

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Phytochrom in Eukaryonten

Als erster Photorezeptor in Pflanzen wurde ein photoreversibles Pigment entdeckt (Butler et al., 1959), welches Phytochrom genannt wurde (Butler et al., 1960). Die ersten Hinweise auf ein Photorezeptor-System mit speziellen Eigenschaften kann man schon 1920 bei der Arbeit von Garner *et al.*, finden. Dort wurde die Induktion der Blütenbildung und Detektion der Photoperiode untersucht (Garner und Allard, 1920). Die Beteiligung eines Pigmentes wurde 1952 bei der Arbeit von Borthwick *et al.*, in der hellrot/ dunkelrot reversible Reaktionen der Samenkeimung (Borthwick et al., 1952b) und Blütenbildung (Borthwick et al., 1952a) beschrieben. Später wurde Phytochrom auch in niedrigen Pflanzen und in Algen (Kolukisaoglu et al., 1995; Lagarias et al., 1995) entdeckt. Der Photozyklus von Phytochrom hat zwei photokonvertierbare, thermostabile Formen, eine hellrotlichtabsorbierende- (Pr) und dunkelrotlichtabsorbierende Form (Pfr). Die Pr-Pfr-Photokonversion wird durch eine Z-E-Isomerisierung um die Doppelbindung zwischen den Ringen 3 und 4 des Tetrapyrrolchromophors eingeleitet (Rüdiger und Thümmler, 1994).

### 1.1.1 Molekulare Eigenschaften

Pflanzliche Phytochrome sind Homodimere, die kovalent die Biline Phytochromobilin (PΦB) (Rüdiger und Thümmler, 1994) oder Phycocyanobilin (PCB) (Wu et al., 1997) durch ein Thioether an ein konserviertes Cystein binden können. Das Chromopeptid besteht aus zwei Domänen: eine eher globuläre N-Terminus-Domäne, die die Tetrapyrrole bindet, und eine eher gestreckte C-Terminus-Domäne, die durch eine flexible Region mit dem N-Terminus verbunden ist (Quail, 1997; Wagner et al., 1996). Innerhalb der N-Terminushälfte befinden sich eine hoch konservierte GAF-Domäne, die zuerst bei anderen Proteinen identifiziert wurde (Aravind und Ponting, 1997), und das Chromophor bindende Cystein enthält, und eine PHY-Domäne, die den Chromophor in der Pfr-Form stabilisieren kann (Wu und Lagarias, 2000) (Abbildung 1). Der C-Terminus hat zwei PAS Domänen (Lagarias et al., 1995; Kay, 1997), die auch bei anderen prokaryotischen und eukaryotischen regulatorischen Proteinen gefunden wurden (Taylor und Zhulin, 1999), welche in eine Protein-Protein Interaktion bzw. eine Interdomäneverbindung involviert sind (Zhulin et al., 1997; Kay, 1997; Jones und Edgerton, 1994), und eine Histidinkinase-

*related*-Domäne (HKRD). Diese ähnelt der Histidin-Kinase-Domäne aus bakteriellen „zwei-Komponenten“ (*two-component sensor*) Proteinen (Schneider-Poetsch et al., 1991; D'Agostino und Kieber, 1999).

### 1.1.1.1 Domänen

Auf der Proteinsequenz eukaryotischer Phytochrome sind fünf wichtige Subdomänen, die auch bei einem breite Spektrum von Organismen gefunden wurden, zu erkennen. Mit höchster Homologie ist eine GAF-Domäne am N-Terminus zu sehen. GAF-Domäne bestehen aus etwa 150 Aminosäuren, die in vielen Signalmolekülen gefunden wurden (Aravind und Ponting, 1997). Bei Pflanzen repräsentieren die GAF-Domänen eine spezifische Bilinlyase Subfamilie (Wu und Lagarias, 2000). Kristallstrukturanalysen einer GAF-Domäne eines Proteins aus Hefe YLK9 (Ho et al., 2000) zeigen auffallende Ähnlichkeiten zu PAS-Domänen.

Noch auf dem N-Terminus und anliegend zum GAF-Domäne gibt es in der PFAM-Database eine PHY-Domäne. Als Funktion dieser Domäne wurde eine Stabilisierung des Chromophors bei Pfr-Konformation durch direkten Kontakt mit dem Ring D des Bilins, vorgeschlagen (Wu und Lagarias, 2000).

Weiter C-terminal gibt es zwei PAS-Domänen (PER-ARNT-SIM Domäne) (Lagarias et al., 1995; Kay, 1997). PAS Domänen wurden ursprünglich auf verschiedenen bHLH enthaltenen Transkriptionsfaktoren gefunden (Huang et al., 1993). PAS-Domänen binden kleine Ligand-Moleküle wie Flavine, Häme und planare aromatische Komponenten oder spielen eine wichtige Rolle bei der Protein-Protein Interaktion, dem Response von kleineren Liganden und dem Wechsel von Lichtbedingungen, Sauerstoffmenge und Redoxpotential (Taylor und Zhulin, 1999). Die Struktur von vier PAS-Domänen (PYP von *Ectothiorhodospira halophila*; Sauerstoffsensor FixL von *Bradyrhizobium japonicum*; cytosolische Domäne des Menschen HERG Kalium-Kanal und eine Flavinbindedomäne des Phototropins Photorezeptor von *Arabidopsis*) wurde publiziert (Borgstahl et al., 1995; Gong et al., 1998; Cabral und et al, 1998; Crosson und Moffat, 2001). Alle Publikationen zeigen die gleiche Anordnung von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt mit einem zentralen antiparallelen 5 strängigen  $\beta$ -Faltblatt, das einen aromatischen Liganden enthalten kann. Verschiedene Mutationen in dieser Region zeigen, dass vollständige PAS-Domänen für das Phytochrom-Signal entscheidend sind (Quail et al., 1995).

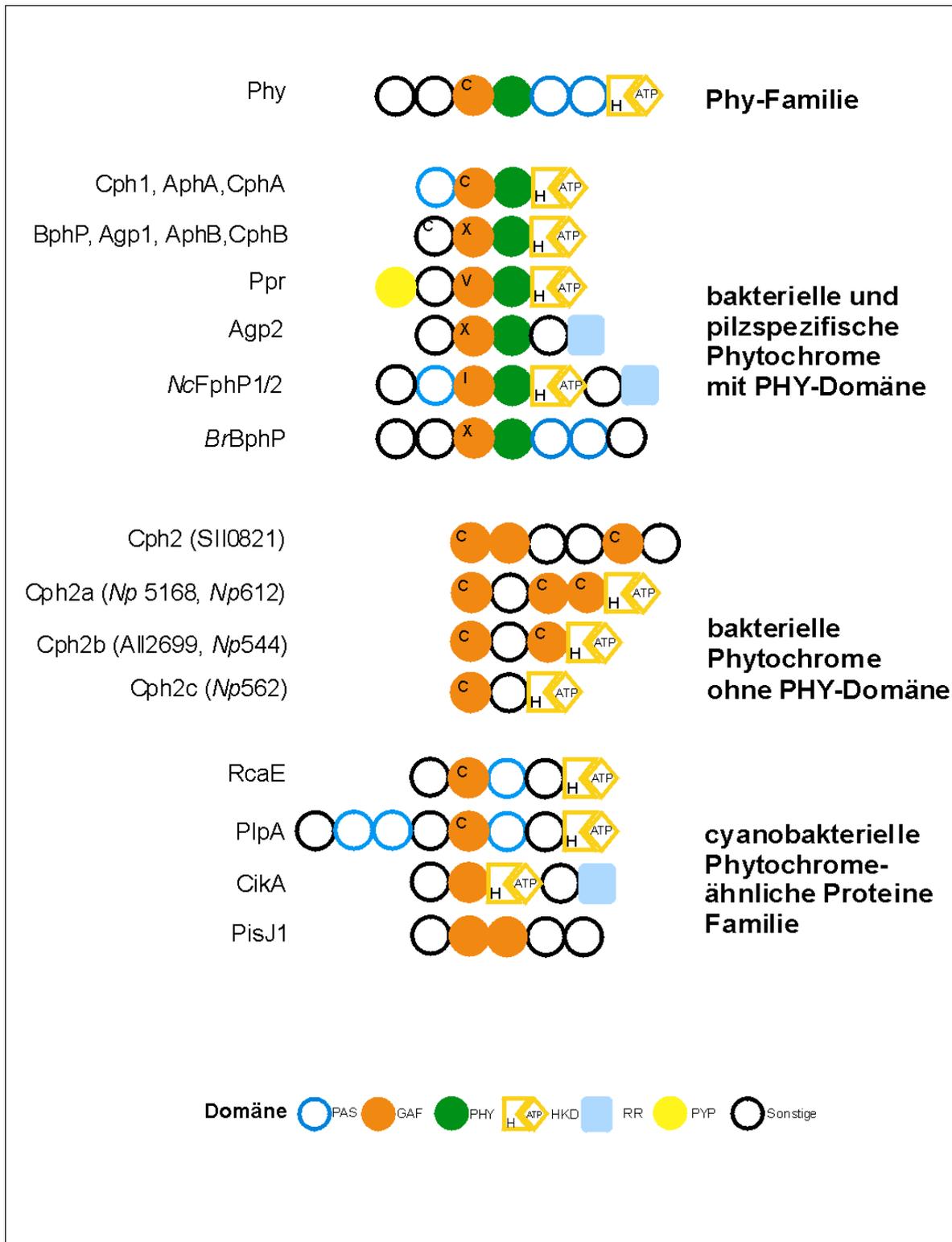


Abbildung 1: Domänen-Anordnung bei Phytochrom und Phytochrom-like proteins; Abbildung nach Montgomery und Lagarias, (2002) modifiziert. Die mögliche oder bekannte Chromophorbindungsstelle wurde mit C (Cystein) oder X-Bindestelle (verschiedene Aminosäurereste) genannt. V (Valin) und I (Isoleucin) zeigen andere Aminosäure an der Stelle

eines konserviertem Cysteins. H wird für Histidinreste an der Histidinkinasedomäne verwendet.

Abkürzungen: GAF-Domäne, aus GMPC-spezifische Phosphodiesterase, cyanobakterielle Adenylatcyklase und Formatelyase Transkriptionsaktivator FhlA; HKD, Histidinkinasedomäne; PAS-Domäne, PER-ARNT-SIM-Domäne; PHY-Domäne, Phytochromdomäne; RR-Domäne, Responsregulatordomäne; PYP-Domäne, Photoaktive Yellow Protein-Domäne. Die Namen der Proteine entsprechen folgenden Organismen: *Agrobacterium tumefaciens* (Agp1, Agp2) *Anabaena* sp. PCC7120 (AphA-B, All2699), *Bradyrhizobium* ORS278 (*BrBphP*), *Calothrix* sp. PCC7601 (CphA, CphB), *Deinococcus radiodurans* (BphP), *Fremyella displosiphon* (RcaE), *Neurospora crassa* (NcFphP1-2), *Nostoc punctiforme* (*Np-X*), *Rhodospseudomonas palustris* (*RpBphP*), *Rhodospirillum centenum* (Ppr), *Synechococcus elongatus* (CikA), *Synechocystis* sp. PCC6803 (Cph1, Cph2, PlpA, PisJ1).

