

**Photochemische und strukturelle
Untersuchungen neuartiger Bilin-bindender
Photorezeptoren**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

M.Sc. Alexander Gutt

aus Düsseldorf

Krefeld, April 2016

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2012 bis Februar 2016 am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion, ehemals Max-Planck-Institut für Bioorganische Chemie, in Mülheim an der Ruhr unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Gärtner.

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:

Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

Korreferent:

Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2016

Für Alexander Fritz

*„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.“*

Werner von Siemens

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, ohne deren großartige Unterstützung das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein großer und aufrichtiger Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Gärtner für die Überlassung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung und großartige Unterstützung während der gesamten Bearbeitungszeit. Zudem danke ich ihm für die vielen hilfreichen Diskussionen, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge sowie die Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger danke ich vielmals für die freundliche Übernahme des Korreferats dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Prof.ssa Aba Losi, Frau Prof.ssa Stefania Abbruzzetti und Herrn Prof. Cristiano Viappiani für die wertvolle Unterstützung und die hervorragende Betreuung während meiner mehrmaligen Aufenthalte in Parma.

Ich möchte mich auch recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen und Frau Dr. Katrin Anders für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön natürlich an mein Team der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse. Dazu zählen Herr Norbert Dickmann, Herr Leslie Currell, Herr Dirk Kampen und Herr Christian Klucken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dagmar Lenk, Herrn Dr. Igor Chizhov und Herrn Dr. Johnny Hendriks für die Einweisung in die Datenauswertung der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse und die stetigen Verbesserungsvorschläge bedanken.

In der Arbeitsgruppe „Gärtner“ herrschte jederzeit eine sehr gute Arbeitsatmosphäre mit viel Spaß und gegenseitiger Unterstützung. Dafür möchte ich mich bei allen, über die Jahre doch recht vielen Mitgliedern, recht herzlich bedanken. Besonders hervorzuheben sind dabei Frau Dr. Xiuling Xu und Frau Dr. Kun Tang, die mir eine komplett neue Sicht auf

das praktische Arbeiten im Labor verschafft haben und dadurch maßgeblichen Anteil an den erfolgreichen experimentellen Arbeiten hatten.

Danken möchte ich auch meinen Eltern und meiner Schwester, die mir unterstützend zur Seite standen.

Zu guter Letzt möchte ich den beiden wichtigsten Personen in meinem Leben danken. Ohne den Rückhalt und die bedingungslose Liebe meiner Frau Elisabeth und meines Sohnes Alexander Fritz wäre diese Arbeit nie entstanden.

Publikationen

Raffelberg S., Gutt A., Gärtner W., Mandalari C., Abbruzzetti S., Viappiani C., Losi A.
The amino acids surrounding the flavin 7a-methyl group determine the UVA spectral features of a LOV protein

Biological Chemistry **394**: 1517-1528 (2013)

Xu X.-L., Gutt A., Mechelke J., Raffelberg S., Tang, K., Miao D., Valle L., Borsarelli C., Zhao K.-H., Gärtner W.

Combined Mutagenesis and Kinetics Characterization of the Bilin-Binding GAF Domain of the Protein Slr1393 from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803

ChemBioChem **15**:1190-1199 (2014)

Anders K., Gutt A., Gärtner W., Essen L.-O.

Phototransformation of the Red Light Sensor Cyanobacterial Phytochrome 2 from *Synechocystis* Species Depends on Its Tongue Motifs

The Journal of Biological Chemistry **289**: 25590-25600 (2014)

Kraiselburd I., Gutt A., Losi A., Gärtner W., Orellano E.G.

Functional Characterization of a LOV-Histidine Kinase Photoreceptor from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

Photochemical and Photobiological Sciences. **91**:1123-1132 (2015).

Zusammenfassung

Photorezeptoren sind Licht-detektierende Systeme, die einen äußeren Lichtreiz wahrnehmen und in ein physiologisches Signal umwandeln. Dabei nehmen sie vor allem die Intensität, Wellenlänge, Periodizität und Richtung des Lichts wahr. Hier wird besonders die Klasse der Phytochrome bearbeitet. Diese können in fünf wohldefinierte Familien unterteilt werden, welche in erster Linie durch die Struktur der Chromophore und die jeweilige Photochemie bestimmt werden. Eine dieser Familien sind die ‚klassischen‘ Phytochrome, welche wichtige regulatorische Aufgaben in der Photomorphogenese von Pflanzen übernehmen. Sie zeigen in ihrem photosensorischen Bereich eine PAS-GAF-PHY Struktur und tragen einen offenkettigen Tetrapyrrol- (Bilin) Chromophor, der kovalent an ein Cystein in der GAF-Domäne gebunden ist. In den letzten Jahrzehnten konnten derartige kanonische Phytochrome zusätzlich in Bakterien und Pilzen nachgewiesen werden.

Diese Thesis beinhaltet insbesondere die kinetische Untersuchung verschiedener Photozyklen in Bezug auf mögliche Intermediate und deren Lebenszeiten. Dabei werden klassische Phytochrome aus den Familien der cyanobakteriellen (Cph), der bacteriophytochromen (BphP) und der pilzlichen (Fph) Phytochrome als auch die neuartigen Cyanobacteriochrome (CBCRs) untersucht. Die zeitaufgelösten kinetischen Absorptionsmessungen wurden mittels der Methode der Blitzlichtphotolyse durchgeführt.

i) Vergleich der Photozyklen klassischer Phytochrome

Der erste Teil dieser Thesis befasst sich mit der vergleichenden Gegenüberstellung von vier Phytochromen aus drei Phytochrom-Unterfamilien. Untersucht wurde *SynCph2(1-2)* aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, welches eine GAF-GAF Bidomäne besitzt, wobei neben der Charakterisierung des Wildtyp-Proteins insbesondere die stabilisierende Wirkung der GAF2-Domäne auf den Bilin-Chromophor mit Hilfe von Punktmutationen genauer untersucht wurde. Daneben wurden zwei Bacteriophytochrome, PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa*, welches zu den bathy-Phytochromen zählt, sowie ein pilzliches Phytochrom, FphA aus *Aspergillus nidulans*, spektroskopisch charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Alanin-Mutanten S385A und W389A von *SynCph2(1-2)* einen deutlichen Einfluss auf den Photozyklus und vor allem auf die Bildung des P_{fr} -Zustandes haben, wohingegen sich der Austausch in eine ähnlich große und

aromatische Aminosäure (W389F) nicht auswirkt. Der bathychrome Charakter von PaBphP wirkt sich nicht auf den Photozyklus aus und ist sehr vergleichbar zu den kanonischen Phytochromen wie CphA bzw. Cph1, wobei die Konversion aus dem Grundzustand in das Photoprodukt keine sichtbaren Intermediate aufzeigt. PstBphP1 und FphA fehlt im Vergleich zu den kanonischen Phytochromen ein Intermediat beim Übergang in den P_{fr} -Zustand was auf einen unterschiedlichen Prozess bei der Bildung des Photoprodukts hindeutet. Die Rückkonversion verläuft bei PstBphP1 ‚klassisch‘, wohingegen bei FphA keine Intermediate identifiziert werden können.

ii) Spektroskopische Untersuchung dreier GAF-Domänen der CBCRs

Im zweiten Teil der Arbeit werden drei Vertreter der Cyanobacteriochrome untersucht. Die CBCRs nehmen in der Klasse der Phytochrome eine außergewöhnliche Stellung ein. Dies zeigt sich u.a. durch ihre Fähigkeit, mit Hilfe einer einzelnen GAF-Domäne den Chromophor kovalent zu binden und einen reversiblen, photochromen Photozyklus zu durchlaufen. Untersucht wurde die GAF3-Domäne von Slr1393 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, die einen Rot/Grün-Photozyklus zeigt, die GAF1-Domäne aus AphC aus *Nostoc* sp. PCC 7120, welche einen klassischen Rot/Dunkelrot-Photozyklus aufweist, sowie die GAF3-Domäne aus demselben Organismus mit einem außergewöhnlichen Rot/Orange-Photozyklus, der durch die Erstellung zweier Punktmutationen in der Nähe des Chromophors (S487R und S487G) genauer untersucht wurde. Zusätzlich wurde bei 1393gaf3 der Einfluss der Chromophor-Bindung bei Zugabe *in vivo* als auch *in vitro* genauer untersucht. Genauere Informationen über Chromophor-Protein Wechselwirkungen konnten durch drei Mutanten (R508N, D531T und N532Y) erhalten werden, die bereits großen Einfluss auf die steady-state Absorption des P_g -Photoproduktes aufweisen.

Die CBCR GAF-Domänen zeigen im Vergleich zu den klassischen Phytochromen einen deutlich vereinfachten Photozyklus, der vermutlich auf die geringe Proteingröße und die dadurch mögliche hohe Flexibilität zurückzuführen ist, die es leichter möglich macht, der durch die Chromophor-Isomerisierung erzwungenen Konformationsänderungen zu folgen. Das außergewöhnliche thermisch sehr instabile und deutlich weniger hypsochrom verschobene Photoprodukt der GAF3-Domäne von AphC lässt sich mit einem möglicherweise gehinderten Intermediat eines rot/grün Photozyklus erklären. Die generierten Mutationen bewirkten eine deutlich stabilisierende Wirkung auf die thermische Rückkehr in den Grundzustand.

Abstract

Photoreceptors are light-detecting systems that convert the external stimulus light into a physiological signal by sensing the intensity, wavelength, periodicity and direction. The focus in this work was set on the phytochrome photoreceptors. Phytochromes can be separated into five well-defined families, specified for their chromophore structure and their respective photochemistry. One of these families, the ‘classical’ phytochromes, comply important regulatory functions in the photomorphogenesis of plants. Their light-sensing part consists of a PAS-GAF-PHY structure with an open-chain tetrapyrrole (bilin) chromophore covalently bound to a cysteine in the GAF domain. In recent decades canonical phytochromes with such domain architecture could also be detected in bacteria and fungi.

This thesis is dedicated in particular to kinetic studies of various photocycles aiming at identification of potential intermediates and their lifetimes. Therefore, classical phytochromes from the families of cyanobacterial (Cph), bacteriophytochromes (BphP) and fungal (Fph) phytochromes as well as the novel cyanobacteriochromes (CBCRs) were examined. The time-resolved kinetic absorption measurements were performed using the method of flash photolysis.

i) Comparison of the photocycles of classical phytochromes

The first part of this thesis deals with the comparative analysis of four phytochromes belonging to three phytochrome-subfamilies. The examination of *SynCph2*(1-2) from *Synechocystis* sp. PCC 6803, carrying a photosensory GAF-GAF bidomain, is based on the characterization of the wildtype-protein and in particular on the mutational analysis of the stabilizing effect on the chromophore of the GAF2 domain. In addition, two bacteriochromes, PstBphP1 from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und PaBphP from *Pseudomonas aeruginosa* (member of bathy-phytochromes) as well as a fungal phytochrome, FphA from *Aspergillus nidulans*, had been spectroscopically characterized.

Results reveal an important effect of position 385 and 389 of *SynCph2*(1-2) on the photocycle. Exchange of these amino acids into alanines (S385A and W389F) affect especially the formation of the P_{fr}-Photoprodukt, whereas the exchange at position 389 into a similarly large, aromatic amino acid (W389F) has no noticeable effect. The bathochromic nature of PaBphP does not alter the photocycle significantly. Its light-driven conversions are very comparable to those of canonical phytochromes such as CphA or Cph1, although

the photoconversion from the parent state to the photoproduct shows no noticeable intermediates. Both PstBphP1 and FphA are missing an intermediate in the transition to the P_{fr} -state (in comparison to canonical phytochromes) suggesting different processes in the formation of the photoproduct. The reverse conversion from PstBphP1 proceeds in a ‘classical’ manner, whereas FphA shows no identifiable intermediates.

ii) Spectroscopic investigation of three GAF domains from CBCRs

In the second part of this work, three representatives of the Cyanobacteriochromes were investigated. The CBCRs assume an exceptional position within the phytochrome photoreceptors. This is apparent, among other things, by their ability to covalently bind the chromophore and undergo a reversible photochromic photocycle with help of only one GAF domain. This study comprised the GAF3 domain from Slr1393 of *Synechocystis* sp. PCC 6803, showing a red/green photocycle, the GAF1 domain from AphC of *Nostoc* sp. PCC 7120, showing a classical red/dark red photocycle, as well as the GAF3 domain from the same organism with an exceptional red/orange photocycle. For this CBCR-GAF domain, also two point mutations located close to the chromophore (S487R and S487G) were included into the time-resolved analysis. The remarkable thermally very unstable and significantly less hypsochromically shifted photoproduct of the GAF3 domain from AphC can be explained by a possibly hindered intermediate of a red/green photocycle. The generated mutations caused a remarkably stabilizing effect on the thermal recovery to the parent state.

In addition, the influence of the chromophore binding mode by either *in vivo* or *in vitro* addition was examined in more detail for the 1393gaf3. Further information regarding the chromophore-protein interactions was obtained using three mutants (R508N, D531T and N532Y) who have a major influence on the steady-state absorption of the P_g photoproduct.

In comparison to the classical phytochromes, the CBCR GAF domains show a significantly simplified photocycle. This is probably due to the low protein size, maybe enabling a high flexibility allowing more easily to follow the forced conformation changes triggered by the photoisomerization.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
AS	Aminosäure
BLUF	blue-light sensing using FAD
BphP	Bacteriophytochrom
BV	Biliverdin
CBCR	Cyanobacteriochrom
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin Dimere
Cph	Cyanobakterielle Phytochrome
Cry	Cryptochrom
DASH	<i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystis</i> und <i>Homo</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAL	Diguanylate Phosphodiesterasen, benannt nach den konservierten AS-Resten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Elektronentransfer
ex	Anregung
FAD	Flavin-Adenin-Nukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
Fph	pilzliches Phytochrom
GAF	cGMP Phosphodiesterase/ Adenylcyclase/ FhlA
GGDEF	Diguanylat-Cyclasen, cyclo-di-GMP aufbauende Phosphodiesterasen
GPCR	G Protein gekoppelter Rezeptor
HKD	Histidinkinase Domäne
<i>hq</i>	Hydroquinon-Form
HRKD	Histidinkinase-verwandte Domäne
HTH	Helix-turn-Helix Regulatorproteine, bestehen aus zwei verbundenen α -Helices
MTHF	Methenyltetrahydrofolat
IMAC	immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IRF	Instrument Response Function
LADS	lifetime-associated difference spectrum
LB	Luria Berta Medium
LED	light-emitting diode
LOV	Light, oxygen, voltage
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Ni-IDA	Nickel iminodiacetic acid
OD	optische Dichte
OPO	optisch parametrischer Oszillator
αx	oxidierte Form
PAS	Per, ARNT, Sim
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
P ϕ B	Phytochromobilin
PCET	Protonen-gekoppelter Elektronentransfer
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
P _b	blau-absorbierende Form des Phytochroms
P _{fr}	dunkelrot-absorbierende Form des Phytochroms
P _g	grün-absorbierende Form des Phytochroms
P _o	orange-absorbierende Form des Phytochroms
P _r	rot-absorbierende Form des Phytochroms
PUB	Phycourobilin
PVB	Phycoviolobilin
phot1	Phototropin 1
PHR	Photolyase
Phy	Phytochrom
<i>phyA</i>	Phytochrom A
<i>phyB</i>	Phytochrom B
<i>phyC</i>	Phytochrom C
<i>phyD</i>	Phytochrom D
<i>phyE</i>	Phytochrom E
PYP	photoactive yellow protein

RR	Responseregulator
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>sq</i>	Semiquinonform
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid
UV	ultraviolet
VIS	visible
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Jablonski Diagramm, editiert nach (5).....	2
Abb. 1-2: Aufbau der Rhodopsine, editiert nach (11).....	5
Abb. 1-3: Photozyklus von PYP aus <i>H. halophila</i> bei Raumtemperatur (12).....	6
Abb. 1-4: Domänenstruktur der Cryptochrome und Photolyasen (17)	7
Abb. 1-5: Photozyklus der Reparatur einer (6-4) DNA Läsion durch eine (6-4)-Photolyase (21).....	8
Abb. 1-6: <i>links</i> : Aufbau der Flavinstrukturen, Riboflavin (RB), FMN und FAD; <i>rechts</i> : Absorptionsspektrum der Flavine in wässriger Lösung am Beispiel des FMN (28)	10
Abb. 1-7: <i>links</i> : Strukturmodell der LOV-Domäne von YtvA-Proteins aus <i>Bacillus subtilis</i> im Dunkelizustand in der Dimerkonformation, editiert nach (31); <i>rechts</i> : Auflistung verschiedener Effektdomänen (8).....	11
Abb. 1-8: Photozyklus der LOV-Domäne des YtvA-Proteins aus <i>B. subtilis</i> (8)	11
Abb. 1-9: Monomer von BlrB aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (37)	12
Abb. 1-10: Phylogenetische Analyse der Phy Superfamilie basierend auf einem Alignment der GAF Domäne, editiert nach (41)	13
Abb. 1-11: Domänenarchitektur der Phytochrome aus Pflanzen (Phy), Cyanobakterien (Cph1, Cph2), Eubakterien (BphP) und Pilzen (Fph) (42).....	14
Abb. 1-12: Strukturformeln der Phytochrom-Chromophore am Beispiel von PCB, P ϕ B und BV, editiert nach (42)	15
Abb. 1-13: Photozyklus für Phytochrome die PCB oder P ϕ B nutzen (42)	16
Abb. 1-14: <i>links</i> : Bänderdarstellung der photosensorischen Domänen von Cph1 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803; <i>rechts</i> : Struktur und Interaktionen zwischen der „tongue region“ und der chromophortragenden GAF-Domäne im P _r -Zustand von Cph1 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (56).	19
Abb. 1-15: Vergleich der Domänenarchitektur von Cph1 und Cph2 aus <i>Synechocystis</i> (56).	19
Abb. 1-16: Domänenarchitektur einiger CBCRs im Vergleich zu Cph1 aus <i>Synechocystis</i> (68).....	22
Abb. 1-17: <i>links</i> : Overlay der Strukturen von AnPixJg2 und der Modellstruktur von Slr1393g3; <i>rechts</i> : Sequenzalignent von Slr1393g3 und AnPixJg2 (78).....	24
Abb. 1-18: Filamente von <i>F. diplosiphon</i> . <i>links</i> : unter Grünlicht; <i>rechts</i> : unter Rotlicht (88).....	25

Abb. 1-19: Grün/Rot Photozyklus von RcaE aus <i>Fremyella diplosiphon</i> (81)	25
Abb. 1-20: PCB-Bindungstasche der Kristallstruktur von Cph1 im P _r -Zustand, editiert nach (81).....	26
Abb. 1-21: A: Blau/Orange Photozyklus von NpF4973 aus <i>Nostoc punctiforme</i> (89), B: Strukturformel von Phycoviolobilin mit den beiden Cysteinbindungen und der erfolgten Elektronenverschiebung im Bereich der Ringe A und B, editiert nach (90), C: Topologie der GAF-Domäne mit dem in CBCRs konservierten Cysteinrest, editiert nach (90).....	27
Abb. 1-22: <i>links</i> : Struktur des P _r - und des P _b -Zustandes mit der jeweiligen Markierung des konjugierten Systems; <i>rechts</i> : Phylogenetisches Cluster der GAF Domänen der CBCRs und einigen anderen Phytochromen zur Einordnung von AM1_1186g2, editiert nach (83).....	28
Abb. 1-23: Kristallstruktur von AnPixJ im 15Z-Dunkelzustand mit gebundenem PCB (Violett). Markiert sind alle für die Blauverschiebung des Photoproduktes bei der Photokonversion essentiellen Aminosäurereste am Beispiel von NpR6012g4. Zusätzlich ist der für die Chromophorbindung zuständige Cysteinrest gezeigt. In Klammern sind die sich bei NpR3874 unterscheidenden AS aufgeführt (74).	29
Abb. 3-1: Ablauf der Proteinaufreinigung mittels Strep-Tag (94)	41
Abb. 3-2: Schritte zur Regeneration der Strep-Tactin Säule mittels HABA (2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure) (94)	42
Abb. 3-3: Schematische Darstellung des Aufbaus der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse	46
Abb. 3-4: Aufbau eines optisch parametrischen Oszillators (OPO) (95).....	46
Abb. 4-1: Vorgehensweise der Datensatz-Bearbeitung bei drei Beobachtungszeitfenstern.	53
Abb. 4-2: Absorptionsspektren von SynCph2(1-2) aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803.....	55
Abb. 4-3: Struktur von SynCph2(1-2) (unten) mit (darüber) detaillierter Ansicht der Chromophorbindungstasche (57).....	56
Abb. 4-4: Absorptionsspektren der drei Mutanten von SynCph2(1-2) A: S385A, B: W389A, C: W389F.....	57
Abb. 4-5: LADS von SynCph2(1-2): Anregung 640 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) P _r → P _{fr}	58
Abb. 4-6: LADS von SynCph2(1-2): Anregung 700 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) P _{fr} → P _r	59

Abb. 4-7: LADS von <i>SynCph2</i> (1-2) S385A: Anregung 640 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$	60
Abb. 4-8: LADS von <i>SynCph2</i> (1-2) S385A: Anregung 700 nm (Wellenlängen 540 – 710 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$	61
Abb. 4-9: LADS von <i>SynCph2</i> (1-2) W389A: Anregung 640 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$	61
Abb. 4-10: LADS von <i>SynCph2</i> (1-2) W389A: Anregung 700 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$	62
Abb. 4-11: Blitzlichtphotolysemessung der W389F von <i>SynCph2</i> (1-2) aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 665 nm im Zeitfenster 100 μ s, 1 ms, 10 ms und 100 ms.	63
Abb. 4-12: Absorptionsspektren von PstBphP1 aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> ...	64
Abb. 4-13: Rückkehr-Kinetik von PstBphP1: $P_{fr} \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 700$ nm) bei 20 °C.....	65
Abb. 4-14: LADS von PstBphP1: Anregung 670 nm (Wellenlängen 600 – 780 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$	66
Abb. 4-15: LADS von PstBphP1: Anregung 760 nm (Wellenlängen 600 – 780 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$	66
Abb. 4-16: Differenzspektren von PstBphP1 zu ausgewählten Zeiten: <i>links</i> : $P_r \rightarrow P_{fr}$; <i>rechts</i> : $P_{fr} \rightarrow P_r$	67
Abb. 4-17: Absorptionsspektren von PaBphP-Pa497 aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Abb. 4-18: Rückkehr-Kinetik von PaBphP-Pa497: $P_r \rightarrow P_{fr}$ ($\lambda_{Abs} = 750$ nm) bei 20°C	69
Abb. 4-19: LADS von PaBphP-Pa497: Anregung 760 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$	70
Abb. 4-20: LADS PaBphP-Pa497 Anregung 650 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$	71
Abb. 4-21: Differenzspektren von PaBphP-497 zu ausgewählten Zeiten: <i>links</i> : $P_{fr} \rightarrow P_r$; <i>rechts</i> : $P_r \rightarrow P_{fr}$	71
Abb. 4-22: Absorptionsspektren von FphA aus <i>Aspergillus nidulans</i>	72
Abb. 4-23: LADS von FphA: Anregung 650 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$.	73
Abb. 4-24: LADS von FphA: Anregung 760 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$.	74
Abb. 4-25: Differenzspektren von FphA zu ausgewählten Zeiten: <i>links</i> : $P_r \rightarrow P_{fr}$; <i>rechts</i> : $P_{fr} \rightarrow P_r$	75
Abb. 4-26: Absorptionsspektren von 2699gaf1 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120.....	76
Abb. 4-27: Rückkehr-Kinetik von 2699gaf1: $P_{fr} \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 635$ nm)	77

Abb. 4-28: LADS von 2699gaf1: Anregung 630 nm (Wellenlängen 530 – 730 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$	78
Abb. 4-29: LADS von 2699gaf1: Anregung 680 nm (Wellenlängen 530 – 730 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$	78
Abb. 4-30: Differenzspektren von 2699gaf1 zu ausgewählten Zeiten: <i>links</i> : $P_r \rightarrow P_{fr}$; <i>rechts</i> : $P_{fr} \rightarrow P_r$	79
Abb. 4-31: Absorptionsspektren von 2699gaf3 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	80
Abb. 4-32: Rückkehr-Kinetik von 2699gaf3: $P_o \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 645$ nm) bei 20°C	81
Abb. 4-33: Modellstruktur von 2699gaf3 (Template: AnPixJG2)	81
Abb. 4-34: Absorptionsspektren von 2699gaf3 S487R	82
Abb. 4-35: Rückkehr-Kinetik 2699gaf3 S487R: $P_o \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 648$ nm) bei 20 °C	82
Abb. 4-36: Absorptionsspektren von 2699gaf3 S487G	83
Abb. 4-37: Rückkehr-Kinetik von 2699gaf3 S487G: $P_o \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 645$ nm) bei 20 °C.	84
Abb. 4-38: Stokes-Verschiebung des P_r -Zustandes von 2699gaf3: A: WT, B: S487R, C: S487G	85
Abb. 4-39: Stokes-Verschiebung des P_o -Zustandes von 2699gaf3: A: WT, B: S487R, C: S487G	86
Abb. 4-40: LADS von 2699gaf3: Anregung 645 nm (Wellenlängen 510 – 670 nm) $P_r \rightarrow P_o$	87
Abb. 4-41: LADS von 2699gaf3: Anregung 560 nm (Wellenlängen 530 – 730 nm) $P_o \rightarrow P_r$	87
Abb. 4-42: Differenzspektren von 2699gaf3 zu ausgewählten Zeiten: <i>links</i> : $P_r \rightarrow P_o$; <i>rechts</i> : $P_o \rightarrow P_r$	88
Abb. 4-43: LADS von 2699gaf3 S487G: Anregung 645 nm (Wellenlängen 520 – 680 nm) $P_r \rightarrow P_o$	89
Abb. 4-44: LADS von 2699gaf3 S487G: Anregung 560 nm (Wellenlängen 520 – 680 nm) $P_o \rightarrow P_r$	90
Abb. 4-45: Absorptionsspektren von 1393gaf3 aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> Assemblierung	92
Abb. 4-46: Stabilitätstest des P_g -Zustandes von 1393gaf3 <i>in vivo</i> bei 20 °C (78)	93
Abb. 4-47: Modellstruktur von Slr1393g3 (Template: AnPixJg2), einzelne AS um den Chromophor sind farbig markiert	93
Abb. 4-48: Absorptionsspektren von 1393gaf3 R508N im Vergleich zum WT	94
Abb. 4-49: Absorptionsspektren von 1393gaf3 D531T im Vergleich zum WT	95

Abb. 4-50: Absorptionsspektren von 1393gaf3 N532Y im Vergleich zum WT.....	95
Abb. 4-51: Emissionsspektren des grün-absorbierenden Zustands von 1393gaf3 (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>) und des rot-absorbierenden Zustands (<i>in vivo</i> , <i>in vitro</i>)	96
Abb. 4-52: Emissionsspektren der P _r - (in rot) bzw. der P _g -Zustände (in grün) der Mutanten von 1393gaf3. A: R508N, B: D531T, C: N532Y.....	97
Abb. 4-53: LADS von 1393gaf3: Anregung 650 nm (Wellenlängen 480 – 700 nm) P _r → P _g	98
Abb. 4-54: LADS von 1393gaf3: Anregung 540 nm (Wellenlängen 500 – 690 nm) P _g → P _r	99
Abb. 4-55: links: Differenzspektren von 1393gaf3 zu gewählten Zeiten, rechts: Absorptionsverlauf bei 540 und 650 nm über den gesamten beobachteten Zeitbereich, oben P _r → P _g , unten P _g → P _r	100
Abb. 5-1: Schema des Phytochrom-Photozyklus nach Eilfeld und Rüdiger auf der Grundlage von stationären Tieftemperatur-Absorptionsmessung (101)	103
Abb. 5-2: Photozyklus von CphA aus dem Cyanobakterium <i>Tolypothrix</i> PCC 7120 mit den Lebenszeiten der identifizierten Intermediate (57,105).....	107
Abb. 5-3: Blitzlichtphotolysemessung von SynCph2(1-2) aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, Photokonversion von P _r → P _{fr} , Absorptionsverlauf bei 665 nm im Zeitfenster 100 µs, 1 ms, 10 ms und 100 ms.	109
Abb. 5-4: Blitzlichtphotolysemessung von SynCph2(1-2) aus <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803, Photokonversion von P _{fr} → P _r , Absorptionsverlauf bei 665 nm im Zeitfenster 100 µs, 1 ms, 10 ms und 100 ms.	110
Abb. 5-5: Struktur von SynCph2(1-2) mit detaillierter Ansicht der Chromophorbindungstasche (57).....	111
Abb. 5-6: Photozyklus von SynCph2(1-2) und der Mutanten S385A und W389A (57)...	112
Abb. 5-7: Steady-state Absorptionsmessung von SynCph2(1-2) W389A. Absorptionsspektren vom P _r - und P _{fr} -Zustand sowie das errechnete Differenzspektrum.	113
Abb. 5-8: CD Spektren für SynCph2(1-2) WT und die Mutanten S385A und W389A, von links nach rechts, editiert nach (56).....	114
Abb. 5-9: Blitzlichtphotolysemessung von PstBphP1 aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , Photokonversion von P _r → P _{fr} , Absorptionsverlauf bei 740 nm im Zeitfenster von 20 ms	115

Abb. 5-10: Blitzlichtphotolysemessung von PstBphP1 aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , Photokonversion von $P_{fr} \rightarrow P_r$, <i>links</i> : Absorptionsverlauf bei 760 nm im Zeitfenster von 20 ms; <i>rechts</i> : Absorptionsverlauf bei 700 nm im Zeitfenster von 20 ms.....	116
Abb. 5-11 Blitzlichtphotolyse-Messung von PaBphP aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Photokonversion von $P_{fr} \rightarrow P_r$, <i>links</i> : Absorptionsverlauf bei 750 nm im Zeitfenster von 20 ms; <i>rechts</i> : Absorptionsverlauf bei 680 nm im Zeitfenster von 20 ms.....	117
Abb. 5-12: Blitzlichtphotolysemessung von PaBphP aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 740 nm im Zeitfenster von 200 μ s, 2 ms und 20 ms.....	118
Abb. 5-13: <i>links</i> : Photozyklus von AnPixJg2 mit den Intermediaten für die gegenläufigen Photokonversionen mit den dazugehörigen Lebenszeiten (75); <i>rechts</i> : Je ein zusätzliches Intermediat für beide Richtungen wurde mittels Tieftemperatur-Resonanz-Raman-Messungen identifiziert 86).....	121
Abb. 5-14: Blitzlichtphotolysemessung von 2699gaf1 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 690 nm in den Zeitfenstern von 200 μ s, 2 ms und 20 ms.	123
Abb. 5-15: Differenzspektren der P_r zu P_{fr} -Konversion von 2699gaf1 zu gewählten Zeiten	124
Abb. 5-16: Blitzlichtphotolysemessung von 2699gaf3 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_o$, Absorptionsverlauf bei 560 nm in den Zeitfenstern von 200 μ s, 2 ms und 20 ms.	125
Abb. 5-17: Blitzlichtphotolysemessung von 2699gaf3 aus <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120, Photokonversion von $P_o \rightarrow P_r$, Absorptionsverlauf bei 640 nm in den Zeitfenstern von 200 μ s, 2 ms und 20 ms. Differenzspektren der P_o zu P_r -Konversion von 2699gaf3 zu gewählten Zeiten (<i>unten rechts</i>).	126

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Photorezeptoren	3
1.1.1	Rhodopsine	4
1.1.2	Xanthopsine	5
1.1.3	Cryptochrome und Photolyasen.....	7
1.1.4	Phototropine/LOV-Proteine.....	9
1.1.5	BLUF-Proteine	12
1.1.6	Phytochrome	13
2	Zielsetzung dieser Arbeit.....	31
3	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien	33
3.1.2	Medien, Puffer und Lösungen	34
3.1.3	Materialien.....	35
3.1.4	Geräte.....	35
3.1.5	Plasmide	37
3.2	Methoden	37
3.2.1	DNS-Isolierung.....	37
3.2.2	Herstellung kompetenter Zellen	38
3.2.3	Transformation	38
3.2.4	Stammhaltung.....	39
3.2.5	Kultivierung und Proteinexpression	39
3.2.6	Zellaufschluss	40
3.2.7	Proteinaufreinigung	40
3.2.8	Spektroskopische Methoden.....	42

4	Ergebnisse.....	51
4.1	<i>SynCph2</i> (1-2), <i>PstBphP1</i> , <i>PaBphP</i> -497 und <i>FphAN753</i>	55
4.1.1	<i>SynCph2</i> (1-2)	55
4.1.2	<i>PstBphP1</i>	63
4.1.3	<i>PaBphP</i> -Pa497	67
4.1.4	<i>FphA</i> -N753	72
4.2	GAF-Domänen aus CBCRs: <i>all2699gaf1</i> und <i>gaf3</i> und <i>slr1393gaf3</i>	75
4.2.1	<i>2699gaf1</i>	75
4.2.2	<i>2699gaf3</i>	80
4.2.3	<i>1393gaf3</i>	92
5	Diskussion	103
5.1	<i>SynCph2</i> (1-2), <i>PstBphP1</i> , <i>PaBphP</i> -497 und <i>FphAN753</i>	103
5.2	GAF-Domänen aus CBCRs: <i>all2699gaf1</i> und <i>gaf3</i> und <i>slr1393gaf3</i>	120
6	Ausblick.....	132
7	Literaturverzeichnis	133
8	Anhang	140
8.1	Aminosäuren	140

1 Einleitung

Licht bildet die Grundlage für das Leben auf unserem Planeten. Schon in der Antike setzten sich die Menschen mit dem Phänomen Licht auseinander. Damals wurde es von den meisten Menschen als göttliche Kraft interpretiert. Dem gegenüber standen einige Philosophen, die schon sehr früh eine wissenschaftliche Erklärung finden wollten. Nach ersten Erfolgen im Feld der Optik in Bezug auf Geradlinigkeit des Lichts und Lichtreflexion von Euklid im 3. Jh. v. Chr. war es Demokrit, der erstmals vorschlug, dass Licht aus kleinen Teilchen besteht, welche dem Auge ein Bild einbrennen. An der Teilchentheorie wurde bis ins 17. Jahrhundert festgehalten, wobei sie durch namhafte Naturwissenschaftler wie Sir Isaac Newton bekräftigt wurde. Mit dieser Theorie ließen sich jedoch nicht alle Eigenschaften des Lichts, wie zum Beispiel dessen Brechung beschreiben. Dies gelang erst durch die Wellentheorie von Christiaan Huygens, später erweitert durch Thomas Young. Sie beruht auf dem Grundsatz, dass Licht aus Wellen besteht, die sich gegenseitig überlagern bzw. auslöschen können (1,2).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts kombinierten Albert Einstein und Max Planck diese beiden Theorien und legten so den Grundstein für das heutige Verständnis und die Wissenschaft des Lichts.

Licht findet sich auch als Regulator in vielen Entwicklungsprozessen lebender Organismen. Beispielsweise lässt sich hier die Wachstumsrichtung der Pflanzen (Phototropismus) oder die Induktion der Blütenbildung (Photoperiodizität) anführen (3). Die Lichtdetektierenden Systeme (auch als „Photorezeptoren“ bezeichnet) bestehen aus einem Lichtabsorbierenden Molekül, Chromophor, und einem Proteinanteil. Beide Komponenten beeinflussen sich gegenseitig in ihren Eigenschaften und erzeugen die Signale, die die biologischen Funktionen in den Zellen in Abhängigkeit von der Lichtqualität regulieren.

Die Chromophore sind in der Lage, Licht bestimmter Wellenlänge zu absorbieren und unter bestimmten Umständen auch zu emittieren. Sie bestehen aus kleinen organischen Molekülen, die durch Absorption von Photonen ihren Anregungszustand ändern. Die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften eines Moleküls werden im sogenannten Jablonski-Diagramm zusammengefasst (Abb. 1-1). Es beschreibt die möglichen Übergänge

der Valenzelektronen im Molekül und ist sehr nützlich, um einen Zusammenhang zwischen physikalischen Eigenschaften und optischen Spektren herzustellen (4).

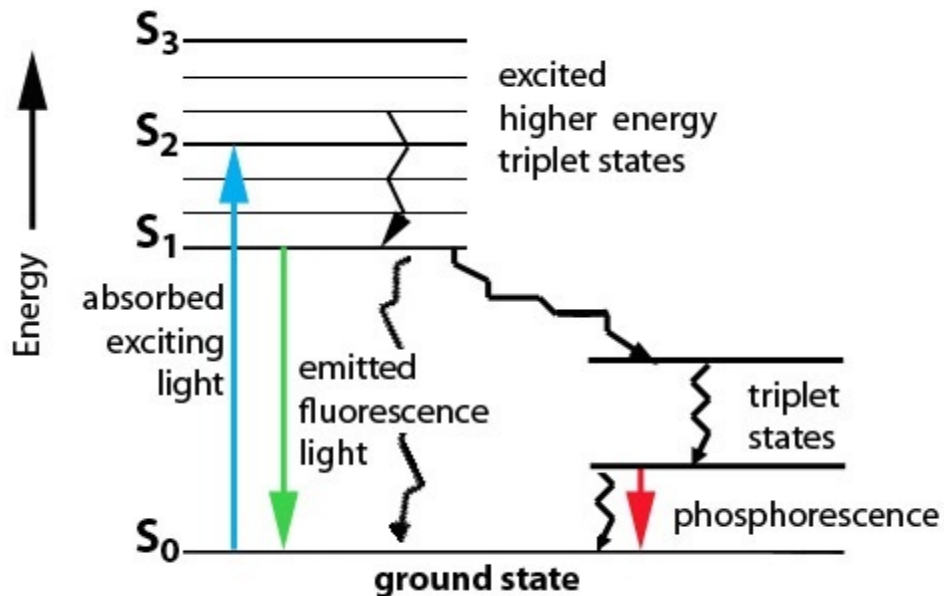


Abb. 1-1: Jablonski Diagramm: Mögliche Energieniveaus für Moleküle. Strahlungsübergänge (durchgezogene Pfeile): Absorption (blau), Emission (Grün für Fluoreszenz, Rot für Phosphoreszenz). Strahlungsfreie Übergänge (gezackte Pfeile): Relaxation, innere Umwandlung, Intersystem Crossing (editiert nach (5)).

Durch die Aufnahme von Photonen (Absorption) gelangen die Valenzelektronen aus dem Grundzustand (S_0) je nach Energie des absorbierten Lichtquants in einen angeregten Zustand ($S_1 \dots S_n$). Es gibt nun verschiedene Wege, aus dem angeregten Zustand unter Energieabgabe zurück in den Grundzustand zu gelangen. Sollten sich die Elektronen im energetisch höher liegenden S_2 -Zustand befinden, erfolgt zunächst eine Schwingungsrelaxation in das niedrigst gelegene Schwingungsniveau des angeregten S_1 -Zustands (gleiches gilt übrigens für höher angeregte Schwingungszustände des S_1 -Zustands). Dieses Energieniveau ist der Startpunkt für verschiedene Übergänge in den Grundzustand. Zunächst können die Moleküle ihre Energie strahlungslos durch sog. „Innere Umwandlung“ unter Erhalt des Elektronenspins abgeben. Bei der Fluoreszenz wird Licht emittiert, um in den Grundzustand zurückzukehren. Beim Intersystem Crossing handelt es sich um einen Übergangsweg, bei dem angeregte Singulett-Zustände über eine Änderung des Elektronengesamtspins in einen energetisch günstigeren Triplett-Zustand übergehen. Dieser zerfällt durch Relaxation strahlungsfrei oder durch Abgabe von Licht (Phosphoreszenz), wobei wiederum eine Spin-Umkehr erfolgen muss (6).

1.1 Photorezeptoren

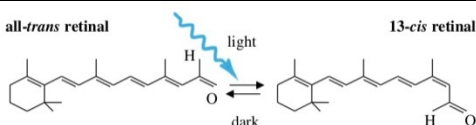
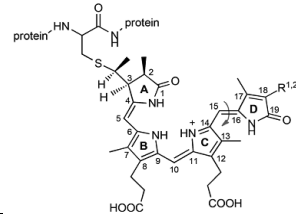
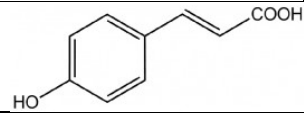
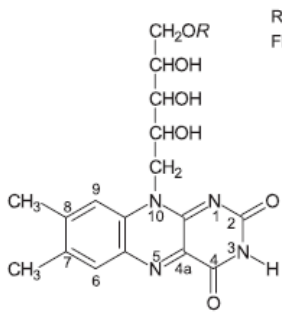
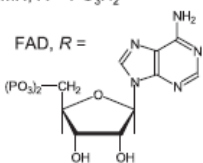
In der Natur gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Photorezeptoren. Übergeordnet kann man sie anhand ihrer Nutzung des Lichts in zwei Kategorien aufteilen.

Eine Kategorie nutzt das Licht als Energiequelle. Darunter fallen zum Beispiel die Photosynthesekomplexe der Pflanzen, bei der unter Wasserspaltung Kohlenstoffdioxid fixiert und energiereiche Kohlenhydrate erzeugt werden. Oxygene Photosynthese findet sich auch z.B. in Cyanobakterien. Diese haben entgegen den Chlorophyll-basierten Antennenpigmenten der Pflanzen Phycobiliproteine als Antennen entwickelt, was zu einer deutlichen Erweiterung des für die Photosynthese nutzbaren Spektralbereichs führt.

Die zweite Kategorie nutzt das Licht als Informationsquelle. So können Organismen zum Beispiel den Bereich des Lichts erkennen, der die höchste Energiegewinnung durch die Photosynthese verspricht. Weiterhin können für den Organismus schädliche Wellenlängen des Lichts detektiert werden, so dass Schutzmaßnahmen induziert werden können. Diese Photorezeptoren nehmen neben Richtung und Intensität des Lichtes auch die Dauer und die spektralen Eigenschaften wahr.

Die überwiegende Mehrheit dieser zweiten Kategorie der Photorezeptoren kann in sechs wohldefinierte Familien unterteilt werden, welche in erster Linie durch die Struktur der Chromophore und die jeweilige Photochemie bestimmt werden. Dabei handelt es sich um die Rhodopsine, Phytochrome, Xanthopsine, Cryptochrome, Phototropine und die BLUF-Proteine (blue-light sensing using FAD) (7-9). Die Familien der Photorezeptoren und ihre Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede sind in Tab. 1-1 dargestellt und sollen im Folgenden nacheinander vorgestellt werden.

Tab. 1-1: Familien der Photorezeptoren mit der jeweiligen Photochemie und den dazugehörigen Chromophoren

Familie	Chromophor	Photochemie	Beispiel	
Rhodopsine	Retinale	trans $\longleftrightarrow$ cis	all-<i>trans</i> retinal  13-<i>cis</i> retinal	
Phytochrome	Tetrapyrrole	trans $\longleftrightarrow$ cis		
Xanthopsine	trans-p-Cumarsäure	trans $\longleftrightarrow$ cis		
Cryptochrome	Flavinderivate	Elektronentransfer	 RB, R = H FMN, R = PO₃H₂ FAD, R = 	
Phototropine		Adduktbildung (FMN-Cys)		
LOV-Proteine		Elektronentransfer mit Änderung des Wasserstoffbin- dungsnetzwerkes		
BLUF Proteine				

1.1.1 Rhodopsine

Rhodopsine sind Membranproteine, deren Hauptstrukturelement sieben die Membran durchdringende α -Helices sind. Sie binden über eine kovalente Bindung (protonierte Schiff'sche Base) ein Molekül Retinal (Vitamin A Aldehyd) als Chromophor (10). Auf der Grundlage von Sequenzanalysen der Opsingene und der Isomerie des Chromophors können sie in zwei Gruppen unterschieden werden: mikrobielle (Typ 1) und tierische (Typ 2) Opsine.

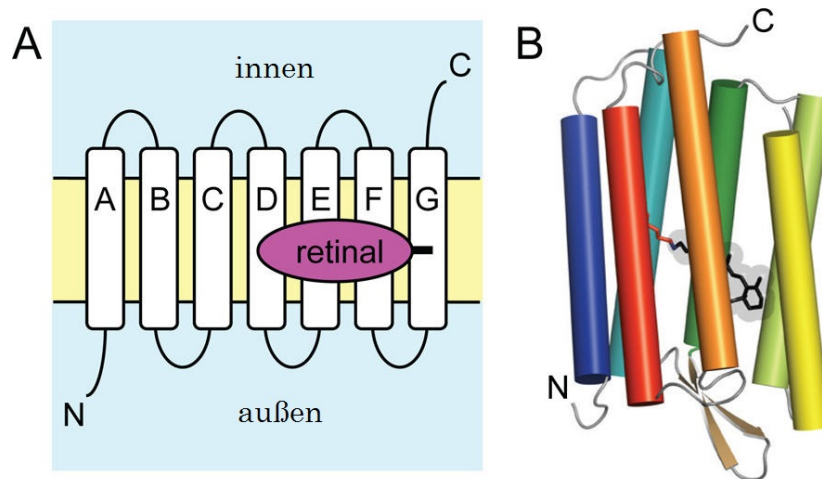


Abb. 1-2: Aufbau der Rhodopsine. (A) Schematische Darstellung der sieben transmembranen α -Helices mit Anbindungsort des Retinalchromophors in der siebten Helix, (B) Dreidimensionale Struktur des Proteins mit gebundenem all-*trans* Retinal (editiert nach (11))

Die mikrobiellen Opsine kommen in der Natur in Archaeen, Eubakterien, Pilzen und Algen vor. Verwendung finden sie dort als lichtgetriebene Protonen- und Chloridpumpen, Lichtsensoren sowie lichtgesteuerte Kationenkanäle (11). Als Chromophor nutzen sie das all-*trans* Retinalisomer, das bei Lichtaufnahme die 13-*cis* Form isomerisiert (Abb. 1-2).

Dem entgegen binden die tierischen Rhodopsine, die zu der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören, das 11-*cis* Isomer des Retinals, welches unter Lichteinfluss in das all-*trans* Isomer übergeht. Sie dienen der visuellen Wahrnehmung (12).

1.1.2 Xanthopsine

Die Familie der Xanthopsine ist an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, beginnend mit der Steuerung der genetischen Regulation der Chalkon-Synthese bis hin zur Migration von Bakterien (12).

Das „photoactive yellow protein“ (PYP) aus *Halorhodospira halophila* stellte bei seiner Entdeckung im Jahre 1985 den Ursprung dieser Familie dar (13). PYP ist ein relativ kleines Protein mit 125 Aminosäuren, das in einer typischen α/β -Faltung vorliegt. Es kann in vier Abschnitte unterteilt werden: eine N-terminale Kappe bestehend aus zwei α -Helices, einen PAS-Kern, einen helikalen Linker aus einer $\alpha 5$ -genannten Helix und ein β -Faltblatt-Gerüst. Seine Funktion als Photorezeptor im sichtbaren Licht erfüllt PYP durch einen *trans*-p-

Cumarsäure-Chromophor, der über eine Thioesterbindung mit einem Cystein (Cys69 für das Xanthopsin aus *H. halophila*) in der PAS-Domäne des Proteins verbunden ist (14).

Im stabilen Grundzustand ($\lambda_{\max} = 446 \text{ nm}$) ist der Chromophor an der Phenolgruppe dissoziiert und liegt in der *trans*-Konfiguration vor. Nach Bestrahlung mit blauem Licht entsteht über verschiedene Zwischenprodukte das leicht in den roten Spektralbereich verschobene Intermediat pR mit einem Absorptionsmaximum bei 510 nm. Der Chromophor liegt in diesem Zustand weiterhin in geladener Form vor, ist aber in die *cis*-Konfiguration isomerisiert. Der signalgebende Zustand (pB) entsteht im Mikrosekunden-Zeitbereich, trägt eine undissoziierte Phenolgruppe und liegt in der *cis*-Konfiguration vor (Abb. 1-3). Die Rückkehr in den Dunkelzustand erfolgt in weniger als einer Sekunde (12).

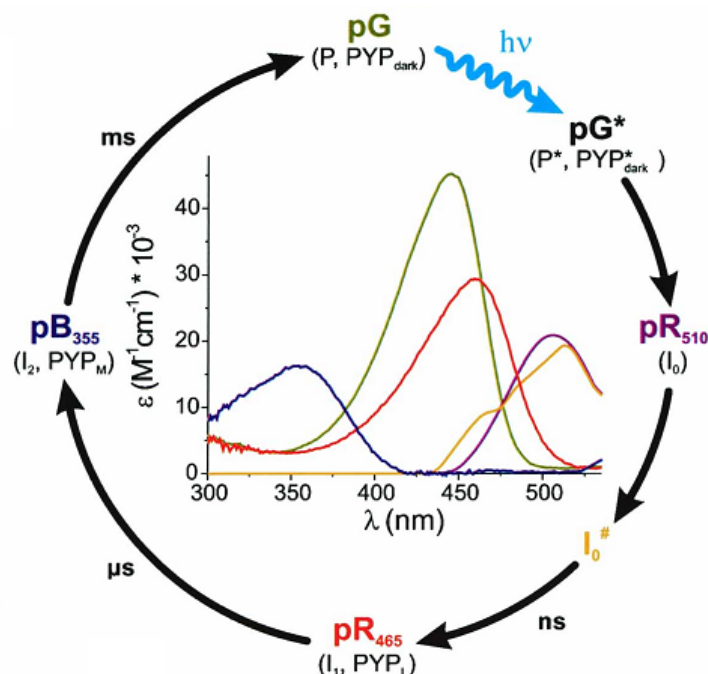


Abb. 1-3: Photozyklus von PYP aus *H. halophila* bei Raumtemperatur; innenliegend die Spektren der verschiedenen Intermediate des Photozyklus. Die Farbgebung der Intermediatnamen und ihrer Spektren ist gleich gewählt. Unter den verschiedenen Zuständen von PYP sind in Klammern die bis jetzt zusätzlich publizierten Nomenklaturen aufgeführt (12).

Heutzutage wird die Anzahl von PYP-verwandten Proteinen vor allem durch die Methoden der Genom- und Metagenomanalyse mit etwa 140 angegeben. Neben den PYPs in Proteobakterien konnten sie auch in Bacteroides und Spirochäten nachgewiesen werden (15).

1.1.3 Cryptochrome und Photolyasen

Cryptochrome (Cry) und Photolyasen (PHR) sind sensorische Photorezeptoren die im UV-A und Blaulichtbereich des elektromagnetischen Spektrums absorbieren (16). Die N-terminale Chromophor-Bindungsdomäne ist über alle Klassen der Cryptochrome und Photolyasen konserviert. Sie trägt zwei Chromophore: ein Pterin in Form eines 5, 10-Methenyltetrahydrofolats (MTHF) und ein Flavin in der Form eines Flavin-Adenin-Nukleotid (FAD) (Abb. 1-4). Das MTHF nimmt eine Art Antennenfunktion ein, indem es die Energie aus dem Licht aufnimmt und an das FAD weiterleitet. Die Rate und die Effizienz dieses Energietransfers ist von der Entfernung und der relativen Orientierung zwischen diesen beiden Chromophoren abhängig und dient der Erweiterung des Absorptionsbereichs (17,18).

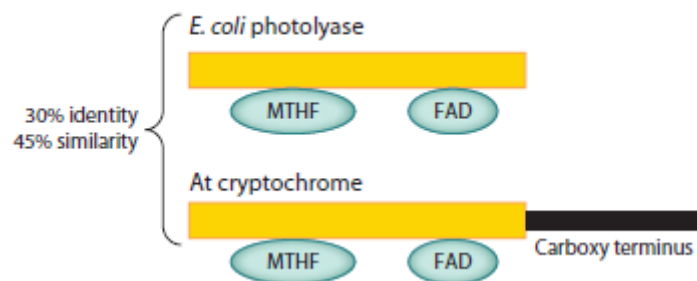


Abb. 1-4: Domänenstruktur der Cryptochrome und Photolyasen. Vergleich der Photolyase aus *Escherichia coli* und Cry1 aus *Arabidopsis thaliana* (17).

FAD kann wie alle Flavinderivate in drei Zuständen im Protein vorliegen: oxidiert, halb-reduziert und vollreduziert, wobei die jeweiligen reduzierten Formen protoniert (also neutral) oder unprotoniert, d.h. geladen sein können. Das oxidierte FAD absorbiert maximal im Blaulichtbereich. Es wird somit angenommen, dass es sich dabei um den Grundzustand des Proteins handelt. Der Photozyklus beginnt mit der Absorption von blauem Licht durch das oxidierte FAD. Im angeregten Zustand wird es zunächst halb-reduziert und nach Protonenaufnahme zum $\text{FADH}^{\cdot}$ Radikal. Diese Spezies kann dann ein weiteres Elektron und evtl. ein Protein aufnehmen zur Bildung von FADH_2 (oder FADH^-). Die erste Reduktion bringt eine konformelle Änderung im Protein mit sich, welche in Cryptochromen zu einer Signaltransduktion führt. Durch die erneute Oxidation des FADs schließt sich der Photozyklus (19,20).

Die Klasse der Photolyasen ist in zwei Unterarten unterteilt, CPD- und (6-4)-Photolyasen, die sich nach der Funktion bzw. der Art der DNA-Schäden richten, gegen die diese Enzyme aktiv werden.

Die CPD Photolyasen reparieren durch UV-Licht entstandene Cyclobutan-Pyrimidin Dimere (CPD). Nach Elektronentransfer (ET) vom Flavin auf die DNA werden die Cyclobutyl-C5-C5 und C6-C6 Einfachbindungen gespalten und die DNA-Struktur wiederhergestellt. Anschließend wird das Elektron auf das Flavin zurückgeführt (21,22).

(6-4) DNA Läsionen entstehen durch eine Paternó-Büchi Reaktion über ein primäres Oxetan/Azetidin Photoprodukt. Dabei reagiert in den meisten Fällen die Carbonylgruppe einer Thyminbase mit der C5=C6 Doppelbindung eines angrenzenden Pyrimidins. Das bei Raumtemperatur instabile Photoprodukt öffnet sich und bildet die entsprechende (6-4) DNA Läsion (22).

Die Reparatur dieses DNA-Schadens erfolgt über einen Protonentransfer, der wie bei der CPD-Reparatur durch einen ET initiiert wird. Eine Serie sich daran anschließender Änderungen der Atom- und Bindungsanordnung durch Einzelbindungsbrüche und Wiederherstellungen stellt die eigentliche Reparationsreaktion dar. Eine abschließende Protonen- und Elektronenrückführung setzt das 6-4 Photoprodukt in zwei Thyminbasen um (Abb. 1-5) (21).

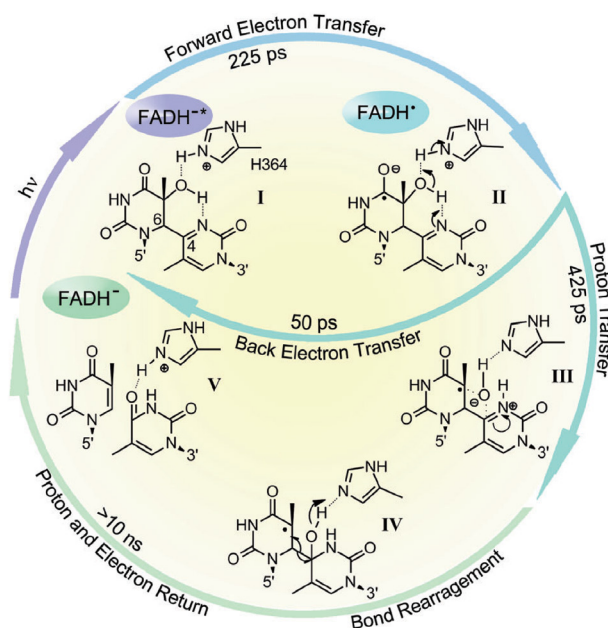


Abb. 1-5: Photozyklus der Reparatur einer (6-4) DNA Läsion durch eine (6-4)-Photolyase (21).

Cryptochrome besitzen eine sehr hohe Sequenzhomologie zu den lichtabhängigen DNA Photolyasen und weisen dieselben Chromophore zur Lichtabsorption auf (23). Ihnen fehlt jedoch die Reparaturfähigkeit für doppelsträngige DNA. Zusätzlich besitzen sie eine in den Photolyasen nicht vorhandene C-terminale Domäne unterschiedlicher Länge, die in der großen Vielfalt an Funktionen in der Cryptochrom Familie resultiert (23). In Cryptochromen der Säugetiere findet sich eine Domäne, die für die Kernlokalisation benötigt wird. Die C-terminale Domäne im Cry aus *Arabidopsis* ist unentbehrlich für die Weiterleitung des Signals, das durch das eingestrahle Licht ausgelöst wird, z.B. für die genetische Regulation der Chalkon-Synthese (16). Die Untergruppe namens Cry-DASH nimmt eine Art Verbindungsfunktion zwischen Cry und PHR ein. Es handelt sich um Cryptochrome, die in der Lage sind, Cyclobutan Pyrimidin-Dimere zu spalten und somit eine DNA Reparaturfunktion auszuüben, welche sonst nur bei den klassischen Photolyasen zu finden ist. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund einer weniger energetischen Bindung nur einzelsträngige DNA repariert werden kann (24).

1.1.4 Phototropine/LOV-Proteine

Phototropine sind ebenfalls Blaulichtrezeptoren, die eine breite Palette von Reaktionen steuern. So dienen sie z.B. in Pflanzen der Optimierung der Photosynthese. Dazu zählen neben dem Phototropismus die lichtinduzierte Stomata-Öffnung und die Bewegung der Chloroplasten in Abhängigkeit von der Intensität des Lichtes. Mit NPH1 aus *Arabidopsis thaliana*, aufgrund seiner wichtigen Rolle im Phototropismus Phototropin 1 (phot1) genannt, konnte der erste Vertreter der Phototropine im Jahre 1997 von der Forschergruppe um Winslow R. Briggs isoliert werden (7,25).

