

4 DISKUSSION

4.1 Eigenschaften des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803

4.1.1 Assemblierung, Photokonversion und Kinaseaktivität

Cph1 wurde als erstes prokaryotisches Phytochrom mit biophysikalischen und biochemischen Methoden untersucht (s. 1.3.2). Assemblierung, Photokonversion und lichtregulierte Kinaseaktivität wurden für Cph1 nachgewiesen (Lamparter et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Yeh et al., 1997). Die Assemblierungsreaktionen waren für Cph1 und pflanzliche Phytochrome sehr ähnlich. Die Biline PCB, PΦB und PEB werden autokatalytisch eingebaut (Li et al., 1995; Murphy und Lagarias, 1997; Lamparter et al., 1997), während BV nichtkovalent am Cph1 bindet (Lamparter et al., 2001). Wie bei pflanzlichen Phytochromen (Wu und Lagarias, 1997) wird PCB schneller in Cph1 eingebaut als PEB. Die Pr-aktive Histidinkinase des Cph1 unterscheidet sich von der Pfr-aktiven Serin/Threoninkinase pflanzlicher Phytochrome (Yeh und Lagarias, 1998). Das hier beschriebene, über Nickel-Affinität gereinigte Cph1-Holoprotein zeigt die gleiche Phosphorylierungsreaktion wie bei Yeh *et al.* (Yeh et al., 1997) beschrieben. Die Autophosphorylierung und der Phosphotransfer zum Rcp1 war stärker in der Pr- als in der Pfr-Form. Nach der Reinigung von Cph1 über NGE (Abb. 19) konnte keine Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme (s.3.1.5), dass durch diese Methode Cph1 als Monomer gereinigt wird.

4.1.2 Analytische GFC mit gereinigtem Cph1

Die Gelfiltrations-Chromatographie zeigte Mobilitätsunterschiede zwischen dunkelrot- (Pr) und hellrotbestrahlter (Pfr) Probe sowie zwischen PCB-, PEB-Addukten und dem Apoprotein. Das Elutionsprofil von Cph1 Apo- und Holoprotein war komplex: meist waren neben dem Hauptpeak, welcher der Größe des Monomers oder Dimers entsprach, auch noch Hochmolekulargewichts-Komponenten zu finden. Dieses Muster unterschied sich von anderen veröffentlichten Ergebnissen (Park et al., 2000b), in denen Cph1 mit zwei fast gleichbreiten großen Peaks, die als Monomer und Dimer interpretiert wurden, eluiert. Wir nehmen an, dass diese Unterschiede vom Expressionssystem und von den

Reinigungsmethoden abhängig sind. Die unterschiedliche Mobilität von PCB-Cph1-Pr, PCB-Cph1-Pfr und Apoprotein zeigt, dass jede Spezies eine andere Konformation hat. Dieser Mobilitätsunterschied könnte die Folge von Konformationsänderungen, die die globale Form des Proteins beeinflussen, sein. Der Hauptpeak der PEB- und PCB-Addukte entspricht vom Molgewicht her der Größe des Cph1-Dimers. Da Histidinkinasen als Dimere wirken und PCB-Cph1 Autophosphorylierung zeigt, nehmen wir an, dass der größte Anteil dieses Peaks als Dimer vorliegt. Die apparente Größe des Hauptpeaks vom Apoprotein entspricht der des Monomers. Allerdings wird auch das Apoprotein autophosphoryliert, ein Hinweis darauf, dass dieses zumindest teilweise als Dimer vorliegt. Das durch NGE gereinigte PCB-Cph1 liegt offenbar als Monomer vor. Dies zeigt nach GFC eine geringere Mobilität und keine hochmolekularen Komponenten (Abb. 20). Nach NGE wurde keine Autophosphorylierungsaktivität nachgewiesen (Abb. 23; B). Bei der NGE wird nur ein kleiner Teil des aufgetragenen Phytochroms (ca. 10 %) eluiert. Vermutlich wird durch die alkalischen Bedingungen im Gel ein Teil der Proteine so gefaltet, dass keine Dimerisierung möglich ist, während die Dimere zu größeren Komplexen aggregieren und in dem Gel steckenbleiben. Wenn GFC unter alkalischen Bedingungen durchgeführt wurde, konnte teilweise Monomerisierung des Cph1 festgestellt werden. Das stimmt mit den NGE-Ergebnissen überein. Im GFC-Profil sind Peaks zu erkennen, die der Größe des Monomers entsprechen. Allerdings deutet das Profil auch auf eine deutliche Tetramerisierung der Pfr-Form im Vergleich zur Pr-Form hin (Abb. 21).

