

**NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Struktur und
Dynamik des Chromophors im cyanobakteriellen
Phytochrom 1 aus *Synechocystis* PCC6803**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Diplom-Biochemikerin
Janina Hahn
aus Halberstadt

November 2008

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2004 bis November 2008 in der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Schmieder in der Abteilung „NMR-unterstützte Strukturforschung“ am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin-Buch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Hartmut Oschkinat (Freie Universität Berlin)
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Saenger (Freie Universität Berlin)

Disputation am 16. April 2009

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muß sie für fertig erklären, wenn man nach
Zeit und Umständen das möglichste getan hat“.*

Goethe nach seiner Arbeit an „Iphigenie auf Tauris“

Meinem Vater in Erinnerung

Danksagung

Bei dem Versuch, mein möglichstes zu tun, hatte ich Unterstützung und Zuspruch von sehr vielen Menschen. Daher möchte ich all jenen danken, die - mehr oder weniger, auf diese oder jene Art und Weise und wohl oder übel, - zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Peter Schmieder für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und die sehr gute Zusammenarbeit, für seine Geduld beim Erklären von NMR-Experimenten, seine Nachsicht und sein Verständnis gerade während stressiger Phasen dieser Promotion sowie für seine Unterstützung bei Aufgaben und Problemen auch abseits des Laboralltages und bei meiner Tätigkeit in der Doktorandenvertretung des Instituts.

Prof. Dr. Hartmut Oschkinat danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Prof. Dr. Jon Hughes verdanke ich meine Begeisterung für die spannende und farbenfrohe Welt der Photorezeptorproteine und auch einen erheblichen Teil meines Wissens darüber. Danke auch für Deine Unnachgiebigkeit, Deinen Ansporn und dass man mit Dir auch eine schöne Zeit ohne Phytochrome haben kann.

Allen meinen Mitstreitern, die mit mir auf dem langen und steinigen Pfad der Doktoranden unterwegs waren, danke ich für ihre Unterstützung und ihre Freundschaft. Vivien, Matze, Christian, Matthias, Sabine, Johanna, Stefan, Marco und Ihr anderen – man konnte mit Euch immer über die eigene Arbeit diskutieren aber man konnte mit Euch auch immer prima die Arbeit vergessen. Für all das danke ich Euch von ganzem Herzen!

Ein großer Dank geht auch an Dr. Anne Diehl für ihr stets offenes Ohr und ihre Unterstützung bei Problemen in der Laborarbeit und außerhalb. Allen anderen Kollegen in den Labors und zahlreichen Büros der Arbeitsgruppe aber auch in den Werkstätten und im Rest des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Prof. Dr. Hugo Scheer danke ich für die Bereitschaft, mich für kurze Zeit zu Studienzwecken in seine Arbeitsgruppe an der Ludwig-Maximilian-Universität München aufzunehmen, Dr. Michaela Kupka und Claudia Bubenzer für die ihre, mich in nur einer Woche in die Geheimnisse der Biliproteinaufreinigung einzuweihen und mir die Herzlichkeit der Münchener zu zeigen.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jon Hughes an der Justus-Liebig-Universität Giessen, speziell Matti, Jutta, Kathi, Jo, Tina, George, Ilse und Melanie gilt mein Dank für eine freundschaftliche Zusammenarbeit und drei mir immer in Erinnerung bleibende, gemeinsam verlebte Photobiologie-Tagungen.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, ganz besonders bei meinem Schatz Georg sowie bei Pascal und Antje, denen ich immer mein Herz ausschütten kann und mit denen sich so herrlich der Alltag für kurze Zeit ausblenden lässt. Danke, dass Ihr mich so nehmt, wie ich bin! Ich danke David für die vielen wissenschaftlich und nicht-wissenschaftlich verquatschten Abende im „Weinsalon“ und Torsten für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Liebe Mutti, lieber Volker, lieber Basti, liebe Familie – ich danke Euch für Eure Liebe, dafür, dass Ihr immer für mich da seid und dass Ihr mich bei allem, was ich tue, begleitet und unterstützt.

*“There is a theory which states
that if ever anybody discovers exactly what the Universe is for and why it is here,
it will instantly disappear and be replaced by something even more bizarre and
inexplicable...*

There is another theory which states that this has already happened.”

*Douglas Adams
The restaurant at the end of the Universe*

Inhalt

1. Kurzdarstellung	9
2. Einleitung	11
2.1. Licht als abiotischer Umweltfaktor	11
2.2. Photosynthese	11
2.2.1. Die Lichtreaktion	12
2.2.2. Akzessorische Pigmente	13
2.2.3. Phycobiliproteine	14
2.3. Photomorphogenese	17
2.3.1. Photorezeptoren in Pflanzen	18
2.3.2. Pflanzliche Phytochrome	18
2.3.3. Phytochrome anderer Taxa	24
2.3.4. Cyanobakterielles Phytochrom 1, Cph1	25
2.4. Bisherige strukturelle Untersuchungen	28
2.4.1. NMR-Spektroskopie	29
2.4.2. Schwingungsspektroskopische Methoden	30
2.4.3. Untersuchungen mit Chromophor-Analoga und ortsgerichtete Mutagenese	30
2.4.4. Röntgenstrukturanalyse	32
2.5. Zielstellung	36
3. Material und Methoden	40
3.1. Proteinherstellung	40
3.1.1. Plasmide und Stämme	40
3.1.2. Medien	41
3.1.3. Proteinexpression	42
3.1.4. Proteinaufreinigung	44
3.2. Chromophorherstellung	46
3.2.1. <i>Synechocystis</i> PCC6803 Zellkultur	46
3.2.2. PBS Isolation und PCB Präparation	47
3.2.3. PCB Präparation aus <i>Spirulina platensis</i>	48
3.3. Präparation von markiertem α -C-Phycocyanin aus <i>Mastigocladus laminosus</i>	48
3.3.1. <i>Mastigocladus laminosus</i> Zellkultur	49
3.3.2. PBS Isolation and Biliprotein-Auftrennung	50
3.3.3. Trennung der C-Phycocyanin α - und β -Untereinheiten	51
3.4. NMR Probenpräparation	52
3.4.1. <i>holo-Cph1Δ2</i>	52
3.4.2. Phototransformation	52
3.4.3. α -C-Phycocyanin	53
3.5. NMR-Spektroskopie	53
4. Präparation von Cph1Δ2 und α-C-Phycocyanin	55
4.1. Präparation von [2 H]-Cph1 Δ 2 mit [1 H]- oder [13 C/ 15 N]-PCB	55
4.2. Präparation von α -C-Phycocyanin	57

5. Resultate: Protonierungszustand des Chromophors in P_r und P_{fr}	61
5.1. α -C-Phycocyanin als Modellsystem	61
5.2. [¹⁵ N]-HMQC und NOESY von α -C-Phycocyanin	62
5.3. [¹⁵ N]-HMQC und [¹⁵ N]-1D von Cph1 Δ 2	64
5.4. Diskussion	68
6. Resultate: Räumliche Struktur des Chromophors in P_r und P_{fr}	71
6.1. [¹³ C]-HMQC	71
6.2. 2D-NOESY und 3D-HMQC-NOESY	72
6.3. [¹³ C]-HMQC und 3D-HMQC-NOESY mit [² H]-Cph1 Δ 2 + [¹³ C]-PCB + [¹ H]-Phe/Tyr	79
6.4. Diskussion	82
7. Resultate: Chromophor-Dynamik	84
8. Abschließende Diskussion	87
9. Zusammenfassung / Summary	89
10. Literatur	92
11. Abbildungen	111
12. Tabellen	113
13. Abkürzungen	114
14. Publikationsliste	116

1. Kurzdarstellung

Biliproteine – Proteine mit kovalent gebundenem Tetrapyrrol-Kofaktor (Bilin) - findet man in ganz unterschiedlichen Lebewesen. Sie spielen zum einen eine wichtige Rolle als akzessorische Pigmente in photosynthetischen Organismen (Kapitel 2.2.), zum anderen steuern sie als photomorphogenetische Photorezeptoren diverse Entwicklungsprozesse in Pflanzen, Cyanobakterien, nicht-photosynthetischen Bakterien und sogar Pilzen. Phytochrome sind solche Photorezeptoren, die das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen in Abhängigkeit von langwelligem sichtbarem Licht vermitteln. Sie messen das Verhältnis von rotem zu dunkelrotem Licht und erlauben es den Organismen so, vorherrschende Lichtverhältnisse wie Schatten (Rotlicht-arm) oder direkte Sonne (Rotlicht-reich) zu detektieren und darauf zu reagieren. Damit steuern Phytochrome physiologische Prozesse wie z.B. Samenkeimung, De-Etiolierung und Blütenbildung.

Als Biliproteine bestehen auch Phytochrome aus einer Apoprotein-Komponente, an die ein linearer Tetrapyrrol-Chromophor kovalent gebunden ist. Sie existieren in zwei thermodynamisch stabilen Formen mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima im roten (P_r -Form) bzw. dunkelroten (P_{fr} -Form) Wellenlängenbereich. Die beiden Konformationsisomere können mittels Licht reversibel ineinander überführt werden (Photokonversion). So kann effektiv zwischen einem physiologisch inaktiven Grundzustand und einem physiologisch aktiven Signalzustand hin und her „geschaltet“ werden (Kapitel 2.3.).

Apoprotein und Chromophor wechselwirken miteinander, um Lichtsignale zu detektieren und adäquat darauf zu reagieren. Um ein detailliertes Verständnis dieser Struktur-Funktionsbeziehungen zu erlangen, ist zunächst die strukturelle Charakterisierung des Systems von Nöten. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten, die im Rahmen dieser Dissertation vorgenommen wurden, gab es bereits einige Ergebnisse struktureller Untersuchungen an Phytochromen unterschiedlicher Taxa (Kapitel 2.4.). Die dreidimensionale Struktur von Phytochrom-Proteinen war jedoch zunächst noch unbekannt. 2005 gelang erstmals die Kristallisation und Strukturbestimmung der P_r -Form eines Phytochrom-Fragmentes aus dem nicht-photosynthetischen Bakterium *Deinococcus radiodurans* (DrBphP). Obwohl zweifelsfrei ein Meilenstein in der Phytochrom-Forschung beantwortete diese Struktur nicht alle diskutierten Fragen. Das kristallisierte Fragment konnte nicht photokonvertieren, Fragen zur Struktur der P_{fr} -Form sowie generell zum Photokonversionsmechanismus blieben offen (Kapitel 2.4.4.).

Die Kenntnis der vollständigen Struktur eines funktionell intakten Phytochroms ist jedoch unerlässlich, wenn man die Funktionsweise dieses Proteins in der Zelle verstehen will. Wie wird das Lichtsignal vom Chromophor detektiert? Mit welchen Aminosäuren interagiert der

Chromophor in der Proteinbindetasche? Wie wirken sich die lichtinduzierten Konformationsänderungen des Chromophors auf diese Interaktionen aus und beeinflussen so die Signalweiterleitung? Ziel der Arbeit war es, die Methodik der Lösungs-NMR-Spektroskopie zu nutzen, um sich der Beantwortung dieser Fragen am System des cyanobakteriellen Phytochroms 1 (Cph1) aus *Synechocystis PCC6803* zu nähern (Kapitel 2.5.).

Dafür mussten zunächst sowohl das Protein als auch der Bilin-Chromophor für NMR-Zwecke spezifisch isotopenmarkiert hergestellt werden (Kapitel 3.1., 3.2. und 4.1.). Geeignete Modellsubstanzen, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist und die als Vergleichsproteine die spätere Zuordnung der NMR-Spektren erleichtern sollten, mussten ebenfalls spezifisch markiert hergestellt und aufgereinigt werden (Kapitel 3.3. und 4.2.). Mit den unterschiedlichen Proben (Kapitel 3.4.) wurden anschließend zahlreiche homo- und heteronukleare Spektren aufgenommen (Kapitel 3.5.) und versucht, die auftretenden Signale zuzuordnen.

Mit den erhaltenen Ergebnissen konnten Aussagen zum Protonierungszustand des Chromophors (Kapitel 5) und zu dessen Konformation in beiden Photoisomeren (Kapitel 6) getroffen werden. Es zeigte sich, dass der Chromophor sowohl in P_r als auch in P_{fr} vollständig protoniert ist. Damit konnten die Ergebnisse früherer spektroskopischer und kinetischer Untersuchungen bestätigt und ein für den P_{fr} -Zustand postulierter deprotonierter Chromophor ausgeschlossen werden. Die Konformation des Chromophors in der Kristallstruktur der P_r -Form des DrBpP aus *Deinococcus radiodurans* ist *ZZZssa*. Die gleiche Konformation konnte anhand der hier vorgenommenen Experimente für den Chromophor in Cph1 in der P_r -Form bestimmt werden. Für die P_{fr} -Form des Cph1-Chromophors wurde eine *ZZEssa*-Konformation ermittelt. Strukturelle Informationen über die P_{fr} -Form waren bis jetzt nicht verfügbar. Die Kenntnis einer P_{fr} -Chromophorstruktur ist aber für die Beantwortung der Fragen zum Photokonversionsmechanismus und zur Signalweiterleitung unerlässlich.

Im Verlaufe der experimentellen Arbeiten zeigte sich auch, dass der Chromophor in der Cph1-Bindetasche eine bemerkenswerte Dynamik aufweist. Diese war größtenteils dafür verantwortlich, dass die Aufnahme von gut aufgelösten NMR-Spektren deutlich erschwert wurde. Daher war es nötig, diese Dynamik hinsichtlich des Austauschs der Stickstoffgebundenen Protonen mit Wasser sowie der Chromophor-Beweglichkeit in beiden Photoisomeren genauer zu untersuchen (Kapitel 7).

Die Bedeutung der erzielten Ergebnisse in Bezug auf die Beantwortung der zu Beginn gestellten Fragen sowie eine mögliche Verallgemeinerung auf andere Phytochrome wurde abschließend diskutiert (Kapitel 8) und zusammengefasst (Kapitel 9).