Der Bereich in Phototropinen, der als Blaulichtsensor fungiert, ist die LOV (light, oxygen, voltage)-Domäne. Dabei handelt es sich um eine Unterfamilie der PAS (Per, ARNT, Sim)-Domänen, die neben dem Vorkommen in Pflanzen auch in Prokaryoten und Pilzen zu finden sind (26,27). Phototropine besitzen zwei N-terminale LOV-Domänen, welche bevorzugt die Riboflavin-Derivate Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Chromophor binden, während C-terminal häufig eine Kinase-Domäne angeschlossen ist, die durch eine Enzymaktivität die Signalweiterleitung ermöglicht (28).

Die Grundstruktur dieser auch als Coenzyme aktiven Moleküle ist bestimmt durch einen 7, 8-Dimethyl-Isoalloxazinring, an den der Zucker Ribitol ankondensiert ist (Abb. 1-6).

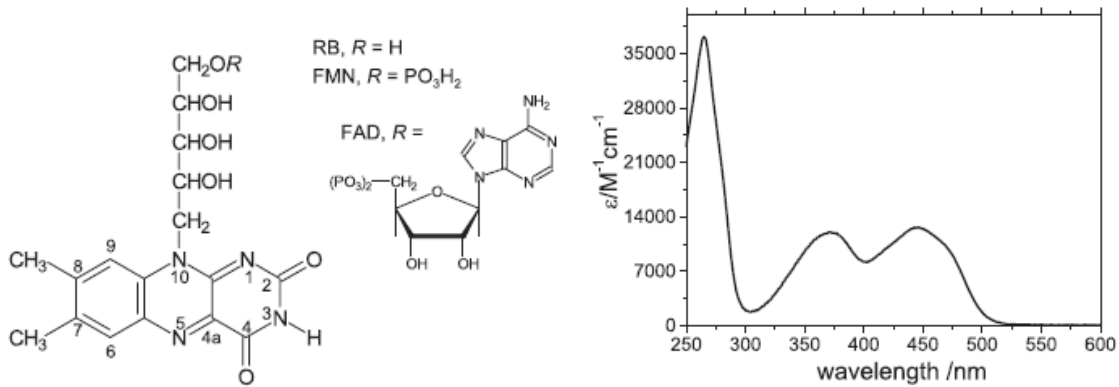


Abb. 1-6: links: Aufbau der Flavinstrukturen, Riboflavin (RB), FMN und FAD; rechts: Absorptionsspektrum der Flavine in wässriger Lösung am Beispiel des FMN (28)

Die oxidierte Form dieser Moleküle zeigt eine gelbe Färbung, die auf die konjugierten Doppelbindungen zurückzuführen ist. In reduzierter Form absorbieren die Chromophore im ultravioletten Bereich, wobei auch Zwischenstufen charakterisiert werden können (29). Dabei handelt es sich neben der voll oxidierten Form (*ox*) um die um ein Elektron reduzierte Semi-quinonform (*sq*) und die Hydroquinon-Form (*hq*), welche um zwei Elektronen reduziert vorliegt (28).

In wässriger Lösung zeigen die vollständig oxidierten Flavine bei Anregung mit Licht ein Absorptionsspektrum mit drei charakteristischen Peaks (Abb. 1-6). Im Fall des FMN liegen diese bei 280 nm, 360 nm und 450 nm. Der Peak bei 450 nm ist dabei die maßgebende Komponente in der Blaulichsensorik der LOV-Domänen.

Die LOV-Domäne besitzt eine klassische PAS-Faltung, bestehend aus einer fünfsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt-Struktur (A β , B β , G β , H β und I β), umgeben von α -Helices, die als Verbindungselemente fungieren (C α , D α , E α und F α) (30). Sie sind je nach Protein mit einer Effektdomäne verbunden, die die letztendliche Funktion beinhaltet. In Abb. 1-7 ist links die PAS Faltung sowie das FMN in gebundener Form zu sehen, rechts sind verschiedene Effektdomänen aufgezeigt. Zu diesen zählen z.B. Kinasen, Phosphodiesterasen (EAL), Diguanylat-Cyclasen (GGDEF) und Helix-turn-Helix Regulatorproteine (HTH).

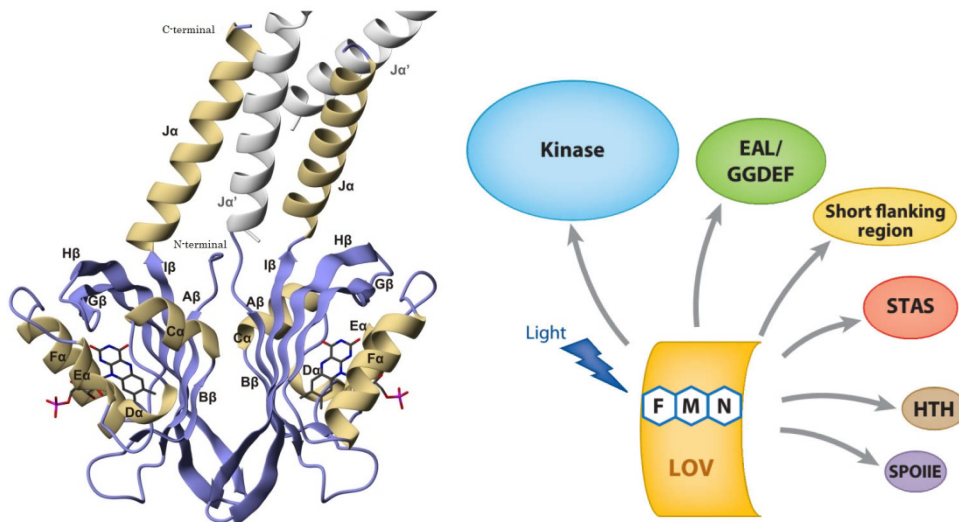


Abb. 1-7: *links*: Strukturmodell der LOV Domäne von YtvA-Proteins aus *Bacillus subtilis* im Dunkelzustand in der Dimerkonformation. Im Kristall bildet sich ein intermolekularer Kontakt zwischen den zwei C-terminalen Jα-Helices und den korrespondierenden Jα'-Helices symmetrisch-verwandter Moleküle (in weiß) (*editiert nach (31)*); *rechts*: Auflistung verschiedener Effektordomänen (8).

Im unbelichteten Zustand liegt das FMN nicht-kovalent gebunden vor. Schwache Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) sowie räumliche Einschränkungen durch die Seitenketten der Aminosäuren formen dabei eine Bindungstasche (32). Absorption von Licht im Wellenlängenbereich um 450 nm setzt einen Photozyklus in Gang (Abb. 1-8), welcher über einen intermediär entstehenden Tripletzustand abschließend zur Bildung eines kovalenten Addukts zwischen dem Kohlenstoff C4_a des Isoalloxazinringes und einem konservierten Cystein auf der Eα-Helix im zentralen Kern der Domäne führt (30). Als Konsequenz verschiebt sich die Absorption von 450 nm auf 390 nm (26).

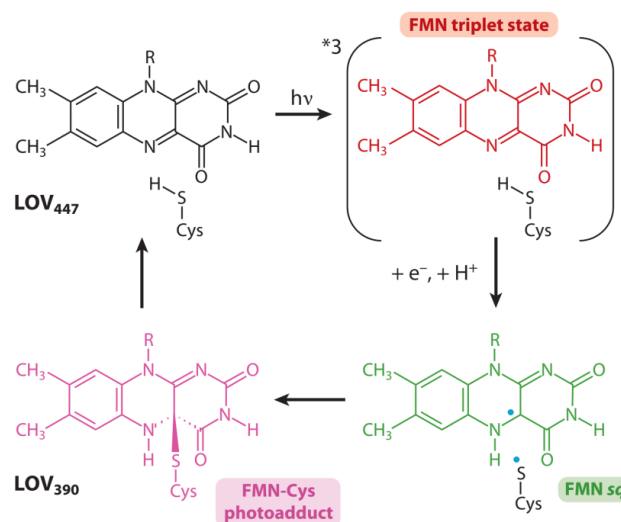


Abb. 1-8: Photozyklus der LOV-Domäne des YtvA-Proteins aus *B. subtilis* (8)

1.1.5 BLUF-Proteine

Die Bezeichnung der BLUF-Proteine geht auf die Funktion und den genutzten Chromophor zurück (**b**lue **l**ight sensing **u**sing **F**AD). Bis heute konnten sie ausschließlich in einzelligen Prokaryoten und Eukaryoten identifiziert werden (33). In Größe und allgemeinem Aufbau ähneln sie den LOV-Domänen (34). Die allgemeine Struktur (Abb. 1-9) zeigt ein sehr kompaktes Protein mit einer β -Faltblatt-Struktur, die auf der einen Seite von zwei parallelen α -Helices und auf der gegenüberliegenden Seite von einem Helix-turn-Helix Motiv umgeben ist (34-36). Dadurch entsteht eine sogenannte $\alpha\beta$ -Sandwichform mit der typischen Ferredoxin-ähnlichen $\beta_1\alpha_2\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$ Raumstruktur (36). Der Isoalloxazinring des FAD ist eng, aber nicht kovalent zwischen den beiden Helices und der β -Faltblatt-Ebene eingelagert. Dabei bilden fast alle Sekundärstrukturelemente der BLUF Domäne eine Art Bindungstasche, die stabilisierend wirkt (36).

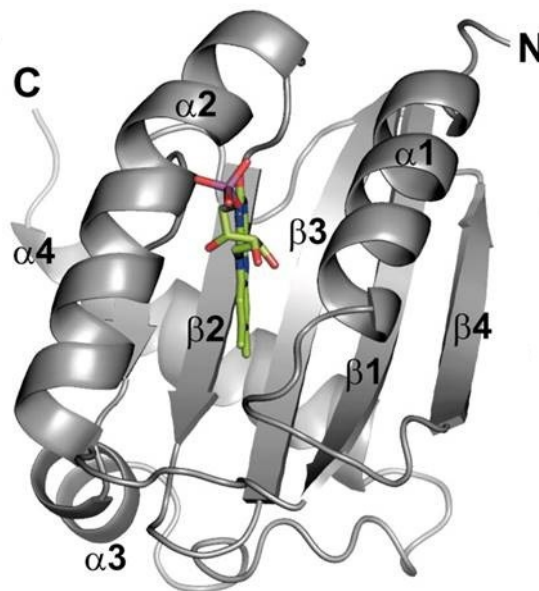


Abb. 1-9: Monomer von BlrB aus *Rhodobacter sphaeroides* mit gekennzeichneten Sekundärstrukturen; Apoprotein (grau) und Flavin Chromophor (grün) (37)

Durch Belichtung findet ein sehr schneller Protonen-gekoppelter Elektronentransfer (PCET) zwischen einem konservierten Tyrosin und dem nicht kovalent gebundenen Flavin-chromophor statt, welcher in einer Neuordnung des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerks resultiert (38). Diese Änderung ist durch eine Rotverschiebung von 10-15 nm gekennzeichnet, welche nach Abschalten des Lichts je nach Protein im Zeitraum von wenigen Sekunden bis hin zu einigen Minuten revertiert und das Protein wieder in den Grundzustand überführt (35,38).

1.1.6 Phytochrome

Phytochrome (Phy) sind in Pflanzen allgegenwärtig und regulieren eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen. Bis in die späten neunziger Jahre ging man davon aus, dass Phytochrome nur in Pflanzen vorkommen. Dies änderte sich durch die Entdeckung eines Gens im Genom des Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803, das für ein Phytochrom-ähnliches Protein kodiert. Durch Expression des Gens in *E. coli* und anschließende Zugabe von Phycocyanobilin (PCB), einem Derivat des Chromophors der pflanzlichen Phytochrome, konnte ein Protein mit einem Phytochrom typischen P_r/P_{fr} Absorptionsspektrum erhalten werden (39). Der verwendete Chromophor PCB stellt ein leicht zugängliches Derivat des in Pflanzen vorkommenden Phytochrom-Chromophor dar (dort als Phytochromobilin bezeichnet). Durch phylogenetische und sequenzanalytische Methoden wurde die Familie der Phytochrome um eine hohe Anzahl von Mitgliedern aus allen Bereichen des Lebens erweitert.

Dabei wird die Phytochromfamilie in fünf Unterfamilien unterteilt (Abb. 1-10): pflanzliche Phytochrome, **b**acterioph**h**ytochrome **P**hotorezeptoren (Bacteriophytochrome, BphPs), **c**yanobakterielle **P**hytochrome (Cphs), pilzliche (**f**ungal) **P**hytochrome (Fphs), **C**yanob**a**cteriochrome (CBCRs) und eine Gruppe Phy-ähnlicher Proteine (12,40).

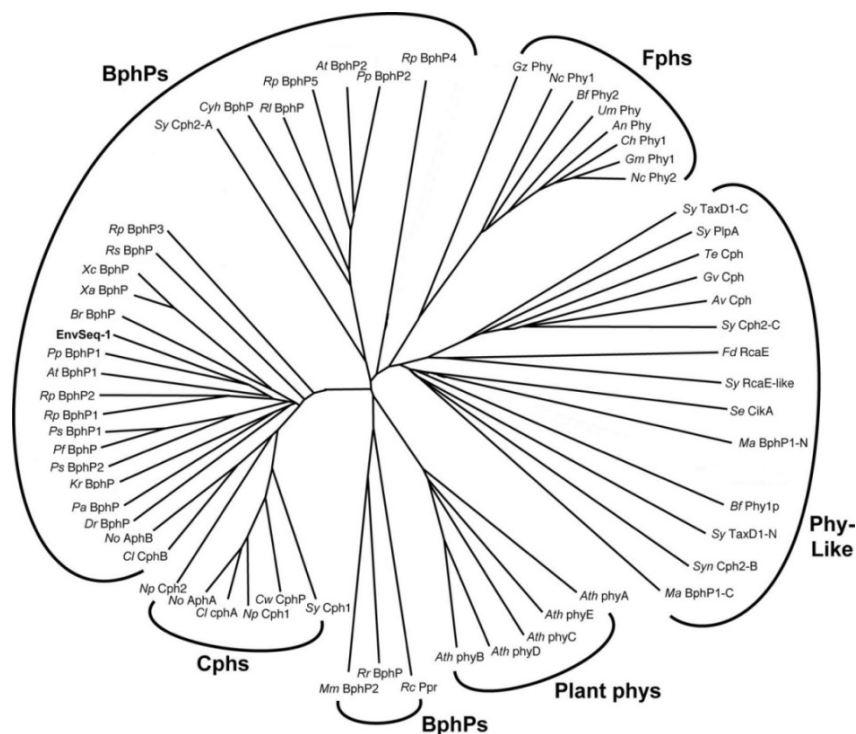


Abb. 1-10: Phylogenetische Analyse der Phy Superfamilie basierend auf einem Alignment der GAF-Domäne (editiert nach (41)), hier noch nicht aufgenommen sind die Cyanobacteriochrome, s.u.

Die Domänen-Architektur der Phytochrome

Phytochrome bestehen aus zwei Hauptdomänen, einer N-terminalen photosensorischen Domäne und einer C-terminalen Regulationsdomäne. Abb. 1-11 zeigt den Aufbau verschiedener Phytochrome aus Pflanzen (Phy), Cyanobakterien (Cph), anderer Bakterien (BphP) und Pilzen (Fph). Ausgenommen sind hier die Cyanobacteriochrome (CBCRs), die in ihrer allgemeinen Domänenstruktur abweichen und daher gesondert in dem dazugehörigen Unterkapitel beschrieben werden (40,42).

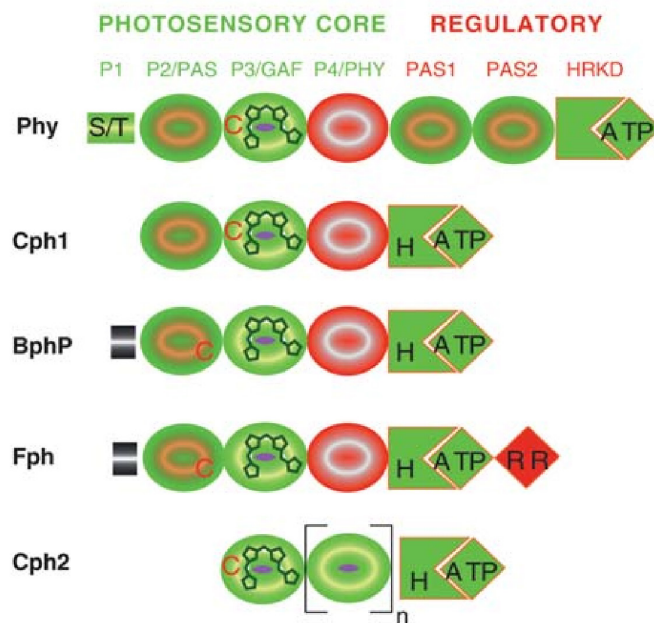


Abb. 1-11: Domänenarchitektur der Phytochrome aus Pflanzen (Phy), Cyanobakterien (Cph1, Cph2), Eubakterien (BphP) und Pilzen (Fph) (42)

Die N-terminale Domäne bindet den Bilin-Chromophor und setzt sich aus drei konservierten Domänen zusammen. Einer P2 oder PAS- (Per-ARNT-Sim) Domäne, einer P3 bzw. GAF- (cGMP Phosphodiesterase/ Adenylcyclase/ FhlA Domäne) sowie einer P4/PHY-Domäne. Die C-terminale regulatorische Domänenstruktur besteht häufig aus einer Histidinkinase-Domäne (HKD) oder einer Histidinkinase-verwandten Domäne (HRKD). Die pflanzlichen Phytochrome besitzen zusätzlich eine weitere Domäne (P1) am N-terminalen Ende. Diese verlangsamt die Dunkelkonversion (s.u.) durch die Stabilisierung des P_{fr} -Zustandes. Weiterhin besitzen sie zwei zusätzliche PAS-Domänen (PAS1 und PAS2), die zwischen dem photosensorischen Abschnitt und der Histidinkinase-Domäne liegen und wichtig für die Kernlokalisierung sind.

Die Fphs und BphPs tragen keine P1-Domäne, weisen aber vor der PAS-Domäne N-terminale Erweiterungen auf. Zusätzlich findet sich bei den Phytochromen in Pilzen eine C-terminale Response-Regulator-domäne (RR). Cph2 besitzt im Vergleich zu den anderen vier aufgeführten Phytochromklassen keine PAS-Domäne. Ein weiterer Unterschied stellt die fehlende PHY-Domäne dar, die bei Cph2-ähnlichen Proteinen durch eine variable Anzahl von GAF-Domänen ersetzt ist.

Der Chromophor der Phytochrome

Zur Lichtabsorption nutzen alle Phytochrome einen offenkettigen Tetrapyrrol- (Bilin) Chromophor. Es wurden bisher drei unterschiedliche Biline nachgewiesen, die für die Photochemie in den verschiedenen Phys genutzt werden: Phytochromobilin (P ϕ B) in Pflanzen, Phycocyanobilin (PCB) in Cphs und CBCRs sowie Biliverdin (BV) in den übrigen Phys aus Bakterien und Pilzen.

Alle als Chromophor verwendeten Biline stammen aus dem oxidativen Häm-Abbau, bei dem im ersten Reaktionsschritt das Häm nach Entfernen des zentralen Eisenions durch eine Häm-Oxygenase in Biliverdin IX α konvertiert wird. Dieses BV kann in BphPs und Fphs direkt als Chromophor über eine Thioetherbindung an ein Cystein in der PAS-Domäne des Proteins gebunden werden (Abb. 1-11/Abb. 1-12).

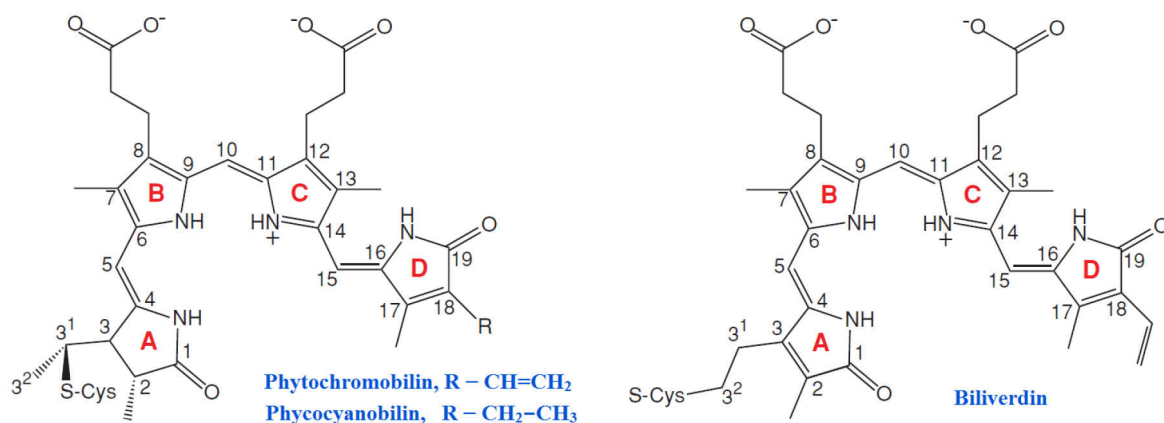


Abb. 1-12: Strukturformeln der Phytochrom-Chromophore am Beispiel von PCB, P ϕ B und BV (editiert nach (42)). Stereochemische Struktur aller gezeigten Chromophore ist ZZZssa.

In Pflanzen wird BV mit Hilfe einer 3Z-Phytochromobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase (HY2) durch eine Zwei-Elektronen-Reduktion in P ϕ B umgewandelt. In Cyanobakterien (Cphs, CBCRs) wird entsprechend durch eine Vier-Elektronen Reduktion unter Nutzung einer Phycocyanobilin:Ferredoxin Oxidoreduktase (PcyA) ein PCB-Chromophor erzeugt (40,43,44). Beide Biline binden im Protein mittels einer Thioetherbindung über die Position C3¹ im A-Ring an ein konserviertes Cystein in der GAF-Domäne (40,42). Daneben können einige Proteine drei weitere Bilinderivate nutzen: Phycoerythrobilin (PEB), Phycoviolobilin (PVB) und Phycourobilin (PUB).

In den meisten Phytochromen durchlaufen die gebundenen Bilinchromophore eine Photokonversion zwischen zwei thermisch stabilen Zuständen, P_r (r, red-absorbing, λ_{max} = 650-670 nm) und P_{fr} (fr, far red-absorbing, λ_{max} = 710-750 nm). Wie in Abb. 1-13 dargestellt, bewirkt Bestrahlung mit Rotlicht eine Photoisomerisierung der C15/C16-Doppelbindung. Die thermisch stabile 15Z-Form (P_r) des Bilins wird bei der Absorption von Rotlicht (**I**, λ_{max} 650–670 nm) über das Lumi-R Photoprodukt und mehrere nachfolgende lichtunabhängige Schritte (**II**) in die metastabile Dunkelrotlicht-absorbierende (P_{fr}) 15E-Form überführt.

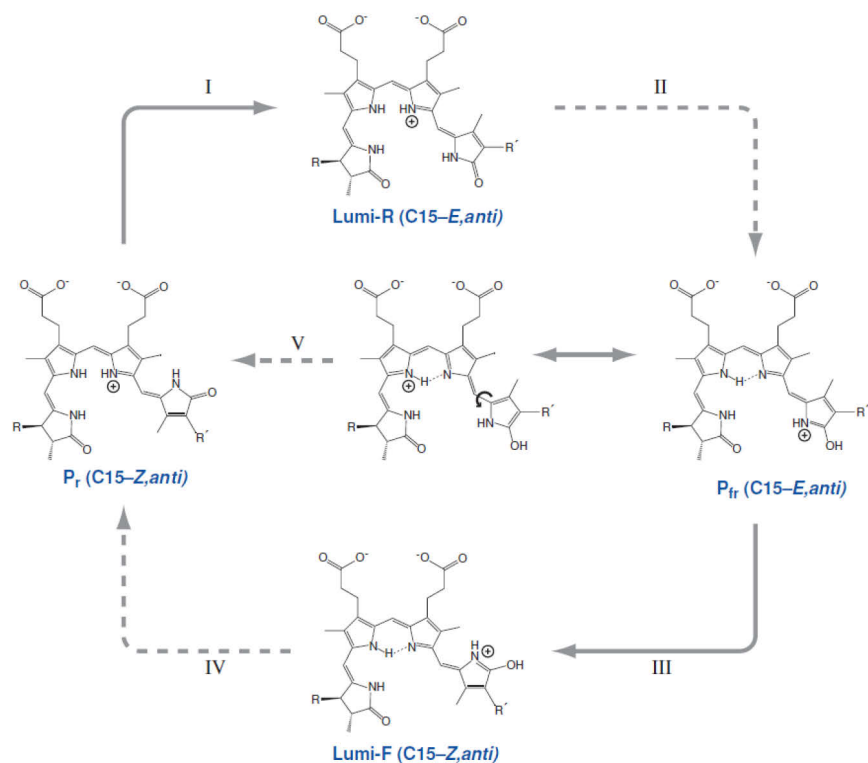


Abb. 1-13: Photozyklus für Phytochrome die PCB oder P ϕ B nutzen. Die durchgezogenen Pfeile markieren die lichtinduzierten Reaktionen, während die gestrichelten Pfeile die lichtunabhängigen Schritte markieren. Der Doppelpfeil zeigt den Übergang des P_{fr}-Zustandes in eine mögliche Resonanzstruktur auf (42).

Belichtung mit dunkelrotem Licht löst die inverse Photoisomerisierung zum primären Photoprodukt Lumi-F (C15-Z, anti) aus (III). Dieses wird, ähnlich wie auf der Hin-Reaktion, aber auf anderem Reaktionsweg, über eine Abfolge lichtunabhängiger Vorgänge (IV) in den P_r-Zustand konvertiert.

Die P_{fr}-Form (oder allgemein die Photoproduktform) kann zusätzlich, in Abwesenheit von Licht, durch einen vollständig thermischen Prozess (Dunkelumkehr) in die P_r-Form zurückgeführt werden (V). Diese Umkehr erfolgt langsam und möglicherweise über eine mit der P_{fr}-Form in Resonanz stehende Übergangsstruktur mit einem Einfachbindungscharakter entlang der C15/C16-Bindung (42).

Einige Phytochrome weichen von der Domänenstruktur und dem allgemeinen Ablauf des Photozyklus ab. Nachfolgend werden alle Untergruppen der Phytochrom-Superfamilie vorgestellt. Falls vorhanden, werden funktionelle und strukturelle Unterschiede zu den klassischen Phytochromen diskutiert.

Pflanzliche Phytochrome (Phy)

Die photoreversiblen Eigenschaften der Phytochrome konnten zum ersten Mal 1959 *in vivo* und *in vitro* spektroskopisch erfasst werden (45). In den meisten Pflanzen sind die Phytochrome durch eine kleine Genfamilie kodiert und weisen alle ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa auf. Der Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* kodiert fünf verschiedene Gene: Phytochrom A, B, C, D, E (*phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD* und *phyE*) (46). Die Homologie dieser Sequenzen beträgt ungefähr 50 % wobei sie zwischen *phyB* und *phyD* mit 80 % deutlich höher ist (12,47,48).

Phytochrome übernehmen viele z.T. einander überschneidende Funktionen in der Regulation der Pflanzenentwicklung. Essentielle Aufgaben, die Phytochrome in Pflanzen erfüllen, dienen der Entwicklung der Keimlinge (Deetiolierung) und der Detektion des Unterschiedes zwischen Rotlicht-abgeschwächtem Licht (Schatten) und Rotlicht-angereichertem Licht (volle Sonne). *PhyA* ist sehr lichtunbeständig und das dominierende Phytochrom in etiolierten Sämlingen. Es dient als eine Art Antenne, die die Deetiolierung bei der kleinsten Bestrahlung mit Licht initiiert. *PhyB* hingegen ist sehr lichtstabil und ist das dominierende Phytochrom in deetiolierten Pflanzen. Es ist das ausschlaggebende Element in der Regulation des

Längenwachstums sowie bei der Schattenflucht. *PhyA* und *phyB* zeigen somit gegensätzliche Effekte. *PhyA* sieht dunkelrotes Licht als Signal für die Deetiolierung, wohingegen *phyB* es als Schattensignal auffasst (49,50).

Cyanobakterielle Phytochrome (Cph)

Die Familie der cyanobakteriellen Phytochrome (zu unterscheiden von den Cyanobacteriochromen, CBCRs, s.u.) ist weit über die unterschiedlichen Cyanobakterien-Arten verteilt und zeigt im Vergleich zu allen Phytochromklassen die größten Gemeinsamkeiten zu den ‚klassischen‘ Phytochromen aus höheren Pflanzen (51). Der Wegbereiter für die Klasse der Cphs war Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Es nutzt wie die anderen Cphs Phycocyanobilin als Chromophor, welches in gleicher Weise wie das P ϕ B in den pflanzlichen Phytochromen an ein konserviertes Cystein in der GAF-Domäne gebunden ist. Weiterhin zeigt es die charakteristischen P_r bzw. P_{fr} Absorptionsspektren (52,53). Die leichte Blauverschiebung beider Formen im assemblierten Protein (P_r = 654 nm und P_{fr} = 706 nm) im Vergleich zur Absorption der Phys aus Pflanzen (P_r = 666 nm und P_{fr} = 730 nm) ist mit einer fehlenden Doppelbindung im π -Elektronensystems des PCBs im Vergleich zum P ϕ B (Substituent an Pos. 18) zu erklären, siehe auch Abb. 1-12 (54).

Die Domänenarchitektur folgt der klassischen Abfolge von PAS/GAF/PHY-Domänen mit einer anschließenden Histidinkinase im C-terminalen Regulationsbereich. Die Kristallstruktur der signalgebenden Domänen (Abb. 1-14) zeigt ein einzigartiges Merkmal der Phytochrome in Form eines zungenförmigen Hinübergreifens der PHY-Domäne („tongue region“) in die GAF Domäne, das die Chromophortasche versiegelt und somit den photoaktiven P_{fr}-Zustand stabilisiert. Dabei bildet sich eine Salzbrücke zwischen einem Argininfinger der PHY-Domäne und einem konservierten Asp-Rest im D-Ring des Chromophors (55). Diese „tongue region“ ist offensichtlich auch in die Signalübermittlung aus der GAF- in die PHY-Domäne beteiligt, da sich die Sekundärstruktur dieses Strukturelements nach Lichtabsorption beim Übergang in die signalgebende Form ändert (56).

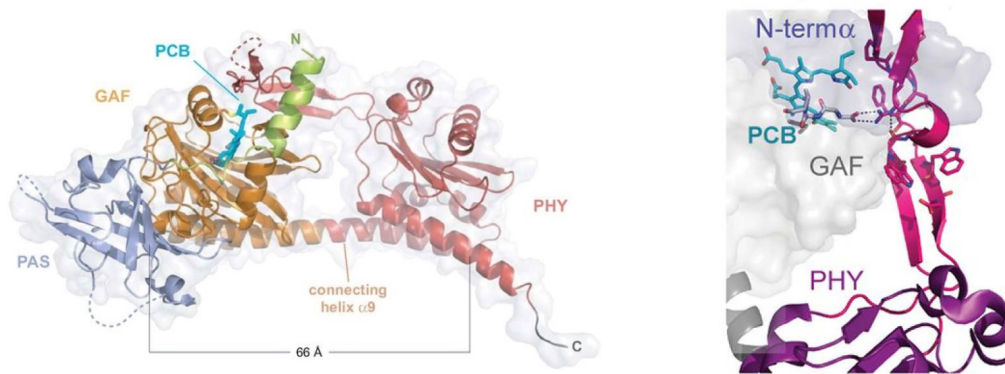


Abb. 1-14: *links*: Bänderdarstellung der photosensorischen Domänen von Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803: N-terminale α -Helix (grün), PAS- (blau), GAF- (orange) und PHY- (rot) Domänen. Der PCB-Chromophor (türkis) bindet kovalent an das Cys259 in der GAF-Domäne; *rechts*: Struktur und Interaktionen zwischen der „tongue region“ und der chromophortragenden GAF-Domäne im P_r -Zustand von Cph1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (56).

Im Genom von *Synechocystis* konnte ein weiteres cyanobakterielles Phytochrom identifiziert werden. Dieses (Cph2) besitzt im Vergleich zu Cph1 bemerkenswerte Unterschiede in der Domänen-Architektur (55). Die sonst üblichen PAS/GAF/PHY Sensormodule sind in eine GAF-GAF Bidomäne verändert (Abb. 1-15). Diese GAF-GAF Tandemanordnung bindet PCB und zeigt eine photoreversible $P_r - P_{fr}$ Photochemie. Diese steuert ein GGDEF-EAL Effektormodul, welches als cyclo-di-GMP abbauende Phosphodiesterase agiert. Dabei nimmt die zweite GAF-Domäne die stabilisierende Rolle, die in Cph1 der PHY-Domäne zugesprochen wird, ein (57). Daneben besitzt Cph2 eine weitere CBCR ähnliche GAF-Domäne (siehe nächstes Unterkapitel), die eine blau/grün Photochemie zeigt und durch den Wechsel zwischen den beiden Photozuständen das cyclo-di-GMP-Level reguliert (GGDEF-Domäne) (56). In der vorliegenden Arbeit wurden die ersten beiden GAF-Domänen untersucht. Dabei handelt es sich um die chromophorbindende Domäne (GAF1) als auch um die stabilisierende Domäne (GAF2).

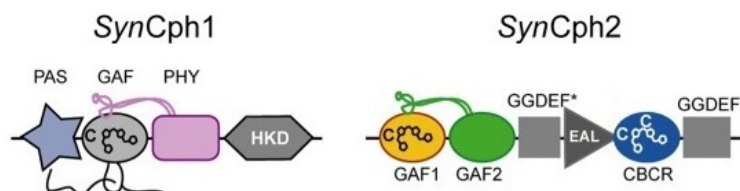


Abb. 1-15: Vergleich der Domänenarchitektur von Cph1 und Cph2 aus *Synechocystis*: Die zungenförmigen Ausbuchtungen der PHY- bzw. GAF2-Domäne bleibt erhalten (56).

Bacteriophytochrome Photorezeptoren (BphP)

Eine weitere Gruppe der Phytochrome findet sich in Bakterien, was ihnen den Namen bakterielle Phytochrome (BphP) eingebracht hat. Dabei handelt es sich um eine weitverbreitete Phytochromfamilie, die eine Homologie zu dem auf den Histidinkinasen beruhendem Zweikomponenten-Signalsystem aufweist. Ebenso wie Fphs und Cphs (s.u.) nutzen die BphPs die P ϕ B/PCB Vorstufe Biliverdin (BV) als Chromophor (58). Die evolutionäre Verlagerung von der Nutzung von BV in Bakterien zu PCB und P ϕ B in Cyanobakterien und Pflanzen kann auf den Wechsel von der anoxygenen zur oxygenen Lebensweise und der Anfälligkeit von BV gegenüber Lichtschäden zurückgeführt werden (59).

Die Absorption von gebundenem BV ist im Vergleich zu PCB und P ϕ B deutlich in den dunkelroten Bereich verschoben ($P_{r(Abs.)} \sim 700 \text{ nm}$, $P_{fr(Abs.)} \sim 750 \text{ nm}$) (59). Bei einigen BphPs findet sich das für die Hämoxygenase kodierende Gen im selben Operon wie das Apophytochromgen. Der für die Bindung zum BV Chromophor zuständige konservierte Cysteinrest befindet sich im Gegensatz zu den kanonischen Phys nicht in der GAF-Domäne, sondern in der N-terminalen PAS-Domäne. Dabei bildet sich eine kovalente Bindung zwischen der Cystein-Seitenkette und dem C3²-Atom der Vinylgruppe des BV aus (Abb. 1-12) (40). Die Position des Chromophors bleibt aber in der GAF-Domäne und entspricht der der PCB-bindenden Phytochrome. Spektrale Untersuchungen zeigen, dass die meisten BphP einen typischen Phy-Photozyklus zeigen.

Der P_r-Zustand bildet sich durch die autokatalytische Bindung von BV und kann durch Absorption von Licht in das Photoprodukt P_{fr} überführt werden. Der umgekehrte Weg von P_{fr} zu P_r erfolgt ebenfalls vergleichbar den kanonischen Phytochromen durch Belichtung oder thermisch unter Lichtausschluss über einen gewissen Zeitraum. Bei einigen untersuchten BphPs wie *Agrobacterium tumefaciens* ist die Dunkelrückkehr im Vergleich zu der der Phys aus Pflanzen deutlich verkürzt. Dies lässt auf einen instabileren P_{fr}-Zustand schließen (51).

Der Aufbau der BphPs deutet darauf hin, dass die meisten Vertreter die Funktion einer Zwei-Komponenten-Histidinkinase (TC-HK) ausüben, da häufig eine typische HKD im C-terminalen Abschnitt des Proteins zu finden ist. TC-HKs sind eine Familie von dimeren Protein-Kinasen, die von vielen Bakterien zur Adaption der Umwelt verwendet werden (51). In einigen Arten findet sich ein zusätzlich an die HKD anfusionierter Responseregulator, wohin-

gegen andere Phytochrome eine neue Art von HKD tragen, die als HWE-HKD (konservierte Histidin-, Tryptophan-, Glutaminsäure- Reste in der HKD) benannt wird (51).

Eine besondere Variante der BphPs stellen die sogenannten bathy-BphPs dar. Sie assemblieren mit BV zunächst zu einem deutlich nachweisbaren P_r -ähnlichen Intermediat, welches dann ohne Beteiligung von Licht in einen stabilen P_{fr} Grundzustand übergeht (60,61). Mit dem bathy-Phytochrom aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaBphP) wurde in der vorliegenden Arbeit ein Vertreter dieser Gruppe spektroskopisch untersucht (62).

Pilzliche Phytochrome (Fph)

Pilze sind imstande, auf Licht im Bereich von UV-A bis in den dunkelroten Bereich zu reagieren (63). Die pilzlichen Phytochrome detektieren, wie die Bacteriophytochrome, im roten- und dunkelroten Bereich und sind bezüglich ihrer Domänenarchitektur den BphPs sehr ähnlich. Sie besitzen die typische N-terminale PAS/GAF/PHY-Domänen Abfolge mit einem Cystein in der PAS-Domäne für die Chromophorbindung. Auch die Fphs binden BV kovalent und zeigen einen P_r/P_{fr} -Photozyklus. C-terminal besitzen die meisten Fphs eine typische HKD, gefolgt von einem Responseregulator. Diese Kombination lässt wie schon bei den BphPs auf eine Hybridkinase schließen (51,64,65).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit FphA aus *Aspergillus nidulans* gearbeitet. Dieser Pilz reproduziert asexuell mit Konidien und sexuell mit Ascosporen (66,67). Die asexuelle Lebensweise tritt bei Wellenlängen um 680 nm auf, die sexuelle um 740 nm oder unter Lichtausschluss (63).

Cyanobacteriochrome (CBCR)

Die Cyanobacteriochrome (CBCRs), die wie der Name schon sagt, in Cyanobakterien zu finden sind, nehmen in der Klasse der Phytochrome eine außergewöhnliche Stellung ein. Sie tragen ebenso wie diese PCB als Chromophor und zeigen im Prinzip dieselben lichtinduzierten Reaktionen wie die klassischen Phytochrome, erweitern jedoch durch Variationen der photochemischen Eigenschaften den Spektralbereich bis in den nahen UV-Bereich (40,68,69). Im Vergleich zu den Phys zeigen sie zusätzlich eine sehr variable Domänenarchitektur, bei der eine GAF-Domäne ausreicht, um eine vollständige reversible Photochemie auszulösen (Abb. 1-16).

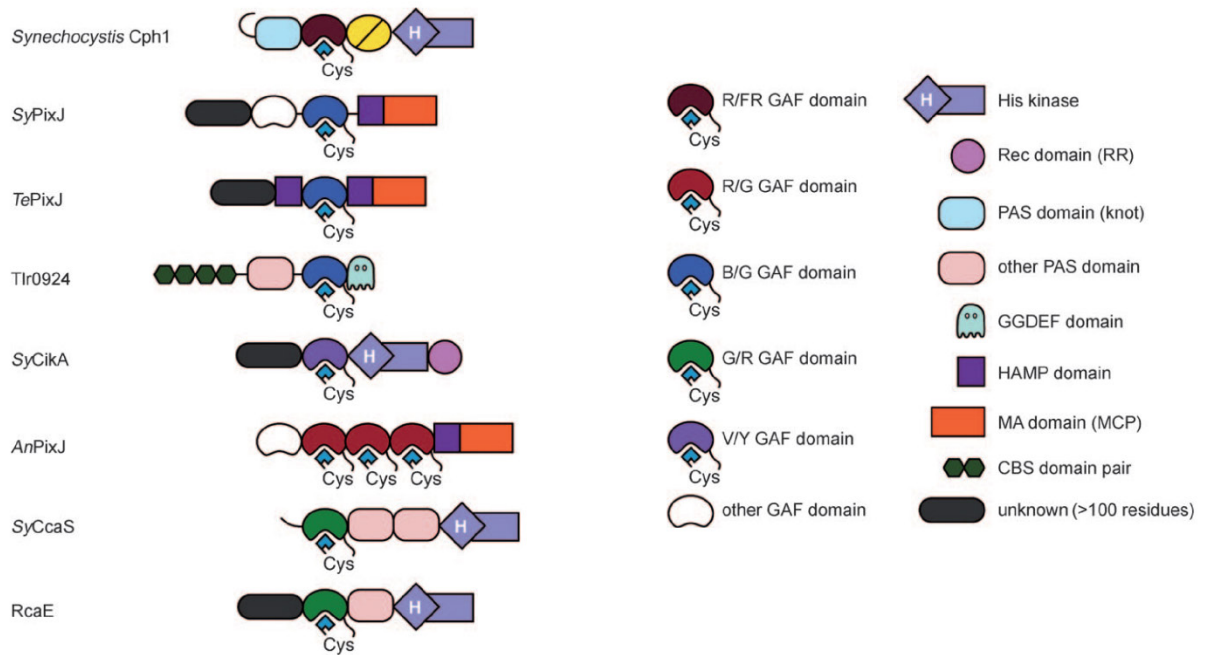


Abb. 1-16: Domänenarchitektur einiger CBCRs im Vergleich zu Cph1 aus *Synechocystis*. Die CBCRs stammen aus folgenden Organismen: SyPixJ (*Synechocystis*), TePixJ (*Thermosynechococcus elongatus*), Tlr0924 (*Thermosynechococcus elongatus*), AnPixJ (*Anabaena*), SyCCaS (*Synechocystis*); RcaE (*Fremyella diplosiphon*). Die Bezeichnung der Domänen ist rechts aufgeführt. Die Großbuchstaben neben den GAF-Domänen kennzeichnen die Bereiche der beiden Zustände im Spektralbereich. Die Signaldomänen sind: Histidinkinase, REC (Responseregulator Empfänger), PAS, GGDEF Motiv, HAMP (Histidinkinase, Adenylcyclase, Methylbindendes Protein, Phosphatase), MA (Methylakzeptor-Chemotaxis-Protein), CBS (Cystathionin β -Synthase) (68).

Daneben gibt es eine Reihe weiterer Eigenschaften, die eine Abgrenzung von den klassischen Phys rechtfertigen. Die Chromophor-bindende GAF-Domäne zeigt zwar eine deutliche strukturelle Homologie zur GAF-Domäne der klassischen Phytochrome, lässt sich allerdings durch den Sequenzvergleich eindeutig in eine eigene Familie einordnen (68,70). Die CBCRs nutzen wie die anderen Phys ein lineares Tetrapyrrole (Bilin) als Chromophor, binden jedoch neben PCB auch Phycoviolobilin (PVB), welches während des Bindungsvorganges autokatalytisch aus PCB hervorgeht (70-73).

Anhand ihrer Photochemie und primären Struktur können sechs Untergruppen der CBCRs unterschieden werden (Rot/Grün, Grün/Rot, DXCF, insert-Cys, Rot/Blau, NpR3874, die jeweiligen Farbangaben bezeichnen den Absorptionsbereich: Rot = rot-absorbierend) (69,74). Zwei dieser Untergruppen zeigen erstaunlicherweise entgegengesetzte Photozyklen: Rot/Grün CBCRs besitzen einen rot-absorbierenden 15Z Dunkelzustand (Grundzustand) und ein grün-absorbierendes 15E Photoprodukt (75-78), demgegenüber stehen die Grün/Rot CBCRs, welche einen grün-absorbierenden 15Z Dunkelzustand und ein rot-absorbierendes

15E Photoprodukt besitzen (79-81). In den beiden folgenden Untergruppen, als DXCF und insert-Cys bezeichnet, ist ein zusätzliches konserviertes Cystein an der Photochemie beteiligt. Dieses bildet eine kovalente Bindung zum C10 Atom des Bilins aus und verkürzt somit das konjugierte System. Entsprechend weisen diese beiden Untergruppen blaue, violette oder sogar ultraviolette Absorptionsmaxima auf (70,73,82). Die fünfte Unterfamilie der CBCRs zeigt eine ungewöhnliche Rot/Blau-Photochemie, deren Grundlage auf einer im Vergleich zu den beiden zuvor erwähnten Gruppen langsamen temperaturabhängigen kovalenten Bindung eines zweiten Cysteinrestes beruht, der eine sehr starke Blauverschiebung des Photoproduktes zur Folge hat (83,84).

Die letzte und zudem auch erst kürzlich entdeckte Unterfamilie mit dem bisher einzigen Vertreter NpR3784 aus *Nostoc punctiforme* zeigt wie die Rot/Grün CBCRs einen rot-absorbierenden Grundzustand und ein grün-absorbierendes Photoprodukt. Dabei findet sich jedoch im Vergleich zu den anderen Rot/Grün CBCRs eine deutlich andere Struktur im Bereich der Chromophorbindung. Eine starke Variation der wichtigen Schlüsselresiduen für die Grünverschiebung des Photoproduktes führt zur Bildung einer eigenen neuen Unterfamilie der CBCRs (74). Daneben gibt es noch zahlreiche CBCRs, die bis jetzt keiner der zuvor genannten Untergruppen zugeordnet werden konnten. Darunter fallen zwei Proteine, welche in der vorliegenden Arbeit spektroskopisch untersucht wurden. Die beiden GAF-Domänen GAF1 und GAF3 in AphC aus *Nostoc* sp. PCC 7120 zeigen eine für Phytochrome klassische Rot/Dunkelrot-Photochemie (GAF1), sowie eine Rot/Orange-Photochemie (GAF3), wobei in diesem Protein das orange-absorbierende Photoprodukt eine sehr geringe thermische Stabilität aufweist (77).

Die zuvor genannten Untergruppen werden im Folgenden anhand mindestens eines Beispiels genauer beschrieben, wobei vor allem auf die in dieser Arbeit untersuchten Untergruppen und Vertreter eingegangen wird.

Rot/Grün

Die Rot/Grün CBCRs zeigen den größten Unterschied zu den klassischen Phytochromen mit einem deutlich kurzwellig verschoben Photoprodukt-Zustand (P_g), welcher das Pendant zu dem dunkelrot-absorbierenden P_{fr} -Photoprodukt der klassischen Phytochrome darstellt. Erklärungen hierfür konnten bei den Untersuchungen des CBCR AnPixJ aus *Nostoc* sp. PCC 7120 gefunden werden, welches oft als Modellorganismus genutzt wird. Im direkten

Vergleich der Photozyklen der zweiten GAF-Domäne (GAF2) dieses Proteins mit der strukturell ähnlichen GAF-Domäne aus Cph1 mittels ^{13}C MAS NMR zeigen sich Unterschiede bei der Elektronendichte am C- und D-Ring (85). Beim Übergang in das jeweilige Photoprodukt nimmt bei AnPixJg2 die Elektronendichte zu, wohingegen sie bei Cph1 abnimmt. Dies deutet auf eine Destabilisierung eines LUMOs (lowest unoccupied molecular orbital = niedrigstes unbesetztes Orbital eines Moleküls) bei AnPixJg2 hin, was die kurzzeitige Verschiebung des P_g -Zustandes erklärt. Ein weiterer Grund ist vermutlich die während der E/Z-Photoisomerisierung veränderte Interaktion mit einem Chromophor-nahen Tryptophanrest, wodurch anscheinend eine Öffnung entsteht, die den Einstrom von Wassermolekülen ermöglicht und eine deutlich polarere Chromophorumgebung erzeugt. Wie Raman-Messungen zeigen, bewirkt dies eine Erhöhung der Methinbrücken-Streckschwingungsfrequenz welche von einer hypsochromen Absorptionsverschiebung begleitet wird (86,87). Ein weiterer Auslöser für die Blauverschiebung ist die Festsetzung des Chromophors in einer gedrehten Geometrie, ausgelöst durch einen konservierten Phenylalaninrest im zweiten β -Strang der GAF-Domäne sowie der α -Helix, die auch den konservierten Cysteinrest für die Chromophorbindung trägt (84).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Vertreter der Rot/Grün CBCRs die GAF3-Domäne aus Slr1393 aus *Synechocystis* sp. PCC 6083 untersucht (78). Dabei handelt es sich strukturell gesehen um ein sehr ähnliches Protein wie AnPixJg2, welches in den meisten funktionell wichtigen konservierten Aminosäuren mit diesem übereinstimmt (Abb. 1-17).

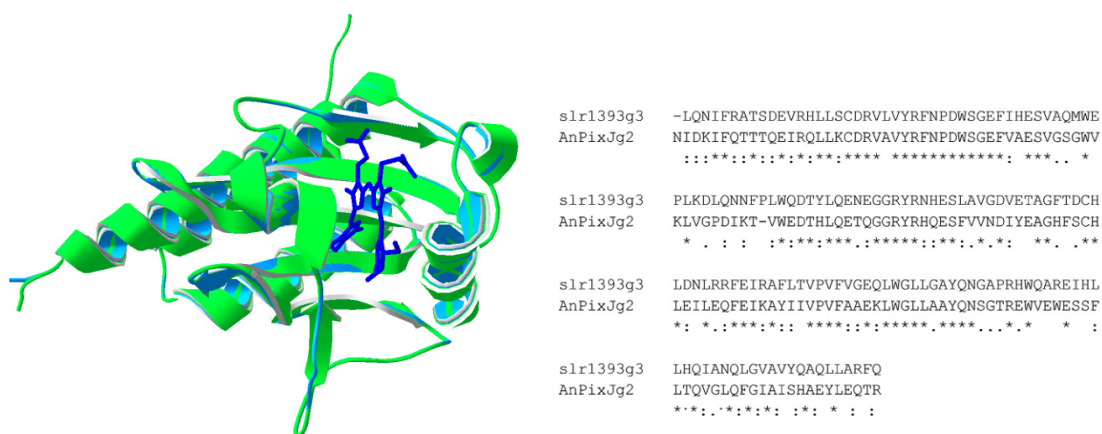


Abb. 1-17: links: Overlay der Strukturen von AnPixJg2 (Grün, PDB ID: 3W2Z) und der Modellstruktur von Slr1393g3 (Blau, Template: AnPixJg2); **rechts:** Sequenzalignent von Slr1393g3 und AnPixJg2, * vollständig konserviert, : halbkonserviert, . funktionell identisch (78)

Grün/Rot

Die bis heute am besten untersuchte lichtgesteuerte physiologische Funktion von CBCRs ist die Regulation der komplementären chromatischen Angleichung (CCA). Dabei optimieren die Cyanobakterien die Zusammensetzung ihrer photosynthetischen Pigmente, um auf das aktuelle Angebot an rotem oder grünem Licht zu reagieren und die Lichtaufnahme zu erhöhen (12,51). Der erste charakterisierte Vertreter dieser Art war RcaE aus *Fremyella diplosiphon*. RcaE befindet sich in einem Drei-Komponenten-Phosphorelay-System, welches die Expression von Phycocyanin (PC) und Phycoerythrin (PE) je nach einstrahlendem Licht reguliert. PC und PE sind Antennenpigmente der Phycobilisomen, die rotes (PC; $\text{Abs}_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$) bzw. grünes (PE; $\text{Abs}_{\text{max}} = 566 \text{ nm}$) Licht absorbieren (Abb. 1-18).

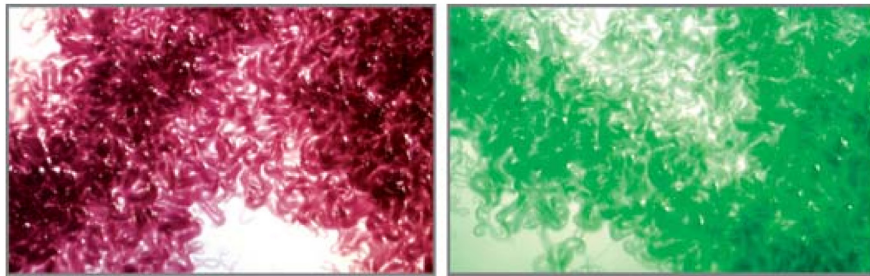


Abb. 1-18: Filamente von *F. diplosiphon*, links: unter Grünlicht; rechts: unter Rotlicht (88).

RcaE konnte ursprünglich nicht bezüglich seiner Photochemie charakterisiert werden, da man keinen Chromophor nachweisen konnte. Dies gelang aber in nachfolgenden Experimenten. RcaE zeigt einen Grün/Rot Photozyklus und eine lichtregulierte Histidinkinase-Aktivität (79). Im Photozyklus zeigt sich die für diese Klasse der CBCRs typische Photochemie (Abb. 1-19).

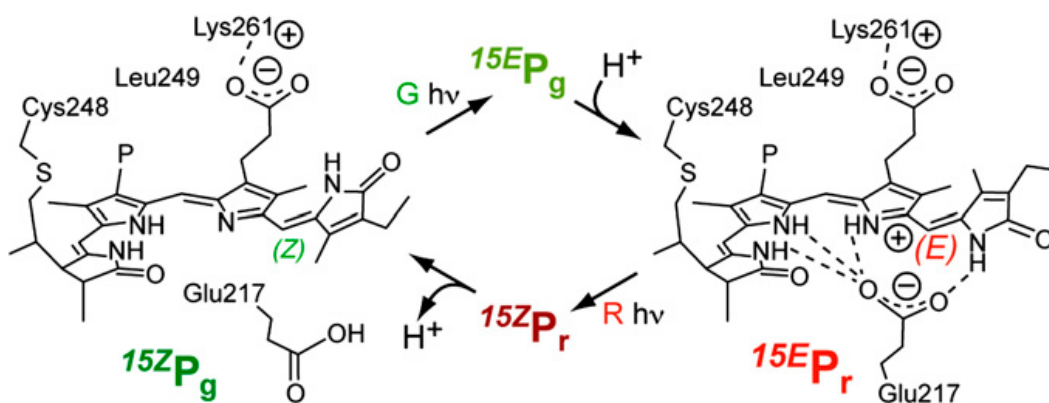


Abb. 1-19: Grün/Rot Photozyklus von RcaE aus *Fremyella diplosiphon* (81)

RcaE kombiniert die Photoisomerisierung des Chromophors mit einer nachfolgenden Verschiebung des pK_a -Wertes des Bilins. Im P_g -Grundzustand (15Z) ist der Bilinchromophor unprotoniert. Über eine Triade von drei Aminosäureresten (Leu249, Lys261, Glu217) wird der Protonentransfer angetrieben, der zu einem protonierten P_r -Zustand führt und so die Rotverschiebung auslöst (Abb. 1-20). Das Glutamin 217 wirkt dabei stabilisierend auf das Photoprodukt und ist auch der Hauptaktivator der pK_a -Verschiebung (81).

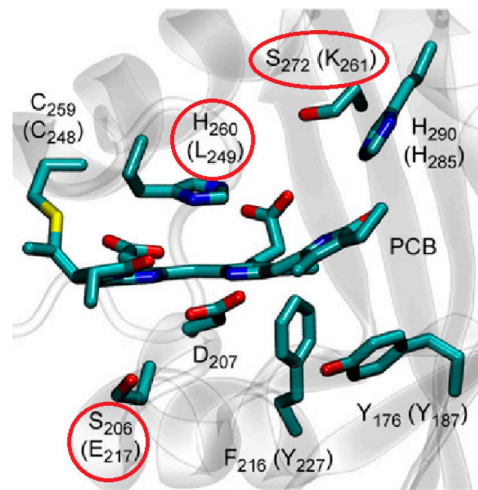


Abb. 1-20: PCB-Bindungstasche der Kristallstruktur von Cph1 im P_r -Zustand. In Klammern stehen die konformen AS-Reste aus RcaE. Die AS der Protonentransfer-Triade sind eingekreist (editiert nach (81) suppl. Material).

DXCF und Insert-Cys

Eine Gruppe der CBCRs zeichnet sich durch ein konserviertes Asp-Xaa-Cys-Phe (DXCF) Motiv aus, in dem ein zweites konserviertes Cystein eine kovalente Bindung mit dem Bilinchromophor eingeht (89). Die Spektralbereiche der beiden Photozustände einzelner Vertreter variieren sehr stark. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten folgende Photozyklen identifiziert werden: Grün/Blaugrün, Grün/Blau, Blau/Orange, Blau/Gelb, Blau/Grün, Blau/Blaugrün, Violett/Grün (70-73,83,90,91), wobei die jeweils kurzwellige Absorption durch die Einwirkung des zweiten Cysteinrests zustande kommt. Zu erwähnen ist, dass das erste photochemisch charakterisierte CBCR SyPixJ1 aus *Synechocystis* sp. PC 6803 ein Vertreter dieser Gruppe ist (92).

In den meisten DXCF CBCRs bildet sich die zweite Cysteinbindung im Dunkelzustand aus. In den anderen Fällen geschieht, dies nach der Photoisomerisierung. Dabei bindet das Cystein kovalent an das C10 des Bilins und unterbricht das konjugierte π -System, was

eine Blauverschiebung der Absorption bewirkt (400-440 nm). Bei der Photokonversion findet eine Z/E-Isomerisierung statt, bei der sich der D-Ring des Chromophors dreht, wodurch möglicherweise durch konformelle Spannung eine Spaltung der zweiten Cysteinbindung erfolgt (Abb. 1-21). Die somit wieder hergestellte Konjugation des Systems bewirkt die Verschiebung des Photoproduktes in den Absorptionsbereich von 490-610 nm.

Während des Photozyklus kann es bei einigen DXCF CBCRs zu einer zusätzlichen Isomerisierung am A-Ring des Bilins und der C5 Methinbrücke kommen (Verschiebung der Doppelbindung von C4=C5 zu C2=C3). Das dabei entstehende Phycoviolobilin (PVB) bewirkt eine weitere Verkürzung des konjugierten Systems (71).