Montgomery *et al.* spekulieren, dass PAS mit einem zurzeit unbekanntem kleinen Molekül interagieren könnte (Montgomery und Lagarias, 2002). Allgemein scheinen PAS und GAF-Domänen Regionen für die allosterische Regulation verbundener katalytischer Domänen zu sein (Aravind und Ponting, 1997; Taylor und Zhulin, 1999).

Das Ende des C-Terminus pflanzlicher Phytochrome ähnelt der Transmitter Domäne von Zwei-Komponenten-Histidinkinasen. Diese Domäne (HKRD) wurde als Histidinkinasedomäne erkannt, obwohl das konservierte Histidin fehlt (Schneider-Poetsch *et al.*, 1991). Yeh *et al.* stellen die eukaryotischen Phytochrome als Serin / Threoninkinasen mit einer Histidinkinase-Abstammung vor, die eine stärkere Phosphorylierung in der hellrot absorbierenden Form (Pfr) zeigt (Yeh und Lagarias, 1998).

### 1.1.1.2 Interagierende Faktoren

Für das Verständnis der molekularen Wirkungsweise ist die intramolekuläre Lokalisierung des Photorezeptors wie auch die Interaktion mit anderen Faktoren wichtig. (Smith, 1970; Sage, 1992; Kendrick und Kronenberg, 1994). In dem Sinne wurden genetische Untersuchungen durch chimärische Fusion von Phytochrom mit GUS ( $\beta$ -Glukuronidase) oder GFP durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass im Dunkeln Phytochrom im Cytoplasma akkumuliert. Nach Konversion zu Pfr wandert es zum Teil in den Zellkern (Sakamoto und Nagatani, 1996; Kircher *et al.*, 1999; Yamaguchi *et al.*, 1999; Nagy und Schäfer, 2000; Kim *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2000). Quail schlägt vor, dass die aktive Form des Photorezeptors im Nukleus durch die Regulierung der Genexpression wirken könnte (Quail, 2000). Durch Screening von pflanzlicher cDNA aus *Arabidopsis*

*thaliana* mit dem *yeast two-hybrid system* wurden drei Phytochrom interagierende Proteine *phytochrome-interacting factor 3* (PIF3) (Ni et al., 1998), ein *phytochrome kinase substrate* (PKS1) (Fankhauser et al., 1999) und eine *nucleoside diphosphate kinase 2* (NDPK2) (Choi et al., 1999) entdeckt. PIF3 ist ein im Nukleus lokalisiertes bHLH-Transkriptionsfaktor-Protein, das sowohl mit PhyA als auch mit PhyB interagiert. Dieses Protein enthält ein klassisches Kerntranslokations-Signal, eine Homologie zu DNA-Bindedomänen sowie einer Dimerisierungsdomäne. Wie andere bHLH-Proteine bindet PIF3 an eine bekannte CANNTG Consensussequenz (Littlewood und Evan, 1998). *In vitro* Versuche zeigen, dass PIF3 den Photorezeptor PhyB in der Pfr-Form binden kann. Nach der Photokonversion von Phytochrom zur Pr-Form trennt sich PIF3 vom Photorezeptor (Ni et al., 1999). Bei PhyA ist die Affinität zu PIF3 deutlich niedriger als bei PhyB (Quail, 2000). Die neuesten Publikationen zeigen eine direkte Bindung von PhyB-PIF3 an bestimmte Promotoren von Licht regulierten Genen (Martinez-Garcia et al., 2000), die einen direkten Transfer vom Lichtsignal zu den Promotoren der lichtregulierten Gene präsentieren.

Ein zweiter isolierter, interagierender Faktor PKS1 ist ein cytosolisches Protein, das ein Phosphat von PhyA annehmen kann (Fankhauser et al., 1999). PKS1 bindet am C-Terminus von PhyA und PhyB. Die Phosphorylierung des PKS1 *in vivo* durch Hellrotlicht könnte der Hinweis auf eine Kinasewirkung von PhyA und PhyB sein. Überexprimiertes PKS1 inhibiert das Phytochrom Signal.

Ein weiterer Interaktionspartner, NDPK2 (= NDPKIa), wurde in Cytosol und Nukleus lokalisiert (Choi et al., 1999; Zimmermann et al., 1999). Die NDPK2 Aktivität steigt, wenn das Peptid mit der PhyA-Pfr Form interagiert. Das Hellrotlicht stimuliert die NDPK2 Phosphorylierung *in vivo*, was andeutet, dass das Peptid ein Substrat für Phytochromkinaseaktivität wäre (Hamada et al., 1996; Tanaka et al., 1998; Ogura et al., 1999). Die Wirkungsweise dieses Faktors ist zur Zeit in Pflanzen unbekannt, obwohl das Protein bei anderen Modellsystemen in verschiedene Entwicklungsprozesse involviert ist (Tanaka et al., 1998; Choi et al., 1999). In Abbildung 2 sind die verschiedenen Interaktionen mit den zur Zeit bekannten interagierenden Faktoren gezeigt.

Außerdem wurden Hinweise für eine Interaktion zwischen PhyA und den Blaulichtphotorezeptoren Cryptochrom 1 (CRY1) und 2 (CRY2) gefunden (Ahmad et al., 1998c). Die Photoaktivierung des Phytochroms könnte die Phosphorylierung bzw. die Wirkung von CRY1 *in vivo* stimulieren (Ahmad et al., 1998c). Da die Phytochrome A und

B (Sakamoto und Nagatani, 1996; Kircher et al., 1999; Yamaguchi et al., 1999; Nagy und Schäfer, 2000; Hisada et al., 2000) und die Cryptochrome (Cashmore et al., 1999; Guo et al., 1999) im Nukleus lokalisiert sein können, existiert die Möglichkeit für eine direkte Interaktion zwischen beiden Photorezeptoren.

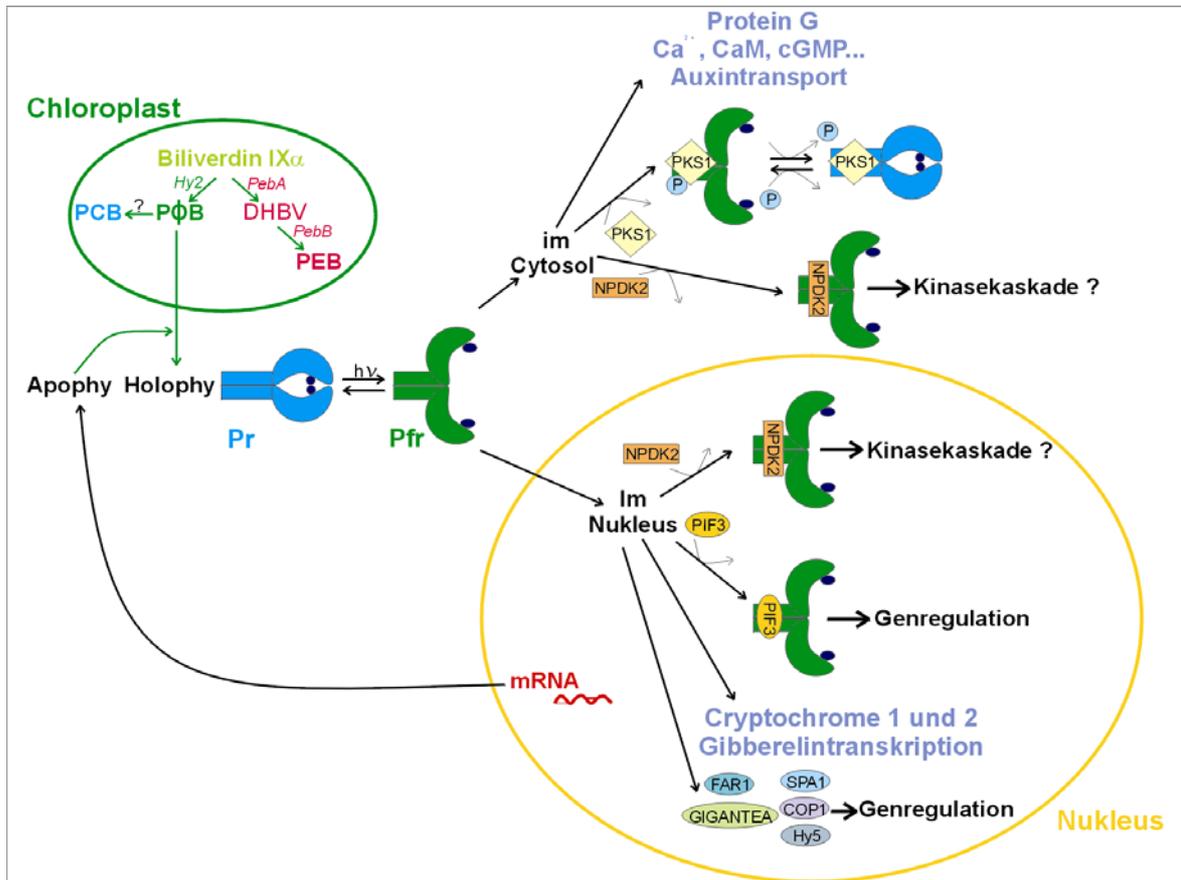


Abbildung 2: Muss heißen G-Protein, Ca<sup>2+</sup>, Gibberellin Synthese und Wirkung der eukaryotischen Phytochromfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Der Chromophor wird in den Chloroplasten synthetisiert und im Cytosol mit dem Apoprotein assembliert. Das Holoprotein wird in der Pr-Form gebildet, die durch die Absorption von Hellrot in Pfr konvertiert. Diese Photokonversion „öffnet“ durch sterische Änderungen im Chromophorbereich das Holopeptid, um mit weiteren Interaktionspartnern interagieren zu können. Nach der Photokonversion kann das Phytochrom-Pfr in den Nucleus einwandern, in dem weitere Reaktionen stattfinden, die zur Genregulation führen.

Über Mutantenstudien wurden weitere Faktoren gefunden wie GIGANTEA, welches vermutlich mit PHYB interagiert (Huq und Tepperman, 2000), oder SPA1 (Hoecker et al., 1999) und FAR1 (Hudson et al., 1999) als möglicher Regulator der PHYA-Genexpression,

die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen. Über *hy5* Mutanten wurde ein Transkriptionsfaktor identifiziert (Koornneef et al., 1980). HY5 ist ein positiver Regulator der Photomorphogenese und kann die Phytochromtranskription regulieren. (Quail, 2002). Mit HY5 (Osterlund et al., 2000) oder SPA1 (Saijo et al., 2003) interagieren andere Faktoren wie COP1, welcher ein konstitutiver Repressor der Photomorphogenese im Dunkeln ist.

