. PCB-Cph1-Pr und PCB-Cph1-Pfr wurden bei 655 bzw. 700 nm gemessen.

Die Peaks und Schultern in dem hohen Molekulargewichtsbereich resultieren von Aggregaten mit einer unbestimmten Anzahl von Elementen. Der relative Anteil der Aggregate variierte zwischen verschiedenen Präparationen, aber war immer höher bei gereinigtem Apoprotein. Die nach GFC berechneten apparenten Molekulargewichte der Hauptbanden sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Protein	kDa
Cph1 Apoprotein	115
PCB-Cph1, nach dunkelroter Bestrahlung (Pr)	210
PCB-Cph1, nach hellroter Bestrahlung (Pfr)	250
PEB-Cph1	210
PCB-Cph1 nach präparativer Gelelektrophorese, Pr	110
PCB-Cph1 nach präparativer Gelelektrophorese, Pfr	145

Tabelle 2: Apparente molekulare Größe des Cph1 nach analytischer GFC. Die Versuche mit Affinitäts gereinigtem Cph1 wurden über 20 Mal wiederholt. NGE-gereinigtes Cph1 wurde 3 Mal gemessen. Für die Bestimmung des Molekulargewichts wurde mit Marker-Proteinen eine Kalibrierkurve (s. 2.8) angefertigt.

Histidin-Kinasen wirken immer als Dimere, in welchen ein Monomer das andere phosphoryliert (Chang und Stewart, 1998; Stock et al., 2000). Nach GFC des Cph1 erschien ein Peak bei etwa 200-250 kDa. Dieser Peak entspricht der Dimerform des PCB-Holoproteins. Das berechnete Molekulargewicht des Monomers liegt bei 85 kDa. Der Hauptpeak beim Apoprotein entspricht vermutlich einem nichtglobularen Monomer.

3.1.6 Native Gelelektrophorese (NGE)

Die Ergebnisse der analytischen GFC zeigten, dass PCB-Cph1 mit dem Molekulargewicht eines Dimeres eluiert. In ersten Studien zur Quartärstruktur des Holoproteins mit NGE war kein Unterschied in der Beweglichkeit zwischen Pr und Pfr zu erkennen, das Protein lag zum Teil als Monomer vor (Lamparter et al., 1997). Das affinitätsgereinigte Cph1-Holoprotein wurde weiter über präparative native Gelelektrophorese (*Prep Cell.s. 2.9*) gereinigt. In affinitätsgereinigten Proben findet man manchmal auf SDS-Gelen eine Bande von 170 kDa (Abb. 20). Dies entspricht dem Doppelten des Cph1-Monomer und ist vermutlich ein Dimer, bei dem die Untereinheiten kovalent verknüpft sind. Kovalentes *crosslinking in vitro* wurde zum Beispiel für Kollagen beschrieben (Graham und Gallop, 1994). Diese Bande war nach NGE nie zu finden. Nach präparativer NGE wurden die Cph1-enthaltenen Fraktionen gesammelt und mittels SDS-PAGE nach verschiedenen Inkubationszeiten untersucht, um die Stabilität von Cph1 in

Bezug auf seine Kristallisierbarkeit zu prüfen (Abb.20). Nach 4 Tagen bei 4 °C waren Abbaubanden von ca. 63 und 20 kDa erkennbar. Diese Banden wurden bei der Kontrolle nicht gesehen. Zinkfluoreszenz zeigte, dass das 63 kDa-Fragment Chromophor enthält. Vermutlich zerbricht das Protein am C-terminalen Ende. Für eine Schnittstelle am N-Terminus wären Änderungen in den Absorptionseigenschaften zu erwarten, die in diesem Fall nicht detektiert wurden. Offenbar ist NGE-gereinigtes Cph1 anfällig für Autoproteolyse.

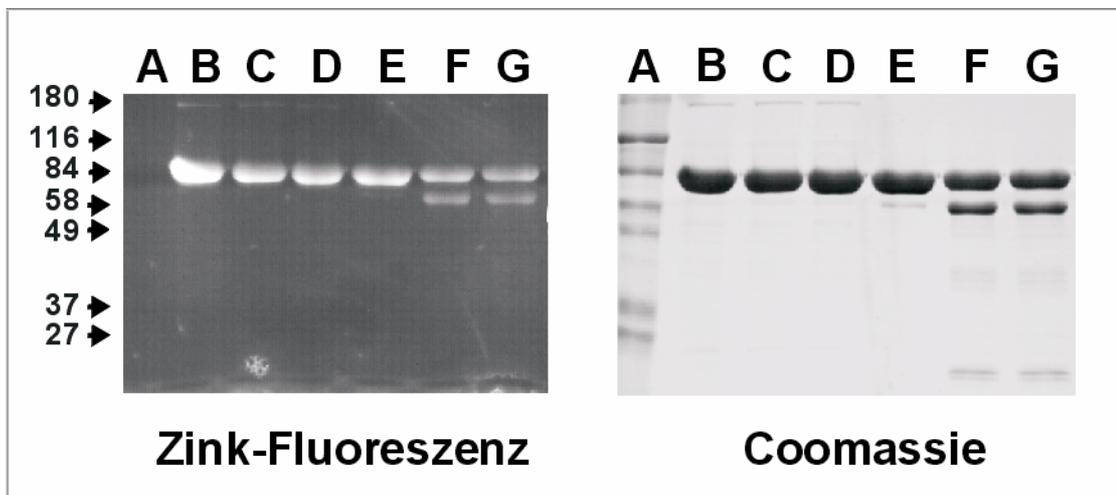


Abbildung 8: SDS-PAGE nach Zink-Fluoreszenz und Coomassiefärbung von PCB-Cph1 nach Affinitätschromatographie (B-D) und nativer Gelelektrophorese (E-G). Die Aliquote wurden nach der Reinigung bei -80 °C gelagert (B,E) oder bei 4 °C, 4 (C,F) bzw. 7 Tage (D,G) stehen gelassen. PSM (A) wurde als Marker verwendet.

Cph1, welches über NGE gereinigt wurde, wurde ebenfalls durch GFC analysiert. Es wurde wieder ein Mobilitätsunterschied zwischen Pr und Pfr gefunden (Abb. 20, Tabelle 5). Allerdings eluierte Cph1 bei einem niedrigeren apparenten Molekulargewicht. Es erschienen keine Peaks im Hochmolekulargewichtsbereich. Bei der NGE-Reinigung betrug die Ausbeute der Cph1 nur etwa 10 %. Die restlichen 90 % verblieben offenbar aggregiert im Gel. Außerden könnten die Bedingungen während der NGE die Cph1-Konformation so verändern, dass die eluierte Fraktion nicht fähig war zu dimerisieren. Dimerisierung könnte eine Voraussetzung für die Bildung von Aggregaten sein, deren Nichtbildung nach präparativer Gelelektrophorese damit erklärt werden könnte.

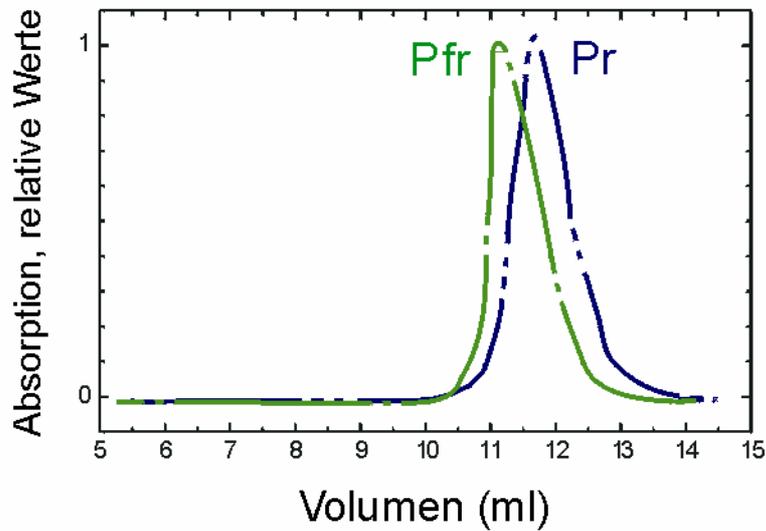


Abbildung 9: GFC von PCB-Cph1 nach nativer Gelelektrophorese. Das Holoprotein wurde als Pr (nach Dunkelrotbestrahlung) und Pfr (nach Hellrotbestrahlung) verwendet.

3.1.7 Gelfiltration bei verschiedenen pH-Werten

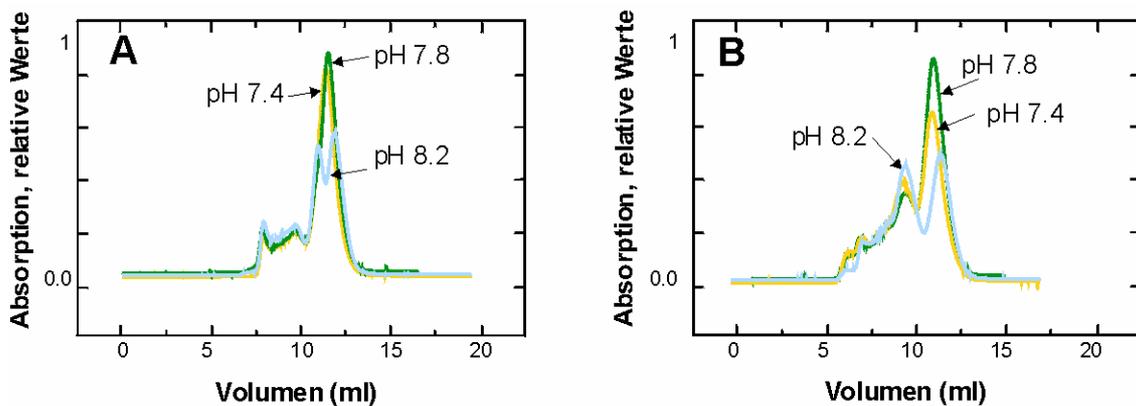


Abbildung 10: GFC von PCB-Cph1 bei verschiedenen pH Werten. 100 µl PCB-Cph1 (1.1 mg/ml) wurden verwendet. Der pH wurde mit HCl bzw. NaOH gestellt. Die Proben wurden mit Dunkelrot- (A) bzw. Hellrot (B) bestrahlt und bei 655 (A) bzw. 700 nm (B) gemessen

Der Einfluss des pH auf die Konformation von PCB-Cph1 wurde über GFC getestet (Abb. 21). Bei pH 7.4 war das Elutionsprofil sowohl für Pr als auch Pfr fast identisch mit der pH 7.8-Kontrolle. Der Anteil von hochmolekularen Komponenten blieb gleich. Bei dem pH 8.2 schien sich der Hauptpeak in 2 Peaks aufzutrennen. Bei Pr lagen die

apparenten Molekulargewichte beider Hauptpeaks im gleichen Molekulargewichts-Bereich wie der Hauptpeak der pH 7.8-Kontrolle (Abb. 21, A). Bei Pfr hatten beide Peaks ähnliche Amplituden. Die apparenten Molekulargewichte lagen bei 320 bzw. 100 kDa. Letzteres entspricht vermutlich der Monomerform des Cph1. Die Monomerisierung unter alkalischen Bedingungen des Cph1 kann auch die Ergebnisse der NGE erklären.

3.1.8 Kristallisationsversuche

Nach der Reinigungsoptimierung wurden Kristallisationsversuche mit Cph1 durchgeführt. Gereinigtes PCB- und PEB-Cph1 wurden für die Kristallisationsansätze verwendet. Der Puffer enthielt immer NTCH, welches die Aggregation verhinderte. Die Konzentration des Proteins schwankte zwischen 25 und 58 mg/ml. Ein 20 µl Aliquot wurde vor dem Ansatz durch analytische GFC geführt, um den Zustand der Löslichkeit des Cph1 zu kontrollieren (Abb. 22). Für die Verwendung von PCB-Cph1 wurde das Protein entweder im Dunkeln als Pr gereinigt oder vor dem Ansatz mit dunkelrotem Licht bestrahlt. Standard Kristallisations *Screening*-Test I und II wurden 24 mal durchgeführt.

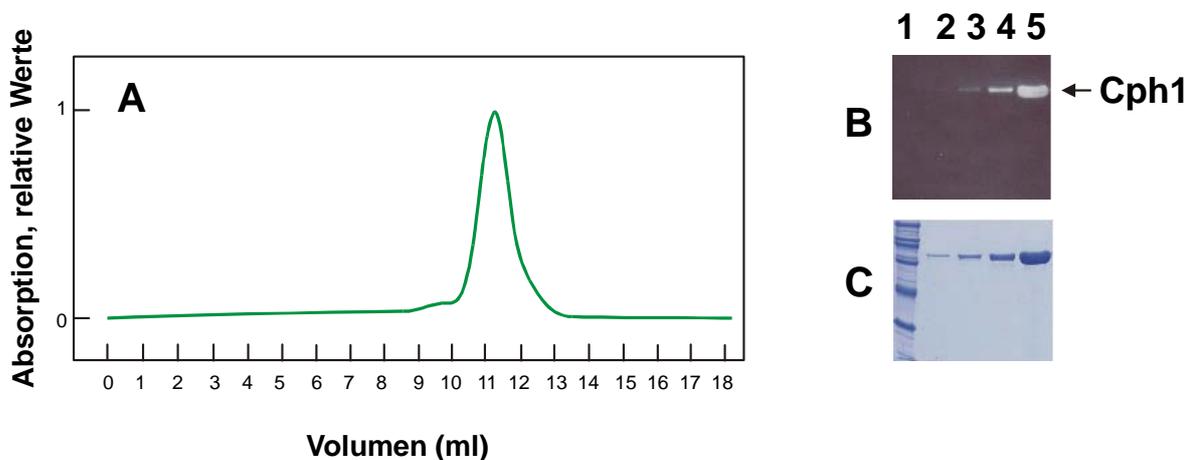


Abbildung 11: (A) Analytische GFC des für Kristallisation vorbereiteten PCB-Cph1. Das Protein (100 µl) wurde auf 1,5 mg/ml verdünnt und bei 655 nm gemessen. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler gesammelt und mittels SDS-PAGE getestet. Zinkfluoreszenz (B) und Coomassie (C) von den Fraktionen 2 (10-10,5), 3 (10,5-11 ml), 4 (11-11,5 ml) und 5 (11,5-12 ml) sind auf der Abbildung zu sehen.

Alle Ansätze wurden immer im Dunkeln bei 15° C aufbewahrt und unter grünem Sicherheitslicht bei 15 °C beobachtet. In vielen Fällen bildete Cph1 Aggregate, aber in manchen Reagenzien blieb Cph1 über lange Zeit löslich. Mit den Präzipitanten, die Cph1

löslich halten, wurde eine Konzentrations-Reihe durchgeführt. Danach wurden die Puffer und zum Schluss das Salz variiert. Die Präzipitanten Ethylenglycol, Jeffamin, PEG400, PEG200, und PEGMME550 sowie 0,1 M HEPES-Puffer hatten eine positive Wirkung auf der Stabilität des Cph1. Die Löslichkeit war deutlich besser. Obwohl Cph1 mehrere Tage stabil blieb, konnte keine Bedingung gefunden werden, unter der sich reproduzierbar Protein-Kristalle bildeten. Weitere Arbeiten mit Deletionspeptiden aus Cph1 sind für zukünftige Kristallisationen empfehlenswert.

3.2 Autophosphorylierung von Cph1

Cph1 ist eine lichtregulierte Histidinkinase, die einen Responsregulator *in vitro* transphosphorylieren kann (Yeh et al., 1997). Wir erhielten mit unseren rekombinanten Proteinen, die andere Affinitäts-*tags* enthalten als die von Yeh et al., ähnliche Ergebnisse. Die Autophosphorylierung und die Phosphatübertragung zu dem Responsregulator war stärker nach Dunkelrotbestrahlung (Pr) als nach Hellrotbestrahlung (Pfr) (Abb. 23). Die relative Intensität des Rcp1-Signals war jedoch niedriger als bei Yeh *et al.*. Bei diesen Autoren wurde Rcp1 als Fusionsprotein mit Maltose-Bindungsprotein exprimiert, das die Phosphoaspartat Bindung stabilisieren könnte. Anschließend wurde NGE gereinigtes Cph1 für die Phosphorylierung verwendet (Abb. 23, B). Keine phosphorylierte Bande wurde nachgewiesen. Diese Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass Cph1 als Monomer gereinigt wurde. Die relative Intensität der Rcp1-Bande war niedriger als die von Yeh *et al.* publizierte. Die phosphorylierten Aspartatgruppen eines Responsregulators haben oft eine kurze Halbwertszeit (Stock et al., 2000), die durch verschiedene Behandlungsmethoden oder Unterschiede in den Konstrukten beeinflusst werden könnten.