4.1.3 Optimierung der Reinigung und Löslichkeit

Die Tertiärstruktur von Phytochrom ist bislang ungeklärt. Die Entdeckung der prokaryotischen Phytochrome brachte eine neue Chance für die Phytochromkristallisation. Cyanobakterielle Phytochrome sind im Vergleich zu pflanzlichen Phytochromen kleiner und lassen sich gut in Bakterien exprimieren. Da eines unserer Ziele die strukturelle Untersuchung von Cph1 durch die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse war, wurde zunächst die Reinigung optimiert und Versuche durchgeführt, um die Aggregation zu reduzieren. Die Wachstumsbedingungen für die transformierten Bakterien wurden optimiert. Es zeigte sich, dass eine niedrigere IPTG Konzentration für die Induktion der Expression und eine kühlere Temperatur während der Expression vorteilhaft war (s. 2.7.1). Unter den neuen Bedingungen war die gesamte Menge des Proteins niedriger aber die

Anteil an unlöslichem Cph1 stark reduziert. Das Extraktionsprotokoll wurde ebenfalls verbessert. Die Aggregate wurden durch die Verwendung des Detergens Natriumcholat (NTCH) in allen Extraktionspuffern und der präparativen GFC deutlich reduziert. Da das Apoprotein stärker aggregierte, wurde Phycocyanobilin unmittelbar nach der Extraktion zugegeben, was die Bildung von Aggregaten ebenfalls verhindert. Durch diese Maßnahmen wurde der SAR (Verhältnis zwischen der Absorption bei λ_{\max} der Pr-Form und der Absorption bei 280 nm) für Cph1 von 0.55 (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 1997) auf 1.0 verbessert. Bei Pflanzenphytochromen, aber auch bei Cph1 und Agp1 entspricht ein SAR von 1 oder größer einer guten Präparation. Diese Änderung des SAR nach Verwendung von GFC lässt sich nicht über eine Reduzierung anderer mitgereinigter Proteine erklären. Andere Faktoren wie die Abnahme der mitgereinigten DNA oder eine Veränderung der Faltung des Cph1 könnten eine Rolle spielen.

Eine Reihe von Detergenzien haben die Löslichkeit von Cph1 positiv beeinflusst, ohne spektrale Störungen zu zeigen (s. 3.1.3). Mit den Detergenzien CHAPS, CYMAL-1, CYMAL-2, C-HEGA8, C-HEGA9 und NTCH wurde die Löslichkeit von Cph1 verbessert. Das Gelfiltrationsprofil war mit NTCH am besten, d.h. wenig Aggregat und viel Dimer. Mit CHAPS eluierte das Chromoprotein zum großen Teil mit einem Molekulargewicht (105 kDa), das dem des Monomers entspricht. NTCH bzw. CHAPS sind anionische bzw. zwitterionische Detergenzien, d.h. sie sind stark amphiphil und können dadurch Protein denaturieren. CHAPS könnte sich an hydrophobe Reste des Proteins binden oder mit hydrophoben Interaktionen in dem Phytochrom, welche an der Dimerisierung beteiligt sind, binden und so zur Monomerisierung führen. NTCH könnte wiederum hydrophobe Verbindungen zwischen verschiedenen Dimeren verhindern und so die Aggregation reduzieren. Andere Detergenzien beeinträchtigen offenbar hydrophobe Chromophor-Protein Interaktionen, so dass es zu spektralen Veränderungen kommt. Durch die Variation der Konzentration wäre es unter Umständen möglich, auch andere Detergenzien einzusetzen, die sich positiv auf die Phytochromlöslichkeit auswirken könnten. Abgesehen von der Verbesserung der Löslichkeit zeigten die Versuche mit den Detergenzien, dass sowohl bei der Chromophor-Protein Interaktion als auch bei der Dimer-Bindung und bei der Aggregatbildung hydrophobe Wechselwirkungen eine wichtige Rolle spielen.