### 1.1.2 Struktur

Konformationsanalysen von pflanzlichem Phytochrom zeigen, dass die Topographie des Chromophors und die Sekundär- und Tertiärstruktur des Phytochroms durch die Apoprotein-Chromophor-Bindung verändert wird (Lagarias und Mercurio, 1985; Singh und Song, 1989; Farrens et al., 1992; Parker et al., 1992; Deforce et al., 1994; Wells et al., 1994; Kneip et al., 1999; Jones und Quail, 1989; Quail, 1997). Andere Studien zeigen, dass sich sowohl die Struktur der C-terminalen (Lagarias und Mercurio, 1985; Grimm et al., 1988; Nakazawa et al., 1993) als auch der N-terminalen Untereinheit durch Photokonversion (Jones und Quail, 1989) verändert. Ein 6 kDa großes,  $\alpha$ -Helix-förmiges Peptid im N-Terminus moduliert die Lage des Chromophors entweder durch direkte Interaktion oder durch eine Wechselwirkung mit anderen Bereichen des Holoпротеins (Vierstra et al., 1987; Song, 1988; Singh und Song, 1989). Im Fall von PhyB gibt es eine zusätzliche 38-Aminosäure-Verlängerung am N-Terminus, die in der Apoprotein-Chromophor Interaktion bzw. dem Interdomänen *crosstalk* mit dem C-Terminus involviert ist (Park et al., 2000a). Im Allgemeinen ist die gesamte N-terminale Domäne des Phytochroms in der Pr-Form exponierter als in der Pfr-Form (Schendel und Rüdiger, 1988; Lapko et al., 1998; Jones et al., 1985). Auf der Peptidebene wurden Unterschiede bei der Darstellung des Tryptophans zwischen Pr und Pfr gefunden (Singh et al., 1988; Singh und Song, 1989; Toyama et al., 1993; Nakazawa und Manabe, 1993). Toyama *et al.* (1993) vermuten, dass das Trp<sup>365</sup> mit dem Chromophor bei der Pr-Form stark interagieren könnte. Dieses Tryptophan würde einen Teil einer hydrophoben Umgebung im Protein bilden. Andere Konformationsänderungen wurden im Bereich von Trp<sup>569</sup> und Trp<sup>572</sup> (Singh et al., 1989; Singh und Song, 1990) bzw. Trp<sup>773</sup> und Trp<sup>777</sup> festgestellt (Eftink, 1991; Nakazawa et al., 1993; Wells et al., 1994). Die Domäne zwischen Trp<sup>773</sup> und Trp<sup>777</sup> erfährt eine deutliche Umordnung während der Photokonversion und ist vorzugsweise in der Pfr-Form exponiert.

### 1.1.3 Spektrale Eigenschaften

Phytochrome werden in der hellrotabsorbierenden Form (Pr) synthetisiert. Diese thermostabile Form wechselt nach Bestrahlung zu einer dunkelrotabsorbierenden Form (Pfr). Phytochrome können auch andere Wellenlängen wie blaues Licht absorbieren (Furuya und Song, 1994). Beide Konformationen bilden zusammen mit verschiedenen Intermediaten einen Photozyklus (Eilfeld und Rüdiger, 1985; Kandori et al., 1992; Chen et al., 1996). Bei der Pr-Pfr-Photokonversion wird eine Z-E-Isomerisierung um die C15=C16 Doppelbindung zwischen Rings C und D durchgeführt (Thümmeler und Rüdiger, 1983; Farrens et al., 1989; Rospendowski et al., 1989). Das PEB-Addukt ist nicht photochromisch, weil die Doppelbindung zwischen C15 und C16 fehlt (Li und Lagarias, 1992), hat aber eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute (Li et al., 1995; Murphy und Lagarias, 1997). Bei der Photokonversion von Pr zu Pfr wurden drei Intermediate (Lumi-R, meta-R<sub>a</sub>, und meta-R<sub>c</sub>) in Phytochrom aus Hafer gefunden (Eilfeld und Rüdiger, 1985). Für die reversible Reaktion Pfr zu Pr wurden zwei Intermediate (lumi-F und meta-F) beschrieben. [das Charakteristische ist, dass Pfr auch thermostabil ist und dass es durch Licht wieder in Pr umgewandelt wird.]

### 1.1.4 Photomorphogenese

Das Phytochrom wirkt in Bezug auf *Fluence* (Fluenz: Photonen m<sup>-2</sup>) und/oder *Irradiance* (Bestrahlung: Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Bei Samenpflanzen wird zwischen drei verschiedenen lichtabhängigen Phytochromreaktionen unterschieden. LFRs (*low fluence responses*) sind Pr-Pfr-photoreversible Reaktionen, die bei Hellrot- und Dunkelrotlicht aktiviert bzw. inhibiert werden (Wirkungsbereich: 1,0 und 1000 μmol Photonen m<sup>-2</sup>). LFRs befolgen das Reziprozitätsgesetz von Bunsen und Roscoe (1850) (s. Anhang 6.4.1) und wurden in verschiedenen pflanzlichen Systemen beschrieben (Mancinelli, 1994). LFRs kontrollieren z.B. die Samenkeimung bei Kopfsalat (Borthwick et al., 1952b), und wirken auf den Ionenflusswechsel, die Blattbewegung oder die Chloroplastenrotation (Haupt und Häder, 1994; Roux, 1994). Auf der genetischen Ebene bewirken LFRs Veränderungen in der Genexpression bei Deetiolerung, Stammverlängerung, Blattwachstum und Blühinduktion (Cosgrove, 1994; Vince-Prue, 1994). [das ist aber oft nicht LFR spezifisch, man kann oft nicht eine scharfe Trennlinie ziehen]

Eine andere Gruppe von Phytochromreaktionen sind die nichtphotoreversiblen VLFRs (*very low fluence responses*) (Blaauw et al., 1968; Mandoli und Briggs, 1981), die bei einer

Bestrahlung zwischen 0,1 und 1  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  wirken. Verschiedene lichtinduzierte Veränderungen bei der Genexpression (Cerdan et al., 1997; Cerdan et al., 1999; Hamazato et al., 1997), und Samenkeimung (Shinomura et al., 1996) wurden als VLFRs Reaktionen beschrieben.

Phytochrom reagiert auch ab 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}$  Licht in den HIRs (*high irradiance responses*) Reaktionen. HIRs Reaktionen erfordern eine lange ununterbrochene Lichtexposition. In Gegenteil zur LFRs dominiert die HIRs bei Dunkelrotlicht. Die Aktivierung bzw. Inhibierung der Samenkeimung durch Dunkelrotlicht bei HIRs (Reed et al., 1994; Shinomura et al., 1994) entspricht der biologischen Aktivität der Pr-Form (Neff et al., 2000). Ein während der Pfr-Pr-Photokonversion generiertes short-live Intermediat wurde als notwendig für die Dunkelrot-HIRs beschrieben (Shinomura et al., 2000).

#### 1.1.4.1 Phytochromfamilie und Photomorphogenese

Studien in *Arabidopsis thaliana L.* zeigen, dass diese Pflanze fünf verschiedene Phytochrome (PhyA-PhyE) enthält (Sharrock und Quail, 1989; Mathews und Sharrock, 1997; Clack et al., 1994). In Tomaten wurde ein weiteres Phytochrom, PhyF, entdeckt (Hauser et al., 1995). Sequenzvergleiche zwischen *Arabidopsis* und andere Angiospermen zeigen, dass nicht immer alle Phytochrome in allen Organismen zu finden sind. *Oryza sativa* enthält zum Beispiel nur drei Phytochrome. Die Monokotylen enthalten kein PhyE (Mathews und Sharrock, 1996).

PhyA ist ein lichtlabiles Phytochrom (Typ I), das nach Hellrot- oder Weißlichtbestrahlung abgebaut wird. Bei pflanzlichem Wachstum im Dunkeln ist PhyA (in Gewebe) am meisten vorhanden. Der Abbau des PhyA ist lichtabhängig und braucht selektive Erkennung der Pfr-Form (Clough et al., 1999). Die phyA-Genexpression wird durch Licht schnell negativ reguliert (Somers und Quail, 1995) und auf der Transkriptionsebene bei Anwesenheit von Phytochrom durchgeführt (Lissemore und Quail, 1988). PhyA vermittelt VLFR Reaktionen von Blau-, Hellrot- und Dunkelrotlicht und ist notwendig für Deetiolierung bei Dunkelrotlicht. PhyA und PhyB akkumulieren im Dunkeln im Cytoplasma und werden nach Lichtbestrahlung in dem Nukleus lokalisiert (Yamaguchi et al., 1999; Kircher et al., 1999; Hisada et al., 2000).

PhyB-PhyE sind lichtstabile Phytochrome (Typ II), die ebenfalls biologisch aktiv sind (Mancinelli, 1994). PhyB, welches das wichtigste Mitglied der Phytochromfamilie ist (Smith, 2000), ist das häufigste Phytochrom bei lichtgewachsenen Pflanzen und steht als

Hellrotphotorezeptor bei der Keimlingentwicklung. Viele durch PhyB regulierte Wachstumsreaktionen induzieren Zellexpansion oder Elongation (Reed et al., 1993). PhyB wirkt auf die Endoreduplikation von Hypokotyl im Nukleus in *Arabidopsis* (Gendreau et al., 1998) und vermittelt sowohl die *end-of-day* Dunkelrotreaktion als auch die Schattenvermeidung, welche auch durch phyD und phyE reguliert wird (Aukerman et al., 1997; Devlin et al., 1998; Devlin et al., 1999). Erstaunlich ist es, dass für die Signaltransduktion in *Arabidopsis* die C-Terminus-Domäne, die bislang immer als Signal-Übermittler zu *downstream* Komponenten betrachtet wurde, nicht benötigt wird und die Aktivität von PhyB verringert (Matsushita et al., 2003). Überexpressionsstudien mit PhyC zeigen eine mögliche Rolle dieses Phytochroms bei der Blatterweiterung (Halliday et al., 1997; Qin et al., 1997).

Alle Phytochrome interagieren miteinander in einem komplexen Netz, in dem auch Blaulichtphotorezeptoren (Cryptochrome und Phototropine) involviert sind (Mas et al., 2000). Außerdem wurden Phytochrom-Mutanten mit Fehlern bei blaulichtregulierten Effekte bei Hemmung des Hypokotylwachstums (Whitelam et al., 1993), bei der Kotyledonenausdehnung (Neff und Van-Volkenburgh, 1994), bei der Samenkeimung (Shinomura et al., 1996), bei der *CAB* (*Chlorophyll a/b binding protein*) Geninduktion (Hamazato et al., 1997) und bei dem durch Licht induzierten Schrumpfen der Hypokotylprotoplasten (Wang und Iino, 1998) gefunden [der letzte Satz ist nicht zu verstehen. Es sind typische Phytochrom-Effekte, die hier als Blaulichteffekte beschrieben werden. Man kann vielleicht sagen, dass es viele Effekte gibt, die sowohl durch Phytochrom als auch durch Blaulichtrezeptoren gesteuert werden. Warum hast du das geschrieben?]. Diese komplexe Interaktion zwischen Photorezeptoren wurde von zahlreichen Gruppen untersucht (siehe z.B. (Casal und Boccalandro, 1995; Casal und Mazzella, 1998; Neff und Chory, 1998; Wang und Iino, 1998; Hennig et al., 1999; Mockler et al., 1999), wobei der Interaktionsmechanismus noch nicht geklärt wurde. [auch hier: die Phytochrom-Regulation / Signaltransduktion bei Pflanzen ist nicht bekannt, das Netzwerk bzw. die Interaktion demzufolge auch nicht, aber für Cph1 und Agp1 ist es nicht so relevant, man hätte es besser nicht beschrieben]

Ein anderer Signaltransduktionsmechanismus, bei dem G-Protein, cGMP und Calcium involviert sind, wurde ebenfalls vorgeschlagen (Neuhaus et al., 1993; Bowler et al., 1994). Obwohl vermutet wurde, dass Iontransporte durch die Plasmamembran eine Rolle bei

lichtregulierter Signaltransduktion spielen, wurde keine direkte Verbindung zwischen dieser Wirkung und einer Genregulation gefunden (Mustilli und Bowler, 1997).