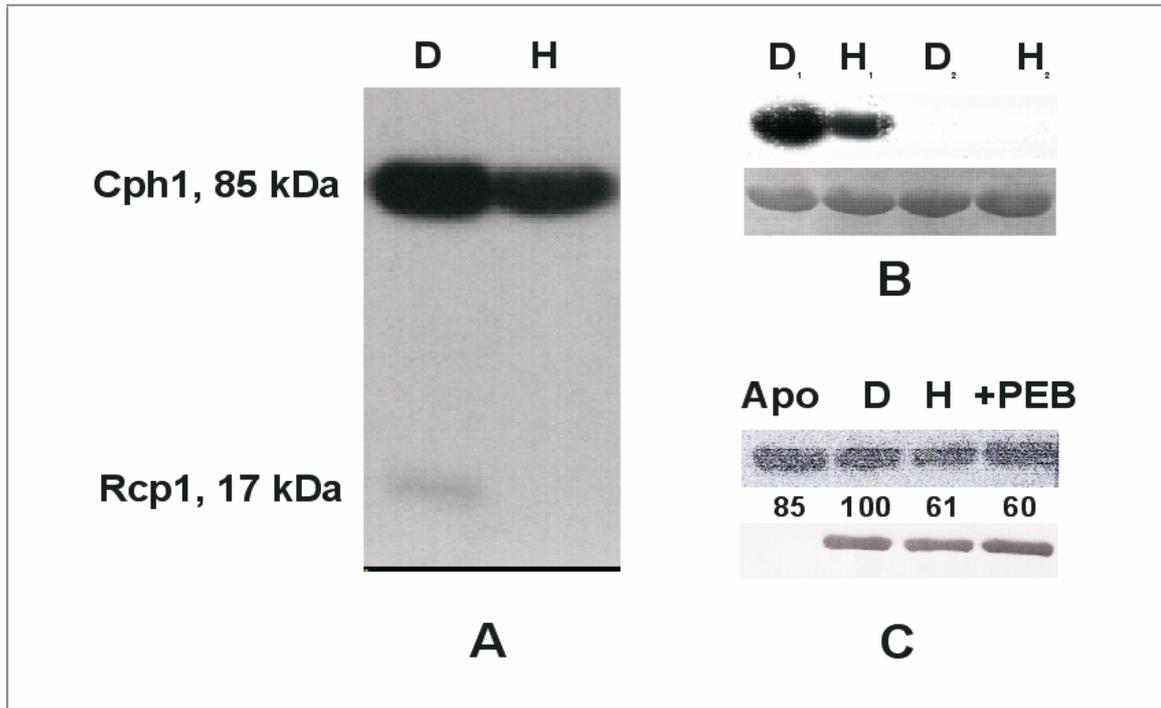


Abbildung 12: Cph1 Autophosphorylierung und *trans*-Phosphorylierung des Responseregulator Rcp1. (A) Dunkelrot (D) bzw. hellrot (H) bestrahltes Cph1-PCB-Rcp1-Gemisch. Autoradiogramm nach [γ - 32 P]ATP Inkubation. (B) Autoradiogramm (oben) und Coomassiefärbung (unten) desselben Blots nach dunkelrot (D) oder hellrot (H) Bestrahlung und [γ - 32 P]ATP Markierung des Cph1-PCB. Die Proben wurden nach Affinitätschromatographie (D₁, H₁) und Nativer Gelelektrophorese (D₂, H₂) verwendet. (C) Autoradiogramm nach [γ - 32 P]ATP Markierung (oben) und Zinkfluoreszenz (unten) eines Cph1 als Apoprotein oder nach Assemblierung mit PCB bzw. PEB. Für die Zinkfluoreszenz wurde ein zweites Gel mit den gleichen nichtradioaktiven Proben verwendet. PCB-Cph1 wurde mit Dunkelrot- (H) oder Hellrotlicht (H) vor Verwendung bestrahlt. Die relative Intensität des Signals (in %) ist unter den Banden angegeben.

3.3 Limitierte Proteolyse von Cph1

Phytochrom macht bei der Photokonversion Konformationsänderungen mit. Dies geht für Cph1 aus den oben beschriebenen GFC Experimenten hervor und wurde für einige pflanzliche Phytochrome gezeigt (Nakazawa et al., 1993; Lagarias und Mercurio, 1985; Jones et al., 1985; Schendel et al., 1989; Grimm et al., 1988; Jones A M. et al., 1986). Diese Konformationsänderung ist vermutlich eine der Ursachen für spektrale Änderungen und für die Modulation der Histidinkinase. Gereinigtes PCB-Cph1 wurde zur limitierten Proteolyse verwendet, um mögliche strukturelle Änderungen verfolgen zu können. Um zu

testen, welche unterschiedlichen Schnittstellen bei Pr und Pfr ungeschützt sind, wurden verschiedene Proteasen verwendet. Von allen eingesetzten Proteasen wurden verschiedene Konzentrationen verwendet und die Inkubationszeiten bestimmt.

Die limitierte Proteolyse wurde hauptsächlich wie bei Nakazawa et al. (1993) beschrieben durchgeführt. Diese Methode wurde verwendet, um spezifische Aspekte einer Proteinstruktur wie die Lokalisierung von hydrophoben oder flexiblen Regionen des Proteins zu untersuchen (Grimm et al., 1988; Jones et al., 1985; Lagarias und Mercurio, 1985). Die Proteolyse erfolgte in einer auf 18 °C temperierten mit grünem Sicherheitslicht ausgestatteten Klimakammer.

3.3.1 Proteolytische Muster nach Verdau mit Trypsin

PCB-Cph1 (1 mg/ml) wurde nach gesättigter Dunkelrot- oder Hellrotbestrahlung mit Trypsin verdaut. Nach der Proteolyse wurden die Peptide mittels SDS-PAGE- oder Nu-PAGE getrennt und mit Coomassie Farbelösung (s 2.3.12) entwickelt (Abb. 24). Vor der Färbung wurden die Chromophor-bindenden Peptide durch Zinkfluoreszenz detektiert. Nach 1 min Verdau erschienen Banden bei 22, 31, 49 und 52 kDa. Die 85 kDa Bande des ungeschnittenen Proteins war ebenfalls noch zu sehen. Die 49 und 52 kDa Peptide enthielten den Chromophor (s. Zinkfluoreszenz; Abb. 24), nicht jedoch die 22 und 31 kDa Peptide. Diese chromophorfreen Fragmente stammen vermutlich vom C-Terminus des Cph1. Obwohl sich nach 1 min Trypsinverdau die dunkelrot- (Pr) und hellrotbestrahlten (Pfr) Muster ähnelten, war die 52 kDa Bande etwas schwächer und die 49 kDa Bande etwas stärker bei der DR-behandelten Probe. Nach längeren Inkubationszeiten waren die Unterschiede zwischen Pr (D-Proben) und Pfr (H-Proben) deutlicher. Das ungeschnittene Cph1-Protein wurde nach 7 min nicht mehr detektiert. Nur drei Chromopeptide mit 43, 49 und 52 kDa waren in beiden Proben sichtbar. Das 52 kDa Fragment (F1) war sehr schwach bei der DR-behandelten Proben (Pr) ragte aber bei den HR-behandelten Proben (Pfr) hervor. Die HR-behandelten Proben enthalten etwa 30 % Pr (Lamparter et al., 1997; Sineshchekov et al., 1998a). Vermutlich entstand die 49 kDa Bande (F2) aus dem restlichen Pr. Die Pfr-Form bleibt vermutlich als F1-Fragment stabil. Betrachtet man den Verlauf der Proteolyse von 1 min bis 60 min wird ersichtlich, dass die Schnittstelle des F1-Fragmentes spezifisch in der Pfr-Form zugänglich ist, während die Schnittstellen der F3- und F2-Fragmente in der Pr-Form spezifisch zugänglich sind. Bis 60 min Verdau gab es keine

kleineren Chromopeptid-Fragmente. Diese wurden nur durch Coomassiefärbung nachgewiesen, aber nicht durch Zinkfluoreszenz detektiert.

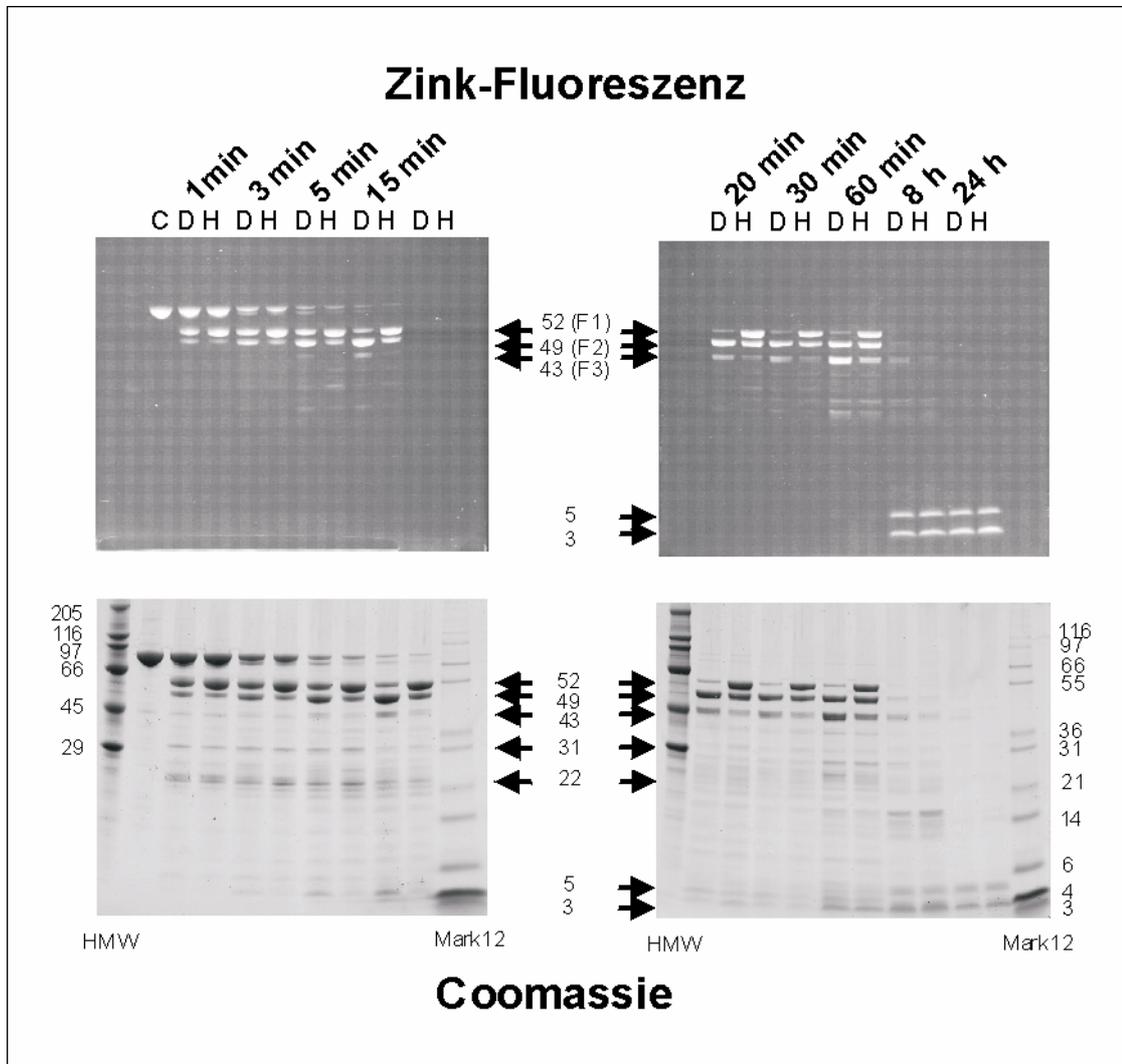


Abbildung 13: PCB-Cph1-Muster bei Nu-PAGE Gele nach gesättigter Dunkelrot- (D) oder Hellrotbestrahlung (H), Verdau mit 5 µg/ ml Trypsin. Als Kontrolle wurde das unverdaute PCB-Cph1 (8 µg) (C) aufgetragen. Die Verdaue wurden zu den angegebenen Zeiten gestoppt. Die Zahlen in der Mitte und an der Seite geben das Molekulargewicht wichtiger Fragmente bzw. von Standardmarkern in kDa an.

Eine Bande mit 3 kDa war stärker bei der dunkelrotbehandelten Probe. Alle anderen Banden zeigten keine Unterschiede zwischen beiden Lichtbehandlungen. Das Peptidmuster war bis zu 2h Verdau kaum verändert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die übrigen Trypsinschnittstellen schlechter zugänglich sind. Längere Inkubationszeit (bis zu 8 h) führten zu einem Abbau der großen Peptide. Nach ungefähr 8 Stunden Verdau wurden 3 und 5 kDa Fragmente mit Zinkfluoreszenz detektiert.

3.3.2 Proteolytische Muster nach Verdau mit der Endoprotease V8

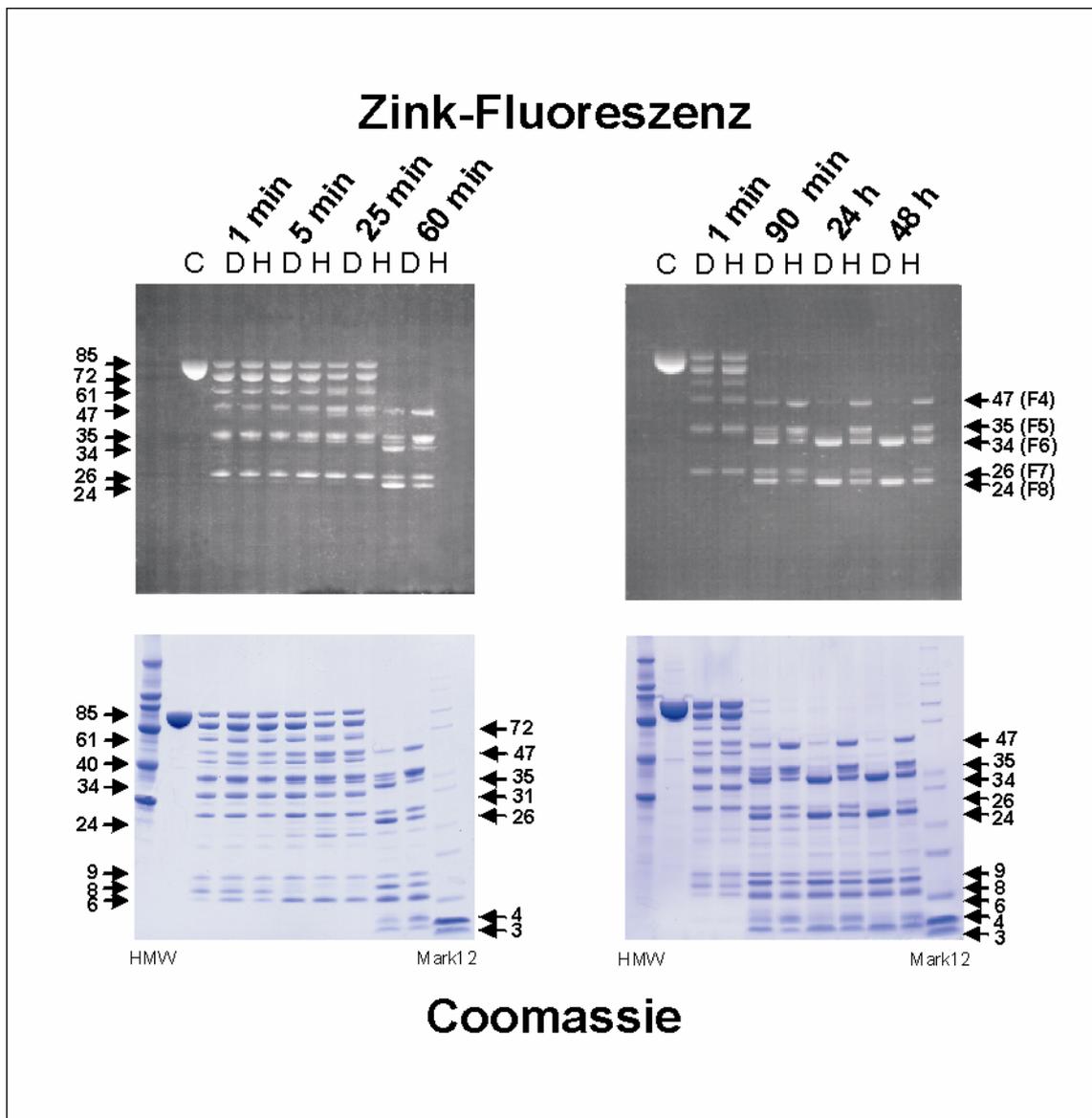


Abbildung 14: PCB-Cph1-Muster nach gesättigter Dunkelrot- (D) oder Hellrotbestrahlung (H), und Nu-PAGE-Gel nach Verdau mit V8. Als Kontrolle wurde unbehandeltes PCB-Cph1 (8 µg) (C) aufgetragen. Die Verdaue wurden zu verschiedenen Zeiten gestoppt. Die Gele wurden wie in Abbildung 24 beschrieben behandelt. Die Zahlen in der Mitte und an den Seiten geben das Molekulargewicht wichtiger Fragmente in kDa an.

Nach 1 min Verdau mit V8 wurden 72, 61, 46, 40 und 26 kDa große Chromopeptide sowie chromophorfremie Fragmente von 46 und 31 kDa gebildet (Abb. 25). Die 85 kDa Bande des unverdauten Proteins war ebenfalls sichtbar. Das Peptidmuster war in den ersten 25 min Verdau kaum verändert. Außerdem zeigten sich keine Unterschiede zwischen

beiden Lichtbehandlungen. Nach 60 min Verdau verschwanden die 85, 72 und 61 kDa Banden und es wurden deutliche Unterschiede zwischen beiden Lichtbehandlungen sichtbar. Insgesamt wurden fünf Chromopeptide von 47 (F4), 35 (F5), 34 (F6), 26 (F7) und 24 (F8) kDa detektiert. Alle fünf Banden waren nach 48 Stunden Verdau bei der hellrotbestrahlten (Pfr) Probe noch vorhanden, während bei der dunkelrotbestrahlten (Pr) Probe nur die 34 und 24 kDa Banden blieben. Die entsprechenden Schnittstellen waren offensichtlich geschützter in der Pfr- als in der Pr-Form. Wie bei den Trypsin-Experimenten erschienen die chromophorfreen Fragmente mit niedrigerem Molekulargewicht. Die Banden mit gleicher Intensität in dem Bereich von 8 kDa wurden bei beiden Lichtbehandlungen detektiert. Eine 3 kDa Bande erschien intensiver in der hellrotbestrahlten (Pfr) Probe, während eine 2 kDa Bande stärker bei der dunkelrotbestrahlten (Pr) Probe zu sehen war.

3.3.3 Proteolytische Muster nach Verdau mit Subtilisin und Thermolysin

Die Proteasen Subtilisin und Thermolysin wurden ebenfalls getestet. Nach 1 min Verdau mit Subtilisin wurden zahlreiche Banden von chromophorenhaltenden und chromophorfreen Peptiden sichtbar. Das Peptidmuster unterschied sich zwischen Lichtbehandlungen von Anfang an (Abb. 26). Deutliche Unterschiede traten nach 5 h Verdau auf. In dieser Zeit waren drei Chromopeptide von 60, 49 und 43 kDa in der hellrotbestrahlten Probe zu erkennen, welche nach 24 h abgebaut wurden. Nach 7 h Verdau wurden zwei Chromopeptide von 37 und 35 kDa bevorzugt bei der dunkelrotbestrahlten Probe detektiert, welche nach 24 h ebenfalls abgebaut wurden. Nach 24 h waren drei Fragmente von 47 (nach HR), 31 (nach HR und DR) und 29 (nach DR) kDa zu erkennen. Das Peptid-Muster beider Lichtbehandlungen ähnelte dem des V8-Verdaus. Das Muster des Thermolysin-Verdaus war ähnlich dem des Trypsin-Verdaus, wobei die Unterschiede zwischen den Lichtbehandlungen nicht so deutlich waren. Nach 30 min Verdau wurden drei Chromopeptide von 60, 59 und 51 kDa gebildet (Abb. 27), die bis zu 24 h stabil blieben. Die 60 kDa Bande wurde bevorzugt bei Hellrotbehandlung gebildet, während die 59 kDa-Bande deutlicher bei Dunkelrotbehandlung detektiert wurde. Die 51 kDa Bande, die bei beiden Lichtbehandlungen gebildet wurde, war bei der Pfr-Form stärker.