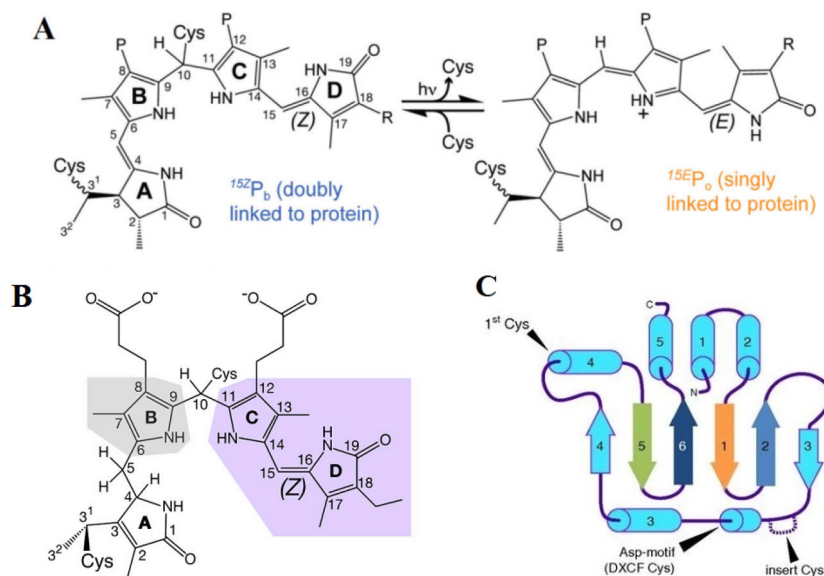


Abb. 1-21: A: Blau/Orange Photozyklus von NpF4973 aus *Nostoc punctiforme* (89), B: Strukturformel von Phycoviolobilin mit den beiden Cysteinbindungen und der erfolgten Elektronenverschiebung im Bereich der Ringe A und B: Die relevanten konjugierten Systeme sind farbig markiert (editiert nach (90) suppl. Material), C: Topologie der GAF-Domäne mit dem in CBCRs konservierten Cysteinrest (1st Cys) und zwei möglichen Bereichen für das zweite Cystein (editiert nach (90)).

Eine Ausnahme in der Familie bildet das NpR5313g2 aus *Nostoc punctiforme*, bei welchem entgegensetzt zu den anderen Vertretern die zweite Cysteinbindung nicht im Dunkelzustand, sondern nach Ausbildung des Photoprodukts entsteht.

Eine weitere Klasse der CBCRs, die insert-Cys CBCRs, besitzt auch einen konservierten Cysteinrest, der eine Bindung mit dem C10 Kohlenstoff des Bilinchromophors eingeht. Es zeigen sich die gleichen Effekte für die Photochromie wie bei den DXCF CBCRs, wobei beide Klassen keine nähere sequentielle Verwandtschaft zeigen. In dieser Untergruppe liegt der Cys-Rest im Gegensatz zu den DXCF CBCRs in einer nicht konservierten, erweiterten Inser-

tionsschleife (Abb. 1-21, C). Der Photozyklus ist vergleichbar, zeigt jedoch keine Autoisomerisierung des PCBs zu PVB (90,93).

Rot/Blau

Die GAF-Domäne AM1_1186g2 aus dem Cyanobakterium *Acaryochloris marina* MBIC11017 ähnelt in der Sequenz sehr stark den Rot/Grün CBCRs, zeigt aber eine reversible Photokonversion zwischen einem rot-absorbierenden P_r -Grundzustand ($\lambda_{\max} = 641$ nm) und einem blau-absorbierenden P_b -Photoprodukt ($\lambda_{\max} = 416$ nm). Neben einem konservierten Cystein zur eigentlichen Bindung des Chromophors besitzt AM1_1186g2 ein zweites Cystein, das durch Sequenzvergleich eine deutlich andere Position einnimmt als in den übrigen zwei-Cystein-bindenden CBCRs (Abb. 1-22). Der Photozyklus ist verwandt mit dem von NpR5313g2 aus der Familie der DXCF CBCRs. Auch bei AM1_1186g2 besitzt der Grundzustand eine Cysteinbindung und geht nach einer Z/E-Isomerisierung durch die Formierung einer zweiten Cysteinbindung in einen blauverschobenen Photozustand über (Abb. 1-22). Diese Formierung ist temperaturabhängig und findet im Gegensatz zu ähnlichen Photozyklen in CBCRs sehr langsam statt. Im Vergleich zu NpR5313g2 zeigt AM1_1186g2 einen deutlich ins Rote verschobenen Grundzustand (NpR5313g2, P_g $\lambda_{\max} = 550$ nm), was vermutlich durch eine Protonierung dieses Zustandes zu erklären ist, die in NpR5313g2 nicht vorliegt. Dies würde auch eine weitere Gemeinsamkeit zu den R/G CBCRs zeigen, bei denen AnPixJ eine vergleichbare Protonierung aufweist.

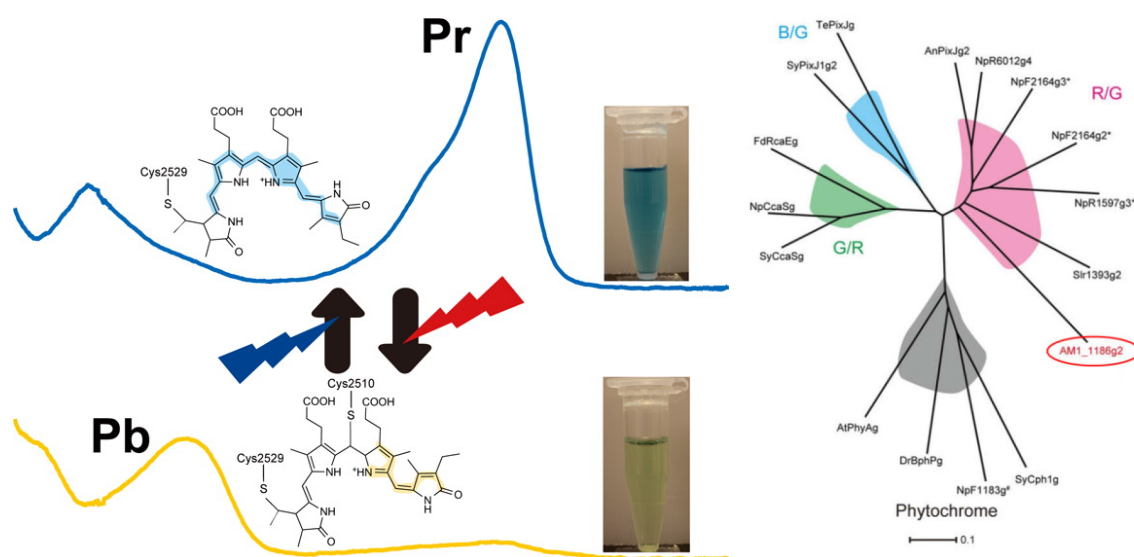


Abb. 1-22: *links*: Struktur des P_r - und des P_b -Zustandes mit der jeweiligen Markierung des konjugierten Systems; *rechts*: Phylogenetisches Cluster der GAF Domänen der CBCRs und einigen anderen Phytochromen zur Einordnung von AM1_1186g2 (editiert nach (83)).

Eine weitere Besonderheit von AM1_1186g2 ist der Abstand zwischen den Absorptionsmaxima beider Zustände. Dieser ist mit 225 nm der größte bis jetzt gefundene in der Klasse der CBCRs und wird nur von einigen Proteinen aus Phytochromen übertroffen, die ebenfalls während ihres Photozyklus eine zweite Cysteinbindung mit dem Chromophor eingehen (83).

NpR3784

Die zuletzt entdeckte Untergruppe der CBCRs, mit seinem ersten Vertreter NpR3874 aus *Nostoc punctiforme*, ist eine neue Gruppe von Rot/Grün CBCRs, die sich durch die Verwendung von alternativen Phenylalaninresten im Vergleich zu den anderen Rot/Grün CBCRs wie zum Beispiel NpR6012g4 aus demselben Genom unterscheidet (74,84).

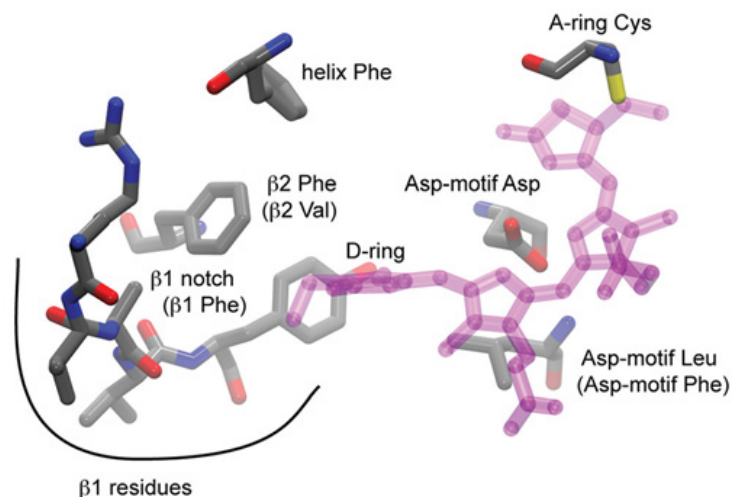


Abb. 1-23: Kristallstruktur von AnPixJ im 15Z-Dunkelzustand mit gebundenem PCB (Violett). Markiert sind alle für die Blauverschiebung des Photoproduktes bei der Photokonversion essentiellen Aminosäurereste am Beispiel von NpR6012g4. Zusätzlich ist der für die Chromophorbindung zuständige Cysteinrest gezeigt. In Klammern sind die sich bei NpR3874 unterscheidenden AS aufgeführt. Die Transparenz besitzt keine Aussage (74).

Wie bei den Rot/Grün CBCRs bewirkt die Interaktion mit den Phenylalaninresten eine Blauverschiebung des Photoproduktes. Im direkten Vergleich findet sich in beiden CBCRs Klassen nur das Helix-Phenylalaninrestes, die restlichen AS-Reste unterscheiden sich. In NpR3874 sind neben dem Helix-Phe vor allem das β1-Phe und Phe im Asp-Motiv wichtig um den Rot/Grün-Photozyklus zu ermöglichen (Abb. 1-23).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden einige weitere Proteine gefunden, die in die Gruppe der NpR3784 CBCBRs eingeordnet werden konnten. Alle Proteine der Klasse der NpR3874 CBCBRs, die bis jetzt photochemisch charakterisiert wurden, verbindet ein konservierter rot-absorbierender Dunkelzustand, wohingegen das Photoprodukt unterschiedliche Absorptionen zeigt (74).

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Mit der Entdeckung von Cph1 im Cyanobakterium *Synechocystis* im Jahre 1997 begann sich die Klasse der Phytochrome, die bis zu diesem Zeitpunkt nur in Pflanzen nachgewiesen worden waren, auf verschiedenste Domänen des Lebens auszuweiten. Neben den Cyanobakterien wies man Phytochrome auch in Pilzen und anderen, auch nicht-photosynthetischen Bakterien nach. Eine zusätzliche Erweiterung der Variabilität, die speziell in Cyanobakterien zu finden ist, bezieht sich auf die Domänenarchitektur. Neben der klassischen verknüpften PAS/GAF/PHY Architektur findet sich in den sogenannten Cph2-Proteinen als auch den Cyanobacteriochromen (CBCRs) ein verkleinerter photosensorischer Bereich. Dieser besteht aus einer PAS/GAF Bidomäne bzw. nur einer einzelnen GAF-Domäne, die für die Chromophorbindung als auch die Photochemie zuständig ist.

Die Entdeckung der CBCRs rückte gleichzeitig die Variabilität der Photozyklen in den Fokus. Dabei fand sich neben dem in der Phytochromfamilie weit verbreiteten Rot/Dunkelrot-Photozyklus eine Vielzahl von weiteren Varianten, die bis in das nahe UV-Licht reichen.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Untersuchung eines cyanobakteriellen Phytochrom aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit der Bezeichnung *SynCph2*(1-2). Daneben werden zwei Bacteriophytochrome, PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie ein pilzliches Phytochrom, FphA aus *Aspergillus nidulans* spektroskopisch charakterisiert.

In diesem Teil wurden folgende Ziele verfolgt:

- Bestimmung der Lebenszeiten der einzelnen Photokonversionen mittels Blitzlichtphotolyse.
- Einfluss von Mutationen auf die chromophorstabilisierende Wirkung der GAF2-Domäne von *SynCph2*(1-2) auf der Grundlage von Blitzlichtphotolysemessungen.
- Darstellung der Ergebnisse im Vergleich zu Phytochromen aus Modellorganismen aus der Literatur.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden drei Vertreter der außergewöhnlichen Klasse der CBCRs untersucht. Die GAF3-Domäne aus Slr1393 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, die einen Rot/Grün-Photozyklus zeigt, die GAF1-Domäne aus AphC aus *Nostoc* sp.

PCC 7120, welche einen klassischen Rot/Dunkelrot-Photozyklus aufweist, sowie die GAF3-Domäne aus demselben Organismus mit einem außergewöhnlichen Rot/Orange-Photozyklus.

Die Ziele für diesen Teil der Arbeit waren folgende:

- Stationäre Spektroskopie und Charakterisierung der Photozustände durch zeitaufgelöste UV-VIS Spektroskopie.
- Zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse mit anschließender Globalanalyse zur Identifizierung der Intermediate und deren Lebenszeiten in den Photozyklen.
- Untersuchung der Protein-Chromophor Interaktionen durch Vergleichsmessungen von Mutanten von 2699gaf3 und 1393gaf3.
- Bestimmung der Stokes-Verschiebung zur Darstellung der Einflüsse der Mutationen auf die Fluoreszenzemission.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Agar Agar, Kobe I	Fa. Roth
Ampicillin Natriumsalz	Fa. Serva
Anhydrotetracyclin	Fa. IBA
Avidin	Fa. Life Technologies
Calciumchlorid-Dihydrat	Fa. Serva
Chloramphenicol	Fa. Serva
D-Desthiobiotin	Fa. Sigma-Aldrich
Ethanol, 99,8 % p.a.	Fa. Roth
Glycerin, 99,5 %, wasserfrei	Fa. Roth
HABA	
(2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure)	Fa. Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Fa. Roth
Imidazol	Fa. Sigma-Aldrich
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Fa. Serva
Kanamycin-Sulfat	Fa. Serva
Magnesiumchlorid-Heptahydrat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Roth
Ni-IDA Metal Chelate Resin	Fa. Serva
Pefabloc® SC	Fa. Biomol
Tetracyclin-Hydrochlorid	Fa. Serva
TRIS-HCl (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanohydrochlorid)	Fa. Serva

Trypton/Pepton aus Casein

Fa. Roth

β -Mercaptoethanol

Fa. Merck

3.1.2 Medien, Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen, Medien und Puffer wurde stets tridestilliertes Wasser verwendet. Die Medien und Puffer wurden bei 121 °C 20 min lang autoklaviert. Lösungen hitzeempfindlicher Substanzen wurden bei Bedarf steril filtriert.

Ampicillinlösung	100 mg/mL Ampicillin Natriumsalz, steril filtriert (0,22 μ m)
Aufschluss-Puffer	100 mM TRIS, 600 mM NaCl, 10 Vol.-% Glycerin
Chloramphenicollösung	50 mg/mL Chloramphenicol, in Ethanol gelöst, steril filtriert (0,22 μ m)
Imidazol-Stammlösung	2 M Imidazol
Kanamycinlösung	50 mg/mL Kanamycinsulfat, steril filtriert (0,22 μ m)
LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Natriumchlorid
LB-Agar	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Natriumchlorid, 15 g/L Agar Agar
Pefabloc® SC-Lösung	100 mg/mL
Resin-Puffer	50 mM TRIS, 200 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin
Strep-Tag-Puffer E	100 mM Tris, 15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM D-Desthiobiotin, pH 8
Strep-Tag-Puffer R	100 mM Tris, 15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, pH 8

Strep-Tag-Puffer W	100 mM Tris, 15 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8
Tetracyclinlösung	10 mg/mL Tetracyclin-Hydrochlorid, in Ethanol gelöst, steril filtriert (0,22 µm)

3.1.3 Materialien

BL21 Stamm	<i>E. coli</i> BL21 (D3), Fa. Stratagene
DNS-Isolierungskit	QIAPrep Spin Miniprep Kit (50), Fa. Qiagen
XLB Stamm	XL1-Blue, Fa. Stratagene

3.1.4 Geräte

Autoklav	VE-95, Fa. Systec
	CV-EL, Fa. Certoclav
Fluoreszenz-Spektrometer	Cary Eclipse, Fa. Varian
Kühlzentrifuge	Avanti J-20 XP, Fa. Beckman Coulter
Rotoren	JA-10 und JLA 16.250, Fa. Beckman Coulter
Küvetten	10,00 mm, Quarzglas, Fa. Hellma
Blitzlichtphotolyse	
Laser	Nd:YAG, Fa. InnoLas
Lampe Messlicht	75 W Xenonlampe, Fa. Amko
Monochromatoren	Slave, f/3.4, Fa. Applied Photophysics
	Master, f/4.2, Fa. Photon Technology
Photomultiplier	R3896, Fa. Hamamatsu
pH-Meter	SevenCompact S220, Fa. Mettler Toledo.
Schüttler	Certomat R, Fa. Braun
	Innova 4330, Fa. New Brunswick Scientific
	MAXQ6000, Fa. Thermo Scientific

Elektrophoresekammer	Novex Mini-Cell, Fa. Invitrogen
LEDs	High Power LEDS, Fa. Roithner
Sterilbank	Mikroflow Werkbank 20230e, Fa. Intermed
Thermoblock	Thermomixer comfort, Fa. Eppendorf
Tischzentrifugen	Universal 320R, Fa. Hettich
	Centrifuge 5418, Fa. Eppendorf
Ultra-Zentrifuge	Optima L-80 XP, Fa. Beckman Coulter
Rotor	Ti-60, Fa. Beckman Coulter
Ultra-Turrax + Stab	Miccra D-8, Fa. ART
UV/VIS-Spektrophotometer	Spektralphotometer UV-2401 PC, Fa. Shimadzu

3.1.5 Plasmide

Tab. 3-1: Liste der verwendeten Plasmide:

Gen	Organismus	Vektor	Antibiotikaresistenz
all2699gaf1	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	pET30	Kanamycin
all2699gaf3	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	pET30	Kanamycin
slr1393gaf3	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	pET30	Kanamycin
Sll0821 (1-1272)	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	pCDFDuet-1	Streptomycin
PstbphO:bphP1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	pET52 3C/LIC	Ampicillin
PaBphP-PCD (1-497)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pET24a	Kanamycin
FphAN753	<i>Aspergillus nidulans</i>	pASK-IBA3	Ampicillin
pHO1-PcyA	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	pACYCDuet-1	Chloramphenicol
HO1	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	pACYCDuet	Chloramphenicol

3.2 Methoden

3.2.1 DNS-Isolierung

Die DNS wurde mithilfe eines QIAprep-Kits der Firma Qiagen isoliert. Im ersten Schritt wurden 5 mL der Zellen mit der gewünschten DNS über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Das nach der Zentrifugation (5000 rpm, 10 min; 4 °C, Universal 320R, Fa. Hettich) vorliegende Pellet wurde in 250 µL P1 Puffer gelöst und in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach Zugabe von 250 µL P2-Puffer wurde bis zum Verschwinden der Trübung invertiert. Anschließend wurden 350 µL N3-Puffer hinzugegeben und erneut invertiert. Der Überstand einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm (Centrifuge 5418, Fa. Eppendorf) wurde auf eine QIAprep-Säule gegeben und 60 s zentrifugiert. Das Waschen des Rückstandes wurde 2x mit 750 µL PE-Puffer durchgeführt. Die auf der Säule verbliebene DNS wurde in 50 µL EB-Puffer über einen Zeitraum von 1 Minute gelöst, vom Säulenmaterial abgelöst und anschließend durch Zentrifugation in ein Eppendorf-Cup überführt.

3.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Um die DNS in BL21 bzw. XLB Zellen zu transformieren, müssen diese zuerst kompetent gemacht werden.

Zu diesem Zweck wurden 100 μL der BL21-Zellen in 100 mL LB-Medium bis zu einer OD von 0,3 bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4°C und 5000 rpm 10 Minuten zentrifugiert (Universal 320R, Fa. Hettich). Das entstandene Pellet wurde vorsichtig in 20 mL eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für 1 h auf Eis belassen. Nach Zentrifugation (4 °C, 8000 rpm, 1 min; Universal 5418, Fa. Eppendorf) wurde der Rückstand in 2 mL eiskalter 100 mM CaCl_2 -Lösung gelöst und in 100 μL Fraktionen mit je 15 % Glycerin bei -80 °C weggefroren.

3.2.3 Transformation

Bei der Transformation wurde die isolierte DNS in die zuvor hergestellten kompetenten BL21-Zellen transferiert.

Hierzu wurden zu 100 μL der kompetenten Zellen 5 μL der isolierten DNS gegeben und gemischt. Nach 30 Minuten auf Eis fand ein anderthalbminütiger Hitzeschock bei 42 °C statt. In den darauffolgenden 5 Minuten auf Eis gelangte die DNS durch die Poren in die Zellen, welche sich durch den Hitzeschock geöffnet hatten. Anschließend wurden 250 μL LB-Medium hinzugegeben und für 1 Stunde (Std) inkubiert (37 °C, 180 rpm). Zur Kontrolle der Transformation wurde die Suspension auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Ein Wachstum sollte nur bei den Zellen zu beobachten sein, die durch den Einbau des Plasmids eine Antibiotika-Resistenz erlangt haben.

Im Allgemeinen wurde bei den hier bearbeiteten Proteinen eine doppelte Transformation durchgeführt. Dabei wurde die DNS des Apoproteins zusammen mit der des jeweiligen Plasmids für die Chromophorsynthese transformiert.

3.2.4 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden 750 μL Zellsuspension mit 250 μL Glycerin (40 %) versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ weggefroren.

3.2.5 Kultivierung und Proteinexpression

Die Grundlage der Kultivierung stellten die zuvor transformierten BL21-Zellen dar. Zur Steigerung der Zellzahl wurde zu Beginn der Kultivierung eine Vorkultur der jeweiligen Zellen erstellt. Hierfür wurden 10 mL LB-Medium mit 10 μL Antibiotika-Lösung sowie einer Kolonie der transformierten BL21-Zellen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 16 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm im Schüttler wurde die Kultur zur Inokulation einer Großkultur verwendet (2 mL/L). Als Medium diente LB, welches mit 2 mL/L Antibiotika-Lösung versetzt worden war. Nach einer ca. dreistündigen Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm wurde mit Hilfe der optischen Dichte (OD) das Zellwachstum überprüft. Sobald sie einen Wert von 0,6 erreichte, wurde die Proteinexpression induziert. Die Art der Induktion und die nachfolgenden Expressionsbedingungen unterscheiden sich je nach Protein und sind in nachfolgender Tabelle aufgelistet.

Tab. 3-2: Auflistung der Proteine mit dem jeweiligen Chromophor, der Induktionsmethode und den Expressionsbedingungen.

Protein (+Chromophor)	Induktion	Expressionsbedingungen
2699gaf1 + PCB	0,4 mM IPTG	37°C , 180 rpm, 3,5 h
2699gaf3 + PCB	0,4 mM IPTG	37°C , 180 rpm, 3,5 h
1393gaf3 + PCB	0,4 mM IPTG	37°C , 180 rpm, 3,5 h
BphP1 + BV	0,5 mM IPTG	20°C , 180 rpm, 16 h
BphP-Pa497 + BV	0,5 mM IPTG	20°C , 180 rpm, 16 h
	0,25 mM IPTG	nach einer Stunde
FphAN753 + BV	+ 0,2 $\mu\text{g/mL}$ Anhydrotetracyclin	20°C , 180 rpm, 16 h

Nach der oben aufgeführten Expressionszeit (Tab. 3-2) wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4 °C, 6500 rpm, 10 min; JA-10, Fa. Beckman Coulter) und bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Zellaufschluss

Zum Aufschluss der Zellen wurden x g des Pellets in x mL Aufschluss-Puffer, x µL Pefabloc und 0,1x µL β-Mercaptoethanol resuspendiert und mechanisch aufgeschlossen. Als Homogenisator diente ein Ultra-Turrax-Dispergierwerkzeug, welches in flüssigem Stickstoff betrieben wurde. Auf diese Weise wird zum einen die Zellsuspension schockgefroren und kann in hartem Zustand durch das Dispergierwerkzeug zerschlagen werden, zum anderen verhindert die tiefe Temperatur die Einwirkung von Proteasen, die bei der Lyse von Zellen freigesetzt werden.

Nach Abdampfen des Stickstoffes wurde die gefrorene Zellsuspension durch Ultrazentrifugation (4 °C, 45000 rpm, 1 Std; Ti-60, Fa. Beckman Coulter) von DNS und Zellfragmenten gereinigt, so dass nur noch das Rohlysate zurückblieb. Dieses wurde entweder sofort aufgereinigt oder bis zum darauffolgenden Tag bei 4 °C gelagert.

3.2.7 Proteinaufreinigung

3.2.7.1 IMAC (*immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie*)

Die zu untersuchenden Proteine wurden bis auf FphA aus *Aspergillus nidulans* mit einem N- bzw. C-terminalen His-Tag exprimiert. Das FphA kodierende Plasmid wurde von der Arbeitsgruppe Frankenberg-Dinkel bereitgestellt. Das Protein war durch diese Kollegen mit einem Strep-Tag versehen worden (s.u.). Ein His-Tag ermöglicht eine Aufreinigung mittels der IMAC Methode. Dabei interagieren die Imidazolringe des His-Tags mit Ni²⁺-Ionen, die über eine Chelatkomplexbindung mit einer Iminodiessigsäure in einem Agarose-Harz (Resin) verankert sind.

Das unter Ethanol gelagerte Resin (5 mL) wurde auf eine mit Glaswolle gefüllte Spritze gegeben und zunächst mit Wasser (1x) sowie mit Resinpuffer (3x) gewaschen. Anschließend wurde das Rohlysate über das Resin gegeben, um das Protein an das Resin zu binden.

Zum Abtrennen ungebundener Fremdproteine, erfolgten mehrere Waschschrirte mit Resinpuffer und folgenden ansteigenden Imidazolkonzentrationen: 20 mL ohne Imidazol und 40 mL mit 50 mM Imidazol. Zusätzlicly wurde jedem Puffer Pefabloc und β -Mercaptoethanol zur Verhinderung von proteolytischen Abbau und Disulfidbrückenbildung zugesetzt (Konzentrationen siehe 3.2.6). Zur Elution wurde eine höhere Imidazolkonzentration verwendet (20 mL mit 500 mM), so dass das Imidazol mit den Histidin-Resten konkurrierte und das Protein in die Lösung freigesetzt wurde. Nach einer anschließenden Dialyse über Nacht gegen 5 L Resinpuffer (um die Imidazolkonzentration unter 1 mM zu senken) wurde das Protein mittels einer Filtermembran (4 °C, 5000 rpm, 10 min; Universal 320R, Fa. Hettich) aufkonzentriert und bei –20 °C bis zur Vermessung gelagert.

3.2.7.2 Strep-Tag

FphA aus *Aspergillus nidulans* wurde mit einem N-terminalen Strep-Tag exprimiert. Diese Methode beruht auf der starken Bindung von Biotin mit Streptavidin. Beim Strep-Tag handelt es sich um eine kurze Peptidkette (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) mit einem vernachlässigbaren Effekt auf das rekombinante Protein, die in der Biotinbindungstasche von Streptavidin bindet.

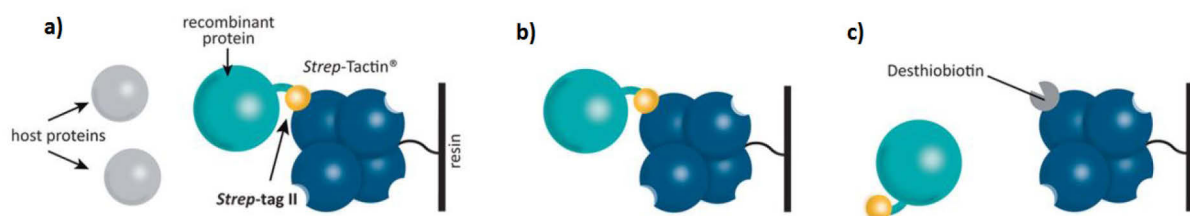


Abb. 3-1: Ablauf der Proteinaufreinigung mittels Strep-Tag (94)

Im ersten Schritt (a) wird das Rohlysats auf eine Strep-Tactin-Säule gegeben (Abb. 3-1). Dabei handelt es sich um ein Streptavidinderivat, das zu den stabilsten Proteinen überhaupt zählt. Das rekombinante Protein bindet mithilfe des Tags an die Säule (b). Die unerwünschten Fremdproteine werden mit 20 mL Puffer W (100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) von der Säule gespült. Im nächsten Schritt wird das rekombinante Protein mit Hilfe von Waschpuffer, enthaltend 2,5 mM Desthiobiotin (Puffer E), eluiert. Das im Puffer enthaltene Protein konkurriert mit dem getagten Protein um die Biotinbindungstelle im Strep-Tactin und verdrängt es somit (c). Das Eluat wird dann gegen Desthiobiotin-freien Puffer dialysiert und kann anschließend für die Messungen verwendet werden.

Im Anschluss muss die Säule für nachfolgende Verwendung regeneriert werden (Abb. 3-2).

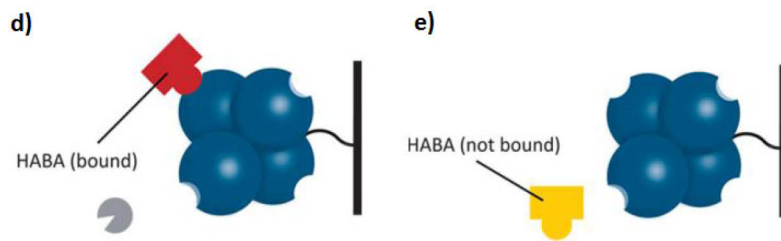


Abb. 3-2: Schritte zur Regeneration der Strep-Tactin Säule mittels HABA (2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure) (94).

Dafür wird die Säule solange mit HABA (2-(4'-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure) haltigem Puffer (Puffer R) gespült, bis sich das Säulenmaterial rot verfärbt. Dies ist die Indikation für den Austausch des gebundenen Desthiobiotin mit HABA (d). Im letzten Schritt wird das gebundene HABA rückstandslos durch den Waschpuffer W von der Säule entfernt, die nun für eine weitere Aufreinigung verwendet werden kann.

3.2.8 Spektroskopische Methoden

Das aufgereinigte Protein wurde mittels verschiedener spektroskopischer Methoden vermessen. Dies geschah stets unter Grünlicht bzw. Rotlicht, um unbeabsichtigte Photochemie der Probe zu verhindern. Das Probenvolumen von 500 μL wurde in eine Küvette mit 10 mm Schichtdicke gegeben und den verschiedenen Messungen zugeführt.

3.2.8.1 UV-VIS-Spektroskopie

Bei der UV-VIS-Spektroskopie werden Moleküle durch elektromagnetische Strahlung in ein höheres Energieniveau angehoben. Die nötige Energie wird der Strahlung entzogen, eine verminderte Intensität des Messlichts (= Absorption) ist die Folge.

Auf dieser Grundlage wurden Absorptionsspektren und Rückkehr-Kinetiken der Proben aufgenommen. Als Blindwert wurde bei allen Messungen der jeweilige Puffer verwendet. Nach Aufnahme des Dunkelspektrums wurde die Probe mit einer LED der jeweiligen Wellenlänge belichtet und der Photoprodukt-Zustand dargestellt (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Wellenlängen der genutzten LEDs

Protein	Eingesetzte LEDs [nm]
2699gaf1	585, 720
2699gaf3	585, 670
1393gaf3	530; 670
SynCph2(1-2)	625, 720
PstBphP1	670; 760
BphP-Pa497	650; 740
FphAN753	650; 760

Die Einstellungen des Spektrometers können der folgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Parameter der Absorptionsmessung

Parameter	Einstellung
Messbereich [nm]	250 – 800 (900)
Spaltbreite [nm]	1,0
Abtastintervall [nm]	0,5

Zur Erfassung der Rückkehr-Kinetik wurde die Probe soweit möglich in den Photoproduktzustand überführt und über einen festgesetzten Zeitraum bei einer konstanten Wellenlänge im Maximum des Grundzustandes vermessen. Folgende Parameter wurden für diese Messung gewählt (Tab. 3-5).

Tab. 3-5: Parameter der Rückkehr-Kinetiken

Parameter	Einstellung
Wellenlänge [nm]	variabel
Spaltbreite [nm]	1,0
Messdauer [s]	variabel

3.2.8.2 Stationäre Fluoreszenz

Fluoreszenz entsteht beim Übergang eines angeregten Moleküls in einen energieärmeren Zustand, soweit das Molekül eine starre Struktur aufweist und die Strahlungsübergänge erlaubt sind. Die entstehende Emission kann spektroskopisch erfasst werden. Von den zu untersuchten Phytochromen wurde nur die Absorption charakterisiert, während für die zu untersuchenden GAF-Proteine, die eine gut messbare Fluoreszenz zeigen, Anregungs- und Emissionsspektren erstellt wurden. Die Proben wurden entsprechend durch eine LED in den zu vermessenden Zustand überführt und auf eine Absorption von etwa 0,1 eingestellt. Das Probenvolumen betrug 500 µL. Die übrigen Parameter sind in den folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 3-6 - Tab. 3-9)

Tab. 3-6 Parameter der Fluoreszenz-Emissionsmessung von 2699gaf3 Pr-Zustand

Parameter	Anregungswellenlänge
Wellenlänge [nm]	610
Spaltbreite [nm]	5
Start [nm]	620
Stop [nm]	800

Tab. 3-7: Parameter der Fluoreszenz-Emissionsmessung von 2699gaf3 Po-Zustand

Parameter	Anregungswellenlänge
Wellenlänge [nm]	550
Spaltbreite [nm]	5
Start [nm]	560
Stop [nm]	800

Tab. 3-8: Parameter der Fluoreszenz-Emissionsmessung von 1393gaf3 Pr-Zustand

Parameter	Anregungswellenlänge
Wellenlänge [nm]	610
Spaltbreite [nm]	5
Start [nm]	620
Stop [nm]	800

Tab. 3-9: Parameter der Fluoreszenz-Emissionsmessung von 1393gaf3 Pg-Zustand

Parameter	Anregungswellenlänge
Wellenlänge [nm]	550
Spaltbreite [nm]	5
Start [nm]	560
Stop [nm]	800

Stokes-Verschiebung

Als weiteres Charakterisierungskriterium wurde die Stokes-Verschiebung berechnet. Dabei handelt es sich um die Energiedifferenz im Spektrum, die zwischen dem Absorptionsmaximum und dem Maximum der Fluoreszenzemission auftritt. Diese ist von der Interaktion des Chromophors mit dem Protein sowie der direkten Umgebung des Chromophors abhängig. Zur Berechnung der Stokes-Verschiebung werden die Absorptionswerte (Wellenlänge) in eine Energieskala, z.B. cm^{-1} , umgerechnet, die Differenz ergibt dann die Stokes-Verschiebung.

3.2.8.3 Zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse

Grundlagen

Die Methode der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse ist der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit. Sie dient hier der Messung von Absorptionsänderungen lichtinduzierter Reaktionen im Mikro- bis Millisekunden-Zeitbereich.

Dabei wurde die zu untersuchende Probe durch einen Laserpuls (Dauer etwa 10 ns) angeregt und der Absorptionsverlauf über eine weitere optische Messlinie mit Hilfe einer durch zwei Monochromatoren aus einer Xenonlampe isolierten Wellenlänge verfolgt (Abb. 3-3).

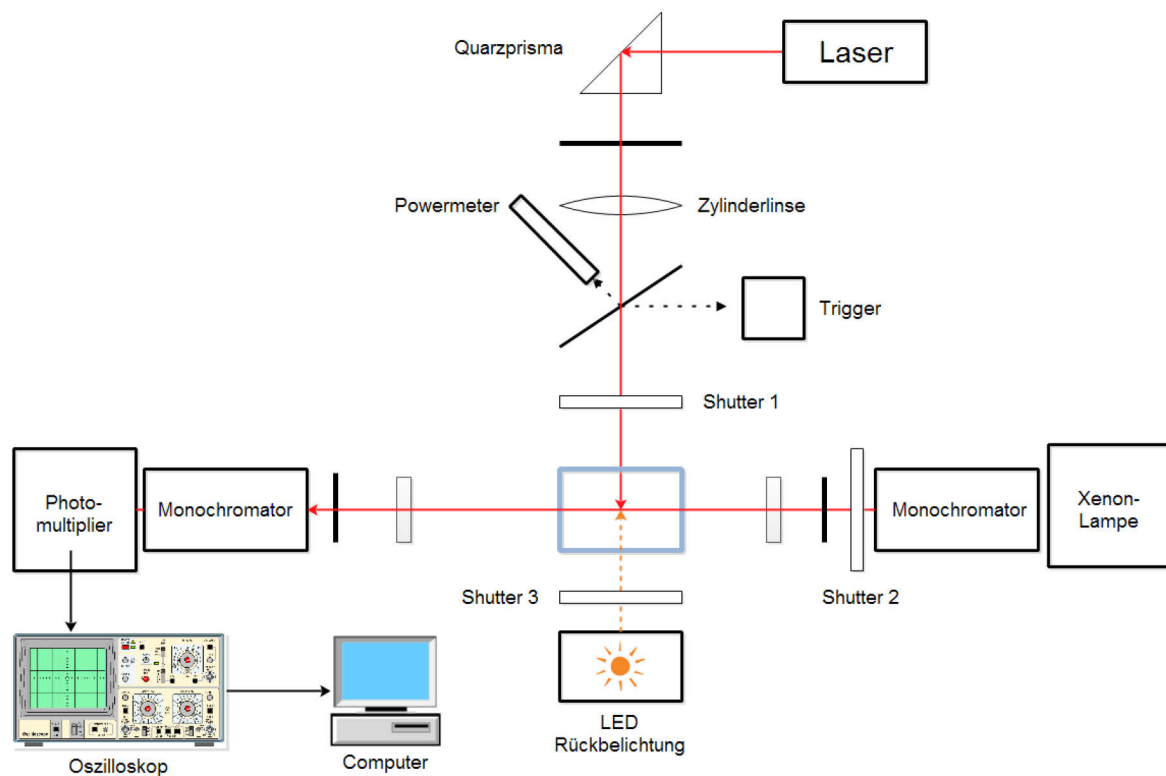


Abb. 3-3: Schematische Darstellung des Aufbaus der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse

Die rechtwinklige Anordnung der Messlinien erlaubt ein einheitliches Ausleuchten der Probe bei gleichzeitiger Minimierung des Laserstreulichts am Detektor.

Für die Anregung der zu untersuchenden Proteine wurde ein OPO-Nd:YAG-Lasersystem verwendet. Bei der Nd:YAG Laserkomponente handelt es sich um einen mit Neodym dotierten Yttrium-Aluminium-Granat ($\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$) Kristall welcher mit einer Blitzlampe angeregt wird. Die dritte Harmonische des Lasers, die bei einer Wellenlänge von 355 nm liegt, wird als Pumpwelle für einen optisch parametrischen Oszillator (OPO) verwendet (Abb. 3-4).

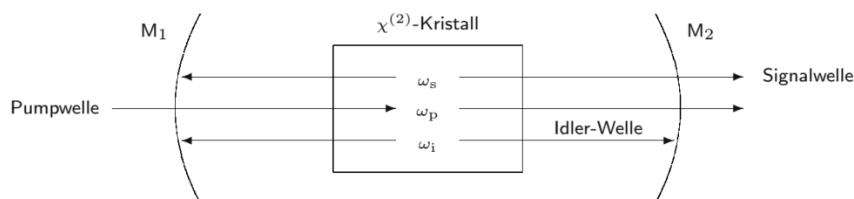


Abb. 3-4: Aufbau eines optisch parametrischen Oszillators (OPO), Spiegel M_1 ist transparent für die Pumpwellenlänge, Spiegel M_2 ist hochreflektierend für die Idler-Welle; ω_p = Frequenz der Pumpwelle; ω_s = Frequenz der Signalwelle; ω_i = Frequenz der Idler-Welle (95)

Ein OPO-System besteht im Zentralen aus einem optisch nichtlinearen Kristall, der sich als aktives Medium zwischen zwei Resonatorspiegeln befindet. Aus der eingestrahnten Pumpwelle des Lasers erzeugt der OPO durch Abwärtskonvertierung eine Signal- und eine Idler-Welle. Bei der Idler-Welle handelt es sich um die Differenz aus der Frequenz der Pumpwelle und der Signalwelle. Unter Erfüllung der Energieerhaltung lassen sich durch Änderungen der Phasenübereinstimmungen beide Wellen unabhängig voneinander über einen großen Spektralbereich abstimmen (Gl. 3-1). Es entsteht kohärente Strahlung, welche durch die einfache Drehung des Kristalls in Bezug auf ihre Wellenlänge und Intensität variiert werden kann.

Somit ist es möglich, mit diesem Nd:YAG-OPO gekoppelten System Proteine im Bereich von 410-800 nm anzuregen.

$$\omega_p = \omega_s + \omega_i$$

Gl. 3-1: Energieerhaltung der Kreisfrequenzen: ω_p = Frequenz der Pumpwelle; ω_s = Frequenz der Signalwelle; ω_i = Frequenz der Idler-Welle

Als Detektionsmesslicht zur Aufnahme von Absorptionsänderungen über ein gewähltes Zeitfenster (hier: 200 μ s, 2 ms, 20 ms) wurde eine 75 W Xenonlampe verwendet, deren Licht durch ein Wasserfilter geführt wird, um thermische Effekte in der Probe zu vermeiden. Das Messlicht wird durch zwei aufeinander abgestimmte Monochromatoren vor und hinter der Probe auf eine spezifische Wellenlänge eingestellt und mit einem Photomultiplier detektiert. Der erste Monochromator schützt die Probe vor Belichtung mit dem kompletten Spektralbereich der Xenonlampe. Der zweite Monochromator dient zur Entfernung von Laserstreu-licht und Restlicht aus dem Labor.

Eine Messung der Blitzlichtphotolyse läuft folgendermaßen ab. Im ersten Teil einer einzelnen Messung wurde die Grundabsorption der Probe über die ersten zehn Prozent des Detektionszeitfensters erfasst (Blende 2 offen, Blende 1 und 3 geschlossen). Daraufhin erfolgte die Anregung der Probe mittels eines Laserpulses, dessen Intensität auf ≤ 10 mJ eingestellt worden war. Derartige Intensitätsmessungen müssen der eigentlichen Messung vorausgehen, um den Bereich der Absorptionsänderung zu definieren, in dem diese zur eingestrahnten Laser-Energie proportional bleibt. Höhere Laser-Energien würden zu photochemischen Artefakten wie sekundärer Photochemie oder Anregung bereits erzeugter Reaktionsintermediate führen. Im weiteren Verlauf wurden die durch den Laserpuls ausgelösten Absorptionsänderungen

erfasst und alle mit einem Oszilloskop aufgezeichneten Daten an eine computergesteuerte Messsoftware weitergeleitet.

Nach jedem Laserpuls wurde die Probe durch kontinuierliche Belichtung mit einer passenden LED in die zu vermessenden Ausgangsabsorption zurückgeführt (Blende 3 offen, Blende 1 und 2 geschlossen). Die Dauer der Belichtung variierte je nach Protein und Photozustand.

Alle Proben wurden auf eine Absorption von etwa 0,6 im Maximum des Ausgangszustandes eingestellt und über die gesamte Messung mittels eines Peltier-Elements auf eine konstante Temperatur von 20 °C temperiert. Die Absorptionsänderungen für jedes Protein wurden über einen breiten Wellenlängenbereich gemessen, um das intermediäre Auftreten von Absorptionsänderungen auch außerhalb der Absorption des Ausgangszustandes zu detektieren. Der gesamte zu untersuchende Spektralbereich wurde durch die Messwellenlängen im Abstand von 10 nm abgefragt. Im Falle kleiner Absorptionsänderungen, z.B. im Bereich isosbestischer Punkte, wurde der Abstand der Messwellenlänge auf 5 nm reduziert. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden pro Zeitfenster mindestens fünf Einzelmessungen durchgeführt, aus denen eine Mittelung errechnet wurde. Weiterhin wurde für das längste Zeitfenster eine Basislinie ohne Laseranregung gemessen, um elektronische und optische Einflüsse zu reduzieren, die evtl. zu einer Drift der Basislinie und damit zu einer Verfälschung des Messsignals führen könnten.

Datenaufnahme und -analyse

Die aus dem Oszilloskop ausgelesenen Daten beschreiben den Verlauf der Absorption über die drei gewählten Zeitfenster (200 µs, 2 ms und 20 ms) für jede einzelne Messwellenlänge. Im Fall von *SynCph2*(1-2) wurden vier Zeitfenster gewählt (100 µs, 1 ms, 10 ms und 100 ms). Vor der Bearbeitung der Daten musste beim 20 ms Zeitfenster die jeweilige Basislinie von der Messung subtrahiert werden, da sich hier Langzeitänderungen besonders stark auf das Messsignal auswirken können (Gl. 3-2).

$$\Delta A_{Dif} = \Delta A_M - \Delta A_{BL}$$

Gl. 3-2: Verrechnung der Basislinie: ΔA_{Dif} = korrigierte Absorptionsdifferenzen; ΔA_M = Absorptionsdifferenzen nach Laserpuls; ΔA_{BL} = Absorptionsdifferenzen ohne Laseranregung

Vor der eigentlichen kinetischen Auswertung der Daten wurden die einzelnen Zeitfenster verschachtelt, um pro Wellenlänge einen einzigen Datensatz über den gesamten Zeitbereich zu erhalten. Dies ist notwendig, da die Dichte der Datenpunkte am Anfang jeder Datenaufnahme relativ gering ist und zum Ende des Zeitfensters der Datenerfassung exponentiell ansteigt. Würde man also nur das 20 ms Zeitfenster für den Globalfit verwenden, hätte man für die ersten 20 μ s nur 500 Datenpunkte zur Verfügung, da jedes Zeitfenster 5000 Datenpunkte aufweist, woraus sich kein Fit erzielen ließe. Entsprechend wurde zunächst der Datensatz des 200 μ s Zeitfensters in den passenden Bereich des 2 ms Zeitfensters kopiert und die dort vorhandenen Daten dieses Zeitfensters ersetzt. Der so entstandene Datensatz wurde in das 20 ms Zeitfenster an die passende Stelle kopiert und ersetzt die vorhandenen Daten in dem Zeitbereich bis 2 ms. Diese Methode gewährleistet eine hohe Punktdichte über den gesamten Zeitbereich vor allem im ersten Zeitfenster.

Ein frei gewähltes Inkrement (fester Zahlenwert) zur Addition oder Multiplikation diene hierbei zur exakten Angleichung an den Übergängen zwischen den verschachtelten Zeitfenstern. Die so erhaltenen Datensätze konnten nun einzeln als auch in ihrer Gesamtheit für jede Richtung der Photokonversion eines Proteins gefittet werden, um Aufschluss über das Auftreten möglicher Intermediate in den Photozyklen zu geben.

Einzelwellenlängen-Fit und Differenzspektren zu gewählten Zeitpunkten

Mit Hilfe des Einzelwellenlängen-Fits lassen sich die kinetischen Änderungen bei einer spezifischen Wellenlänge ermitteln. Zur Darstellung von Differenzspektren werden die Absorptionsoptionsdifferenzen zu fest gewählten Zeiten der Messung gegen die zugehörigen Wellenlänge aufgetragen. Somit lassen sich die Differenzspektren der Probe zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Anregung darstellen.

Globalanalyse (Globalfit)

Bei dem Ansatz der Globalanalyse handelt es sich um eine komplexe Fit-Methode, die auf einer simultanen Analyse sämtlicher vorliegender Kinetiken beruht. Es wird eine Vielzahl von Datensätzen mit nur einem Modell angepasst. Die gewählten Parameter werden übergreifend, d.h., für die Gesamtheit der Wellenlängen optimiert. Somit lassen sich die den zeitaufgelösten Absorptionsänderungen (Transienten) zugrunde liegenden Reaktionen und Lebenszeiten bestimmen. Unter der Prämisse, dass diese einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ord-

nung folgen, wird zur mathematischen Behandlung eine Summe von monoexponentiellen Funktionen genutzt (Gl. 3-3). Durch diesen Ansatz werden die Lebenszeiten (τ) berechnet, mit denen die verschiedenen Intermediate ineinander übergehen.

$$\Delta A(t, \lambda) = \left[\sum_{i=1}^N A_i(\lambda) e^{\frac{-t}{\tau_i}} + A_0(\lambda) \right]$$

Gl. 3-3: Absorptionsänderungen bei der Wellenlänge λ : $\Delta A(t, \lambda)$ = zeitaufgelöst gemessene Absorptionsänderung bei der Wellenlänge λ ; $A_i(\lambda)$ = Amplitude der Absorptionsänderung einer Lebenszeit bei der Wellenlänge λ ; τ_i = Lebenszeit des Intermediats i ; t = Zeit; $A_0(\lambda)$ = Konstante bei der Wellenlänge λ

Man setzt den Globalfit ein, da prinzipiell jedes auftretende Intermediat zu jedem Zeitpunkt der Reaktion und bei jeder Wellenlänge (λ) zur Gesamtheit der gemessenen Absorptionsänderungen beiträgt. Daraus ergeben sich für die Transienten der verschiedenen Wellenlängen unterschiedliche Amplituden ($A_i(\lambda)$). Durch Auftragen dieser Amplituden gegen die entsprechenden Wellenlängen ergibt sich das sog. lifetime-associated difference spectrum (LADS). Dabei handelt es sich, wie der Name sagt, um ein Differenzspektrum, für diese durch den Fit erhaltene Lebenszeit. Zu beachten ist, dass mit exponentiellen Zerfällen gerechnet wird. Entsprechend gilt, dass eine positive Amplitude in einem Transienten-Absorptionsspektrum auf den Zerfall dieses Intermediats hindeutet, wohingegen eine negative Amplitude eine Intermediats-Bildung beschreibt.

4 Ergebnisse

Phytochrome und strukturell/funktionell verwandte Chromoproteine, die außer in Tieren (Metazoa) in fast allen Bereichen des Lebens zu finden sind und eine Vielzahl verschiedener Strukturen und photochemischer Eigenschaften zeigen. Sie decken mit ihren verschiedenen Photozyklen den spektralen Bereich des Lichts vom dunkelroten bis in das nahe UV-Licht ab. Ihre Photozyklen unterscheiden sich durch verschiedene chemische Reaktionen und strukturelle Veränderungen. Diese Arbeit konzentriert sich auf die durch Licht ausgelösten Reaktionen einer Reihe von Phytochromen und Phytochrom-verwandter Proteine. Eine wichtige Methode, um den jeweiligen Photozyklus aufzuschlüsseln, ist eine zeitaufgelöste Untersuchung der verschiedenen Intermediatzustände, die im Verlauf des Zyklus auftreten. Dies kann mittels verschiedener Methoden geschehen. Hier wird eine zeitaufgelöste Detektion der durch einen kurzen Laserblitz ausgelösten Absorptionsänderungen verwendet. Diese Methode (Blitzlichtphotolyse) erlaubt es, über einen breiten Zeit- und Spektralbereich transiente Änderungen zu detektieren und so zwischenzeitlich auftretende Intermediate nachzuweisen.

Im Abschnitt 4.1 werden die Ergebnisse zu zwei Bacteriophytochromen (PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa*) und einem Phytochrom aus einem Pilz (FphA aus *Aspergillus nidulans*) beschrieben. Diese drei Proteine weisen die in kanonischen Phytochromen nachgewiesene PAS-GAF-PHY Struktur im photosensorischen Teil des Proteins auf, verwenden aber im Gegensatz zu diesen Biliverdin IX α (BV) als Chromophor. Zusätzlich wurde der photosensorische Bereich des Proteins SynCph2(1-2) untersucht. Dieses Protein weist zwei Chromophor-tragende Bereiche auf, von denen der erste, N-terminale, den kanonischen Phytochromen ähnelt, während der zweite, C-terminal gelegene Chromophorbereich den weiter unten behandelten CBCRs ähnelt. Hier wurde der N-terminale photochemisch aktive Bereich als Wildtypprotein und in Form dreier Mutanten untersucht.

PstBphP1 und FphA zeigen beide einen rot-absorbierenden 15Z Grundzustand und ein dunkelrot-absorbierendes 15E Photoprodukt. PaBphP dagegen gehört zu den sogenannten bathy-Phytochromen, die sich durch einen langwelligen Grundzustand und ein kürzerwelliges Photoprodukt auszeichnen. Im Fall von PaBphP zeigt sich dies durch einen dunkelrot-absorbierenden Grundzustand und ein rot-absorbierendes Photoprodukt (Grundzustand (P_{fr}): $\lambda_{max} = 750$ nm; Photoprodukt (P_r): $\lambda_{max} = 701$ nm).

Im Folgenden (Abschnitt 4.2) wurden drei verschiedene GAF-Domänen spektroskopisch untersucht, die jeweils die photochemisch-aktiven Komponenten von Cyanobacteriochromen (CBCRs) darstellen. Die bearbeiteten GAF-Domänen weisen jeweils sehr unterschiedliche Photozyklen auf. Slr1393gaf3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 durchläuft einen Rot/Grün-Photozyklus, ausgehend von einem im Dunkeln entstehenden rot-absorbierenden Zustand (*in vivo*: $\lambda_{\max}(P_r) = 648 \text{ nm}$, $\lambda_{\max}(P_g) = 538 \text{ nm}$). Einige AS im Bereich des Chromophors wurden durch Punktmutation geändert, um deren Einfluss auf die Absorption bzw. die Kinetiken der Intermediate im Photozyklus mittels zeitaufgelöster Blitzlichtphotolyse zu bestimmen.

Neben Slr1393gaf3 wurden zwei GAF-Domänen des Proteins All2699 (AphC) aus *Nostoc* sp. PCC 7120 vermessen. All2699gaf1 zeigt als eines der ersten CBCRs einen für klassische Phytochrome typischen Rot/Dunkelrot-Photozyklus. All2699gaf3 hingegen besitzt einen außergewöhnlichen Rot/Orange-Photozyklus, wobei das orange-absorbierende Photoprodukt nur eine sehr geringe thermische Stabilität aufweist.

Alle sieben charakterisierten Phytochrome wurde mit Hilfe eines koexprimierten zweiten Plasmids *in vivo* mit dem Chromophor assembliert (im Fall von 1393gaf3 wurde das Apoprotein als Vergleich zusätzlich *in vitro* mit PCB assembliert). Diese „Hilfsplasmide“ kodieren die Enzyme, die aus vorhandenem Häm den jeweils benötigten Chromophor erzeugen: Phycocyanobilin für die CBCR-GAF-Domänen und *SynCph2*(1-2) sowie BV für die Bacteriophytochrome und das pilzliche Phytochrom. *SynCph2*(1-2) wurde in aufgereinigter Form von der Arbeitsgruppe von Lars-Oliver Essen (Philipps Universität, Marburg) zur Verfügung gestellt.

Sämtliche Phytochrome wurden zunächst mittels steady-state Spektroskopie bezüglich ihrer P_r - und P_{fr} -Zustände (bzw. im Fall der CBCRs bezüglich ihrer Dunkelformen und Photoprodukte) hin untersucht. Nachfolgend wurde jedes Protein zeitaufgelöst auf Absorptionsänderungen nach einem 10-ns Laserblitz hin charakterisiert. Zusätzlich wurden bei einigen Proteinen Differenzspektren zu gewählten Zeitpunkten der Kinetik erzeugt. Hierbei ist zu beachten, dass die LADS echte Fit-Kurven darstellen, während die Differenzspektren zu gewählten Zeitpunkten aus Absorptionsänderungen bei den Messwellenlängen mittels eines „cubic spline“ Algorithmus erzeugt wurden und keine Fit-Kurven darstellen.

Zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse

Die zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse bietet eine gute Möglichkeit, Intermediate einer lichtinduzierten Umwandlung und ihre Entstehungs- und Zerfallskinetiken zu erfassen und als Differenzspektren darzustellen. Entsprechend wurden bei der jeweiligen Anregungswellenlänge pro Beobachtungswellenlänge drei verschiedene Zeitfenster aufgenommen (200 μ s; 2 ms; 20 ms). Bei der Untersuchung des *SynCph2*(1-2) und den drei ausgewählten Mutanten wurden vier verschiedene Zeitfenster gewählt (100 μ s, 1 ms, 10 ms, 100 ms). Beim längsten Zeitfenster wurde zusätzlich eine Basislinie aufgenommen und vor der eigentlichen Datenauswertung mit dem dazugehörigen Zeitfenster verrechnet.

Zu Beginn der Datenanalyse wurden die einzelnen Zeitfenster verschachtelt. Dies ist nötig, um die Punktdichte im kurzen Zeitbereich zu erhöhen und somit auch kurze Kinetiken erfassen zu können. Veranschaulicht wird die Vorgehensweise an den Messungen mit drei verschiedenen Zeitfenstern (Abb. 4-1).