#### **1.1.4.2 Hormone und Phytochrom**

Die Rolle von verschiedenen pflanzlichen Hormonen bei der Photomorphogenese wurde untersucht (Neff et al., 2000). Es wurden regulatorische Verbindungen zwischen Phytochrom- und Gibberellin-Regulation (Kamiya und García-Martínez, 1999) bzw. Brassinosteroid-Katabolismus (Neff et al., 1999) entdeckt. Genetische Studien zeigen die Rolle von Auxin bei der Photomorphogenese, dessen Transport durch Licht beeinflusst werden kann (Jensen et al., 1998).

## **1.2 Andere eukaryotische Photorezeptoren**

### **1.2.1 Der Blaulichtphotorezeptor Cryptochrom**

Der erste pflanzliche Blaulicht-Photorezeptor, Cryptochrom, wurde in *Arabidopsis* entdeckt (Ahmad und Cashmore, 1993). Cryptochrome wurden sowohl in Pflanzen als auch in Tieren gefunden (Chentao, 2002). Die pflanzlichen Cryptochrome (cry1-5) sind 70-80 kDa Proteine mit zwei unterschiedlichen Domänen: eine N-Terminus Domäne PHR (*photolyase*-related), die Sequenzhomologie mit dem Flavoprotein Photolyase zeigt und eine C-Terminus-Domäne (Cashmore et al., 1999). Als Chromophore, die an Cryptochrom binden können, wurden FAD, ein Pterinmethenyltetrahydrofolat (Briggs und Huala, 1999), und Deazaflavin (Ahmad und Cashmore, 1993) vorgeschlagen. Aufgrund der Homologie zwischen Cryptochrom und prokaryotischen Photolyasen wurde postuliert, dass als erste Lichtreaktion ein Elektron-Transfer zwischen dem Flavin des Cryptochroms und einem Signalmolekül bzw. dem Apoprotein stattfindet, wodurch eine Konformationsänderungen eingeleitet wird (Chentao, 2002). Außer mit Phytochrome PhyA (Ahmad et al., 1998c) und PhyB (Mas et al., 2000) interagiert Cryptochrom auch mit anderen Proteinen wie COP1 (Yang et al., 2000; Wang et al., 2001) und ADO1/ZTL/LKP1 (Kiyosue und Wada, 2000; Somers et al., 2000; Jarillo et al., 2001). In *Arabidopsis* und *Nicotiana* akkumuliert Cryptochrom 2 (cry2) im Zellkern (Guo et al., 1999; Kleiner et al., 1999; Mas et al., 2000) und könnte sich an die Chromosomen binden (Cutler et al., 2000). *Arabidopsis* Cryptochrom 1 (cry1) konzentriert sich im Zellkern im Dunkeln oder im Cytosol im Licht

(Cashmore et al., 1999; Yang et al., 2000). Auf der Proteinebene ist die Expression der Cryptochrome durch Licht reguliert. Für Cry1 gibt es keinen klaren Beweis, während Cry2 bei blauem Licht negativ reguliert wird (Ahmad et al., 1998a; Lin et al., 1998). Die Funktionen von Cryptochromen überlappen sich mit denen von Phytochromen bei Prozessen wie Deetiolerung, Genexpression und photoperiodischer Blütezeit. Die Hemmung des Hypokotylwachstums (Koorneef et al., 1980; Ahmad und Cashmore, 1993; Lin et al., 1995), die Stimulation der Kotyledonenöffnung (Lin et al., 1998; Mazzella et al., 2001; Weller et al., 2001), der Wechsel bei der Genexpression und die Induktion der Chloroplastenentwicklung sind bei der Deetiolerung unter der Kontrolle von Cryptochrom und Phytochrom. Die Cryptochrome nehmen auch an der Kontrolle der Blütezeit teil (Koorneef et al., 1991; Koorneef et al., 1991; Koorneef et al., 1991; Mozley und Thomas, 1995; Bagnall et al., 1996; Guo et al., 1998; Koorneef et al., 1991; El-DinEl-Assal et al., 2001) und sind an der Steuerung der inneren Uhr von Tieren und Pflanzen beteiligt (Lin, 2000).

### 1.2.2 Phototropin und der Blau/Rotlichtphotorezeptor *Adiantum phy3*

Ein andere Gruppe von Blaulichtphotorezeptoren, die Phototropine (PHOT), wurde erst als ca. 120 kDa Plasmamembranproteine mit blaulichtabhängiger Phosphorylierung bei *Pisum*, *Arabidopsis* und anderen Pflanzen entdeckt (Gallagher et al., 1988; Short und Briggs, 1994; Christie und Briggs, 2001). Das Gen *phot1* (ursprünglich *nph1: nonphototropic hypocotyl*) kodiert für ein Protein mit zwei PAS-Domänen (auch LOV-Domänen genannt) am N-Terminus, die die Chromophorbindedomänen für zwei Flavine sind (Christie et al., 1999), und eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne am C-Terminus (Huala et al., 1997). PHOT1 kann Flavinmononukleotid (FMN) in vitro nicht-kovalent binden. Der Photozyklus beinhaltet Aufbau und Zerfall eines FMN-Cysteinyll-Addukts, welcher durch eine Absorptionsabnahme bzw. Absorptionszunahme im blauen Spektralbereich charakterisiert ist (Salomon et al., 2000; Swartz et al., 2001). Dieser Photorezeptor induziert Phototropismus bei Hypokotyl und Wurzel in *Arabidopsis* (Reymond P. et al., 1992; Liscum und Briggs, 1995a; Huala et al., 1997). Ein anderes Phototropin, PHOT2 (auch *Npl1:Nph1-like* genannt) wurde als zweiter Photorezeptor für den Phototropismus in *Arabidopsis* entdeckt (Ahmad et al., 1998b; Lasceve et al., 1999; Sakai et al., 2001). PHOT2 (Briggs et al., 2001) vermittelt die Chloroplastenbewegung (Kagawa et al., 2001) bei starkem Blaulicht (Kagawa und Wada, 1999; Kagawa und Wada,

2000). Eine dritte Reaktion, die die Phototropine induzieren können, ist die Stomataöffnung (Zeiger und Helper, 1977; Assmann et al., 1985; Zeiger, 2000), bei der beide Phototropine, PHOT1 und PHOT2, notwendig sind (Kinoshita et al., 2001). In Bezug auf die Signaltransduktion des Phototropins wurden mehrere interaktive Partner wie die Proteine NPH3 (Liscum und Briggs, 1995b; Liscum und Briggs, 1996), RPT2 (Sakai et al., 2000) und NPH4/ARF7 (Liscum und Briggs, 1995a; Stowe-Evans et al., 1998) entdeckt. NPH3 und RPT2 könnten die Signalweiterleitung von Phototropin (an der Plasmamembran lokalisiert) zu Transkriptionsfaktoren in den Zellkern vermitteln (Chentao, 2002), während NPH4/ARF7 ein Transkriptionsaktivator wäre, der einen Wachstumsunterschied als Reaktion auf Licht oder Umweltstimulus vermitteln könnte (Harper et al., 2000). Andere physiologische Effekte wie die Phosphorylierung von Calcium-Transportern durch Phot1 an der Plasmamembran, die Zelländerungen und einen Wachstumsunterschied bei dem Hypokotyl induzieren könnten (Chentao, 2002), oder der Einfluss von blaulichtaktiviertem Phototropin auf die durch Cryptochrom verursachte Hypokotylinhibition (Folta und Spalding, 2001), sind bekannt.

Ein anderer Photorezeptor, PHY3, wurde bei der Farnpflanze *Adiantum capillus-veneris* identifiziert. PHY3 besteht aus einer N-Terminus-Domäne, die der Phytochrom-Chromophor-Bindungsdomäne ähnelt und einer C-Terminus Domäne, welche ein *full-length* Phototropin ist (Nozue et al., 1998). Dieses Protein wurde als Phytochrom-Phototropin-Hybride, die die Chromophore Phycocyanobilin, Phytochromobilin und Flavinmononukleotid (FMN) binden kann, beschrieben (Nozue et al., 1998; Christie et al., 1999). Da der Phototropismus in *Adiantum* durch Blau- und Rotlicht induziert wird, wurde PHY3 als Photorezeptor, der den Phototropismus vermittelt, vorgeschlagen. PHY3 induziert, durch rotes Licht angeregt, Chloroplastenrelokation und erhöht deutlich die phototrope Reaktion in *Adiantum* zum Weisslicht (Kawai et al., 2003).

### 1.2.3 Rhodopsin

Mehr als 300 verschiedene Proteine aus dieser Familie sind zur Zeit in Eukaryonten und Prokaryonten bekannt (Spudich et al., 2000; Hellingwerf, 2002). Die Apoproteine verwenden ein Vitamin-A Aldehyd (Retinal) als Chromophor, welches in einer inneren Tasche, die aus sieben membrangebundenen  $\alpha$ -Helix Fragmenten besteht, gebunden ist. Die gesamte Familie besteht aus zwei Gruppen. Die eukaryotischen Rhodopsine werden Typ 2-Rhodopsine genannt, welche als Photorezeptoren in den Augen von Tieren, in der

Pinealdrüse, im Hypothalamus und in anderen Gewebe aus primitiven Wirbeltieren wirken. Die Rhodopsine erfahren eine Cis-Trans-Isomerisierung im Retinal, welche zu einer Konformationsänderung des Holoproteins führt.

### 1.3 Phytochrom in Prokaryonten: bakterielle Phytochrome

Als erstes prokaryotisches Phytochrom wurde das Protein Cph1 identifiziert. (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997). Bei der Sequenzierung des cyanobakteriellen Genoms aus *Synechocystis* PCC6803 (Kaneko et al., 1996) wurde ein ORF gefunden, das für ein Protein kodiert, welches ein Bilin als Chromophor assembliert und Hellrot/Dunkelrot Photokonversion durchführt. Andere bakterielle Phytochrome wie CphA und CphB aus dem Cyanobakterium *Calothrix* sp. PCC7601 (Jorissen et al., 2002b) und Cph2 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Park et al., 2000b); AphA und AphB aus *Anabaena* sp. PCC7120 (Wu und Lagarias, 2000; Montgomery und Lagarias, 2002) oder verschiedene Bakteriophytochrome (BphP) aus den nichtphotosynthetischen Eubakterien *Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Pseudomonas putida* (Davis et al., 1999) und aus dem Proteobakterium (Agp1 und Agp2) *Agrobacterium tumefaciens* (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003) wurden danach untersucht. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass auch viele andere Bakterien Phytochrom enthalten. Vor und parallel zu der Entdeckung von prokaryotischen Phytochromen wurden andere Proteine entdeckt, welche den Phytochromen ähneln. Solche Proteine, Phytochrom-ähnliche Proteine (*phytochrome-related proteins* oder *phytochrome-like proteins*) genannt, wurden allerdings bislang nur in Cyanobakterien gefunden. Zu dieser Gruppe gehören RcaE aus *Fremyella diplosiphon* (Kehoe und Grossman, 1996), PlpA (Wilde et al., 1997), PisJ1 (Yoshihara et al., 2000) aus *Synechocystis* sp. PCC6803, CikA aus *Synechococcus elongatus* (Schmitz et al., 2000) und Ppr aus dem photosynthetischen Purpurbakterium *Rhodospirillum centenum* und *Rhodopseudomonas palustris* (Jiang et al., 1999).