Der relativ hohe SAR wurde vor allem durch die präparative GFC erreicht. Dies brachte eine Erhöhung des relativen Gehalts von löslichem Cph1 und eine Reduktion der Aggregate.

4.2 Cph1-Konformationsanalyse durch limitierte Proteolyse

4.2.1 Unterschiede zwischen Pr und Pfr

Phytochrome bestehen aus verschiedenen Domänen, welche eine definierte, aber zum Teil noch nicht eindeutig bestimmte Funktion haben. Limitierte Proteolyse hat für eukaryotisches PHYA aus *Avena sativa*, *Pisum sativum* und *Oryza sativa* gezeigt, dass Phytochrom aus zwei großen Subdomänen besteht (Jones et al., 1985; Jones A M. et al., 1986) und dass die Photokonversion strukturelle Änderungen an der C-Terminus-Domäne (Lagarias und Mercurio, 1985; Grimm et al., 1988; Nakazawa et al., 1993) und N-Terminus-Domäne (Jones und Quail, 1989) induziert. Die Existenz von unterschiedlichen Banden nach Hellrot- (Pfr) bzw. Dunkelrotbestrahlung (Pr) und der Verdau mit verschiedenen Proteasen deutet auf Änderungen der Tertiärstruktur des Cph1 während der Photokonversion hin. Von den vielen potentiellen Schnittstellen (49 Glutaminsäure für V8 bzw. 36 Arginin und 27 Lysin für Trypsin) werden nur wenige sofort angegriffen. Offenbar sind im nativen Zustand nur wenige zur Umgebung exponiert. Die meisten sind in dem nativen Protein geschützt.

Nach Trypsin-Verdau erschienen drei diskrete Chromopeptid-Fragmente von 52 (F1), 49 (F2) und 43 (F3) kDa. F1 wurde bevorzugt in der Pfr Form gebildet, die anderen beiden in der Pr-Form (Tab. 6). Die C-terminale Schnittstelle des Fragments F1 liegt in der Gelenkregion zwischen PHY- und Histidinkinasedomäne. Diese Gelenkregion, welche als Trennungsbereich zwischen N- und C-terminaler Region definiert wurde, liegt bei pflanzlichem Phytochrom zwischen Position 590 und 600 und wird dort von verschiedenen Proteasen angegriffen (Grimm et al., 1988; Nakazawa et al., 1993). Allerdings wurde dort kein Unterschied zwischen Pr und Pfr gefunden. Bei Cph1 ist die Gelenkregion in der Pfr-Form offenbar stärker exponiert. Die Chromopeptide F2 und F3 haben als C-terminale Schnittstelle R⁴⁷⁹. Diese Aminosäure liegt in der PHY-Domäne. Interessanterweise ist das Arginin bei pflanzlichen und bakteriellen Phytochromen hoch konserviert (Abb. 32). Die Fragmente F2 und F3 werden nach Dunkelrotbestrahlung (Pr-Form) gebildet. Bei spektralen Messungen nach Trypsinverdau und Photokonversion stellte sich heraus, dass die Bildung der F2- und F3-Fragmente auch aus dem F1-Chromopeptid, welches nur nach einer ersten Hellrotbestrahlung detektiert wurde, gebildet werden (Abb. 29). Wenn *full*

length Cph1 zuerst als Pfr zu F1 verdaut und dann zu Pr konvertiert wurde, wurden die F2/F3 Fragmenten wesentlich schneller gebildet als bei direktem Verdau von *full length* Cph1-Pr. Der Abbau von F1-Pr zu F2/F3 verläuft also viel schneller als der Abbau von *full length* Cph1-Pr zu F2/F3. Offensichtlich behindert die Histidinkinasedomäne, welche in F1 fehlt, die Proteolyse an R472 (und R63/R80). Außerdem wird der Abbau in der Pfr Form behindert.