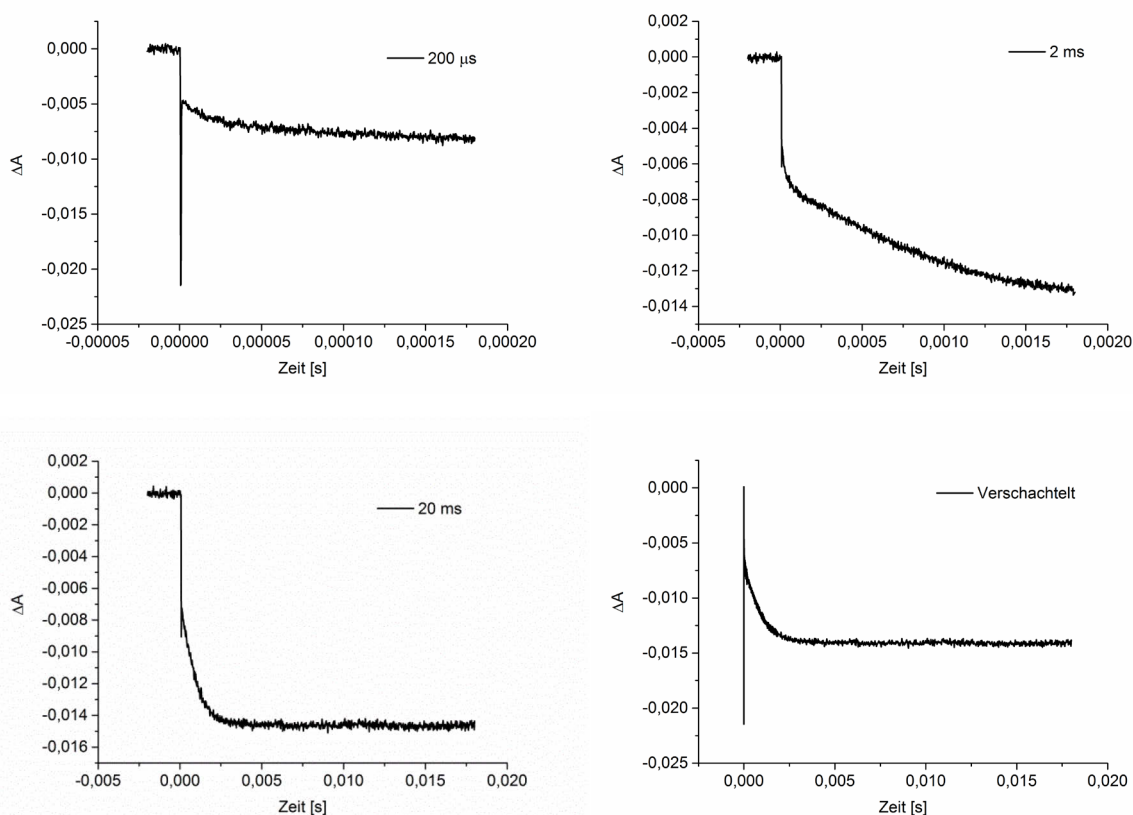


Abb. 4-1: Vorgehensweise der Datensatz-Bearbeitung bei drei Beobachtungszeitfenstern. Gezeigt sind Absorptionsänderungen bei den drei gewählten Zeitfenstern (200 μ s, 2 ms, 20 ms) sowie der verschachtelte Datensatz für die weitere Analyse am Beispiel einer Messung von 1393gaf3 (Anregungswellenlänge: 540 nm, Beobachtungswellenlänge: 540 nm).

Dafür wurde zunächst der Datensatz des 200 μ s Zeitfensters in den passenden Bereich des 2 ms Zeitfensters kopiert und die dort für diesen Zeitbereich vorhandenen Daten wurden entfernt. Der so entstandene Datensatz wurde in das 20 ms Zeitfenster an die passende Stelle kopiert und ersetzt entsprechend die vorhandenen Daten in dem Zeitbereich bis 2 ms (Abb. 4-1). Da u.U. die einzelnen Zeitfenster unterschiedliche Grundabsorption zeigen („offset“), muss in einigen Fällen bei Kombination der Daten der gesamte Datensatz mit einem Inkrement multipliziert bzw. addiert werden, um die Basislinien anzupassen.

Globalanalyse und absolute Differenzspektren

Die Auswertung der Daten der Blitzlichtphotolyse erfolgt hier durch die Globalanalyse, auch Globalfit genannt. Dabei wird eine simultane Analyse mehrerer Kinetiken durchgeführt. Bei den vorliegenden Messungen wurden dabei die unterschiedlichen Absorptionsverläufe verschiedener Beobachtungswellenlängen bei einer Anregungswellenlänge mithilfe der verschachtelten Datensätze gefittet. Dies liefert die Möglichkeit, die Lebenszeiten der Intermediate zu errechnen, wobei jede gemessene Wellenlänge einen unterschiedlichen Anteil am jeweiligen Intermediat beiträgt, welcher durch folgende Formel berechnet werden kann (Gl. 4-1).

$$\Delta A(t, \lambda) = \left[\sum_{i=1}^N A_i(\lambda) e^{\frac{-t}{\tau_i}} + A_0(\lambda) \right]$$

Gl. 4-1: Absorptionsänderungen bei der Wellenlänge λ : $\Delta A(t, \lambda)$ = zeitaufgelöst gemessene Absorptionsänderung bei der Wellenlänge λ ; $A_i(\lambda)$ = Amplitude der Absorptionsänderung einer Lebenszeit bei der Wellenlänge λ ; τ_i = Lebenszeit des Intermediats i ; t = Zeit; $A_0(\lambda)$ = Konstante bei der Wellenlänge λ .

Die so errechneten Amplituden der einzelnen Wellenlängen zu einer gefundenen Lebenszeit werden gegen die entsprechenden Wellenlängen aufgetragen, woraus ein sogenanntes life-time-associated difference spectrum (LADS) entsteht. Das LADS zeigt das Aussehen des Intermediats, das mit der gefitteten Kinetik verknüpft ist. Die Konstante (A_0) in den Spektren entsteht, wenn man die Zeit (t) ins Unendliche laufen lässt, d.h., sie zeigt die Absorption, die am Ende des Experiments vorliegt. Hierbei folgt man der Konvention, dass bei Darstellung der LADS eine negative Amplitude ein Intermediat anzeigt, das in diesem Wellenlängenbereich mit der errechneten Lebenszeit entsteht, während umgekehrt eine positive Amplitude ein Intermediat anzeigt, das mit der errechneten Lebenszeit verschwindet. Die Konstante A_0 dagegen wird absorptionsgetreu dargestellt.

4.1 *SynCph2*(1-2), *PstBphP1*, *PaBphP-497* und *FphAN753*

4.1.1 *SynCph2*(1-2)

Das Absorptionsspektrum der GAF-GAF Bidomäne aus *SynCph2* zeigt einen Rot/Dunkelrot Photozyklus mit einem Maximum des rot-absorbierenden Zustandes bei 644 nm. Bei Belichtung mit rotem Licht (LED = 625 nm) geht das Protein in einen Mischzustand aus P_r - und P_{fr} -Zustand über. Dabei verschiebt sich das Maximum im roten Bereich auf 647 nm und es bildet sich eine Schulter im dunkelroten Spektralbereich bei 695 nm (Abb. 4-2).

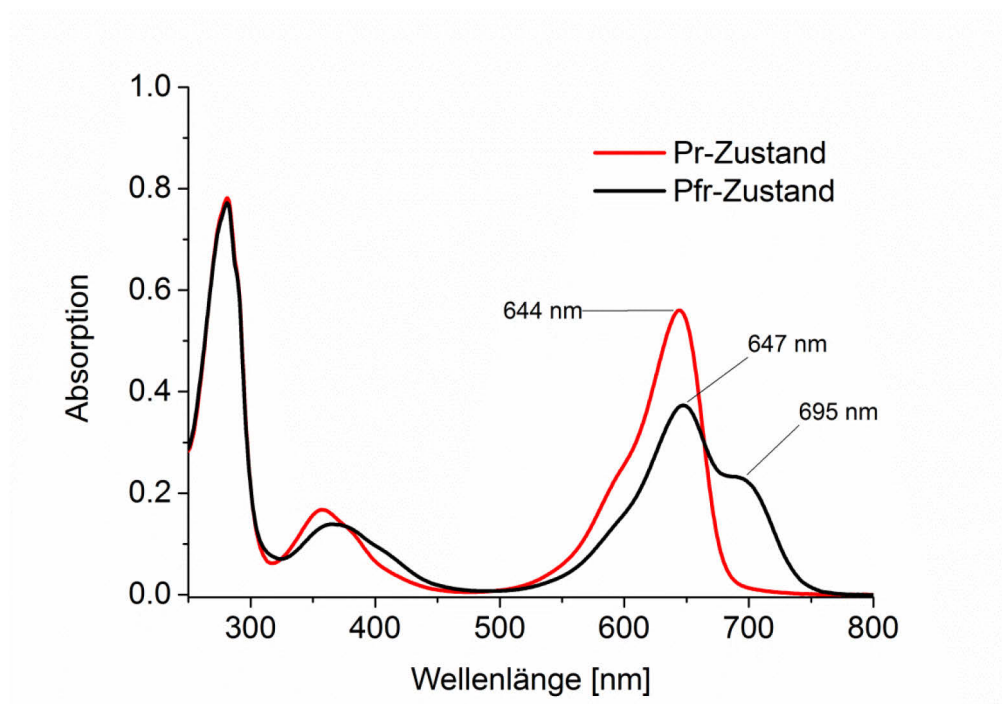


Abb. 4-2: Absorptionsspektren von *SynCph2*(1-2) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803

Zur genaueren Untersuchung der stabilisierenden Wirkung der GAF2-Domäne wurden Punktmutationen in die zungenförmige Struktur eingeführt, die die Chromophortasche verschließt. Dabei wurden zwei Motive für die Mutation gewählt (WXE, PRXSF) die zusammen mit dem W(G/A)G Motiv im Vergleich zu anderen Sequenzen zwischen der GAF2- und der PHY-Domäne aus kanonischen Phytochromen nahezu unveränderlich sind und daher als sehr wichtig für die Phototransformation und die Stabilität des P_{fr} -Zustandes erachtet werden (Abb. 4-3) (57).

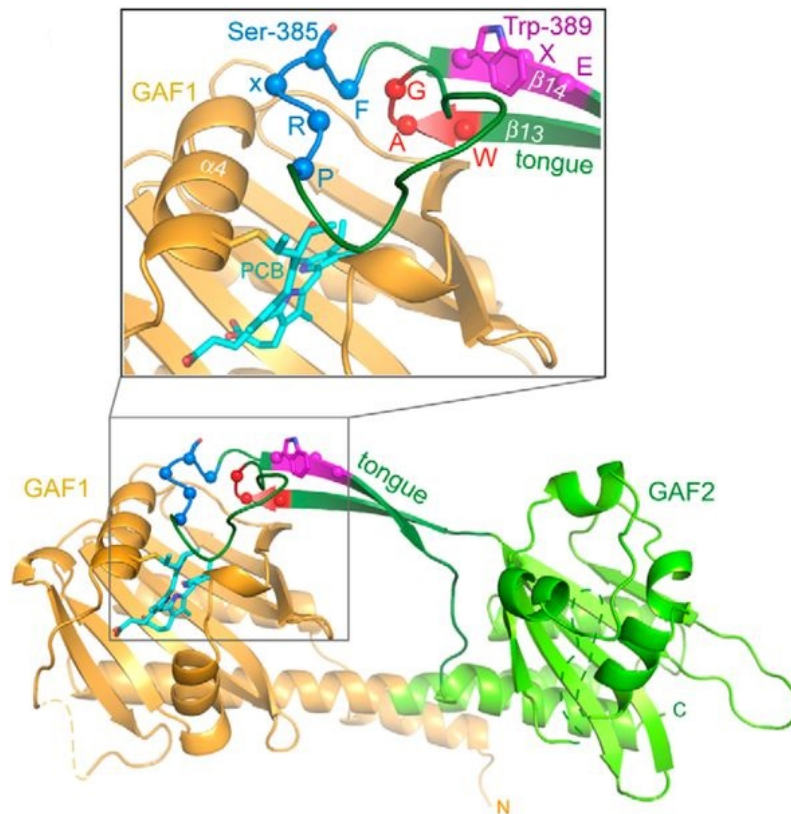


Abb. 4-3: Struktur von *SynCph2*(1-2) (unten) mit (darüber) detaillierter Ansicht der Chromophorbindungstasche. Die GAF1-Domäne ist in orange dargestellt, die GAF2-Domäne mit der zungenförmigen Ausbuchtung (tongue region) in grün. Der PCB Chromophor ist in türkis gezeigt. In Stabform sind die AS-Positionen Ser-385 und Trp-389 sowie der chromophorbindende Cysteinrest Cys-129 präsentiert. Die AS Reste der konservierten W(G/A)G, PRXS F und WXE Motive sind in Kugelform dargestellt und in rot, blau und violett hervorgehoben (57).

Serin 385 liegt im konservierten PRXS F Motiv und zeigt bei Betrachtung der Kristallstruktur keine Interaktion mit der GAF1-Domäne oder dem gebundenen PCB Chromophor. Das Absorptionsspektrum der Mutante S385A weist im Absorptionsspektrum eine leichte Verschiebung des rot-absorbierenden Zustands um 2 nm ($P_{\text{max}} = 646 \text{ nm}$) auf. Das P_{fr} -Spektrum zeigt wie beim WT einen Mischzustand, bei dem der Anteil der Absorption im dunkelroten Spektralbereich deutlich geringer ist (Abb. 4-4, A).

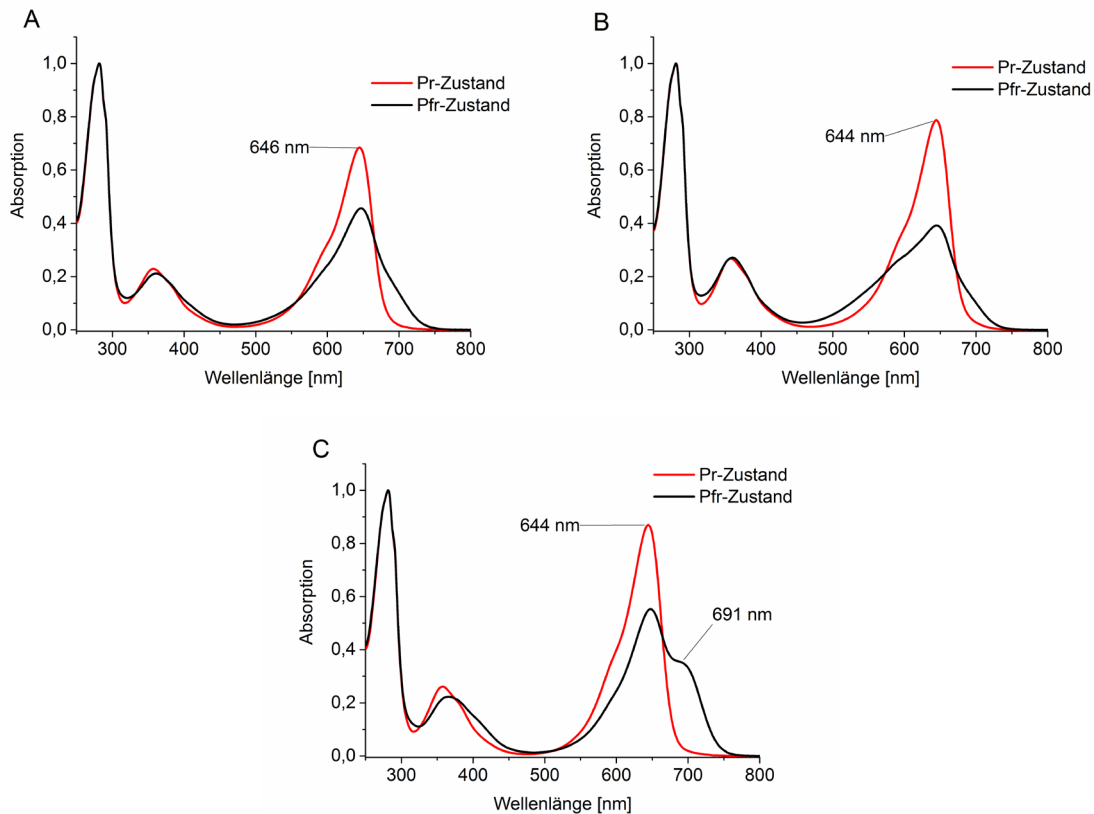


Abb. 4-4: Absorptionsspektren der drei Mutanten von *SynCph2*(1-2) A: S385A, B: W389A, C: W389F.

W389A zeigt keine Verschiebung des P_r-Zustandes im Vergleich zum WT. Deutliche Unterschiede werden beim dunkelrot-absorbierenden Photoprodukt deutlich. Dieses besitzt eine sehr breite Absorption, die sich von ungefähr 450 nm bis 740 nm erstreckt und wie S385A keine sichtbare Schulter im dunkelroten Spektralbereich ausbildet (Abb. 4-4, B).

Die Absorptionsspektren beider Zustände der Mutante W389F sind denen des WT-Proteins sehr ähnlich. Lediglich die Schulter, die im dunkelrot-absorbierenden Zustand auftritt ist etwas weniger ausgeprägt (aber deutlich stärker vorhanden als bei den beiden anderen Mutanten und zeigt eine leichte Verschiebung des Absorptionsmaximums (691 nm, vgl. WT 695 nm) (Abb. 4-4, C).

Für die Untersuchung der Konversion vom rot-absorbierenden in den dunkelrot-absorbierenden Photozustand des WT von *SynCph2*(1-2) mittels der Methode der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse wurde die Probe mit dem Laser bei einer Wellenlänge von 640 nm angeregt. Die Beobachtungswellenlängen lagen im Abstand von 10 nm im Wellenlängenbereich von 520 nm bis 720 nm. Zusätzlich wurde der Absorptionsverlauf bei 665 nm vermes-

sen. Rückbelichtet wurde nach jedem Laserpuls über einen Zeitraum von 20 Sekunden mit einer LED der Wellenlänge 720 nm. Im Folgenden sind die durch Globalfit ermittelten LADS mit den dazugehörigen Lebenszeiten der Intermediate aufgeführt.

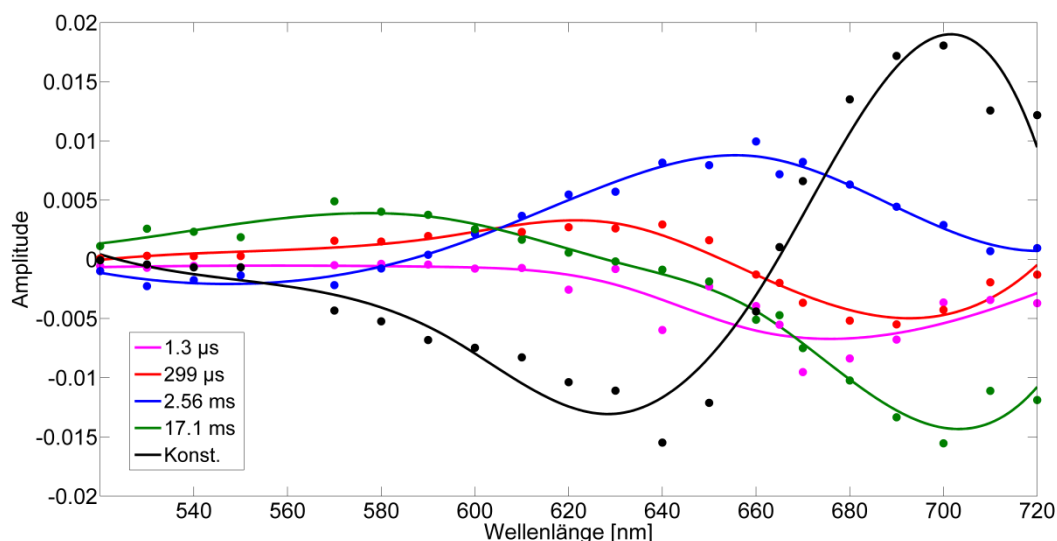


Abb. 4-5: LADS von *SynCph2*(1-2): Anregung 640 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Die errechneten LADS zeigen vier Intermediate (Abb. 4-5). Das erste Intermediat nach 1,3 Mikrosekunden zeigt einen leichten Absorptionsanstieg um 670 nm. Das nächste Intermediat weist ebenso einen Anstieg der Absorption im dunkelroten Spektralbereich (690 nm) auf als auch einen Absorptionsabfall bei 620 nm. Für das dritte Intermediat mit einer Lebenszeit von 2,56 Millisekunden lässt sich ein Abfall der Absorption um 660 nm gleichzeitig mit einem Abfall im kürzerwelligen Spektralbereich feststellen. Das letzte Intermediat (Lebenszeit 17,1 ms) weist einen starken Absorptionsanstieg bei 700 nm in der Nähe des Maximums des P_{fr} -Zustandes auf und stellt somit anscheinend die dominante Komponente für die finale Formierung des P_{fr} -Zustandes dar. Der Verlauf der Konstanten weist den erwarteten Übergang vom P_r - in den P_{fr} -Zustand auf.

Die inverse Konversion wurde durch einen Laserpuls bei 700 nm initiiert (Abb. 4-6). Der Wellenlängenbereich für die Messung lag zwischen 520 nm und 720 nm im Abstand von 10 nm. Zusätzlich wurde der Absorptionsverlauf bei 665 nm vermessen. Rückbelichtet wurde mittels einer LED (625 nm) für die Dauer von 20 Sekunden.

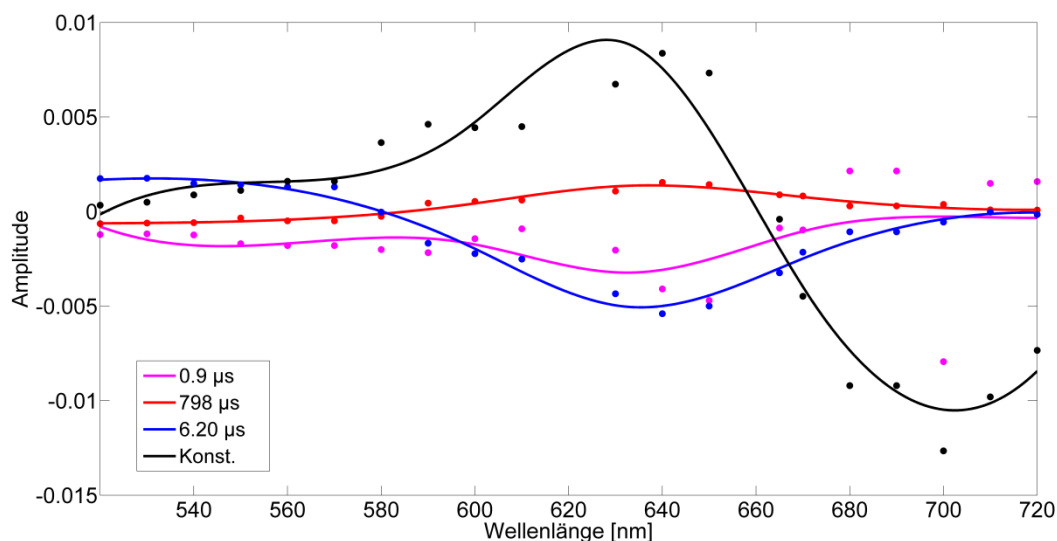


Abb. 4-6: LADS von *SynCph2*(1-2): Anregung 700 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die Rückreaktion vom P_{fr} - in den P_r -Zustand zeigt beim Globalfit drei Intermediate in den LADS. Die ersten beiden Intermediate zeigen nur geringe Absorptionsänderungen mit einem Absorptionsanstieg um 630 nm ($\tau_1 = 0,9 \mu s$) und einem Abfall im selben Absorptionsbereich mit einer Lebenszeit von 798 Mikrosekunden. Das letzte Intermediat weist einen großen Absorptionsanstieg bei 640 nm auf und geht anschließend in den P_r -Zustand über.

Wie bereits oben ausführlich beschrieben, wurden für dieses Protein Mutanten erstellt, die in zwei der drei Sequenzmotive liegen, die als sehr wichtig für die Phototransformation und die Stabilität des P_{fr} -Zustandes erachtet werden. Diese wurden im Vergleich zum WT ebenfalls in Bezug auf ihre Photokonversion im Mikro- bis Millisekundenzeitbereich mittels der Blitzlichtphotolyse untersucht. Dabei wurden dieselben Parameter wie bei den WT Messungen gewählt. Eine Ausnahme bildet die W389F Mutante, die aufgrund ihres im Vergleich zu den anderen Mutanten ähnlichen Absorptionsspektrums bei der steady-state Messung bei sieben ausgewählten Wellenlänge (590, 640, 660, 665, 690, 700 und 720 nm) vermessen wurde und nur durch Einzelwellenlängenfits charakterisiert wurde.

Die S385A Mutante, die im PRXSF Motiv der GAF2-Domäne liegt, zeigt für die drei ersten Intermediate der LADS ähnliche Absorptionsverläufe wie der WT. Die Lebenszeiten sind jedoch um das bis zu Dreifache verkürzt.

Das erste Intermediat mit einer Lebenszeit von 1,3 Mikrosekunden weist einen Absorptionsanstieg im dunkelroten Spektralbereich mit einem Maximum bei 690 nm auf. Das nachfolgende Intermediat ($\tau_2 = 112 \mu\text{s}$) führt diesen Anstieg fort, wobei zeitgleich die Absorption um 620 nm sinkt. Für das dritte Intermediat mit einer Lebenszeit von 1,57 Millisekunden lässt sich ein Absorptionsanstieg um 540 nm bei gleichzeitigem Absorptionsabfall bei 650 nm feststellen. Das letzte Intermediat zeigt einen Absorptionsanstieg von 590 nm bis 700 nm mit einer maximalen Absorptionsänderung bei 660 nm (Abb. 4-7).

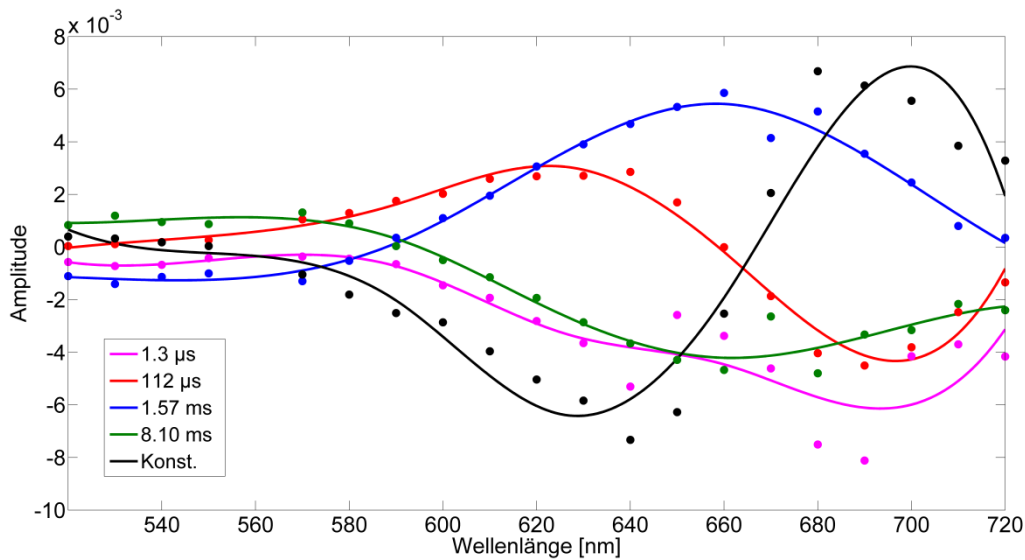


Abb. 4-7: LADS von *SynCph2*(1-2) S385A: Anregung 640 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Die gegenläufige Konversion durchläuft wie beim WT drei Intermediate. Das erste Intermediat mit einer Lebenszeit von 1,3 μs zeigt einen Absorptionsanstieg über den gesamten vermessenen Spektralbereich mit zwei Maxima bei 640 nm und 690 nm. Nachfolgend weist das zweite Intermediat mit einer Lebenszeit von 619 Mikrosekunden einen Absorptionsabfall von 580 nm bis 660 nm mit einer maximalen Absorptionsänderung um 630 nm auf. Die größte Absorptionsänderung erfolgt mit einer Lebenszeit von 3,53 Millisekunden bei der Bildung des 3. Intermediats. Es zeigt einen Absorptionsanstieg bei 640 nm bei gleichzeitigem Absorptionsabfall um 550 nm (Abb. 4-8).

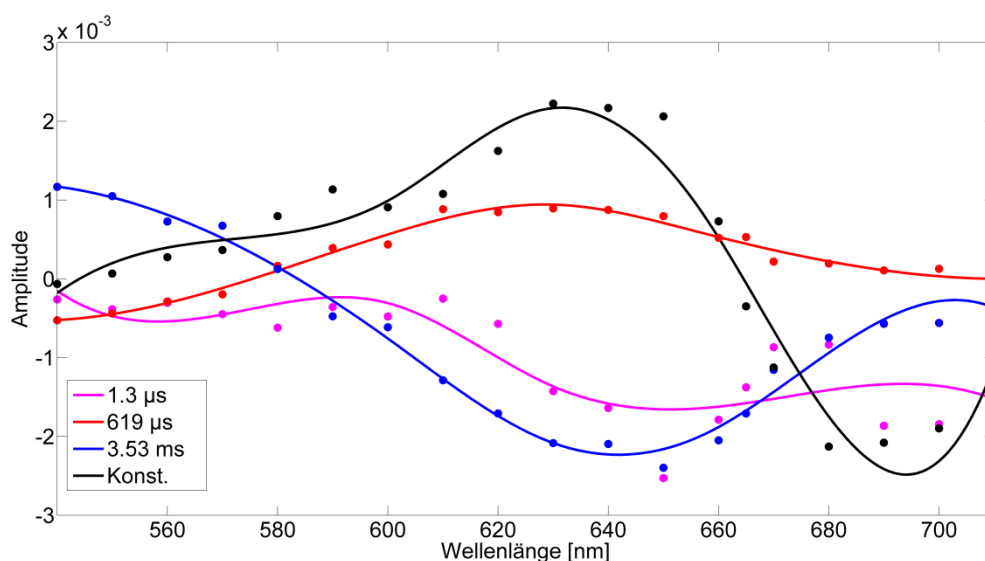


Abb. 4-8: LADS von *SynCph2*(1-2) S385A: Anregung 700 nm (Wellenlängen 540 – 710 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die W389A Mutante, die im konservierten WXE-Motiv liegt, besitzt für die P_r zu P_{fr} Photokonversion drei Intermediate, die anhand der LADS identifiziert werden konnten. Der Absorptionsverlauf beginnt mit einem starken Abfall im Wellenlängenbereich um 700 nm für das erste Intermediat mit einer Lebenszeit von 1,4 Mikrosekunden. Dieser Absorptionsabfall setzt sich für das zweite Intermediat ($\tau_2 = 414 \mu s$) weiter fort. Das letzte Intermediat weist einen Absorptionsanstieg über einen breiten Abschnitt des Spektralbereiches zwischen 610 nm und 720 nm mit einem Maximum bei 660 nm auf (Abb. 4-9).

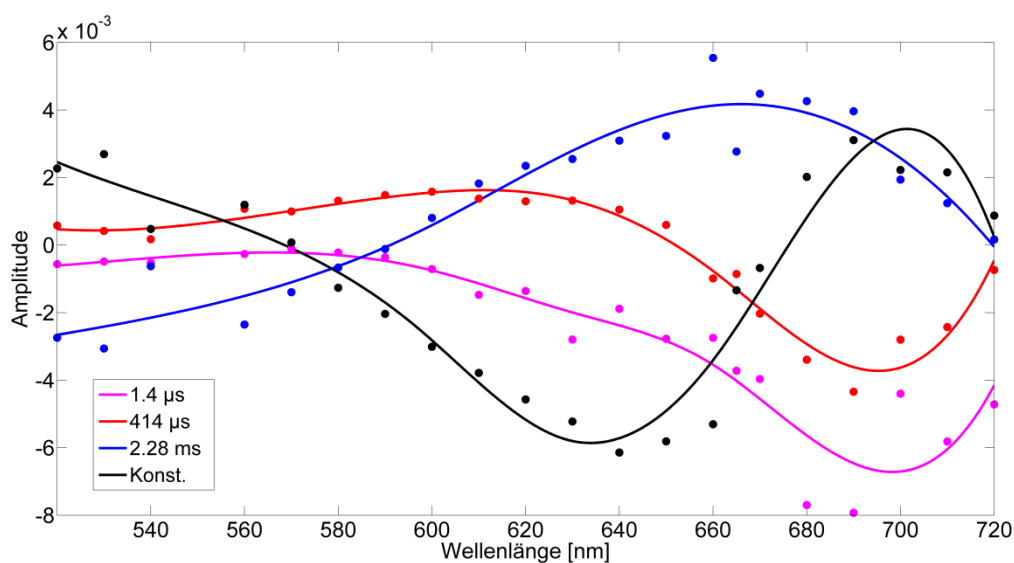


Abb. 4-9: LADS von *SynCph2*(1-2) W389A: Anregung 640 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Die inverse Konversion vom dunkelrot-absorbierenden Grundzustand in das rot-absorbierende Photoprodukt besitzt wie bei den zuvor beschriebenen *SynCph2*(1-2) Proteinen drei Lebenszeiten. Das erste Intermediat ($\tau_1 = 1,2 \mu\text{s}$) weist einen Absorptionsanstieg zwischen 600 nm und 720 nm mit einem Maximum bei 660 nm auf. Das zweite und dritte Intermediat zeigen einen geringen Absorptionsanstieg ($\tau_2 = 2,21 \text{ ms}$) bzw. einen Abfall ($\tau_3 = 19,5 \text{ ms}$) um 630 nm (Abb. 4-10).

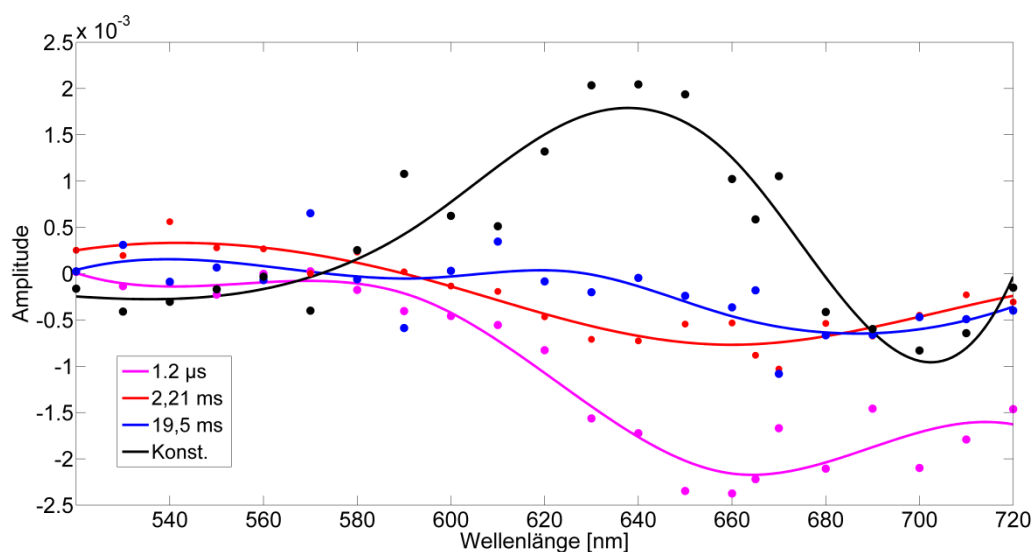


Abb. 4-10: LADS von *SynCph2*(1-2) W389A: Anregung 700 nm (Wellenlängen 520 – 720 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die Mutante W389F, die dem Wildtyp sehr ähnliche steady-state Absorptionsspektren aufwies, wurde bei sieben Wellenlängen (590, 640, 660, 665, 690, 700 und 720 nm) mittels zeitaufgelöster Blitzlichtphotolyse vermessen. Nachfolgend ist der Absorptionsverlauf nach der Laseranregung für die vier verschiedenen Zeitfenster aufgeführt. Durch Pfeilmarkierung sind die zu identifizierenden Intermediate markiert (Abb. 4-11).

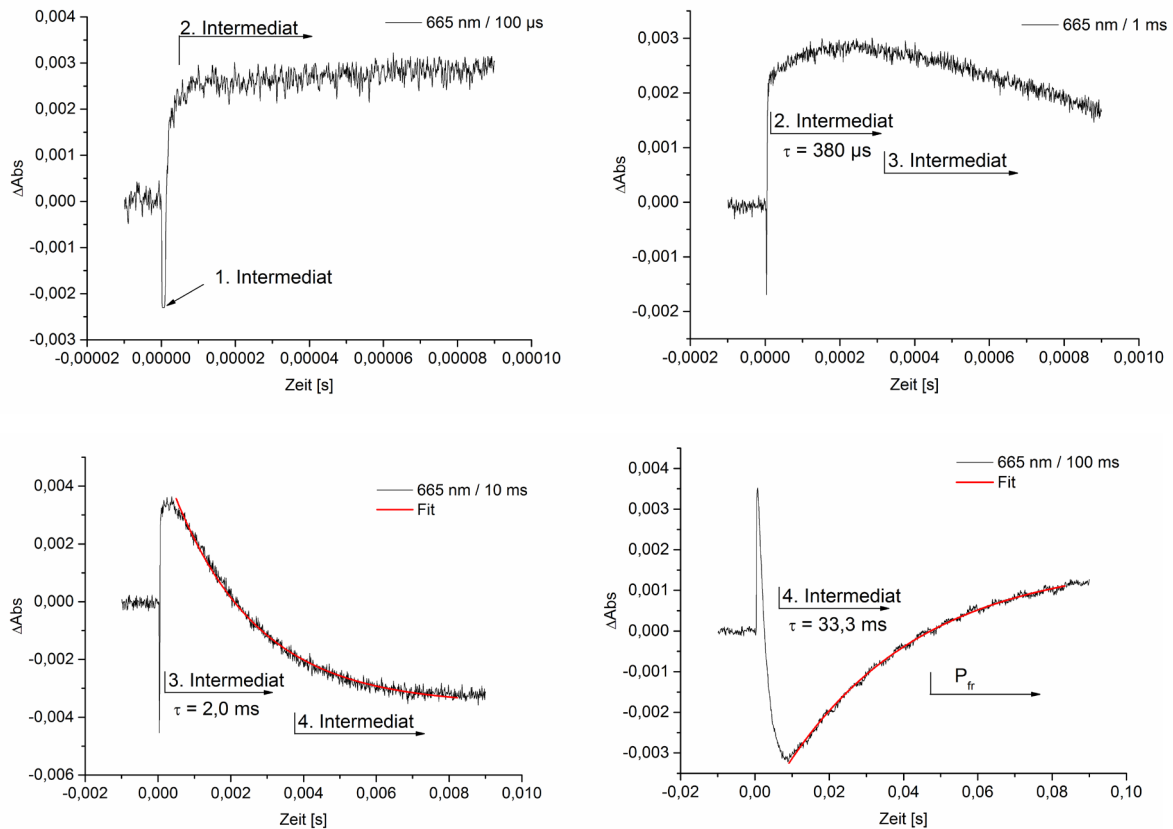


Abb. 4-11: Blitzlichtphotolysemessung der W389F von SynCph2(1-2) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 665 nm im Zeitfenster 100 μ s, 1 ms, 10 ms und 100 ms.

W389F verhält sich bezogen auf die Intermediate und deren Lebenszeiten nahezu identisch zum Wildtyp (Abb. 4-11). Für die P_r zu P_{fr} Konversion zeigen sich vier Lebenszeiten (1,5 μ s, 380 μ s, 2,0 ms und 33,3 ms), die eine gute Übereinstimmung mit den Lebenszeiten des WT aufzeigen. Lediglich das 4. Intermediat zeigt eine im direkten Vergleich zweifach längere Lebenszeit. Für die gegenläufige Konversion kann nur ein Intermediat per Einzelfit identifiziert werden, welches eine Lebenszeit von 3,1 ms besitzt.

4.1.2 PstBphP1

Das Absorptionsspektrum des BV-bindenden Phytochroms 1 aus *Pseudomonas syringae* (PstBphP1) weist die beiden für klassische Phytochrome charakteristischen Zustände auf (Abb. 4-12). Der rot-absorbierende Grundzustand besitzt ein Maximum von 702 nm und eine schwach ausgeprägte Schulter bei 643 nm. Durch Belichtung mit einer 670 nm LED lässt sich das Protein in einen Mischzustand aus P_r - und P_{fr} -Zustand überführen. Dabei verschiebt sich

das Maximum des Absorptionsspektrums auf 705 nm und es bildet sich eine Schulter im dunkelroten Spektralbereich mit einem Maximum um 760 nm aus.

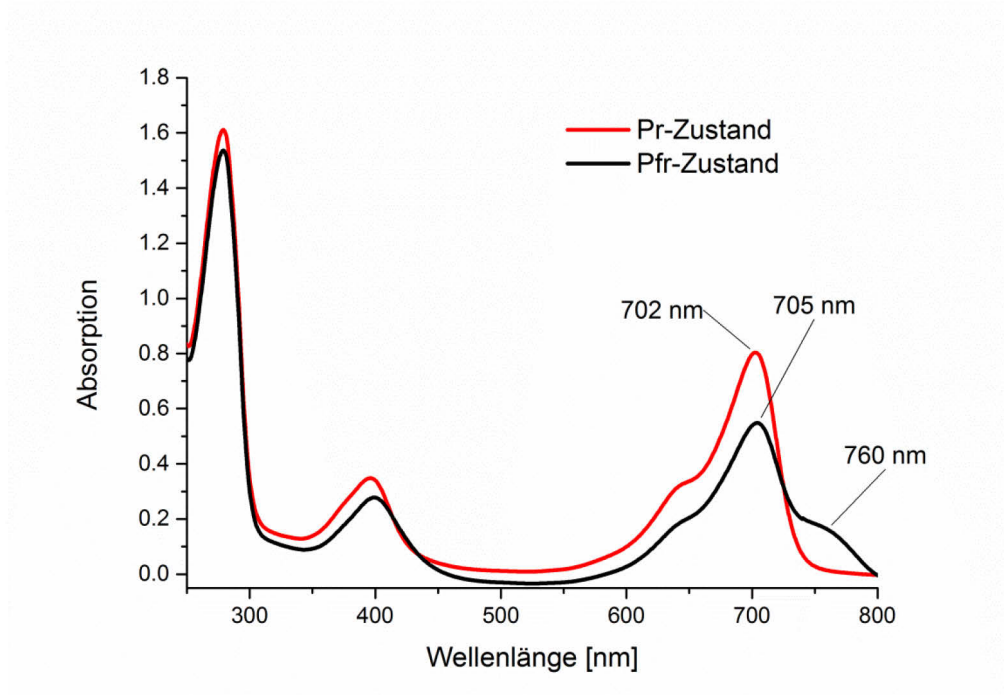


Abb. 4-12: Absorptionsspektren von PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Die Rückkonversion in den Grundzustand konnte durch Belichtung mit einer LED (760 nm) als auch durch eine thermische Rückkehr unter Lichtausschluss erfolgen. Der Absorptionsanstieg bei der Rückkehr wurde bei 700 nm über einen Zeitraum von 5000 Sekunden photometrisch vermessen.

Durch einen monoexponentiellen Fit mit Hilfe der Gleichung (Gl. 4-2) konnte für die Rückkehr-Kinetik eine Zeit von 4,5 Minuten berechnet werden (Abb. 4-13).

$$y = A_1 \cdot e^{\left(\frac{-x}{t_1}\right)} + y_0$$

Gl. 4-2: Monoexponentielle Gleichung zur Berechnung der Rückkehr-Kinetik (t_1) .

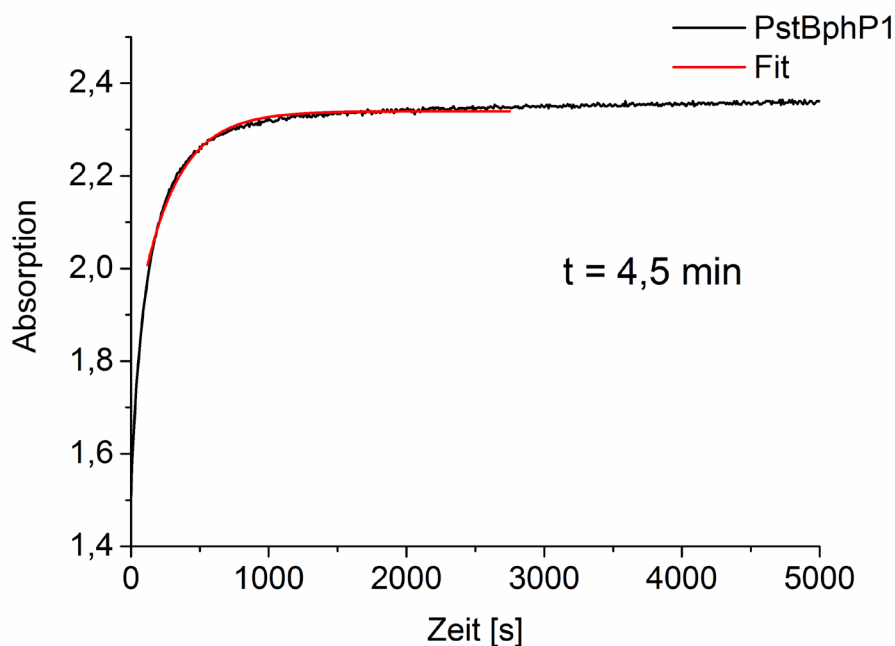


Abb. 4-13: Rückkehr-Kinetik von PstBphP1: $P_{fr} \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 700$ nm) bei 20 °C

Die Konversion vom rot-absorbierenden Grundzustand in das dunkelrot-absorbierende Photoprodukt wurde für die Blitzlichtphotolysemessungen durch eine Laseranregung bei 670 nm initiiert. Die Beobachtungswellenlängen wurden zwischen 600 nm und 780 nm mit einem Abstand von 20 nm gewählt. Zusätzliche vermessene Wellenlängen lagen bei 670 nm, 710 nm und 750 nm, da in diesen Bereichen die Absorptionsänderungen nur gering sind. Die Rückbeleuchtung erfolgte über einen Zeitraum von 30 Sekunden mit einer LED der Wellenlänge 760 nm.

Die aus den aus drei vermessenen Zeitfenstern (200 μ s, 2 ms, 20 ms) verschachtelten Datensätze errechneten LADS zeigen zwei Intermediate (Abb. 4-14). Das erste Intermediat mit einer Lebenszeit von 1,2 Millisekunden weist nur geringe Absorptionsänderungen um 700 nm und um 730 nm auf. Das zweite Intermediat zeigt nach 26 Millisekunden einen Abfall der Absorption bei 690 nm sowie einen Anstieg im Bereich von 750 nm.

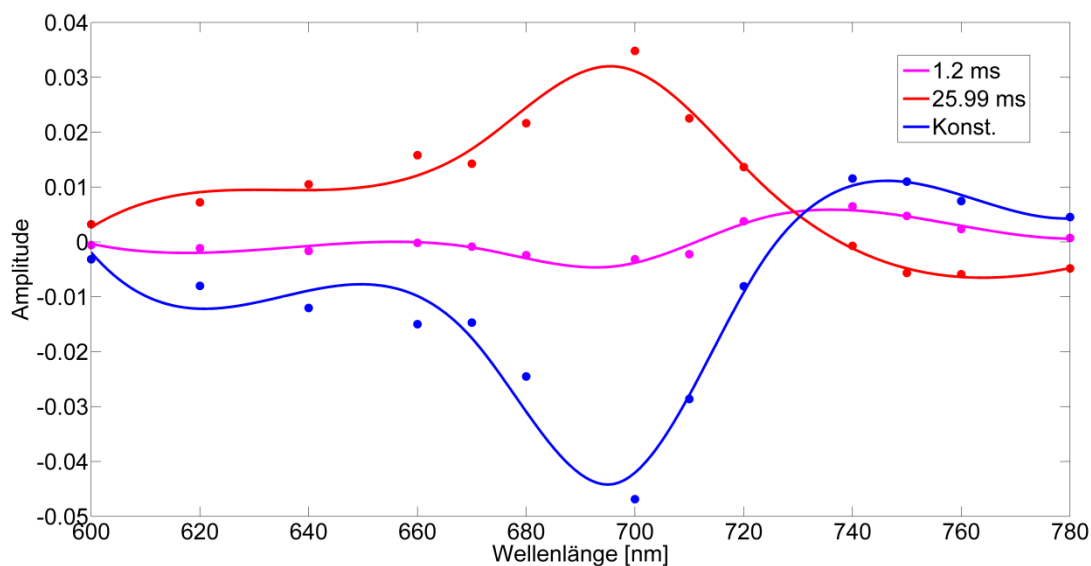


Abb. 4-14: LADS von PstBphP1: Anregung 670 nm (Wellenlängen 600 – 780 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Für die entgegengesetzte Photokonversion (P_{fr} zu P_r) liefert die Globalanalyse ebenfalls zwei Intermediate (Abb. 4-15). Die Probe wurde bei 760 nm angeregt und über den Wellenlängenbereich von 600 nm bis 780 nm vermessen. Die Rückbelichtung erfolgte über einen Zeitraum von 30 Sekunden ($\lambda_{LED} = 670$ nm). Bei der Darstellung der Intermediate (700 μ s, 11 ms) in den LADS ergeben sich nahezu identische Verläufe der Amplituden. Die Absorption bei 700 nm sinkt, wobei gleichzeitig ein Absorptionsanstieg im Bereich um 750 nm festzustellen ist.

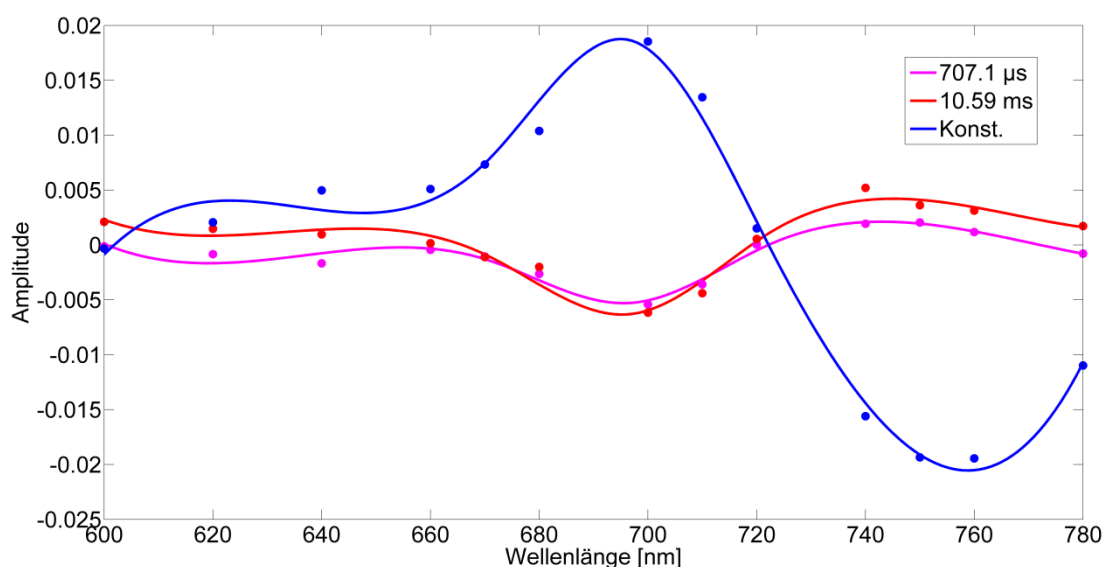


Abb. 4-15: LADS von PstBphP1: Anregung 760 nm (Wellenlängen 600 – 780 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Zur genaueren Analyse wurden für dieses Protein Differenzspektren zu gewählten Zeiten erzeugt. Diese stellen je Konversion vier verschiedene Zeitpunkte im Absorptionsverlauf dar, aufgetragen gegen die verschiedenen Wellenlängen. In den Spektren der P_r - nach P_{fr} -Umwandlung zeigt sich nach 15 Mikrosekunden ein deutlicher Absorptionsabfall bei 700 nm und ein Anstieg um 740 nm. Bis einschließlich des dritten Differenzspektrums bei 1,5 Millisekunden findet praktisch keine weitere Absorptionsänderung im rot-absorbierenden Bereich statt (Abb. 4-16, links). Die Maxima der Differenzspektren bei 740 nm findet man für den ersten und zweiten Zeitpunkt, während die Intensität nach 1,5 Millisekunden sinkt bis sie zum letzten Zeitpunkt die geringste Auslenkung erreicht. Der dazugehörige Abfall der Absorption bei 700 nm ist demgegenüber der größte im gesamten Verlauf der Konversion.

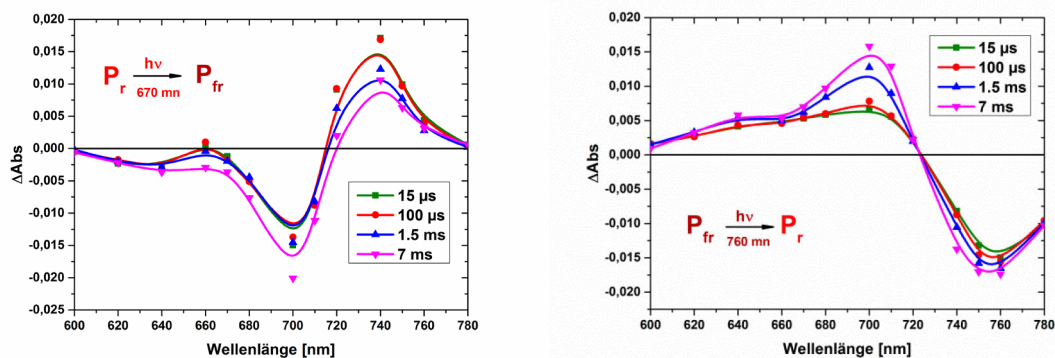


Abb. 4-16: Differenzspektren von PstBphP1 zu ausgewählten Zeiten: links: $P_r \rightarrow P_{fr}$; rechts: $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die gegenläufige Photokonversion vom dunkelrot-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand wurde zu denselben Zeitpunkten im Absorptionsverlauf betrachtet (Abb. 4-16, rechts). Dabei wird sichtbar, dass mit Ausprägung eines isosbestischen Punkts die Absorption vom ersten bis zum letzten Zeitpunkt im P_{fr} -Zustand stetig ab- und bei 700 nm stetig zunimmt.

4.1.3 PaBphP-Pa497

Den Untersuchungen an PaBphP1-Pa497 folgend wurde ein Bacteriophytochrom aus *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Eingesetzt wurde hier nur die vollständige Photosensor-domäne, bestehend aus der PAS-, GAF- und der PHY-Domäne, die mit der Aminosäure 497 endet. Der Einfachheit halber wird die Bezeichnung PaBphP für dieses Fragment beibehalten. Das Absorptionsspektrum von PaBphP1 zeigt ein für kanonische Phytochrome typisches

Rot/Dunkelrot-Spektrum (Abb. 4-17). Auffällig ist, dass das Protein nach der Aufreinigung unter Lichtausschluss im P_{fr} -Zustand vorliegt, es gehört damit also zur Bacteriophytochrom-Untergruppe der bathy-Phytochrome. Dieser dunkelrot-absorbierende Zustand besitzt ein Maximum bei 750 nm. Der rot-absorbierende Zustand, der durch Belichtung mit 740 nm dargestellt werden kann, zeigt ein Maximum bei 701 nm mit einer Schulter bei 645 nm. Interessanterweise konnte der P_{fr} -Zustand durch anschließende Belichtung des P_r -Zustandes mit 650 nm nur teilweise wiederhergestellt werden und erst unter Lichtausschluss findet eine vollständige Rückkehr in den dunkelrot-absorbierenden Grundzustand statt.

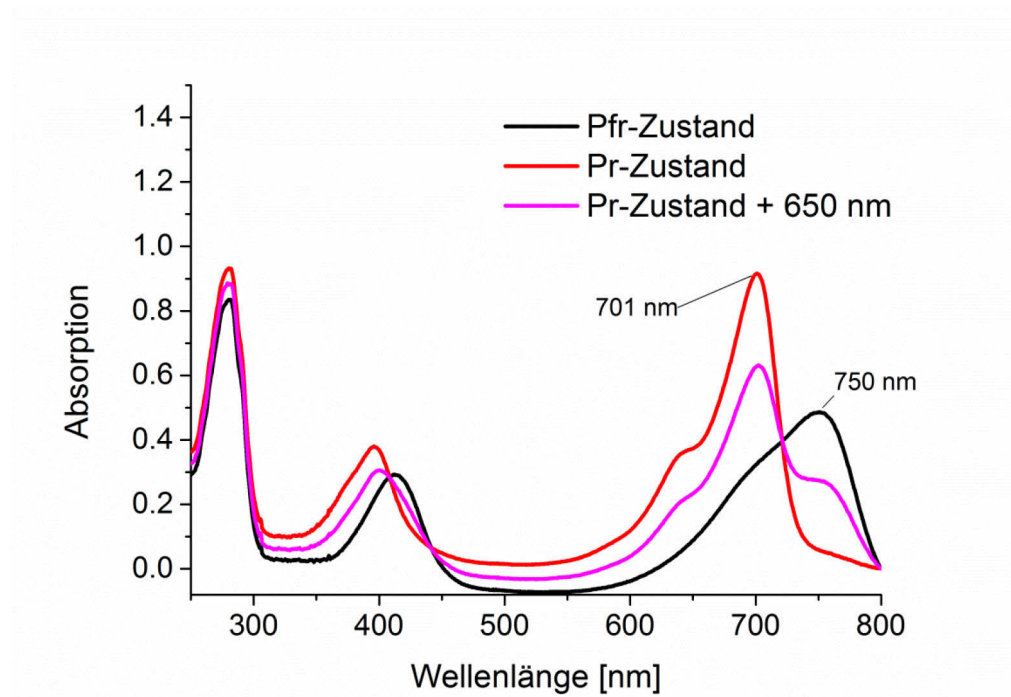


Abb. 4-17: Absorptionsspektren von PaBphP-Pa497 aus *Pseudomonas aeruginosa*. Rot, die durch Belichtung aus der P_{fr} -Grundform hergestellte P_r -Form; violett, die durch Belichtung anteilig erhältliche P_{fr} -Form; schwarz, die P_{fr} -Form nach Dunkelinkubation der in violett dargestellten Mischform.

Die Rückkehrzeit für die thermische Umwandlung aus dem vollständig in den P_r -Zustand belichteten Protein in den P_{fr} -Zustand beträgt 12 Minuten (Abb. 4-18).