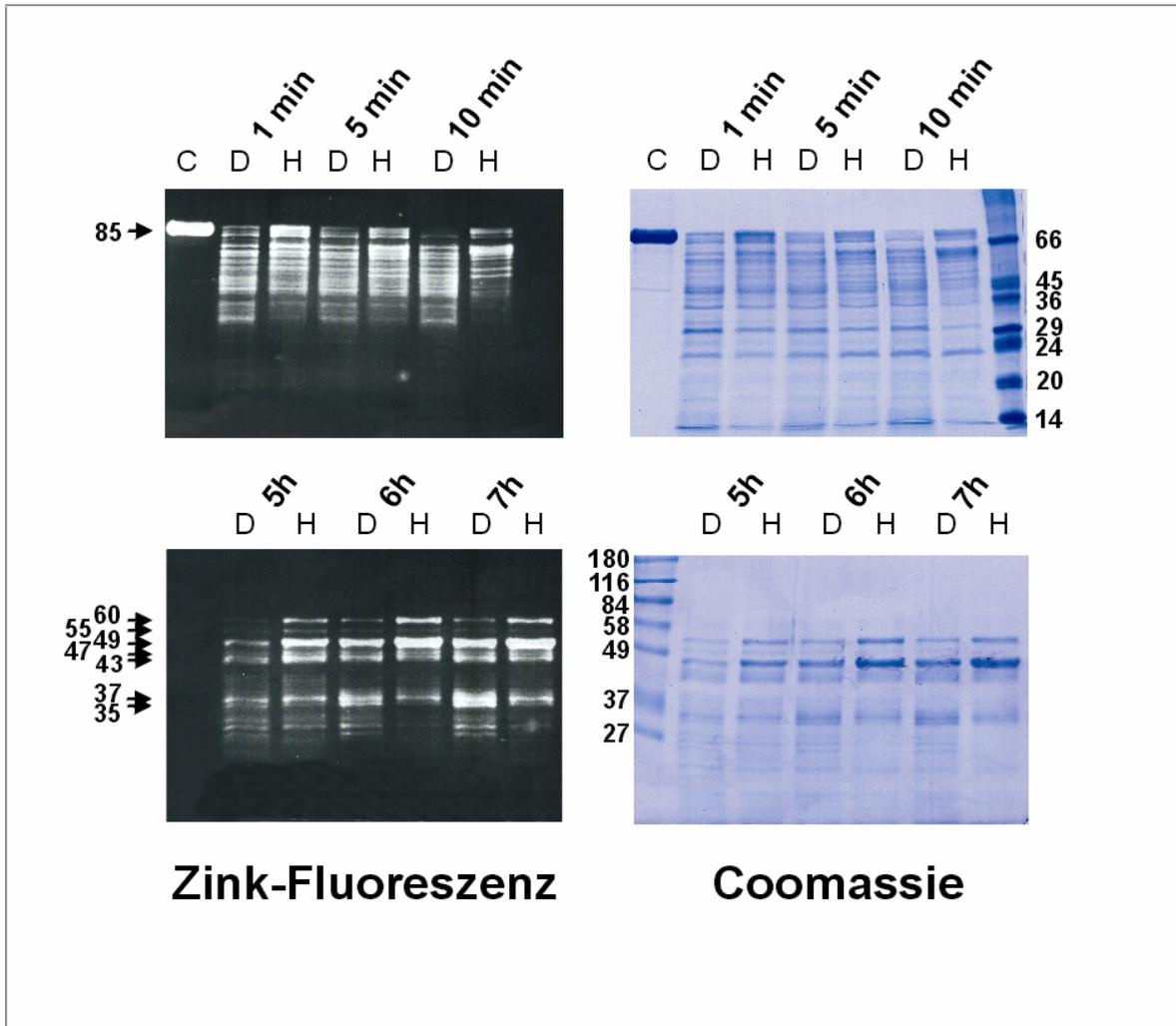


Abbildung 15: : PCB-Cph1-Muster nach gesättigter Dunkelrot- (D) oder Hellrotbestrahlung (H) und Nu-PAGE-Gel nach Verdau mit $7,5 \times 10^{-7}$ % Subtilisin und Auftragung zu SDS-PAGE. Als Kontrolle wurde unverdautes PCB-Cph1 (9 μ g) (C) aufgetragen. Der Verdau wurde zu den angegebenen Zeiten gestoppt. Die Zahlen an der rechte Seite und in der Mitte zeigen die Molekulargewichte in kDa von Standardmarker PSM (mitte) und LMW (rechts). Größen wichtiger Fragmente (in kDa) sind an der linken Seite angegeben.

Auch nach längerer Inkubationszeit war immer noch unverdautes PCB-Cph1 vorhanden, dessen Abbau offenbar schneller in der Pr-Form erfolgte. Einige chromophorfrie Peptide zwischen 28 und 20 kDa, wahrscheinlich aus der C-terminalen Region, bildeten sich nach ca. 30 min Verdau und blieben mehrere Stunden stabil.

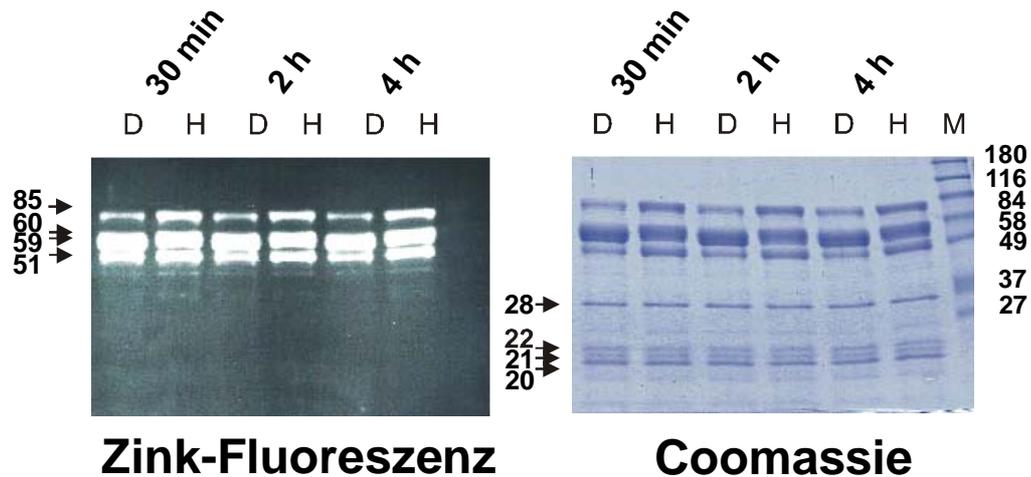


Abbildung 16: PCB-Cph1-Muster nach Behandlung mit Dunkelrot- (D) oder Hellrotlicht (H) und SDS-PAGE nach Verdau mit Thermolysin. In diesem Fall wurde kein unverdautes PCB-Cph1 aufgetragen (s. Abb 26). Die Zahlen in der Mitte und an der linken Seite geben das Molekulargewicht wichtiger Fragmente in kDa an. Als Marker (M) wurde PSM verwendet.

3.3.4 Spektrale Änderungen von Cph1 während des Verdaus: UV/VIS Spektroskopie bei der limitierten Proteolyse

Die Proteolyse von dunkelrot- und hellrotbestrahltem Cph1 wurde spektral verfolgt, um Informationen über die spektralen Eigenschaften der Chromopeptide zu bekommen. Das Absorptionsmaximum von Pr- und Pfr wurde zu niedrigerer Wellenlänge verschoben. Gleichzeitig wurde der Extinktionskoeffizient reduziert (Abb. 28). Das Spektrum nach 24 Stunden Trypsinverdau (Abb. 28, A) ähnelte dem des freien Chromophors und war fast identisch für beide Lichtbehandlungen. In Gegensatz dazu hatten Cph1-Proben nach langem V8-Verdau noch ziemlich hohe Extinktionskoeffizienten und zeigten Unterschiede zwischen hellrot- und dunkelrotbehandelten Proben. (Abb. 28, B).

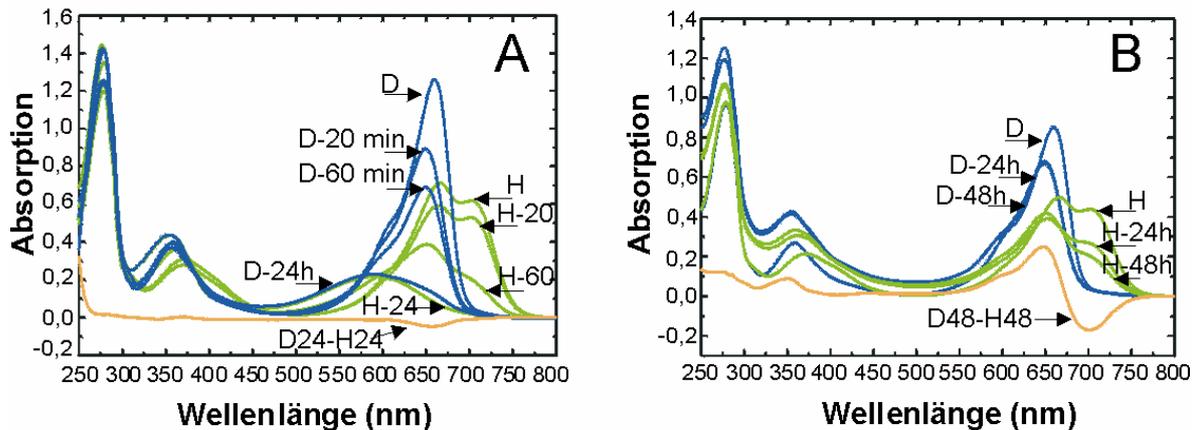


Abbildung 17: UV-VIS Spektren von PCB-Cph1 bei der Trypsin- (A) und V8-Behandlung (B). PCB-Cph1 wurde nach gesättigter Dunkelrot- oder Hellrotbestrahlung mit Trypsin oder V8 verdaut (s. 3.3.1 bzw. 3.3.2) und nach bestimmten Zeit gemessen. Das Differenzspektrum wurde aus den letzten beiden Spektren D-24h und H-24h bzw. D-48h und H-48h errechnet.

3.3.4.1 Photokonversion nach Trypsinverdau

Trypsinverdaute Proben wurden abwechselnd mit Hellrot und Dunkelrot bestrahlt, um die Photokonversion zu testen. Die Dauer des Trypsinsverdaus lag bei 15 Minuten. Zu diesem Zeitpunkt haben sich entweder F1- oder F2/F3-Fragmente gebildet. Reversible Photokonversion wurde nach Hellrot- oder Dunkelrotbestrahlung und Verdau nachgewiesen (Abb. 29). Dem Differenzspektrum der nach Trypsinverdau zuerst dunkelrotbestrahlten Probe, in der die F2/F3 Fragmente dominieren, kann man entnehmen, dass die absoluten Absorptionswerte von Pfr schneller abnahmen als die von Pr. Das Pfr-Maximum war außerdem 10 nm nach Blau verschoben. Bei der anfangs hellrotbestrahlten Probe, in der das F1 Fragment dominiert, war das erste Differenzspektrum ähnlich dem des unverdauten Cph1. Nach einer weiteren Photokonversion war die Pfr-Bande des Differenzspektrums weiter nach Blau verschoben und hatte eine niedrigere Absorption. Das zweite Differenzspektrum ähnelte dem ersten, zeigte aber eine Verringerung der Pr-Absorption. Diese Senkung könnte aus einem Abbau des F2 Fragmentes während der Bestrahlung resultieren.

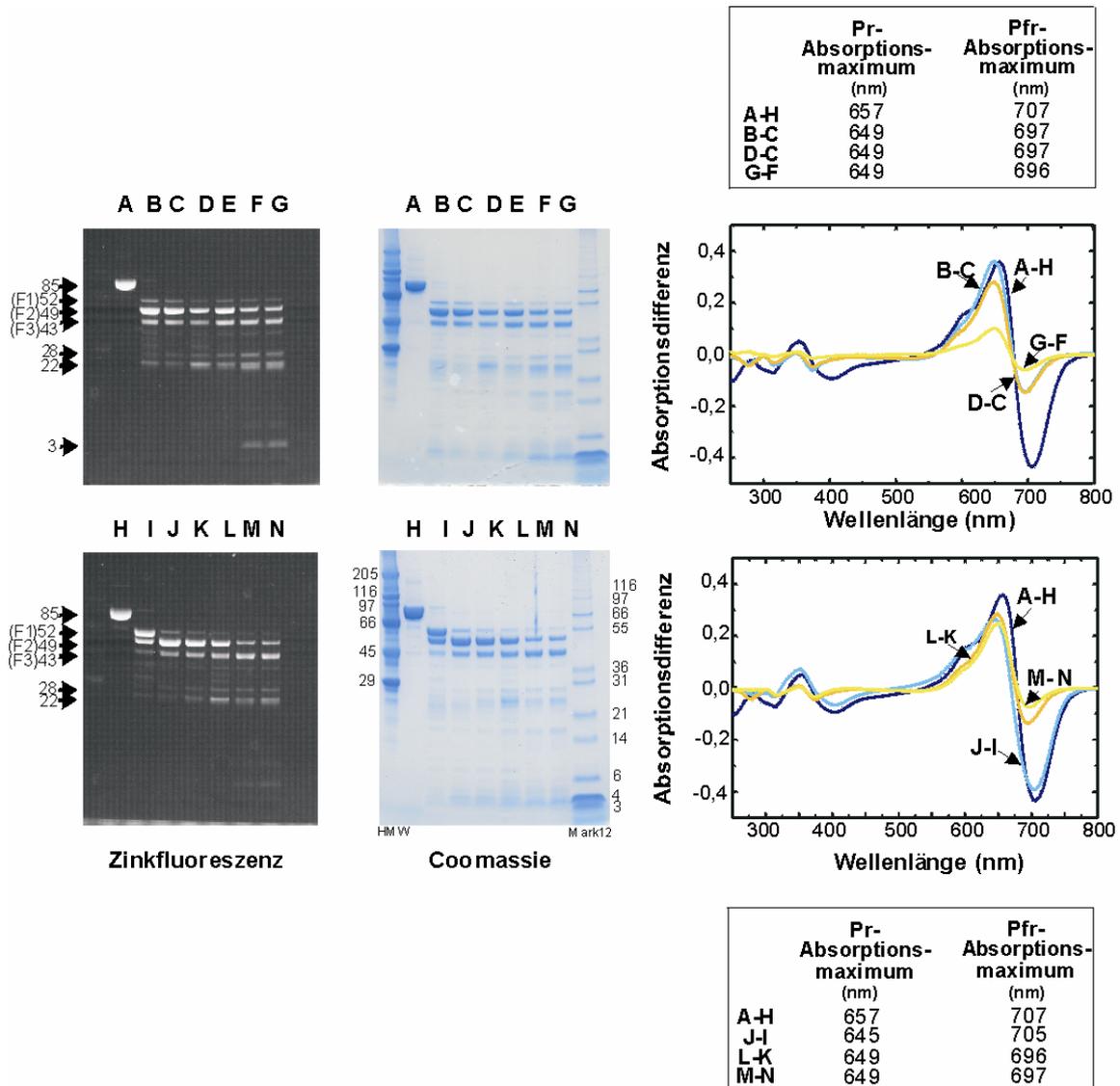


Abbildung 18: Photokonzersion unter Trypsinverdau. Oben: Cph1 wurde vor dem Verdau dunkelrot bestrahlt. Unten: Cph1 wurde vor dem Verdau hellrot bestrahlt. Nach 15 min Trypsinverdau (B,I) wurden die Proben spektral gemessen und 5 min mit dem jeweils anderen Licht bestrahlt und wieder gemessen (C,J). Dieser Prozess wurde insgesamt 5 mal wiederholt. Für die Differenzspektren wurden die Absorption nach Hellrotbestrahlung (oben: C, E und G; unten: I, K und M) von der Absorption nach Dunkelrotbestrahlung (oben: B, D und F; unten: J, L und N) subtrahiert. Die Photokonzersionen wurden nach 15 (B,I), 20 (C,J), 25 (D,K), 30 (E,L) und 90 min (F-G, M-N) durchgeführt.

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass das F1-Fragment der hellrotbestrahlten Probe innerhalb von 5 min Bestrahlung komplett zu den F2/F3-Fragmenten abgebaut wurde. Im Vergleich zu *full-length* Cph1 müssen die Schnittstellen der F2/F3 kDa Fragmente in dem F1-Fragment exponierter sein, da bei *full length* Cph1 die F2/F3 Fragmente erst nach 20

min gebildet werden. Das erste Differenzspektrum nach Photokonversion der hellrotbestrahlten Probe ist ein Differenzspektrum zwischen der Pfr-Form des F1-Fragmentes und der Pr-Form der F2/F3-Fragmente. Die Pfr Absorption war mit der des *full-length* Cph1 vergleichbar und die Pr-Absorption ähnelte der von F2/F3 nach direktem Verdau. Nach der zweiten Photokonversion, in der nur F2/F3-Fragmente gemessen wurden, war die Pfr- Absorption des Differenzspektrums reduziert. Wenn das F1-Fragment ein Monomer ist, könnte man dessen Zugänglichkeit erklären (s.3.3.5).