2. Einleitung

2.1. Licht als abiotischer Umweltfaktor

Biotope sind durch die Gesamtheit aller in ihnen wirkenden Umweltfaktoren gekennzeichnet. Diese Umweltfaktoren wiederum stellen Lebensbedingungen dar, die sich fördernd oder hemmend auf die Entwicklung der Organismen im Biotop auswirken. Gehen diese Wirkungen direkt von den Organismen selbst aus, spricht man von biotischen Umweltfaktoren (Nahrungsbeziehung, Konkurrenzbeziehung, Fortpflanzungsbeziehung etc.). Im Gegensatz dazu werden Wirkungen, die von der nicht-lebenden Umwelt ausgehen, als abiotische Faktoren bezeichnet. Neben Wasser, Temperatur, mechanischen und chemischen Einflüssen ist Licht der wichtigste abiotische Umweltfaktor für Flora und Fauna. Während sich Tiere jedoch prinzipiell ungünstigen Umweltbedingungen entziehen können, sind Pflanzen sesshaft. Damit sind sie auf eine effiziente Lichtperzeption angewiesen, die es ihnen ermöglicht, in einem relativ eingeschränkten Radius um optimale Bedingungen zu konkurrieren und sich zu reproduzieren. Um wichtige Eigenschaften ihrer illuminierten Umgebung zu detektieren, haben Pflanzen ein kompliziertes und ausgeklügeltes Licht-sensorisches Netzwerk entwickelt. Damit ist es ihnen möglich, Lichtstärke, Dauer, Qualität und Richtung zu identifizieren und ihr Wachstum und ihre Entwicklung daran anzupassen und zu optimieren, ein Prozess, den man als Photomorphogenese bezeichnet. Andererseits dienen ihnen weit größere Mengen an Licht als Energiequelle für die Fixierung von Kohlenstoff in den Photosynthese-Reaktionen.

Bei beiden Prozessen – Photosynthese und Photomorphogenese in Pflanzen und Cyanobakterien – spielen Biliproteine eine entscheidende Rolle. Diese soll in den folgenden Kapiteln kurz beschrieben werden. Spezielles Augenmerk liegt dabei auf dem photomorphogenetischen Rotlicht-Rezeptor Phytochrom, der im Rahmen dieser Arbeit strukturell näher untersucht wurde.

2.2. Photosynthese

Höhere Pflanzen, Algen und einige Prokaryonten sind in der Lage, Sonnenlicht für die Synthese organischer Verbindungen zu nutzen, was als Photosynthese bezeichnet wird. Die Photosynthese ist wahrscheinlich der wichtigste biochemische Stoffwechselweg auf Erden, da sie biologische Kreisläufe in allen existierenden Ökosystemen antreibt.

Die Photosynthese kann in zwei funktionell unterschiedliche Reaktionen unterteilt werden:

die Lichtreaktion (Primärreaktion), die Lichtenergie in chemische Energie umwandelt, und die Dunkelreaktion (Calvin-Zyklus, Sekundärreaktion), die die entstandene chemische Energie für die Synthese energiereicher organischer Verbindungen nutzt.

Die Primärreaktion findet in den Thylakoiden statt. Thylakoide sind Membransysteme, die man in den Chloroplasten von Pflanzenzellen und auch in phototrophen Bakterien findet. Die Kohlenstoff-Fixierung im Calvin-Zyklus hingegen verläuft bei Pflanzen im Chloroplasten-Stroma oder im Cytosol der photosynthetischen Bakterien.

Generell unterscheidet man zwei verschiedene Formen der Photosynthese. Pflanzen, Algen und einige Cyanobakterien nutzen Wasser als Reduktionsmittel in der Primärreaktion, was zur Freisetzung von molekularem Sauerstoff führt. Daher wird dieser Prozess auch als oxygene Photosynthese bezeichnet. Zahlreiche photosynthetische Bakterien nutzen hingegen Schwefelwasserstoff, molekularen Wasserstoff oder einfache organische Verbindungen wie Ethanol oder Acetat als Reduktionsmittel, was nicht zu einer Sauerstofffreisetzung führt. In diesem Fall spricht man dann von anoxygener Photosynthese.

Der Kohlenstoff, der für die Synthese energiereicher organischer Verbindungen während der Sekundärreaktion der Photosynthese benötigt wird, kann entweder aus anorganischen Verbindungen wie Kohlendioxid oder aus einfachen organischen Verbindungen wie Acetat stammen. Lebewesen, die in der Lage sind, ihre Bau- und Reservestoffe ausschließlich aus anorganischen Stoffen aufzubauen, bezeichnet man als Autotrophe. Werden auch organische Verbindungen zum Aufbau der Baustoffe verwendet, spricht man von Heterotrophie. Photosynthetische Organismen benutzen Sonnenlicht als Energiequelle für die Gewinnung von ATP und die Fixierung von anorganischem Kohlenstoff, daher bezeichnet man sie als Photoautotrophe.

Eine detaillierte Beschreibung der historischen Beobachtungen und Entdeckungen, die mit an-/oxygener Photosynthese, Licht- und Dunkelreaktion und Strukturanalyse verschiedener Photosysteme verbunden sind, sowie eine Vielzahl relevanter Zitate liefern die Übersichtsartikel von Govindjee & Krogmann, von Gest & Blankenship und Witt (*Govindjee & Krogmann, 2004; Gest & Blankenship, 2004; Witt, 2004*), auf die Zitierung spezifischer Veröffentlichungen wird aufgrund des Umfangs verzichtet.

2.2.1. Die Lichtreaktion

Während der oxygenen Photosynthese wird Wasser oxidiert, NADP reduziert und ATP synthetisiert. Die Reaktionen werden von vier großen Membranproteinkomplexen katalysiert (siehe Abbildung 1), den Photosystemen I und II (PSI, PSII), dem Cytochrom-b₆f-Komplex und einer ATP-Synthase (F-ATPase).

organisiert sind. Diese Lichtsammelkomplexe enthalten als Farbstoff-Pigmente neben weiterem Chlorophyll a auch Chlorophyll b sowie Carotenoide. Sie fangen Licht unterschiedlicher Wellenlänge ein. Das angeregte Pigment gibt dann seine Energie strahlungsfrei an ein Akzeptor-Pigment weiter (siehe 1.2.3.). Da der angeregte Zustand des Chlorophyll-Spezialpaars in den PSI und PSII Reaktionszentren energetisch niedriger liegt als der der akzessorischen Pigmente, wird eine effiziente Energieübertragung aller eingefangenen Lichtquanten auf P680 und P700 gewährleistet.

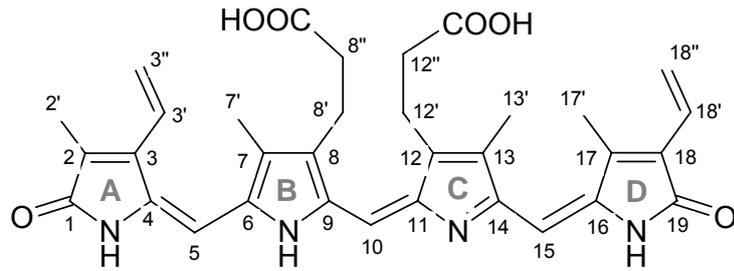
2.2.3. Phycobiliproteine

Cyanobakterien, Rhodophyten und Cryptophyten besitzen eine weitere Gruppe von akzessorischen Proteinen, um den Wellenlängenbereich und den Absorptionsquerschnitt ihrer Photosysteme zu erweitern: die Phycobiliproteine. Diese Proteine haben als Pigment ein lineares Tetrapyrrol-Molekül (Bilin) kovalent gebunden. In den Lichtsammelkomplexen (Antennen) der Cyanobakterien, den Phycobilisomen, sind verschiedene Phycobiliproteine miteinander assoziiert, um einen optimalen strahlungsfreien Energietransfer hin zum Photosystem zu gewährleisten.

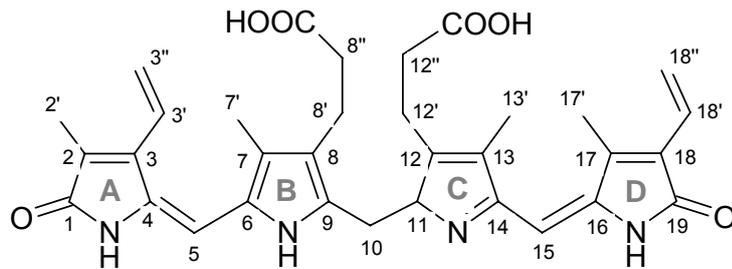
Biline sind Gallenfarbstoffe, die bereits Anfang des 19. Jahrhunderts aus menschlichen Gallensteinen isoliert werden konnten (*Thenard, 1807; Berzelius, 1808*). Mitte des 20. Jahrhunderts schließlich wurde durch Totalsynthese die chemische Natur der Biline geklärt: offenkettige Tetrapyrrole, deren Synthese eng mit der Häm-Biosynthese verknüpft ist (*Fischer & Plieninger, 1942*). Die Strukturen verschiedener freier Biline sind in Abbildung 2 gezeigt.

Da freie Biline in der Zelle generell instabil sind oder sogar toxisch wirken können, kommen sie in der Natur meistens als prosthetische Gruppe an Proteine gebunden vor (Biliproteine). Sowohl Biline als auch Biliproteine unterscheiden sich hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften, die von der Natur des Tetrapyrrols (Größe des delokalisierten π -Systems (*Glazer & Fang, 1973; Glazer & Hixson, 1975*), Protonierungszustand (*Glazer & Fang, 1973; Gossauer & Hirsch, 1974; Brandlmeier et al., 1981*), Konformation und Konfiguration (*Scheer, 1981; Thümmler & Rüdiger, 1983; Falk, 1989*)) und der Proteinumgebung abhängen (*Sineshchekov, 1995; Sineshchekov et al., 1998a; Sineshchekov et al., 1998b*).

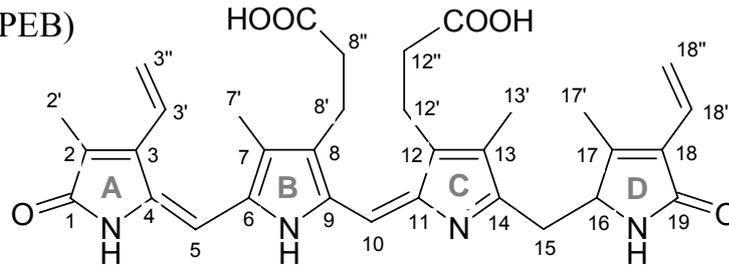
Biliverdin (BV)



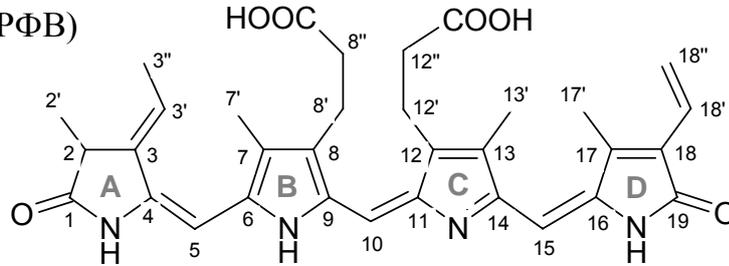
Bilirubin



Phycoerythrobilin (PEB)



Phytochromobilin (PΦB)



Phycocyanobilin(PCB)

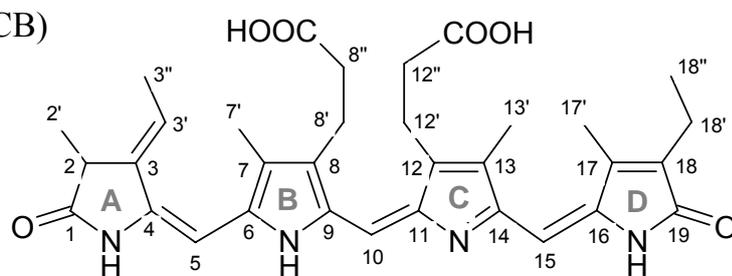


Abbildung 2: Strukturen freier Biline. Die Nummerierung der Kohlenstoffe dient dem Verständnis der folgenden Diskussion.

Die Phycobilisomen sind hoch organisierte, membranassoziierte, lösliche Komplexe aus Phycobiliproteinen und Linkerproteinen, die erstmals von Gantt und Conti in der Rotalge *Porphyridium cruentum* charakterisiert wurden (Gantt & Conti, 1965; Gantt & Conti, 1966a; Gantt & Conti, 1966b). Sie dienen, wie bereits erwähnt, den photosynthetischen Einzellern als Licht sammelnde Antennen hauptsächlich für das Photosystem II (Gantt, 1975; Sidler, 1994; Bald et al., 1996).

Augrund ihrer Absorptionsspektren können vier Klassen von Phycobiliproteinen unterschieden werden: Phycoerythrin (PE, $\lambda_{\max} = 490 - 579$ nm), Phycoerythrocyanin (PEC, $\lambda_{\max} = 565 - 600$ nm), Phycocyanin (PC, $\lambda_{\max} = 615 - 640$ nm) und Allophycocyanin (APC, $\lambda_{\max} = 650 - 655$ nm). Die einzelnen Phycobiliproteine unterscheiden sich in der Art und Anzahl der gebundenen Bilin-Chromophore. Ähnlichkeiten zeigen sich in Sequenz und Raumstruktur (Apt et al., 1995; MacColl, 1998).

Phycobiliproteine bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten, α und β , mit Molekulargewichten zwischen 15000 und 21000 Dalton (Glazer & Cohen-Bazire, 1971). Die kleinere α -Untereinheit hat in der Regel ein Bilin, die größere β -Untereinheit zwei Biline kovalent gebunden (Rüdiger, 1994). Die beiden Untereinheiten lagern sich zunächst zu einem Heterodimer ($\alpha\beta$) zusammen. Aus drei Heterodimeren bildet sich ein ringförmiges Aggregat mit dreifacher Symmetrie, das Trimer ($\alpha\beta$)₃. Es stellt die kleinste Baueinheit der Phycobilisomen dar.

Die scheibenförmigen Trimere können unter Beteiligung von Linkerproteinen zu Hexameren aggregieren (Ficner et al., 1992; MacColl, 1998). Aus diesen Hexamer-Untereinheiten sind sowohl der Phycobilisomenkern als auch die peripheren Stäbchen zusammengesetzt. Beim hemidiscoidalen Phycobilisom, dem am weitesten verbreiteten und am besten untersuchten morphologischen Phycobilisomen-Subtyp, bilden zwei, drei oder fünf zur Thylakoidmembran parallel liegende Zylinder den Kern. Zwei bis acht ebenfalls zylindrische Stäbchen stehen senkrecht auf den Zylindern des Kerns (Mörschel et al., 1977; Nies & Wehrmeyer, 1980; Gantt, 1980; Ducret et al., 1996; Ducret et al., 1998).

Ab Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts gelang die Bestimmung hochaufgelöster Kristallstrukturen einzelner Phycobiliprotein-Untereinheiten wie auch höherer Oligomere. Somit ist auch bekannt, in welcher räumlichen Struktur die einzelnen Phycobiliprotein-Chromophore vorliegen (Schirmer et al., 1985; Schirmer et al., 1987; Schmidt et al., 1987; Düring et al., 1990; Düring et al., 1991; Ficner et al., 1992; Ficner & Huber, 1993; Brejc et al., 1995; Reuter et al., 1999).

Bringt man isolierte Phycobilisomen in Lösung mit geringer Ionenstärke, dissoziieren sie in die einzelnen Biliprotein- und Linkerproteinuntereinheiten und können so getrennt isoliert und analysiert werden (Füglister et al., 1981; Glazer, 1988).