Cph1 wurde auch nach NGE-Reinigung mit Trypsin verdaut. Wie unter 3.3.5 gezeigt, lag Cph1 nun in der Monomer-Form vor. In diesem Fall wurde unter beiden Lichtbehandlungen kein F1-Fragment gebildet, beide Proben wurden direkt zu F2 und F3 abgebaut. Offenbar werden die F2 und F3 Schnittstellen durch die Monomerisierung exponiert. Für das Deletionsprotein Cph1 Δ 2 (Chromophor-Modul), welches kein Histidinkinase-Modul enthält, wurde postuliert, dass Pr als Monomer und Pfr als Dimer vorliegen (Otto et al., 2003). F1 ist etwas kürzer als Cph1 Δ 2. Die Ergebnisse der Proteolyse lassen sich jedoch sehr gut damit erklären, dass F1-Pr ebenfalls als Monomer vorliegt, welches nach Photokonversion zu Pfr dimerisiert.

Ein chromophorfrees Fragment von ca 31 kDa wurde am Anfang der Proteolyse mit Trypsin bei beiden Lichtbehandlungen detektiert. Dieses Fragment enthält keinen Chromophor und entspricht in etwa der Größe des Histidinkinase-Moduls (28 kDa). Es war nach 20 min Inkubationszeit abgebaut. Die Bande ist im Vergleich zu den Chromopeptid-Banden viel schwächer. Das Fragment wird also offenbar schneller verdaut. Diese Ergebnisse sprechen für eine kompaktere Form des N-terminalen Chromophormoduls im Vergleich zu dem Histidinkinase-Modul.

Der Verdau mit V8 brachte ebenfalls Unterschiede zwischen Pr und Pfr zutage. Nach 60 min V8-Verdau waren fünf deutliche Chromopeptide von 47 (F4), 35 (F5), 34 (F6), 26 (F7) und 24 (F8) kDa zu erkennen. Die C-terminale Schnittstellen dieser Fragmente befinden sich zwischen GAF und PHY-Domäne oder auf der PHY-Domäne (Abb. 33). In diesem Bereich wurde bei mit Trypsin oder V8-behandeltem pflanzlichen PHYA keine Schnittstelle gefunden (Grimm et al., 1988; Schendel et al., 1989; Nakazawa et al., 1993). In allen analysierten Fragmenten wurde das Histidinkinase-Modul verdaut. Das Gelmuster zeigte, dass die Region zwischen GAF- und PHY-Domäne nach der Photokonversion zur Pr-Form exponiert ist.

4.2.2 Spektrale Änderungen

Wie erwartet, werden die Absorptionsspektren von Pr- und Pfr-Cph1 während der Trypsin- und V8-Verdaue verändert. Im Allgemeinen führt Proteolyse zu einer hypsochromen Verschiebung der Absorption und einer Abnahme der Extinktionskoeffizienten. Diese Abnahme fand schneller für die Pfr-Form statt, obwohl die Pr-Form schneller degradiert wurde. Die Photokonversionsmessungen während des Trypsinverdaus (Abb. 29) zeigten, dass das F1-Fragment dem *full-length* Cph1 spektral ähnelt. Die folgenden Spektren zeigten sowohl für Pr- als auch für Pfr-Form eine Blaushift des Absorptionsmaximums und eine Absorptionsabnahme der Pfr-Form nach 60 min Verdau (Abb. 29). Die oben beschriebenen Übergänge korrelieren mit dem Abbau von F1 zu den F2- und F3-Fragmenten. Die Verschiebung und die Absorptionsabnahme resultiert aus dem Verdau am N-terminalen R⁵⁵, R⁶³ und R⁸⁰ bzw. C-terminalen R⁴⁷² und R⁵²⁰. Bei den V8-Experimenten wiederholt sich ein Blaushift von Pr- und Pfr sowie der Absorptionsverlust der Pfr-Form (Abb. 30). Die Intensität der F4-Bande verringert sich etwas, während die anderen Banden unverändert bleiben. Der Verlust an Pfr-Absorption zwischen der ersten und der zweiten Messung ist höchstwahrscheinlich auf den Verlust von F4 zurückzuführen. Die Differenzspektren der F4-, F5-, F6-, F7- und F8-Fragmente nach dem V8-Verdau, welche nach Blau verschoben sind, ähnelten dem *full-length* Cph1-Spektrum mehr als die F2/F3-Differenzspektren. Das F4-Fragment war im Vergleich zur Kontrolle spektral unverändert. Das Spektrum der F6/F8-Fragmente (Abb. 30; Proben B,C,D) ähnelte dem des F4-Fragmentes, wobei das Pfr-Absorptionsmaximum reduziert war. Dass die F6/F8-Fragmente Photoaktivität zeigen, deutet an, dass die deletierten Aminosäuren nach der Assemblierung des *full length* Cph1 mit dem Chromophor nicht für die Photokonversion notwendig sind.