3.3.4.2 Photokonversion nach V8-Verdau

Photokonversionsmessungen wurden ebenfalls mit einer V8-verdauten Probe durchgeführt. In diesem Fall wurden die Messungen nach 48 h Verdau durchgeführt. Wie zu erwarten, war auch hier die Photokonversion reversibel (Abb. 30). Die relativen Absorptionswerte von Pfr aus beiden Proben waren niedriger als bei der Kontrolle, wobei bei der zuerst dunkelrotbestrahlten Probe (Abb. 30, A) dieser Unterschied größer war. Das Pfr-Maximum war um 13 nm nach Blau verschoben. Die Verringerung der Absorption bei Pfr zwischen der ersten und der zweiten Messung resultiert wahrscheinlich aus dem Verlust des 47 kDa (F4) Chromopeptides. Die Differenzspektren der dunkelrotbestrahlten Probe waren identisch zur Kontrolle und vergleichbar mit den Spektren der F2/F3-Fragmente des Trypsinverdau. Diese Probe enthielt 34 (F6) und 24 (F8) kDa Chromopeptide. Die Amplitude des Differenzspektrums zeigte, dass beide Fragmente photoaktiv waren. Bei der hellrotbestrahlten Probe, welche die F4, F5, F6, F7 und F8 Fragmente enthielt, wurde nach der ersten Photokonversion das Pfr-Maximum um 4 nm nach Blau verschoben und wie erwartet die Absorption verringert. Eine leichte Abnahme der Intensität der Gel-Bande des F4-Fragmentes wurde während der Messungen festgestellt. Die anderen Banden blieben gleich. Die Bildung der F6, F5 und F8 Fragmente aus dem F4-Fragment lässt die Abnahme der Pfr-Absorption für die Zeit, in der das hellrotbestrahlte Cph1 in der Pr-Form war, vermuten.

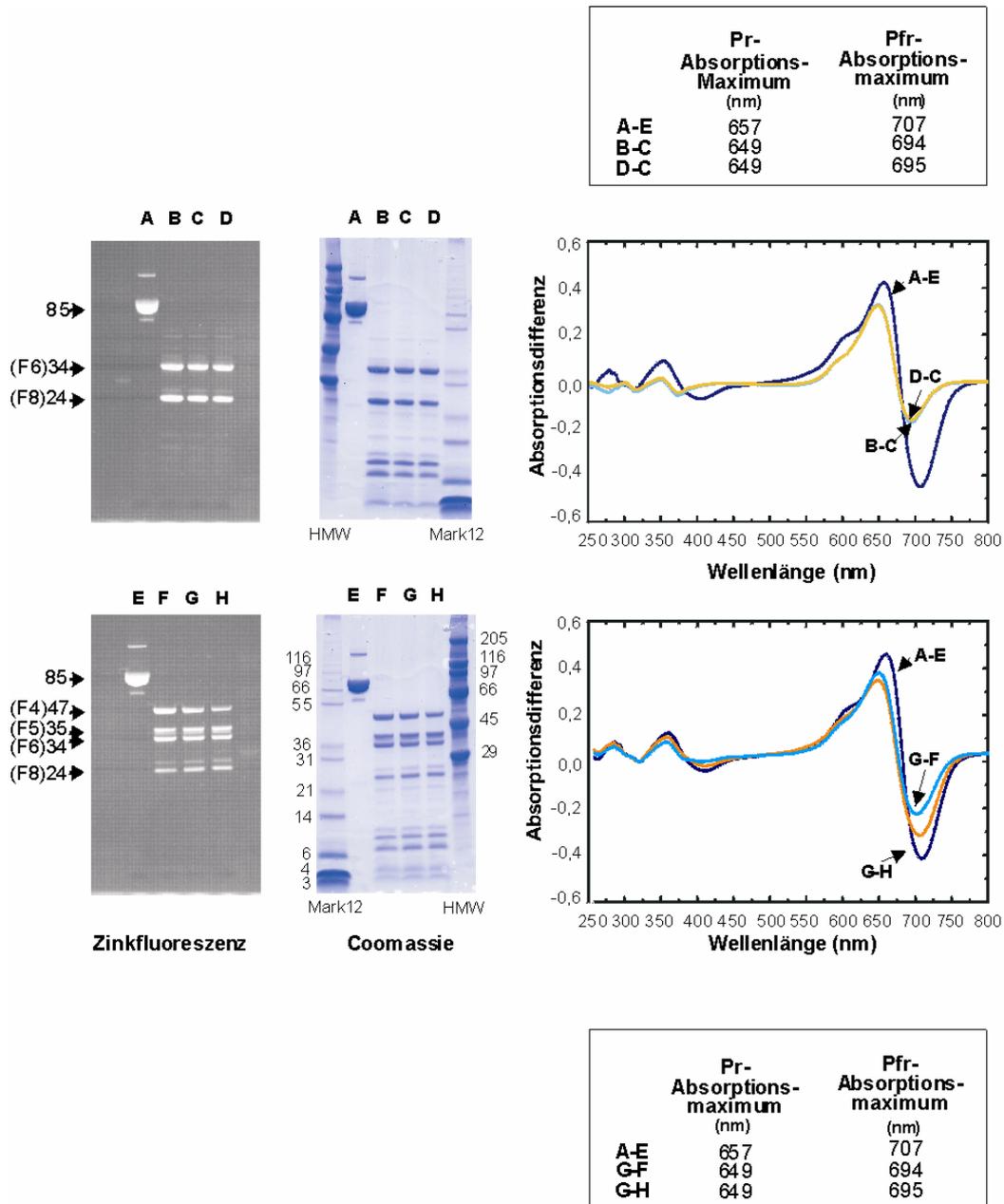


Abbildung 19: Photokonversion nach Hellrot- und Dunkelrotbestrahlung von PCB-Cph1 nach gesättigter Dunkelrot- (oben) oder Hellrotbestrahlung (unten) und Verdau mit V8. PCB-Cph1 (A) (1 mg/ml) nach 48 h V8-Verdau (B, F) spektral gemessen und 5 min mit dem entsprechenden Licht bestrahlt und wieder gemessen (C, G). Dieser Prozess wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Für die Differenzspektren wurden die Pfr-Formen (1: C; 2:F und H) von den Pr-Formen (1:B und D; 2: G) subtrahiert.

3.3.5 Limitierte Proteolyse nach NGE

PCB-Cph1 wurde nach Affinitätschromatographie über NGE gereinigt (s.3.1.6).

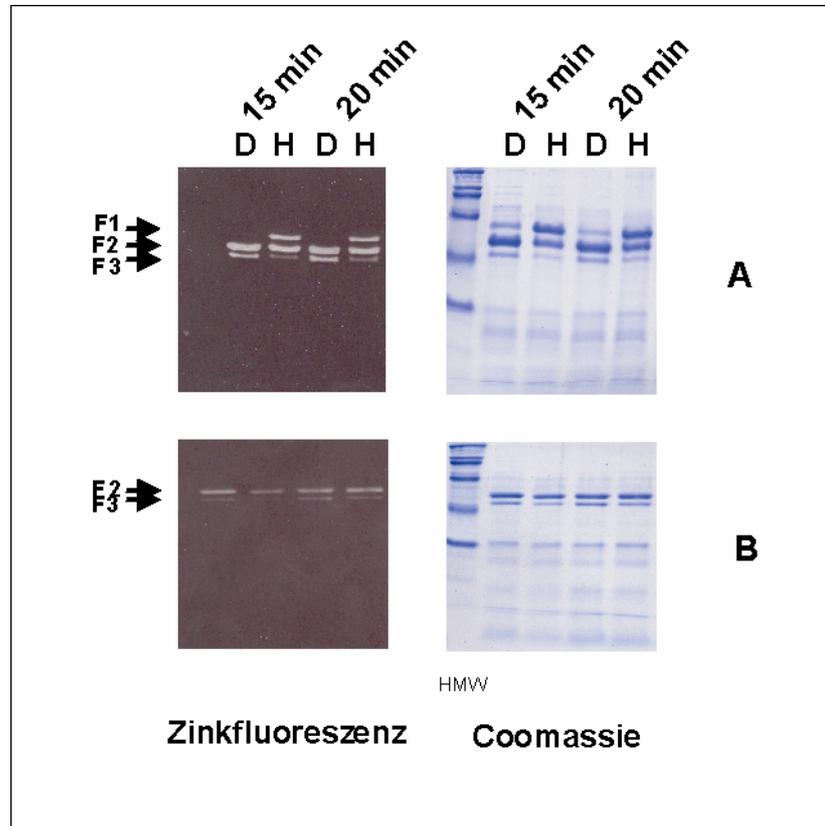


Abbildung 20: PCB-Cph1 nach NGE und Proteolyse mit Trypsin (B). Als Kontrolle wurde gereinigtes PCB-Cph1 mit Trypsin verdaut (A). Die Probe wurde mit Dunkelrot- (D) oder Hellrot (H) bestrahlt und mit Trypsin verdaut.

Wenn Cph1 über NGE gereinigt wird, liegt es als Monomer vor. Dieses Protein wurde ebenfalls für limitierte Proteolyse eingesetzt (Abb. 31). Als Kontrolle wurde durch Affinitätschromatographie gereinigtes PCB-Cph1 verwendet. Nach NGE war der Unterschied zwischen dunkelrot- (Pr) und hellrotbehandelten (Pfr) Proben nicht mehr zu sehen. Die beiden Chromopeptid-Fragmente hatten ein Molekulargewicht von 49 (F2) und 43 (F3) kDa, das F1 Fragment war nicht vorhanden. Die nach NGE erwartete Monomerisierung des Cph1 führt zu einer deutlichen Exposition der F2- und F3-Schnittstelle auch in der Pfr Form.

3.4 Massenspektrometrische Analyse von proteolytischen Fragmenten

Aus dem Trypsinverdau wurden die drei dominierenden Chromopeptide: F1 (52 kDa), F2 (49 kDa) und F3 (43 kDa) zur massenspektrometrischen Analyse verwendet, um die Position der C- und N-terminalen Schnittstelle zu bestimmen (Tabelle 6). Für die Prozedur wurden F1 und F2/F3 aus den hellrotbestrahlten (Pfr) bzw. dunkelrotbestrahlten Proben nach 20 min Verdau ausgewählt. Diese Auswahl war repräsentativ für alle Chromopeptide, die zwischen 5 und 60 min Verdau detektiert wurden.

Protease	Molekulargewicht (kDa)	Spezifität der Schnittstelle	Aminosäure am N-Terminus	Aminosäure am C-Terminus	Name des Fragments
Trypsin	52614	Pr	S-56	R-520	F1
	46219	Pfr>Pr	T-64	R-472	F2
	44284	Pfr	L-81	R-472	F3
V8	48596,8	Pr	T-17	N-449	F4
	35825	Pr	T-17	E-335	F5
	34335,4	Pfr	T-17	E-323	F6

Tabelle 3: Fragmente von Cph1 nach limitierter Proteolyse mit Trypsin oder Endoproteinase Glu-C (V8). Die Proben wurden vor dem Verdau mit Dunkelrot (Pr) oder Hellrot (Pfr) bestrahlt und auf 13 % SDS-PAGE Gelen aufgetrennt. Die gewählten Fragmente wurden nach Coomassiefärbung ausgeschnitten und elektroeluiert. Die Molekulargewichte und Aminosäuresequenzen von verdauten Peptiden wurden durch eine Micro-HPLC angeschlossen an eine *Ion Trap* Tandem Massen Spektrometer bestimmt (s. 2.12).

Aus der V8 Proteolyse wurden die Chromopeptide F4 (47 kDa) und F5 (35 kDa) der hellrotbestrahlten Probe (Pfr) und F6 (34 kDa) der dunkelrotbestrahlten Probe (Pr) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 zusammengestellt.

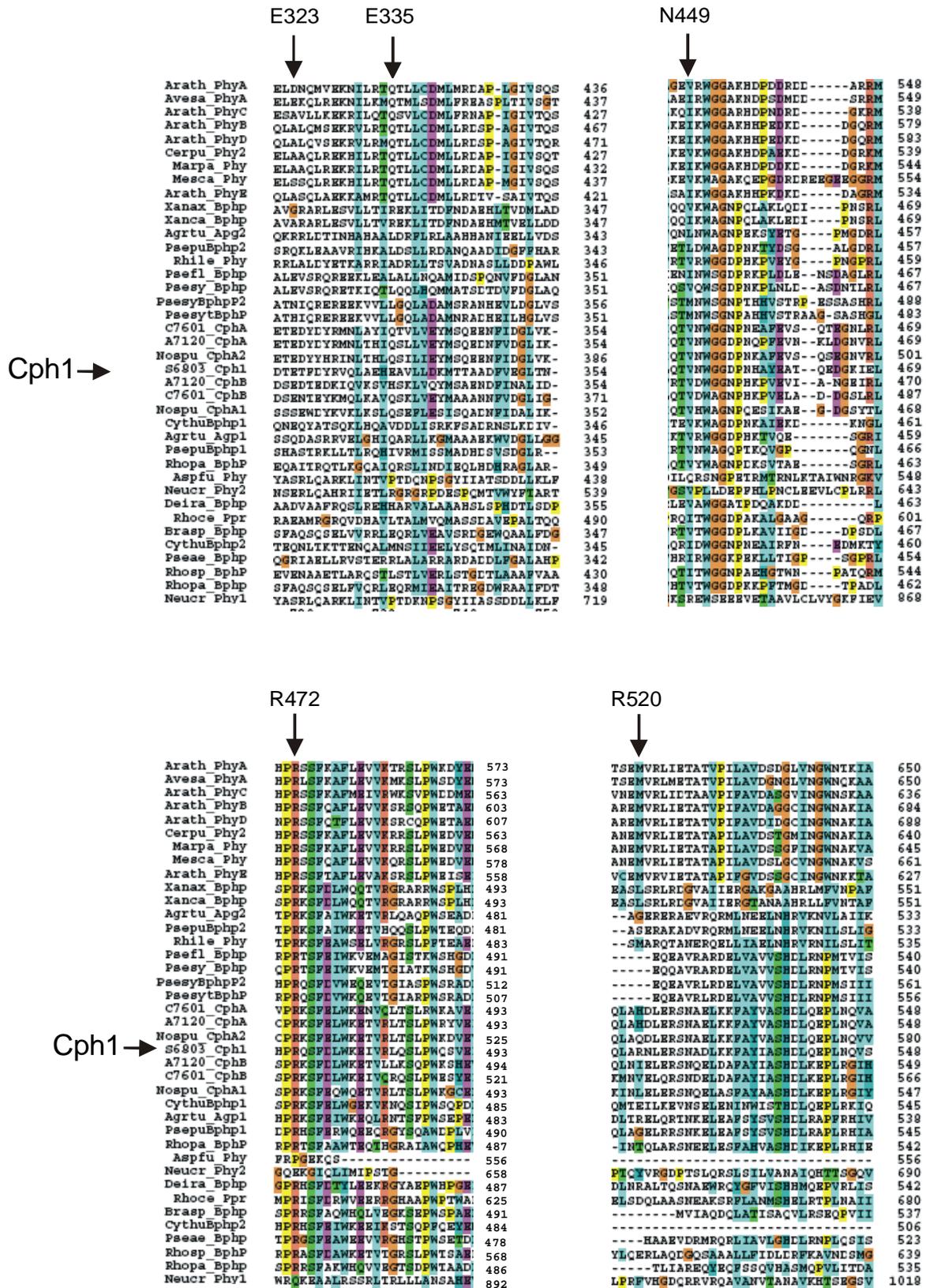


Abbildung 21: Sequenzvergleich (Alignment) mit Phytochromen aus Pflanzen, Bakterien und Pilzen. Die Position der C-terminalen Schnittstelle der F1 bis F6 Fragmente ist durch den Pfeil markiert.

Das F1-Fragment beginnt bei Ser⁵⁶ und endet bei Arg⁵²⁰. Letztere Aminosäure liegt zwischen Chromophormodul und dem C-terminalen Histidinkinase-Modul, während Ser⁵⁶ innerhalb der PAS-Domäne am N-Terminus liegt (Abb. 33). Die F2 und F3 Fragmente unterscheiden sich in der N-terminalen Schnittstelle Arg⁶³ bzw. Arg⁸⁰, hatten aber die gleiche C-terminale Schnittstelle Arg⁴⁷². Diese Aminosäure liegt innerhalb der PHY-Domäne. Wie Sequenzvergleiche zeigen, ist dieses Arginin in allen bisher bekannten bakteriellen und pflanzlichen Phytochromen konserviert (Abb. 32). Nur in Phytochromen aus Pilzen ist an der homologen Stelle kein Arginin zu sehen. Die N-terminalen Schnittstellen liegen beide in der PAS-Domäne.

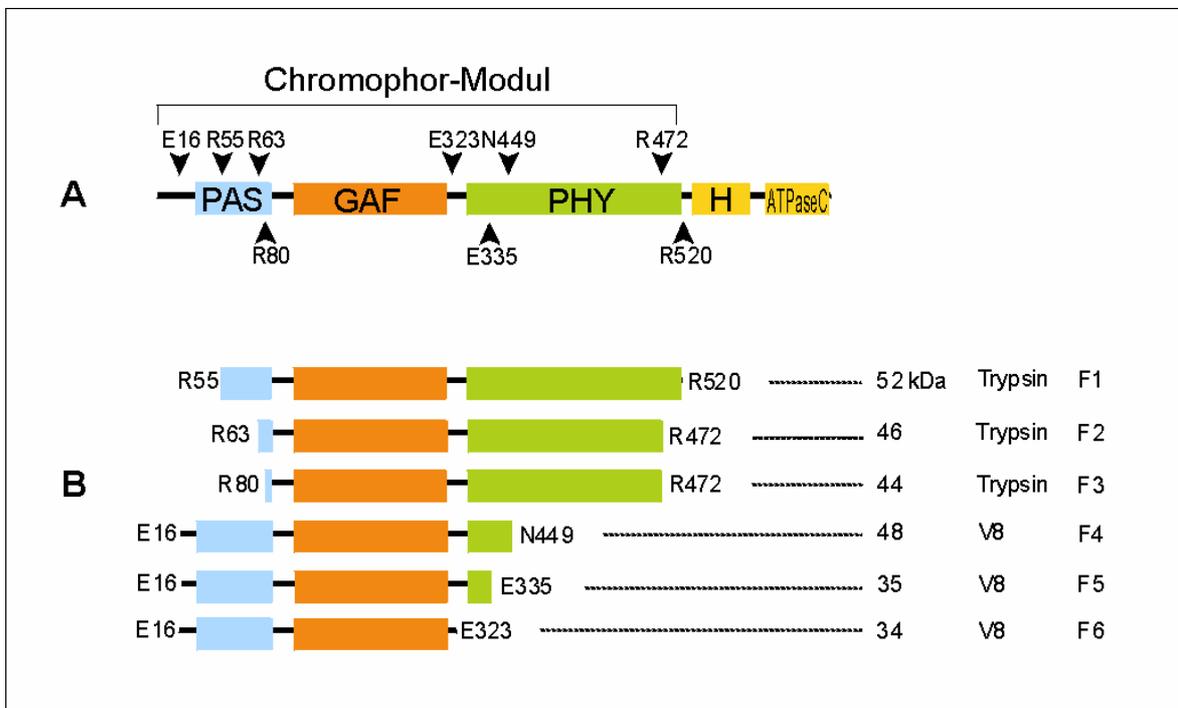


Abbildung 22: (A) Spezifische Schnittstelle auf der Cph1-Domänenstruktur nach massenspektrometrischer Analyse. (B) Resultierende Peptide nach Trypsin- oder V8-Verdauung und massenspektrometrischer Analyse.