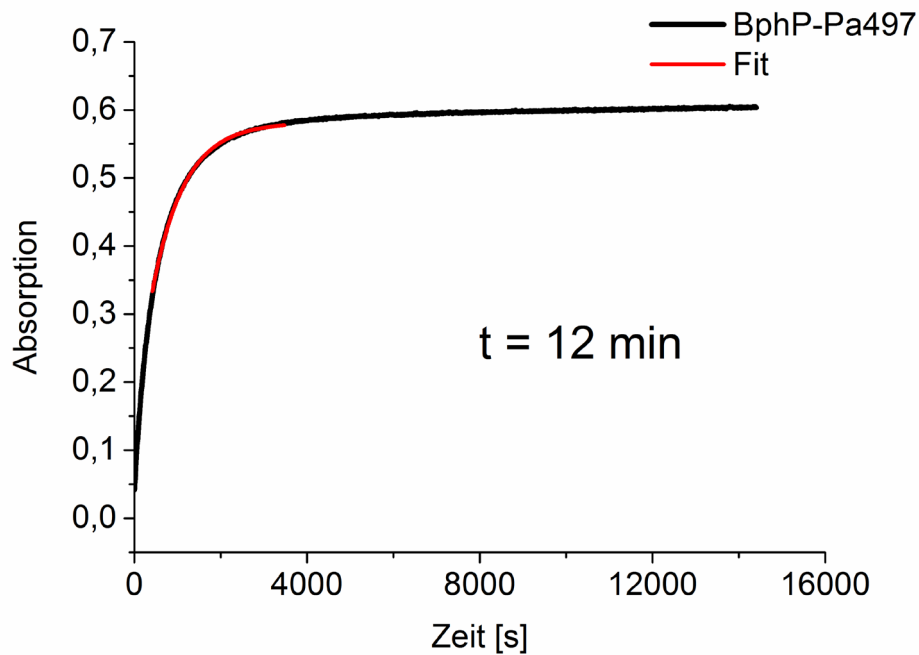


Abb. 4-18: Rückkehr-Kinetik von PaBphP-Pa497: $P_r \rightarrow P_{fr}$ ($\lambda_{\text{Abs}} = 750 \text{ nm}$) bei 20°C

Für das bathy Phytochrom PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* wurde ebenfalls die Methode der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse genutzt, um den Absorptionsverlauf und die Lebenszeiten der Intermediate zu erfassen.

Das bathy-Phytochrom wurde für die Konversion vom dunkelrot-absorbierenden Grundzustand in das rot-absorbierende Photoprodukt bei einer Wellenlänge von 760 nm angeregt. Die Beobachtungswellenlängen lagen im Abstand von 20 nm im Wellenlängenbereich von 620 nm bis 780 nm. Zusätzlich wurde der Absorptionsverlauf bei 650 nm, 710 nm und 750 nm vermessen. Die Rückbelichtung erfolgte nach jedem Laserpuls durch eine 30-sekündige Belichtung mittels einer LED (650 nm). Nachfolgend sind die LADS mit den dazugehörigen Lebenszeiten der Intermediate dargestellt.

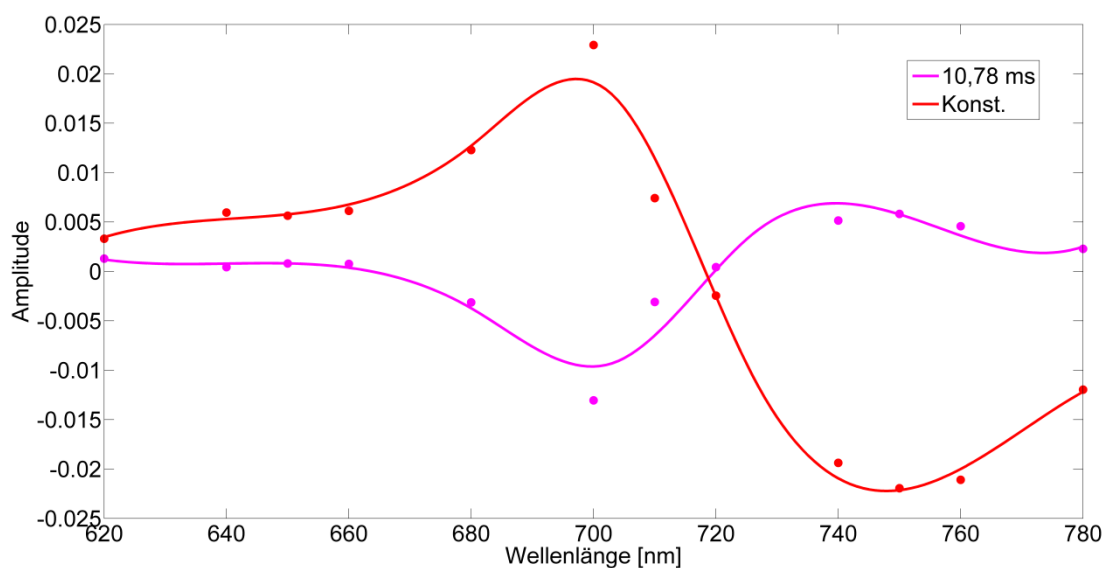


Abb. 4-19: LADS von PaBphP-Pa497: Anregung 760 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die Analyse der P_{fr} zu P_r Konversion mit Hilfe der Globalanalyse liefert nur ein Intermediat mit der Lebenszeit von 11 Millisekunden (Abb. 4-19). Es zeigt den zu erwartenden Abfall der Absorption des P_{fr} -Zustandes und den gleichzeitigen Anstieg im Bereich des P_r -Zustandes.

Die entgegengesetzte Konversion wurde durch einen Laserpuls bei 650 nm initiiert. Gemessen wurde zwischen 620 nm und 780 nm im Abstand von 20 nm sowie bei den ergänzenden Wellenlängen 650 nm, 710 nm und 750 nm. Rückbelichtet wurde mittels einer LED (760 m) für die Dauer von 30 Sekunden.

Der Globalfit liefert zwei Intermediate, deren LADS zusammen mit der Konstanten in Abb. 4-20 dargestellt sind. Für das erste Intermediat lassen sich ein Abfall der Absorption im Bereich von 730 nm und ein Anstieg um 680 nm feststellen. Das zweite Intermediat weist einen gegensätzlichen Verlauf mit einem Absorptionsanstieg bei 760 nm und einem Abfall um 680 nm auf. Das Spektrum der Konstanten deckt sich mit dem erwarteten Absorptionsverlauf beider Zustände bei der Konversion von P_r zu P_{fr} . Hier ist zu beachten, dass möglicherweise auf Grund der geringen Empfindlichkeit des Photomultipliers im langwelligen Spektralbereich die Messwerte bei 780 nm fehlerbehaftet sind.

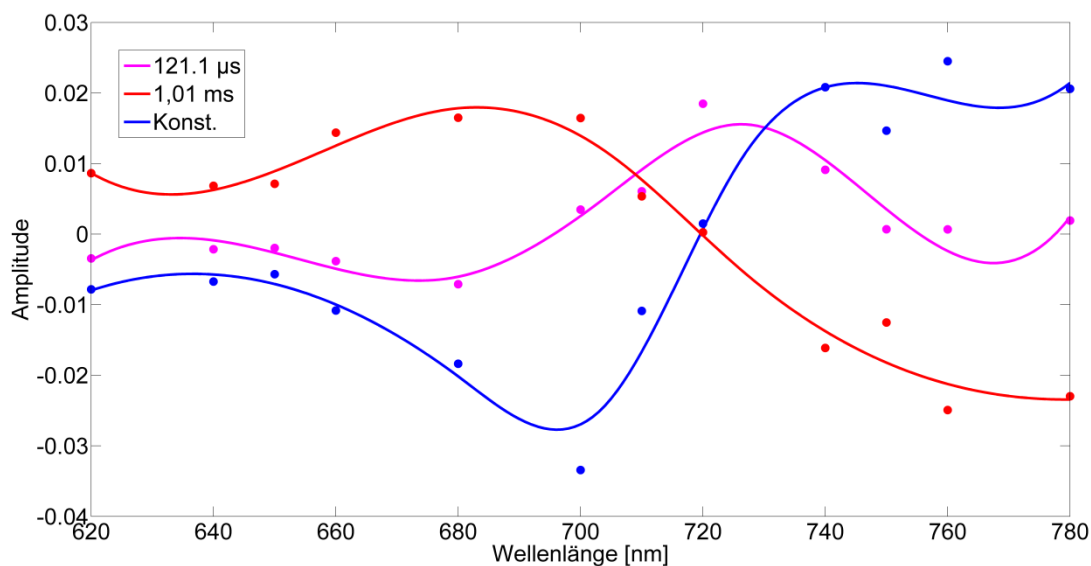


Abb. 4-20: LADS PaBphP-Pa497: Anregung 650 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Um vor allem das vom Absorptionsverlauf eher gegensätzlich verlaufende zweite Intermediat detaillierter erklären zu können und um auch die Intermediat-Konversion vom dunkelrot-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand zu verdeutlichen, sind im Folgenden die Differenzspektren zu ausgewählten Zeiten dargestellt (Abb. 4-21).

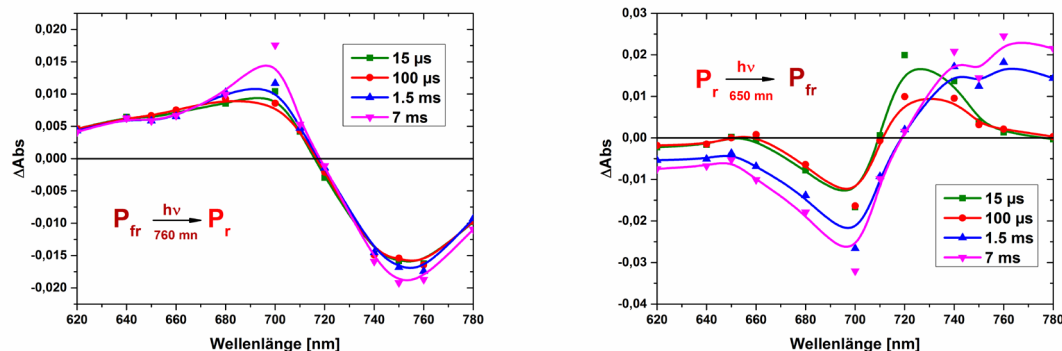


Abb. 4-21: Differenzspektren von PaBphP-497 zu ausgewählten Zeiten: links: $P_{fr} \rightarrow P_r$; rechts: $P_r \rightarrow P_{fr}$

Die Differenzspektren der P_{fr} zu P_r Konversion zeigen einen schnellen Anstieg im roten Bereich bei gleichzeitiger Absorptionsabnahme um 750 nm (Abb. 4-21, links). Über die vermessene Zeit prägen sich diese Differenzen etwas deutlicher aus, nehmen aber ansonsten monoton zu. Bei der entgegengesetzten Konversion sieht dies anders aus (Abb. 4-21, rechts). Nach 15 Mikrosekunden verschwindet Absorption bei 700 nm und es findet ein Absorptionsanstieg um 730 nm statt. Zum nächsten Zeitpunkt nach 100 Mikrosekunden findet keine Posi-

tionsänderung der Absorption bei 700 nm satt, jedoch sinkt die Absorption um 730 nm etwas. Nach 1,5 bzw. 7 Millisekunden findet man erneut einen Absorptionsabfall bei 700 nm, wobei sich zusätzlich eine Absorptionsverschiebung von 730 nm zu etwa 760 nm vollzieht. Die absolute Absorptionsdifferenz ist dabei an beiden Punkten beim letzten betrachteten Zeitpunkt am größten.

4.1.4 FphA-N753

Als letztes der hier untersuchten Biliverdin-bindenden Phytochrome wurde FphA-N753 aus *Aspergillus nidulans* spektral und kinetisch charakterisiert. Wie schon bei PaBphP wurde nur die photosensitive Domäne untersucht, welche in diesem Fall direkt vor der Histidinkinasedomäne mit der Aminosäure 753 endet, wobei der N-terminale Bereich intakt bleibt. Der Einfachheit halber wird die Bezeichnung FphA für dieses Fragment beibehalten.

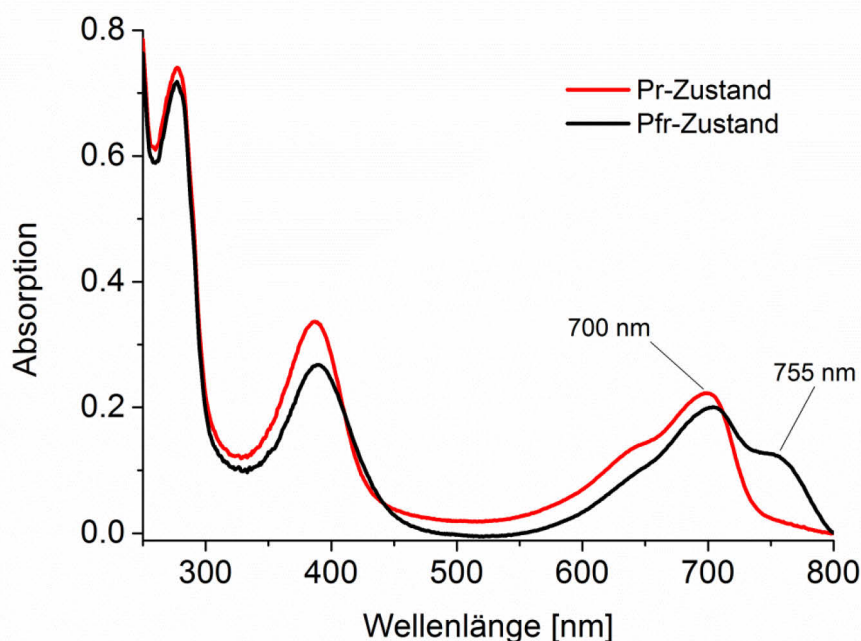


Abb. 4-22: Absorptionsspektren von FphA aus *Aspergillus nidulans*

Das Absorptionsspektrum zeigt einen rot-absorbierenden Zustand mit einem Maximum bei 700 nm sowie nach Belichtung einen Mischzustand von P_r und P_{fr} mit einem Maximum bei etwa 700 nm und einer Schulter bei 755 nm (Abb. 4-22). Dieser teilweise dargestellte P_{fr} -Zustand wurde durch eine Belichtung mit einer LED der Wellenlänge 650 nm erzeugt. Die Rückkehr in den Grundzustand gelingt einzig durch Belichtung mit 760 nm, da eine thermische Rückkehr unter Lichtausschluss nicht stattfand. Dabei ist die thermische Stabilität des P_{fr} -Zustandes von der N-terminalen Erweiterung abhängig, dergestalt, dass bei Vorhan-

densein des kompletten N-terminalen Bereichs die thermische Rückkonversion vollständig unterdrückt wird. (67).

FphA aus *Aspergillus nidulans* wurde mittels der Blitzlichtphotolyse für den Übergang vom stabilen rot-absorbierenden Grundzustand in das dunkelrot-absorbierende Photoprodukt bei 650 nm angeregt und über den Wellenlängenbereich von 620 nm bis 780 nm untersucht. Auch hier wurde der Absorptionsverlauf alle 20 nm bei jeweils drei Zeitfenstern (200 μ s, 2 ms, 20 ms) gemessen. Ergänzt wurden die Messungen durch den Absorptionsverlauf bei 750 nm. Nach jedem Laserpuls wurde die Probe für 30 Sekunden mit Hilfe einer LED der Wellenlänge 760 nm in den Grundzustand zurückbelichtet.

Die Globalanalyse dieser Konversion lieferte drei Intermediate mit den dazugehörigen LADS (Abb. 4-23).

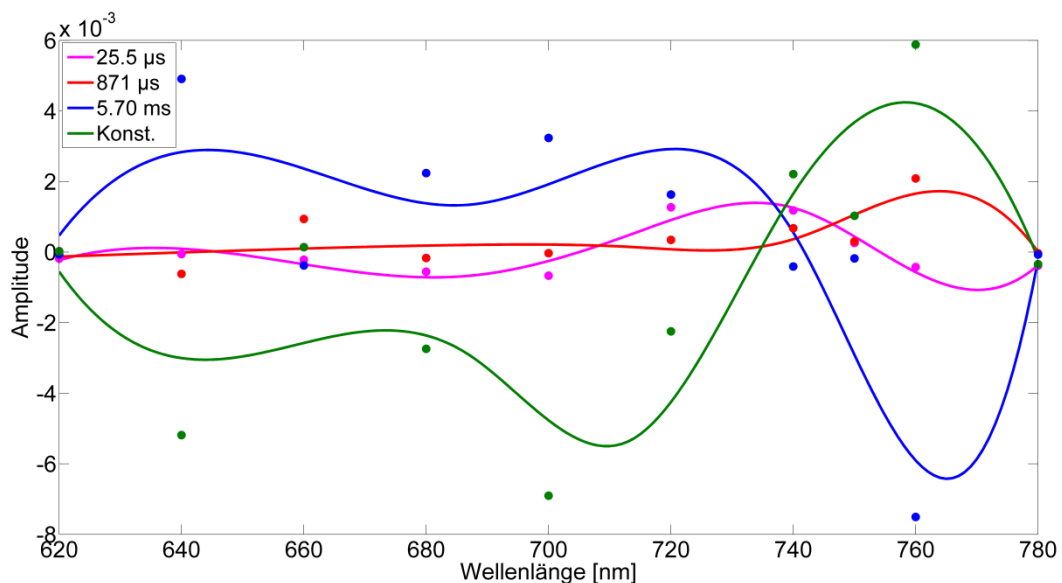


Abb. 4-23: LADS von FphA: Anregung 650 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Nach 25 Mikrosekunden zeigt sich eine leichte Zunahme der Absorption um 680 nm sowie bei 770 nm. Ein Absorptionsabfall ist bei etwa 730 nm auszumachen (Abb. 4-23). Insgesamt sind die gefundenen Absorptionsänderungen für diese Lebenszeit relativ klein. Das zweite Intermediat mit der Lebenszeit von 870 Mikrosekunden gibt lediglich Auskunft über einen Abfall der Absorption im Bereich von 760 nm. Ein starker Anstieg der Absorption in diesem Bereich lässt sich für das dritte Intermediat nach 5,7 Millisekunden ausmachen.

Gleichzeitig sieht man einen Abfall der Absorption zwischen 620 nm und 740 nm mit zwei Maxima bei 640 nm und 700 nm.

Für die Auswertung der Rückreaktionen vom P_{fr} - in den P_r -Zustand wurde das Protein bei 760 nm angeregt und von 620 nm bis 780 nm untersucht, wobei Messreihen im Abstand von 20 nm erfolgten, die durch eine Messreihe bei 750 nm ergänzt wurden. Die für die Erhaltung der Ausgangsabsorption nötige Rückbelichtung in den P_{fr} -Zustand wurde durch die Bestrahlung der Probe für 30 Sekunden mit einer LED der Wellenlänge von 650 nm sichergestellt.

Nach dem Abschluss der Globalanalyse konnten die LADS und die Intermediate der Konversion bestimmt werden (Abb. 4-24). Sie zeigen nur ein Intermediat mit einer Lebenszeit von einer Millisekunde, welches einen leichten Absorptionsabfall im dunkelroten sowie einen Anstieg der Absorption im roten Spektralbereich aufweist. Die letztendliche Umwandlung in den P_r -Zustand ist deutlich am Differenzspektrum der Konstanten zu erkennen.

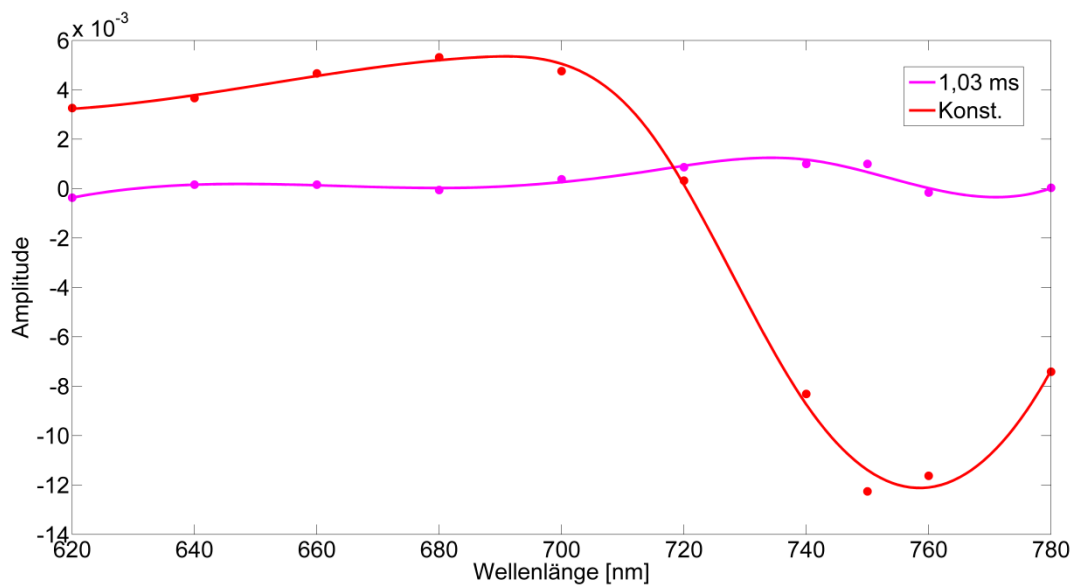


Abb. 4-24: LADS von FphA: Anregung 760 nm (Wellenlängen 620 – 780 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Betrachtet man die beiden Konversionen zugehörigen Differenzspektren, markieren die ersten drei gewählten Zeitpunkte bei der Umwandlung von P_r zu P_{fr} (Abb. 4-25, links) einen Absorptionsabfall bei 640 nm und 700 nm bei gleichzeitigem Anstieg um 740 nm. Nach 7 Millisekunden tritt ein deutlicher Abfall der Absorption in den zuvor genannten Bereichen auf, wobei eine zusätzliche Absorptionsverschiebung von 700 nm auf 760 nm stattfindet.

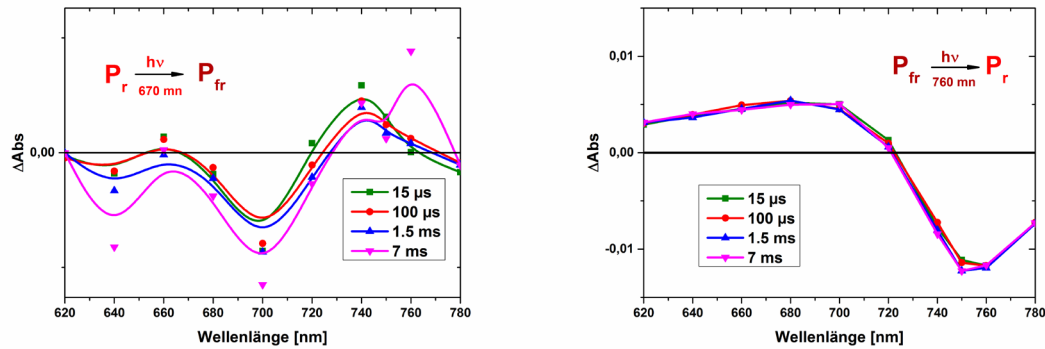


Abb. 4-25: Differenzspektren von FphA zu ausgewählten Zeiten: *links*: $P_r \rightarrow P_{fr}$; *rechts*: $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die Differenzspektren für die Konversion aus dem dunkelrot-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand zeigen nahezu identische Verläufe zu allen drei gewählten Zeitpunkten im Absorptionsverlauf (15 μ s, 100 μ s, 1,5 ms, 7 ms). Dabei ist bereits beim ersten gewählten Zeitfenster ein Absorptionsanstieg im Spektralbereich von 620 nm bis 720 nm sowie ein Abfall im Bereich um 750 nm zu erkennen, der sich über den gesamten beobachteten Zeitbereich nicht mehr ändert (Abb. 4-25, rechts).

4.2 GAF-Domänen aus CBCRs: all2699gaf1 und gaf3 und slr1393gaf3

Im nachfolgenden Abschnitt werden drei GAF-Domänen aus CBCRs untersucht. Wie im Abschnitt zuvor wird zunächst die stationäre Absorption dargestellt, die einen Aufschluss über den Grundzustand und das Photoprodukt liefert. Nach einer Betrachtung der Rückkehr-Kinetiken werden in diesem Abschnitt die Fluoreszenzemissionsspektren mit der jeweiligen Stokes-Verschiebung aufgeführt. Abschließend werden die Ergebnisse der Blitzlichtphotolysemessungen dargestellt.

4.2.1 2699gaf1

Das Cyanobacteriochrom All2699 aus *Nostoc* sp. PCC 7120 weist im N-terminalen Bereich drei GAF-Domänen auf, von denen zwei (GAF1 und GAF3) einen PCB-Chromophor binden können (77). Das Absorptionsspektrum von 2699gaf1 zeigt einen rot-absorbierenden stabilen Grundzustand (P_r), der (direkt nach der Aufreinigung aufgenommen) ein Absorptionsmaxi-

mum bei 636 nm besitzt. Durch Belichtung mit einer LED (585 nm) wird das Protein in ein P_{fr} -Photoprodukt überführt. Die Konversion ist allerdings nicht komplett, es entsteht lediglich ein Mischzustand aus P_r und P_{fr} (Abb. 4-26).

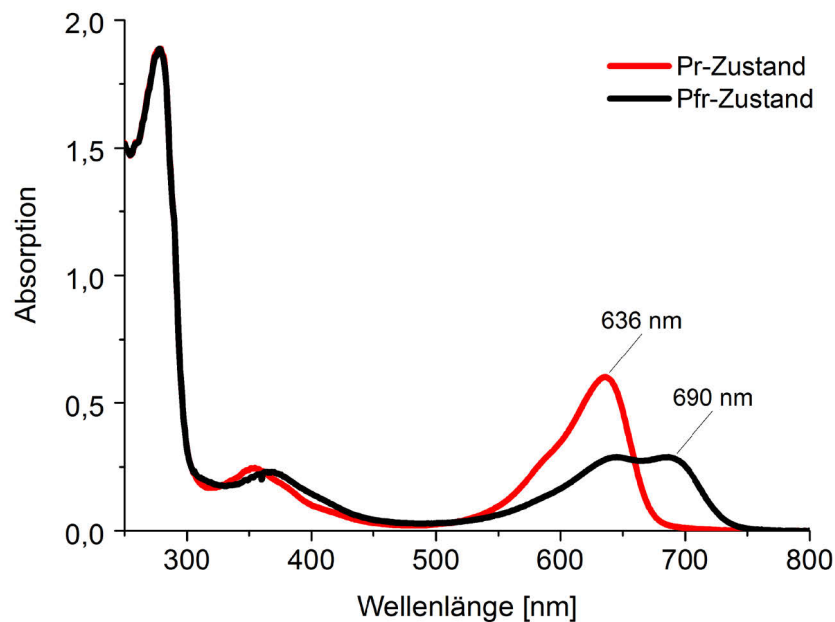


Abb. 4-26: Absorptionsspektren von 2699gafI aus *Nostoc* sp. PCC 7120

Die Rückkehr in den Grundzustand kann auf zwei Arten erfolgen. Zum einen durch Belichtung des Proteins mittels LED (720 nm), zum anderen konnte eine thermische Rückkehr in den Grundzustand detektiert werden. Dafür wurde das Protein in das Photoprodukt überführt und der Absorptionsverlauf während der Rückkehr in den Grundzustand bei 635 nm über einen Zeitraum von etwa 8 Stunden verfolgt (Abb. 4-27).

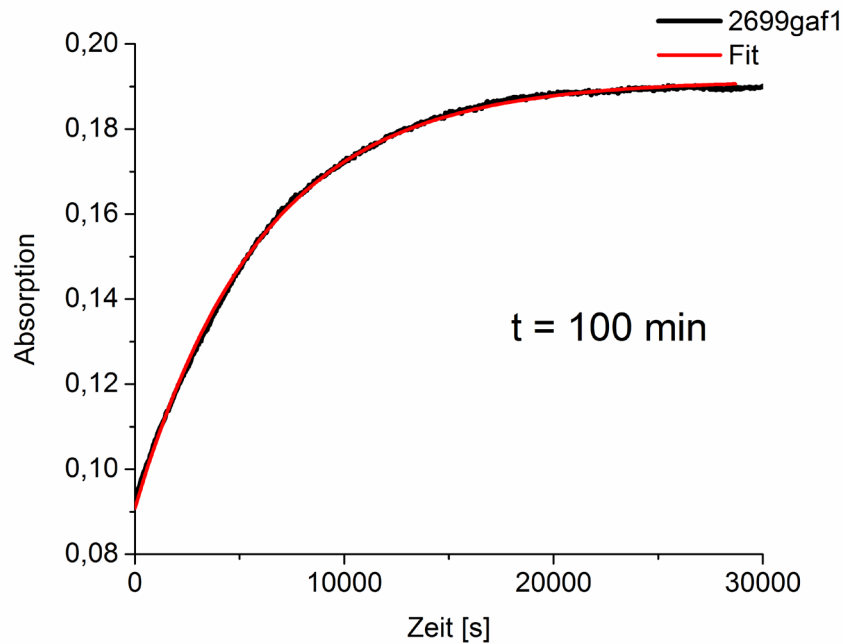


Abb. 4-27: Rückkehr-Kinetik von 2699gaf1: $P_{fr} \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 635$ nm) bei 20 °C

Zur Erfassung der Photokonversion vom rot- in den dunkelrot-absorbierenden Zustand des Proteins 2699gaf1 aus *Nostoc* mittels zeitaufgelöster Blitzlichtphotolyse wurde bei 630 nm in der Nähe des Maximums des P_r -Zustandes angeregt. Der Absorptionsverlauf über den Wellenlängenbereich von 530-730 nm wurde im Abstand von 10 nm in den drei Zeitfenstern vermessen. Zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses wurden mindestens 5 Messungen gemittelt. Um bei jeder Messung dieselbe Ausgangsabsorption zu gewährleisten, wurde die Probe nach jedem Laserpuls mit einer 585 nm LED über einen Zeitraum von 20 Sekunden in den P_r -Zustand zurückbelichtet.

Die LADS von 2699gaf1 deuten auf drei Intermediate hin (Abb. 4-28). Das erste Intermediat mit einer Lebenszeit von 3 Mikrosekunden zeigt, dass schon nach sehr kurzer Zeit ein großer Anteil des P_{fr} -Zustandes gebildet wurde. Das nächste Intermediat nach 45 Mikrosekunden zeigt einen leichten Abfall um den isosbestischen Punkt (660 nm) beider Photozustände. Das letztendliche Photoprodukt (mit der Lebenszeit von etwa 7 ms) weist einen erneuten größeren Absorptionsanstieg im Bereich um 690 nm auf. Die Konstante (dunkelgrün) verdeutlicht das Differenzspektrum am Ende der Messung an, das auch aus den steady-state Messungen erhalten wurden (siehe zum Vergleich Abb. 4-26).

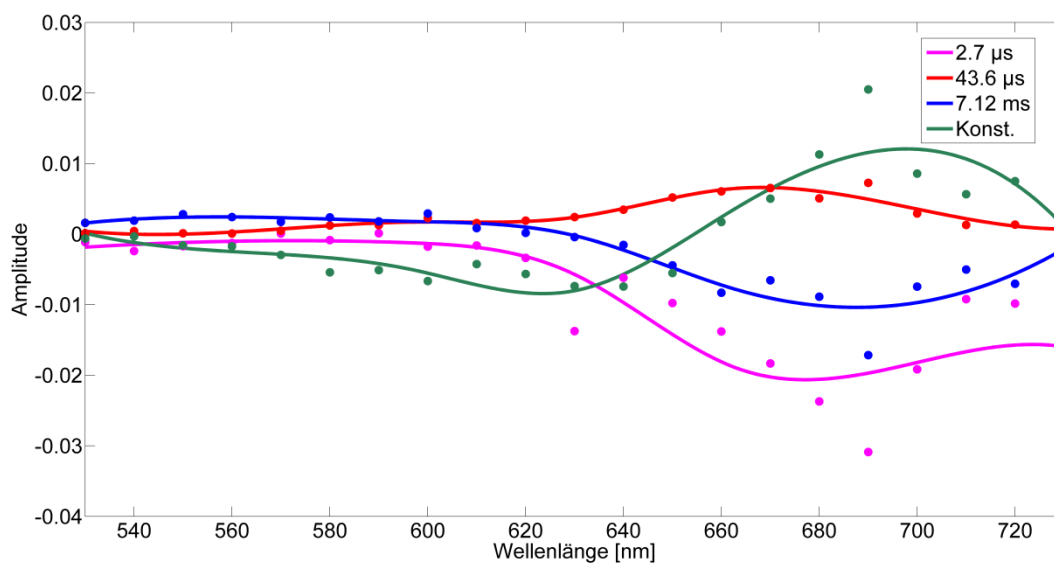


Abb. 4-28: LADS von 2699gafl: Anregung 630 nm (Wellenlängen 530 – 730 nm) $P_r \rightarrow P_{fr}$

Für die gegensätzliche Konversion vom Photoprodukt in den Grundzustand wurde die Probe mit 680 nm angeregt und im Wellenlängenbereich von 530-730 nm alle 10 nm vermessen. Die Rückbelichtung fand über einen Zeitraum von 10 Sekunden mit einer LED bei 720 nm statt.

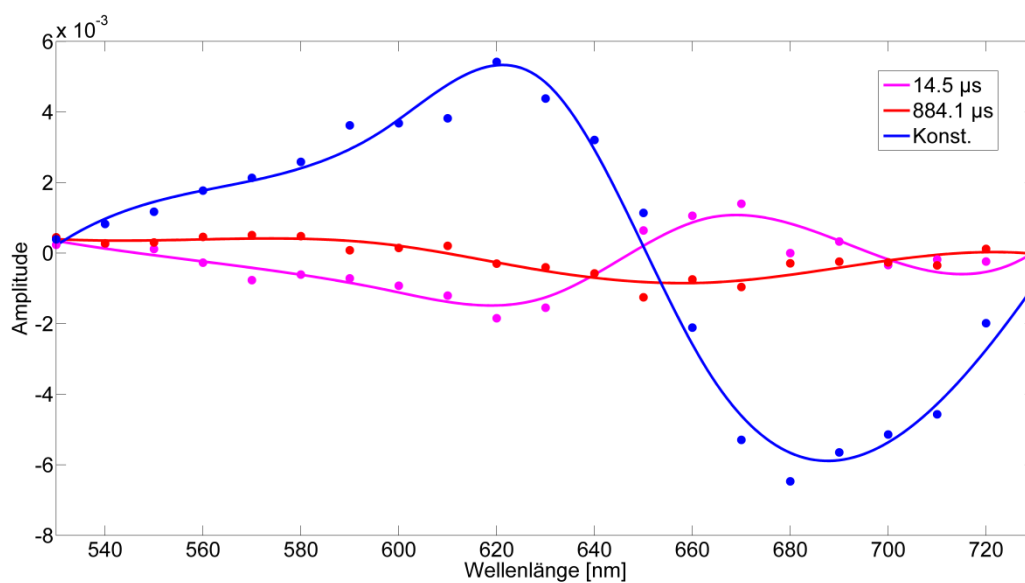


Abb. 4-29: LADS von 2699gafl: Anregung 680 nm (Wellenlängen 530 – 730 nm) $P_{fr} \rightarrow P_r$

Die Rückreaktion vom P_{fr} - in den P_r -Zustand zeigt bei den LADS des Globalfits nur zwei Intermediate. Die gesamte Absorptionsverschiebung in den P_r -Zustand tritt bereits nach einigen Mikrosekunden mit der Bildung des ersten Intermediats auf. Das zweite Intermediat nach etwa 1 ms zeigt nur einen leichten Anstieg der Absorption um den isosbestischen Punkt bei gleichzeitigem minimalem Absorptionsabfall um 580 nm. Auch hier gibt die Konstante am Ende der Messung das Differenzspektrum wieder (Abb. 4-29).

Als Ergänzung zu den LADS der Globalanalyse, die vor allem zur Berechnung der den einzelnen Intermediate zugehörigen Lebenszeiten mit dem jeweiligen Anteil der einzelnen Wellenlängen genutzt werden kann, wurden zu gegebenen Zeiten Differenzspektren erstellt. Diese zeigen die Absorptionsdifferenz über den gesamten vermessenen Wellenlängenbereich. Bei beiden Übergängen wurden vier Zeitpunkte gewählt, wobei diese sich in etwa an den Zeiten der Intermediate der LADS orientierten.

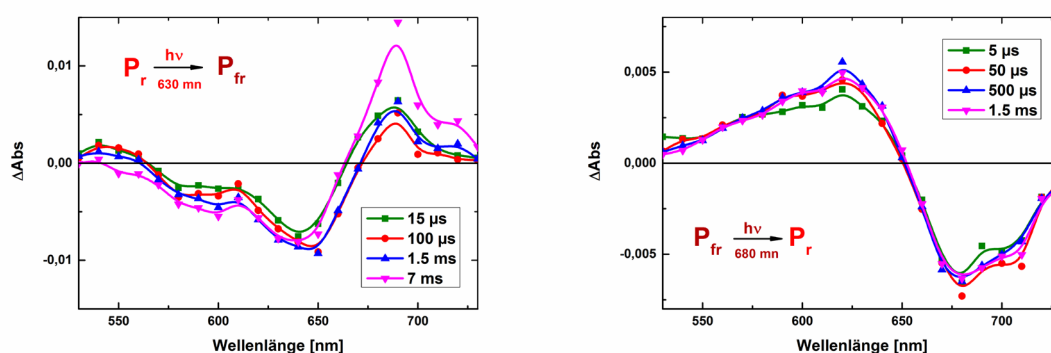


Abb. 4-30: Differenzspektren von 2699ga1 zu ausgewählten Zeiten: *links*: $P_r \rightarrow P_{fr}$; *rechts*: $P_{fr} \rightarrow P_r$; auch hier sei nochmals darauf hingewiesen, dass die Spektrenform sich als ‚cubic-spline‘ der gemessenen Datenpunkte ergibt, also nicht echt gefittete Spektren darstellt.

Die Differenzspektren des Übergangs von P_r zu P_{fr} (Abb. 4-30, links) zeigen den Anstieg der Absorption um 680 nm sowie den Abfall um 640 nm, was die beginnende Konversion darstellt. Nach 100 Mikrosekunden sinkt die Absorption im dunkelroten Bereich mit einer gleichzeitigen geringen Erhöhung der Absorption bei 640 nm. Der dritte Zeitpunkt bei 1,5 ms zeigt eine Fortsetzung der Photokonversion in den dunkelrot-absorbierenden Zustand, die nach 7 ms ihr Maximum erreicht und das letztendliche Differenzspektrum des Photoproduktes darstellt. Allerdings sind alle nachfolgenden Änderungen nur „Korrekturen“ der ersten, prinzipiellen Umwandlungsreaktion.

Die umgekehrte Reaktion vom dunkelrot-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand deutet ebenfalls auf eine schnelle Photokonversion hin (Abb. 4-30, rechts). Nach 5 Mikrosekunden ist der größte Anteil der Konversion bereits vollzogen. Die Absorption bei 640 nm steigt an, wobei sie gleichzeitig bei 680 nm sinkt. Die nächsten drei Zeitpunkte zeigen jeweils nur eine minimale Änderung der Absorption im roten sowie im dunkelroten Spektralbereich.

4.2.2 2699gaf3

Die GAF3-Domäne aus All2699 zeigt einen Rot/Orange-Photozyklus. Das Maximum des stabilen Rotzustands liegt bei $\lambda_{\text{max}} = 645 \text{ nm}$ (Abb. 4-31). Das Absorptionsspektrum des orange-absorbierenden Photoprodukts ($\lambda_{\text{max}} = 585 \text{ nm}$) kann aufgrund einer sehr schnellen Rückkehr-Kinetik von 38 Sekunden nur bei Dauerbelichtung mit einer roten LED (670 nm) erhalten werden. Abb. 4-32 zeigt die schnelle Rückkehr-Kinetik, beobachtet bei 645 nm über einen Zeitraum von 6 Minuten. Entgegen der photochemischen Konversion von 2699gaf1 können für dieses Protein beide Zustände vollständig erzeugt werden.

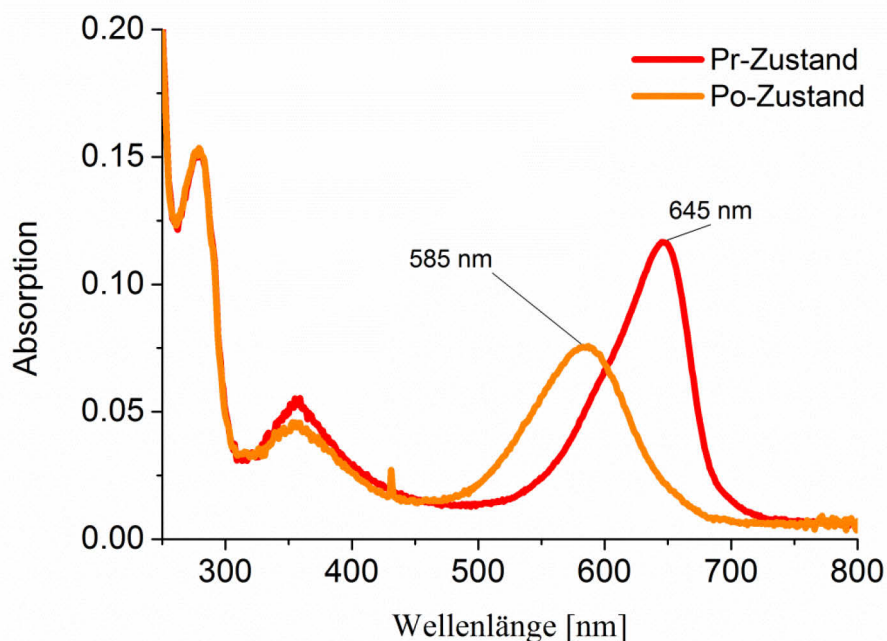


Abb. 4-31: Absorptionsspektren von 2699gaf3 aus *Nostoc* sp. PCC 7120

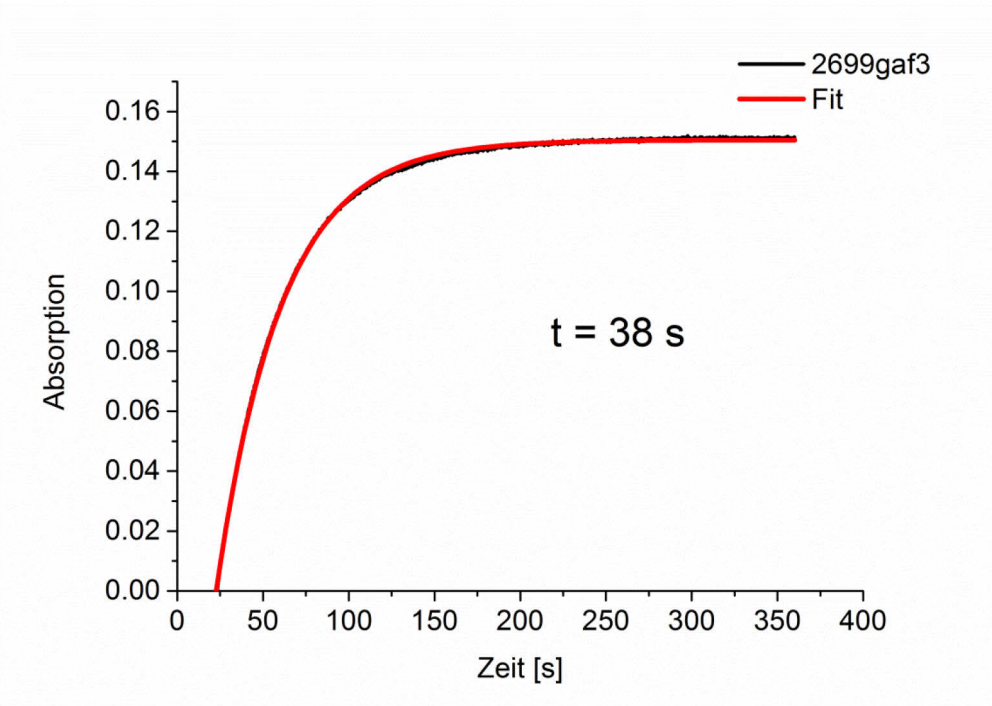


Abb. 4-32: Rückkehr-Kinetik von 2699gaf3: $P_o \rightarrow P_r$ ($\lambda_{\text{Abs}} = 645 \text{ nm}$) bei 20°C

Man kann vermuten, dass dieses Protein in die Klasse der rot/grün-absorbierenden CBCR gehört, wobei das orange-absorbierende Photoprodukt mit seiner deutlich geringeren Absorptionsverschiebung und sehr kurzen Lebenszeit möglicherweise ein gehindertes Intermediat eines rot/grün-schaltenden CBCRs darstellt. Um diese Überlegungen zu untersuchen, wurden Punktmutationen in die Aminosäuresequenz des Proteins eingeführt (Abb. 4-33). Hierzu wurde mit Serin 487 eine Position ausgewählt, die im direkten Umfeld des Chromophors liegt und einen Einfluss auf ihn ausüben könnte. Serin wurde zum einen in das deutlich größere, positiv geladene Arginin mutiert, zum anderen wurde in diese Position ein Glycin (als kleinste mögliche Aminosäure) eingeführt.

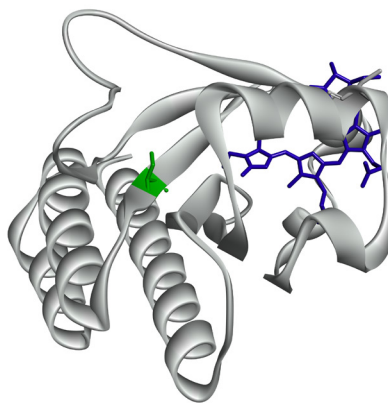


Abb. 4-33: Modellstruktur von 2699gaf3 (Template: AnPixJG2). Die AS S487 ist grün markiert der PCB Chromophor ist in blau dargestellt.

Das Absorptionsspektrum der S487R Mutante zeigt außer einer leichten Verschiebung beider Zustände (P_r : 2 nm; P_o : 4 nm) auf den ersten Blick keinen Unterschied zum Wildtyp (Abb. 4-34). Bei der weiteren Untersuchung ergab sich jedoch, dass keine Dauerbelichtung des Grundzustandes mehr notwendig ist, um das Photoprodukt für die Dauer der Messung aufrecht zu erhalten. Das ist ein erstes Indiz auf eine verlängerte Rückkehr, die durch die Messung der Kinetik bestätigt werden konnte. Die S487R Mutante zeigt mit ungefähr 20 Minuten eine im Vergleich zum WT deutlich verlängerte Rückkehrzeit (Abb. 4-35).

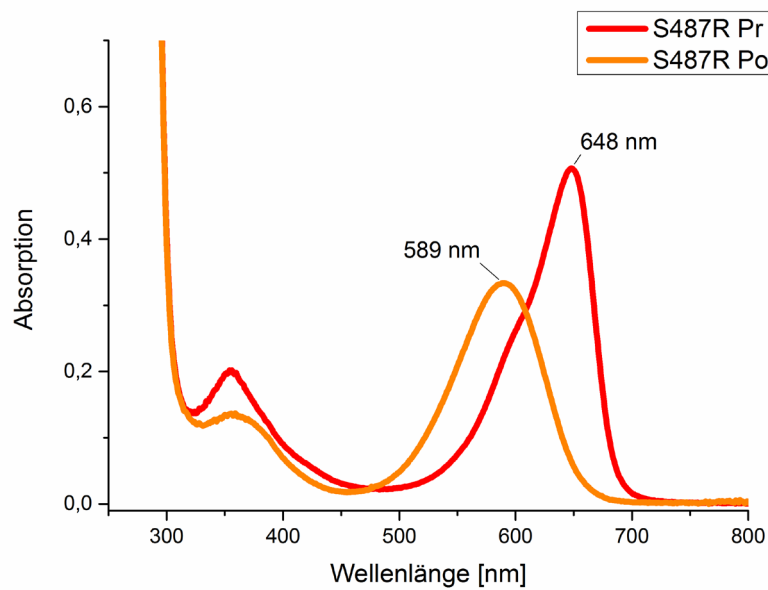


Abb. 4-34: Absorptionsspektren von 2699gaf3 S487R

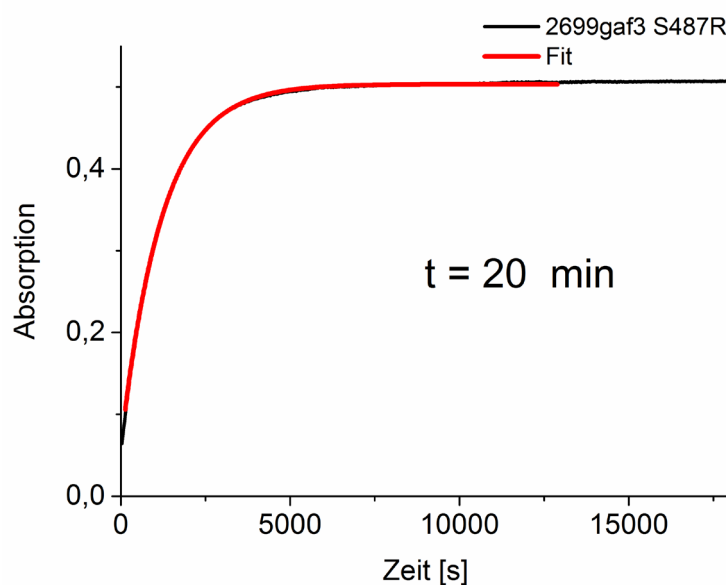


Abb. 4-35: Rückkehr-Kinetik 2699gaf3 S487R: $P_o \rightarrow P_r$ ($\lambda_{\text{Abs}} = 648 \text{ nm}$) bei 20 °C

Die zweite Mutante, bei der das Serin an Position 487 gegen das kleinere Glycin getauscht wurde, zeigt einen ähnlichen Einfluss auf die Photochemie, auch hier ist ein stabilisierender Einfluss deutlich, so dass das Photoprodukt ohne Belichtung vermessen werden kann.

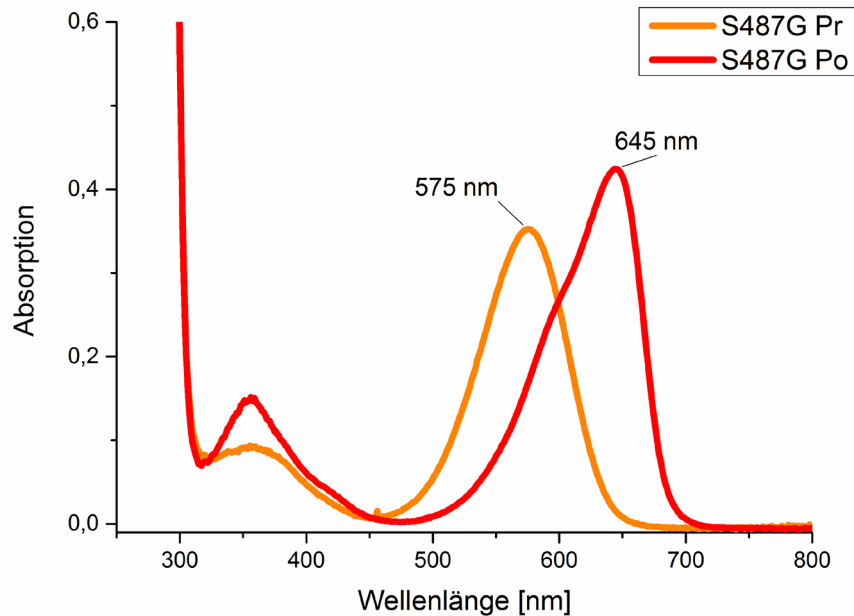


Abb. 4-36: Absorptionsspektren von 2699gaf3 S487G

Das Maximum des P_r -Zustandes ist identisch mit dem des WT-Proteins. Das Photoprodukt der Glycin-Mutante zeigt allerdings mit $\lambda_{\max} = 575 \text{ nm}$ eine Blauverschiebung um 10 nm, die damit deutlich größer als die der Arginin-Mutante ist (Abb. 4-36). Darüber hinaus wirkt sich die Mutation noch stärker auf die Rückkehr-Kinetik aus, die im Vergleich zur ersten Mutante noch einmal etwas länger ist (31 min) (Abb. 4-37).

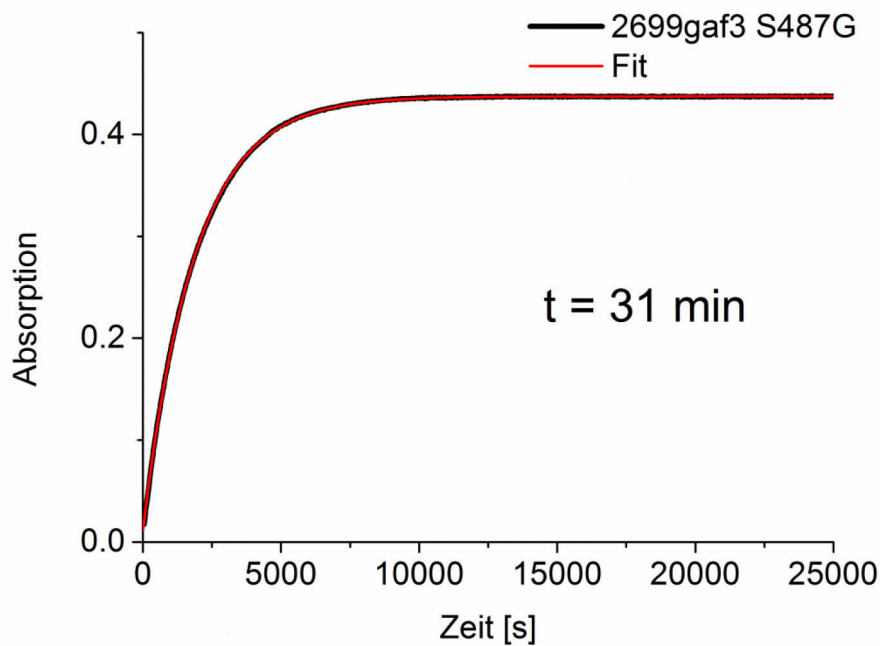


Abb. 4-37: Rückkehr-Kinetik von 2699gaf3 S487G: $P_o \rightarrow P_r$ ($\lambda_{Abs} = 645$ nm) bei 20 °C

Da CBCR-GAF-Domänen im Gegensatz zu den kanonischen Phytochromen eine z.T. bemerkenswerte Fluoreszenz zeigen, wurden für die hier bearbeiteten CBCR-GAF-Domänen die Fluoreszenzspektren aufgenommen und charakterisiert. Als Charakterisierungskriterium wurde die Stokes-Verschiebung genutzt. Dabei handelt es sich um die Differenz im Spektrum (bestimmt auf einer Energieskala, z.B. in Wellenzahlen), die zwischen den Maxima der Absorption und der Fluoreszenzemission auftritt. Diese ist von der Interaktion des Chromophors mit seiner direkten Proteinumgebung abhängig. Gezeigt wird die Stokes-Verschiebung für den P_r - sowie den P_o -Zustand.

Betrachtet man die drei Spektren für den P_r -Zustand, stellt man eine Verringerung der Stokes-Verschiebung vom WT (463 cm^{-1}) zu den beiden Mutanten fest (S487R: 385 cm^{-1} ; S487G: 96 cm^{-1}). Dabei ist der Effekt bei der zu Mutante S487G am größten (Abb. 4-38).

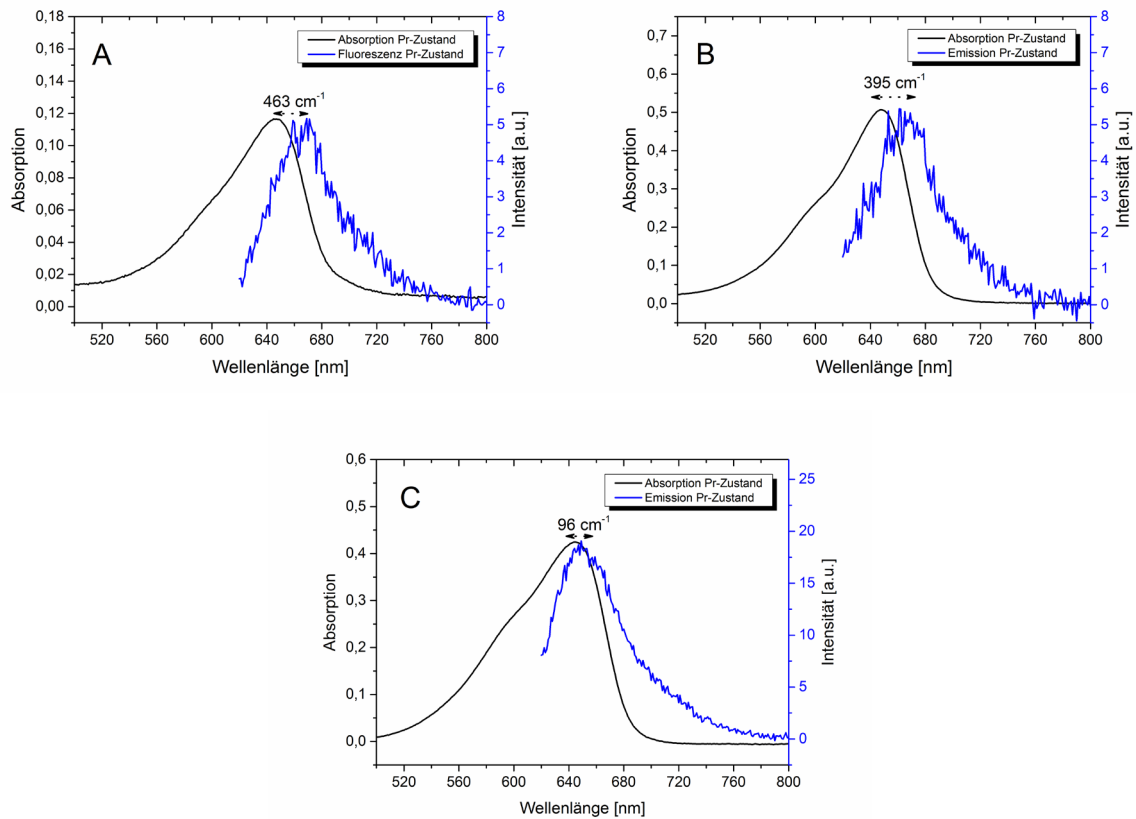


Abb. 4-38: Stokes-Verschiebung des P_r-Zustandes von 2699gaf3: A: WT, B: S487R, C: S487G. Die Verschiebung wird in Wellenzahlen angegeben.