#### 1.3.1 Molekulare Eigenschaften

Prokaryotische Phytochrome gehören, wie die Phy-Familie, zu den GAF-Domäne-enthaltenen Proteinen (Montgomery und Lagarias, 2002). Die typischen bakteriellen Phytochrome sind ähnlich zu pflanzlichen Phytochromen. Die cyanobakteriellen Phytochrome Cph1 (*Synechocystis* sp. PCC6803), AphA, AphB (*Anabaena* sp. PCC7120),

CphA und CphB (*Calothrix* sp. PCC7601), verschiedene Bakteriophytochrome BphP (*Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc), Agp1 und Agp2 (*Agrobacterium tumefaciens*) bilden eine Gruppe von prokaryotischen Photorezeptoren, welche durch eine konservierte N-Terminus-Domäne sowie ein C-terminales Histidinkinase-Modul charakterisiert sind. Die N-terminale Domäne enthält eine GAF- und eine PHY-Domäne, die unerlässlich sind für die Chromophorbindung und die photochromische Aktivität. Am Anfang des N-Terminus fehlt ein serinreiches Modul, welches auf den pflanzlichen Phytochromen zu sehen ist. Das könnte die Blauverschiebung vom Pfr-Spektrum bei PΦB-Addukten erklären (Montgomery und Lagarias, 2002). Zwei Bakteriophytochrome, *BrBphP* und *RpBphP* aus den photosynthetischen *Bradyrhizobium* ORS278 bzw. *Rhodopseudomonas palustris* enthalten nach Giraud *et al.* (2002) keine Histidinkinasedomäne am C-Terminus (Giraud *et al.*, 2002). Die neuere Auswertung des *Rhodopseudomonas palustris* Genoms zeigt, dass es fünf verschiedene Bakteriophytochrome (*RpBphP*1-5) gibt, die alle eine Histidinkinasedomäne enthalten. *BrBphP* könnte dennoch als eine Subfamilie von dieser Gruppe betrachtet werden. Vielen Phytochromen dieser Gruppe fehlt das konservierte Cystein, das bei pflanzlichem Phytochrom für die kovalente Bindung mit dem Chromophor verwendet wird. Manche Phytochrome wie Cph1 (Lamparter *et al.*, 1997) oder CphA (Jorissen *et al.*, 2002b) haben dieses Cystein. Bei anderen cyanobakteriellen Phytochromen wie CphB (Jorissen *et al.*, 2002b), allen Phytochromen von Purpurbakterien und nichtphotosynthetischen Eubakterien (BphP) (Davis *et al.*, 1999; Bhoo *et al.*, 2001) und den agrobakteriellen Phytochromen Agp1 und Agp2 (Lamparter *et al.*, 2002) fehlt dieses konservierte Cystein. Dafür besitzen Agp1, Agp2, CphB, *DrBphP*, *PaBphP* etc. ein konserviertes Cystein am N-Terminus (vor der GAF-Domäne), welches als Chromophorbindungsstelle vorgeschlagen wurde (Lamparter *et al.*, 2002). Zwei Phytochrome aus dem Pilz *Neurospora crassa*, (*NcBphp*1/2), passen zu dieser Gruppe, wobei zusätzlich eine C-terminale Responsregulator Domäne zu erkennen ist. Eine zweite Gruppe beinhaltet (zur Zeit) nur die cyanobakteriellen Phytochrome Cph2 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und Cph2a, Cph2b und Cph2c aus *Nostoc punctiforme*. Bei diesen Photorezeptoren fehlt der erste Teil der pflanzlichen N-Terminus-Domäne. Sie besitzen mehreren GAF-Domänen, von denen eine ortholog mit der PHY-Domäne aus Cph1 oder BphP ist, und eine Histidinkinase-Domäne. Die GAF-Domäne am N-Terminus hat ein hochkonserviertes Cystein und ähnelt der GAF-Domäne aus Pflanzen und Cph1 (Montgomery und Lagarias, 2002). Manche der

anderen Cystein-enthaltenden GAF-Domänen können *in vitro* Biline kovalent binden. Die Addukte sind jedoch nicht photoaktiv (Wu und Lagarias, 2000). Die anderen cyanobakteriellen *phytochrome-like proteins* wie RcaE, PlpA, PisJ1 und CikA gehören zu einer dritten Gruppe von Photorezeptoren, welche GAF-, Histidinkinase- und/oder Responsregulator-Domänen enthalten.

### **1.3.2 Cyanobakterielle Phytochrome von *Synechocystis* und *Calothrix***

Die Gruppierung der bakteriellen Phytochrome kann nach verschiedenen Kriterien erfolgen. Die Cyanobakterien enthalten im Unterschied zu anderen Bakterien Phycobilisomen, die Energie in das photosynthetische System leiten. Im Unterschied zu Phytochromen anderer Bakterien wird PCB als natürlicher Chromophor verwendet (Hübschmann et al., 2001a). Auf Grund dieses Unterschiedes kann man cyanobakterielle Phytochrome von allen anderen bakteriellen Phytochromen getrennt betrachten.

#### **1.3.2.1 Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803**

Als erstes prokaryotisches Phytochrom wurde Cph1 (*cyanobacterial phytochrome 1*) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 kloniert und charakterisiert (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997). Dieses etwa 85 kDa Apoprotein assembliert kovalent mit PCB, PΦB und PEB *in vitro* (Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001). Im Unterschied zu eukaryotischem Phytochrom kann Cph1 sehr gut in *E.coli* exprimiert werden, was seine Charakterisierung erleichtert hat (Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997; Park et al., 2000c; Lamparter et al., 2001; Gambetta und Lagarias, 2001; Landgraf et al., 2001; Hübschmann et al., 2001a). Nach der Entdeckung von prokaryotischen Phytochromen wurde Cph1 als Modellphytochrom verwendet. Dafür wurden Signaltransduktion (Yeh et al., 1997; García et al., 2000), Photoisomerisierung (Heyne et al., 2002), Assemblierungsreaktionen mit verschiedenen Chromophoren (Borucki et al., 2003), die Bildung von Intermediaten zwischen den Konformationen (Sineshchekov et al., 2002b), Dimerisierung (Otto et al., 2003), Chromophoränderungen während der Photokonversion (van Thor et al., 2001) und Konformationsänderungen (Remberg et al., 1997) untersucht. Cph1 brachte eine neue Chance, um ungelöste Fragen wie die Struktur eines Phytochroms oder die Evolution der Phytochromfamilie besser verstehen zu können. Außerdem kann Cph1 ein Modellsystem für das durch Licht regulierte Phytochromsignal in Pflanzen sein. Cph1 ist das erste Phytochrom, in dem eine Kinase und

Phosphotransferaseaktivität nachgewiesen wurden (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001). Analysen von Cph1 mit verschiedenen spektroskopischen Methoden zeigen, dass die physikochemischen Eigenschaften des Cph1 denen der Phytochrome aus höheren Pflanzen, wie PhyA aus Hafer oder PhyB ähneln (Remberg et al., 1997; Sineshchekov et al., 1998a; Foerstendorf et al., 2000; Sineshchekov et al., 2002b; Heyne et al., 2002; Borucki et al., 2003). Assemblierungsstudien mittels CD und *stopped-flow* mit PCB und PEB zeigen, dass die nichtkovalenten Interaktionen des Chromophors mit der Bindungsdomäne des Apoproteins genügen, um den Chromophor in die richtige Geometrie für die Photoisomerisierung zu bringen (Borucki et al., 2003). Die Photoisomerisierungsdynamik wurde durch Femtosekunden-Messungen (*Femtosecond time-resolved transient absorption spectroscopy*) untersucht. Wie bei PhyA gab es eine langsame Pr-Pfr- und eine schnelle Pfr-Pr-Photoreaktion (Heyne et al., 2002). Außer den oben beschriebenen sequenziellen Unterschieden (s. 1.3.1) ist zum Beispiel eine Blauverschiebung des Cph1-Pfr-Form-Maximums (Lamparter et al., 1997) zu nennen. Im Gegensatz zu Pflanzenphytochromen ist das erste Intermediat der Pr-Pfr Konversion, Lumi-R, kaum zu erkennen (Sineshchekov, 1995; Kneip et al., 1999; Sineshchekov et al., 2002b). Andere Intermediate wie *meta*-Ra und *meta*-Rc wurden bei  $-60\text{ °C}$  bzw.  $-30\text{ °C}$  detektiert. Während der Assemblierung mit PCB wird ein erkennbares Intermediat beobachtet, dessen Absorptionsmaximum bei höher Wellenlänge als bei freiem Chromophor ist (Lamparter et al., 1997; Lamparter et al., 2001). Wie bei Pflanzen wurde eine Protonen-abgabe während der Pr-Pfr-Photokonversion beschrieben (van Thor et al., 2001). Dieser Wechsel des Protonierungszustandes könnte konformationelle Änderungen anzeigen. Eine Deprotonierung eines Intermediats wäre eine Möglichkeit, um die Pr-Pfr-Zyklusrate zu kontrollieren (Lamparter und Hughes, 2003). Eine Z-E-Isomerisierung des Chromophors und Änderungen bei der H-Bindung mit dem Protein wurden detektiert (Remberg et al., 1997; Sineshchekov et al., 1998b; Park et al., 2000c; Foerstendorf et al., 2000). Cph1 bildet Dimere, welche durch das C-terminale Histidinkinase-Modul vermittelt werden (Park et al., 2000c). Die Dimerisierung wurde auch durch biophysikalische Messungen (FRET) (Otto et al., 2003) und NGE bzw. GFC nachgewiesen (Lamparter et al., 2001). Struktur-Vorhersagen für Cph1 zeigen, dass wie in Pflanzen-Phytochromen der Anteil an  $\alpha$ -Helix überwiegt. Dieser Anteil steigt in dem Holoprotein nach der Chromophorassemblierung, während der Anteil an  $\beta$ -Faltblatt unverändert bleibt. Keine

weitere bedeutsame Änderung in der Sekundärstruktur des Cph1 wurden bei der Pr-Pfr-Photokonversion gesehen (Park et al., 2000c).

Das Gen *cph1* (Locus slr0473) gehört zu einem Operon, in dem sich das Gen *rcp1* (Locus slr0474) befindet, welches für einen Responsregulator kodiert. Cph1 und Rcp1 bilden ein „Zwei-Komponenten Signalsystem“. Dieses System könnte die erste Stufe der Signaltransduktion durch die umkehrbare Phosphorylierung des Responsregulators an einem hoch konservierten Aspartat sein (Parkinson und Kofoid, 1992; Yeh et al., 1997; West und Stock, 2001; Stock et al., 2000). Die cyanobakteriellen Phytochrome werden in der Pr Form stärker phosphoryliert als in der Pfr-Form (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Hübschmann et al., 2001b). Die Regulation der *cph1-rcp1*-mRNA Expression zeigt eine Rolle des Cph1 bei der Kontrolle von Prozessen, die für die Anpassung im Licht-Dunkel- bzw. Dunkel-Licht-Übergang nötig sind (García et al., 2000). Die physiologischen Effekte von Cph1 und vielen anderen cyanobakteriellen und prokaryotischen Phytochromen sind noch unbekannt. *Cph1-knockout* Mutanten zeigen einen unveränderten photosynthetischen Pigmentgehalt bzw. eine unveränderte Lichtregulierung und normale phototaktische Bewegungen. Das Mutantenwachstum ist deutlich retardiert unter intensivem Weisslicht (A. Wilde bei Lamparter 2003). Trotzdem ist die biochemische Rolle des Cph1 zur Zeit unbekannt.