Alle V8-Fragmente (F4-F6) starten mit Tyr¹⁷ am N-Terminus. Diese Stelle liegt unmittelbar vor der PAS-Domäne. Asn⁴⁴⁹ am C-Terminus von F4 wurde auf der PHY-Domäne gefunden. Da V8 Glu bevorzugt schneidet, muß die Asn-Schnittstelle besonders exponiert sein, um die schwächere enzymatische Aktivität auszugleichen. Glu³³⁵ am C-Terminus von F5 liegt zwischen der GAF- und der PHY-Domäne, während Glu³²³ aus dem F6-Fragment innerhalb der GAF-Domäne liegt.

3.5 Site-directed Mutagenese

Durch die limitierten Proteolyse wurden spezifische Pr- oder Pfr-Schnittstellen bestimmt. Diese Region, in der diese Aminosäuren liegen, wird bei der Photokonversion bewegt. Veränderungen in der Primärstruktur könnten die Beweglichkeit dieses Elements ändern und so die Photokonversion und die intramolekulare Signaltransduktion beeinflussen. Um mehr von diesem Prozess zu wissen, wurden die drei Aminosäuren R520, R472 und E323 durch SDM verändert. Diese drei Aminosäuren wurden als spezifische Schnittstellen für die F1, F2/F3 bzw. F6 Fragmente identifiziert (Abb. 34). Jede der drei Aminosäuren wurde durch zwei verschiedene Aminosäuren ersetzt. Arginin bzw. Glutamat wurden in Prolin oder Alanin bzw. Prolin oder Aspartat umgewandelt. Prolin wurde gewählt, weil es eine lokal beschränkte starre Peptidstruktur bewirken kann. So liegen sechs verschiedene Mutanten, R520A, R520P, R472A, R472P, E323D und E323P vor.

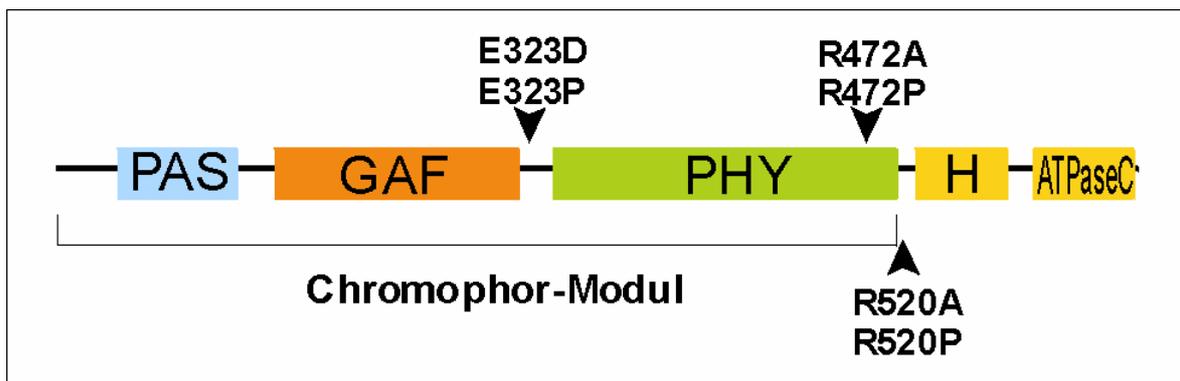


Abbildung 23: Stellung der durch SDM veränderte Aminosäure aus dem cyanobakteriellen Phytochrom Cph1.

3.5.1 Spektrale Eigenschaften der Cph1 Mutanten

Die R520A- und R520P-Addukte waren spektral von dem Addukt des Wildtyp-Proteins nicht zu unterscheiden (Abb. 35). Das war zu erwarten, weil die Mutation außerhalb der PHY-Domäne liegt und sich nicht auf dem Aminoterminalfragment Cph1 Δ 2 (Aminosäure 1 bis 513) befindet, welches spektral identisch zu *full-length* ist.

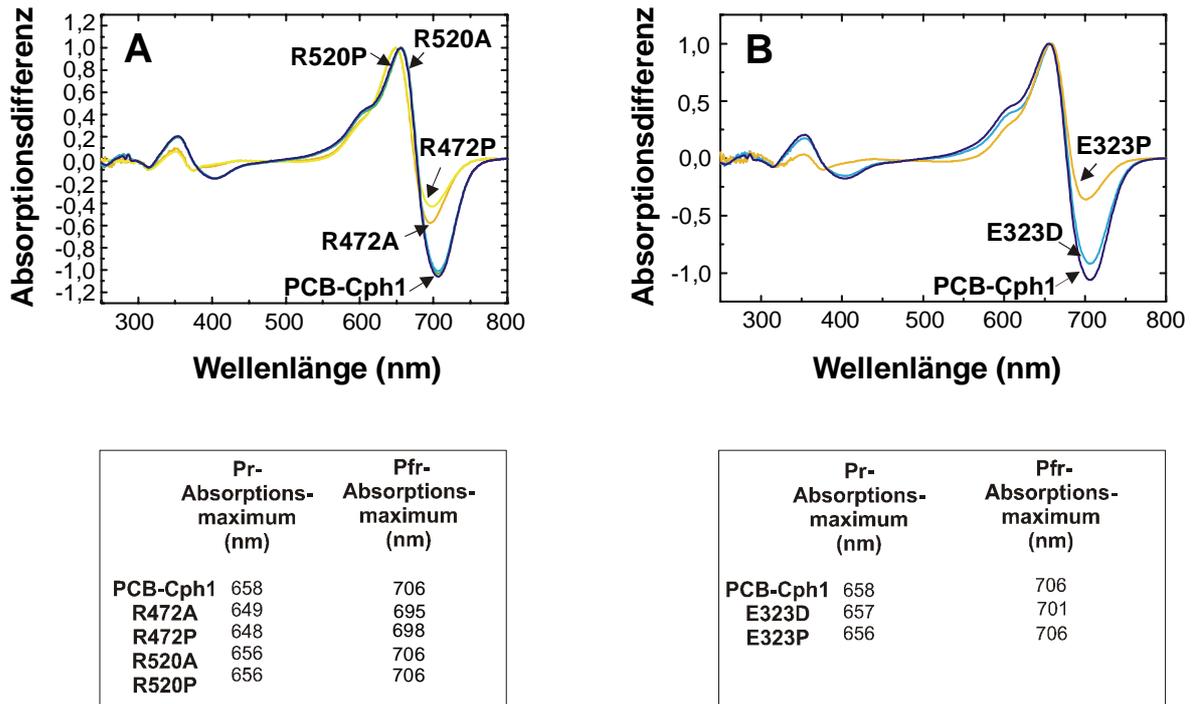


Abbildung 24: Differenzspektren von den Mutanten R520A, R520P, R472A, R472P (A), E323P und E323D (B) nach Affinitätschromatographischer Reinigung und Assemblierung mit 1.1 µM PCB. Die Addukte (1 mg/ml) wurden mit hellrot oder dunkelrot bestrahlt. Als Kontrolle wurde gereinigtes PCB-Cph1 verwendet.

Die R472P- und R472A-Addukte hatten blauverschobene Pr- und Pfr-Absorptionsmaxima von 659 zu 650 nm bzw. von 708 zu 699 nm. Die relative Absorption der Pfr-Form war in beiden Fällen reduziert. Diese Mutanten waren spektral ähnlich den F1 (52kDa) und F2 (49 kDa) Chromopeptiden aus der Trypsinproteolyse. Bei den E323P- und E323D-Addukten war die Position des Pr-Absorptionsmaximums unverändert, aber die relative Absorption der Pfr-Form ebenfalls reduziert. Diese Reduktion war deutlicher bei dem E323P-Addukt, bei welchem das Pfr-Absorptionsmaximum von 708 zu 702 nm verschoben war.

3.5.2 Mutantenverdau durch Trypsin oder V8 Behandlung

Limitierte Proteolyse mit Trypsin wurde bei den R520P-, R520A-, R472P- und R472A-Addukten durchgeführt (Abb. 36). Bei R472P und R472A gab es keinen Unterschied zwischen hellrot- und dunkelrotbehandelten Proben (Abb.36; B und C). Bei R520P und R520A wurden jedoch Unterschiede zwischen beiden Lichtvorbehandlungen gefunden, die mit dem Wildtyp-Peptidmuster übereinstimmten (Abb. 36; E und F). Es gibt ein weiteres

Arginin an Position R524. Vermutlich wurde Cph1 bei dieser Aminosäure geschnitten. Außerdem befinden sich zwei Lysine an Position 530 und 531, die ebenfalls als Schnittstelle benutzt werden könnten. [von Asparagin habe ich noch nichts gehört, wo kommt die Information her?]

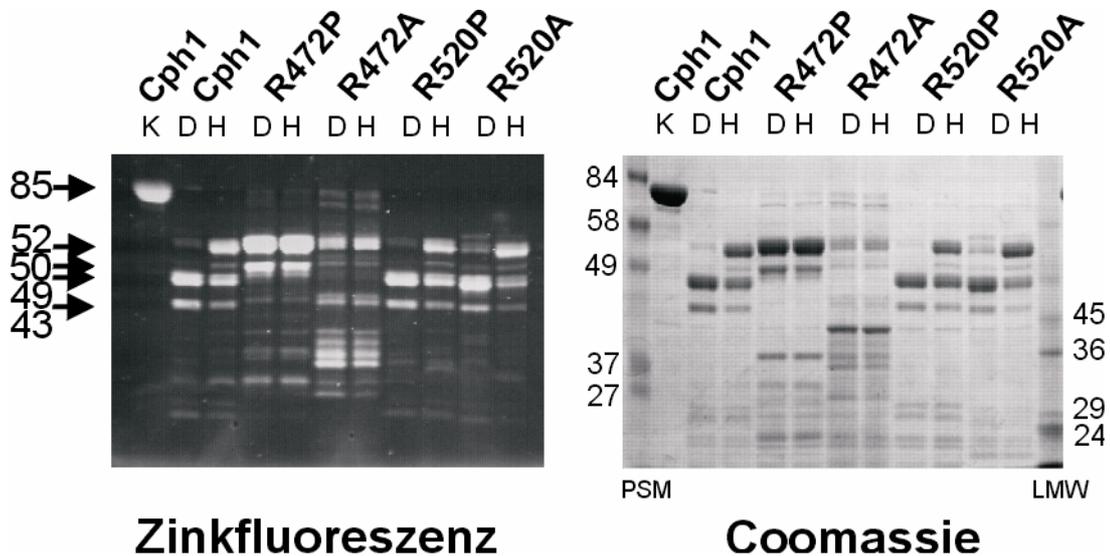


Abbildung 25: Trypsinverdau des Cph1 und der Mutanten R472P, R472A, R520P und R520A nach affinitätschromatographischer Reinigung der Proteine und Assemblierung mit PCB. Die Proben wurden vor Trypsinbehandlung mit dunkelrot (D) oder hellrot (H) bestrahlt. Die SDS-PAGE (13 x 14cm, 8-9 µg / Spur) wurde nach 30 min Verdau durchgeführt. Als Kontrolle wurde unverdautes PCB-Cph1 verwendet. Links sind Molekulargewichte wichtiger Fragmente in kDa angegeben. Die Molekulargewichte des Markers sind links und rechts neben dem Coomassie-Gel angegeben.

Für die Verdaue von den E323P- und E323D-Addukten wurde V8 verwendet. Wie bei R472P gab es bei E323P keinen deutlichen Unterschied zwischen beiden Lichtvorbehandlungen. Das 47 kDa-Fragment wurde bei der hellrotbestrahlten Probe (H) deutlich abgebaut und das 35 kDa-Fragment nahm bei beiden Lichtbehandlungen zu. Bei dem E323D-Addukt gab es Unterschiede zwischen beiden Lichtbehandlungen, allerdings nicht übereinstimmend mit dem des Wildtyps. Wie oben für R472P und R472A beschrieben sind diese Mutanten E323D und E323P aller Wahrscheinlichkeit nach anders als PCB-Cph1 gefaltet und zeigen andere Schnittstellen als Cph1-Wildtyp.

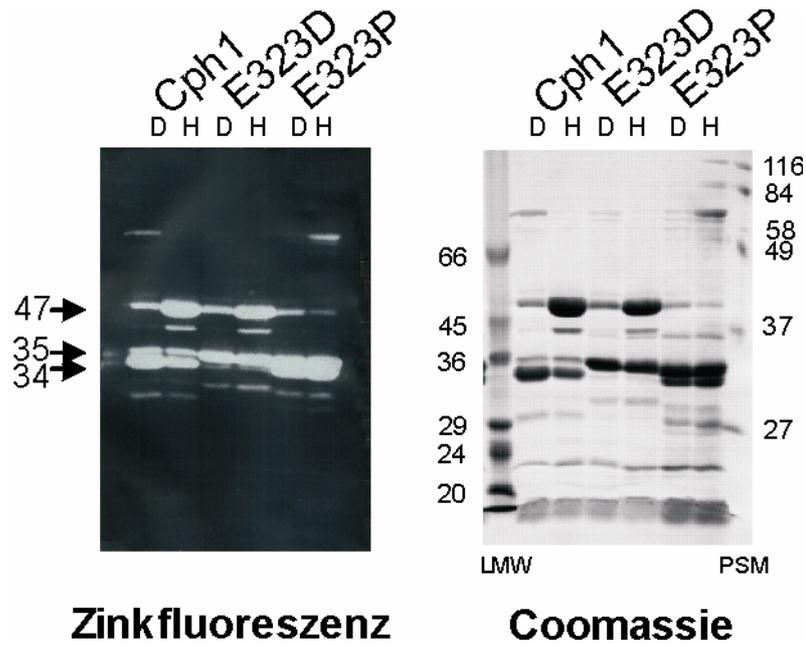


Abbildung 26: V8-Verdau der Kontrolle Cph1 (A) und der Mutanten E323D (B) und E323P (C). Die Mutanten wurden wie in Abb. 25 behandelt. Die proteolytische Reaktion wurde nach 48 h Inkubation mit Probenpuffer gestoppt (s. 2.3.12) und auf einem 13x14 cm großer Gel zur SDS-PAGE aufgetragen. Als Kontrolle wurde 48 h verdautes PCB-Cph1 verwendet. Links sind Molekulargewichte wichtiger Fragmente in kDa angegeben. Die Molekulargewichte des Markers sind links und rechts neben dem Coomassie-Gel angegeben. .

3.6 Mutantanalyse: Autophosphorylierung und GFC

Die Histidinkinaseaktivität wird bei Cph1 durch Licht reguliert. Die Kinaseaktivität ist stärker in der Pr- und schwächer in der Pfr-Form. Das Phosphorylierungsverhältnis zwischen beiden Konformationen war ca 4.5 bei Yeh et al. (1997). Die Wirkung der Mutationen in der Regulation der Histidinkinaseaktivität wurde durch Radioaktivmarkierung der Chromopeptide analysiert.

3.6.1 Autophosphorylierung

Mit allen Mutanten wurden nach gesättigter Dunkelrot- oder Hellrotlichtbestrahlung eine Autophosphorylierung durchgeführt. Dafür wurde erst jedes Apoprotein mit PCB im Überschuss assembliert. Danach wurde freier Chromophor mit einer Entsalzungs-Säule entfernt. Das Autoradiogram zeigte, dass die Phosphorylierungsmustern aller Mutanten verschieden sind und dass diese Muster sich von denen des Wildtyp unterscheiden (Abb.

38). Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Mutationen sensitive Regionen des Proteins verändert wurden.

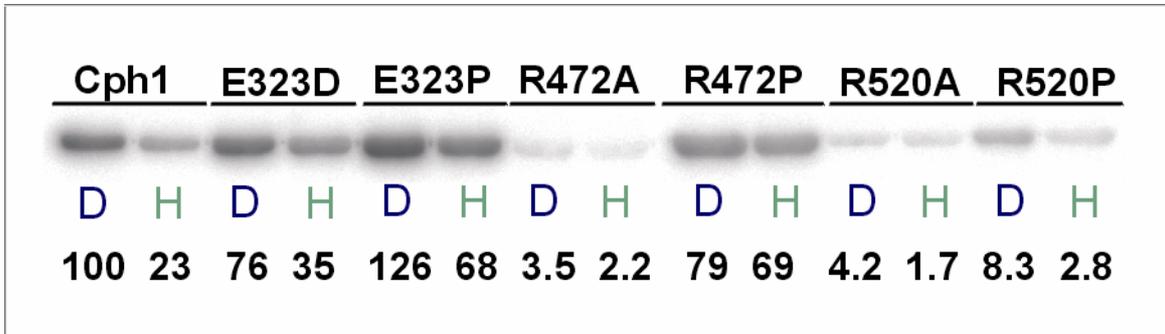


Abbildung 27: Beispiele für Cph1, E323D, E323P, R472A, R472P, R520A und R520P Autophosphorylierung. Dunkelrot (D) oder hellrot (H) bestrahlte PCB-Chromopeptide (0.9 µg) nach $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ Markierung, SDS-PAGE Elektrophorese und *Blotting*. Das Signal von Cph1-D wurde als 100 definiert. Die relativen Werte sind unter den Banden angegeben. Die Proben wurden nach Affinitätschromatographie, Konzentrationsbestimmung und gesättigter Dunkelrot- oder Hellrotbestrahlung 30 min mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert.

Die Phosphorylierung der R472A, R520A und R520P Mutanten war drastisch reduziert. In dem Fall von E323D, E323P und R472P war die Phosphorylierung der dunkelrotbestrahlten Probe (Pr) vergleichbar mit der von Cph1.