Die Spektren des P_o-Zustandes zeigen allgemein eine größere Stokes-Verschiebung als die des Dunkelzustands. Die Mutanten bewirken allerdings einen unterschiedlichen Einfluss auf die Stokes-Verschiebung (Abb. 4-39). Die S487R Mutante zeigt mit 1373 cm⁻¹ eine etwas kleinere Verschiebung als der WT (1390 cm⁻¹), wohingegen die S487G Mutante eine größere Stokes-Verschiebung aufweist (S487G: 1717 cm⁻¹).

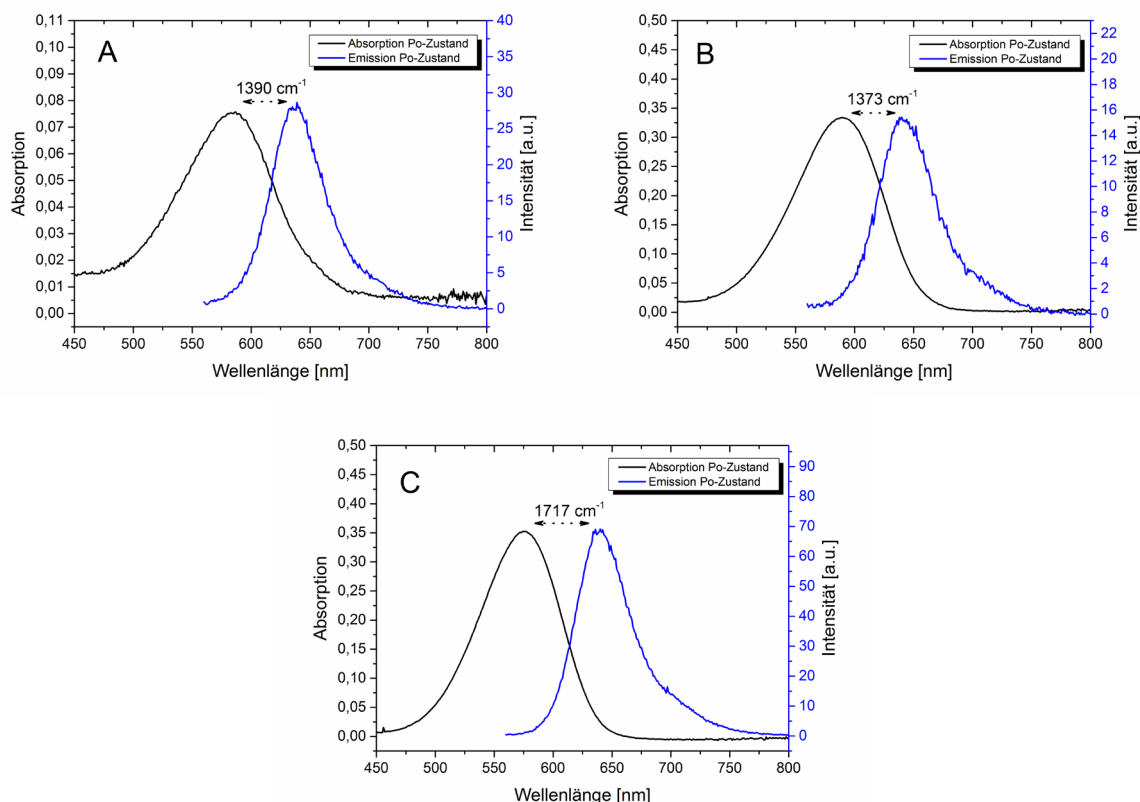


Abb. 4-39: Stokes-Verschiebung des P_0 -Zustandes von 2699gaf3: A: WT, B: S487R, C: S487G. Die Verschiebung wird in Wellenzahlen angegeben.

Zur Erfassung der Absorptionsänderungen und der Lebenszeiten der Intermediate mittels der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse wurde für die Konversion in das orange-absorbierende Photoprodukt die Probe mit dem Laser bei einer Wellenlänge von 645 nm angeregt. Die Beobachtungswellenlängen lagen im Abstand von 10 nm im Spektralbereich zwischen 510 nm und 670 nm. Für die fünf Sekunden dauernde Rückbelichtung wurde eine LED mit 585 nm verwendet.

Die errechneten LADS zeigen zwei mögliche Intermediate (Abb. 4-40). Das Erste bildet sich nach 100 Mikrosekunden und zeigt praktisch keine Absorptionsänderungen über den gesamten Absorptionsbereich. Die letztendliche Bildung des Photoproduktes findet nach etwa 2 ms statt und zeigt sich in einem starken Abfall um 640 nm und einen deutlichen Anstieg bei 560 nm. Dieses Intermediatspektrum entspricht dem am Ende des Experiments erhaltenen Differenzspektrum.

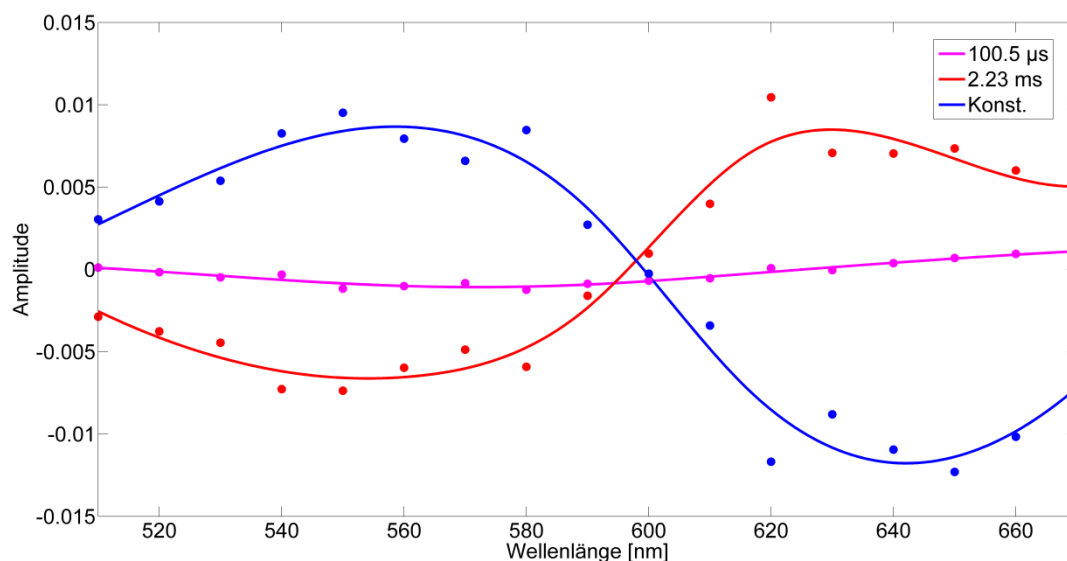


Abb. 4-40: LADS von 2699gaf3: Anregung 645 nm (Wellenlängen 510 – 670 nm) $P_r \rightarrow P_o$

Für Konversion aus dem kurzlebigen orange-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand wurde das Protein mit einem Laserpuls bei 560 nm angeregt und über den Wellenlängenbereich von 530 nm bis 730 nm im Abstand von 10 nm vermessen. Zur Rückbelichtung diente eine LED mit 650 nm, die für eine Dauer von 10 Sekunden genutzt wurde. Da das Photoprodukt nur eine kurze Lebenszeit aufweist, wurde seine Darstellung durch Belichtung mit einer 650 nm LED bis kurz vor dem Laserblitz aufrechterhalten. Aufgrund von Artefakten des Lasers wurden die ersten zehn Mikrosekunden der Messung in der Globalanalyse nicht betrachtet.

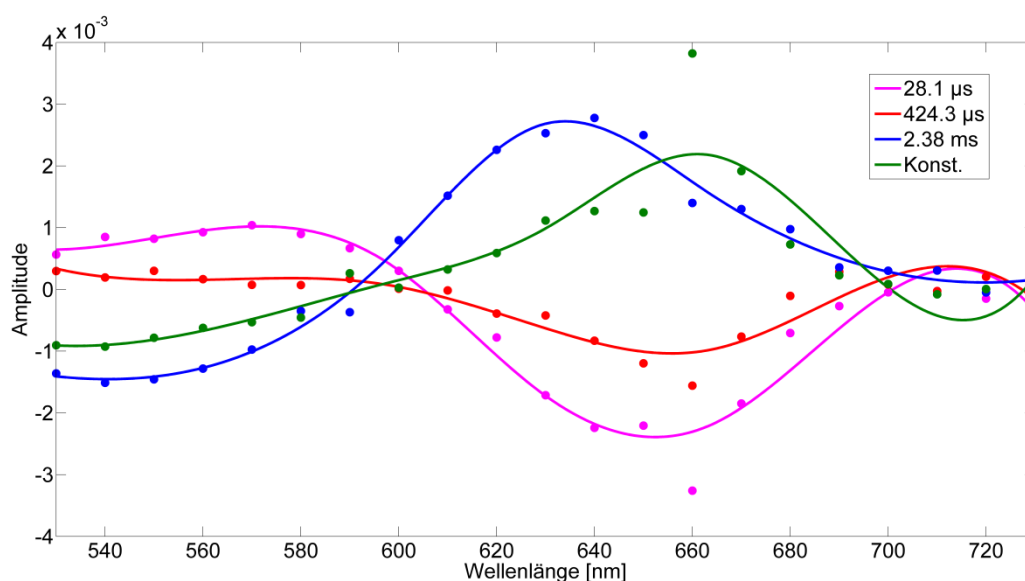


Abb. 4-41: LADS von 2699gaf3: Anregung 560 nm (Wellenlängen 530 – 730 nm) $P_o \rightarrow P_r$

Die LADS aus der Globalanalyse zeigen für die Photokonversion drei Intermediate (Abb. 4-41). Die ersten beiden Intermediate nach 30 bzw. 400 Mikrosekunden zeigen einen ähnlichen Verlauf der LADS-Kurven. Die Absorption fällt im Bereich des Photoproduktes um 560 nm leicht ab und steigt bei 650 nm an. Die Höhe der Amplituden ist dabei für das erste Intermediat größer als für das zweite. Das letzte Intermediat mit 2,38 Millisekunden zeigt einen deutlich anderen Verlauf auf. Die Absorption sinkt bei 560 nm und im Bereich um 630 nm. Die Konstante zeigt die letztlich stattgefundene Photokonversion vom orange-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand. Auch bei 2699gaf3 werden die LADS durch die nachfolgend gezeigten Differenzspektren ergänzt.

Die Differenzspektren zeigen bei der $P_r \rightarrow P_o$ Konversion für die ersten drei gewählten Zeitpunkte des Absorptionsverlaufes einen stetigen Abfall der Absorption des Grundzustandes ($P_r = 650$ nm) sowie den Anstieg der Absorption des Photoproduktes ($P_o = 560$ nm) (Abb. 4-42, links). Den größten Anstieg bzw. Abfall der Absorption wird nach 5 Millisekunden deutlich. Hier sind möglicherweise bei der längsten Zeit (5 ms) bei den Messpunkten 560 nm und bei 660 nm Artefakte aufgetreten.

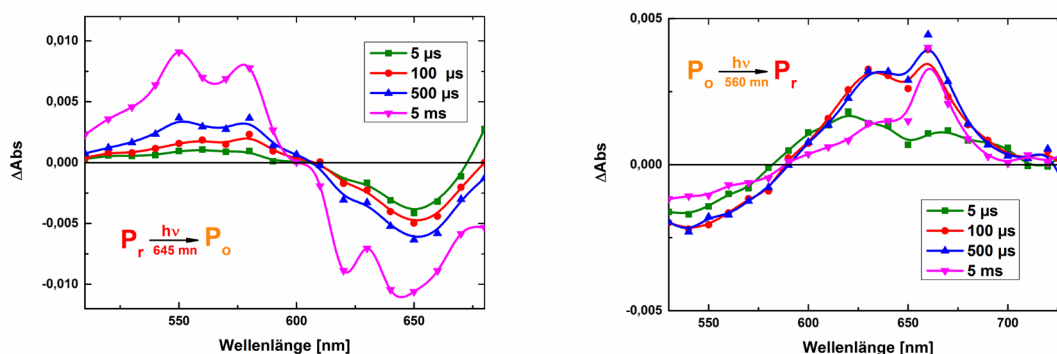


Abb. 4-42: Differenzspektren von 2699gaf3 zu ausgewählten Zeiten: links: $P_r \rightarrow P_o$; rechts: $P_o \rightarrow P_r$

Die gegenläufige Photokonversion zeigt aus den Absorptionsdifferenzen (Abb. 4-42, rechts) mehr Details als aus den LADS zu entnehmen sind. Der erste Zeitpunkt bei 5 Mikrosekunden zeigt einen Abfall um 560 nm sowie einen Anstieg bei 650 nm. Die nächsten beiden Zeitpunkte nach 100 bzw. 500 Mikrosekunden weisen einen deutlich erhöhten Anstieg bzw. Abfall bei beiden zuvor erwähnten Wellenlängen, vor allem im Bereich um 650 nm auf. Gleichzeitig bildet sich eine Schulter bei 625 nm. Nach 5 Millisekunden ist eine gegenläufige

Änderung der Absorption zu erkennen. Die Absorption steigt im orangenen Bereich wieder deutlich an, wohingegen sie im roten Bereich leicht absinkt.

Wie zuvor beschrieben, wurden für dieses Protein Mutanten erstellt, um das außergewöhnlich kurzlebige, orange-absorbierende Photoprodukt mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse genauer zu untersuchen. Die zeitaufgelösten Messungen sollten auch eine Erklärung für die unter steady-state Bedingungen gemessene deutlich verlängerte Rückkehrzeit liefern. Um einen genaueren Vergleich zum WT zu ermöglichen, wurden dieselben Parameter gewählt wie bei den Messungen des WT. Einzig der Wellenlängenbereich der Detektion ist leicht verändert.

Die S487G Mutante von 2699gaf3 wurde für die Konversion vom P_r - zum P_o -Zustand im Abstand von 20 nm über den Wellenlängenbereich von 520 nm bis 680 nm vermessen. Ergänzt wurden sie durch die Beobachtungswellenlänge bei 590 nm und 650 nm.

Die LADS der S487G Mutante zeigen zwei Intermediate, wobei das erste Intermediat eher als ein Artefakt des Lasers betrachtet werden sollte, s.u. Diskussion (Abb. 4-43). Damit verbleibt nur ein Intermediat mit einer Lebenszeit von 500 μ s, das die Umwandlung vom P_r in den P_{fr} -Zustand darstellt. Es deckt sich bezüglich der Höhe der Amplituden mit denen der Konstanten.

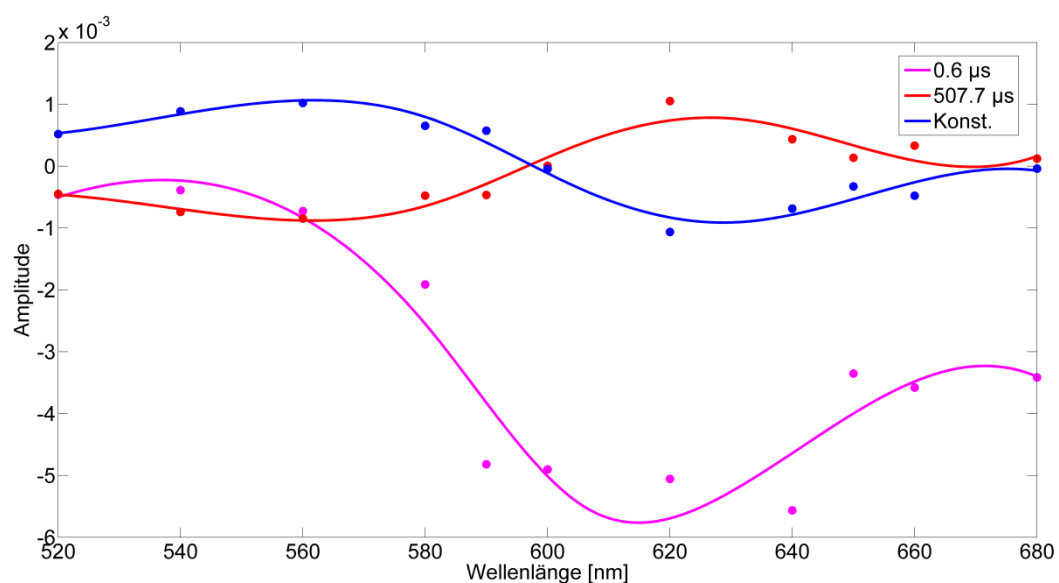


Abb. 4-43: LADS von 2699gaf3 S487G: Anregung 645 nm (Wellenlängen 520 – 680 nm) $P_r \rightarrow P_o$

Die Rückreaktion von P_o zu P_r dieser Mutante zeigt auf den ersten Blick drei Intermediate, wobei auch hier das erste Intermediat vermutlich wieder auf ein Artefakt des Lasers hindeutet. Das Intermediat mit einer Lebenszeit von 32 Mikrosekunden weist einen sehr kleinen Abfall der Absorption im orangenen Bereich sowie einen Anstieg um 650 nm auf. Dieser Anstieg ist auch beim letzten Intermediat (1 ms) zu erkennen, welches jedoch keinen Abfall der Absorption des Photoprodukt zeigt (Abb. 4-44).

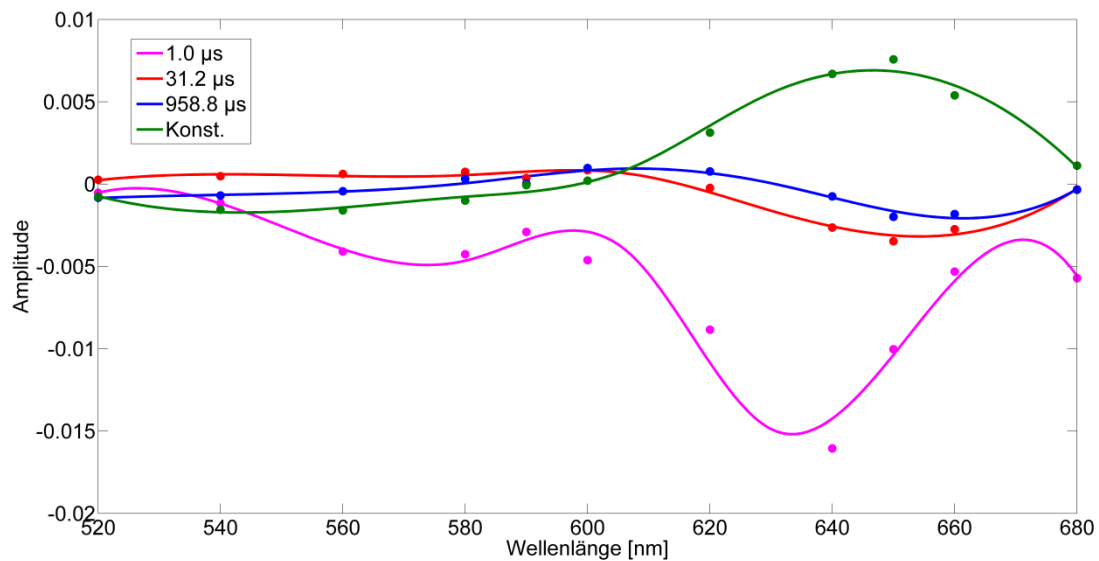


Abb. 4-44: LADS von 2699gaf3 S487G: Anregung 560 nm (Wellenlängen 520 – 680 nm) $P_o \rightarrow P_r$

Die zweite Mutante von 2699gaf3 (S487R) zeigte kein eindeutiges und auswertbares LADS. Daher wurden für die Analyse der Mutante S487R bei ausgewählten Wellenlängen Einzelfits erstellt und mit den jeweiligen analogen Messungen des WT verglichen. Die Parameter der Messung wurden identisch zu denen des Wildtyps gewählt, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in den beiden nachfolgenden Tabellen aufgeführt. In der ersten Spalte ist jeweils die Anregungswellenlänge mit der entsprechenden Beobachtungswellenlänge aufgeführt. Die nachfolgenden Spalten beinhalten die verschiedenen Lebenszeiten der Intermediate für die Mutante sowie in Klammern die des Wildtyps. Dargestellte Spiegelstriche kennzeichnen das jeweilige Intermediat, dass nur bei der Messung des WT bzw. der Mutante zu identifizieren war.

Die Tabelle der Intermediat-Kinetiken für die Photokonversion vom rot- in den orange-absorbierenden Zustand zeigt sehr vergleichbare Intermediate für die Mutante S487R und den WT. Einzig das zweite Intermediat weist eine erhöhte Lebenszeit auf, die bei der Bildung des P_o-Zustandes bei einer Beobachtungswellenlänge von 580 festzustellen ist (Tab. 4-1).

Tab. 4-1 Lebenszeiten der Intermediate der Mutante S487R von 2699gaf3 beim Übergang vom P_r- in den P_o-Zustand, durch Einzelwellenlängenfits. In Klammern zum Vergleich die Lebenszeiten des WT aus Einzelwellenlängen Fits.

Wellenlängen / Zeit	τ_1 [μ s]	τ_2 [μ s]	τ_3 [ms]
645/540	9 (23)	- (-)	0,26 (1,7)
645/580	11 (10)	- (65)	0,31 (1,7)
645/640	0,5 (0,3)	11 (58)	1,9 (1,8)
645/650	0,9 (0,3)	- (58)	1,6 (1,8)

Bei der Photokonversion vom orange- in den rot-absorbierenden Zustand sind schon eher Unterschiede in Bezug auf die Lebenszeiten der Intermediate auszumachen (Tab. 4-2). Das zweite Intermediat der Mutante zeigt im Vergleich zum WT eine ungefähr dreimal so lange Lebenszeit. Beim dritten Intermediat wird bei einigen Wellenlängen beobachtet, dass die Lebenszeit etwa doppelt so lang ist wie beim WT-Protein. Dabei bleibt im Vergleich zu den LADS zu beachten, dass das letzte Intermediat bei der Messung des WT nicht die Bildung des P_r-Zustandes, sondern seinen Zerfall zeigt.

Tab. 4-2: Lebenszeiten der Intermediate der Mutante S487R von 2699gaf3 beim Übergang vom P_o- in den P_r-Zustand. In Klammern als Vergleich die Lebenszeiten des WT aus Einzelwellenlängen Fits

Wellenlängen / Zeit	τ_1 [μ s]	τ_2 [μ s]	τ_3 [ms]
560/540	0,2 (0,2)	277 (44)	2,3 (2,7)
560/580	0,4 (0,4)	154 (49)	3,3 (1,5)
560/620	0,6 (0,8)	190 (60)	3,5 (2,9)
560/680	0,8 (1,0)	60 (27)	5,1 (3,4)

4.2.3 1393gaf3

Im Fall der GAF3-Domäne des Proteins Slr1393 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnte durch die Absorptionsspektren des Proteins ein Rot/Grün-Photozyklus identifiziert werden (Abb. 4-45). Im Unterschied zu den beiden zuvor beschriebenen GAF-Domänen wurden beim Vergleich von *in vivo* zu *in vitro* assembliertem Chromophor Abweichungen festgestellt. Die beiden Anfangszustände zeigten nahezu deckungsgleiche Absorptionsmaxima (648 nm), wohingegen das Photoprodukt der *in vitro* Variante deutlich weniger zu kleineren Wellenlängen verschoben ist (591 nm).

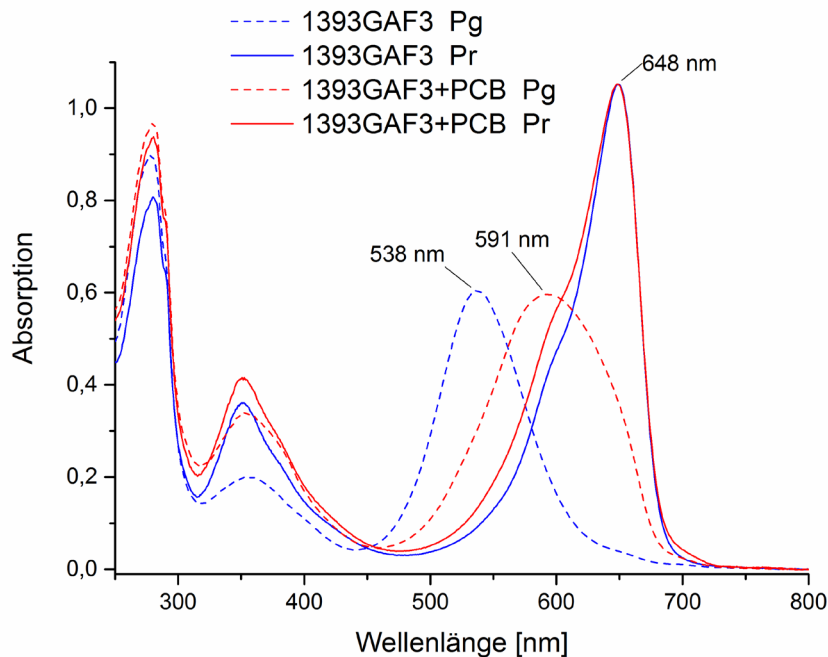


Abb. 4-45: Absorptionsspektren von 1393gaf3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, *in vivo* (blau) und *in vitro* (+PCB) Assemblierung (rot)

Der Stabilitätstest für das *in vivo* assemblierte Protein zeigt für den P_g-Zustand eine sehr langsame Rückkehr in den P_r-Zustand (Abb. 4-46).

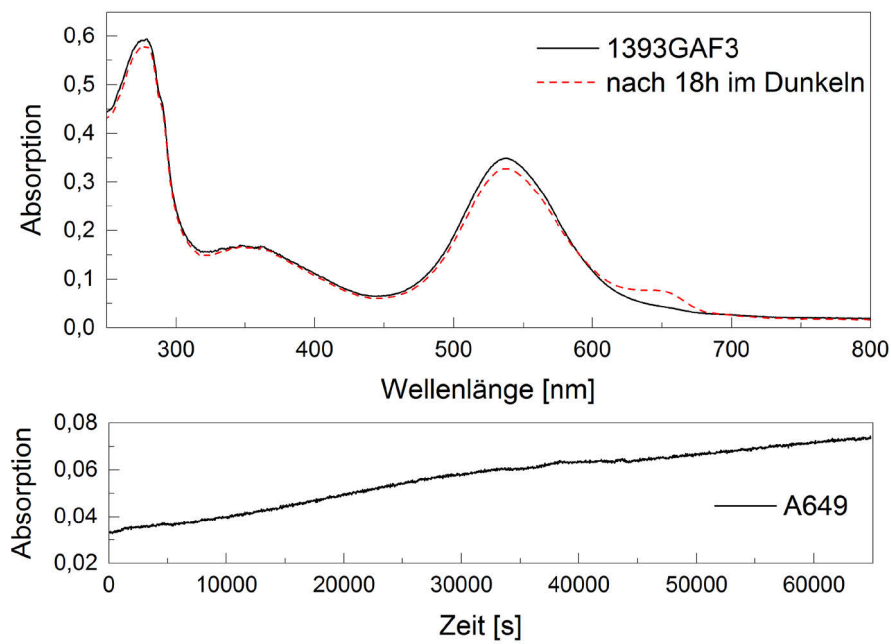


Abb. 4-46: Stabilitätstest des P_g-Zustandes von 1393gaf3 *in vivo* bei 20 °C (78)

Wie bei der GAF3-Domäne von 2699 aus *Nostoc* wurden auch bei 1393gaf3 einzelne Punktmutationen eingeführt, um AS in der Nähe des Chromophors zu verändern (Abb. 4-47) (78).



Abb. 4-47: Modellstruktur von Slr1393g3 (Template: AnPixJg2), einzelne AS um den Chromophor sind farbig markiert. Die in dieser Arbeit vermessenen Mutanten sind eingekreist.

Drei Mutationen (R508N, D531T, N532Y) zeigten dabei einen sehr großen Einfluss auf die Absorption des P_g-Zustandes, wohingegen in allen drei Fällen kein Einfluss auf den P_r-Zustand zu erkennen war (Abb. 4-48-Abb. 4-50, die Spektren des Wildtyps sind jeweils in blau angegeben).

Die Mutation Arginin 508 nach Asparagin zeigt für den P_g-Zustand eine sehr breite, im Vergleich zum WT deutlich verschobene Absorption mit einem Maximum um 600 nm (Abb. 4-48).

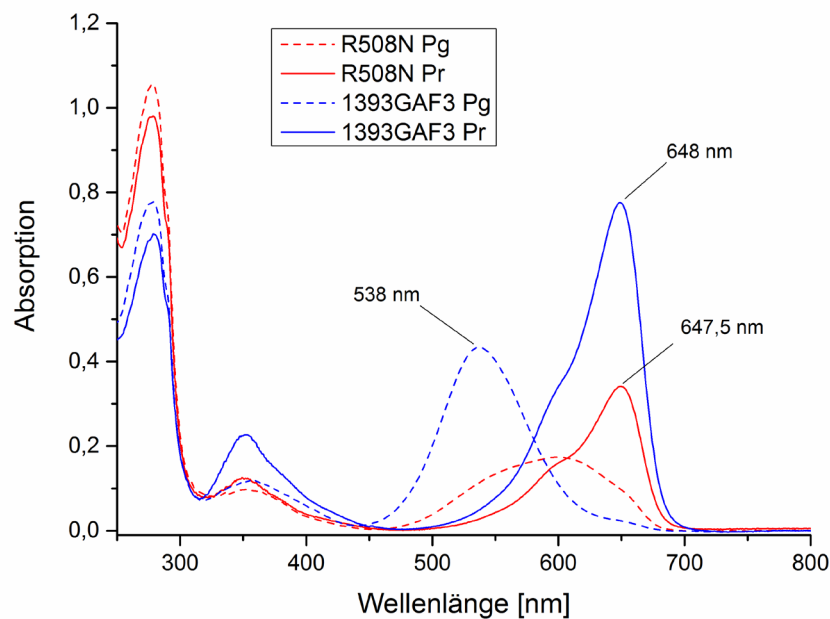


Abb. 4-48: Absorptionsspektren von 1393gaf3 R508N im Vergleich zum WT

Die zweite Mutante besitzt an Position 531 anstatt einer Asparaginsäure ein Threonin. In der Absorption zeigt sich ein leicht rotverschobenes Maximum des P_g-Zustandes mit 552 nm (Abb. 4-49).

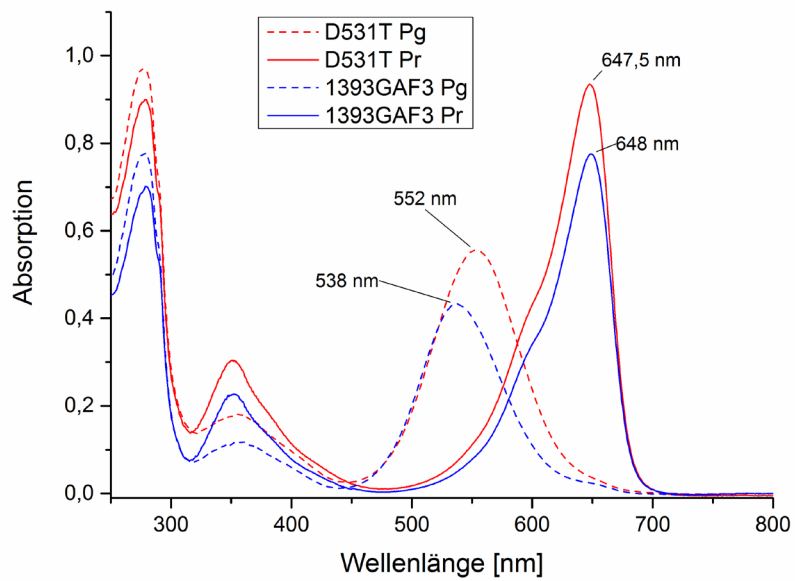


Abb. 4-49: Absorptionsspektren von 1393gaf3 D531T im Vergleich zum WT

Die letzte untersuchte Mutante von 1393gaf3 trägt an Position 532 anstatt eines Asparagins ein Tyrosin und zeigt das auffälligste Absorptionsspektrum der drei Mutanten. Der Photoprodukt-Zustand besitzt einen sehr breiten Peak von 480 bis 720 nm mit zwei Maxima bei 552 und 662 nm (Abb. 4-50). Erwähnenswert ist, dass ein Teil der Absorption des P_g -Zustandes langwelliger ist als die des rot-absorbierenden Grundzustandes.

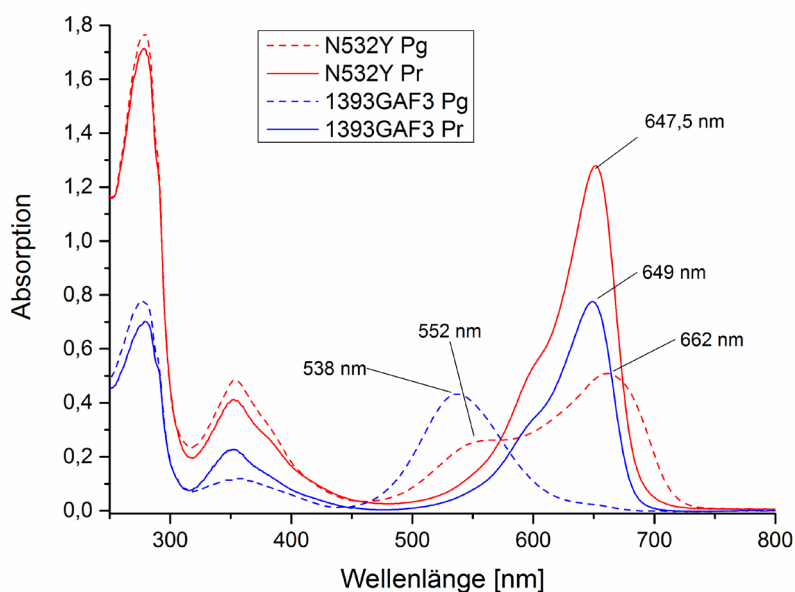


Abb. 4-50: Absorptionsspektren von 1393gaf3 N532Y im Vergleich zum WT

Die Fluoreszenzemissionsspektren des roten Grundzustandes für die *in vivo* und *in vitro* Varianten von 1393gaf3 zeigen bei der Fluoreszenz nahezu Deckungsgleichheit (Abb. 4-51). Die Emissionsspektren der P_g-Form hingegen zeigen eine deutliche Differenz (*in vivo*: 615 nm, *in vitro*: 645 nm). Entsprechend ergibt sich für die Stokes-Verschiebung für den grün-absorbierenden Zustand ein deutlicher Unterschied. Für die *in vivo* Form errechnet sich 1335 cm⁻¹ und für das *in vitro* assimilierte Protein ein Wert von 579 cm⁻¹.

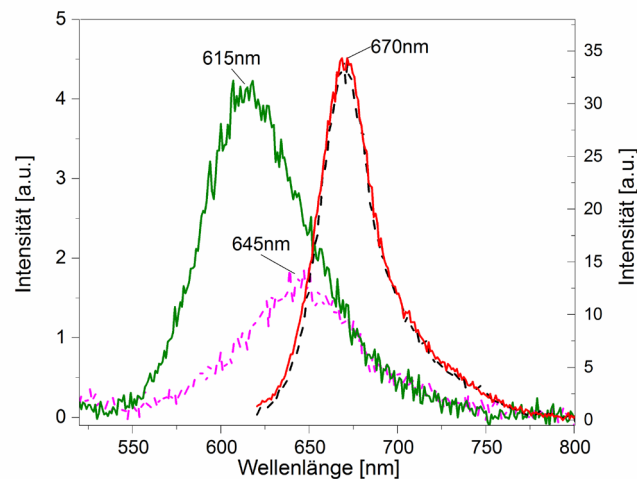


Abb. 4-51: Emissionsspektren des grün-absorbierenden Zustands von 1393gaf3 (*in vivo*: Grün, *in vitro*: Magenta) und des rot-absorbierenden Zustands (*in vivo*: rot, *in vitro*: schwarz). Durchgezogene Linien: *in vivo* Assemblierung, gestrichelt: *in vitro* Assemblierung.

Die drei untersuchten Mutanten zeigen nur einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenz beider Zustände (Abb. 4-52 und Tab. 4-3).

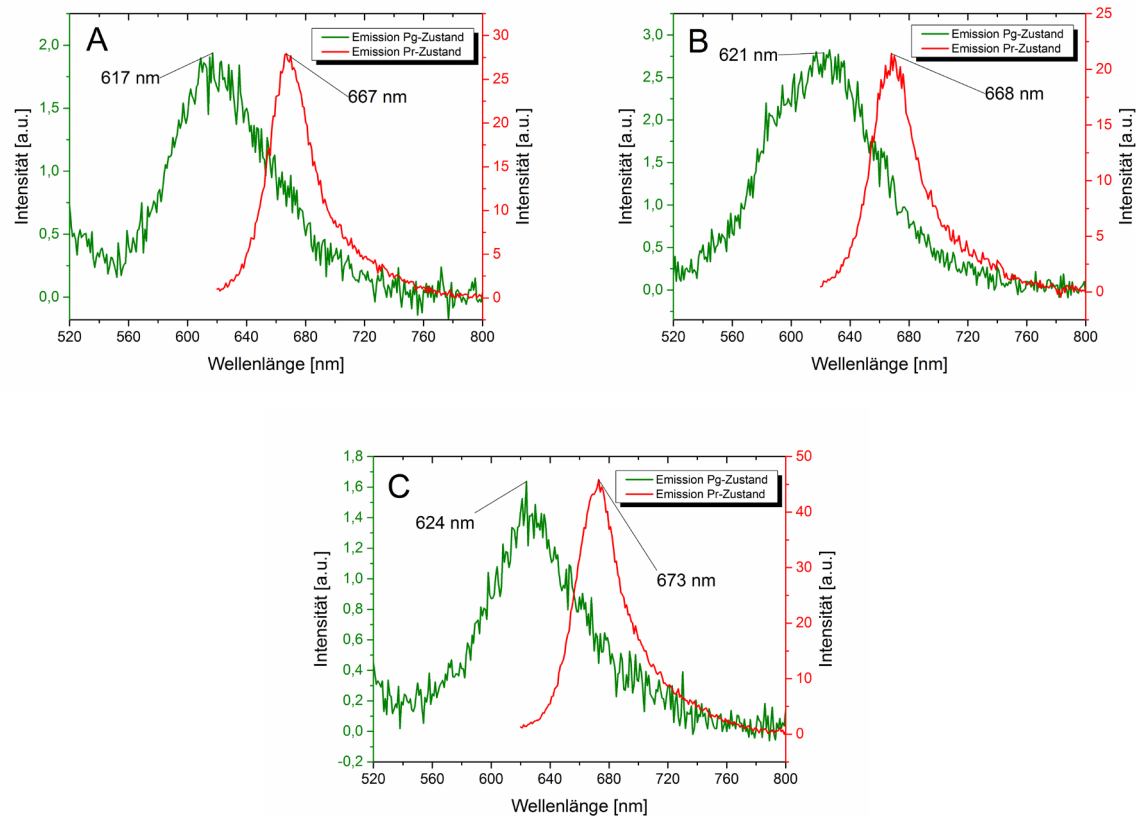


Abb. 4-52: Emissionsspektren der P_r- (in rot) bzw. der P_g-Zustände (in grün) der Mutanten von 1393gaf3. A: R508N, B: D531T, C: N532Y.

Tab. 4-3: Maxima der Emissions- und der Absorptionsspektren des rot- und grün-absorbierenden Zustands vom WT *in vivo* und *in vitro* von 1393g3 sowie der drei Mutanten (R508N, D531T, N532Y).

Protein	Em _{max} /Abs _{max} P _r - Zustand [nm]	Em _{max} /Abs _{max} P _g - Zustand [nm]	Stokes-Shift P _r -Zustand [cm ⁻¹]	Stokes-Shift P _g -Zustand [cm ⁻¹]
WT <i>in vivo</i>	670/648	615/538	507	2327
WT <i>in vitro</i>	670/648	645/591	507	787
R508N	667/647,5	617/-	452	-
D531T	668/647,5	621/552	474	2013
N532Y	673/647,5	624/-	585	-

Die GAF3-Domäne des Proteins 1393 aus *Synechocystis* sp. 6803 wurde bisher in dieser Arbeitsgruppe bezüglich seiner steady-state Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften sowie hinsichtlich seiner Struktur am intensivsten bearbeitet. Hier werden die Absorptionsänderungen im rot/grün Photozyklus für beide Präparationen, *in vivo* und *in vitro* mithilfe der Blitzlichtphotolyse untersucht. Für den Übergang vom rot-absorbierenden Grundzustand in

das grün-absorbierende Photoprodukt wurde die Probe mittels eines Laserpulses der Wellenlänge 650 nm angeregt. Beobachtet wurde der Absorptionsverlauf über den Spektralbereich von 480 nm bis 700 nm. Dabei wurde jeweils alle 10 nm eine Messreihe über drei Zeitfenster (200 μ s, 2 ms, 20 ms) erstellt. Ausgespart wurden dabei die folgenden Ausreißer, die eine eindeutige Globalanalyse erschwerten: 490 nm, 680 nm. Außerdem wurde mit der Erweiterung der Beobachtungswellenlängen um die Wellenlängen von 570 nm und 585 nm der Bereich um den isosbestischen Punkt genauer erfasst. Für die Rückbelichtung wurde eine LED mit einer Wellenlänge von 530 nm genutzt, die über einen Zeitraum von 5 s die Probe in ihre Ausgangsabsorption zurückbelichtete. Nachfolgend sind die durch die Globalanalyse erhaltenen LADS aufgeführt.

Die LADS von 1393gaf3 zeigen beim Übergang vom rot- in den grün-absorbierenden Zustand drei Intermediate (Abb. 4-53). Ein sehr schnelles Intermediat mit 3 Mikrosekunden zeigt eine steigende Absorption in zwei Bereichen des Spektrums. Diese finden sich um 550 nm sowie um 660 nm. Das zweite Intermediat (400 μ s) besitzt eine gegensätzliche Absorptionsänderung. Dabei fällt die Absorption bei etwa 540 nm als auch im Bereich um 650 nm. Das letzte Intermediat liefert einen Absorptionszuwachs um 530 nm sowie einen Zerfall um 600 nm. Die Konstante bestätigt den Absorptionsanstieg bei 540 nm, zeigt aber eine Verschiebung des Absorptionsabfalls von 600 auf 650 nm.

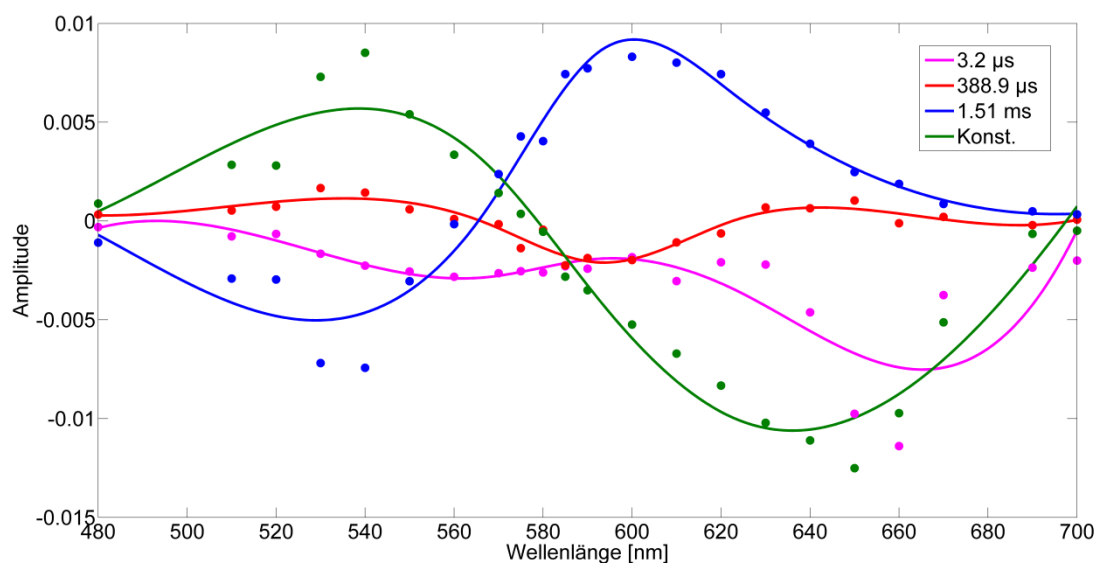


Abb. 4-53: LADS von 1393gaf3: Anregung 650 nm (Wellenlängen 480 – 700 nm) $P_r \rightarrow P_g$

Die (Rück-)Konversion von P_g zu P_r wurde durch einen Laserpuls mit einer Wellenlänge von 540 nm initiiert. Beobachtet wurde der Absorptionsverlauf alle 10 nm über den Spektralbereich von 500 nm bis 690 nm. Folgende Ausreißer wurden nicht in der Globalanalyse berücksichtigt: 560 nm, 570 nm. Die Wellenlängen um den isosbestischen Punkt wurden erneut engmaschiger untersucht (575 nm, 585 nm). Für die Rückbelichtung wurde eine LED mit der Wellenlänge 670 nm genutzt. Die Dauer der Belichtung betrug 8 Sekunden.

Für die Konversion vom grün-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Grundzustand wurden drei Intermediate berechnet (Abb. 4-54). Das erste Intermediat markiert einen Zerfall der Absorption bei 520 nm sowie einen starken Anstieg im Bereich um 600 nm. Diese beiden Bereiche zeigen beim zweiten Intermediat (340 μ s) den gleichen Verlauf, jedoch mit einer deutlich geringeren Amplitude. Das letzte Intermediat bei etwa 1 Millisekunde stellt die letztendliche Umwandlung durch einen Absorptionsabfall über den gesamten Spektralbereich von 510 bis 600 nm dar. Der gleichzeitige Absorptionsanstieg findet im roten Spektralbereich um 640 statt. Diese dominante Komponente der Umwandlung deckt sich mit dem Konstanten-Spektrum am Ende der Messung.

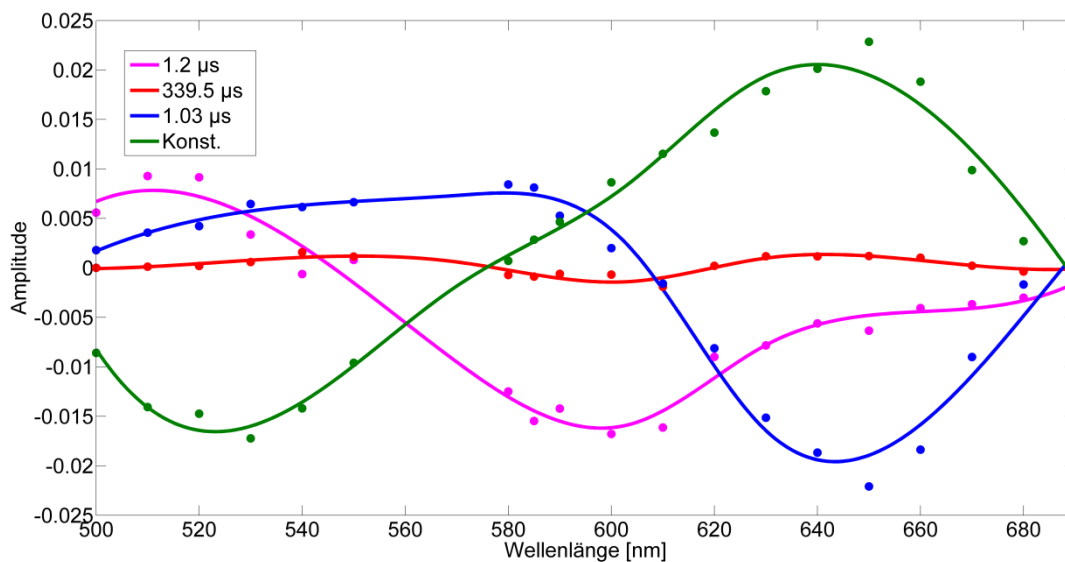


Abb. 4-54: LADS von 1393gaf3: Anregung 540 nm (Wellenlängen 500 – 690 nm) $P_g \rightarrow P_r$

Auch bei der Messung der GAF3-Domäne aus *Synechocystis* wird die Globalanalyse durch die Differenzspektren ergänzt. Zusätzlich sind in der nachfolgenden Abbildung die Absorptionsverläufe der Maxima beider Photozustände bei beiden Photokonversionen dargestellt (Abb. 4-55).

Die Differenzspektren für die P_r zu P_g Konversion zeigen bei den ersten drei gewählten Zeitpunkten (5 μ s, 50 μ s und 500 μ s) einen fast identischen Verlauf. Die Absorption bei 650 nm verschwindet, bei gleichzeitiger Bildung des Intermediats um 570 nm. Nach 4 ms verschiebt sich das Maximum des Absorptionsanstiegs in den grünen Bereich auf 540 nm. Der Bereich der Kurve, die den Absorptionsabfall im roten Bereich darstellt, wird deutlich bis 570 nm verbreitert und nimmt gleichzeitig etwas in der negativen Absorptionsdifferenz zu.

Das Differenzspektrum für die Konversion vom P_g - zum P_r -Zustand zeigt bei den ersten beiden dargestellten Zeitpunkten im Absorptionsverlauf einen Abfall um 520 nm bei gleichzeitigem Anstieg bei 580 nm (Abb. 4-55, links). Nach 230 Mikrosekunden findet gleichzeitig ein Anstieg im Bereich des roten Grundzustandes statt. Die dritte Kurve nach 1,5 Millisekunden liefert eine im Vergleich zu den beiden Vorgängern verschobene Absorption und zeigt bereits deutliche Ähnlichkeiten zum anschließenden Differenzspektrum. Der Abfall im grünen Bereich liegt immer noch bei 520 nm, wohingegen der Anstieg von 580 nm auf 650 nm verschoben ist. Eine Erhöhung beider Absorptionsdifferenzen wird nach 18 ms deutlich. Das Auftreten von Intermediaten wird auch in der Gesamtkinetik für die beiden gewählten Wellenlänge sichtbar (Abb. 4-55, rechts).

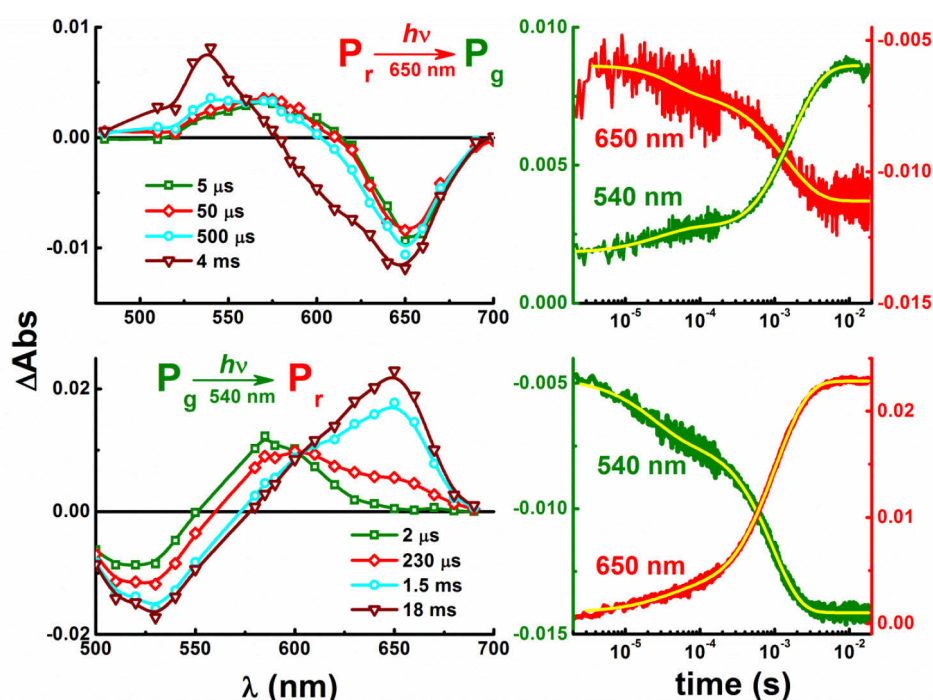


Abb. 4-55: links: Differenzspektren von 1393gaf3 zu gewählten Zeiten; rechts: Absorptionsverlauf bei 540 und 650 nm über den gesamten beobachteten Zeitbereich, oben $P_r \rightarrow P_g$, unten $P_g \rightarrow P_r$

Auch das *in vitro* assemblierte Protein wurde untersucht, wobei Einzelwellenlängen für beide Konversionen für den Fit verwendet wurden. Die berechneten Lebenszeiten sind im direkten Vergleich in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Lebenszeiten der Intermediate der *in vitro* assemblierten Form von 1393gaf3. In der ersten Spalte finden sich die Anregungs- sowie die Beobachtungswellenlängen. In Klammern als Vergleich die Lebenszeiten des WT-Proteins (*in vivo* Assemblierung), ebenfalls aus Fits einzelner Wellenlängen.

1393gaf3 <i>in vitro</i>	τ_1 [μ s]	τ_2 [μ s]	τ_3 [ms]
650/520	20 (26)	- (300)	2,4 (1,5)
540/650	1 (1,3)	24 (360)	1,5 (1)

Der direkte Vergleich von *in vivo* und *in vitro* assemblierten Protein zeigt für die Konversion vom Grundzustand in das Photoprodukt eine vergleichbare Lebenszeit des ersten Intermediats. Das zweite Intermediat, das bei der Messung des WT Lebenszeit von 300 Mikrosekunden besitzt, ist bei der *in vitro* Form nicht erkennbar. Die Lebenszeiten für das letzte Intermediat sind erneut relativ ähnlich, wobei die *in vitro* Variante eine um 1 Millisekunde verlängerte Lebenszeit aufweist.

Für die Rückkonversion lässt sich erneut eine zwischen beiden Proteinen ähnliche Lebenszeit für das erste Intermediats erkennen. Weiterhin findet sich für die *in vitro* assemblierte Form bei dieser Konversion auch ein zweites Intermediat, welches jedoch mit 24 Mikrosekunden eine im Vergleich zum WT zehnfach kürzere Lebenszeit aufweist. Das letzte Intermediat ist dann wieder nahezu identisch.

Wie am Anfang des Kapitels für dieses Protein erwähnt, wurden im Bereich um den Chromophor von Slr1393gaf3 Mutationen eingeführt. Diese zeigen bereits in den steady-state Spektren deutliche Unterschiede zum WT, die eine Untersuchung vor allem mit Hilfe der Blitzlichtphotolyse nahelegte.

In der folgenden Tabelle sind die Lebenszeiten der Intermediate jeweils beim Übergang vom rot-absorbierenden in den grün-absorbierenden Zustand, als auch die gegenläufige Konversion dargestellt (Tab. 4-5). Als Vergleich dienten für alle Mutanten die Lebenszeiten des WT-Proteins (jeweils in Klammern).

Tab. 4-5: Lebenszeiten der Intermediate der Mutanten von 1393gaf3. In der ersten Spalte finden sich die Anregungs- sowie die Beobachtungswellenlängen, entsprechend der Untersuchungen der Hin- und Rückreaktion. In Klammern als Vergleich die Lebenszeiten des WT ebenfalls aus Fits einzelner Wellenlängen erhalten.

R508N	τ_1 [μs]	τ_2 [μs]	τ_3 [ms]
670/540	7,4 (26)	470 (300)	4.55 (1,5)
530/650	- (1,3)	113 (360)	0,45 (1)
D531T			
650/520	14 (26)	260 (300)	0,8 (1,5)
540/650	1,9 (1,3)	355 (360)	0,94 (1)
N532Y			
650/540	7,5 (26)	390 (300)	- (1,5)
650/710	2,5 (-)	470 (360)	- (-)
525/650	73 (1,3)	- (360)	6,2 (1)
705/650	- (-)	- (-)	- (-)

Die R508N Mutante, die sich im Vergleich zum WT durch einen breiten Absorptionspeak des grün-absorbierenden Zustandes auszeichnet, zeigt bei der Konversion in das Photoprodukt eine verlängerte Lebenszeit (τ_3). Die gegenläufige Konversion ist hingegen durch eine verkürzte Lebenszeit zweier Intermediate gekennzeichnet (τ_2 , τ_3). In Bezug auf den Wildtyp liefert die Messung der Mutante D531T sehr vergleichbare Lebenszeiten, deren leichte Abweichungen wohl auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sind. Bei der letzten Mutante N532Y handelt es sich um diejenige, die eine breite Absorption des Photoproduktes besitzt, welche von 500 nm bis 720 nm reicht. Die beiden Maxima des Photoproduktes liegen bei 552 nm und 662 nm. Diese Probe ist offensichtlich heterogen. Soweit ein Fit möglich war, weist die Mutante beim Übergang vom rot-absorbierenden Grundzustand in das Photoprodukt ähnliche Lebenszeiten wie der WT auf. Die Konversion vom Photoprodukt in den P_r -Zustand zeichnet sich durch eine deutlich verlängerte Lebenszeit des dritten Intermediats aus. Der Versuch einer Anregung bei 705 nm, welcher im dunkelroten Bereich des Photoproduktes liegt, jedoch nicht vom Grundzustand überdeckt ist, brachte keinen Erfolg. Eine sichtbare Kinetik konnte jedoch für die Beobachtungswellenlängen in diesem Bereich (710 nm) bei der Photokonversion von P_r zu P_g detektiert werden.

5 Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse auf der Grundlage des theoretischen Hintergrunds bewertet, interpretiert und diskutiert. Dabei liegt das Augenmerk im ersten Teil auf zwei Bacteriophytochromen, einem cyanobakteriellen Phytochrom sowie einem pilzlichen Phytochrom.

Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse der drei GAF-Domänen diskutiert, welche zur besonderen Phytochromklasse der Cyanobacteriochrome gehören, welche sich vor allem dadurch auszeichnet, dass eine einzelne GAF-Domäne für die photochemischen Eigenschaften sowie den reversiblen Photozyklus ausreicht.