In diesem Kontext wurde diese Arbeit zur weiteren Charakterisierung des Cph1 durchgeführt.

### 1.3.2.2 Andere cyanobakterielle Phytochrome

Eine zweites Gen (Locus *sll0821*) in *Synechocystis* kodiert für ein photochromisches Protein, das als Phytochrom identifiziert wurde (Park et al., 2000b; Wu und Lagarias, 2000). Dieses Phytochrom, Cph2 genannt, ähnelt Cph1 und der Phy-Familie aus Pflanzen in einer N-terminalen Chromophorbindungsdomäne. Cph2 enthält zwei Chromophorbindungsdomänen, bei welchen Cystein 129 bzw. 1022 die Biline *in vitro* binden (Park et al., 2000b). Da beide Chromophorbindungsdomänen Bilinlyaseaktivität zeigen, aber nur ein Hellrot/Dunkelrot photoreversibles Addukt haben, kann man von zwei verschiedenen Typen solcher Domänen reden: mit oder ohne photochromische Addukte (Wu und Lagarias, 2000). Cph2 assembliert mit PCB, PΦB (Park et al., 2000b) und PEB (Wu und Lagarias, 2000) *in vitro* und zeigt für PΦB und PCB die typische photochromische Reversibilität eines Phytochroms. Wie bei *cph1* wird die Expression von

*cph2* im Dunkeln verstärkt (García et al., 2000; Park et al., 2000b). In *Calothrix* sp. PCC7601 wurden zwei Gene *cphA* (Locus AF309559) und *cphB* (Locus AAL76161), die für zwei Phytochrome CphA und CphB kodieren, gefunden (Jorissen et al., 2002b). Die in *E.coli* exprimierten CphA und CphB Apoproteine können den Chromophor PCB kovalent bzw. nicht-kovalent binden und eine Photokonversion nach Hellrot-Dunkelrotlicht Bestrahlung erfahren (Anh. 2). Die Assemblierungs- und Pr-Pfr-Photokonversionskinetik von PCB-CphA ähnelt der von PCB-Cph1, auch im Hinblick auf einen nach dunkelrot verschobenes Intermediat, welches während des Assemblierungsprozesses gefunden wird. Wie in *Synechocystis* liegen die Gene mit Response-Regulator-Genen *rcpA* und *rcpB* in einem Operon vor. CphA-RcpA und CphB-RcpB bilden ein Zwei-Komponenten Signalsystem. Kein Phosphotransfer findet zwischen phosphoryliertem CphA und RcpB bzw. phosphoryliertem CphB und RcpA statt (Hübschmann et al., 2001b).

### 1.3.3 Andere bakterielle Phytochrome

Als weitere prokaryotische Phytochrome wurden *DrBphP* aus *Deinococcus radiodurans* und *PaBphP* aus *Pseudomonas aeruginosa* entdeckt (Davis et al., 1999). *DrBphP* und *PaBphP* enthalten eine Histidinkinase-Domäne und wurden, wie die cyanobakteriellen Phytochrome, als Licht-regulierte Histidinkinasen, die anderen „Zwei-Komponenten Signalsystem“ Sensoren ähneln, beschrieben (West und Stock, 2001). Im Gegensatz zu cyanobakteriellem Phytochrom ist bei *PaBphP* Pfr die aktivere Form (Bhoo et al., 2001). Die Gene *DrBphP*, *PaBphP* und andere Bakteriophytochromgene gehören zu einem Operon, das ein Hämoxygenase-Gen und ein Responsregulator-Gen enthält. Die Responsregulatoren ähneln dem CheY aus *E.coli* und wirken als Phosphoakzeptor des autophosphorylierten Bakteriophytochroms. *DrBphP* bindet kovalent verschiedene Biline wie PCB, PΦB (Davis et al., 1999), PEB oder BV, welches (wie für andere Bakteriophytochrome) der natürliche Chromophor ist (Bhoo et al., 2001).

Wie bei *DrBphP* und *PaBphP* ist BV der natürliche Chromophor der proteobakteriellen Phytochrome (Bhoo et al., 2001; Lamparter et al., 2002). Andere Biline wie PCB oder PEB können kovalent am *BrBphP* und Agp1 binden (Giraud et al., 2002; Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003). Im Gegensatz zu pflanzlichen Phytochromen oder den Bakteriophytochromen, die ein konserviertes Cystein in der GAF-Domäne enthalten (Cph1, CphA, PhyA aus *Arabidopsis* etc.) hat PCB-Agp1 ein nach Rot verschobenes Absorptionsmaximum (685 nm) wie auch andere Bakteriophytochrome

wie *DrBphP* und *CphB*. Das Maximum von BV-Agp1 liegt sogar bei 701 nm. Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* hat die typische Domäneanordnung eines Phytochroms und wird ebenfalls als Licht-regulierte Histidinkinase definiert (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003), welche zusammen mit dem Responsregulator Rap1 (AtRR1) aus dem gleichen Operon ein „Zwei-Komponenten Signalsystem-Modell“ für die Signaltransduktion sein könnte. *Agrobacterium tumefaciens* enthält neben der genomischen DNA ein Ti-Plasmid, welches die Gene für die Infektion von Pflanzen enthält (Krishnamohan et al., 2001; Zhu et al., 2000). Es wurden mehrere pflanzliche und bakterielle Faktoren identifiziert die den DNA-Transfer von *Agrobacterium* in die Pflanze beeinflussen (Tzfira und Citovsky, 2002). In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, dass der Gentransfer von *Agrobacterium* zu *Arabidopsis thaliana* und *Phaseolus acutifolius* durch Licht gefördert werden kann (Zambre et al., 2003). In dem Sinne wurde an eine mögliche Wirkung des Phytochroms Agp1 auf den Gentransfer gedacht. Agp1 wird wie Cph1 stärker in der Pr-Form *in vitro* phosphoryliert, wobei die absolute Phosphataufnahme im Fall von Agp1 größer ist (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003). Die Bakteriophytochrome *BrBphP* aus *Bradyrhizobium* ORS278 und *RpBphP* aus *Rhodospseudomonas palustris* enthalten nach der ersten Publikation keine Histidinkinase-Domäne am C-Terminus, es sind aber hoch konservierte Regionen einer PAS Domäne zu sehen (Giraud et al., 2002). Das spricht für eine durch Licht regulierte Protein-Protein-Interaktion ohne Phosphorylierungskaskade als Signaltransduktionsweg (Giraud et al., 2002). Nach dem neuesten Stand der NCBI-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) hat *Rhodospseudomonas palustris* fünf verschiedene Phytochrome, welche alle eine Histidinkinasedomäne enthalten. Agp2 ist ein ungewöhnliches Phytochrom, das anstatt einem Histidinkinase-Modul eine Responsregulator-Domäne am Ende des C-Terminus enthält. Diese Domäne ist auch bei anderen Bakteriophytochromen wie denen aus *Pseudomonas putida* (*BphP2*), *Rhizobium leguminosarium* (*R/BphP*) und *Rhodospseudomonas palustris* (*RpBphP*) vorhanden (Giraud et al., 2002). Obwohl eine Histidinkinasedomäne nicht direkt zu erkennen ist, gibt es Ähnlichkeiten zu solchen Domänen, die sich zwischen Chromophormodul und Responsregulator-domäne befinden. Die Histidinkinase-Funktion wurde auch für Agp2 nachgewiesen. Die Aktivität wird nach Photokonversion zur Pr-Form inhibiert (Karniol und Vierstra, 2003). Im Unterschied zu anderen Mitgliedern der Phytochromsuperfamilie erfahren

Agp1 und Agp2 eine Dunkelreversion zur Pr- bzw. Pfr-Form (Lamparter et al., 2002; Karniol und Vierstra, 2003). [die Dunkelreversion zu Pfr ist nicht wie bei Pflanzen] Die Dunkelreversion des Agp2 zur Pfr-Form ist auch bei *BrBphP* zu sehen (Giraud et al., 2002). Es ist noch nicht in allen Fällen bekannt, welche Effekte von bakteriellen Phytochromen regulieren werden. Bei *Bradyrhizobium* ORS278 und *Rhodospseudomonas* ist die Synthese des photosynthetischen Apparats unter der Kontrolle von Bakteriophytochrom, welches in der Pr-Form die Synthese aktiviert (Giraud et al., 2002).

## 1.4 Andere prokaryotische Photorezeptoren

### 1.4.1 Cyanobakterielle Phytochrom-ähnliche Proteine: RcaE, PlpA, PisJ1 und Cika

Vor der Entdeckung von Phytochromen in prokaryotischen Organismen wurde das Gen *rcaE* aus dem Cyanobakterium *Fremyella dispoliphon* gefunden, welches für ein Protein mit Ähnlichkeiten zum Chromophormodul eines Phytochroms und einer Histidinkinasedomäne kodiert (Kehoe und Grossman, 1996). Das Gen *rcaE* (*response to chromatic adaptation E*), das für ein 74 kDa Protein kodiert, reguliert zusammen mit anderen Genen wie *rcaC*, die CCA (*complementary chromatic adaptation*) in *Fremyella*. RcaE-Mutanten zeigen keine CCA (Anhang 6.4.2) und die Expression der Phycocyanin- und Phycoerythrin-Operone ist konstitutiv (Kehoe und Grossman, 1996). Auf dem gleichen Operon befindet sich ein weiteres Gen, *rcaF*, das für einen typischen bakteriellen Responsregulator kodiert. RcaE und RcaF könnten ein Zwei-Komponenten Signalsystem bilden, welches die erste Stufe einer Transduktionskaskade wäre (Kehoe und Grossman, 1997). RcaE bindet Bilin als Chromophor und ist photochromisch mit Absorptionsmaxima im roten und grünen Spektralbereich. Die letzte Publikation zeigt, dass RcaE das Cystein 198 braucht, um das offenkettige Tetrapyrrol kovalent binden zu können (Terauchi et al., 2003); vermutlich handelt es sich um das Chromophor-bindende Cystein.

Bei dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC6803 wurde ein weiteres Phytochrom-ähnliche Protein PlpA gefunden, welches Homologie zu Phytochromen zeigt (Wilde et al., 1997). *Knock-out* Mutanten von *plpA* zeigen unter photoheterotropischen (weisses oder dunkelrotes Licht und Glukose) bzw. phototropischen Bedingungen ein normales Wachstum. Unter blauem Licht ohne Glukose gab es kein Wachstum. Wie dieses

Pigment, welches das Wachstum in *Synechocystis* kontrolliert, eine durch Blaulicht hervorgerufene Wirkung regulieren kann, ist noch nicht bekannt.

Das Gen *pisJ1* in *Synechocystis* PCC6803 kodiert für ein Protein, welches eine Hybride aus einer Phytochrom-ähnlichen Chromophordomäne und einem Homolog zur Signaldomäne von bakteriellen Methyl-Aceptor Chemotaxis Rezeptoren ist (Yoshihara et al., 2000). Das Protein PisJ1 (*phototaxis* J1) spielt vermutlich bei der positiven Phototaxis eine Rolle. Deletionsmutanten von *pisJ1* und anderen Genen (*pisG*, *pisH*, *pisI*, *pisJ2* und *pisL*) verlieren die positive Phototaxis und zeigen nur negative Phototaxis.