Die Phycobiliprotein-Scheiben sind im Phycobilisom so angeordnet, dass es zu einem strahlungsfreien Transfer der absorbierten Energie von den Stäbchen über den Kern hin zum photosynthetischen Reaktionszentrum durch den so genannten Förster-Mechanismus kommt (Scheer, 1986; Suter & Holzwarth, 1987; Glazer, 1989). Dieser Mechanismus beruht auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor- und Akzeptor-Chromophor und ermöglicht bei einer optimalen Ausrichtung der Chromophore zueinander einen effektiven Energietransfer über Entfernungen von bis zu 100 Å pro Transferschritt (Förster, 1967). Für den Energietransfer sind also neben der richtigen Ausrichtung der Chromophore auch deren Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von entscheidender Bedeutung. Daher liegen die hochenergetisch absorbierenden Phycoerythrine bzw. Phycoerythrocyanine an der Peripherie der Stäbchen, die Phycocyanine im unteren Teil der Stäbchen und die niederenergetisch absorbierenden Allophycocyanine im Kern (Abbildung 1). Die meist unpigmentierten Linkerproteine sind ebenfalls am Energietransfer beteiligt. So ist der große Linker L_{CM} (core-membrane linker), der das Phycobilisom mit der Thylakoidmembran verbindet, für die Energieübertragung vom Phycobilisom auf Chlorophyll a des PSII-Reaktionszentrums verantwortlich (Gantt, 1975; Sidler, 1994; Bald et al., 1996).

Für Cyanobakterien wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts von Engelmann (Engelmann, 1883; Engelmann, 1902) ein Effekt beschrieben, der die optimale Nutzung unterschiedlicher Lichtbedingungen z.B. in verschiedenen Wassertiefen gewährleistet. Nach Bestrahlung mit rotem ($\lambda = 650$ nm) oder grünem ($\lambda = 540$ nm) Licht und anschließender Kultivierung im Dunkeln werden die Antennenpigmente von Cyanobakterien in Abhängigkeit von der Qualität des letzten Lichtpulses (Wellenlänge) gebildet. Das bedeutet, dass das Verhältnis der Pigmente den vorherrschenden Umweltbedingungen angepasst wird. Der letzte Lichtpuls wird dabei als vorherrschende Umweltbedingung interpretiert. Diesen Effekt nennt man komplementäre chromatische Adaptation.

2.3. Photomorphogenese

Licht liefert nicht nur Strahlungsenergie für die Photosynthese. Es dient vor allem pflanzlichen Organismen auch als Signal, um Wachstums- und Entwicklungsprozesse zu steuern. Die Detektion vorherrschender Lichtverhältnisse und die daran angepasste Regulation der pflanzlichen Entwicklung nennt man Photomorphogenese.

2.3.1. Photorezeptoren in Pflanzen

In Pflanzen beruhen alle photomorphogenetischen Prozesse im Wesentlichen auf drei Klassen von photochromen¹ sensorischen Rezeptoren, die nach ihrem jeweiligen Absorptionsbereich unterschieden werden können: Phototropine (Reymond *et al.*, 1992; Christie *et al.*, 1999; Briggs *et al.*, 2001), Cryptochrome (Ahmad & Cashmore, 1993; Cashmore *et al.*, 1999) und Phytochrome (Butler *et al.*, 1959; Fankhauser, 2001; Mathews, 2006). Phototropine sind blauabsorbierende, Cryptochrome blau- und UV-A-absorbierende und Phytochrome rotabsorbierende Chromoproteine.

Arabidopsis thaliana besitzt zwei Phototropine, zwei Cryptochrome und fünf Phytochrome. Innerhalb einer Gruppe von Photorezeptorisoformen besteht eine gewisse funktionelle Redundanz, jedoch kommt auch jedem Photorezeptor eine eigene Rolle in der Sensorik zu (Quail, 1998). Es zeigt sich allerdings auch ein hoher Grad an Kooperation zwischen den verschiedenen Photorezeptoren.

Phototropin bewirkt ein gerichtetes Wachstum von Pflanzenteilen in Abhängigkeit von einer Lichtquelle (Phototropismus) und reguliert die blaulichtabhängige Öffnung der Stomata. Phytochrome spielen eine Rolle bei der Samenkeimung und steuern die Vermeidereaktion bei Beschattung. Gemeinsam mit den Cryptochromen beeinflussen sie photoperiodische Vorgänge wie die Blühinduktion oder die Photomorphogenese des etiolierten Keimlings. Eine ausführliche Darstellung und Diskussion der photomorphogenetischen Photorezeptoren in Pflanzen findet man bei (Kendrick & Kronenberg, 1994).

In *Arabidopsis thaliana* wurden jüngst weitere Blaulichtrezeptoren gefunden, die als zirkadiane Photorezeptoren die Blühzeit regulieren: ZTL (Zeitlupe), FKF1 (Flavin-binding Kelch repeat F-box1) und LKP2 (LOV Kelch Protein2) (Yanovsky & Kay, 2003). Bisher wenig untersucht ist die UV-B-Perzeption, die zum Beispiel eine Rolle bei der Inhibition des Hypokotylenwachstums spielt (Tevini & Teramura, 1989; Jordan, 1995; Jenkins, 1997; Kim *et al.*, 1998). Die Retinyliden-Photorezeptoren von Tieren und Menschen (z.B. Rhodopsin), zu denen z.B. auch die lichtgetriebenen Ionenpumpen Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin in *Halobacterium* gehören, kommen in höheren Pflanzen nicht vor (Spudich *et al.*, 2000).

2.3.2. Pflanzliche Phytochrome

Bereits im Jahre 1952 beschrieben Borthwick und Mitarbeiter erstmals einen hypothetischen Photorezeptor in Pflanzen, der offenbar als molekularer Schalter funktionierte (Borthwick *et al.*, 1952). Nach Bestrahlung keimten Archänen von *Lactuca sativa* (Kopfsalat) ganz in

¹ Photochromie, auch Photochromizität: Bezeichnung für eine durch Licht spezifischer Wellenlänge hervorgerufene reversible Umwandlung eines Stoffes in einen anderen. Beide Stoffe unterscheiden sich in ihren Absorptionsspektren. Die Rückreaktion kann durch Licht einer anderen Wellenlänge oder durch Wärme ausgelöst werden.

Abhängigkeit von der Wellenlänge des eingestrahnten Lichtes. Dabei war entscheidend, welchem Licht die Samen zuletzt ausgesetzt waren. Eine kurze Belichtung der gequollenen Archänen mit schwachem Rotlicht induzierte eine Keimung. Eine unmittelbar folgende Bestrahlung mit dunkelrotem Licht jedoch hob das vorangegangene Signal auf. Es wurde vermutet, dass für diesen reversiblen Effekt ein sensorisches Molekül verantwortlich war, welches in zwei verschiedenen spektralen Formen auftritt. 1959 wurde von Butler *et al.* ein photochromer Photorezeptor postuliert, der zwischen einer rot und einer dunkelrot absorbierenden Form wechseln kann und der nur nach Rotlichtbestrahlung physiologisch aktiv ist. Sie konnten das entsprechende Pigment aus Maiskeimlingen anreichern und erste rot/dunkelrot Differenzspektren messen (Butler *et al.*, 1959). Im darauf folgenden Jahr wurde für dieses Pigment der Begriff Phytochrom geprägt. Der Nachweis eines Bilins als prosthetische Gruppe wurde von Rüdiger und Kollegen 1969 durchgeführt (Rüdiger & Correll, 1969). Erst 1982 konnten Vierstra und Quail zum ersten mal intaktes Phytochrom isolieren (Vierstra & Quail, 1982), die Klonierung und Sequenzierung der ersten Phytochromgene aus *Avena sativa* gelang kurze Zeit später (Hershey *et al.*, 1984; Hershey *et al.*, 1985; Hershey *et al.*, 1987).

Phytochrome sind lösliche sensorische Biliproteine, d.h. sie bestehen aus einem Apoprotein, an welches ein Bilin-Chromophor kovalent gebunden ist. Im Unterschied zu den Phycobiliproteinen der bakteriellen Lichtsammelkomplexe sind Phytochrome allerdings photochrom, d.h. frei durch Licht zwischen zwei spektral unterschiedlichen Formen photokonvertierbar. Eine rot-absorbierende (ca. 660 nm, R) P_r-Form (*Phytochrome red absorbing*) geht nach R-Bestrahlung in die dunkelrot-absorbierende (ca. 730 nm, FR) P_{fr}-Form (*Phytochrome far-red absorbing*) über. Eine FR-Bestrahlung der P_{fr}-Form überführt diese wieder in P_r. Der Bilin-Chromophor hat in beiden Photozuständen eine unterschiedliche Konformation. Die Doppelbindung zwischen C15 und C16 (Abbildung 2) isomerisiert nach R-Absorption von *cis* nach *trans*, nach FR-Absorption wieder von *trans* nach *cis* (Rüdiger *et al.*, 1983). Phytochrome können so also das Verhältnis von rotem zu dunkelrotem Licht „messen“ und erlauben es den Pflanzen damit, vorherrschende Lichtbedingungen wie Schatten (Rotlicht-arm) oder direkte Sonne (Rotlicht-reich) zu detektieren und darauf zu reagieren. Phytochrome steuern allein oder im Zusammenspiel mit anderen Photorezeptoren alle wichtigen Wachstums- und Entwicklungsprozesse in Pflanzen. Dazu gehören vor allem Samenkeimung, De-Etiolierung, Schattenvermeidereaktion, Blütenbildung, Chloroplastendifferenzierung und die Regulation zirkadianer Rhythmen. Außerdem können Pflanzen mittels der Phytochrome unterschiedliche Lichtintensitäten wahrnehmen (z.B. HIR: *high irradiance response*, LFR: *low fluence response*, VLFR: *very low fluence response*). Die Auswertung, Weiterleitung und Umsetzung der Signale in zelluläre Antworten wird durch komplexe regulatorische Mechanismen bewerkstelligt. Pflanzen besitzen meist mehrere

Phytochrome, in *Arabidopsis thaliana* sind es fünf (PhyA-PhyE) (Sharrock & Quail, 1989; Clack et al., 1994). Diese können aufgrund ihrer unterschiedlichen Stabilität im Licht in zwei Klassen unterteilt werden: die photolabilen Typ I- (PhyA) und die photostabilen Typ II-Phytochrome (PhyB-PhyE). Im Dunkeln angezogene *Arabidopsis thaliana* Keimlinge akkumulieren PhyA. Es reguliert die Genexpression und Samenkeimung unter Schwachlichtbedingungen, also in einer Umgebung mit erhöhtem Dunkelrot-Anteil (Botto et al., 1996). Setzt man die Keimlinge Sonnenlicht aus, wird PhyA rasch abgebaut (Nagy & Schäfer, 2002). Auch ist generell die Expression von PhyA im Licht reprimiert. Die anderen *phy*-Gene werden allgemein weniger stark exprimiert, wobei die Expression (wie auch die Stabilität der jeweiligen Proteine) wenig vom Licht beeinflusst wird (Sharrock & Clack, 2002).

Pflanzen-Phytochrome sind Protein-Homodimere (Molekulargewicht: ca. 125 kDa pro Untereinheit). Jede Untereinheit trägt ein Molekül Phytochromobilin (PΦB, Abbildung 2) als Chromophor (Lagarias & Rapoport, 1980; Rüdiger & Thümmler, 1994). Dieser wird ausgehend von Häm in den Plastiden synthetisiert und autokatalytisch im Cytosol an das Apoprotein gebunden. Generell bestehen Phytochrome aus einer N-terminalen photosensorischen Domäne, die der Lichtperzeption dient, und einer C-terminalen regulatorischen Domäne, die bei der Dimerisierung und Aktivierung der Signaltransduktion beteiligt ist (Wagner et al., 1996; Quail, 1997). Während die photosensorischen Domänen verschiedener Organismen bis zu 50 % Sequenzhomologie besitzen (Montgomery & Lagarias, 2002), sind die regulatorischen Domänen weniger stark konserviert. Die beiden Hauptdomänen lassen sich wiederum in verschiedene Subdomänen unterteilen. Eine schematische Darstellung der Domänenstruktur in verschiedenen Phytochromfamilien ist in Abbildung 3 gezeigt.

Die sensorische Domäne besteht bei Pflanzen aus vier Subdomänen, der N-terminalen P1-Domäne, einer PAS² verwandten P2-Domäne (PLD: *PAS like domain*), der Chromophorbindenden Domäne (BLD: *bilin lyase domain*, auch GAF³-Domäne genannt), und der PHY-Domäne (Montgomery & Lagarias, 2002). Die Bezeichnung Bilin-Lyase-Domäne (BLD) leitet sich von der intrinsischen Enzymaktivität dieser Domäne ab, aufgrund derer die Ligationsreaktion des Bilin-Chromophors mit dem Apoprotein katalysiert wird (Lagarias & Lagarias, 1989; Wu & Lagarias, 2000). Sie enthält einen Cystein-Rest, der in allen pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen konserviert ist (Hughes et al., 1997; Lamparter et al., 2002), mit dem der jeweilige Bilin-Chromophor über eine Thioether-Bindung kovalent verknüpft

² PAS: Akronym, entstanden aus den Namen der Proteine, bei denen dieses Motiv zuerst gefunden wurde: period clock protein (*Drosophila melanogaster*), arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Vertebraten), single-minded protein (*Drosophila melanogaster*).

³ GAF: Akronym, entstanden aus den Namen der Proteine, bei denen dieses Motiv zuerst gefunden wurde: cGMP-spezifische Phosphodiesterase (Vertebraten), cyanobakterielle Adenylatcyclase, Formiathydrogenlyase-Transkriptionsaktivator FhlA (Bakterien).

ist (Lagarias & Rapoport, 1980). Die Phytochrome anderer Bakterien und Pilze besitzen keinen Cystein-Rest an der homologen Position (Davis et al., 1999; Lamparter et al., 2002; Jorissen et al., 2002). Die PHY-Domäne ist für die spektrale Integrität und die Stabilisierung der P_{fr}-Form verantwortlich (Cherry et al., 1993; Park et al., 2000).

Die C-terminale regulatorische Domäne pflanzlicher Phytochrome besteht aus einem PAS-Modul und einer Histidinkinase-verwandten Domäne (HKD: *Histidine kinase like domain*). Man vermutet, dass das PAS-Modul eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen spielt und die Bindestelle für noch uncharakterisierte Liganden ist (Montgomery & Lagarias, 2002). Das PAS-Modul besteht aus zwei PAS-Subdomänen, die zumindest in PhyB für die Integrität des Kern-Lokalisationssignals (NLS: *nuclear localization signal*) verantwortlich sind (Chen et al., 2003). Das C-terminale Ende ähnelt strukturell und funktionell der Transmitter Domäne von Zwei-Komponenten-Histidinkinasen. Allerdings fehlt hier das konservierte Histidin, man findet an homologer Position stattdessen einen Serin- oder Threonin-Rest (Schneider-Poetsch et al., 1991; Schneider-Poetsch, 1992). Pflanzliche Phytochrome sind Serin-/Threoninkinasen, die von Histidinkinasen abstammen. Die Kinaseaktivität ist lichtabhängig, wobei die Aktivität in der P_{fr}-Form höher ist als in der P_r-Form (Yeh & Lagarias, 1998).