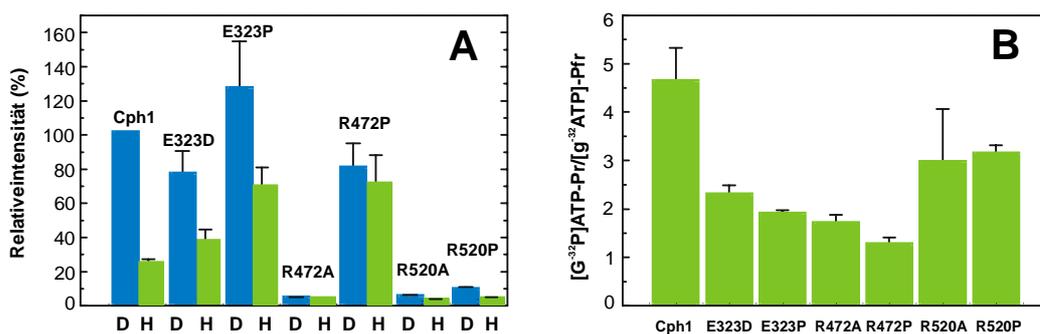


Abbildung 28: Auswertung der Radiogramme. (A) Relativintensitäten (%) von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ markierten PCB-Cph1, E323D, E323P, R472A, R472P, R520A und R520P nach Hellrot- (H) oder Dunkelrotbestrahlung (D). (B) Phosphorylierungsverhältnis zwischen $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ markierten Pr und Pfr für jedes Chromopeptid. Mittelwerte aus 3 Versuchen +/- Standardfehler.

Die hellrotbestrahlten Proben (Pfr) dieser Mutanten waren stärker phosphoryliert als die von Wildtyp Cph1. In allen 6 Mutanten war das Verhältnis zwischen dunkelrot und hellrotbestrahlten Proben in Vergleich zu dem Wildtyp Cph1 reduziert (Abb. 39; B).

3.6.2 Analytische GFC nach Dunkelrotbestrahlung aller Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Mutation die Cph1 Dimerisierung beeinflusst, wurde analytische GFC durchgeführt. Cph1 und die Mutanten wurden nach gesättigter Dunkelrotbestrahlung für eine GFC verwendet (Abb. 40). Bei R472A und R472P gab es Anzeichen für Monomere (Tabelle 7). Das Elutionsprofil der Mutante E323D ähnelte dem der Kontrolle mit der gleichen Absorptionsausbeute. R520A und R520P zeigten ein in mehrere Peaks geteiltes Profil, wobei das Protein im Bereich des Dimers eluierte. Bei R520P eluierte das Protein mit zwei Peaks, einer im Tetramer- und der andere im Monomerbereich.

Chromoprotein	Elutionspeak (ml)	Molekulargewicht
Cph1	12,2	158
E323D	11,5	199
E323P	11,8	190
R472A	11,6 13,2	200 95
R472P	11,5 13	199 102
R520A	10,3 11,8	389 190
R520P	10,5 11,7 12,8	331 186 112

Tabelle 4: Elutionsvolumen und berechnete Molekulargewichte des Cph1 und der Mutanten E323D, E323P, R472A, R472P, R520A und R520P nach GFC.

Wenn die Mutationen, ähnlich wie NGE (s. 3.3.5), zur Monomerisierung führen, dann lässt sich so die schwache Phosphorylierung erklären.

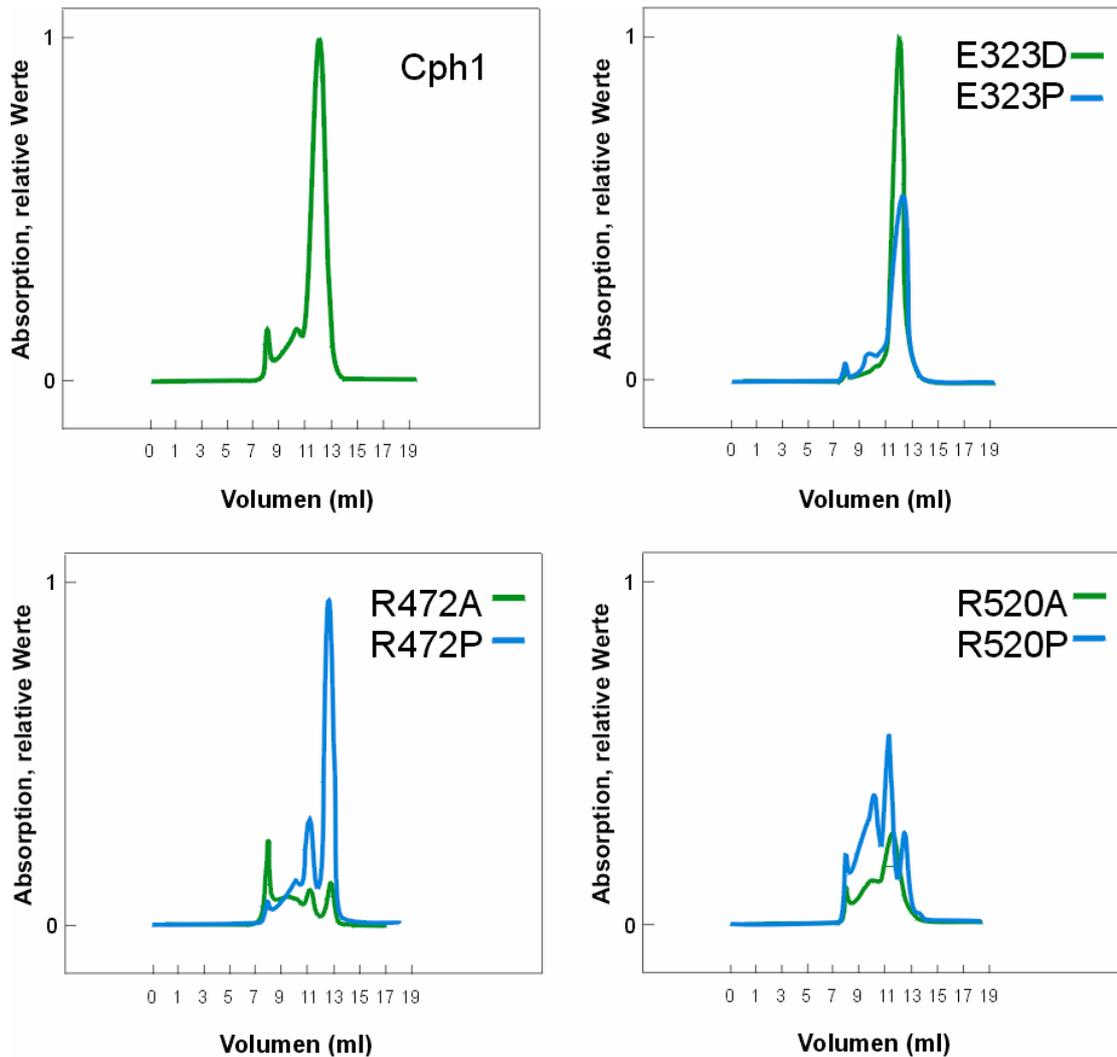


Abbildung 29: GFC Elutionsprofil nach Dunkelrotbestrahlung von Cph1 (Kontrolle) und den Mutanten E323D, E323P, R472A, R472P, R520A und R520P. Nach affinitätschromatographischer Reinigung wurden 150 µl gereinigte Chromopeptide (ca. 1mg/ml) verwendet.

3.7 Rekombinante Cph1-Deletionsproteine

Bei der V8 Proteolyse wurden relativ kleine photoaktive Fragmente erhalten. Das F6 Fragment (T17-E323) und ein anderes Fragment, welches beim nativen Startcodon beginnt (M1-E323), wurden in einen Expressionsvektor kloniert. Diese N-terminalen Deletionen enthalten keine PHY-, HisK- und ATPaseC-Domäne (Abb. 41). Die Proteine wurden exprimiert und extrahiert. Nach der Reinigung wurde PCB im Dunkeln zugegeben und das Addukt über SDS-PAGE, Zinkfluoreszenz und UV/VIS Spektroskopie gemessen.



Abbildung 30: Strukturdomänen der Chromopeptiddeletionen von Cph1. In einem Fall wurden die ersten 16 Aminosäuren deletiert. Beide enthalten PAS- und GAF-Domänen und enden am E323.

(Abb. 43). Über SDS-PAGE und Zinkfluoreszenz wurde festgestellt, dass beide Fragmente PCB einbauen, wobei Cph1:T17-E323 ein schwächeres Signal zeigte. Die Assemblierung wurde bei beiden Deletionen über Spektroskopie bestätigt. Das Deletionsprotein Cph1:M1-E323 zeigte ein nach Blau verschobenes Pr-Spektrum. Nach Hellrotbestrahlung und Differenzspektrum wurde eine Photokonversion festgestellt, welche eine Abnahme der Absorption der Pfr-Form im Vergleich zur Kontrolle zeigte.

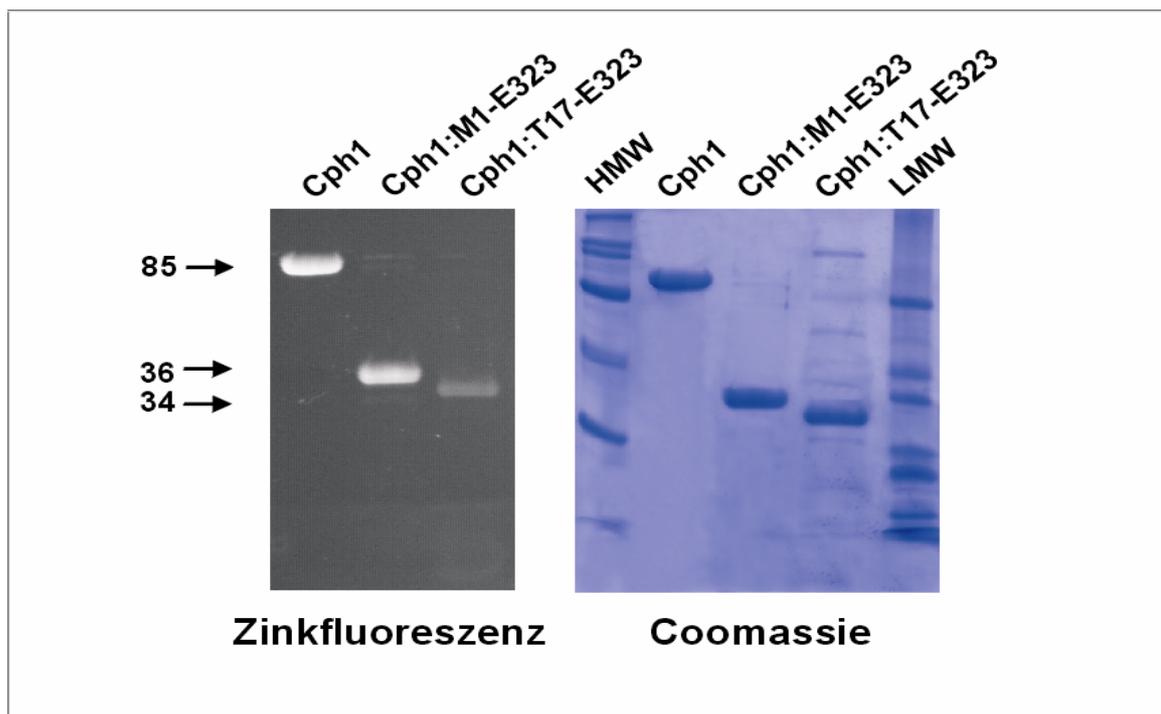


Abbildung 31: SDS-PAGE von affinitätschromatographisch gereinigtem Cph1 und die Deletionen M1-E323 und T17-E323 nach Zinkfluoreszenz und Coomassiefärbung. Die Molekulargewichte (kDa) der Chromopeptide sind mit Pfeilen auf der linken Seite gezeigt.

Die Absorptionwerte bei Cph1:T17-E323 waren viel niedriger als bei Cph1:M1-E323. Das Differenzspektrum zeigte eine starke Absorptionsabnahme der Pfr-Form im Vergleich zur Pr-Form. Das Pr/Pfr-Verhältnis des Cph1:T17-E323 entspricht nicht dem des V8-verdauten Cph1, allerdings wurde in beiden Fällen eine Pfr-Abnahme detektiert. Die

Deletion der ersten 16 Aminosäuren resultiert in einer deutlichen Änderung bei den Assemblierungs- und Photokonversionswerten.

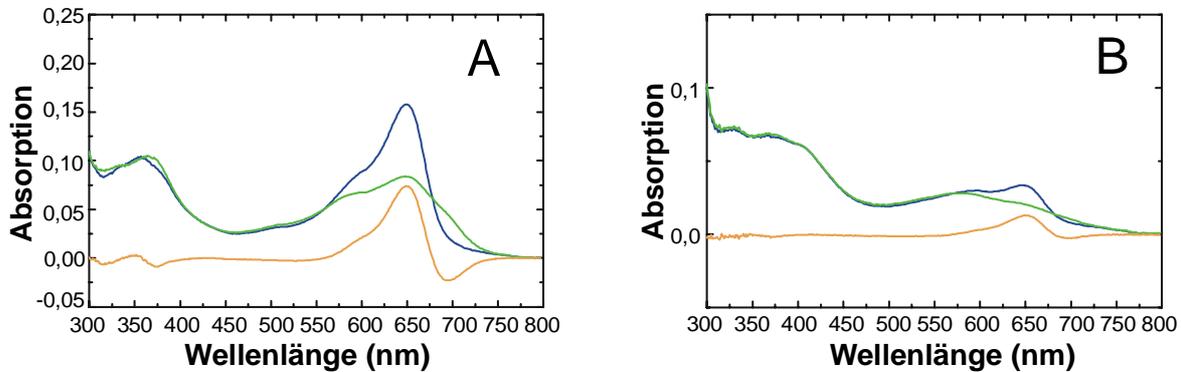


Abbildung 32: Spektrale Eigenschaften der Chromopeptiddeletionen M1-E323 (A) und T17-E323 (B) aus Cph1. Die Spektren wurden nach vollständiger Assemblierung mit PCB gemessen. Photokonversion und Absorptionsdifferenzen wurden nach gesättigter Hellrotbestrahlung ermittelt.

3.8 Versuche mit dem proteobakteriellen Phytochrom Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens*

Das Genom aus *Agrobacterium tumefaciens* (Goodner et al., 2001; Wood et al., 2001) enthält zwei Gene (GI Nummer: 15889282 und 15889444), die für zwei phytochromhomologe Proteine Agp1 (*Agrobacterium Phytochrom*) und Agp2 codieren. Die Anordnung der Domänen von Agp1 ähnelt der anderer bakterieller Phytochrome Cph1 aus *Synechocystis* PCC 6803 (Lamparter et al., 1997), CphA und CphB aus *Calotrix* sp. PCC7601 (Jorissen et al., 2002b) oder BphP aus *Deinococcus radiodurans* (Davis et al., 1999; Bhoo et al., 2001) (s. 1.1.1.1). Agp2 weicht von dem typischen Schema ab. Es enthält eine Responseregulator-Domäne im C-Terminus (Abb. 44). In pflanzlichen und einigen cyanobakteriellen Phytochromen ist der Chromophor kovalent mit einem konservierten Cystein verbunden. Bei Agp1 und Agp2 befindet sich an der homologen Position ein Valin bzw. Isoleucin (Anhang 5). Das Cystein fehlt auch in manchen cyanobakteriellen (Hübschmann et al., 2001b) und in allen bekannten proteobakteriellen Phytochromen (Bhoo et al., 2001; Jiang et al., 1999). Um das Protein biochemisch zu

charakterisieren, wurde der Agp1-Expressionsvektor kloniert und das Protein in *E.coli* exprimiert (s. 2.6.6.2).

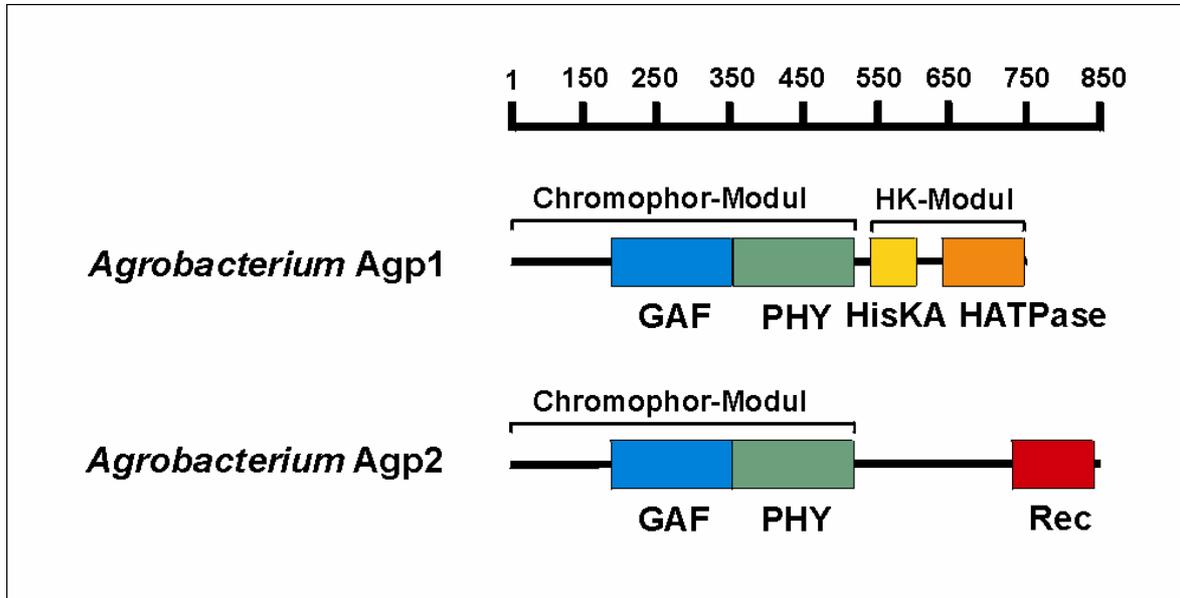


Abbildung 33: Proteindomänen der agrobakteriellen Phytochrome Agp1 und Agp2 gemäß SMART und PFAM Strukturanalyse-Computerprogramm (s. 2.4). Die Domänen sind in Abbildung 1 erläutert.

3.8.1 Reinigung und spektrale Eigenschaften

Die Reinigung von Agp1 erfolgte wie bei Cph1. Man erhielt etwa 150 mg pro Liter Bakterienkultur lösliches Protein. Analytische GFC mit gereinigtem Apo- und Holoprotein zeigte Signale im Molekulargewichtsbereich der Dimere.