4.2.3 Mutanten-Analyse und Phosphorylierung

Auf der Basis vorliegender Ergebnisse wurden 6 Mutanten hergestellt und untersucht. Alle Mutanten (E323D, E323P, R472A, R472P, R520A, R520P) assemblieren PCB und zeigen Pr-Pfr-Photokonversion. Die Mutanten E323P, R472A und R472P zeigten keine unterschiedlichen Verdaumuster nach Dunkelrot- bzw. Hellrotbestrahlung und proteolytischer Behandlung. Dieses Ergebnis bestätigte die massenspektrometische Analyse. Es ergab sich ein Verdaumuster, bei dem die Fragmente F2/F3 bei Trypsin in der Mutante R472P, R472A und das Fragment F4 bei V8 in der Mutante E323P fehlten. Im

Gegensatz dazu zeigten die Mutanten E323D, R520A und R520P wie die Wildtyp-Kontrolle einen Musterunterschied zwischen Pr und Pfr. Bei E323D ist dieser Unterschied zu erwarten, weil V8 auch an Aspartat schneiden kann. Die Mutanten R520A und R520P zeigten das gleiche Muster wie Cph1. Neben R⁵²⁰ befindet sich ein R⁵²⁴ in der Gelenkregion, welches vermutlich ebenfalls angegriffen werden kann. Ein Verdau 4 Aminosäuren weiter C-terminal würde auf SDS-Gelen nicht detektiert werden können.

Die analytische GFC zeigte für die Mutanten R472A, R472P, R520A und R520P ein verändertes Elutionsprofil im Vergleich zum Wildtyp-Protein (Abb. 40). Cph1 wird durch die Mutationen an R⁴⁷² monomerisiert. Die Monomerisierung des Phytochroms bei R472P und teilweise bei R472A zeigt, dass diese Aminosäure in dem Dimerisierungsprozess eine Rolle spielt. Die Mutanten R520A und R520P bilden offenbar Tetramere. Diese Stelle am Ende der Gelenkregion und vor der Histidinkinasedomäne könnte in der Dimerisierung direkt eingebunden sein. Durch die Mutationen an R⁵²⁰ könnte die Faltung des Phytochroms so verändert sein, dass sich leichter Tetramere bilden.

Bei allen Mutanten war das Autophosphorylierungsmuster des Cph1 verändert. Das bedeutet, dass durch die Mutationen sensitive Regionen des Cph1 verändert wurden. In allen Fällen war das Pr/Pfr-Phosphorylierungsverhältnis reduziert (Abb. 38). Die lichtregulierte Autophosphorylierung des Cph1 wurde also bei allen Mutanten negativ beeinflusst. Die Phosphorylierungsaktivität von Pfr war bei den Mutanten R472P, E323P und E323D höherer als beim Wildtyp. Von diesen drei Mutanten zeigt R472P das niedrigste Pr/Pfr-Phosphorylierungsverhältnis. Wir gehen davon aus, dass die Kinaseaktivität der Cph1-Pfr-Form aktiv inhibiert wird. Bei R472A, R520A und R520P war das Signal sowohl für Pr als auch für Pfr sehr stark reduziert im Vergleich zum Wildtyp und den anderen Mutanten. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Gelenkregion um R⁵²⁰ und dem Ende der PHY-Domäne um R⁴⁷⁰ eine wichtige Rolle bei der lichtregulierten Autophosphorylierung spielt.