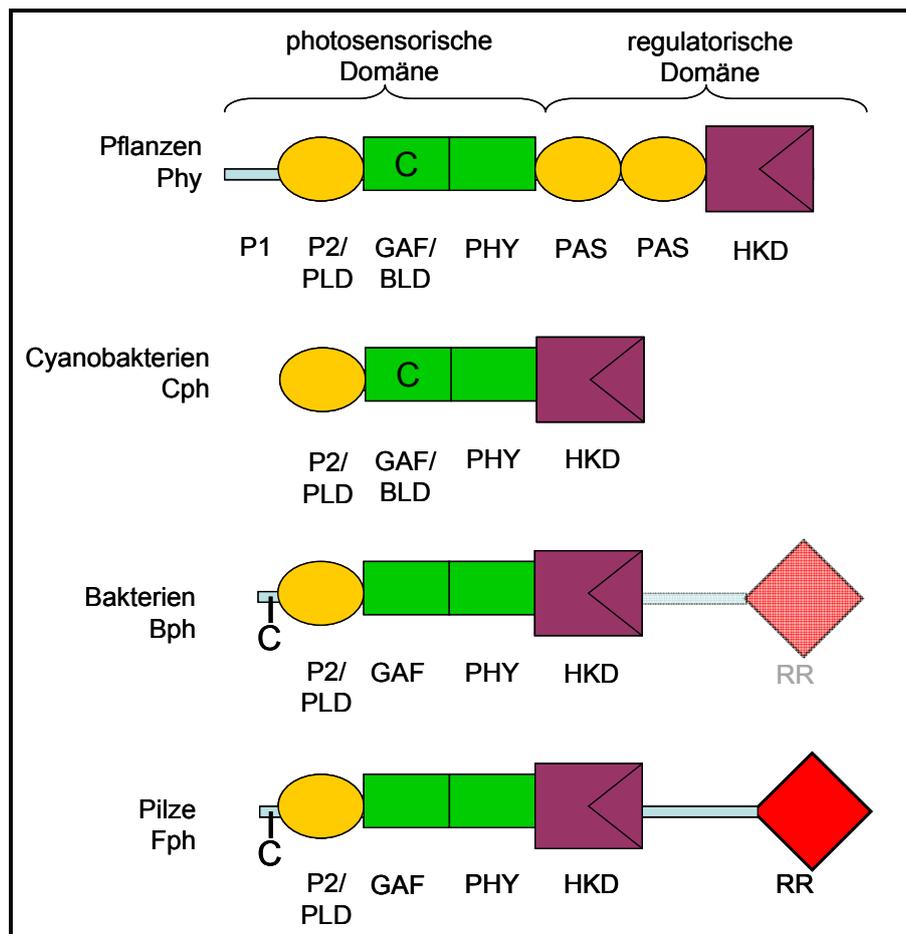


Abbildung 3: Domänenstruktur von Phytochromen verschiedener Organismen (nach Rockwell et al., 2006). Eine ausführliche Erläuterung findet sich im Text. BLD: Bilinlyasedomäne; C: Chromophorbindestelle; GAF: GAF-Domäne; HKD: Histidinkinase-verwandte Domäne; PAS: PAS-Domäne; PLD: PAS-verwandte Domäne; PHY: Phytochrom-Domäne; RR: Antwortregulator.

Bis heute wurden zahlreiche Experimente zur Aufklärung der Wirkungsweise und der Signalübertragungswege von Phytochrom in der pflanzlichen Zelle durchgeführt. Aufgrund der Komplexität der Mechanismen konnte jedoch ein vollständiges Bild aller Funktionsweisen bisher nicht erstellt werden. Einen Überblick findet man bei Schäfer & Bowler (Schäfer & Bowler, 2002), ein Modell der Phytochrom Signaltransduktion ist in Abbildung 4 gezeigt.

Phytochrom kann die Signaltransduktion sowohl direkt im Zellkern als auch vom Cytosol aus initiieren. Eine schnelle Antwort schließt die Translokation des aktivierten Proteins (P_{fr}) in den Zellkern ein, wo es Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie (*basic helix-loop-helix*), speziell PIF3 (*phytochrome interacting factor 3*) bindet. Anschließend werden regulatorische Transkriptionsfaktoren (RTF) aktiviert, die wiederum die Expression spezifischer Licht-regulierter Gene induzieren (Ni et al., 1999; Quail, 2002a; Quail, 2002b). In einem zweiten Kern-lokalisierten Signalweg bindet aktiviertes Phytochrom einen Antwortregulator (RR: *response regulator*), der wiederum das aktivierte Protein stabilisiert und die Expression Licht-regulierter Gene regelt (Sweere et al., 2001). Dies geschieht einerseits durch die Inhibition der Proteolyse des Schlüssel-Transkriptionsfaktors HY5 (Osterlund et al., 2000; Hardtke & Deng,

2000; Hellmann & Estelle, 2002), andererseits durch die Bindung von aktiviertem Cryptochrom (Ahmad et al., 1998; Más et al., 2000). In allen geschilderten Fällen wird vermutet, dass eine Veränderung der Chromatinstruktur notwendig für die Regulation der Expression der photomorphogenetischen Gene ist und zugleich eine epigenetische Kontrolle darstellt (Benvenuto et al., 2002; Schroeder et al., 2002; Quail, 2002a). Im Cytoplasma kann aktiviertes Phytochrom die Genexpression über G-Proteine, Calcium und cGMP-abhängige Signalwege aktivieren (Shacklock et al., 1992; Bowler et al., 1994; Okamoto et al., 2001; Guo et al., 2001). PKS1 (*phytochrom kinase substrat 1*), ein konstitutiv im Cytoplasma lokalisiertes Protein, kann von PhyA phosphoryliert werden. Es wird spekuliert, dass PKS1 Phytochrom bindet und so dessen Translokation in den Kern inhibiert (Fankhauser et al., 1999).

Die von Phytochromen ausgelösten Signalwege sind häufig mit denen anderer Faktoren (z.B. Hormone, Temperatur) gekoppelt (Franklin & Whitelam, 2004). Die Vernetzung multipler Signale durch diese komplexen Prozesse ermöglicht Pflanzen eine extrem gute Wahrnehmung von Umweltveränderungen.

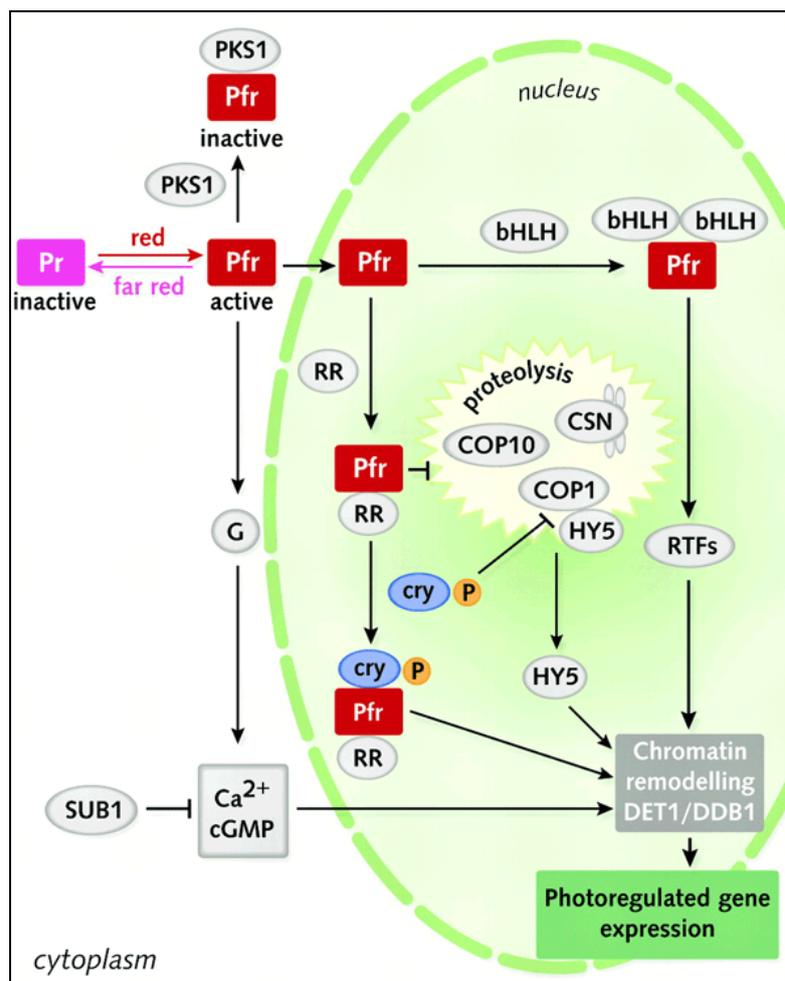


Abbildung 4: Modell der Phytochrom-Signaltransduktion (Schäfer & Bowler, 2002). Eine ausführliche Erklärung findet sich im Text.

2.3.3. Phytochrome anderer Taxa

Phytochrome findet man nicht nur in Pflanzen, wie lange Zeit angenommen wurde. 1996 entdeckten Kehoe und Grossman das Phytochrom-ähnliche Protein RcaE im Cyanobakterium *Calothrix* sp. PCC7601 (*Fremyella diplosiphon*), 1997 Wilde *et al.* PlpA in *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kehoe & Grossman, 1996; Wilde *et al.*, 1997). Genom-Sequenzierungsprojekte führten zur Entdeckung weiterer Phytochrom-Gene in diversen photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Bakterien und sogar in Pilzen. Spätestens mit der Entdeckung Phytochrom-ähnlicher Proteine in den nicht photosynthetischen Eubakterien *Deinococcus radiodurans* und *Pseudomonas aeruginosa* (Davis *et al.*, 1999) stellte sich heraus, dass Phytochrome eine weitaus vielfältigere Klasse von Photorezeptoren darstellen und phylogenetisch viel älter sind, als bis zu diesem Zeitpunkt angenommen.

Ganz generell lassen sich Phytochrome aufgrund der Natur ihres Chromophors in zwei Gruppen unterteilen: Pflanzen-ähnliche und bakterielle Phytochrome (Bakteriophytochrome). Während pflanzliche Phytochrome Phytochromobilin als Chromophor tragen (PΦB, Abbildung 2), haben einige cyanobakterielle Phytochrome wie Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803, AphA/B aus *Anabena* PCC7120 oder CphA aus *Calothrix* Phycocyanobilin (PCB, Abbildung 2) inkorporiert (Wu *et al.*, 1997; Hübschmann *et al.*, 2001). PCB trägt im Vergleich zu PΦB eine Ethyl- statt einer Vinyl-Seitenkette am Ring D. Anderen bakteriellen Phytochromen wie CphB aus *Calothrix*, Agp1/2 aus *Agrobacterium tumefaciens* oder BphP aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaBphP) und *Deinococcus radiodurans* (DrBphP) dient Biliverdin IX α , ein Vorläufer im PCB- und PΦB-Syntheseweg, als Chromophor (BV, Abbildung 2) (Bhoo *et al.*, 2001). Die Chromophore sind jeweils kovalent über eine Thioether-Bindung mit einem Cystein des Proteins verknüpft, PCB und PΦB über das C3¹- (Lagarias & Rapoport, 1980; Hübschmann *et al.*, 2001), BV über das C3²-Atom des A-Rings (Wagner *et al.*, 2005). Doch nicht nur die Art und Anknüpfungsweise der Chromophore differiert in pflanzlichen/cyanobakteriellen und bakteriellen Phytochromen, auch unterscheiden sich die Bindestellen im Protein. Pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome binden den Chromophor an einen Cystein-Rest innerhalb der GAF-Domäne (siehe 2.3.2. und Abbildung 3). Bakterielle Phytochrome haben an homologer Position kein konserviertes Cystein. Sie binden ihren Chromophor an ein Cystein oberhalb der N-terminalen P2-Domäne (PLD), welches in allen Phytochromen, denen das GAF-Cystein fehlt, hoch konserviert ist (Lamparter *et al.*, 2004; Karniol *et al.*, 2005; Tasler *et al.*, 2005). Welches Bilin also als Chromophor fungiert, hängt davon ab, welches der beiden konservierten Cysteine im Protein vorkommt. Mit diesen Erkenntnissen lässt sich die oben beschriebene einfache Klassifizierung von Phytochromen noch präzisieren. Man unterscheidet also Pflanzen-ähnliche Phytochrome, die PCB oder PΦB innerhalb der GAF-Domäne binden, und Bakterio-

phytochrome, die BV innerhalb der P2-Domäne binden. Keine der beiden Phytochrom-Klassen benötigt Enzyme oder Kofaktoren, die die Assemblierungsreaktion unterstützen.

Cyanobakterielle Phytochrome und Bakteriophytochrome sind meist Bestandteile eines Zwei-Komponenten-Phosphorelais-Systems. „Klassische“ Zwei-Komponenten-Systeme bestehen aus einer Sensor-Histidinkinase und einem Antwortregulator, auf den ein Phosphatrest eines Phosphohistidins der Sensorkinase unter Phosphorylierung eines Aspartatrestes übertragen wird. Die Sensorkinase kann Teil des Rezeptors sein, der das Signal registriert, sie kann aber auch auf einer vom Rezeptor getrennten Polypeptidkette lokalisiert sein. Ebenso können Sensor und Antwortregulator auf einem oder verschiedenen Proteinen vorkommen, die darüberhinaus auch membranständig sein können (Krauss, 2001). Die C-terminalen regulatorischen Domänen bakterieller und cyanobakterieller Phytochrome enthalten die Histidinkinase-Funktion, es gibt jedoch auch bakterielle Phytochrome ohne diese Funktion (die Phytochrome BrBphP aus *Bradyrhizobium* ORS278 und RpBphP aus *Rhodopseudomonas palustris* enthalten nach früheren Publikationen keine Histidinkinase-Domäne am C-Terminus, aber hochkonservierte Regionen einer PAS-Domäne, (Giraud et al., 2002)). Bei einigen Spezies sind die Antwortregulatoren im selben Protein lokalisiert (Agp2 aus *Agrobacterium tumefaciens* (Karniol & Vierstra, 2003), RpBphP aus *Rhodopseudomonas palustris* (Giraud et al., 2002)), in anderen Fällen konnte als Antwortregulator der direkt lichtregulierten Sensorhistidinkinase ein eigenständiges Protein identifiziert werden (Rcp1 als Antwortregulator des Cph1 aus *Synechocystis* PCC6803 (Yeh et al., 1997)).