3.8.1.1 Assemblierung *in vitro*

Die Assemblierung der Chromophore PCB, PEB und BV mit dem Apoprotein wurde getestet. In allen Fällen wurden spektrale Messungen vor und nach Zugabe von Chromophor zum gereinigten Apoprotein durchgeführt. Bei der Assemblierung mit BV wurde eine schnelle spektrale Änderung innerhalb 1min nach dem Mischen festgestellt (Abb. 45). Danach gab es keine weiteren Änderungen (s. [20 min]-[1 min] Differenzspektren). Vergleichbare schnelle spektrale Änderungen, denen noch geringe Veränderungen folgten, wurden bei der Assemblierung mit PCB beobachtet. Mit PEB wurden ungewöhnliche spektrale Profile mit zwei Peaks bei 560 und 611 nm erhalten. Die Absorption um 600 nm nahm während der folgenden Stunden ab. Bei ca. 550 nm erfolgte

eine Zunahme der Absorption. Das Assemblierungsmuster von Agp1 war insofern sehr verschieden von Cph1 (s. 3.1.1). Die Absorptionsmaxima des PCB-Agp1 bei der Pr- und Pfr-Form waren etwa 16 nm nach rot verschoben.

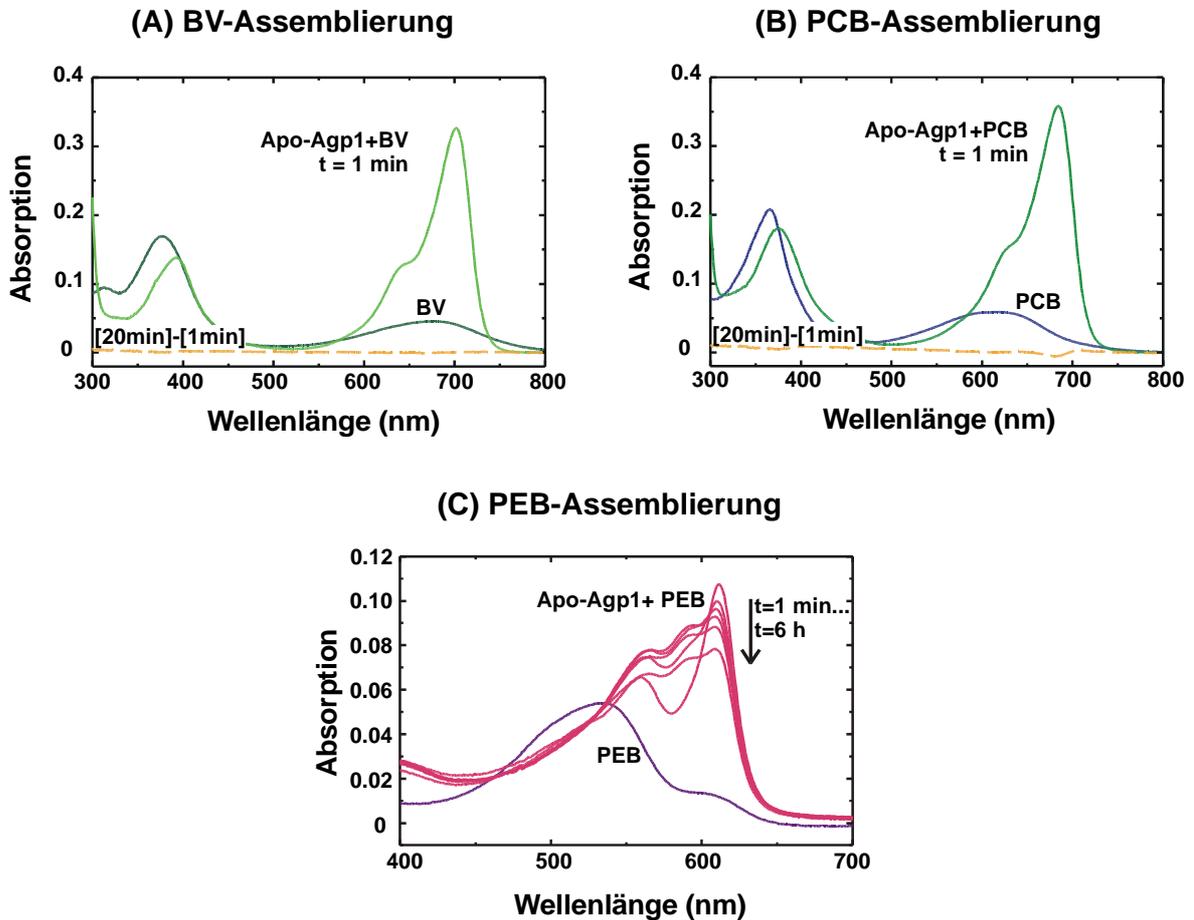


Abbildung 34: Spektrale Veränderungen von Agp1 während der Assemblierung mit den Chromophoren BV (A), PCB (B) und PEB (C). Unmittelbar nach dem Mischen mit BV und PCB gab es nur noch geringfügige spektrale Änderungen. Die Veränderungen sind durch das Differenzspektrum [20min]-[1min] dargestellt.

Das PEB-Addukt zeigte zwei Absorptionsmaxima bei 560 und 611 nm, während das Maximum des PEB-Cph1 Addukts bei 579 nm lag (s. 3.1.1 und Anh. 2). Das Absorptionsmaximum des BV-Adduktes von Agp1 war im Vergleich zu dem des PCB-Adduktes noch weiter nach Rot verschoben. Ähnliche spektrale Verschiebungen wurde auch bei anderen bakteriellen Phytochromen wie *Deinococcus* BphP (Davis et al., 1999) oder *Calothrix* CphB (Jorissen et al., 2002b) gefunden. Die BV- und PCB-Addukte waren

photoaktiv (Abb. 46). Das PEB-Addukt wurde durch Bestrahlung nicht verändert, was mit den PEB-Addukten anderer Phytochrome (Li et al., 1995) übereinstimmt.

Chromophor	Pr-Absorptionsmaximum nm	Differenzspektrum, Pr-Maximum nm	Differenzspektrum, Pfr-Maximum Nm
BV	701	701	750
PCB	686	684	733
PEB	560	-	-

Tabelle 5: Absorptionsmaxima der BV-, PCB- und PEB-Addukte nach vollständiger Assemblierung. BV- und PCB-Agp1 wurden auch nach Behandlung mit DTNB gemessen.

3.8.1.2 Photokonversionsverhältnis und Dunkelreversion

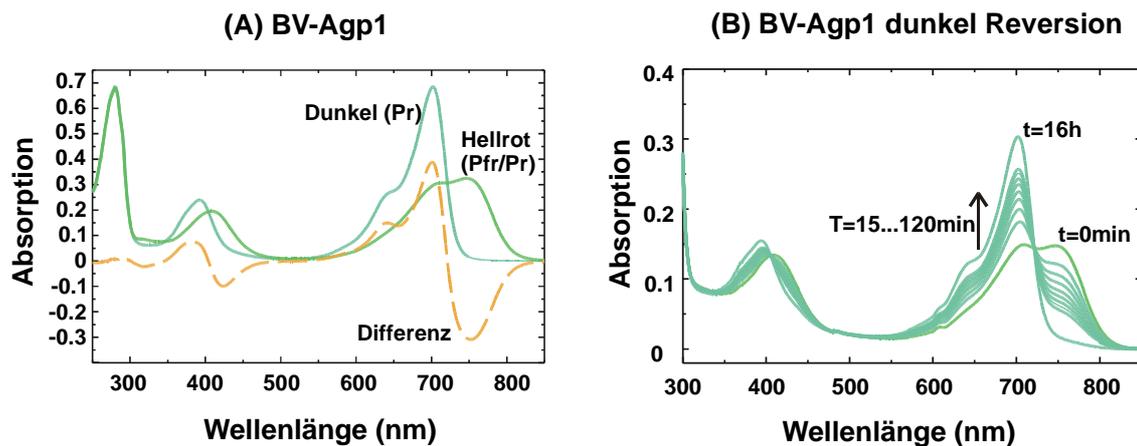


Abbildung 35: Spektrale Messungen des BV-Agp1-Addukts. (A) Spektrum nach Inkubation im Dunkeln, sowie nach Hellrotbestrahlung, Differenzspektrum. Mit BV-assembliertes Agp1 wurde vor der Messung über SEC gereinigt. (B) Dunkelreversion von BV-Agp1 nach Hellrotbestrahlung. Die Spektren wurden in Abständen von 15 min, bis zu 120 min gemessen. Das letzte Spektrum wurde nach 16 h gemessen.

Der Photokonversionsprozess von Pr zur Pfr verläuft mit einer ähnlichen Effizienz wie bei anderen Phytochromen, während die Pfr-Pr-Photokonversion ineffizient war und lange Bestrahlungszeiten erforderte. Im Gegensatz zu Cph1 ist die Pfr-Form von Agp1 instabil und konvertiert in Dunkeln zurück zu Pr (Abb. 46).

3.8.2 Bindung des Chromophors

Die kovalente Bindung des Chromophors an Phytochrom scheint nicht eine *Conditione sine qua non* zu sein, um volle spektrale Aktivität zu sehen, wie für CphB publiziert wurde (Jorissen et al., 2002b). Agp1 Apoprotein wurde mit BV, PCB oder PEB assembliert, um zu testen, ob die Chromophore kovalent mit dem Protein verknüpft sind (Abb. 45). Für die Untersuchung wurde SDS-PAGE und zinkinduzierte Fluoreszenzmessung durchgeführt (Berkelman und Lagarias, 1986). Nach 1 min Assemblierung wurde bei dem PCB-Addukt keine Zinkfluoreszenz detektiert, während das BV-Addukt deutlich fluoreszierte (Abb. 47). Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde ein schwaches Signal bei PCB-Agp1 detektiert, während das Signal von BV-Agp1 unverändert war.

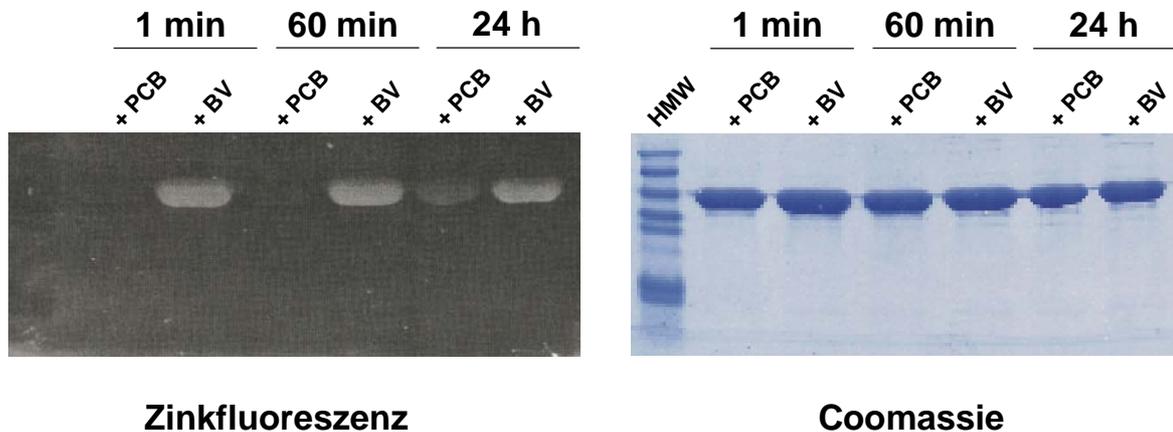


Abbildung 36: Zinkfluorezenz und Coomassie nach der Assemblierung des Apoproteins Agp1 mit den Bilinen BV und PCB. Apo-Agp1 (1 mg/ ml) wurde mit BV oder PCB (4 μ M) assembliert und nach verschiedenen Inkubationszeiten bei RT aufgetragen.

Um den Anteil gebundenen Chromophors besser zu quantifizieren, wurde von anderen Mitarbeitern eine NAP-5 Säule verwendet (Tabelle 9). Im nativen Zustand (ohne SDS) wurde eine feste Bindung des BV und eine schwache Bindung des PCB festgestellt. PEB war auch schwach gebunden. Nach SDS-Denaturierung war BV noch quantitativ gebunden. Bei PCB und PEB wurde durch SDS der größte Teil des Chromophors von dem Protein entfernt, nur etwa 5 % bzw. 8 % Chromophor blieb am Protein gebunden.

Chromophor	ohne SDS	mit SDS
BV	99 ± 1%	98 ± 1%
PCB	95 ± 3%	5 ± 2%*
PEB	36 ± 2%	8 ± 2%*

Tabelle 6: Apo-Agp1 wurde mit dem entsprechenden Chromophor gemischt. Freie Biline wurden mit einer NAP Säule entfernt. Protein-gebundener Chromophor wurde über UV-VIS Spektroskopie quantifiziert. Mittelwerte aus 3 Messungen +- Standardfehler.

Anschließend wurde die Hemmung der Chromophorbinding durch Behandlung mit thiolreaktiven Wirkstoffen getestet (Abb. 48). Die Chromophorbinding kann bei Cph1 durch Jodacetamid (Lamparter et al., 2001) und DTNB blockiert werden. Jodacetamid bindet an Cystein und Histidin (Lottspeich und Zorbas, 1998), DTNB nur an Cystein.

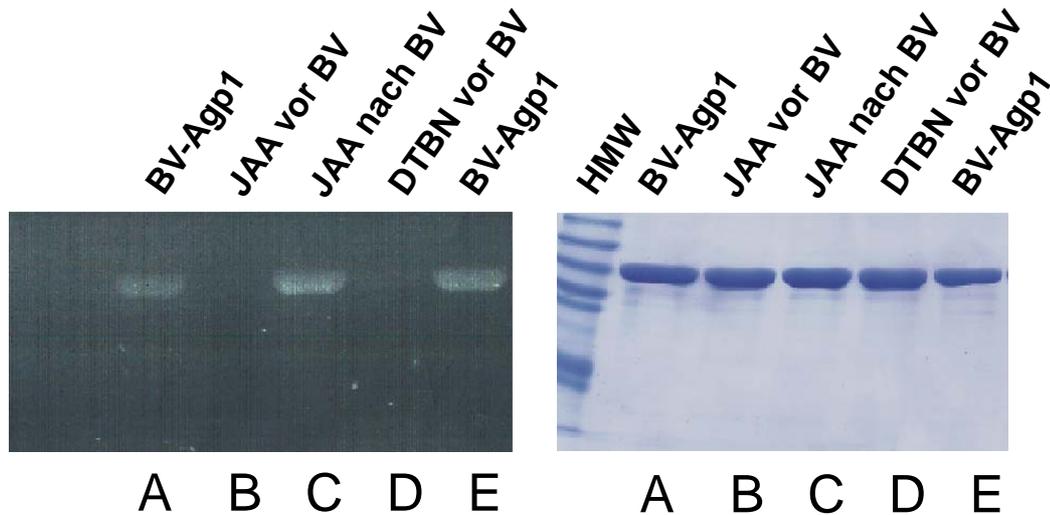


Abbildung 37: Wirkung thiolreaktiver Wirkstoffe auf die BV-Agp1 kovalente Bindung. Den Agp1-enthaltenen Proben wurde JAA (1 mM Endkonzentration) (B und C) oder DTNB (0,2 mM Endkonzentration) (D) vor (B und D) oder nach (C) Assemblierung des Proteins mit BV zugegeben. Als Kontrolle wurden BV-Agp1 (A und E) verwendet.

Agp1 Apoprotein wurde mit JAA und DTNB inkubiert und anschließend mit dem Chromophor BV gemischt. Dieses Addukt war photoreversibel und ähnelte spektral der Kontrolle ohne Hemmstoff. Im Unterschied zur Kontrolle hatte das Addukt ein geringeres Pfr/Pr-Absorptionsverhältnis und eine Verschiebung des Pfr-Maximums in den blauen

Bereich (Abb. 49). Die spektralen Eigenschaften des PCB-Adduktes wurde durch eine Vorbehandlung nicht verändert. Die Blockierungsversuche zeigten, dass ein Cysteinrest für die kovalente Verknüpfung von BV notwendig ist.

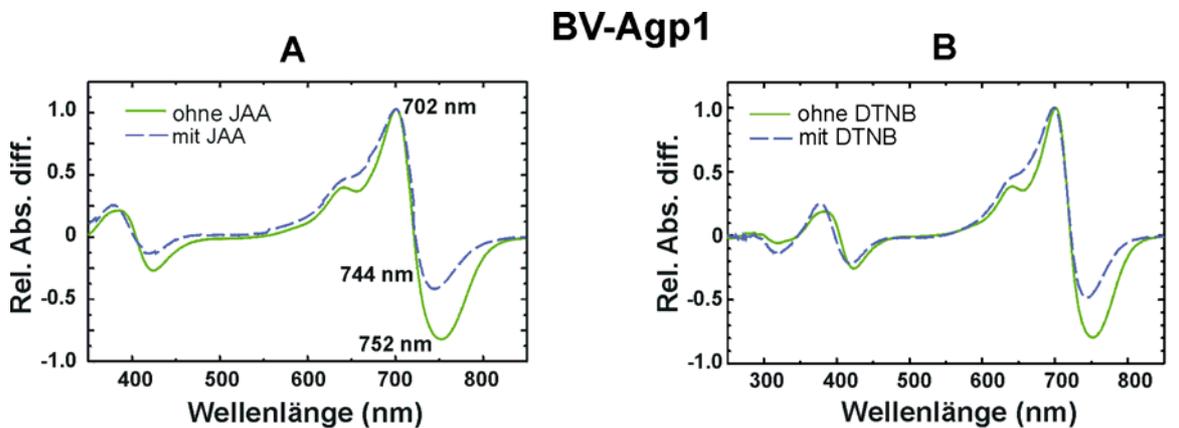


Abbildung 38: Pr-Pfr Differenzspektren von BV-Agp1 oder nach Behandlung, vor Chromophor Zugabe, mit JAA (A) bzw. DTNB (B).

3.8.3 Phosphorylierung

Lichtregulierte Histidinautophosphorylierung wurde für verschiedene bakterielle Phytochrome nachgewiesen (Hübschmann et al., 2001b; Yeh et al., 1997; Bhoo et al., 2001; Lamparter et al., 2001). Aufgrund der Sequenzhomologie ist anzunehmen, dass Agp1 ebenfalls Histidinkinase-Aktivität zeigt.