4.2.4 Deletionsproteine aus Cph1

Von pflanzlichem PhyA wurden N-terminale Deletionschromopeptide exprimiert (bis Aminosäure 74 und 78 bzw. 399), welche normale Lyaseaktivität und Photokonversion zeigten (Cherry et al., 1993; Bhoo et al., 1997). Andere Deletionsproteine wie ein 16 kDa Fragment mit kürzerer N-terminaler Region (ab ca. Aminosäure 200) wurden als photochromisch aktiv beschrieben (Jones und Quail, 1989). Diese Fragmente entstammen

aus einer Proteolyse. Für Cph1 wurde ein N-terminales 32.5 kDa Fragment (Aminosäuren 26 bis 314) konstruiert, welches dem *full-length* Cph1 spektral ähnelt (Park et al., 2000c). Nach langen V8-Verdauen wurden in dieser Arbeit drei Chromopeptide von 34 (F6), 26 (F7) und 24 kDa (F8) (Abb. 28) nachgewiesen, die alle spektral aktiv waren. Das F6-Fragment T17-E323 wurde in einen Expressionsvektor kloniert. Zusätzlich wurde ein Expressionsklon, der M1-E323 exprimiert, hergestellt. Bei beiden ist die Absorption der Pfr Form reduziert. Die Absorptionsabnahme der Pfr-Form bei M1-E323 und T17-E323 im Vergleich zu Pfr-Cph1 zeigte, dass die C-terminale deletierte Region eine wichtige Rolle bei der Pfr-Konformationsbildung hat.

Die Assemblierung des PCB mit dem T17-E323 Expressionskonstrukt war sehr ineffizient im Vergleich zu M1-E323. Limitierte Proteolyse mit pflanzlichen Phytochromen zeigte, dass das N-terminale 6-10 kDa Fragment eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit dem Chromophor und der Stabilisierung der Pfr Struktur spielt (Manabe K und Nakazawa M, 1997). Ein Sequenzvergleich zwischen pflanzlichem PhyA und Cph1 zeigte, dass die ersten 17 Aminosäuren von Cph1 (~ 2 kDa) dem N-terminalen 6 kDa Fragment pflanzlicher PhyA's entsprechen. Dieser Vergleich weist auf eine Regulierung des 2 kDa-Fragments bei der Chromophorbindung und der Stabilisierung der Pfr-Form in Cph1 hin.

Das kleinste photoaktive Fragment, F8, wurde noch nicht kloniert, da dessen Sequenz noch nicht vorliegt. Es ist wahrscheinlich, dass dem F8-Fragment (24 kDa) das Histidinkinase-modul, ein Teil der PHY-Domäne und ein Teil der N-terminalen GAF-Domäne fehlen. Die GAF-Domäne ist für die Lyaseaktivität essentiell (Wu und Lagarias, 2000). Ein Teil dieser Region fehlt vermutlich in F8. Nach der Assemblierung des undeletierten Proteins hätte eine Deletion im Bereich der Lyaseaktivität nur noch geringen Einfluss auf die Photokonversion und die Proteinstruktur. Höchstwahrscheinlich würde ein F8-Expressionskonstrukt keine Assemblierung und Photokonversion zeigen.

4.3 Eigenschaften des Phytochroms Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens*

Das Genom des Proteobakteriums *Agrobacterium tumefaciens* C58 wurde Ende 2001 publiziert (Goodner et al., 2001; Wood et al., 2001). Eines der Gene, *agp1* (*Agrobacterium phytochrome 1*), das für ein Phytochromprotein kodiert, wurde in einen Expressionsvektor kloniert und in *E.coli* exprimiert. Danach wurde Agp1 extrahiert und gereinigt, um biochemisch charakterisiert zu werden. Im Vergleich zu Cph1 gab es weniger Aggregationsprobleme während der Extraktion und Reinigung. Bei Agp1 wurde ebenfalls ein SAR (Absorption bei λ_{\max} der Pr-Form im Verhältnis zur Absorption bei 280 nm) von 1.0 erreicht. Aufgrund dieser Unterschiede ist möglicherweise Agp1 besser für Kristallisierungsexperimente geeignet als Cph1.

4.3.1 Assemblierung, Photokonversion und Dunkelreversion

Die Assemblierung der Chromophore BV, PCB und PEB mit dem gereinigten Agp1-Apoprotein wurde getestet. Die Spektren von BV- und PCB-Agp1 zeigten die Bildung von photoaktivem Agp1-Holoprotein, während PEB-Agp1 nicht photochromisch war. Das Absorptionsmaximum für PCB-Agp1 (686 nm; s. Tab. 8) ist gegenüber dem von PCB-Cph1 nach Rot verschoben. Dies liegt daran, dass PCB nicht kovalent mit dem Protein verknüpft wird. In dieser Hinsicht ähnelt Agp1 anderen Phytochromen wie *Deinococcus* BphP (Davis et al., 1999) oder *Calothrix* CphB (Jorissen et al., 2002b). Für das BV-Addukt ist das Absorptionsmaximum (701 nm) noch weiter nach Rot verschoben, was daran liegt, dass BV mehr Doppelbindungen hat. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass für die kovalente Kopplung von BV und Agp1 ein Cystein notwendig ist (Abb. 48).