2.3.4. Cyanobakterielles Phytochrom 1, Cph1

Kaneko et al. gelang 1996 erstmals die vollständige Sequenzierung des Genoms eines photosynthetischen Organismus, des einzelligen Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996). Unter den über 3000 identifizierten *open reading frames* wurden mehrere Phytochrom-ähnliche Sequenzen gefunden, wobei ein Gen die stärkste Homologie zu pflanzlichen Phytochromen zeigte, die je bei Prokaryoten gefunden wurde (slr0473). Fast zeitgleich identifizierten Hughes et al. und Yeh et al. aufgrund dieser Sequenzhomologie und weiteren spektroskopischen und biochemischen Untersuchungen das erste prokaryotische Phytochrom: cyanobakterielles Phytochrom 1, Cph1 (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997).

Das Cph1-Apoprotein besteht aus 748 Aminosäuren. Es ist in der Lage, autokatalytisch Bilin-Chromophore zu binden. Als nativer Chromophor konnte mittels homologer Überexpression PCB identifiziert werden (Hübschmann et al., 2001). Das PCB ist kovalent an Cystein 259 innerhalb der GAF-Domäne gebunden, was mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnte (Hahn et al., 2006). Cph1 kommt wie alle Phytochrome in zwei spektralen Isoformen vor, die durch Licht ineinander überführt werden

können. Die P_r -Form besitzt ihr langwelliges Absorptionsmaximum bei 658nm, die P_{fr} -Form bei 702nm. Die jeweiligen Absorptionsspektren sowie ein (P_r) - (P_r/P_{fr}) -Differenzspektrum sind in Abbildung 5 gezeigt. Aufgrund der sich überlappenden P_r - und P_{fr} -Absorptionsspektren ist eine komplette Photokonversion von P_r zu P_{fr} nicht möglich. Es stellt sich lediglich ein Photogleichgewicht ein, in dem bei Bestrahlung im Absorptionsmaximum von P_r ca. 70% P_{fr} und 30% P_r , bei Bestrahlung im Absorptionsmaximum von P_{fr} ca. 97% P_r und 3% P_{fr} vorhanden sind (Lamparter et al., 1997)⁴. Allerdings ist eine präparative Trennung der beiden Isoformen mittels Größenausschlußchromatographie möglich (Strauss et al., 2005b). Eine thermische Reversion der P_{fr} -Form, wie sie bei Pflanzenphytochromen vorkommt, ist bei Cph1 nicht zu beobachten (Yeh et al., 1997).

Während sich pflanzliche Phytochrome nur mäßig gut rekombinant exprimieren lassen, kann Cph1 als Apoprotein löslich in *E.coli* mit guten Ausbeuten exprimiert werden (Lamparter et al., 1997). Aufgrund der intrinsischen Bilin-Lyase-Funktion des Proteins ist eine anschließende *in vitro* Assemblierung mit PCB möglich, die zu voll funktionellem Phytochrom führt.

Die Aminosäuren 1 bis 514 von Cph1 bilden die photosensorische Domäne des Proteins. Die entsprechende Deletionsmutante (Cph1 Δ 2) kann ebenfalls gut rekombinant in *E.coli* exprimiert werden (Park et al., 2000) und ergibt nach Assemblierung mit PCB ein Holoprotein mit fast identischen spektralen Eigenschaften wie das *full length* Cph1 (Yeh et al., 1997). Kotransformiert man zusätzlich zu *cph1* die kodierenden Gene für die Enzyme der Biosynthese von PCB (*ho*: Hämoxygenase, Protohäm IX \rightarrow BV; *pcyA*: PCB-Ferredoxin-Oxidoreduktase, BV \rightarrow PCB), kann man auch direkt in *E.coli* Holo-Cph1 exprimieren (Landgraf et al., 2001; Gambetta & Lagarias, 2001). Aufgrund der guten Ausbeuten der rekombinanten Expression und der guten Handhabbarkeit sowohl des *full length* Proteins als auch der Deletionsmutante sind beide ideal für biochemische und strukturelle Untersuchungen geeignet. Entsprechend zahlreich sind die Publikationen hierzu.

⁴ Die „ P_r/P_{fr} “-Nomenklatur wird hier der Einfachheit halber verwendet, bezieht sich aber in allen Fällen auf die Beschreibung des jeweiligen photostationären Gleichgewichts.

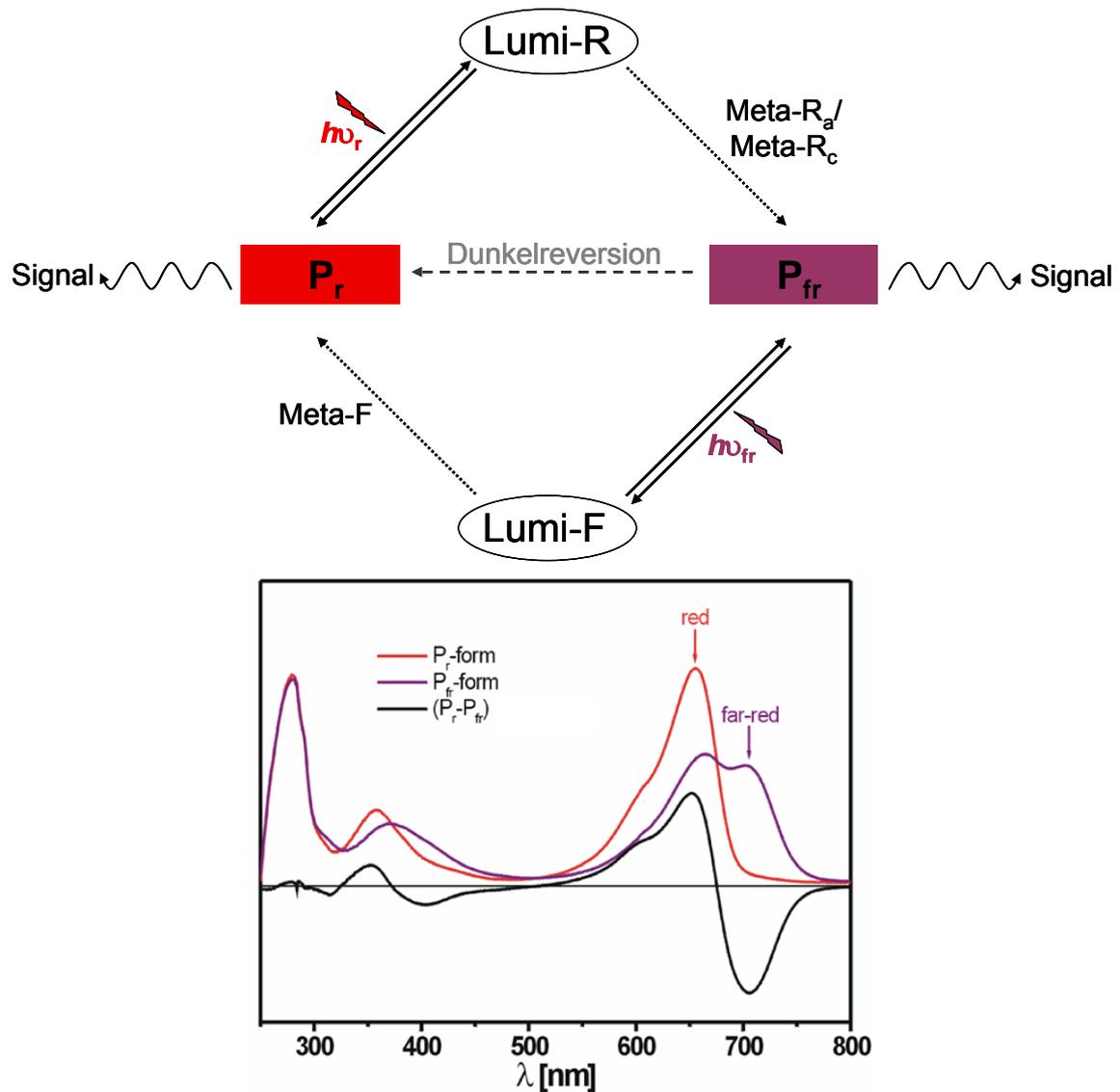


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Photozyklus von Cph1 (oben), dazugehörige UV/vis-Spektren der P_r - und P_{fr} -Form sowie das entsprechende (P_r - P_{fr})-Differenzspektrum.

Cph1 ist die Sensorhistidinkinase eines Zwei-Komponenten-Systems, die cytoplasmatisch lokalisiert ist (Yeh *et al.*, 1997). Nach Aktivierung durch Licht autophosphoryliert sie einen Histidinrest. Überraschenderweise ist jedoch die rot-absorbierende P_r -Form die physiologisch aktive, also die Kinase-Aktivität tragende Form von Cph1, und nicht wie in Pflanzen P_{fr} (Yeh *et al.*, 1997; Lamparter *et al.*, 2001). Anhand der Genomsequenz von *Synechocystis* konnten Yeh und Mitarbeiter (Yeh *et al.*, 1997) auch den *open reading frame* des zugehörigen Antwortregulators identifizieren. Dieser liegt lediglich 15 Basenpaare *downstream* vom Cph1-Stopcodon und kodiert für ein 17kDa großes Protein: Rcp1 (Rcp1: *response regulator for cyanobacterial phytochrome 1*). Sie konnten zeigen, dass autophosphoryliertes Cph1 seine Phosphatgruppe auf einen Aspartatrest in Rcp1 überträgt. Damit konnte zum ersten Mal ein Reaktionspartner von Phytochrom identifiziert werden. Inzwischen ist auch die dreidimensionale Struktur von Rcp1 bekannt (Young *et al.*, 2002). Es wurden keine DNA-Bindemotive gefunden.

Daher ist nicht davon auszugehen, dass Rcp1 direkt auf der DNA als Transkriptionsaktivator wirkt. Allerdings konnte festgestellt werden, dass eine Dimerisierung von Rcp1 anscheinend phosphorylierungsabhängig ist. Vielleicht spielt dies im weiteren Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle.

Ein Nachweis der physiologischen Funktion von Cph1 steht noch aus, obwohl zahlreiche Untersuchungen dahingehend durchgeführt wurden. So konnte für Cph1-Nullmutanten ein vermindertes Wachstum unter Starklicht und dunkelrotem Licht beobachtet werden (Fiedler *et al.*, 2004). Das Wachstumsverhalten von Cph1- und Cph2- (Phytochrom 2 aus Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC6803) *knock out* Mutanten zu Licht anderer Wellenlänge wurde ebenfalls untersucht. Dabei konnte eine Rolle von Cph2, nicht jedoch von Cph1 in der Blaulichtperzeption festgestellt werden (Wilde *et al.*, 2002). Auch wurde die Regulation der Transkription verschiedener Gene in *Synechocystis sp.* PCC6803 in Abhängigkeit von rotem und dunkelrotem Licht gezeigt (Hübschmann *et al.*, 2005). Es gab weitere Untersuchungen, die auf einen Einfluss von Licht, Glukose und Eisen auf die Transkription des *cph1/rcp1*-Operons hindeuten (Garcia-Dominguez *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003).

2.4. Bisherige strukturelle Untersuchungen

Als photochemische Primärreaktion der Phytochrome wurde bereits 1983 von Rüdiger und Mitarbeitern eine Z/E-Isomerisierungsreaktion des Bilin-Chromophors vorgeschlagen (Rüdiger *et al.*, 1983). Für die Photochromie generell sind aber auch die Wechselwirkungen des Chromophors mit dem nativen Protein essentiell. Heutzutage sind die einzelnen Intermediate im Reaktionszyklus der Phytochrome, wie sie schematisch in Abbildung 5 gezeigt sind, bekannt, strukturell jedoch wenig charakterisiert. Um ein detailliertes Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen zu erlangen, ist jedoch eine strukturelle Charakterisierung essentiell. In der Vergangenheit sind daher sowohl an Pflanzen-ähnlichen als auch an bakteriellen Phytochromen zahlreiche Untersuchungen vorgenommen worden. Dabei kamen verschiedene Methoden wie NMR-Spektroskopie (NMR: *nuclear magnetic resonance*, kernmagnetische Resonanz), FT-IR- und FT-RR-Spektroskopie (FT-IR: *Fourier transform infrared*, FT-RR: *Fourier transform resonance Raman*), Tieftemperatur-Fluoreszenzspektroskopie, CD-Spektroskopie (CD: *circular dichroism*), Blitzlicht-Photolyse, Untersuchungen mit Chromophor-Analoga und ortsspezifische Mutagenese zur Anwendung. Anhand der Ergebnisse konnten Aussagen zur Konformation des Chromophors und des Protein-Rückgrats, zur Kinetik der einzelnen Schritte des Photozyklus und damit generell zum Mechanismus der Photochromie als Beispiel molekularer Signalverarbeitung getroffen werden. Einen Meilenstein in der Erforschung der Phytochrome stellt die 2005 veröffentlichte dreidimensionale Struktur eines Fragmentes des

Bakteriophytochroms DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* dar (Wagner *et al.*, 2005). Wagner und Kollegen ist es erstmals gelungen, rekombinantes Phytochrom zu kristallisieren und röntgenkristallographisch zu vermessen.

Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen einiger dieser strukturellen Untersuchungen sollen im folgenden Abschnitt erläutert werden. Dabei werden der Übersichtlichkeit halber hauptsächlich die Ergebnisse zu den beiden stabilen Photozuständen P_r und P_{fr} und nicht zu Intermediaten des Photozyklus berücksichtigt, da lediglich erstere Bestandteil dieser Arbeit waren.

2.4.1. NMR-Spektroskopie

Zunächst einmal gelang es mittels NMR-Spektroskopie die Struktur von PCB und PΦB zu bestimmen (Cole *et al.*, 1967; Lagarias & Rapoport, 1980). Lagarias und Rapoport konnten in ihrer Arbeit auch nachweisen, dass der PΦB-Chromophor in pflanzlichen Phytochromen (hier PhyA aus Hafer, *Avena sativa*) über eine Thioetherbindung kovalent mit dem Protein verknüpft ist. Rüdiger und Thümmler bedienten sich ebenfalls dieser Methode, um der Photochromizität der Phytochrome auf den Grund zu gehen. Sie konnten für Hafer-PhyA anhand der Lage der Methin-Protonen in einem $[^1\text{H}]$ -1D Spektrum zeigen, dass die beobachtete Rot/Dunkelrotverschiebung der Absorptionsmaxima im UV/vis-Spektrum nach entsprechender Bestrahlung mit einer *Z/E*-Isomerisierung der Doppelbindung zwischen Position C15 und C16 im Chromophor einhergeht (Thümmler & Rüdiger, 1983; Rüdiger *et al.*, 1983; Thümmler *et al.*, 1983). Es wurde allerdings auch deutlich, dass nicht die Isomerisierung allein die spektralen Veränderungen des Proteins erklären kann, sondern dass auch Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein-Matrix ihren Beitrag leisten. Diese konnten jedoch nicht genauer bestimmt werden, da die NMR-Messungen, wie auch die von Cole *et al.* und Lagarias und Rapoport (s.o.), lediglich mit (tryptischen) Proteinfragmenten und nicht mit funktionell intaktem Phytochrom durchgeführt wurden.