5.1 *SynCph2(1-2)*, *PstBphP1*, *PaBphP-497* und *FphAN753*

Zu den ersten Untersuchungen der Photokonversionen von Phytochromen im Mikro- bis Millisekunden-Zeitbereich zählen die Betrachtungen von isolierten Phytochromen aus Erbsen sowie Hafer (96,97). Zur besseren Erfassung schneller Kinetiken wurden die Proben in den ersten Studien bei 10 °C vermessen. Die Methode der Wahl stellte in den meisten Fällen die zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse dar, die auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Für die Konversion P_r nach P_{fr} (rot- nach dunkelrot-absorbierende Formen) konnte die Gruppe um David Kliger durch eine Globalanalyse der Blitzlichtphotolysedaten Lebenszeiten von fünf Intermediaten für das native Phytochrom aus Trieben von Haferkeimlingen identifizieren (7,4 μ s, 89,5 μ s, 7,6 ms, 42,4 ms, >266 ms) (98). Die Rückkonversion zeigte in einer nachfolgenden Betrachtung drei Intermediate (320 ns, 265 μ s, 5,5 ms) (99). Auf der Grundlage der von Spruit und Kendricks (1977) eingeführten Terminologie und Übereinstimmungen mit zuvor veröffentlichten Intermediatspektren wurden die gemessenen Lebenszeiten entsprechend zugeordnet (100,101) (Abb. 5-1).

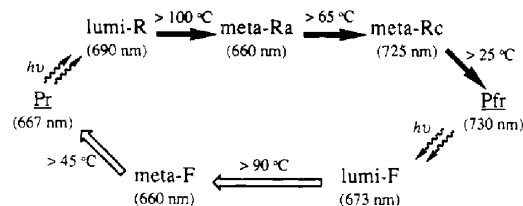


Abb. 5-1: Schema des Phytochrom-Photozyklus nach Eilfeld und Rüdiger auf der Grundlage von stationären Tieftemperatur-Absorptionsmessungen (101). In Klammern sind die ungefähren Absorptionsmaxima der Intermediate bei Raumtemperatur angegeben. Die für die Unterbindung der jeweiligen Reaktion nötige Temperatur steht über dem dazugehörigen Pfeil (98).

Die unten aufgeführten Lebenszeiten (Tab. 5-1) für die P_r zu P_{fr} Konversion zeigen für die ersten beiden Intermediate (lumi-R und meta-Ra) biexponentielle Kinetiken (bezeichnet als R1/R2 und Ra1/Ra2), die zum Zeitpunkt der Messung auf die Heterogenität der Proben zurückgeführt wurden, die aus Pflanzen extrahiert wurden. Die Lebenszeiten für die P_{fr} zu P_r Konversion sind in Tab. 5-2 aufgeführt.

Tab. 5-1: Lebenszeiten der Intermediate von nativem Phytochrom aus Haferkeimlingen. Photokonversion von P_r nach P_{fr} (98).

Intermediat	lumi-R1	lumi-R2	meta-Ra1	meta-Ra2	meta-Rc
Lebenszeit	7,4 μ s	89,5 μ s	7,6 ms	42,4 ms	>266 ms

Tab. 5-2: Lebenszeiten der Intermediate von nativem Phytochrom von Haferkeimlingen für die Rückkonversion von P_{fr} nach P_r (99).

Intermediat	lumi-F	meta-Fa	meta-Fb
Lebenszeit	320 ns	265 μ s	5,5 ms

Die Untersuchungen des nativen pflanzlichen Phytochroms brachten einige Einschränkungen in den externen Variablen wie pH-Wert- und Temperaturbereich (Vermeidung des Zusatzes von hochviskosen Lösemitteln) mit sich. Für exaktere kinetische Bestimmungen und spektroskopische Untersuchungen wie Tieftemperaturmessungen wurde auf rekombinante Phytochrome zurückgegriffen (102). Die Nutzung von rekombinantem Phytochrom brachte weitere Vorteile mit sich. Zunächst konnte der Chromophor gegen chemisch synthetisierte, strukturell modifizierte Derivate ausgetauscht werden, um den Einfluss der Änderungen auf die Kinetiken zu überprüfen. Ein weiterer Vorteil lag in der Vermeidung einer vermeintlich vorhandenen Heterogenität, die in anfangs vermessenen Proben durch die Extraktion der Phytochrome und partielle Protolyse ausgelöst wurde (103).

Rekombinantes phyA-P ϕ B mit dem nativen Chromophor Phytochromobilin aus Pflanzen wurde im direkten Vergleich mit dem nativen phyA aus Hafer vermessen (Tab. 5-3). Um das starke Streulicht und die geringe Absorption der rekombinanten Probe zu kompensieren, wurde ein hochoempfindliches Detektionssystem entwickelt, welches zwei Laserstrahlen detektierte. Somit konnten Absorptionsänderungen im Bereich von 500 ns bis in den Sekunden-Zeitbereich erfasst werden (102,103).

Für das native sowie das rekombinante Phytochrom konnten für die sehr komplexe P_r zu P_{fr} Konversion drei Intermediate bestimmt werden, die mit sechs Exponentialtermen (Lebenszeiten) paarweise auftreten (Tab. 5-3). Diese Daten decken sich sehr gut mit den vorangegangenen Messungen von full-length phyA aus Hafer (12).

Eine weitere Aussage lässt sich auf der Grundlage der Ergebnisse für die Heterogenität der Phytochromextrakte ziehen. Das rekombinante mit $P\phi B$ assemblierte Phytochrom liefert bis auf kleine Unterschiede der Lebenszeiten vergleichbare Kinetiken wie das native phyA. Daraus lässt sich schließen, dass die Heterogenität, die auf der Proteinsequenz basiert, nicht der Auslöser für die biexponentiellen Kinetiken ist (12,104).

Tab. 5-3: Die Lebenszeiten von nativem 124 kDa phyA aus Hafer und dem korrespondierenden rekombinanten phyA. Angewendet wird eine der oben aufgeführten vergleichbare Terminologie (I_{700} (Lumi-R), I_{bl} (meta-Ra), I_x (lumi-Rc), * Abweichung von verschiedenen Fits $\pm 50\%$ (editiert nach (104))

Intermediate	Time constant ($\pm 10\%$)	
	Native (top)	Recombinant (bottom)*
I_{700}^1	11.5 μs	10 μs
I_{700}^2	85 μs	90 μs
I_{bl}^1	6.7 ms	3.8 ms
I_{bl}^2	50 ms	25 ms
I_x^1	427 ms	164 ms
I_x^2	3020 ms	2570 ms
P_{fr}	Constant	Constant

Als favorisierte Begründung für die komplexen Kinetiken der P_r zu P_{fr} Konversion von phyA (nativ und rekombinant) wird ein paralleler Mechanismus vorgeschlagen, der darauf basiert, dass die beiden I_{700} -Spezies zeitgleich durch Belichtung aus dem P_r -Zustand entstehen (12,104).

Im Vergleich dazu zeigt sich, dass das mit PCB assemblierte rekombinante phyA einen monoexponentiellen Zerfall von I_{700} und eine insgesamt schnellere Bildung des P_{fr} -Zustandes durchläuft. Dies lässt auf eine schwächere Interaktion zwischen dem Chromophor und dem Protein schließen, die vermutlich auf den Unterschied zwischen dem Vinyl- ($P\phi B$) und dem Ethylsubstituent (PCB) an Position 18 des Chromophors zurückzuführen ist. Somit

ist der Zerfall von I_{700} deutlich schneller und erfolgt vor dem detektierbaren Mikrosekundenzeitbereich (103).

Eine detailliertere Untersuchung mittels Blitzlichtphotolyse wurde im Jahre 2013 durchgeführt und identifizierte für die Konversion vom rot- in den dunkelrot-absorbierenden Zustand fünf Intermediate (30 μ s, 230 μ s, 1,5 ms, 4,5 ms, 34 ms) und für die gegenläufige Konversion vier Intermediate (0,6 μ s, 200 μ s, 1 ms, 15 ms) (105).

Kurz nach Entschlüsselung des ersten Genoms eines Cyanobakteriums, *Synechocystis* sp. PCC 6803, wurde dort ein Gen entdeckt, das für ein Phytochrom-ähnliches Protein kodieren sollte. Das Genprodukt, als Cph1 benannt, konnte 1997 erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden und wies die photochromen Eigenschaften der kanonischen Phytochrome auf. Allerdings fand man als Chromophor Phycocyanobilin (PCB) anstelle des in pflanzlichen Phytochromen vorhandenen Phytochromobilins (P ϕ B). Der Unterschied der Substituenten an Position 18 macht sich in einer leichten hypsochromen Verschiebung der Maxima beider Zustände bemerkbar (λ_{max} P_r, P_{fr} für Cph1 = 650, 708 nm, im Vergleich dazu die P_r, P_{fr} λ_{max} -Werte für ein pflanzliches Phytochrom: 667 und 730 nm).

Cph1 wurde bezüglich seiner lichtinduzierten konformellen Änderungen intensiv untersucht. Dabei wurden die Lebenszeiten der einzelnen Intermediate für die Konversion vom rot- in den dunkelrot-absorbierenden Zustand durch zeitaufgelöste Blitzlichtphotolyse im Mikro- bis Millisekunden-Zeitbereich ermittelt. Bei einer Temperatur von 10 °C konnten fünf Intermediate mit folgenden Kinetiken ermittelt werden: 25 μ s, 320 μ s, 6 ms, 450 ms, 1 s (106). Bei 20 °C und einem pH-Wert von 7 wurden folgende fünf Lebenszeiten gemessen: 4,9 μ s, 320 μ s, 4,2 ms, 24 ms, 200 ms (107).

Eine noch weitergehende Betrachtung, die zusätzlich die inverse Photokonversion einschließt, wurde für einen dem Cph1 eng verwandten Vertreter der cyanobakteriellen Phytochrome, dem CphA aus *Tolypothrix* PCC7120 (auch als *Fremyella diplosiphon* oder *Tolypothrix* sp bekannt), durchgeführt (105). Die bei 20 °C und mit PCB als Chromophor ermittelten Lebenszeiten der Intermediate zeigt Abb. 5-2.

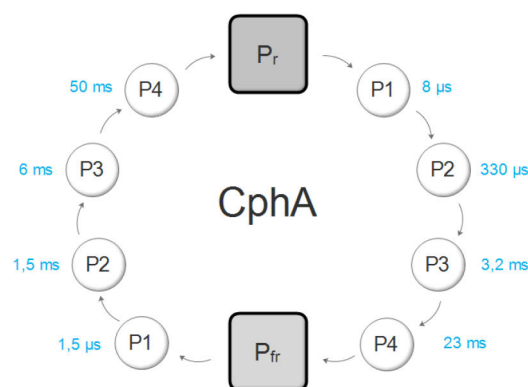


Abb. 5-2: Photozyklus von CphA aus dem Cyanobakterium *Tolypothrix* PCC7120 mit den Lebenszeiten der identifizierten Intermediate (blau) (57,105)

Die Zuordnung von Intermediaten zu strukturellen Änderungen kann für zwei Intermediate bei der $P_r \rightarrow P_{fr}$ Konversion erfolgen (108). Der Lumi-R Zustand bildet sich durch eine Z/E-Isomerisierung der C15/C16 Doppelbindung (109,110). Im meta-R Zustand wird der Chromophor am Stickstoff des D-Rings vorübergehend deprotoniert und bei der Bildung des P_{fr} -Zustandes wieder reprotoniert (107).

Die erhaltenen Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bacteriophytochrome, PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie das pilzliche Phytochrom, FphA, aus *Aspergillus nidulans*, die alle Biliverdin als Chromophor verwenden, werden in den folgenden beiden Tabellen zusammen mit SynCph2(1-2) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 im Vergleich zu CphA aus *Tolypothrix* PCC7120 aufgeführt. Bei PaBphP wird aufgrund der Zugehörigkeit zu den bathy-Phytochromen und dem somit dunkelrot-absorbierenden Grundzustand jeweils die inverse Photokonversion für den Vergleich herangezogen (Tab. 5-4, Tab. 5-5).

Tab. 5-4: Lebenszeiten der Intermediate aus der Globalanalyse für die P_r zu P_{fr} Konversion für SynCph2(1-2) und die drei BV-bindenden Proteine im Vergleich zu CphA aus *Tolypothrix* PCC7120 (105); a = P_{fr} nach P_r

Protein	τ_1 [µs]	τ_2 [µs]	τ_3 [ms]	τ_4 [ms]
SynCph2(1-2)	1,3	299	2,6	17,1
PstBphP1	-	-	1,2	25,99
PaBphP ^a	-	-	-	10,78
FphA	25,5	871	5,70	-
CphA	8	330	3,2	23

Tab. 5-5: Lebenszeiten der Intermediate aus der Globalanalyse für die P_{fr} zu P_r Konversion für *SynCph2(1-2)* und die drei BV-bindenden Proteine im Vergleich zu CphA aus *Tolypothrix* PCC7120 (105); a = P_r nach P_{fr}

Protein	τ_1 [μ s]	τ_2 [ms]	τ_3 [ms]	τ_4 [ms]
<i>SynCph2(1-2)</i>	0,9	0,8	6,2	-
PstBphP1	-	0,71	10,59	-
PaBphP ^a	-	0,12	1,01	-
FphA	-	1,03	-	-
CphA	1,5	1,5	6	50

SynCph2(1-2)

Als den kanonischen Phytochromen noch am ehesten vergleichbares Phytochrom in dieser Arbeit wurde *SynCph2(1-2)* aus *Synechocystis* sp. 6803 untersucht, welches anstatt der für kanonische Phytochrome typischen PAS-GAF-PHY Domänenabfolge eine GAF-GAF Bidomäne als Struktur aufweist (57). Dabei nimmt die zweite GAF-Domäne die stabilisierende Rolle der PHY-Domäne aus Cph1 ein, die wie diese durch einen herausragenden Argininfinger durch Bildung einer Salzbrücke mit dem Chromophor die Chromophortasche versiegelt (55,57). Zu dieser Art der Photorezeptoren mit der GAF-GAF-Bidomäne und einer fehlenden N-terminalen PAS-Domäne gab es keine zuvor durchgeführten zeitaufgelösten spektroskopischen Messungen.

In dieser Arbeit wurden die Photozyklen des rekombinanten *SynCph2(1-2)* sowie dreier Mutanten, die in den PRXSF und WXE Motiven der zungenförmigen Region der GAF2-Domäne liegen, im Mikro- bis Millisekundenzeitbereich untersucht. Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert. Nachfolgend sind Auszüge der Ergebnisse der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolysemessungen für die Konversion vom rot-absorbierenden in den dunkelrot-absorbierenden Zustand aus Publikation (57) aufgeführt. Dabei werden am Beispiel der Absorptionsänderungen in den einzelnen Zeitfenster bei der Wellenlänge bei 665 nm die einzelnen Intermediate aufgezeigt (Abb. 5-3).

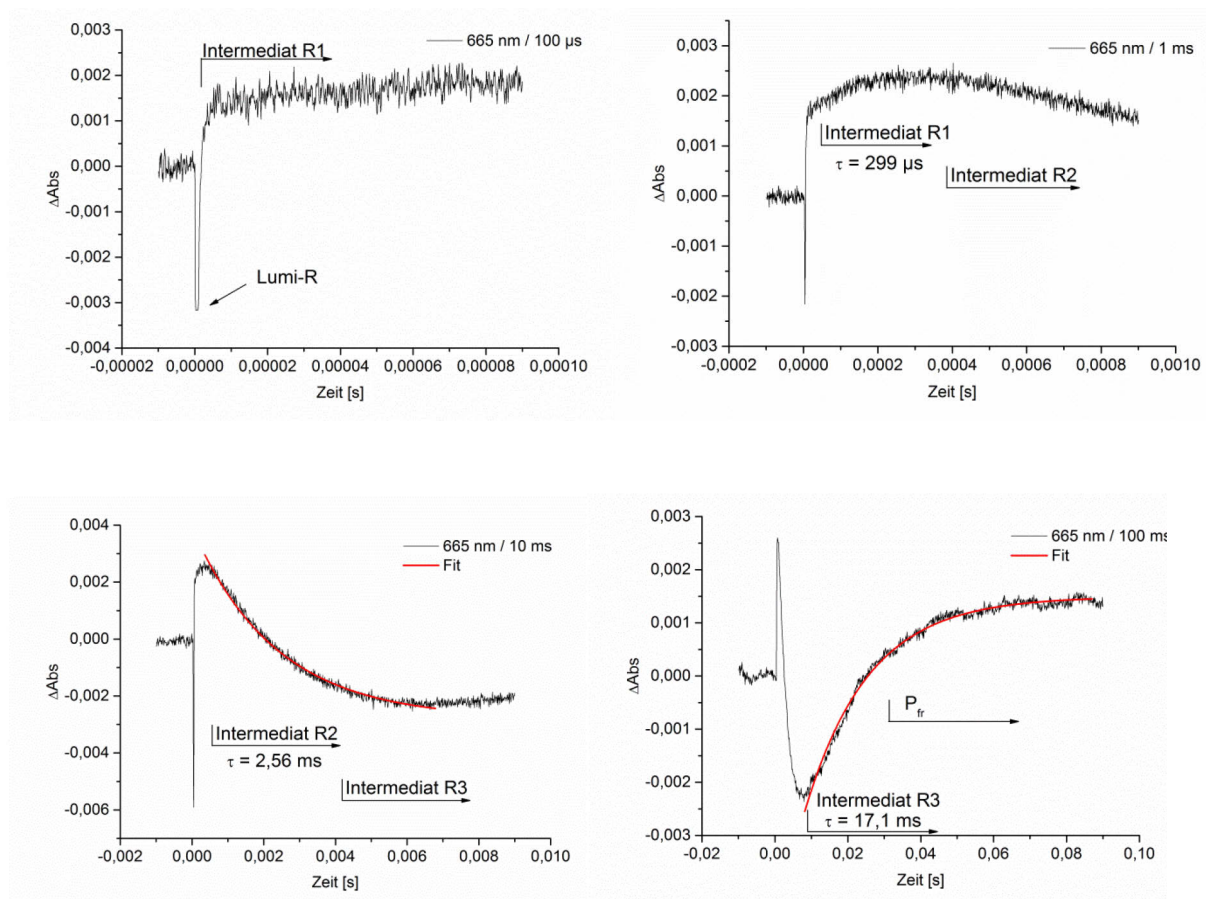


Abb. 5-3: Blitzlichtphotolysemessung von SynCph2(1-2) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 665 nm in den Zeitfenstern von 100 μs , 1 ms, 10 ms und 100 ms.

Durch die Kombination der LADS und der Einzelwellenlängen-Fits konnten vier Intermediate identifiziert werden. Das erste Intermediat mit einer Lebenszeit von 1,3 μs kann dem lumi-R Zustand zugeordnet werden. Wegen der schnellen Bildung des Intermediats im Pikosekunden-Zeitbereich, welche z.B. in pflanzlichen Phytochromen nachgewiesen wurde, kann nur dessen Zerfall mittels unserer Messmethode ermittelt werden. Dabei deckt sich die gemessene Zeit von 1,3 μs sehr gut mit der Lebenszeit des ersten Intermediats von CphA ($\tau = 8 \mu\text{s}$, 20 °C) und Cph1 ($\tau = 4,9 \mu\text{s}$, 20 °C), sie ist jedoch deutlich schneller als die der kanonischen Phytochrome (phyA65-PCB, $\tau = 90 \mu\text{s}$, bei 10 °C).

Die nachfolgenden Intermediate spiegeln die strukturellen Änderungen im Protein und die Anpassung des Chromophors (R1: $\tau = 299 \mu\text{s}$; R2: $\tau = 2,56 \text{ ms}$; R3: $\tau = 17,1 \text{ ms}$) wider. Die Zuordnung des Protonierungszustands des Chromophors ist zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich. Für SynCph1 wurde die vorübergehende Proteinabgabe dem Intermediat mit der Lebenszeit von 320 μs zugeordnet, welches eine rot-verschobene Absorption aufweist (106). Dieses spektrale Verhalten sowie die Lebenszeit ähneln dem R1-Intermediat von

SynCph2(1-2). Ein ähnliches Intermediat mit einer vergleichbaren Rotverschiebung zeigt sich auch bei *CphA* mit einer Lebenszeit von 230 μ s.

Die gegenläufige $P_{fr} \rightarrow P_r$ Konversion beginnt wie die ‚Vorwärts‘-Konversion mit einer sehr schnellen E/Z-Isomerisierung der C15/C16 Doppelbindung die in das Lumi-F Intermediat führt (Abb. 5-4).

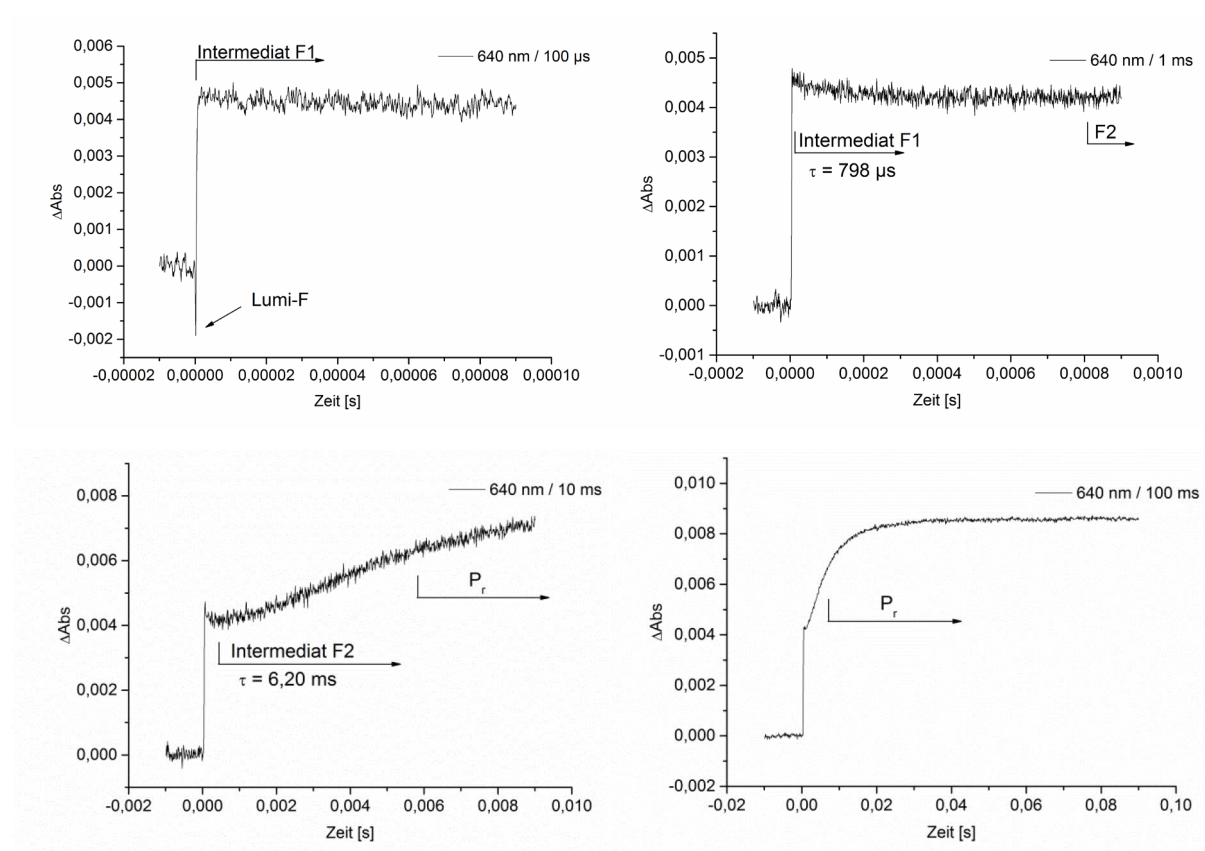


Abb. 5-4: Blitzlichtphotolysemessung von *SynCph2*(1-2) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803, Photokonversion von $P_{fr} \rightarrow P_r$, Absorptionsverlauf bei 665 nm in den Zeitfenstern von 100 μ s, 1 ms, 10 ms und 100 ms.

Bei der hier durchgeführten Messung konnte der Zerfall des Intermediats mit einer Lebenszeit von 0,9 μ s verfolgt werden. Die Absorptionsänderungen der beiden nachfolgenden Intermediate (F1: $\tau = 798 \mu$ s; F2: $\tau = 6,2$ ms) sind höchstwahrscheinlich auf konformelle Änderungen im Bereich des C- und D-Rings zurückzuführen. Der Übergang von meta-F2 in den P_r -Zustand wird von einer Neubildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Stickstoff des D-Rings und eines Wassermoleküls begleitet (111).

Zur genauen Untersuchung der stabilisierenden Wirkung der GAF2-Domäne wurden Punktmutationen in die zungenförmige Struktur eingeführt, die die Chromophortasche verschließt (Abb. 5-5). Serin 385 und Tryptophan 389 liegen im PRXSF bzw. WXE Motiv und haben trotz ihrer Entfernung zum D-Ring des Chromophor (Ser-385: ~ 13 Å, Trp-389: ~ 16 Å) einen Effekt auf die Bildung des P_{fr} -Zustands. Die steady-state Absorptionsmessungen zeigen für die beiden Alanin-Mutanten (S385A, W389A) bereits eine deutlich geringere Menge an gebildetem P_{fr} -Zustand im Vergleich zum WT (Abb. 4-4).

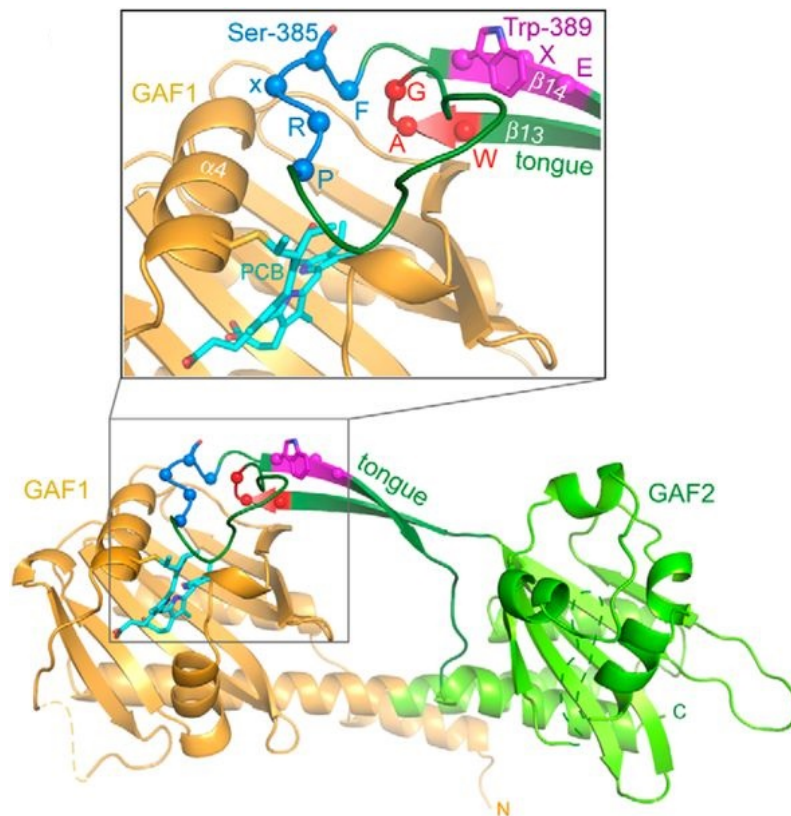


Abb. 5-5: Struktur von *SynCph2*(1-2) mit detaillierter Ansicht der Chromophorbindetasche. Die GAF1-Domäne ist in orange dargestellt, die GAF2-Domäne in mit der zungenförmigen Ausbuchtung (tongue region) in grün. Der PCB Chromophor ist in türkis gezeigt. In Stabform sind die AS-Positionen Ser-385 und Trp-389 sowie der chromophorbindende Cysteinrest Cys-129 präsentiert. Die AS-Reste der konservierten W(G/A)G, PRXSF und WXE Motive sind in Kugelform dargestellt und in rot, blau und violett hervorgehoben (57).

Auf der Grundlage der Ergebnisse zeigen sich für die Konversion der S385A Mutante vom rot-absorbierenden Grundzustand in das dunkelrot-absorbierende Photoprodukt wie beim WT vier Intermediate (Abb. 4-7). Die ersten drei Intermediate lumi-R, R1 und R2 decken sich vom Absorptionsverlauf der LADS mit denen des WT, wobei sich etwa doppelt so schnelle Lebenszeiten finden. Das vierte Intermediat R3' zeigt zu R3 des WT ebenso eine doppelt so

schnelle Lebenszeit und ein etwas verschobenen Absorptionsanstieg im LADS, zerfällt jedoch zu einem P_{fr} -ähnlichen Intermediat.

Die $P_{fr} \rightarrow P_r$ Konversion von S385A ist der des WTs sehr ähnlich. Es liegt nahe, anzunehmen, dass der P_{fr} ähnliche Zustand in ein dem Lumi-F ähnliches Intermediat zerfällt, hier als Lumi-F' benannt. Die weitere Konversion in den P_r -Zustand erfolgt über die üblichen Intermediate F1 und F2 des *SynCph2*(1-2) Wildtyps. Der Photozyklus des Wildtyps, der S385A Mutante sowie der im folgenden beschriebenen W389A Mutante sind in Abb. 5-6 dargestellt.

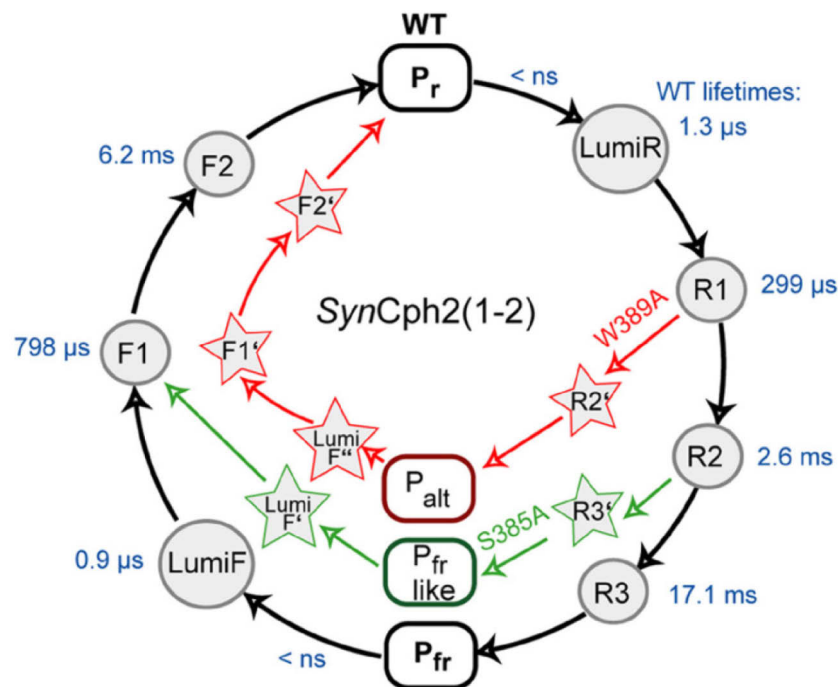


Abb. 5-6: Photozyklus von *SynCph2*(1-2) (schwarze Linien) und der Mutanten S385A (grün) und W389A (rot). Dargestellt sind die P_r - und P_{fr} -Grundzustände (abgerundete Rechtecke) und die Intermediate des WT (Kreise). Die Lebenszeiten der Intermediate sind in blau jeweils neben dem zugehörigen Intermediat aufgeführt. Die farbigen Pfeile zeigen die Abweichungen vom nativen Photozyklus von *SynCph2*(1-2), die durch die Mutation in der „tongue region“ ausgelöst werden. Die zugehörigen Intermediate sind mit einer Sternform markiert. P_{alt} bezieht sich auf einen alternativen rot-absorbierenden Zustand der sich vom P_{fr} -Zustand unterscheidet (57).

Der Photozyklus der W389A Mutante unterscheidet sich deutlich von dem des Wildtyps (Abb. 5-6). Die Photokonversion vom rot- in den dunkelrot-absorbierenden Zustand zeigt in den LADS nur 3 Intermediate auf. Die ersten beiden Intermediate, Lumi-R und R1, besitzen in den LADS in Bezug auf den Absorptionsverlauf und die Lebenszeiten eine sehr hohe Ähnlichkeit zu denen des WT. Das dritte Intermediat ($R3'$) weist ebenso eine vergleichbare Lebenszeit auf, zeigt jedoch einen leicht verschobenen und über einen breiteren Bereich stattfindenden Absorptionsabfall. Im Gegensatz zum Wildtyp zerfällt dieses Intermediat ohne ein

viertes Intermediat in einen rot-absorbierenden Zustand (P_{alt}) der eine sehr breite Absorption aufweist, und einen Absorptionsanstieg bei 550 nm besitzt (57). Auffallend ist, dass die W389A Mutante trotz eines offenbar fehlenden letzten R3 Intermediat einen meta-R ähnlichen Zerfall mit einer Lebenszeit von $\sim 2,3$ ms (ähnlich dem des WT und der S385A Mutante) aufweist. Eine Erklärung für diese Tatsache liefert das P_r/P_{fr} -Differenzspektrum der steady-state Absorptionsmessung, welches einen geringen Absorptionsunterschied zwischen P_r - und P_{fr} -Zustand aufzeigt (Abb. 5-7). Dies kann dazu geführt haben, dass der Globalfit die dazugehörige Kinetik nicht erfasst hat.

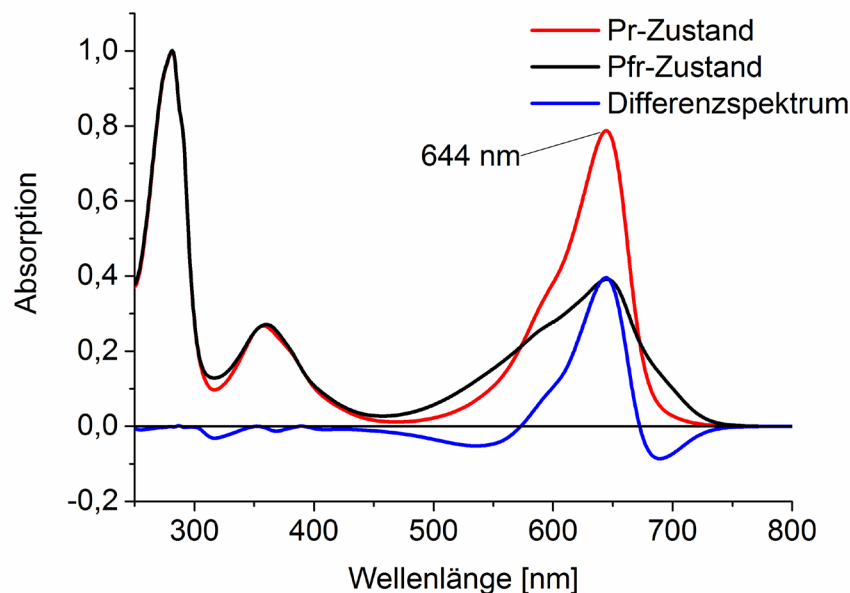


Abb. 5-7: Steady-state Absorptionsmessung von *SynCph2(1-2)* W389A. Absorptionsspektren vom P_r - und P_{fr} -Zustand sowie das errechnete Differenzspektrum.

Den Unterschied zwischen den Photoproduktzuständen von S385A und W389A wird durch die CD-Spektren (Circulardichroismus) bestätigt (aus Lit. (56), Abb. 5-8). W389A zeigt einen ausgeprägten Peak bei 550 nm welcher bei S385A, wie auch beim WT kaum sichtbar ist (56).

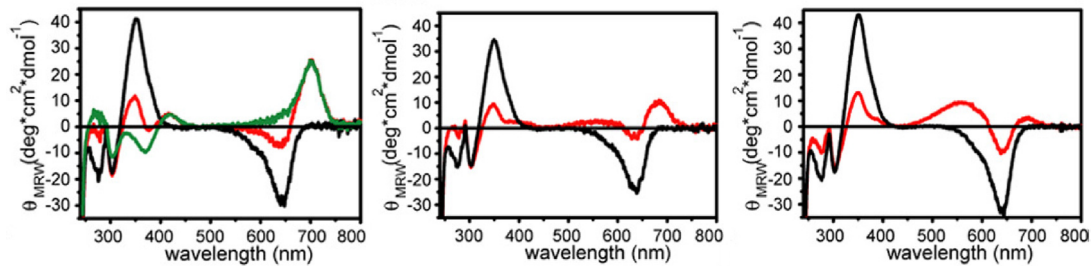


Abb. 5-8: CD-Spektren für *SynCph2*(1-2) WT und die Mutanten S385A und W389A, von links nach rechts. Das Spektrum des P_r -Zustandes ist in schwarz angegeben, das des jeweiligen P_{fr} -Zustands in rot. Die grüne Kurve (linke Abb.) zeigt das Spektrum für den reinen P_{fr} -Zustand (errechnet) (editiert nach (56))

Erstaunlicherweise ähnelt das Differenzspektrum von W389A sehr stark dem des *SynCph2*(1) Proteins, welches nur aus der GAF1-Domäne besteht und dem daher die stabilisierende Wirkung der GAF2-Domäne sowie der „tongue region“ fehlt (112). Ein vergleichbares Spektrum liefert ebenfalls ein 45 kDa großes Teilstück des pflanzlichen Phytochrom A (AS 1-425) aus *Avena sativa*, bei dem ebenfalls ein Großteil der PHY-Domäne fehlt (113). Die aufgeführten spektralen Gemeinsamkeiten mit Phytochromproteinen, bei denen entweder ein Teil oder die gesamte GAF2- bzw. PHY-Domäne fehlt, verdeutlicht die wichtige Rolle des Tryptophans im WXE Motiv für die Bildung des P_{fr} -Zustandes.

Demzufolge unterscheidet sich die Rückkonversion von W389A vom P_{fr} - in den P_r -Zustand deutlich von dem des Wildtyps. Es zeigen sich drei abweichende Intermediate (Lumi-F'', F1' und F2'), die eine bis zu dreimal längere Lebenszeit aufweisen (F2 (WT): 6,2 ms, F2' (W389A): 19,5 ms).

Die W389F Mutante zeigt für beide Konversionen nahezu identische Intermediate wie der Wildtyp. Auffällig ist die zweifach längere Lebenszeit des letzten Intermediats der $P_r \rightarrow P_{fr}$ Konversion. Die langsamere Bildung des P_{fr} -Zustands ist auf das im Vergleich zum Tryptophan volumenmäßig kleinere Phenylalanin zurückzuführen. Das größere Volumen des Tryptophans ist entscheidend für die Formierung der „tongue region“ Konformation (56).

PstBphP1

Für die Blitzlichtphotolyse-Messungen von PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* zeigt sich für die Photokonversion vom rot-absorbierenden Grundzustand in das dunkelrot-absorbierende Photoprodukt sowohl in den lifetime-associated difference spectra als auch in den Differenzspektren ein eindeutiger Intermediat-Zustand. Er äußert sich in den LADS durch einen leichten Absorptionsanstieg bei 690 nm und einen Abfall um 750 nm. Der Abfall im dunkelroten Bereich wird durch die Differenzspektren bestätigt. Die LADS als auch der Wellenlängen-Einzelfit geben die Lebenszeit des Intermediats mit 1,2 Millisekunden (Abb. 4-14 und Abb. 5-9) an. Im Anschluss geht das Protein in den P_{fr} -Zustand über. Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich für das R2-Intermediat von *SynCph2*(1-2) ($\tau = 2,56$ ms). Es besitzt ebenso einen Abfall im dunkelroten Spektralbereich, wobei ein nachfolgendes Intermediat mit dem anschließenden P_{fr} -Zustand einen deutlichen Anstieg der Absorption aufweist (57). Für CphA und PhyA finden sich vergleichbare Lebenszeiten (CphA: $\tau_3 = 3,2$ ms; PhyA: $\tau_3 = 1,5$ ms), die jedoch keinen Abfall, sondern mit einem starken Absorptionsanstieg im dunkelroten Spektralbereich den größten Anteil an der P_{fr} -Bildung liefern. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf doch deutliche Unterschiede für die P_{fr} -Bildung im Vergleich zwischen verschiedenen Phytochromen.

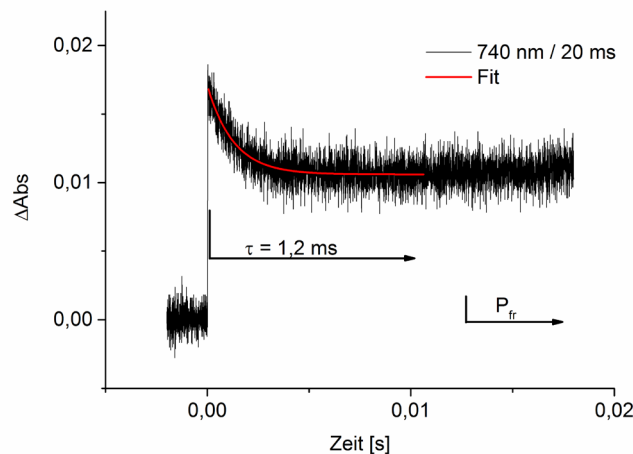


Abb. 5-9: Blitzlichtphotolysemessung von PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 740 nm im Zeitfenster von 20 ms. Zerfall des Intermediats und Bildung von P_{fr} .

Für die Rückkonversion aus dem P_{fr} - in den P_r -Zustand ist ein Intermediat identifizierbar. Die Differenzspektren zeigen, dass der P_{fr} -Zustand bereits nach 15 Mikrosekunden fast vollständig gebleicht ist (Abb. 4-16). Dies bestätigt der unten aufgeführte Einzelfit für den

Absorptionsverlauf bei 760 nm, der einen instantanen Absorptionsabfall beschreibt (Abb. 5-10, links). Der anschließende weitere Abfall der Absorption bei 760 nm verdeutlicht, dass der Zerfall noch nicht abgeschlossen ist und dass das hier verwendete größte Zeitfenster den limitierenden Faktor darstellt. Dies erklärt auch die offensichtlich fehlerhafte lange Lebenszeit (10,59 ms) in den LADS (Abb. 4-15).

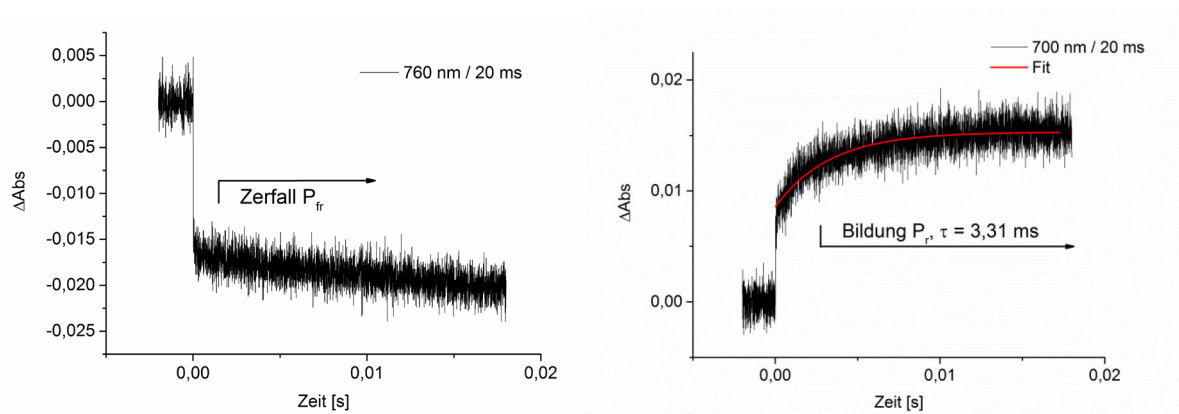


Abb. 5-10: Blitzlichtphotolysemessung von PstBphP1 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Photokonversion von $P_{fr} \rightarrow P_r$, links: Absorptionsverlauf bei 760 nm im Zeitfenster von 20 ms. Zerfall des dunkelrot-absorbierenden Photoproduktes; rechts: Absorptionsverlauf bei 700 nm im Zeitfenster von 20 ms. Bildung des rot-absorbierenden Grundzustandes.

Für die Bildung des P_r -Zustandes findet sich im Einzelfit bei der Wellenlänge von 700 nm mit 3,31 Millisekunden eine Lebenszeit, die den Zerfall eines instantan entstandenen Intermediats beschreibt, welches in den rot-absorbierenden P_r -Zustand übergeht. Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich für das Intermediat F2 von *SynCph2*(1-2) mit einer Lebenszeit von 6,2 ms. Es lässt sich vermuten, dass das bei Cph2 auftretende Lumi-F Intermediat, welches durch eine Isomerisierung der C15/C16 Doppelbindung entsteht und mit einer Rearrangierung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes in das meta-F Intermediat übergeht, auch bei FphA vorliegt, hier allerdings eine deutlich schnellere Lebenszeiten aufweist und mit der von uns gewählten Methode nicht erfasst werden kann. Der abschließende meta-F $\rightarrow P_{fr}$ Übergang mit einer Neubildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Stickstoff des D-Rings und eines Wassermoleküls deckt sich mit der gemessenen Lebenszeit von 3,31 ms (57,111).

PaBphP

Das bathy-Phytochrome PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* weist für die Konversion vom Grundzustand in das Photoprodukt, somit vom dunkelrot-absorbierenden in den rot-absorbierenden Zustand, keine sichtbaren Intermediate auf. Das kann zum einen auf sehr schnelle Intermediate hindeuten, zum anderen kann es sich um Intermediate handeln, bei de-

nen Bildung und Zerfall zum selben Zeitpunkt auftreten. Die mit 10,78 ms angegebene Lebenszeit in den LADS lässt sich durch Betrachtung der Spektren der Einzelwellenlängen erklären (Abb. 4-19 und Abb. 5-11). Diese zeigen, dass die Konversion im Zeitfenster unserer Messung von 20 ms noch nicht abgeschlossen ist und bei der Berechnung des Globalfits als irrtümliche Lebenszeit erfasst wird.

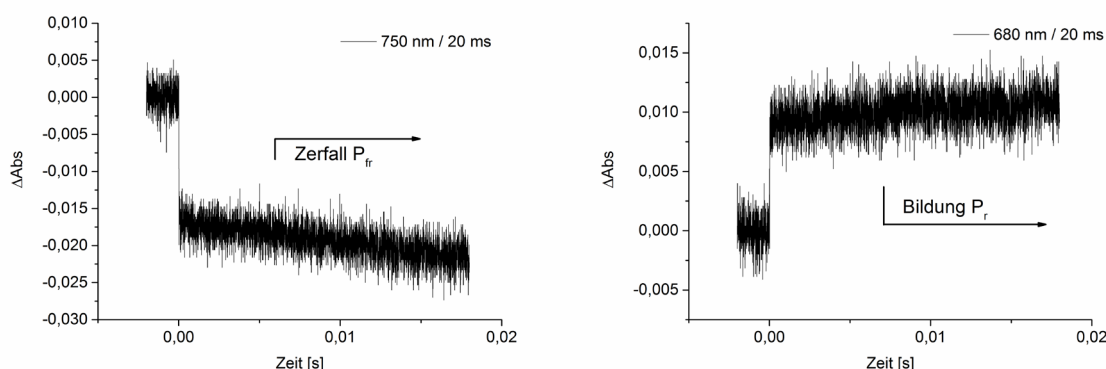


Abb. 5-11: Blitzlichtphotolyse-Messung von PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa*, Photokonversion von $P_{fr} \rightarrow P_r$, *links:* Absorptionsverlauf bei 750 nm im Zeitfenster von 20 ms. Zerfall des dunkelrot-absorbierenden Photoproduktes; *rechts:* Absorptionsverlauf bei 680 nm im Zeitfenster von 20 ms. Bildung des rot-absorbierenden Grundzustandes.

In den LADS für die P_r zu P_{fr} Konversion zeigen sich zwei Lebenszeiten (121,1 μ s und 1,01 ms), die mit Unterstützung der Differenzspektren auf mindestens 1 Intermediat schließen lassen (Abb. 4-20). Die Einzelspektren liefern ein anderes Bild. Sie geben die Möglichkeit, drei Intermediate zu identifizieren (Abb. 5-12). Das erste Intermediat bildet sich instantan und zerfällt mit einer Lebenszeit von 54 μ s in das zweite Intermediat. Nach einer Lebenszeit von ca. 1 ms bildet sich anschließend das dritte Intermediat, welches in das dunkelrot-absorbierende Photoprodukt übergeht.

Vergleicht man die hier für PaBphP gefundenen Prozesse mit dem sehr ähnlichen Verlauf der P_{fr} zu P_r Konversion von *SynCph2*(1-2), lassen sich die Intermediate von PaBphP in eine ähnliche Terminologie einordnen. Das erste Intermediat lässt sich mit Lumi-F vergleichen, dessen Zerfall sehr schnell stattfindet und dessen Kinetik nicht gefittet werden kann. Das zweite und dritte Intermediat deckt sich mit den Intermediaten F1 und F2 von *SynCph2*(1-2).

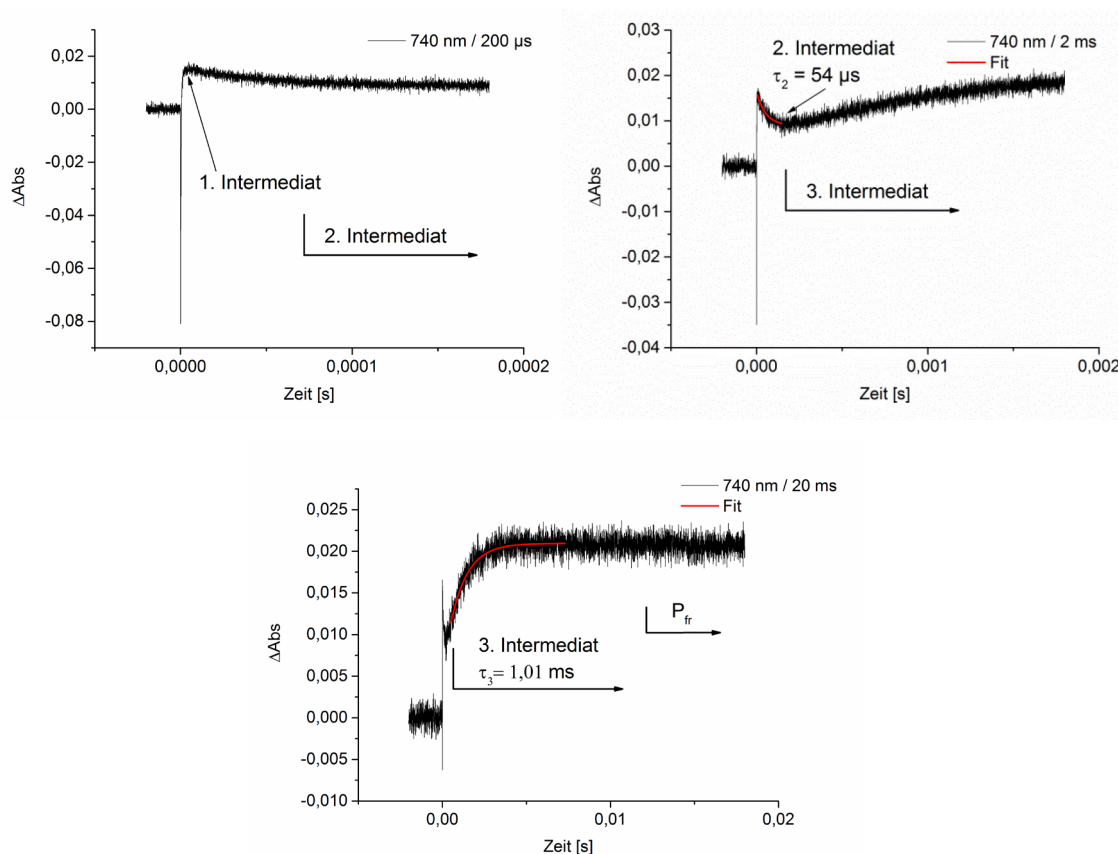


Abb. 5-12: Blitzlichtphotolysemessung von PaBphP aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 740 nm in den Zeitfenstern von 200 μs , 2 ms und 20 ms.

Im Gegensatz zu SynCph2(1-2) findet bei der Bildung des dritten Intermediats mit der Lebenszeit von ungefähr 1 ms eine deutliche Verschiebung in den dunkelroten Spektralbereich statt. Ein vergleichbarer Shift ist für die P_r zu P_{fr} Konversion von CphA (3,2 ms) und FphA (5,7 ms) mit einer ähnlichen Lebenszeit zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass das bathy-Phytochrom PaBphP beim Übergang in das letzte Intermediat und in den P_{fr} -Grundzustand ähnliche Reaktionen durchläuft wie die kanonischen Phytochrome bei der Konversion in das Photoprodukt (ebenfalls P_{fr}).

FphA

Für das pilzliche Phytochrom aus *Aspergillus nidulans* deuten die LADS der P_r zu P_{fr} Konversion und vor allem auch die Differenzspektren nur auf ein Intermediat im Wellenlängenbereich um 740 nm hin (Abb. 4-23 und Abb. 4-25). Die Bildung dieses Intermediats ist für unsere angewandte Methode allerdings deutlich zu schnell. Der Zerfall dieses Intermediats hingegen kann mit einer Lebenszeit von 5,7 ms beziffert werden. Vergleichbar zum dritten Intermediat (P3) von CphA findet bei diesem Zerfall eine deutliche Rotverschiebung statt

(760 nm) (105). Allerdings geht FphA, anders als CphA, anschließend ohne ein nachfolgendes Intermediat direkt in den P_{fr} -Zustand über.

Bei der P_{fr} zu P_r Konversion von FphA lassen sich mit der von uns eingesetzten Methode keine Intermediate im Zeitbereich von 1 μ s bis 20 ms identifizieren (Abb. 4-24 und Abb. 4-25). Wie schon zuvor bei PaBphP (Übergang von P_{fr} zu P_r) zeigt sich ein instantaner Absorptionsabfall (P_{fr} -Zustand) bzw. Anstieg (P_r -Zustand), bei dem das Protein vollständig in den Grundzustand konvertiert. Dies deutet auf sehr schnelle Intermediate vor dem in dieser Arbeit vermessenen Zeitbereich hin oder auf Intermediate, deren Bildung und Zerfall zeitgleich ablaufen.

5.2 GAF-Domänen aus CBCRs: all2699gaf1 und gaf3 und slr1393gaf3

Cyanobacteriochrome gehören zu den Bilin-bindenden Photorezeptoren, und bilden mit ihrer minimalisierten Domänenstruktur des photosensorischen Bereichs eine eigene Klasse aus. Für eine reversible Photochemie wird einzig die GAF-Domäne benötigt, die gleichzeitig auch die Chromophorbindestelle in der Form eines Cysteinrestes bereitstellt.

Sie zeigen viele Gemeinsamkeiten als auch deutliche Unterschiede zu den klassischen Phytochromen. Die beiden Photozustände besitzen die gleiche Konfiguration, die sich durch einen 15Z Dunkelzustand und ein 15E Photoprodukt auszeichnet (69). Weiterhin zeigen sich Gemeinsamkeiten bei den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Bilinchromophor und dem Protein. Im 15Z-Zustand ist ein konserviertes Histidin oder Tyrosin mit einem Carbonyl-Sauerstoff des D-Rings des Bilins verbunden (55,87). Der Amid-Stickstoff des D-Rings bindet im 15E-Zustand mit einem Aspartatrest im Protein, der dabei verschiedene Aufgaben übernimmt. Im cyanobakteriellen Phytochrom Cph1 interagiert er mit einem AS-Rest in der PHY-Domäne (55). Bei AnPixJ einem CBCR aus *Anabaena* sp. PCC 7120, welches wie 1393gaf3 einen Rot/Grün Photozyklus besitzt und als Chromophor PCB bindet, interagiert er direkt mit dem A-, B- und C-Ring des Bilins (87). Zusätzlich ist durch die fehlende PAS- und PHY-Domäne der A- und B-Ring dem Lösemittel ausgesetzt.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Cyanobacteriochromen entdeckt, die trotz vieler spektroskopischer und photochemischer Ähnlichkeiten sehr unterschiedliche spektrale Eigenschaften und Photozyklen zeigen. AnPixJ war eines der ersten CBCRs, welches mittels zeitaufgelöster Spektroskopie zur Identifizierung des Photozyklus sowie der Intermediate vermessen wurde (75,86).

Die Konversion vom thermisch stabilen rot-absorbierenden Zustand ($P_r = 648 \text{ nm}$) in das grün-absorbierende Photoprodukt ($P_g = 543 \text{ nm}$) sowie die inverse Konversion liefern je zwei semistabile Intermediate mit folgenden Lebenszeiten: $R1_{650-680}$ ($\tau = < 1 \text{ }\mu\text{s}$); $R2_{610}$ ($\tau = 920 \text{ }\mu\text{s}$); $G1_{570}$ ($\tau = 190 \text{ }\mu\text{s}$); $G2_{630}$ ($\tau = 1,01 \text{ ms}$) (Abb. 5-13, links). Das erste Intermediat $R1$ der Konversion in das Photoprodukt P_g ist vergleichbar zu Cph1. Es bildet sich sehr schnell unterhalb des Nanosekundenzeitbereich und besitzt eine Lebenszeit um $1 \text{ }\mu\text{s}$. Gleichzeitig

zeigt sich wie bei Cph1 eine Rotverschiebung (648 nm zu 650-680 nm) (86,106). Dieser Umstand und die Ähnlichkeit der Absorptionsmaxima Pr und Lumi-R von Cph1 zu Pr und R1 von AnPixJ legt eine vergleichbare Änderung der Konfiguration, genauer gesagt in beiden Fällen eine Z/E-Isomerisierung, nahe. Dies wurde durch weiterführende Resonanz-Raman und ^{13}C MAS NMR Spektroskopie Messungen bestätigt (85,86). Das nachfolgende R2 Intermediat und der abschließende P_g -Zustand zeigen eine starke Blauverschiebung, wohingegen die dem Lumi-R Intermediat nachfolgenden Intermediate von Cph1 im rot- sowie dunkelroten Spektralbereich angesiedelt sind. Eine Erklärung für die Blauverschiebung liefern die ^{13}C NMR Messungen, die einen Anstieg der Elektronendichte am C- und am D-Ring des Bilin-chromophors beim Übergang in den P_g zeigen, wohingegen die Elektronendichte im Fall von Cph1 Δ 2 (das N-terminale Sensormodul) bei der Photokonversion in den P_{fr} -Zustand abnimmt. Dieser Unterschied weist auf eine Destabilisierung eines LUMO im P_g -Zustand hin, welche zu der Blauverschiebung führt (85).