Ein weiteres Phytochrom-ähnliches Protein wurde bei dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 gefunden. Das entsprechende Gen *cikA* ist für die Synchronisation der inneren Uhr bei hell/dunkel Wechsel notwendig (Schmitz et al., 2000). Außer einer GAF-Domäne am N-Terminus hat CikA ein Histidinkinase-Modul und eine Responsregulator-Domäne, bei der das konservierte Phosphoacceptor-Aspartat fehlt. Die Rolle des CikA als Histidinkinase wurde noch nicht nachgewiesen. Ein Sequenzvergleich mit anderen phytochromähnlichen Proteinen deutet an, dass CikA einen Chromophor binden könnte (Lamparter und Hughes, 2003).

#### 1.4.2 Purpurbakterielles *phytochrome-like protein* Ppr

Ein weiterer prokaryotischer Photorezeptor, Ppr, wurde in dem Purpurbakterium *Rhodospirillum rubrum* entdeckt (Jiang et al., 1999). Der Aufbau von Ppr (*PYP-phytochrome-related*) ist ähnlich wie Cph1 oder andere typische bakterielle Phytochrome, aber zusätzlich enthält das Protein eine N-terminale PYP-Domäne (*photoactive yellow protein*). Ppr bindet kovalent den Blaulichtchromophor *p*-Cumarsäure und sein Photozyklus ähnelt dem von PYP. Es wurden keine Biline als Chromophor gefunden. Ppr-Mutanten zeigen eine schwache Expression der Chalcon-Synthase (*chs*; *chalcone synthase*). Die Chalcon-Synthase ist bei der Synthese von Anthocyaninen beteiligt. In höheren Pflanzen ist die *chs*-Transkription durch Phytochrom und andere Photorezeptoren reguliert. Außerdem zeigt Ppr eine durch Blaulicht induzierte Repression der *chs*-Expression (Jiang et al., 1999).

#### 1.4.3 Bakteriorhodopsin, PYP und Sensory Rhodopsin

Der Photorezeptor PYP (*photoactive yellow protein*) ist ein lösliches Protein, das Cumarsäure als Chromophor über ein Thiolester an ein Cystein gebunden hat (Hellingwerf,

2000; Hellingwerf, 2002). In *Ectothiorhodospira halophila* könnte PYP als Photorezeptor für Phototaxis wirken (Hoff et al., 1995; Sprenger et al., 1993). Seine Funktion bleibt bis diesem Zeitpunkt unbekannt.

Die Bakteriorhodopsine bilden eine Familie (Typ 1) von Photorezeptoren, welche wie die Rhodopsine (Familie Typ 2) ein Vitamin-A Aldehyd (Retinal) als Chromophor verwenden (Spudich et al., 2000). Die Bakteriorhodopsine wurden in *Archaeum Halobakterium salinarum*, in halophilen Prokaryonten und auch in eukaryotischen Mikroorganismen gefunden. Die Typ 1-Familie wirkt als lichtkontrollierter Ionentransporter (Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin) und Phototaxisrezeptor (Sensory Rhodopsin I und II). Neue Sensory Rhodopsine wurden bei der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (CSRA, CSRB) (Sineshchekov et al., 2002a) und bei dem Cyanobakterium *Anabaena (Nostoc) sp. PCC7120* (Jung et al., 2003) gefunden. CSRA ist für die photophobische Reaktion bei hoher Lichtintensität verantwortlich (Govorunova et al., 2004). Im Unterschied zu *Archaeum*-Sensory Rhodopsinen könnte *Anabaena*-Sensory Rhodopsin mittels eines löslichen zytoplasmischen Proteins wirken (Jung et al., 2003).

## 1.5 Biline

Die Biline BV (Biliverdin), PCB (Phycocyanobilin), PΦB (Phytochromobilin) und PEB (Phycoerythrobilin) werden von Pflanzen-, Algen-, Pilzen- und Bakterienphytochromen als Chromophor verwendet (Abb. 3). In Pflanzen findet die Synthese von PΦB in den Chloroplasten statt. Der fertige Chromophor diffundiert danach in das Zytosol, wo die Assemblierung mit dem Apophytochrom stattfindet. In manchen Organismen wie Cyanobakterien oder Rotalgen steht der verwendete Chromophor PCB in dem Phycobilisomen-Antennenkomplex stark konzentriert zur Verfügung. Pflanzenphytochrome nutzen PΦB und PCB als Chromophor (Rüdiger und Thümmeler, 1994; Wu et al., 1997; Terry, 1997; Zeidler et al., 1998). In höheren Pflanzen und Cyanobakterien werden PΦB bzw. PCB aus Biliverdin IX $\alpha$  (BV) synthetisiert, welches aus Häm durch eine ferredoxinabhängige Hämoxxygenase gebildet wird. Biliverdin wird durch PΦB-Synthetase in 3E-PΦB konvertiert, welches dann zu 3Z-PΦB isomierisiert. (Muramoto et al., 1999). Bei Cyanobakterien wird BV durch eine PcyA (3Z-phycoerythrobilin-ferredoxin oxidoreductase) (Frankenberg et al., 2001) direkt zu PCB reduziert. Bei beiden Reaktionen wird die BV-Ring A-Doppelbindung reduziert und die

Ring A-Vinyl-Gruppe wird zu Ethyliden. Bei PCB wird zusätzlich der Vinyl-Rest des Ringes D zu einem Ethyl-Rest reduziert (Kohchi et al., 2001; Frankenberg et al., 2001). Die kovalente Bindung des Chromophors am pflanzlichen Phytochrom durch eine Thioetherbindung (Lagarias und Rapoport, 1980) wird mit der Ethylidenseitenkette des Rings A durchgeführt. Manche cyanobakterielle Phytochrome wie Cph1 oder CphA binden PCB und PΦB kovalent, während in dem Fall von CphB die Bindung nicht kovalent ist (Jorissen et al., 2002b). Für Cph1 wurde PCB als natürlicher Chromophor beschrieben (Hübschmann et al., 2001a). Andere Bakteriophytochrome wie BphP und die agrobakteriellen Phytochrome Agp1 und Agp2 assemblieren autokatalytisch mit Biliverdin, welches als natürlicher Chromophor verwendet wird (Davis et al., 1999; Bhoo et al., 2001; Lamparter et al., 2002; Lamparter et al., 2003). Die Chromophore PCB und PΦB binden auch an diese Phytochrome und produzieren photoaktive Addukte (Davis et al., 1999; Lamparter et al., 2002). Für diese Bakteriophytochrome wurden andere Aminosäuren, wie ein konserviertes Histidin an der GAF-Domäne des Apoproteins, als Bindungsstelle für den Chromophor vorgeschlagen (Davis et al., 1999).

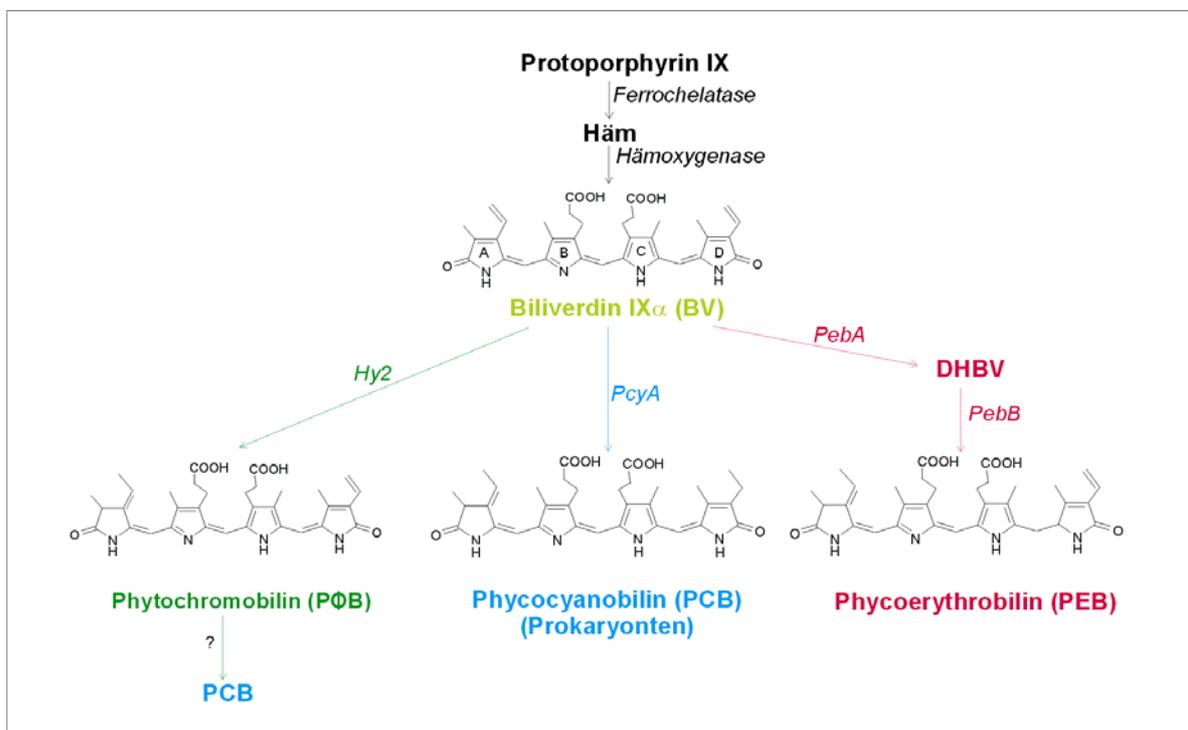


Abbildung 3: Tetrapyrrolvorstufen der Phytochrom- und Phycobiliproteinchromophore von Pflanzen, Algen und Cyanobakterien nach Frankenberg *et al.* (2001). Biliverdin steht als Vorläufer und als natürlicher Chromophor für viele verschiedene Bakteriophytochrome aus Eubakterien und Proteobakterien. Abkürzungen: HY2, Phytochromobilinsynthase oder 3Z-Phytochromobilin-

Ferredoxinoxidoreductase; PcyA, 3Z-Phycocyanobilin-Ferredoxinoxidoreductase; PebA, 15,16-Dihydrobiliverdin-Ferredoxinoxidoreductase; PebB, 3Z-Phycoerythrobilin-ferredoxinoxidoreductase.

Die Entdeckung von einem N-terminalen konservierten Cystein (Cys<sup>20</sup>) außerhalb der GAF-Domäne bei Agp1, das BV über die Ring A Vinylgruppe kovalent bindet (Lamparter et al., 2003; Lamparter et al., 2004), zeigt die Möglichkeit, dass andere Bakteriophytochrome den Chromophor an diesem Cystein binden können. Viele biophysikalische Studien zur Konformation und Protonierungszustand des Chromophors als auch Chromophor-Protein-Interaktionen während der Photokonversion bei pflanzlichem PhyA und cyanobakteriellem Cph1 wurden durchgeführt (Fodor et al., 1990; Matysik et al., 1995; Andel et al., 2000; Kneip et al., 1999; Foerstendorf et al., 2001; Otto et al., 2003; van Thor et al., 2001). Der Chromophor wird während der Assemblierungsreaktion protoniert. In der Pfr-Form ist der Chromophor vermutlich ebenfalls protoniert (Kneip et al., 1999), wobei manche Autoren postulieren, dass bei der Konversion zu Pfr der Chromophor ein Proton abgibt (Mizutani et al., 1994). Bei Cph1 wurde ein protonierter und nichtprotonierter Zustand der Pfr-Form bei neutralem und basischem pH vorgeschlagen (van Thor et al., 2001).