Die Autolyase-Funktion von Phytochromen wurde in letzter Zeit dazu genutzt, rekombinant exprimiertes, unmarkiertes oder deuteriertes Apoprotein (Cph1 oder Cph1Δ2 aus *Synechocystis* sp. PCC6803) mit $[^{15}\text{N}]$ - und/oder $[^{13}\text{C}]$ -markiertem Chromophor (PCB) zu assemblieren. Mit diesen Proben wurden entweder ein- oder mehrdimensionale heteronukleare Lösungs-NMR Spektren oder MAS-Festkörper-NMR-Spektren (MAS: *magic angle spinning*) aufgenommen (Strauss *et al.*, 2005a; Rohmer *et al.*, 2006). Damit erhielt man erstmals strukturelle Einblicke in funktionell intaktes Phytochrom. Aus beiden Arbeiten konnte geschlossen werden, dass der Chromophor sowohl in P_r als auch in P_{fr} vollständig protoniert ist, obwohl dies später von anderen Autoren angezweifelt wurde (Rockwell *et al.*, 2006). Auch zeigte sich eine gewisse Flexibilität des Chromophors in der Bindetasche des Proteins.

Insbesondere die Arbeiten von Strauss *et al.* dienten als Grundlage für die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen (Strauss *et al.*, 2005a; Strauss, 2006).

2.4.2. Schwingungsspektroskopische Methoden

Die Gesamtkonformation des Tetrapyrrol-Chromophors wird im Allgemeinen beschrieben, indem man die Konfigurationen der Doppelbindungen und die Konformationen der Einfachbindung um die drei Methinbrücken im Molekül (C5, C10, C15) angibt. Diese Beschreibung ist ausreichend, da die Pyrrol-Ringe an sich starre Einheiten darstellen und durch das konjugierte π -Elektronensystem eine annähernd planare Struktur einnehmen. Die Doppelbindungen können entweder in *Z*- oder *E*-Konfiguration (*Z*: *cis*, *E*: *trans*) vorliegen, die Einfachbindungen in *s*- oder *a*-Konformation (*s*: synperiplanar, *a*: antiperiplanar).

Wie bereits erwähnt geht die P_r - P_{fr} -Umwandlung mit einer *Z/E*-Isomerisierung an der C15-Doppelbindung einher. Es stellte sich jedoch natürlich auch die Frage nach der Situation an den anderen Methin-Kohlenstoffen. Zahlreiche schwingungsspektroskopische Untersuchungen widmeten sich dieser Frage, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen. So wurde beispielsweise aus experimentellen FT-RR-Spektren von Hafer-PhyA und Vergleichen mit theoretisch berechneten Spektren für die P_r -Form einmal eine *ZZZasa*-Konformation (Kneip *et al.*, 1999; Mroginski *et al.*, 2004), in anderen Versuchen eine *ZEEaas*-Konformation bestimmt (Andel *et al.*, 1996; Andel *et al.*, 2000). Für die P_{fr} -Form wurden *ZZEssa* (Mroginski *et al.*, 2004) und *ZEEaaa* (Andel *et al.*, 1996; Andel *et al.*, 2000) postuliert. Eine Protonierung aller Pyrrol-Stickstoffe sowohl in der P_r - als auch der P_{fr} -Form wird durch zahlreiche Experimente belegt (Siebert *et al.*, 1990; Fodor *et al.*, 1990; Andel *et al.*, 1996; Foerstendorf *et al.*, 1996; Kneip *et al.*, 1999; Andel *et al.*, 2000; Foerstendorf *et al.*, 2001). Dabei konnten als Schlüsselereignisse der P_r - P_{fr} -Konversion in Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* für die Meta- R_c -Formation eine transiente Protonenabgabe des BV-Chromophors ans Medium und für die anschließende P_{fr} -Formation eine Reprotonierung beobachtet werden (Borucki *et al.*, 2005; von Stetten *et al.*, 2007). Andere Arbeiten finden einen deprotonierten Chromophor in der P_{fr} -Form (Mizutani *et al.*, 1991; Mizutani *et al.*, 1994).

2.4.3. Untersuchungen mit Chromophor-Analoga und ortsgerichtete Mutagenese

Für ein vollständiges Verständnis der Funktionsweise von Phytochromen ist es nicht ausreichend, die Konformation des Chromophors zu kennen, man muss auch dessen Interaktionen mit dem umgebenden Protein berücksichtigen, um Modelle für die Weiterleitung und Verarbeitung der Lichtsignale zu erstellen. Die Charakterisierung der Chromophor-Apoprotein-Wechselwirkungen ist jedoch nicht trivial. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von synthetischen Chromophoren bzw. Chromophor-Analoga. So konnte z.B. für Agp1 aus

Agrobacterium tumefaciens durch die Verwendung von Biliverdin-Analoga die Anknüpfung des BV-Chromophors über die Vinyl-Seitenkette am Ring A gezeigt werden (Lamparter *et al.*, 2003). Die Verwendung von Biliverdin-Analoga mit fixierten Konformationen und Konfigurationen (*locked chromophores*) für die Assemblierung mit Apo-Agp1 und ein Vergleich der Absorptionsspektren ließen einen Rückschluß auf die Konformation und Konfiguration des BV-Chromophors in der P_r- und P_{fr}-Form von Agp1 zu (Inomata *et al.*, 2005). Untersuchungen an PhyB aus *Arabidopsis thaliana* mit modifizierten PΦB-Chromophoren ergaben, dass Autoassemblierungs- und Photokonversionsrate mit zunehmender Länge der Substituenten am Ring D absinken. Außerdem sind die Seitenketten der Ringe B und C entscheidend sowohl für die Positionierung des Chromophors in der Protein-Bindetasche als auch für die Photoreversibilität des Proteins im Allgemeinen (Hanzawa *et al.*, 2001). Ähnliche Ergebnisse erhielt man für PhyA aus *Arabidopsis*. Die Veresterung einer Propionat-Seitenkette führt zwar zur kovalenten Bindung des Chromophors, Photokonversion konnte jedoch nicht mehr beobachtet werden. Nach Veresterung beider Propionate war auch die kovalente Bindung inhibiert (Bhoo *et al.*, 1997). Experimente mit rekombinantem Hafer-PhyA zeigten, dass für die kovalente Bindung von Bilinen eine Ethyliden-Seitenkette an Ring A (C3) nötig ist. Biline ohne diese Funktion (BV, Bilirubin IX_α, Abbildung 2) binden nicht an diese Pflanzen-ähnlichen Phytochrome (Li & Lagarias, 1992). Die Nutzung von Chromophor-Analoga führte auch zur Postulierung alternativer Mechanismen der Photokonversion. Als Beispiel sei hier die von Grubmayr und Stanek vorgeschlagene Bildung eines Iminoethers am Ring A erwähnt (Grubmayr & Stanek, 1998). Im Widerspruch dazu steht allerdings ein Befund aus FT-IR-Messungen, nachdem sich ein Carbonyl-Sauerstoff an entsprechender Position finden lässt (Foerstendorf *et al.*, 2001).

Um Einflüsse einzelner Aminosäuren im Phytochrom auf die Assemblierungsreaktion und die Photoreversibilität zu überprüfen, wurden auch zahlreiche SDM-Studien durchgeführt (SDM: *site-directed mutagenesis*, ortsgerichtete Mutagenese). Zur Analyse der Mutanten dienten vor allem UV/vis-Absorptionsspektroskopie, CD-Spektroskopie, Assemblierungs- und Phosphorylierungsassays (DeForce *et al.*, 1993; Bhoo *et al.*, 1997; Remberg *et al.*, 1998; Remberg *et al.*, 1999; Wu & Lagarias, 2000; Jorissen *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2006). Aufgrund des Fehlens einer dreidimensionalen Phytochrom-Struktur waren Interpretationen der resultierenden Phänotypen jedoch meist schwierig. Eine Diskussion der Funktionen bestimmter Aminosäurereste erfolgt daher im folgenden Kapitel (2.4.4.) im Zusammenhang mit den dort vorgestellten Raumstrukturen dreier funktioneller Phytochrome.

2.4.4. Röntgenstrukturanalyse

2005 stellten Wagner *et al.* erstmalig eine gut aufgelöste (2,5Å), dreidimensionale Struktur eines Phytochroms vor (Wagner *et al.*, 2005). Dabei handelte es sich um die Kristallstruktur eines Teils des bakteriellen Phytochroms DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* im P_r-Grundzustand. Das kristallisierte und vermessene Fragment umfasste die so genannte Chromophor-bindende Domäne (CBD, N-terminale PAS- und GAF-Domäne) von DrBphP, an die BV kovalent gebunden ist. Aufgrund des Fehlens der PHY-Domäne war das Fragment jedoch photochemisch nicht voll funktionell, d.h. es war nicht in der Lage, eine vollständige Photokonversion von P_r zu P_{fr} zu vollführen. Trotz alledem war diese erste Veröffentlichung einer Phytochrom-Struktur ein genereller Durchbruch auf dem Gebiet der Phytochrom-Forschung, und dies aus zwei Gründen. Zum einen gelang erstmalig überhaupt ein struktureller Einblick in Phytochrome in atomarer Auflösung, zum anderen ist es mit Hilfe dieser Struktur nun möglich, die Ergebnisse bisheriger Untersuchungen genauer zu interpretieren.

Zunächst einmal zeigen sowohl die 2,5Å-Struktur (PDB-Code: 1ztu) sowie auch die 2007 von denselben Autoren veröffentlichte verfeinerte Struktur (1,45Å, PDB-Code: 2o9b/2o9c, (Wagner *et al.*, 2007), Abbildung 6A) die kovalente Verknüpfung des BV-Chromophors über C3² im A-Ring mit Cys24 oberhalb der N-terminalen PAS-Domäne. Die C3²-Verknüpfung kann aufgrund von Strahlenschäden am Kristall lediglich postuliert, nicht jedoch eindeutig bewiesen werden. Die Gesamtkonformation des BV wird mit ZZZssa angegeben. Die PAS-Domäne zeigt eine für diese Domänen typische Faltung aus einem fünfsträngigen antiparallelen β-Faltblatt (β2, β1, β5, β4 und β3), welches auf einer Seite von drei α-Helices (α1-α3) flankiert wird. Die GAF-Domäne enthält ein sechssträngiges antiparalleles β-Faltblatt (β9, β10, β11, β6, β7 und β8), welches zwischen einem 3-Helixbündel (α4, α5 und α8) sowie den Helices α6 und α7 eingebettet ist. Die Chromophor-Bindetasche wird hauptsächlich durch die GAF-Domäne gebildet, der gestreckte Chromophor ist tief eingebettet in eine Furche aus α6 und α7 auf einer Seite und dem GAF-β-Faltblatt auf der anderen Seite. Die N-terminalen 35 Reste oberhalb der PAS-Domäne weisen keine dezidierte Sekundärstruktur auf (*random coil*).

Eine interessante strukturelle Eigenschaft der DrBphP-Struktur ist der Kleeblatt-Knoten, der die PAS- und GAF-Domäne räumlich voneinander trennt. Er entsteht, in dem die 35 N-terminalen Aminosäuren oberhalb der PAS-Domäne eine Schleife zwischen β9 und α7 der GAF-Domäne durchlaufen. Diese Schleife (Aminosäuren 225-257) stellt eine Insertion innerhalb der konservierten GAF-Domäne dar. Hier kommen gehäuft Proline vor, teilweise sogar in cis-Konformation (Pro236). Daher wird postuliert, dass die Schleife wahrscheinlich kritisch für die Stabilisierung der Intermediate im Faltungsprozess des Knotens ist. Es kommt zur Bildung eines antiparallelen „Mini“-β-Faltblatts, in dem die beiden äußeren Stränge aus der GAF-Domänen-

Schleife, der innere Strang aus dem äußersten N-Terminus des Proteins stammen. Der Knoten wird durch hydrophobe Wechselwirkungen in seinem Inneren stabilisiert. Von entscheidender Bedeutung ist dabei Ile35, welches in Mutagenesestudien bereits als kritischer Rest für die korrekte Faltung von PhyA aus Erbse (*Bhoo et al., 1997*) und Agp2 aus *Agrobacterium tumefaciens* (*Karniol et al., 2005*) identifiziert wurde. Daher kann man vermuten, dass die Ausbildung des Kleeblatt-Knotens eine Eigenschaft aller Phytochrome ist. Vermutlich trägt er zur Stabilisierung des Kontaktes zwischen der PAS- und der GAF-Domäne bei und reduziert die Beweglichkeit des Proteins, speziell des extremen N-Terminus, der ja nicht strukturiert ist. Gerade letzteres könnte wichtig sein für eine korrekte Orientierung von Cys24 und damit für eine effiziente Erkennung und Bindung von Biliverdin.

Auch andere Aminosäure-Reste, die in vielen Phytochromen konserviert sind und die in Mutagenese-Studien als kritisch für Chromophor-Bindung und Photokonversion identifiziert wurden, können anhand der Kristallstruktur nun funktionell deutlicher charakterisiert werden. So führten z.B. Mutationen von Asp207 (Teil des hoch konservierten DIP-Motivs Asp207 – Ile208 – Pro209) und His260 in diversen Phytochromen zu Proteinen, die nach R-Bestrahlung kein P_{fr} mehr bildeten, sondern, wie FT-RR-Untersuchungen ergaben, in Meta- R_c verblieben. Betrachtet man nun die Lage dieser Aminosäuren im Protein, so wird deutlich, dass sie Teil eines komplexen Wasserstoffbrückennetzwerkes sind, das den Chromophor zusammen mit einem Wassermolekül und durch Interaktionen mit weiteren Resten positioniert (z.B. elektrostatische Interaktion zwischen Asp207 und Tyr263, Wasserstoffbrücke zwischen His260 und Propionat-Seitenkette des C-Rings) und die positive Ladung am Chromophor stabilisiert (His260). Außerdem könnten Asp207 und His260 am De-/Reprotonierungsprozess während des Meta- R - P_{fr} -Übergangs beteiligt sein. Andere Reste wie Arg254, Ser272 und Ser274 fixieren den Chromophor direkt oder über weitere Wassermoleküle in der Bindetasche, Arg254 z.B. über eine Salzbrücke mit der Propionat-Seitenkette des Rings B. Sperrige hydrophobe Reste, die den Raum um den D-Ring bilden (Tyr176, Phe198, Phe203 und Tyr263), fixieren ihrerseits den Chromophor oder andere wichtige Aminosäurereste über Wasserstoffbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen. Sie könnten auch aufgrund der *Z/E*-Isomerisierung des D-Rings während der Photokonversion mit diesem kollidieren und so weitergehende Signale auslösen. Gerade diese letzte Frage nach den Umordnungen im Protein aufgrund der Photokonversion kann wegen des Fehlens einer P_{fr} -Struktur nicht beantwortet werden. Aber auch auf andere Fragen, wie z.B. die nach der Bedeutung der Aminosäurereste in der PHY-Domäne, liefern die DrBphP-Strukturen keine Antwort. Auch gibt es Mutationen, die in homologen Phytochrom-Proteinen unterschiedliche Phänotypen hervorrufen, was auf Unterschiede in der Struktur hindeutet.