Dunkelreversion ist seit langem von pflanzlichen Phytochromen bekannt (Butler et al., 1963; Mancinelli, 1994; Sweere et al., 2001). Bei den cyanobakteriellen Phytochromen PCB-Cph1 (Lamparter et al., 1997) und PCB-CphA (Jorissen et al., 2002b) wurde keine Dunkelreversion beschrieben. Die Dunkelreversion könnte die Existenz einer einzigen thermostabilen Form eines ursprünglichen Photorezeptors andeuten, wobei auch eine spezifische Entwicklung dieser Eigenschaft des Agp1 in *Agrobacterium* in Frage kommt.

In Pflanzen, Pilzen und Bakterien werden bestimmte Chromophore synthetisiert, welche mit den entsprechenden Phytochromen assemblieren können. In Pflanzen katalysiert Häm-Oxygenase die Synthese von BV aus Häm (Muramoto et al., 1999). Im nächsten Schritt

wird BV von einer ferredoxin-abhängigen PΦB-Synthase zu 3Z-PΦB reduziert (Terry et al., 1995). In Cyanobakterien und Rotalgen kommen verschiedene ferredoxinabhängige Bilinreduktasen vor, welche die Reduktion von BV zu PCB oder PEB katalysieren (Frankenberg et al., 2001). In Agrobakterien wurde mit BLASTP ein Gen für Häm-Oxygenase (GI accession n: 15157689) gefunden, allerdings scheint es keine Biliverdinreduktase zu geben. Daher muss man annehmen, dass BV der natürliche Chromophor von Agp1 ist. Wie in Abb. 45 gezeigt, assembliert Agp1 mit BV, PCB und PEB. Das C-3' Atom des Ringes A des Chromophors (Abb. 3) ist in pflanzlichen und manchen cyanobakteriellen Phytochromen kovalent an ein konserviertes Cystein gebunden. Andere cyanobakterielle (Hübschmann et al., 2001b) und alle proteobakteriellen (Bhoo et al., 2001; Jiang et al., 1999) Phytochrome haben an dieser Stelle kein Cystein. Agp1 besitzt an homologer Stelle ein Valin. Sequenzvergleiche von Agp1, Agp2, proteobakteriellen Phytochromen (BphP) und cyanobakteriellen Phytochromen (CphB) zeigen, dass diese Phytochrome ein Cystein im N-Terminus besitzen, das die Bindungsstelle des Chromophors sein könnte. Um diese Hypothese zu beweisen, wurden bei Lamparter *et al.* alle drei Cysteine (20, 279 und 295) mutiert (Lamparter et al., 2002). Diese Ergebnisse und andere Untersuchungen bestätigten, dass Cys²⁰ die Bindungsstelle des Chromophors ist. Cys²⁰ liegt außerhalb der GAF-Domäne (von S¹⁴² bis E³²⁰), die das chromophorbindende Cystein pflanzlicher Phytochrome enthält. Nach der Entdeckung von Lamparter *et al.* 2002 ist die Region bei Cys20 ein Teil der Chromophor-Tasche. Ein Sequenzvergleich mit anderen Phytochromen zeigte, dass das Fragment zwischen Position 18 und 50 von Agp1 den höchsten Grad an Homologie hat. Cys²⁰ scheint in allen nicht-pflanzlichen und einigen cyanobakteriellen Phytochromen konserviert zu sein. Diese Daten zeigen, dass Cys²⁰ als Chromophor-Bindestelle in BV bindenden Phytochromen verwendet wird.