Die zuvor erwähnten Tieftemperatur-Resonanz-Raman-Messungen identifizieren je ein weiteres Intermediat für beide Photokonversionsrichtungen. Weiterhin geben die Messungen Aufschluss über die Protonierungszustände im Verlauf des Photozyklus (Abb. 5-13, rechts) (86). Wie bei den klassischen Phytochromen, z.B. Cph1, ist der Chromophor in beiden Zuständen protoniert, wobei im Verlauf beider Konversionen eine De- als auch eine Reprotonierung stattfindet (107).

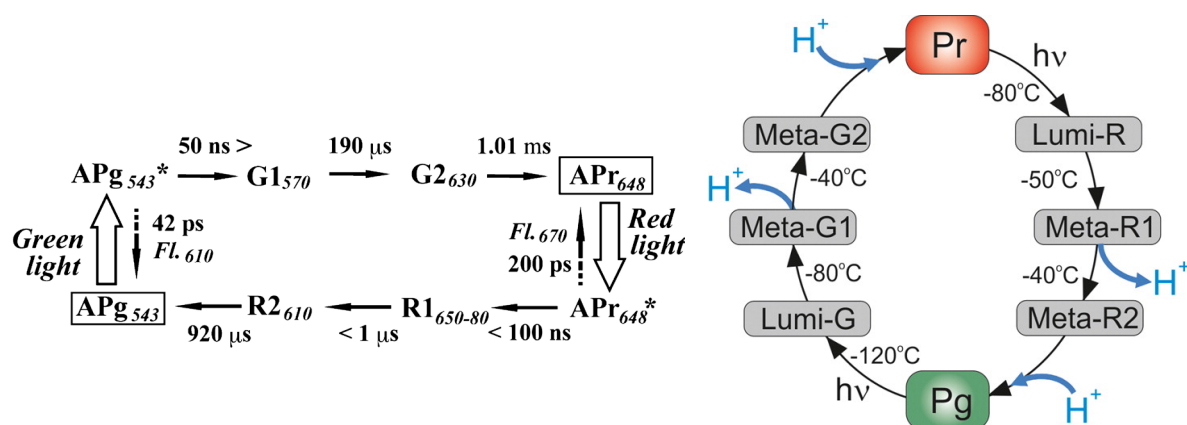


Abb. 5-13: *links:* Photozyklus von AnPixJg2 mit den Intermediaten für die gegenläufigen Photokonversionen mit den dazugehörigen Lebenszeiten. Ergänzend sind die beiden angeregten Zustände mit dem jeweiligen Emissionsmaximum der Fluoreszenz sowie der Fluoreszenzlebenszeit angegeben (75); *rechts:* Je ein zusätzliches Intermediat für beide Richtungen wurde mittels Tieftemperatur-Resonanz-Raman-Messungen identifiziert. Zusätzlich sind die gemessenen Protonierungszustands-Änderungen angegeben (blau) (86).

2699gaf1 und 2699gaf3

Das CBCR AphC (all 2699) aus *Nostoc* sp. PCC 7120 besitzt drei GAF-Domänen, von denen zwei PCB als Chromophor mittels eines Cysteinrestes binden (GAF1: Cys138; GAF3 Cys554) und eine reversible Photochemie zeigen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die isolierten chromophorbindenden GAF-Domänen unabhängig voneinander untersucht. Dabei zeigen die GAF1- und GAF3-Domäne zwei unterschiedliche Arten von Photozyklen. Beide besitzen einen rot-absorbierenden thermisch stabilen Ausgangszustand. Im Fall von der GAF1-Domäne zeigt sich ein den kanonischen Phytochromen sehr vergleichbarer rot/dunkelrot Photozyklus (Abb. 4-26). Durch Belichtung mit einer LED mit der Wellenlänge 585 konnte ein thermisch instabiles dunkelrot-absorbierendes Photoprodukt mit einer Dunkelrückkehrzeit von ~ 100 min erzeugt werden (Abb. 4-27). Im direkten Vergleich bildet die GAF3-Domäne durch Belichtung (LED 670 nm) ein deutlich instabileres orange-absorbierendes Photoprodukt mit einer Rückkehrzeit von ~ 38 s (Abb. 4-31 und Abb. 4-32).

In der nachfolgenden Tabelle sind die Lebenszeiten der identifizierten Intermediate des Photozykluses von GAF1 zusammengefasst aufgeführt (Tab. 5-6).

Tab. 5-6: Vergleich der Lebenszeiten der Globalanalyse von 2699gaf1, $P_r \rightarrow P_{fr}$, $P_{fr} \rightarrow P_r$

2699gaf1	τ_1 [μs]	τ_2 [μs]	τ_3 [ms]
$P_r \rightarrow P_{fr}$	2,7	43,6	7,1
$P_{fr} \rightarrow P_r$	-	14,5	0,9

Man findet für den Übergang vom dunkelrot-absorbierenden in den rot-absorbierenden Zustand deutlich kürzere Lebenszeiten im Vergleich zur inversen Konversion. So findet man für das zweite Intermediat eine um den Faktor drei bzw. für das dritte Intermediat eine um den Faktor sieben kürzere Lebenszeit. Bestätigt wird dies durch die absoluten Differenzspektren, die für diesen Übergang nach 50 Mikrosekunden eine fast vollständige Bildung des P_r -Zustandes aufweisen. Bei der Photokonversion vom P_r - in den P_{fr} -Zustand findet die komplette Umwandlung erst zum letzten gewählten Zeitpunkt von 7 Millisekunden statt.

Der Absorptionsverlauf bei der Konversion vom rot- in den dunkelrot-absorbierenden Zustand zeigt eine große Ähnlichkeit zu *SynCph2*(1-2), wobei für 2699gaf1 im Gegensatz zu den vier Lebenszeiten bei *SynCph2*(1-2) nur 3 Lebenszeiten identifizierbar sind (Abb. 5-3 und Abb. 5-14). Beide weisen ein sehr schnelles Intermediat (Lumi-R bei *SynCph2*(1-2)) auf, dessen Bildung außerhalb unserer Auflösung liegt. Der Zerfall ist in beiden Fällen messbar und besitzt eine sehr ähnliche Lebenszeit (2699gaf1: 1,7 μ s; *SynCph2*(1-2): 1,3 μ s). Daran anschließend findet sich bei *SynCph2*(1-2) das Intermediat R1 mit einer Lebenszeit von 299 μ s und das nachfolgende R2 Intermediat (τ = 2,56 ms). Die GAF1-Domäne zeigt nur ein vergleichbares Intermediat, welches vom Verlauf dem R2 Intermediat ähnelt, jedoch mit 51 μ s eine deutlich kürzere Lebenszeit aufweist. Das dritte Intermediat ist ebenso vergleichbar und weist mit 7,1 ms (*SynCph2*(1-2) τ = 2,6 ms) eine ähnliche, wenn auch ungefähr doppelt so schnelle Lebenszeit auf. Der Vergleich der LADS bestätigt die Gemeinsamkeiten in der Photokonversion und weist ebenso das in 2699gaf1 fehlende R1-Intermediat auf, welches bei *SynCph2*(1-2) nur auf leichte Konformationsänderungen hindeutet (Abb. 4-5 und Abb. 4-28).

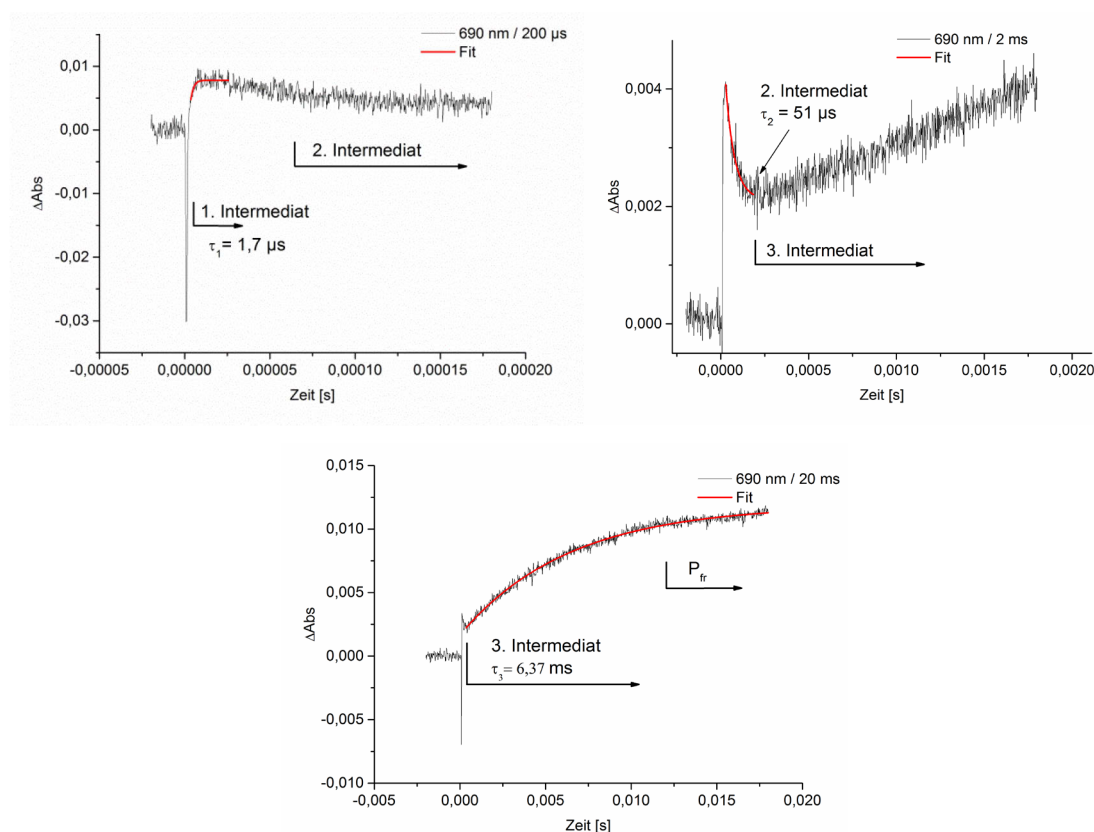


Abb. 5-14: Blitzlichtphotolysemessung von 2699gaf1 aus *Nostoc* sp. PCC 7120, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_{fr}$, Absorptionsverlauf bei 690 nm in den Zeitfenstern von 200 μ s, 2 ms und 20 ms.

Für die gegenläufige Konversion vom dunkelrot-absorbierenden Photoprodukt in den rot-absorbierenden Ausgangszustand liefern die LADS Lebenszeiten für zwei Intermediate (14,5 μ s; 884,1 μ s). Diese werden durch die Differenzspektren, die eine instantane Konversion zeigen, nicht bestätigt (Abb. 4-29 und Abb. 5-15). Das legt die Vermutung nahe, sofern tatsächlich Intermediate auftreten, dass diese zu schnell für unsere Messmethode sind oder dass die Bildung und der Zerfall der Intermediate zeitgleich erfolgen und somit keine Absorptionsänderung messbar ist.

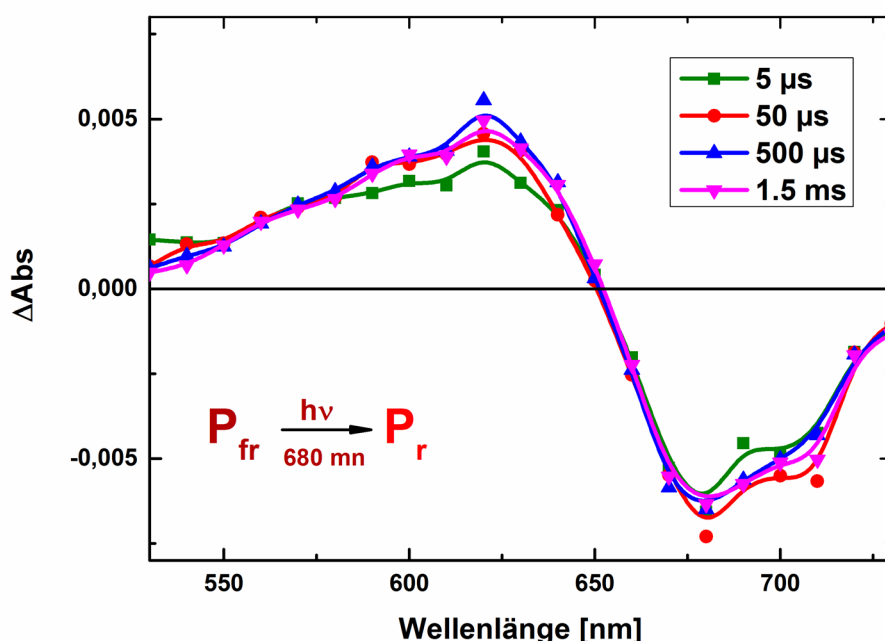


Abb. 5-15: Differenzspektren der P_r zu P_{fr} -Konversion von 2699gaf1 zu gewählten Zeiten .

Wie oben bereits erwähnt, bildet die GAF3-Domäne von AphC (all2699) ein sehr instabiles orange-absorbierendes Photoprodukt. Die Bildung dieses Photoproduktes zeigt bei den Ergebnissen der zeitaufgelösten Blitzlichtphotolyse in den LADS zwei Intermediate, wobei das erste mit einer Lebenszeit von 100 μ s praktisch keine Absorptionsänderungen aufweist. Das zweite LADS mit einer Lebenszeit von 2,23 ms zeigt den gesamten Absorptionsanteil an der Bildung des P_o Photoproduktes. Die Einzelspektren in Abb. 5-16 bestätigen dies, da sie ebenfalls über den gesamten detektierten Zeitbereich einen stetigen Absorptionsanstieg aufzeigen, der mit einer Lebenszeit von 2,32 ms in den P_o -Zustand übergeht. Somit lässt sich für die Bildung des Photoproduktes vermuten, dass entweder mögliche Intermediate deutlich schneller sind als diese Messung auflösen kann, oder dass eine im Vergleich zu anderen vermessenen Phytochromen abgewandelte Photochemie auftritt. Diese Resultate bestärken die

oben geäußerte Vermutung, dass dieses Protein in die Klasse der rot/grün CBCR gehört, wobei das orange-absorbierende Photoprodukt mit seiner deutlich geringeren Absorptionsverschiebung und sehr kurzen Lebenszeit möglicherweise ein gehindertes Intermediat darstellt und somit keine nachfolgenden Intermediate messbar sind, wie man es bei den zuvor beschriebenen Phytochromen findet.

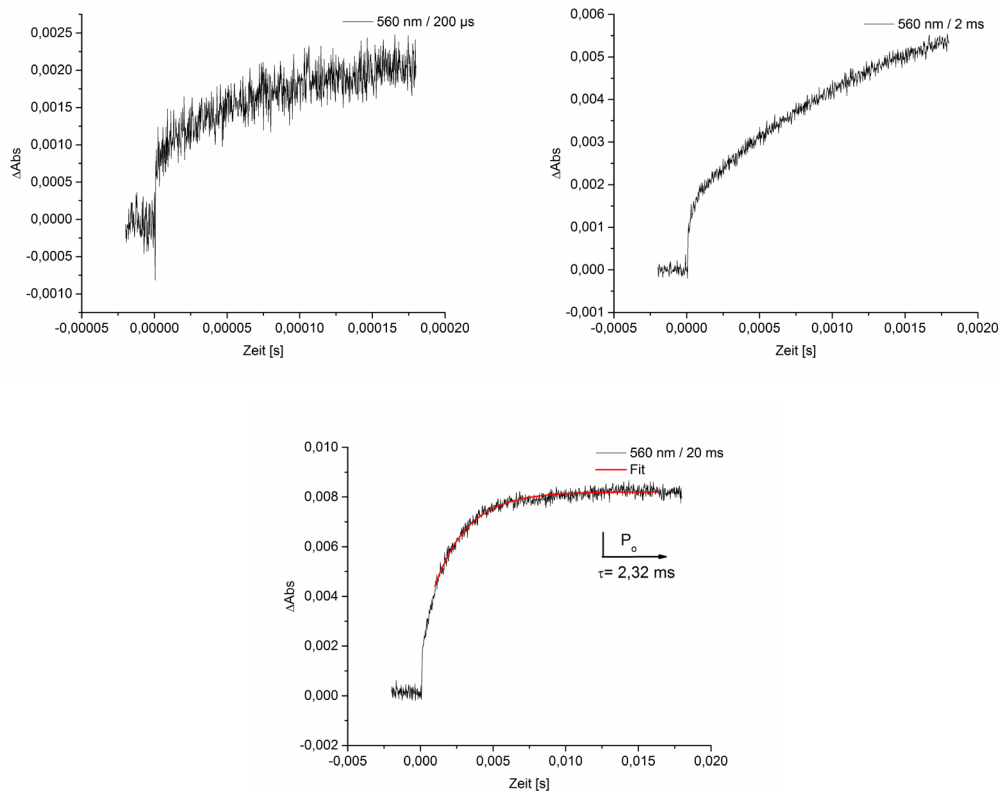


Abb. 5-16: Blitzlichtphotolysemessung von 2699gaf3 aus *Nostoc* sp. PCC 7120, Photokonversion von $P_r \rightarrow P_o$, Absorptionsverlauf bei 560 nm in den Zeitfenstern von 200 μs , 2 ms und 20 ms.

Die inverse Konversion aus dem Photoprodukt in den Ausgangszustand ist komplexer als die zuvor beschriebene Bildung des Photoproduktes und durchläuft entsprechend den LADS (Abb. 4-41) drei Intermediate ($\tau_1 = 28,1 \mu\text{s}$; $\tau_2 = 424,3 \mu\text{s}$; $\tau_3 = 2,38 \text{ ms}$). Die Betrachtung von Einzelspektren der drei Zeitfenster bei der Beobachtungswellenlänge von 640 nm zeigt nur zwei Intermediate ($\tau_1 = 32 \mu\text{s}$; $\tau_2 = 2 \text{ ms}$) (Abb. 5-17). Die ersten beiden Intermediate weisen dabei auf die Bildung des P_r -Zustandes hin, wohingegen das letzte Intermediat mit einer Lebenszeit von $\sim 2 \text{ ms}$ einen Zerfall dieses neu gebildeten Zustands beschreibt. Besonders deutlich wird dies bei der Betrachtung des 20 ms Zeitfensters. Auffallend ist hier, dass die Absorption abfällt, dieser Abfall jedoch nach 2 ms stagniert und keine nachfolgende Absorptionsänderung auftritt. Diese Beobachtung bestätigen die Differenzspektren (Abb. 5-17,

unten rechts). Sie zeigen nach 100 μs einen Peak bei $\sim 650\text{ nm}$, dem Maximum des P_r -Zustandes, mit einer Schulter bei $\sim 630\text{ nm}$. Zum letzten Zeitpunkt ist die Absorption bei 650 nm etwas kleiner, die Absorption der Schulter hat jedoch deutlich abgenommen. Der in den LADS und den Zeitfenstern gefundene Abfall der Absorption deckt sich mit dieser Differenz bei 630 nm und erklärt das Stagnieren des Absorptionsabfalls.

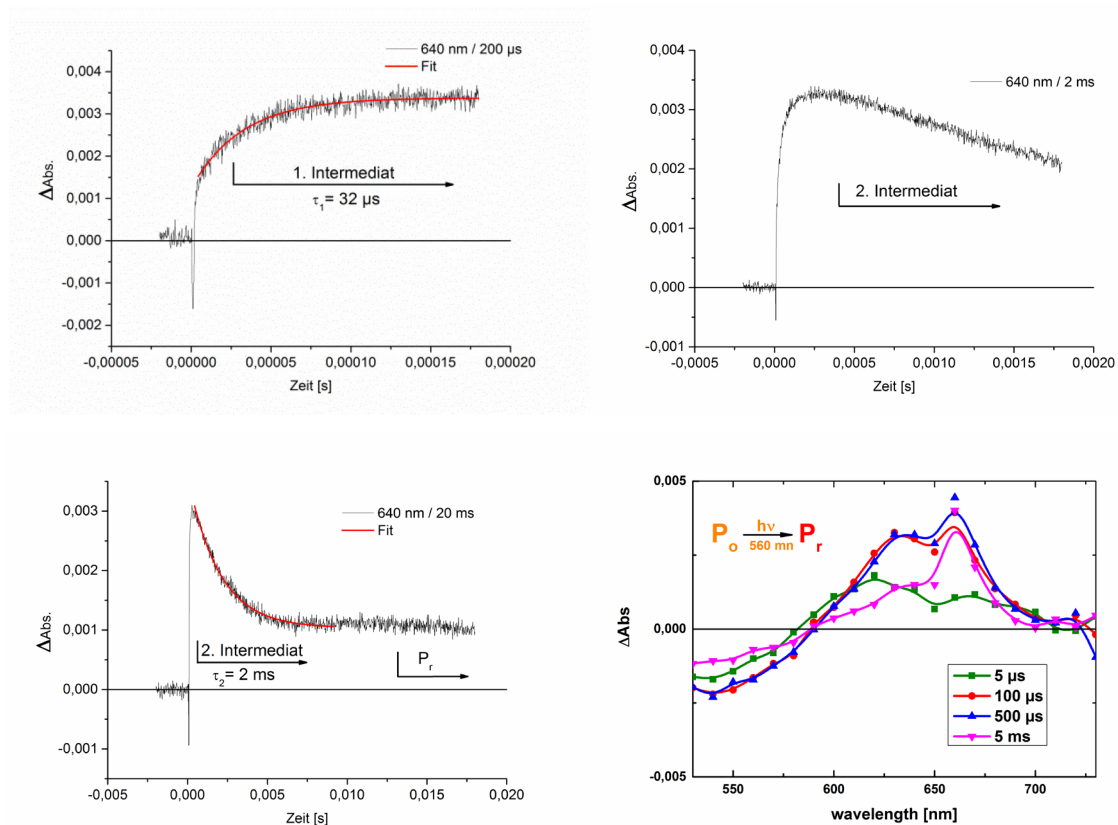


Abb. 5-17: Blitzlichtphotolysemessung von 2699gaf3 aus *Nostoc* sp. PCC 7120, Photokonversion von $P_o \rightarrow P_r$, Absorptionsverlauf bei 640 nm in den Zeitfenstern von $200\text{ }\mu\text{s}$, 2 ms und 20 ms . Differenzspektren der P_o zu P_r -Konversion von 2699gaf3 zu gewählten Zeiten (unten rechts).

Es lässt sich somit festhalten, dass bei der Konversion aus dem P_o Photoprodukt zunächst ein Intermediat mit einem Absorptionsmaximum bei 650 nm sowie einer Schulter bei 630 nm gebildet wird. Bei der endgültigen Ausbildung des P_r -Zustandes verschwindet diese Schulter fast vollkommen und das Absorptionsmaximum bei 650 nm wird bezogen auf die Absorption etwas kleiner.

Wie zuvor erwähnt, lässt sich vermuten, dass das außergewöhnliche orange-absorbierende Photoprodukt mit der sehr kurzen Rückkehrzeit in den P_r Ausgangszustand einen Intermediats-Zustand in einem nicht vollständigen Rot/Grün-Photozyklus darstellt. Um

diesen Umstand und die einzigartige Photochemie zu untersuchen, wurden Punktmutationen in die Aminosäuresequenz des Proteins eingeführt. Hierzu wurde mit Serin 487 eine Position ausgewählt, die im direkten Umfeld des Chromophors liegt und einen Einfluss auf ihn ausüben könnte. Serin wurde zum einen in das deutlich größere, positiv geladene Arginin mutiert, zum anderen wurde in diese Position ein Glycin (als kleinste mögliche Aminosäure) eingeführt.

Die stationären Absorptionsspektren der Mutanten S487R ($P_{r(max)} = 648 \text{ nm}$; $P_{o(max)} = 589 \text{ nm}$) und S487G ($P_{r(max)} = 645 \text{ nm}$; $P_{o(max)} = 575 \text{ nm}$) zeigten nur geringfügige Änderungen im Vergleich zum 2699gaf3 WT ($P_{r(max)} = 645 \text{ nm}$; $P_{o(max)} = 585 \text{ nm}$) (Abb. 4-31, Abb. 4-34 und Abb. 4-36). Dafür ist ihr Einfluss auf die beim WT mit $\sim 38 \text{ s}$ gemessene, sehr schnelle Dunkelkonversion vom Photoprodukt in den Grundzustand erheblich deutlicher (Abb. 4-32). Die Rückkehr-Kinetik der stationären Absorptionsmessung bei 645 nm weist für S487R bzw. S487G mit 20 min bzw. 31 min eine deutlich verlängerte Rückkehrzeit auf (Abb. 4-35 und Abb. 4-37). Das lässt in beiden Fällen auf ein durch die Mutation stabilisiertes Photoprodukt schließen.

Auf diese stabilisierende Wirkung weisen ebenso die Blitzlichtphotolyse-Messungen hin. Die Lebenszeiten der P_r zu P_o -Konversion, entsprechend der Bildung des Photoproduktes, sind deutlich geringer (angegeben wird hier das letzte Intermediat, WT: $\tau = 2,23 \text{ ms}$; S487R: $\tau = 507,7 \text{ }\mu\text{s}$; S487G: $\tau = 260 \text{ }\mu\text{s}$) (Abb. 4-40, Abb. 4-43 und Tab. 4-1). Für die inverse Konversion vom P_o - in den P_r -Zustand finden sich ebenso Hinweise für eine stabilisierende Wirkung der Mutanten auf das Photoprodukt.

Die S487G Mutante zeigt für die ersten beiden Intermediate der P_o zu P_r Konversion einen ähnlichen Absorptionsverlauf. Jedoch findet man für das zweite Intermediat eine doppelt so lange Lebenszeit, ausgenommen ist der Laserartefakt bei der S487G Mutante (S487G: $\tau_2 = 958,8 \text{ }\mu\text{s}$; WT: $\tau_2 = 424,3 \text{ }\mu\text{s}$) (Abb. 4-41 und Abb. 4-44). Auffällig ist, dass das in der Wildtypform auftauchende dritte Intermediat bei der Mutante nicht nachgewiesen wird. Die doppelt so lange Lebenszeit bestärkt den Hinweis auf das thermisch stabilere Photoprodukt, welches durch die Stabilitätserhöhung nicht so schnell in den Ausgangszustand übergeht wie der WT.

Ähnliche Beobachtungen sind für die S487R Mutante zu machen. In diesem Fall muss aufgrund nicht aussagekräftiger LADS auf den Vergleich von Einzelwellenlängenfits zwischen der Mutante und dem WT zurückgegriffen werden. Diese zeigen, wie für die S487G Mutante bei der Konversion vom Photoprodukt in den P_r-Zustand, einen ähnlichen Einfluss der Mutation, welcher zu einer etwa doppelt so langen Lebenszeit führt (Tab. 4-2).

Als ein weiteres Charakterisierungskriterium für den Einfluss der Mutationen auf die Photochemie bzw. speziell auf die Fluoreszenz und die damit verbundene Geometrie des Chromophors wurde die Stokes-Verschiebung bestimmt (Tab. 5-7). Sie gibt die Energiedifferenz zwischen dem Absorptionsmaximum und dem Maximum der Fluoreszenzemission an und wird üblicherweise in cm⁻¹ angegeben. Diese ist von der Interaktion des Chromophors mit dem Protein sowie der direkten Umgebung des Chromophors abhängig.

Tab. 5-7: Stokes-Verschiebung. Vergleich vom WT von 2699gaf3 und den dazugehörigen Mutanten.

Protein	Pr-Zustand [cm⁻¹]	Po-Zustand [cm⁻¹]
2699gaf3-WT	463	1390
2699gaf3-S487R	395	1373
2699gaf3-S487G	96	1717

Der Einfluss der Mutationen auf die Stokes-Verschiebung zeigt sich besonders deutlich für den P_r-Zustand. Dieser ist bei der Mutante S487R etwas kleiner, im Gegensatz dazu aber bei der Glycin-Mutante (S487G) erheblich kleiner. Dies ist ein Indiz für eine durch die Mutationen geänderte Geometrie des Proteins, die die Interaktion zwischen Chromophor und Protein beeinflusst. Der deutlich größere Einfluss der S487G Mutante kann auf die sehr kleine Aminosäure Glycin zurückzuführen sein. Eine Vermutung wäre, dass durch die kleinere Aminosäure der Chromophor enger am Proteinrückgrat liegt und daher beim Übergang in den angeregten Zustand keine große geometrische Änderung möglich ist.

1393gaf3

Das Cyanobacteriochrome RGS (slr1393) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzt drei GAF-Domänen. Mutationen zeigen, dass nur die GAF3-Domäne den Chromophor, im vorliegenden Fall das PCB, bindet (77). Die GAF3-Domäne zeigt 49% Übereinstimmung zu der Sequenz des zuvor erwähnten AnPixJ und durchläuft wie dieses einen Rot/Grün-Photozyklus. Im Gegensatz zu AnPixJ, welches eine langsame thermische Rückkehr des Photoprodukts in den Grundzustand aufweist, verbleibt 1393gaf3 nahezu vollständig thermisch stabil im grünabsorbierenden Photoprodukt (Abb. 4-46) (114). Untersuchungen der frühen photochemischen Reaktionen der Photokonversion des $P_r(15Z)$ - bzw. des $P_g(15E)$ -Zustandes mittels Transienter Absorptionsspektroskopie im Femtosekunden-Zeitbereich zeigen große Unterschiede der Reaktionsdynamiken im Vergleich zu anderen Rot/Grün CBCRs. Auffallend dabei ist vor allem die langsamere Kinetik der Isomerisierung beim Übergang in das primäre Photoprodukts (115).

In der vorliegenden Arbeit wurden die nachfolgenden Intermediate im Mikro- bis Millisekunden-Zeitbereich untersucht. In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 5-8) sind die Ergebnisse der Blitzlichtphotolysemessungen des *in vivo* assemblierten Wildtyps aus dem Global Fit und der *in vitro* assemblierten Variante, welche einen rotverschobenes Photoprodukt besitzt ($P_g(in\ vivo)_{\lambda_{max}} = 591\text{ nm}$; $P_g(in\ vitro)_{\lambda_{max}} = 538\text{ nm}$), aus Einzelwellenlängenfits zusammengefasst.

Tab. 5-8: Ergebnisse der Blitzlichtphotolysemessungen von 1393g3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Oben: Lebenszeiten der LADS für das *in vivo* assemblierte Protein. Unten: Lebenszeiten aus den Fits einzelner Zeitfenster für die angegebenen Wellenlängen des *in vitro* assemblierten Proteins (Die erste Wellenlänge beschreibt die Anregungswellenlänge, die zweite die Beobachtungswellenlänge). In Klammern sind die Lebenszeiten für die *in vivo* Variante angegeben, die ebenfalls aus Einzelwellenlängenfits ermittelt wurden.

WT (in vivo)	τ_1 [μ s]	τ_2 [μ s]	τ_3 [ms]
Pr $\rightarrow$ Pg	3,2	390	1,5
Pg $\rightarrow$ Pr	1,2	340	1,03
WT (in vitro)			
650/520	20 (26)	- (300)	2,4 (1,5)
540/650	1 (1,3)	24 (360)	1,5 (1)

Die Ergebnisse der Blitzlichtphotolyse des *in vivo* assemblierten Proteins zeigen für beide Photokonversionen drei Intermediate. Dabei findet sich in beiden Konversionen nur ein dominantes Intermediat, welches durch die Differenzspektren bestätigt wird (Abb. 4-55). Dies spiegelt die im Vergleich zu kanonischen Phytochromen simple Photochemie dieser CBCR GAF-Domäne wieder. Eine Erklärung dafür liegt vermutlich an der deutlich geringeren Größe dieser Proteine, die leichter der durch die Chromophor-Isomerisierung erzwungenen Konformationsänderungen folgen können.

Das *in vitro* assemblierte Protein zeigt ein hypsochromes Photoprodukt ($\lambda_{\max} = 590$ nm) und geringfügig längere Lebenszeiten der Intermediate, was auf einen Unterschied der Faltung der Polypeptidkette hindeuten kann. Dies bekräftigt der Unterschied in der Stoke-Verschiebung zwischen dem *in vivo* und *in vitro* assemblierten Protein.

Neben dem WT wurden drei Mutanten untersucht, die bereits einen großen Einfluss auf die steady-state Absorption des P_g-Photoproduktes aufweisen (Abb. 4-48 - Abb. 4-50). Diese zeigen bis auf die D531T Mutante, die ähnliche Lebenszeiten wie der WT besitzt, einen Einfluss auf die Lebenszeiten der Intermediate für beide Photokonversionen (Tab. 5-9).

Tab. 5-9 Ergebnisse der Blitzlichtphotolysemessungen der Mutanten von 1393g3 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803. Lebenszeiten aus den Fits einzelner Zeitfenster für die angegebenen Wellenlängen jeweils für die angegebene Mutante (die erste Wellenlänge beschreibt die Anregungswellenlänge, die zweite die Beobachtungswellenlänge). In Klammern sind die Lebenszeiten für WT der *in vivo* Variante angeben, die ebenfalls aus Einzelwellenlängenfits ermittelt wurden.

R508N	τ_1 [μs]	τ_2 [μs]	τ_3 [ms]
670/540	7,4 (26)	470 (300)	4,55 (1,5)
530/650	- (1,3)	113 (360)	0,45 (1)
D531T			
650/520	14 (26)	260 (300)	0,8 (1,5)
540/650	1,9 (1,3)	355 (360)	0,94 (1)
N532Y			
650/540	7,5 (26)	390 (300)	- (1,5)
650/710	2,5 (-)	470 (-)	- (-)
525/650	73 (1,3)	- (360)	6,2 (1)

Dieser Umstand zeigt, dass die AS R508 und N532 einen Einfluss auf die Protein-Chromophor Interaktion haben. Mutationen der AS D531, die etwas weiter entfernt liegt als die anderen beiden mutierten AS, zeigen hingegen keinen Einfluss.

6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit gibt einen breiten Überblick über die Kinetiken der Photokonversionen verschiedener Bilin-bindender Phytochrome als auch über die isolierten Chromophorbindenden GAF-Domänen der Cyanobacteriochrome. Dabei werden die vielfältigen photochemischen Eigenschaften und die damit verbundenen sehr variablen Photozyklen deutlich. Die BV-bindenden Phytochrome und *SynCph2*(1-2) aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 besitzen einen den klassischen Phytochromen vergleichbaren Rot/Dunkelrot Photozyklus, wohingegen, die Cyanobacteriochrome, die ausschließlich aus einer chromophorbindenden GAF-Domäne bestehen, mit einem Rot/Dunkelrot, Rot/Orange bzw. Rot/Grün Photozyklus die hohe spektrale Variabilität der Klasse der CBCRs aufzeigen.

Diese Variabilität sowie die Flexibilität der GAF-Domäne als auch die in einigen Fällen (wie hier bei 1393gaf3) hohe thermische Stabilität des Photoproduktes machen die CBCRs zu sehr interessanten Photorezeptoren in Bezug auf biologische Modifikation und Applikationen. Dazu zählen zum Beispiel die Optogenetik oder der Einsatz als Fluoreszenzmarker.

Um diese Einsatzmöglichkeiten zu gewährleisten, muss in nachfolgenden Arbeiten vor allem eine genauere Betrachtung der Signalweiterleitung zur letztendlichen biologischen Funktion erfolgen, die in den meisten Fällen einer Histidinkinase zugeordnet werden kann. Dies würde zudem eine Grundlage für Fusionen mit anderen Enzymaktivitäten darstellen, deren Aktivität so durch Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlänge an bzw. abgeschaltet werden kann.

7 Literaturverzeichnis

1. Kilian, U., and Aschemeier, R. (2012) *Das große Buch vom Licht*, Primus Verlag
2. Walther, T., and Walther, H. (2010) *Was ist Licht? Von der klassischen Optik zur Quantenoptik*, Verlag C. H. Beck
3. Hart, J. W. (1988) *Light and plant growth*, Unwin Hyman
4. Björn, L. O. (2015) *Photobiology: The Science of Life and Light*, Springer
5. Jablonski Diagramm, <http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence.html>.
Advanced Imaging Laboratory, University of Victoria
6. Lakowicz, J. R. (2007) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer
7. Christie, J. M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 21-45
8. Losi, A., and Gärtner, W. (2012) The Evolution of Flavin-Binding Photoreceptors: An Ancient Chromophore Serving Trendy Blue-Light Sensors. *Annual Review of Plant Biology* **63**, 49-72
9. van der Horst, M. A., Key, J., and Hellingwerf, K. J. (2007) Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends in microbiology* **15**, 554-562
10. Bèjà, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N., and DeLong, E. F. (2000) Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science* **289**, 1902-1906
11. Ernst, O. P., Lodowski, D. T., Elstner, M., Hegemann, P., Brown, L. S., and Kandori, H. (2014) Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms. *Chemical Reviews* **114**, 126-163
12. Batschauer, A. (2003) *Photoreceptors and Light Signalling*, Royal Society of Chemistry
13. Meyer, T. E. (1985) Isolation and characterization of soluble cytochromes, ferredoxins and other chromophoric proteins from the halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halophila*. *Biochimica et Biophysica Acta* **806**, 175-183
14. Pellequer, J. L., Wager-Smith, K. A., Kay, S. A., and Getzoff, E. D. (1998) Photoactive yellow protein: A structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5884-5890
15. Meyer, T. E., Kyndt, J. A., Memmi, S., Moser, T., Colón-Acevedo, B., Devreese, B., and Van Beeumen, J. J. (2012) The growing family of photoactive yellow proteins and their presumed functional roles. *Photochemical & Photobiological Sciences* **11**, 1495-1514
16. Yang, H. Q., Wu, Y. J., Tang, R. H., Liu, D., Liu, Y., and Cashmore, A. R. (2000) The C Termini of *Arabidopsis* Cryptochromes Mediate a Constitutive Light Response. *Cell* **103**, 815-827
17. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T., Batschauer, A., and Ahmad, M. (2011) The Cryptochromes: Blue Light Photoreceptors in Plants and Animals. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 335-364
18. Sancar, A. (2003) Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *Chemical Reviews* **103**, 2203-2237
19. Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., and Lin, C. (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* **16**, 684-691

20. Wang, J., Du, X., Pan, W., Wang, X., and Wu, W. (2015) Photoactivation of the cryptochrome/photolyase superfamily. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **22**, 84-102
21. Liu, Z., Wang, L., and Zhong, D. (2015) Dynamics and mechanisms of DNA repair by photolyase. *Physical Chemistry Chemical Physics* **17**, 11933-11949
22. Kneuttinger, A. C., Kashiwazaki, G., Prill, S., Heil, K., Müller, M., and Carell, T. (2013) Formation and Direct Repair of UV-induced Dimeric DNA Pyrimidine Lesions. *Photochemistry and Photobiology* **90**, 1-14
23. Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A., and Getzoff, E. D. (2003) Identification of a New Cryptochrome Class. Structure, Function, and Evolution. *Molecular cell* **11**, 59-67
24. Mei, Q., and Dvornyk, V. (2015) Evolutionary History of the Photolyase/Cryptochrome Superfamily in Eukaryotes. *PLoS One* **10**
25. Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E., and Briggs, W. R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A Protein Kinase with a Putative Redox-Sensing Domain. *Science* **278**, 2120-2123
26. Jurk, M., Dorn, M., Kikhney, A., Svergun, D., Gärtner, W., and Schmieder, P. (2010) The Switch that Does Not Flip: The Blue-Light Receptor YtvA from *Bacillus subtilis* Adopts an Elongated Dimer Conformation Independent of the Activation State as Revealed by a Combined AUC and SAXS Study. *Journal of molecular biology* **403**, 78-87
27. van der Horst, M. A., and Hellingwerf, K. J. (2004) Photoreceptor Proteins, "Star Actors of Modern Times": A Review of the Functional Dynamics in the Structure of Representative Members of Six Different Photoreceptor Families. *Accounts of chemical research* **37**, 13-20
28. Losi, A., and Gärtner, W. (2011) Old Chromophores, New Photoactivation Paradigms, Trendy Applications: Flavins in Blue Light-Sensing Photoreceptors. *Photochemistry and Photobiology* **87**, 491-510
29. Moran, L. A., and Horton, H. R. (2012) *Principles of Biochemistry*, Pearson
30. Herrou, J., and Crosson, S. (2011) Function, structure and mechanism of bacterial photosensory LOV proteins. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 713-723
31. Möglich, A., and Moffat, K. (2007) Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA. *Journal of molecular biology* **373**, 112-126
32. Raffelberg, S., Mansurova, M., Gärtner, W., and Losi, A. (2011) Modulation of the Photocycle of a LOV Domain Photoreceptor by the Hydrogen-Bonding Network. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 5346-5356
33. Mehlhorn, J., Lindtner, T., Richter, F., Glaß, K., Steinocher, H., Beck, S., Hegemann, P., Kennis, J. T., and Mathes, T. (2015) Light-Induced Rearrangement of the beta5 Strand in the BLUF Photoreceptor SyPixD (Slr1694). *The Journal of Physical Chemistry Letters* **6**, 4749-4753
34. Losi, A. (2007) Flavin-based Blue-light Photosensors: A Photobiophysics Update. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 1283-1300
35. Masuda, S. (2013) Light Detection and Signal Transduction in the BLUF Photoreceptors. *Plant & Cell Physiology* **54**, 171-179
36. Jung, A., Reinstein, J., Domratcheva, T., Shoeman, R. L., and Schlichting, I. (2006) Crystal Structures of the AppA BLUF Domain Photoreceptor Provide Insights into Blue Light-mediated Signal Transduction. *Journal of molecular biology* **362**, 717-732
37. Jung, A., Domratcheva, T., Tarutina, M., Wu, Q., Ko, W. H., Shoeman, R. L., Gomelsky, M., Gardner, K. H., and Schlichting, I. (2005) Structure of a bacterial

- BLUF photoreceptor: Insights into blue light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 12350-12355
38. Fudim, R., Mehllhorn, J., Berthold, T., Weber, S., Schleicher, E., Kennis, J. T., and Mathes, T. (2015) Photoinduced formation of flavin radicals in BLUF domains lacking the central glutamine. *FEBS Journal* **282**, 3161-3174
 39. Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A., and Borner, T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**, 663
 40. Rockwell, N. C., and Lagarias, J. C. (2010) A Brief History of Phytochromes. *ChemPhysChem* **11**, 1172-1180
 41. Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M., and Vierstra, R. D. (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochemical Journal* **392**, 103-116
 42. Rockwell, N. C., Su, Y. S., and Lagarias, J. C. (2006) Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 837-858
 43. Gärtner, W. (2010) Lights on: A Switchable Fluorescent Biliprotein. *ChemBioChem* **11**, 1649-1652
 44. Warren, M., and Smith, A. (2009) *Tetrapyrroles: Birth, Life and Death*, Springer New York
 45. Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W., and Hendricks, S. B. (1959) Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **45**, 1703-1708
 46. Clack, T., Mathews, S., and Sharrock, R. A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of *PHYD* and *PHYE*. *Plant molecular biology* **25**, 413-427
 47. Whitelam, G. C., Patel, S., and Devlin, P. F. (1998) Phytochromes and photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **353**, 1445-1453
 48. Rockwell, N. C., and Lagarias, J. C. (2006) The Structure of Phytochrome: A Picture Is Worth a Thousand Spectra. *The Plant cell* **18**, 4-14
 49. Devlin, P. F., Yanovsky, M. J., and Kay, S. A. (2003) A Genomic Analysis of the Shade Avoidance Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**, 1617-1629
 50. Schäfer, E., and Nagy, F. (2006) *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria: Function and Signal Transduction Mechanisms*, Springer Netherlands
 51. Briggs, W. R., and Spudich, J. L. (2006) *Handbook of Photosensory Receptors*, Wiley
 52. Kim, P. W., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., and Larsen, D. S. (2014) Dynamic Inhomogeneity in the Photodynamics of Cyanobacterial Phytochrome Cph1. *Biochemistry* **53**, 2818-2826
 53. Kim, P. W., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., and Larsen, D. S. (2014) Heterogeneous Photodynamics of the P_{fr} state in the Cyanobacterial Phytochrome Cph1. *Biochemistry* **53**, 4601-4611
 54. Jorissen, H. J. M. M., Quest, B., Remberg, A., Coursin, T., Braslavsky, S. E., Schaffner, K., Tandeau de Marsac, N., and Gärtner, W. (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *European Journal of Biochemistry* **269**, 2662-2671
 55. Essen, L. O., Mailliet, J., and Hughes, J. (2008) The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 14709-14714
 56. Anders, K., Daminelli-Widany, G., Mroginiski, M. A., von Stetten, D., and Essen, L. O. (2013) Structure of the Cyanobacterial Phytochrome 2 Photosensor Implies a

- Tryptophan Switch for Phytochrome Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 35714-35725
57. Anders, K., Gutt, A., Gärtner, W., and Essen, L. O. (2014) Phototransformation of the Red Light Sensor Cyanobacterial Phytochrome 2 from *Synechocystis* Species Depends on Its Tongue Motifs. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 25590-25600
 58. Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776-779
 59. Auldrige, M. E., and Forest, K. T. (2011) Bacterial phytochromes: More than meets the light. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **46**, 67-88
 60. Karniol, B., and Vierstra, R. D. (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 2807-2812
 61. Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B., and Verméglio, A. (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* **417**, 202-205
 62. Tasler, R., Moises, T., and Frankenberg-Dinkel, N. (2005) Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Journal* **272**, 1927-1936
 63. Purschwitz, J., Müller, S., Kastner, C., and Fischer, R. (2006) Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 566-571
 64. Corrochano, L. M. (2011) Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus* **2**, 25-28
 65. Fuller, K. K., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2015) Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Current Genetics* **61**, 275-288
 66. Fuller, K. K., Ringelberg, C. S., Loros, J. J., and Dunlap, J. C. (2013) The Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus* Regulates Growth, Metabolism, and Stress Resistance in Response to Light. *mBio* **4**
 67. Brandt, S., von Stetten, D., Günther, M., Hildebrandt, P., and Frankenberg-Dinkel, N. (2008) The Fungal Phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 34605-34614
 68. Ikeuchi, M., and Ishizuka, T. (2008) Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences* **7**, 1159-1167
 69. Rockwell, N. C., Ohlendorf, R., and Möglich, A. (2013) Cyanobacteriochromes in full color and three dimensions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 806-807
 70. Ma, Q., Hua, H. H., Chen, Y., Liu, B. B., Krämer, A. L., Scheer, H., Zhao, K. H., and Zhou, M. (2012) A rising tide of blue-absorbing biliprotein photoreceptors: characterization of seven such bilin-binding GAF domains in *Nostoc* sp. PCC7120. *FEBS Journal* **279**, 4095-4108
 71. Burgie, E. S., Walker, J. M., Phillips, G. N., Jr., and Vierstra, R. D. (2013) A Photo-Labile Thioether Linkage to Phycoviolobilin Provides the Foundation for the Blue/Green Photocycles in DXCF-Cyanobacteriochromes. *Structure* **21**, 88-97
 72. Ishizuka, T., Kamiya, A., Suzuki, H., Narikawa, R., Noguchi, T., Kohchi, T., Inomata, K., and Ikeuchi, M. (2011) The Cyanobacteriochrome, TePixJ, Isomerizes Its Own Chromophore by Converting Phycocyanobilin to Phycoviolobilin. *Biochemistry* **50**, 953-961
 73. Rockwell, N. C., Martin, S. S., Gulevich, A. G., and Lagarias, J. C. (2012) Phycoviolobilin Formation and Spectral Tuning in the DXCF Cyanobacteriochrome Subfamily. *Biochemistry* **51**, 1449-1463

74. Rockwell, N. C., Martin, S. S., Gan, F., Bryant, D. A., and Lagarias, J. C. (2015) NpR3784 is the prototype for a distinctive group of red/green cyanobacteriochromes using alternative Phe residues for photoproduct tuning. *Photochemical & Photobiological Sciences* **14**, 258-269
75. Fukushima, Y., Iwaki, M., Narikawa, R., Ikeuchi, M., Tomita, Y., and Itoh, S. (2011) Photoconversion Mechanism of a Green/Red Photosensory Cyanobacteriochrome AnPixJ: Time-Resolved Optical Spectroscopy and FTIR Analysis of the AnPixJ-GAF2 Domain. *Biochemistry* **50**, 6328-6339
76. Rockwell, N. C., Martin, S. S., and Lagarias, J. C. (2012) Red/green Cyanobacteriochromes: Sensors of Color and Power. *Biochemistry* **51**, 9667-9677
77. Chen, Y., Zhang, J., Luo, J., Tu, J. M., Zeng, X. L., Xie, J., Zhou, M., Zhao, J. Q., Scheer, H., and Zhao, K. H. (2012) Photophysical diversity of two novel cyanobacteriochromes with phycocyanobilin chromophores: photochemistry and dark reversion kinetics. *FEBS Journal* **279**, 40-54
78. Xu, X. L., Gutt, A., Mechelke, J., Raffelberg, S., Tang, K., Miao, D., Valle, L., Borsarelli, C. D., Zhao, K. H., and Gärtner, W. (2014) Combined Mutagenesis and Kinetics Characterization of the Bilin-Binding GAF Domain of the Protein Slr1393 from the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *ChemBioChem* **15**, 1190-1199
79. Terauchi, K., Montgomery, B. L., Grossman, A. R., Lagarias, J. C., and Kehoe, D. M. (2004) RcaE is a complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Molecular Microbiology* **51**, 567-577
80. Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M., and Ikeuchi, M. (2010) Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in *Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 8854-8859
81. Hirose, Y., Rockwell, N. C., Nishiyama, K., Narikawa, R., Ukaji, Y., Inomata, K., Lagarias, J. C., and Ikeuchi, M. (2013) Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 4974-4979
82. Rockwell, N. C., Martin, S. S., and Lagarias, J. C. (2012) Mechanistic Insight into the Photosensory Versatility of DXCF Cyanobacteriochromes. *Biochemistry* **51**, 3576-3585
83. Narikawa, R., Enomoto, G., Ni Ni, W., Fushimi, K., and Ikeuchi, M. (2014) A New Type of Dual-Cys Cyanobacteriochrome GAF Domain Found in Cyanobacterium *Acaryochloris marina*, Which Has an Unusual Red/Blue Reversible Photoconversion Cycle. *Biochemistry* **53**, 5051-5059
84. Rockwell, N. C., Martin, S. S., Gulevich, A. G., and Lagarias, J. C. (2014) Conserved Phenylalanine Residues Are Required for Blue-Shifting of Cyanobacteriochrome Photoproducts. *Biochemistry* **53**, 3118-3130
85. Song, C., Narikawa, R., Ikeuchi, M., Gärtner, W., and Matysik, J. (2015) Color Tuning in Red/Green Cyanobacteriochrome AnPixJ: Photoisomerization at C15 Causes an Excited-State Destabilization. *The Journal of Physical Chemistry* **119**, 9688-9695
86. Velazquez Escobar, F., Utesch, T., Narikawa, R., Ikeuchi, M., Mroginiski, M. A., Gärtner, W., and Hildebrandt, P. (2013) Photoconversion Mechanism of the Second GAF Domain of Cyanobacteriochrome AnPixJ and the Cofactor Structure of Its Green-Absorbing State. *Biochemistry* **52**, 4871-4880
87. Narikawa, R., Ishizuka, T., Muraki, N., Shiba, T., Kurisu, G., and Ikeuchi, M. (2013) Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 918-923

88. Kehoe, D. M., and Gutu, A. (2006) Responding to Color: The Regulation of Complementary Chromatic Adaptation. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 127-150
89. Rockwell, N. C., Martin, S. S., and Lagarias, J. C. (2015) Identification of DXCF cyanobacteriochrome lineages with predictable photocycles. *Photochemical & Photobiological Sciences* **14**, 929-941
90. Rockwell, N. C., Martin, S. S., Feoktistova, K., and Lagarias, J. C. (2011) Diverse two-cysteine photocycles in phytochromes and cyanobacteriochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 11854-11859
91. Enomoto, G., Hirose, Y., Narikawa, R., and Ikeuchi, M. (2012) Thiol-Based Photocycle of the Blue and Teal Light-Sensing Cyanobacteriochrome Tlr1999. *Biochemistry* **51**, 3050-3058
92. Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X., and Ikeuchi, M. (2004) Cyanobacterial Phytochrome-like PixJ1 Holoprotein Shows Novel Reversible Photoconversion Between Blue- and Green-absorbing Forms. *Plant Cell Physiology* **45**, 1729-1737
93. Gottlieb, S. M., Kim, P. W., Corley, S. C., Madsen, D., Hanke, S. J., Chang, C. W., Rockwell, N. C., Martin, S. S., Lagarias, J. C., and Larsen, D. S. (2014) Primary and Secondary Photodynamics of the Violet/Orange Dual-Cysteine NpF2164g3 Cyanobacteriochrome Domain from *Nostoc punctiforme*. *Biochemistry* **53**, 1029-1040
94. iba-lifesciences. (2014) Expression and purification of proteins using Strep-tag® or Twin-Strep-tag® - A comprehensive manual.
95. Reider, G. A. (2013) *Photonik: Eine Einführung in die Grundlagen*, Springer Vienna
96. Linschitz, H., and Kasche, V. (1967) Kinetics of Phytochrome Conersion: Multiple Pathways in the P_r to P_{fr} Reaction, as studied by Double-Flash Technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **58**, 1059-1064
97. Ruzsicska, B. P., Braslavsky, S. E., and Schaffner, K. (1985) The Kinetics of the Early Stages of the Phytochrome Phototransformation P_r - P_{fr}. A Comparative-Study of Small (60 kDalton) and Native (124 kDalton) Phytochromes from Oat. *Photochemistry and Photobiology* **41**, 681-688
98. Zhang, C. F., Farrens, D. L., Björling, S. C., Song, P. S., and Kliger, D. S. (1992) Time-Resolved Absorption Studies of Native Etiolated Oat Phytochrome. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 4569-4580
99. Chen, E., Lapko, V. N., Lewis, J. W., Song, P. S., and Kliger, D. S. (1996) Mechanism of Native Oat Phytochrome Photoreversion: A Time-Resolved Absorption Investigation. *Biochemistry* **35**, 843-850
100. Kendrick, R. E., and Spruit, C. J. (1977) Phototransformations Of Phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **26**, 201-214
101. Eilfeld, P., and Rüdiger, W. (1985) Absorption-Spectra of Phytochrome Intermediates. *Zeitschrift für Naturforschung C* **40c**, 109-114
102. Braslavsky, S. E., Gärtner, W., and Schaffner, K. (1997) Phytochrome photoconversion. *Plant Cell and Environment* **20**, 700-706
103. Schmidt, P., Westphal, U. H., Worm, K., Braslavsky, S. E., Gärtner, W., and Schaffner, K. (1996) Chromophore-protein interaction controls the complexity of the phytochrome photocycle. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **34**, 73-77
104. Schmidt, P., Gensch, T., Remberg, A., Gärtner, W., Braslavsky, S. E., and Schaffner, K. (1998) The Complexity of the P_r to P_{fr} Phototransformation Kinetics Is an Intrinsic Property of Native Phytochrome. *Photochemistry and Photobiology* **68**, 754-761
105. Chizhov, I., Zorn, B., Manstein, D. J., and Gärtner, W. (2013) Kinetic and Thermodynamic Analysis of the Light-induced Processes in Plant and Cyanobacterial Phytochromes. *Biophysical Journal* **105**, 2210-2220

106. Remberg, A., Lindner, I., Lamparter, T., Hughes, J., Kneip, C., Hildebrandt, P., Braslavsky, S. E., Gärtner, W., and Schaffner, K. (1997) Raman Spectroscopic and Light-Induced Kinetic Characterization of a Recombinant Phytochrome of the Cyanobacterium *Synechocystis*. *Biochemistry* **36**, 13389-13395
107. van Thor, J. J., Borucki, B., Crielard, W., Otto, H., Lamparter, T., Hughes, J., Hellingwerf, K. J., and Heyn, M. P. (2001) Light-Induced Proton Release and Proton Uptake Reactions in the Cyanobacterial Phytochrome Cph1. *Biochemistry* **40**, 11460-11471
108. Song, C., Rohmer, T., Tiersch, M., Zaanen, J., Hughes, J., and Matysik, J. (2013) Solid-State NMR Spectroscopy to Probe Photoactivation in Canonical Phytochromes. *Photochemistry and Photobiology* **89**, 259-273
109. Dasgupta, J., Frontiera, R. R., Taylor, K. C., Lagarias, J. C., and Mathies, R. A. (2009) Ultrafast excited-state isomerization in phytochrome revealed by femtosecond stimulated Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 1784-1789
110. Andel, F., 3rd, Lagarias, J. C., and Mathies, R. A. (1996) Resonance Raman Analysis of Chromophore Structure in the Lumi-R Photoproduct of Phytochrome. *Biochemistry* **35**, 15997-16008
111. Rohmer, T., Lang, C., Bongards, C., Gupta, K. B., Neugebauer, J., Hughes, J., Gärtner, W., and Matysik, J. (2010) Phytochrome as Molecular Machine: Revealing Chromophore Action during the $P_{fr} \rightarrow P_r$ Photoconversion by Magic-Angle Spinning NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 4431-4437
112. Wu, S. H., and Lagarias, J. C. (2000) Defining the Bilin Lyase Domain: Lessons from the Extended Phytochrome Superfamily. *Biochemistry* **39**, 13487-13495
113. Gärtner, W., Hill, C., Worm, K., Braslavsky, S. E., and Schaffner, K. (1996) Influence of expression system on chromophore binding and preservation of spectral properties in recombinant phytochrome A. *European Journal of Biochemistry* **236**, 978-983
114. Narikawa, R., Fukushima, Y., Ishizuka, T., Itoh, S., and Ikeuchi, M. (2008) A Novel Photoactive GAF Domain of Cyanobacteriochrome AnPixJ That Shows Reversible Green/Red Photoconversion. *Journal of molecular biology* **380**, 844-855
115. Slavov, C., Xu, X., Zhao, K. H., Gärtner, W., and Wachtveitl, J. (2015) Detailed insight into the ultrafast photoconversion of the cyanobacteriochrome Slr1393 from *Synechocystis* sp. *Biochimica et Biophysica Acta* **1847**, 1335-1344

8 Anhang

8.1 Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Arbeitserklärung

Ich versichere, die vorliegende Abschlussarbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen deutlich als solche gekennzeichnet habe. Diese Abschlussarbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland als Prüfungsarbeit vorgelegt.

Krefeld, den

Unterschrift