Erst kürzlich gelang es zwei anderen Gruppen weitere Phytochrome zu kristallisieren und röntgenkristallographisch zu vermessen. Dabei arbeiteten beide mit der vollständigen N-terminalen photosensorischen Domäne der jeweiligen Proteine. Essen *et al.* veröffentlichten die Struktur von Cph1 Δ 2 (PDB-Code: 2vea, Abbildung 6B) im P_r-Grundzustand (Essen *et al.*, 2008), die Gruppe um Keith Moffat die Struktur eines Bakteriophytochroms aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaBphP) im P_{fr}-Grundzustand (Yang *et al.*, 2008). Beiden Strukturen gemein ist das Vorhandensein der PHY-Domäne, welche für die volle Funktionalität von Phytochromen nötig ist. Beide Kristalle waren in der Lage zu photokonvertieren. Allerdings streuten sie anschließend nur noch ungenügend, so dass die Strukturlösung beider Photoisomere nicht gelang. Die Strukturen ähneln im Allgemeinen der DrBphP-Struktur, die homologen Aminosäuren in Cph1 und PaBphP haben ähnliche Funktionen bei der Platzierung des Chromophors in der Bindetasche. Der PCB-Chromophor in Cph1 Δ 2-P_r liegt in ZZZssa vor, der BV-Chromophor in PaBphP-P_{fr} in ZZEssa. Die mitkristallisierte PHY-Domäne ist der Faltung nach eine weitere GAF-Domäne, die über eine ca. 7Å lange Helix mit der ersten GAF-Domäne verbunden ist. An dieser Helix erfolgt die Homodimerisierung des Proteins.

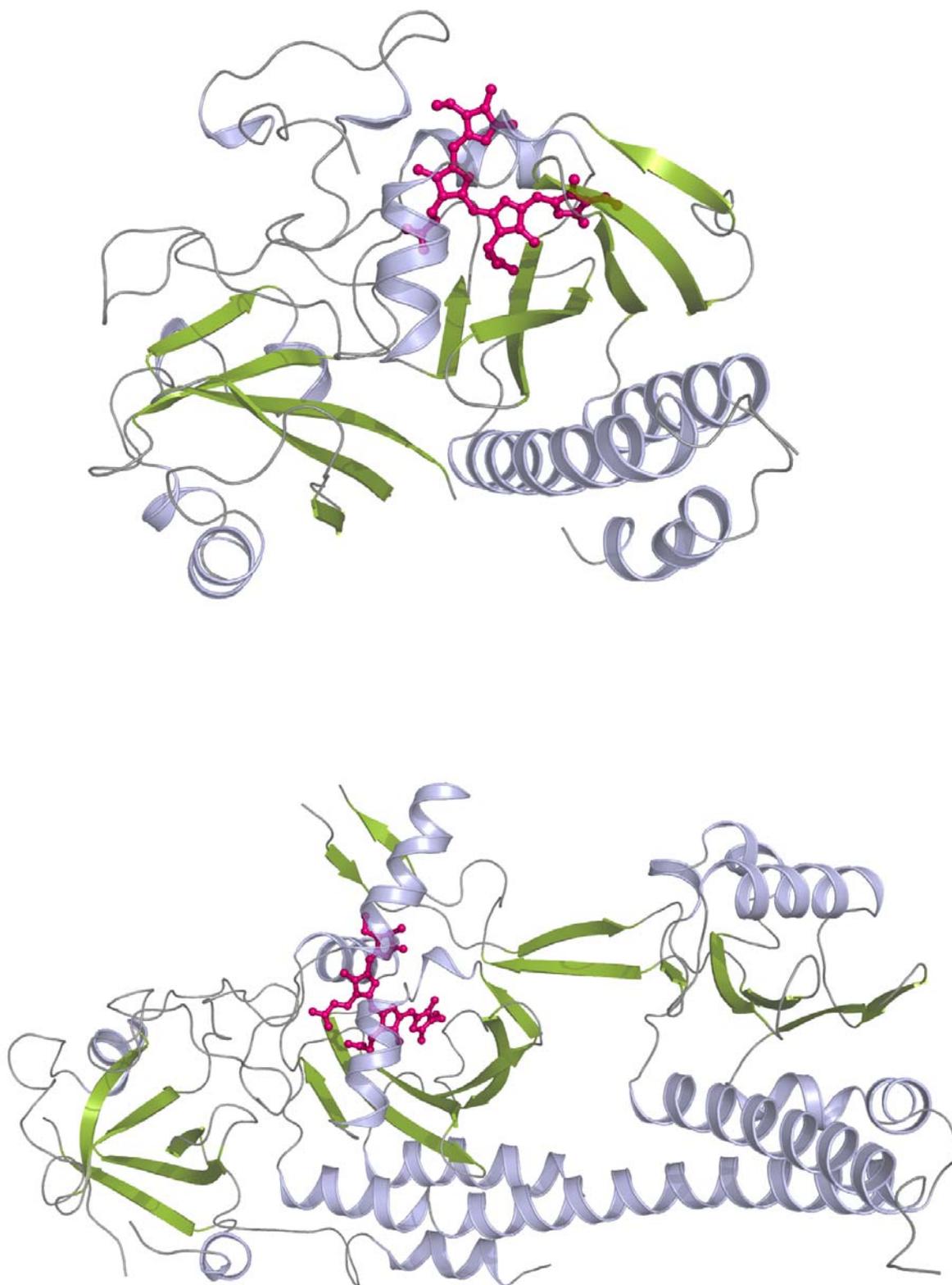


Abbildung 6: Dreidimensionale Struktur von DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* (oben, PDB-Code: 1ztu) und Cph1Δ2 aus *Synechocystis sp.* PCC6803 (unten, PDB-Code: 2vea).

2.5. Zielstellung

Trotz der zahlreichen strukturellen Untersuchungen, die bisher an Phytochromen vorgenommen wurden, sind die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich und viele Fragen zur Funktionsweise des Proteins bis heute unbeantwortet geblieben. Ist der Chromophor in beiden stabilen Photozuständen vollständig protoniert? Welche Konformationsänderungen vollzieht der Chromophor nach Lichtdetektion? Wie wird das vom Chromophor detektierte Lichtsignal auf das Protein übertragen, um die Signaltransduktionskaskade zu initiieren und schließlich eine Antwort auszulösen? Ziel dieser Arbeit ist es, diese Fragen zu Struktur-Funktionsbeziehungen in cyanobakteriellem Phytochrom Cph1 zu beantworten und die Ergebnisse wenn möglich auf andere Phytochrome zu verallgemeinern.

Für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten strukturellen Untersuchungen eines Protein-Kofaktor-Systems kommt die Methode der Lösungs-NMR-Spektroskopie zur Anwendung, wie bereits 2002 für das aktive Zentrum von Bakteriorhodopsin erfolgreich praktiziert (*Patzelt et al., 2002*). Diese „Absolutmethode“ der Strukturaufklärung erlaubt die Bestimmung der Lage einzelner Atome eines Proteins oder Kofaktors direkt aus den Messdaten. Dabei ist der Vorteil dieser Methode gegenüber der röntgenkristallographischen Vermessung biochemisch relevanter Verbindungen, dass sich die zu untersuchenden Substanzen in Lösung befinden. Damit kann im Prinzip die natürliche Situation von löslichen Proteinen in einer Zelle „nachgeahmt“ werden. Es können ausserdem Aussagen zu Protonierungszuständen und dynamischem Verhalten der Zielverbindung getroffen werden. Schäden am zu untersuchenden System, wie sie z.B. bei einer Bestrahlung der Probe mit Röntgenstrahlen auftreten, werden vermieden.

Natürlich bringt die Anwendung der Lösungs-NMR-Spektroskopie auf das Cph1-System auch Probleme mit sich. Zunächst einmal ist die Gesamtgröße des Proteins kritisch. Cph1 ist 85 kDa groß, die von uns verwendete Deletionsmutante Cph1 Δ 2 noch 58 kDa (siehe Kapitel 2.3.4.). Trotz enormer Weiterentwicklung der NMR-Geräte und -Methoden in Bezug auf die Größe der zu untersuchenden Proteine ist eine vollständige Strukturlösung von Proteinen mit Molekulargewichten von über 35kDa nicht zu bewerkstelligen. Daher waren in dieser Arbeit ausschließlich die Struktur des Chromophors sowie der ihn umgebenden Proteintasche von Interesse, was ein zweites Problem mit sich brachte. Im Gegensatz zum Apoprotein hat der PCB-Chromophor lediglich eine Größe von 586 Da. Das Verhältnis von Protonen im Protein und im Chromophor ist 4096:33. Das bedeutet, dass ohne spezielle Markierungen Signale vom Chromophor von denen des Proteins überlagert werden und dementsprechend nicht eindeutig zu identifizieren und zuzuordnen sind.

Strategien zur Selektion der Chromophorsignale sind die Einführung von Heterokernen ($[^{13}\text{C}]$ und/oder $[^{15}\text{N}]$) in den Chromophor und die Deuterierung des Apoproteins. Letzteres würde generell zu einer Reduzierung der Signalzahl z.B. in einem 2D-NOESY führen. In einem solchen Spektrum sollten dann bei vollständiger Deuterierung des Apoproteins die Chromophor-Protonen-Signale eindeutig zuzuordnen sein. Die Einführung von $[^{13}\text{C}]$ - und/oder $[^{15}\text{N}]$ -Kernen in den Chromophor und die Aufnahme entsprechender heteronuklearer 2D- und 3D-Spektren ergeben zusätzliche Selektionskriterien für die Chromophorsignale, was im Idealfall deren eindeutige und vollständige Zuordnung erlauben und Informationen über Abstände und Winkel im Chromophor liefern sollte. Dabei wäre auch das Verhältnis von Protonen im Protein und im Chromophor für eine eindeutige Zuordnung nicht mehr so entscheidend, eine vollständige Deuterierung des Apoproteins nicht zwingend erforderlich.

Mit $[^{13}\text{C}]$ - bzw. $[^{15}\text{N}]$ - HSQC/HMQC-Spektren könnten die chemischen Verschiebungen der Heterokerne bestimmt werden. Zusammen mit Daten heteronuklearer 3D-Spektren wäre somit eine konsistente Zuordnung möglich. In einem weiteren Schritt könnten dann Kopplungskonstanten bestimmt und sequentielle sowie intramolekulare NOE-Signale in 2D- und heteronuklearen 3D-NOESY-Spektren zugeordnet werden. Ein reverser Markierungsansatz, d.h. speziell protonierte Aminosäuren vor einem ansonsten deuterierten Proteinhintergrund, und die Aufnahme weiterer NOESY-Spektren sollten zusätzliche Informationen über intermolekulare Abstände zwischen Chromophor und Aminosäuren der Proteinbindetasche liefern. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 7 alle erwähnten Markierungsstrategien anhand des Modells eines Phycobiliproteins zusammengefasst.

Theoretisch sollte mit den genannten Markierungsstrategien sowie nach Auswertung aller Daten ein Modell des Chromophors in der Bindetasche für beide stabilen Photozustände P_r und P_{fr} berechnet werden können, mit dessen Hilfe eine Beantwortung der gestellten Fragen dann möglich wäre.

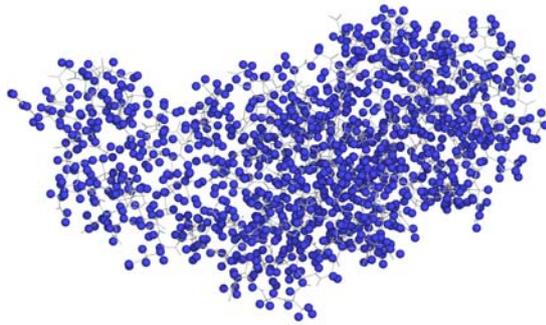
Holger Strauss hat in seiner Dissertation unter Verwendung der vorgestellten Strategien bereits erste Spektren gemessen (*Strauss, 2006*). In einem HMQC-Spektrum mit $[^{13}\text{C}]$ -markiertem Chromophor waren die Methylgruppen deutlich zu identifizieren (*Strauss et al., 2005a*), nicht jedoch die Methinbrücken oder andere Protonen-Kohlenstoff-Korrelationen. Damit ist zwar generell die Aufnahme von $[^{13}\text{C}]$ -editierten 3D-NOESY-Spektren möglich, eine vollständige Resonanzzuordnung wird jedoch deutlich erschwert. In ebenfalls bereits gemessenen $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektren konnten nicht alle Protonen-Pyrrolstickstoff-Korrelationen des Chromophors detektiert werden. Stark verbreiterte Signale und damit einhergehende schwache Signalintensitäten auch nach extrem langen Messzeiten machen die Aufnahme $[^{15}\text{N}]$ -editierter 3D-NOESY-Spektren unmöglich, was wiederum eine Resonanzzuordnung erschwert bzw.

verhindert. Es scheint, dass der Chromophor nicht starr in der Proteinbindetasche fixiert ist, sondern eine gewisse Beweglichkeit aufweist, was die Qualität der Spektren beeinträchtigt. Aufgrund dieser ersten Experimente konnte man schlussfolgern, dass die möglichen messbaren Spektren nicht genug Daten für eine vollständige Strukturberechnung des Chromophors liefern würden.

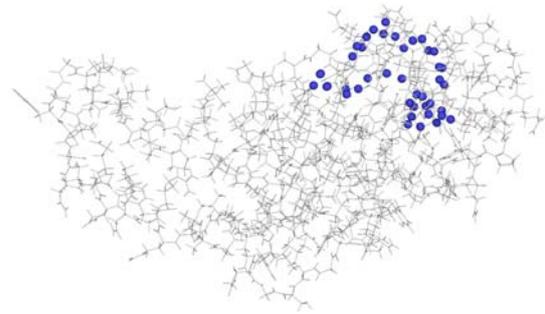
Um sich dennoch der strukturellen Charakterisierung des Chromophors in der Proteinbindetasche und somit der Beantwortung der zu Beginn dieses Kapitels gestellten Fragen zu nähern, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein geeignetes Modellsystem – Protein mit kovalent gebundenem Bilin-Chromophor – gefunden werden, dessen dreidimensionale Struktur bekannt ist und das als Vergleichsobjekt für die Interpretation und Zuordnung der [^{15}N]-chemischen Verschiebungen von Cph1 Δ 2 dient. Das cyanobakterielle Phycobiliprotein C-Phycocyanin bzw. dessen α -Untereinheit ist ein solches Modellsystem. Ziel war es daher, α -C-Phycocyanin spezifisch markiert herzustellen, aufzureinigen und NMR-spektroskopisch zu vermessen.