4.3.2 Chromophorbindung

Chromophore sind in der Regel kovalent an Phytochrom gebunden. Die erste Evidenz dafür, dass BV an ein Cystein bindet, kam aus Blockierungs-Studien mit JAA und DTNB. Die Chromophorbindung wurde durch JAA, welches mit Cystein reagiert, inhibiert. Allerdings reagiert JAA auch mit Histidin. DTNB, welches spezifischer mit Cystein reagiert, inhibiert ebenfalls die kovalente Bindung des BV (Abb. 48). Das nach Blockierung gebildete BV-Addukt zeigte dennoch Photokonversion, allerdings mit niedrigerem Extinktionskoeffizienten und Pfr:Pr Absorptionsverhältnis. Die

Blockierungsexperimente mit DTNB und JAA (s.3.8.2) lassen vermuten, dass BV kovalent an ein Cystein gebunden ist. Die Chromophorbindungsversuche mit PCB und PEB zeigten, dass nur ein geringer Teil dieser Chromophore kovalent mit dem Apoprotein verknüpft werden. In diesem Fall könnte eine Bindung des Chromophors an das homologe Histidin, welches von Davis et al. (1999) als Bindestelle des *DrBphP* vorgeschlagen wurde, in Frage kommen. Der gebundene Anteil von PEB war dabei etwas höher als der von PCB. Die chemische Struktur zwischen PCB und PEB unterscheidet sich in der Seitenkette des Ringes D. Daher war vermutet worden, dass diese Seitengruppe für die kovalente Verknüpfung benutzt wird. Allerdings wurde später gezeigt, dass die Vinyl-Gruppe des Ringes A für die kovalente Bindung von BV benötigt wird (Lamparter et al., 2003).

4.3.3 Kinaseaktivität und Signaltransduktion

Eine stärkere Phosphorylierung des Apoproteins zeigte, dass durch die Integration des Chromophors die Phosphorylierung inhibiert wird. Die Inhibition wird durch die Photokonversion zu Pfr noch verstärkt. Da die Histidinkinasen immer als Dimer wirken, in denen die ATPase eines Monomers den Histidin-Rest des anderen Monomers phosphoryliert, könnte diese Inhibition durch die Verbreiterung der Distanz zwischen beiden Einheiten erklärt werden. Der totale Verlust des Phosphats nach Säurebehandlung des autophosphorylierten Agp1 zeigte, dass ein Histidin und nicht z.B. ein Serin oder ein Threonin bei der Kinaseaktivität phosphoryliert wird. Wie bei den cyanobakteriellen Phytochromen Cph1 und CphA (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Hübschmann et al., 2001b) wird Pr stärker als Pfr phosphoryliert, was für eine aktive Wirkung der Pr-Form in der Zelle spricht. Diese Ergebnisse zeigen, dass hier die Pfr-Form stärker phosphoryliert wird als die Pr-Form. Bhoo et al. (2001) hatten für *Pseudomonas BphP* gezeigt, dass dieses Phytochrom wie Agp1 eine Histidinkinase ist, welche BV als natürlichen Chromophor bindet. Allerdings war bei diesem Phytochrom die Pfr Form stärker phosphoryliert als die Pr Form.

Die Autophosphorylierung des Agp1 und die Übertragung des Phosphats zu einem Responsregulator zeigen, dass dieses Phytochrom als lichtregulierte Histidinkinase wirken kann, welche zu einem Zwei-Komponenten System gehört. Eine effektive Autophosphorylierung des Apoproteins und der Holoproteine PCB-Agp1 bzw. BV-Agp1 sowie die Übertragung des Phosphats zum Responsregulator Rap1 bzw. ExsF zeigt aller Wahrscheinlichkeit nach eine phosphatübertragungsregulierte Signaltransduktionskaskade.

Sowohl die Autophosphorylierung des Apo- und Holo-Agp1 als auch die Phosphatübertragung zum Responsregulator waren stärker bei Agp1 als bei Cph1. Der Grund für diese Unterschiede könnte an der evolutionären Entwicklung der Cyano- und Proteobakterien liegen.

Es ist noch unklar, welche biologischen Faktoren von Agp1 und Agp2 gesteuert werden. In einer Arbeit von Zambre et al. (2003) wurde gezeigt, dass der Infektionsprozess lichtabhängig ist (zumindest unter bestimmten Bedingungen). Die agrobakteriellen Phytochrome könnten als lichtregulierte Chromoproteine den Infektionsprozess beeinflussen. Diese Fragen können über *knock-out* Studien weiter untersucht werden.