3.8.3.1 Autophosphorylierung des Apoproteins und des Phycocyanobilinadduktes

Die Kinetik der Phosphorylierung wurde mit PCB-Agp1 ermittelt. Wie bei den cyanobakteriellen Phytochromen (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Hübschmann et al., 2001b) und im Gegenteil zu *Pseudomonas* BphP (Bhoo et al., 2001) war die Phosphorylierung der Pr-Form stärker. Für Pr war die Phosphorylierung nach 7 min bereits saturiert. Das Signal der hellrotbestrahlten Probe war schwächer, nahm aber während der folgenden 30 min kontinuierlich zu. Diese Zunahme lässt sich über Dunkelreversion erklären. Außerdem nahm Apo-Agp1 mehr Phosphat als Holo-Agp1-auf. Durch die Integration des Chromophors wird offenbar die Phosphorylierung inhibiert und diese Inhibition wird durch die Photokonversion zu Pfr verstärkt. Histidinkinasen wirken immer

als Dimere. Die ATPase einer Monomeruntereinheit phosphoryliert das Substrat der anderen. Die Inhibition der Phosphorylierung durch die Aufnahme des Chromophors und die Photokonversion könnte durch die Verbreiterung der Distanz zwischen beiden Einheiten erklärt werden.

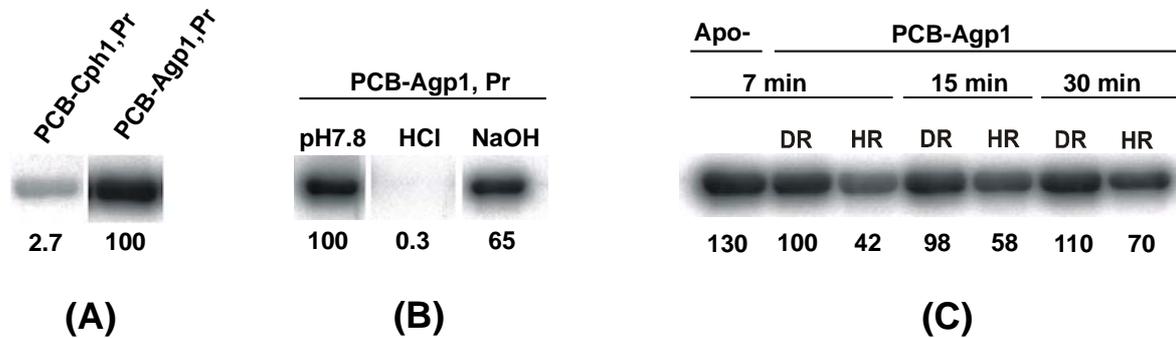


Abbildung 39: Autoradiogramme nach $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Markierung, SDS-PAGE Elektrophorese und *Blotting*. Unter den Banden ist die relative Intensität in % angegeben. (A) PCB-Cph1-Pr in Vergleich zum PCB-Agp1-Pr. Die Proben wurden nach gesättigter Dunkelrot- oder Hellrotbestrahlung 30 min mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert. Auftrag 5 μg . (B) PCB-Agp1-Pr- Blottmembranestücke nach 2 Stunden Behandlung mit 1M HCl, 2M NaOH. Die mit Basispuffer (pH 7.8) behandelte Probe diente als Kontrolle. (C) Apo- und PCB- Agp1 Vergleich. Die Proben wurden mit 730 nm (Pr) oder 645 nm (Pfr) Leuchtdioden bestrahlt und für 7, 15 oder 30 min mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert.

Insgesamt war die Phosphorylierung von PCB-Agp1 effizienter als die von Cph1. PCB-Agp1 baut ungefähr 30 mal mehr Phosphat ein als Cph1 (Abb. 50). Phosphoryliertes PCB-Agp1 wurde nach *Blotting* in Säure und Alkali inkubiert (Abb. 50, B). Die Säurebehandlung verursachte einen Verlust des Phosphats, die Alkalibehandlung nicht. Im Gegensatz zu Serinphosphat ist Histidinphosphat in saurer Lösung instabil (Stock et al., 2000). Dadurch lässt sich eine Phosphorylierung an Histidin nachweisen.

3.8.3.2 Autophosphorylierung des Biliverdinaddukts und Transphosphorylierung des Responsregulator Rap1 aus *Agrobacterium tumefaciens*

BV ist der natürliche Chromophor von Agp1 (Lamparter et al., 2002). Wie bei dem PCB-Addukt wurde die Phosphorylierung des BV-Addukts durchgeführt (Karniol und

Vierstra, 2003). Wie in anderen Bakterien (Yeh et al., 1997; Bhoo et al., 2001) wird Agp1 innerhalb eines Operons kodiert, welches ein Responsregulatorgen enthält. (Abb. 51).

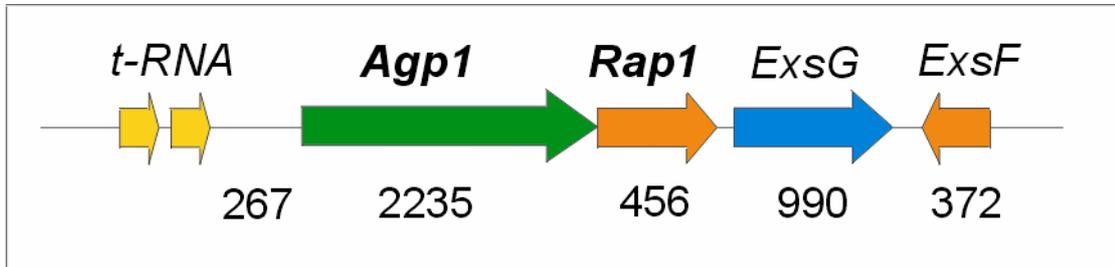


Abbildung 40: Struktur des Agp1-Operons. Die Zahlen zeigen die Größe der ORFs in bp. Rap1 hat die Genbank accession number NP_532668.

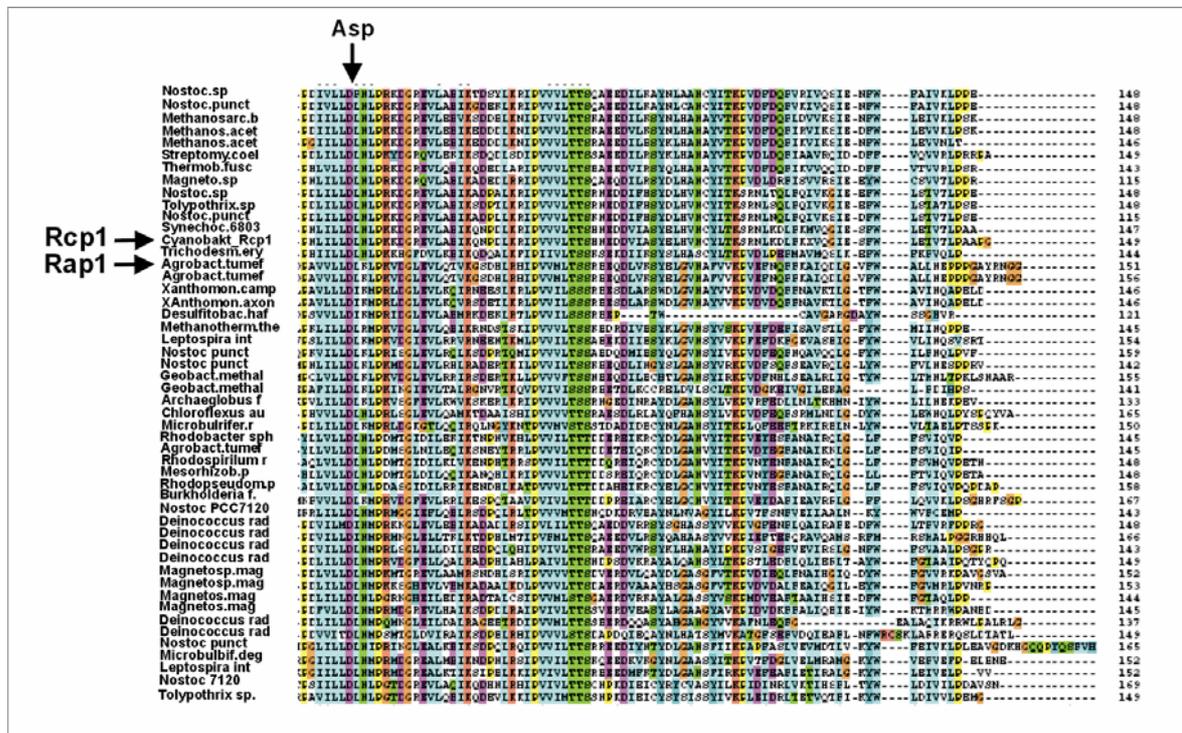


Abbildung 41: Sequenzvergleich (Alignment) mit bakteriellen Responsregulatoren. Das hoch konservierte Aspartat ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

Hinter der für Agp1 kodierenden Region befindet sich ein Gen für einen Responsregulator mit 151 Aminosäuren. Dieses Protein wird hier mit Rap1 (Responsregulator Agro**a**cterium Phytochrom 1) bezeichnet. Es weist hohe Homologie mit den bakteriellen Responsregulatoren der CheY-Familie auf und besitzt das hoch konservierte Aspartat (Asp⁶⁶), welches in die Übertragung des Phosphats involviert ist (Abb. 52). Apo-Agp1 und BV-Addukte wurden mit und ohne Rap1 phosphoryliert (Abb.

53). Das Pr/Pfr-Muster der BV-Agp1-Phosphorylierung war ähnlich wie bei PCB-Agp1. Rap1 wurde sehr stark phosphoryliert. Der Phosphotransfer von Phytochrom zum Responsregulator war für Apo- und BV-Agp1-Pr besonders stark. Rap1 wurde auch von BV-Agp1-Pfr phosphoryliert, allerdings nicht so effizient wie von Apo- oder BV-Agp1-Pr.

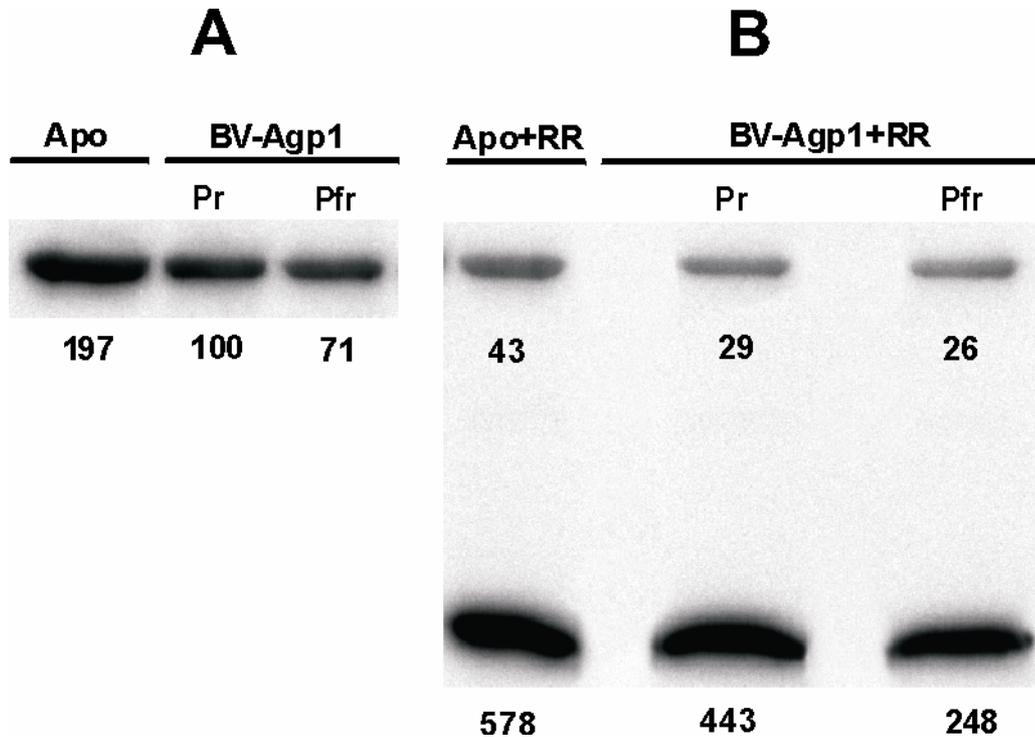


Abbildung 42: Autoradiogramme nach $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Markierung, SDS-PAGE Elektrophorese und *Blotting*. Die relativen Intensitäten in % sind unter den Banden angegeben. (A) Vergleich zwischen Apo-Agp1 und BV-Addukten (7 μg). Alle Proben wurden nach Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ für 30 min im Dunkeln inkubiert, „Pfr“ wurde vor der Inkubation mit Rotlicht bestrahlt. (B) Die gleiche Probe wie in (A) nach Zugabe von Responsregulator Rap1 (7 μg).

3.8.4 Phosphorylierung von ExsF

Außer Rap1 wurde ein zweiter Responsregulator, ExsF, und eine Sensorkinase, ExsG, in entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Die ersten Versuche wurden nur mit ExsF und Rap1 durchgeführt, da ExsG nicht richtig gereinigt werden konnte. Die Phosphorylierung des Agp1-PCB-Pr war, wie erwartet (s. 3.8.3.1), stärker als die von Agp1-PCB-Pfr. Rap1 und ExsF wurden unter beiden Lichtbehandlungen phosphoryliert, wobei in der Agp1-Pr-Form die Phosphorylierung stärker war (Abb. 55). ExsF zeigte eine

sehr schwache Phosphorylierung. Die Kontrollen ohne Agp1 wurden kaum phosphoryliert. Das zeigt, dass die Phosphorylierung durch Phytochrom katalysiert wird.

Eine Zwei-Komponenten Sensor kinase VirA phosphoryliert einen Responsregulator VirG, welcher alle *vir*-Promotoren, inklusiv der eigenen *virG*- und *virA*-Promotoren auf dem Ti-Plasmid des *Agrobacterium* reguliert. Diese Gene kontrollieren den Infektionsprozess des *Agrobacterium* in Pflanzen. Das gen *virG* wurde ebenfalls in einen Expressionsvektor kloniert, um die vermutete Signaltransduktion von Phytochrom zu Infektionsproteinen zu untersuchen.

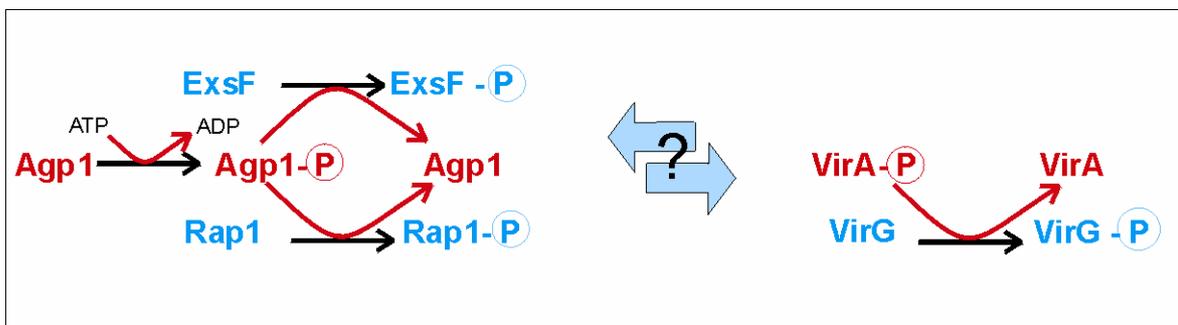


Abbildung 43: Mögliche Signaltransduktionskaskade. Agp1 und Rap1 bilden in *Agrobacterium* ein Zweikomponenten Signaltransduktionsystem, welche weitere Proteine phosphorylieren können. Agp1 phosphoryliert auch den Responsregulator ExsF. Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen Agp1 und dem VirA/VirG Zweikomponenten-System.

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden Agp1, Rap1, ExsF, ExsG und VirG gereinigt. Die Proteinreinigung von ExsG und VirG erwies sich als schwierig. Es wurde eine niedrige Expression und eine starke Aggregation festgestellt, welche mit neuen Konstrukten verbessert wurde. Weitere Versuche mit ExsG und VirG sind notwendig, um eine Signaltransduktion des Agp1 über die Infektionsproteine besser verstehen zu können. Ein physiologischer Effekt in pflanzlichen Zellen durch die Wirkung des agrobakteriellen Agp1 kann durch Autophosphorylierungsversuche mit den oben genannten Proteinen untersucht werden.

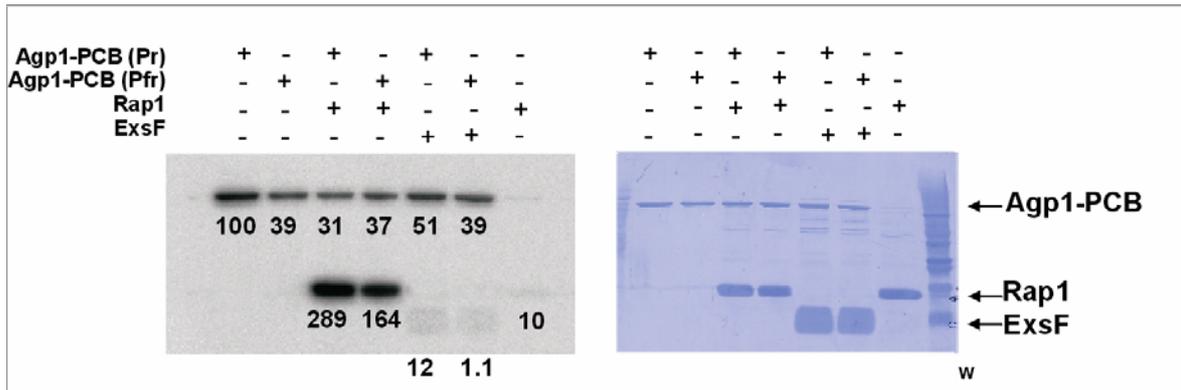


Abbildung 44: Autoradiogramm nach $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Markierung, SDS-PAGE Elektrophorese und *Blotting*. Die relative Intensität (%) ist unter den Banden angegeben. Agp1-PCB (5 μg) wurde nach Assemblierung im Dunkeln und/oder Hellrotbestrahlung mit Rap1 oder ExsF gemischt und 30 min mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ inkubiert.