## 1.6 Evolution

Nach der Entdeckung prokaryotischer Phytochrome und phytochromähnliche Proteine lässt sich der evolutive Ursprung des eukaryotischen Phytochroms nachprüfen. Die Präsenz von Phytochromen in Purpurbakterien, in nichtphotosynthetischen Proteobakterien, in celluloseabbauenden Cytophagalen und in Pilzen bedeutet, dass die Evolution Milliarden von Jahren vor dem Auftauchen der grünen Pflanzen stattfand. Nach Montgomery und Lagarias würden die Phytochrome aus einem Tetrapyrrol-poly-GAF Sensorprotein, das die Lichtrezeptorfunktion entwickelte, kommen. Da es verschiedene phytochromähnliche Proteine in Eubakterien gibt, die eine sauerstofffreie Umgebung für Photosynthese und Stickstofffixierung brauchen, könnten die Phytochromvorläufer Bilinsensoren gewesen sein, deren Konzentration durch Sauerstoffpräsenz reguliert wurde. (Montgomery und Lagarias, 2002). Nach Viestra et al. wurde ein ursprünglicher Photorezeptor in photosynthetischen Bakterien weiterentwickelt, welcher nach der

endosymbiotischen Assimilation der Cyanobakterie in Eukaryonten zu finden ist (Vierstra und Davis, 2000).

Ein Sequenzvergleich der Chromophorbindungsdomänen von verschiedenen eukaryotischen und prokaryotischen Phytochromen bzw. *phytochrome-like protein* lässt vermuten, dass die im Ursprung cyanobakteriellen Phytochrome sich danach in nichtphotosynthetischen Bakterien und in Eukaryonten ausgebreitet haben. Andere phylogenetische Studien deuten an, dass cyanobakterielle Phytochrome die direkten Vorfahren von Phytochrom höherer Pflanzen sein könnten (Herdman et al., 2000). Sequenzvergleiche von anderen Domänen wie die Histidinkinasedomäne oder die GAF-Domäne von verschiedenen Phytochromen und *phytochrome-like protein* sprechen für einen nichtcyanobakteriellen Ursprung des pflanzlichen Phytochroms (persönliche Mitteilung von T. Lamparter) (Abb. 4). Diese Idee wird durch die Verwendung von verschiedenen Chromophoren bei Pflanzen (PΦB) und Cyanobakterien (PCB) unterstützt, wobei die Grünalgen *Mesotaenium caldariorum* (Wu et al., 1997) und *Mougeotia scalaris* (Jorissen et al., 2002a) PCB als natürlichen Chromophor verwenden und dadurch eine Ausnahme bilden. Ein endosymbiotischer Ursprung des Phytochroms durch Chloroplastenassimilation ist nicht sicher. Es ist auch möglich, dass Phytochrom-Gene nach symbiotischer Assimilation von Proteobakterien, die die späteren Mitochondrien bildeten, in den Nukleus von Pflanzen landeten.

Durch die Kenntnis der Struktur und Funktion der cyanobakteriellen oder proteobakteriellen Phytochrome Cph1 bzw. Agp1 werden wir einen Teil der Evolution besser verstehen können. Eine Wirkung des *Agrobacterium* in Pflanzen durch ein lichtreguliertes Phytochromsignal könnte neue Bedeutungen bei der Gentransduktion und Expression haben.

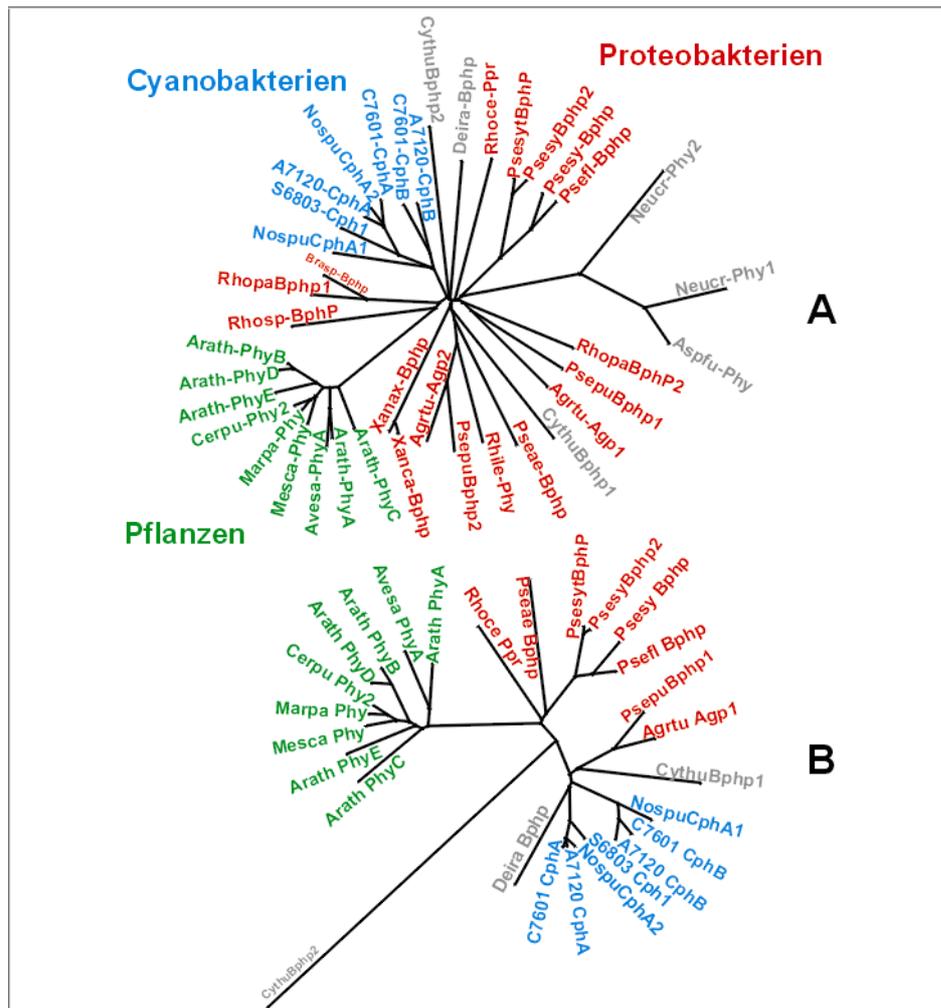


Abbildung 4: Stammbaum (*Protdist und fitch* Algorithmen von Phylip) der Phytochrome (von T.Lamparter). Für die Konstruktion wurde das Chromophormodul (A) bzw. die Histidinkinasedomäne (B) verwendet. Die pflanzliche Phytochrome bilden in beiden Fällen eine deutlich getrennte extra Gruppe. Cyanobakterielle Phytochrome bilden eine Gruppe, welche durch manche proteobakteriellen Phytochrome von Pflanzen getrennt sind.

Agrtu, *Agrobacterium tumefaciens*; Arath, *Arabidopsis thaliana*; Aspfu, *Aspergillus fumigatus*; Avesa, *Avena sativa*; Brasp, *Bradyrhizobium* sp. ORS278; A7120, *Nostoc* sp. PCC 7120; Cerpu, *Ceratodon purpureus*; Cythu, *Cytophaga hutchinsonii*; C7601, *Calothrix* sp. PCC7601; Deira, *Deinococcus radiodurans*; Mesca, *Mesotaenium caldariorum*; Marpa, *Marchantia paleacea* var. *diptera*; Neucr, *Neurospora crassa*; Nospu, *Nostoc punctiforme*; Pseae, *Pseudomonas aeruginosa*; Psefl, *Pseudomonas fluorescens*; Psepu, *Pseudomonas putida*; Psesy, *Pseudomonas syringae*; Psesyt, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate*; Rhile, *Rhizobium leguminosarum*; Rhoce, *Rhodospirillum centenum*; Rhopa, *Rhodopseudomonas palustris*; Rhosp, *Rhodobacter sphaeroides*; S6803, *Synechocystis* sp. PCC6803; Xanax, *Xanthomonas axonopodis*; Xanca, *Xanthomonas campestris*.

## 1.7 Ziele der Arbeit

Zur biochemischen Charakterisierung des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 war es wichtig, die Reinigungsschnitte zu optimieren, um die Aggregation zu minimieren. Die Art der Chromophor-Protein-Verbindung sowie die spektralen Unterschiede zwischen PCB- und PEB-Addukten sollte untersucht werden. Ziel war es außerdem, den Extinktionskoeffizienten von Cph1 durch PCB-Assemblierung zu bestimmen.

Die Konformationsänderung des Chromoproteins bei der Photokonversion und die Quartärstruktur von Cph1 als Monomer, Dimer oder Tetramer waren von Interesse. Eine mögliche Dimerisierung des Chromoproteins war zu untersuchen. Dafür waren analytische GFC und limitierte Proteolyse durchzuführen. Mittels GFC sollten die Elutionsprofile von Apoprotein, Cph1-Pr und Cph1-Pfr verglichen werden. Es war die Absicht, möglichst kleine photochromisch aktive Cph1-Deletionen zu erhalten. Es wurde erwartet, dass Endopeptidasen die Pr und Pfr Form von Cph1 nach Dunkelrot- oder Hellrotbestrahlung an unterschiedlichen Stellen schneiden. Zu diesem Zweck wurden die spezifischen Schnittstellen mittels Massenspektrometrie untersucht. Die Rolle dieser Schnittstellen sollte mittels SDM untersucht werden. Hierzu war es notwendig, spektrale Messungen und analytische GFC verschiedener Mutanten durchzuführen. Weiterhin war die Untersuchung der Autophosphorylierung aller Mutanten mit radioaktiven Phosphat wichtig.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Klonierung des Gens *agp1* aus *Agrobacterium tumefaciens* (GI:15157115) in ein Expressionsplasmid. *Agrobacterium* induziert die Bildung von Tumoren bei Pflanzen. Als möglicher Faktor, welcher den Gentransfer von *Agrobacterium* zu Pflanzen regulieren könnte, war Agp1 von Interesse. Nach Reinigung des exprimierten Proteins sollte die Assemblierung mit verschiedenen Chromophoren, Photokonversion und Dunkelreversion untersucht werden. Die Hemmung der Chromophorbindung durch die Behandlung mit thiolreaktiven JAA und DTNB war zu testen. Ziel war auch, den natürlichen Chromophor und die Art der Bindung und die Bindestelle an das Protein zu finden. Die Rolle des Agp1 als Histidinkinase in einem Zwei-Komponenten-System war zu ermitteln. Dafür musste der Responsregulator *rap1* (GI:17933925) kloniert, in *E.coli* exprimiert und als Protein gereinigt werden. Die Autophosphorylierung des Agp1 und die Übertragung des Phosphats zu Rap1 war über radioaktive Markierung zu untersuchen. Außerdem war die Stabilität des Histidinphosphats in basischen Lösungen nachzuweisen. Um die Signaltransduktion des Agp1 verstehen zu

können, waren die Responsregulatoren *exsF* (GI:17933925) und *virG* (GI:17939132) bzw. die Sensorkinase *exsG* (GI:17933925) zu klonieren. Die Signalübertragung war ebenfalls durch radioaktive Phosphorylierung zu untersuchen.