Die verschiedenen NMR-Messungen am Cph1-System selbst erfordern eine unterschiedliche Markierung von Protein und Chromophor. Ermöglicht wird dies durch die intrinsische Bilin-Lyase-Funktion von Phytochromen (siehe Kapitel 2.3.2.). Diese erlaubt es, Chromophor und Apoprotein einzeln und spezifisch markiert herzustellen und anschließend beide *in vitro* zu assemblieren und zu vermessen. Eine Prozedur zur Markierung und Isolierung von PCB aus *Synechocystis* PCC6803 wurde bereits etabliert und kann hier zur Anwendung kommen (Strauss *et al.*, 2005a). Protokolle für eine möglichst vollständige Deuterierung von apo-Cph1 Δ 2 sowie für den reversen Markierungsansatz mußten im Rahmen dieser Arbeit entwickelt werden.

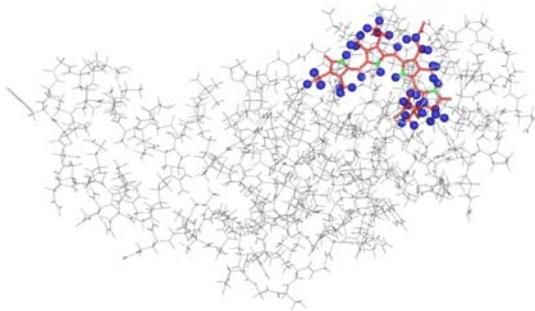
Mittels aller gesammelten Messdaten sollte es zum Abschluss der Arbeit möglich sein, ein grobes Modell des PCB-Chromophors in der Bindetasche von Cph1 Δ 2 in beiden photoisomeren Formen zu erstellen, mit dem die gestellten Fragen beantwortet werden können.



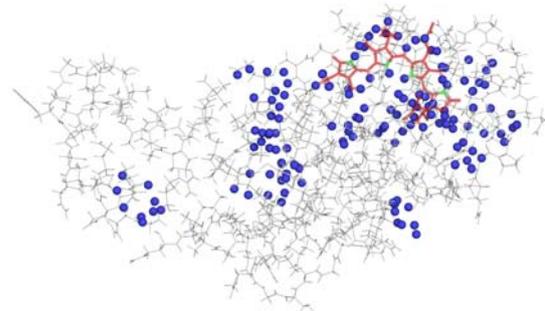
$[^1\text{H}]\text{-Protein} + [^1\text{H}]\text{-Chromophor}$



$[^2\text{H}]\text{-Protein} + [^1\text{H}]\text{-Chromophor}$
→ 2D-NOESY



$[^2\text{H}]\text{-Protein} + [^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]\text{-Chromophor}$
→ $[^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]\text{-HMQC}$
→ 3D-HMQC-NOESY



$[^2\text{H}]\text{-Protein} + [^1\text{H}]\text{-AA} + [^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]\text{-Chromophor}$
→ $[^{13}\text{C}/^{15}\text{N}]\text{-HMQC}$
→ 3D-HMQC-NOESY

Abbildung 7: Markierungsstrategien und mögliche Experimente zur Lösung der Struktur der Bindetasche von Cph1Δ2 mittels NMR-Spektroskopie. Zur Veranschaulichung wurde ein Modell der 3D-Struktur eines Phycobiliproteins gewählt.

3. Material und Methoden

Falls nicht separat erwähnt wurden alle benutzten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Serva Electrophoresis (Heidelberg), Amersham Biosciences / GE Healthcare (Uppsala, Schweden), Merck (Darmstadt). Isotopenangereicherte Verbindungen ($[^2\text{H}]_2\text{O}$, $\text{N}[^2\text{H}]_4\text{Cl}$, $\text{Na}[^{15}\text{N}]\text{O}_3$, $\text{NaH}[^{13}\text{C}]\text{O}_3$, deuteriertes Glycerol oder Glucose) stammen von Cambridge Isotope Laboratories (Cambridge, MA, USA), Isotopenangereichertes Vollmedium von Silantes (München). Rote und dunkelrote *light emitting diodes* (LEDs; Rot (*red*, R): B5-436-30D, λ_{max} 664 nm, FWHM 40 nm; Dunkelrot (*far-red*, FR): SMC735, λ_{max} 735 nm, FWHM 40 nm) für die Photokonversion sowie grüne Sicherheitslicht-LEDs (λ_{max} 520 nm) wurden bei Roithner Lasertechnik (Wien, Österreich) erworben.

Optische Zelldichten wurden an einem Ultrospec2000 UV/visible Spektrophotometer (Pharmacia Biotech / GE Healthcare), UV/vis-Absorptionsspektren an einem Lambda-9 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) Spektrophotometer gemessen.

3.1. Proteinherstellung

3.1.1. Plasmide und Stämme

Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde nicht mit dem Wildtyp-Protein Cph1, sondern mit einer Deletionsmutante - Cph1 Δ 2 - gearbeitet. Cph1 Δ 2, das die N-terminalen Aminosäuren 1-514 umfasst, ist photochemisch nicht unterscheidbar vom *full-length* Konstrukt (Yeh *et al.*, 1997), neigt aber weniger stark zur Aggregation (Strauss *et al.*, 2005b). Das p926.5 Plasmid enthält ein offenes Leseraster für Cph1 Δ 2 mit C-terminalem His₆-tag (basierend auf dem pQE12 Expressionsvektor, Qiagen, Hilden), um die Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) durchzuführen. Es wurde freundlicherweise von J. Hughes (Justus-Liebig-Universität, Giessen) zur Verfügung gestellt.

Für Lagerung und Vermehrung wurde p926.5 in *E.coli* XL1-blue (Stratagene, La Jolla, CA, USA), für die Expression in M9-Minimalmedium in *E.coli* BL21(DE3)pSE111 transformiert. Das pSE111 Plasmid (kloniert von E. Scherzinger und zur Verfügung gestellt von K. Büssow, PSF, Berlin) kodiert für *lacI_q* and *ArgU*. Große Mengen *lac*-Repressor *lacI* sind für eine effiziente Repression des T5-Promotors im p926.5 Plasmid und damit für eine optimale Regulation der Genexpression von Nöten. Das *argU* Gen kodiert für seltene Arginin-tRNAs und verbessert so die Expression von Genen mit vielen AGG oder AGA Arginin-Codons.

3.1.2. Medien

Expression von [²H]-markiertem Cph1Δ2: Für die Expression von deuteriertem Cph1Δ2 wurde [²H]₂O-M9 Minimalmedium mit vollständig deuteriertem Glycerol oder vollständig deuterierter Glukose als einziger Kohlenstoffquelle benutzt. Alle Bestandteile des Mediums (Tabelle 1) sowie Antibiotika und IPTG wurden entweder direkt in [²H]₂O gelöst oder - wenn sie als Hydrate vorlagen - zunächst in [²H]₂O gelöst, anschließend lyophilisiert und erneut in [²H]₂O gelöst.

Expression von [²H]-markiertem Cph1Δ2 + [¹H]-Phe/Tyr: Für die Expression von deuteriertem Cph1Δ2 mit spezifisch protonierten Phenylalanin- und Tyrosin-Resten wurde kommerziell erhältliches deuteriertes Vollmedium (*E.coli*-OD2 D, Silantes, München) verwendet. Dieses Medium besteht aus einem Bakterienhydrolysat und enthält primär Aminosäuren, einige niedermolekulare Oligopeptide und fast keine Kohlenhydrate. Phenylalanin und Tyrosin liegen in diesem Medium in folgenden Konzentrationen vor:

Phenylalanin	7,55 μM = 1,3 mg/l
Tyrosin	6,18 μM = 1,1 mg/l

Um zu gewährleisten, dass Phenylalanin und Tyrosin als protonierte Aminosäuren ins Protein eingebaut werden, wurden sie im Überschuss in einer Konzentration von 200 mg/l Kultur zum Medium hinzugegeben (*E.coli*-OD2 D/FY). Die entsprechenden Antibiotika (Konzentration siehe Tabelle 1) und IPTG wurden in [²H]₂O gelöst, bevor sie ebenfalls zum Medium hinzugefügt wurden.

Tabelle 1: M9-Minimalmedium-Komponenten und Antibiotika für die Expression von [²H]₂O-Cph1Δ2.

Komponente	Ausgangs- konzentration	Schüttel- kultur (1 l)	HZDF-Kultur	
			Batch-Medium (1 l)	Expressionsfeed (30 ml)
² [H] ₂ O		860 ml	740 ml	ad 30 ml
Spuren- elemente		10 ml	20 ml	-
MgSO ₄	1M	1 ml	1 ml	-
CaCl ₂	1M	0,3 ml	0,3 ml	-
M9-Salz	10x	100 ml	200 ml	15 ml
Glukose oder Glycerol		4 g	8 g	7,5 g
NH ₄ Cl		1 g	2 g	1,9 g
Thiamin	1 mg/ml	1,5 ml	3 ml	0,225 ml
Biotin	0,1 mg/ml	15 ml	30 ml	2,25 ml
Spuren- elemente		EDTA FeSO ₄ ZnCl ₂ CuSO ₄ H ₂ O		2,5 g 250 mg 25 mg 5 mg ad 500 ml
10x M9-Salz		Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ NaCl H ₂ O		80 g 20 g 5 g ad 1l
Antibiotika		Schüttelkultur	Ampicillin	Kanamycin
		HZDF: Batch-Medium	100 µg/ml	25 µg/ml
		HZDF: Expressionsfeed	600 µg/ml	180 µg/ml
		HZDF: Induktionsfeed	600 µg/ml	180 µg/ml
			-bzgl. Gesamtvol.-	180 µg/ml
			-bzgl. Feedvol.-	180 µg/ml
			-bzgl. Feedvol.-	180 µg/ml

3.1.3. Proteinexpression

Expression von [²H]-markiertem Cph1Δ2 - Schüttelkultur: Die Expression von Cph1Δ2-Apo-protein basiert auf einer Prozedur, die von Lamparter *et al.* entwickelt wurde (Lamparter *et al.*,

2001). 50 ml flüssiges Luria-Bertani-Medium (LB) mit entsprechenden Antibiotika wurden mit einer frischen Transformante (*p926.5* in BL21(DE3)pSE111) inokuliert und die Kultur bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine optische Dichte OD₆₀₀ von 1 erreicht hatte. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation geerntet, mit 150 mM steriler NaCl-Lösung gewaschen und in 500 ml [²H]₂O-M9-Glycerol-Medium resuspendiert. Diese markierte Vorinduktionskultur ist nötig, damit sich die Zellen an die Kultivierung in [²H]₂O gewöhnen und damit ein möglichst hoher Deuterierungsgrad des Proteins erreicht wird. Die Zellen wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen, wieder geerntet und anschließend in 2 x 500 ml [²H]₂O-M9-Glycerol-Medium resuspendiert. Nach einer kurzen Inkubationsphase bei 18°C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 18°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Expression von [²H]-markiertem Cph1Δ2 – Hochzelllichtfermentation (HZDF): Die Fermentation wurde mit dem fedbatch-pro[®] System der Firma DASGIP AG (Jülich) durchgeführt. Das gesamte System ist Software-kontrolliert, d.h. alle Fermentationsschritte können aufgezeichnet und automatisch reguliert werden.

2 x 40 ml flüssiges LB-Medium wurden mit einer frischen Transformante (*p926.5* in BL21(DE3)pSE111) inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Ernte der Zellen mittels Zentrifugation wurden die Bakterienpellets in 8 ml vorgewärmtem Batch-Medium resuspendiert und in die vier Fermentationsreaktoren überführt (je 2 ml pro Reaktor). In die Reaktoren war bereits jeweils 200 ml Batch-Medium vorgelegt worden. Die optische Dichte OD₆₀₀ zu Beginn der Fermentation betrug 0,5.

Während die Zellen wachsen, misst das System ständig den Sauerstoffgehalt (pO₂) in den Reaktoren. Aufgrund der metabolischen Aktivität der *E.coli* Zellen werden die Nährstoffe im Medium verbraucht und der Sauerstoffgehalt sinkt kontinuierlich. Dies kompensiert das System zunächst durch eine Erhöhung der Rührergeschwindigkeit. Sind alle Nährstoffe des Batch-Mediums aufgebraucht, stoppen die Zellen ihren Metabolismus. Der Sauerstoffgehalt steigt nun sprunghaft an. Überschreitet er einen vorher bestimmten Wert für eine bestimmte Zeit (hier: pO₂ 50%, 30 Sekunden), aktiviert das System die Hinzugabe des Expressionsfeeds (Flussrate: 1 ml/min). Durch die Zugabe neuer Nährstoffe setzt der Metabolismus der Zellen wieder ein und Sauerstoff wird verbraucht. Sinkt nun der Sauerstoffgehalt wieder unter einen bestimmten Wert (hier: pO₂ 30%), stoppt das System die Zugabe des Expressionsfeeds, bis erneut alle Nährstoffe verbraucht sind und pO₂ wieder auf 50% steigt. Dieser kontrollierte Regulationsmechanismus führt zu einer optimalen Ausnutzung aller Ressourcen, speziell der isotonen-angereicherten Verbindungen. Die Proteinexpression wird eine Stunde nach Start des Expressionsfeeds durch

Zugabe des Induktionsfeeds induziert (Flussrate: 40 ml/min für 15 Minuten). Die Fermentation endet nach sieben Stunden und die Zellen können geerntet werden.

In einer Fermentation zur [^{13}C]- bzw. [^{15}N]-Markierung sind die Komponenten des Batch-Mediums nicht isotoopenmarkiert. Außerdem ist es möglich, einen zusätzlichen unmarkierten Feed in den Fermentationsprozess einzuführen, um die Biomasse vor Induktion der Expression weiter zu steigern (Fiedler *et al.*, 2007). Im Fall der Deuterierung des zu exprimierenden Proteins jedoch werden alle Komponenten des Batch-Mediums deuteriert angeboten, um einen maximalen Deuterierungsgrad zu erreichen. Während der Batch-Phase betrug die Temperatur des Systems 37°C, für die Expression wurde sie auf 18°C abgesenkt. Die Proteinexpression wurde mit 100 μM IPTG (Anibiotikakonzentration im Induktionsfeed: siehe Tabelle 1) induziert. Am Ende der Fermentation lag die optische Dichte OD_{600} der Kulturen durchschnittlich bei 11-12.

Expression von [^2H]-markiertem Cph1 Δ 2 + [^1H]-Phe/Tyr - Schüttelkultur: 50 ml flüssiges LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika wurden mit einer frischen Transformante (*p926.5* in BL21(DE3)pSE111) inokuliert und die Kultur bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis sie eine optische Dichte OD_{600} von 1 erreicht hatte. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation geerntet, mit 150 mM steriler NaCl-Lösung gewaschen und in 500 ml E.coli-OD2 D/FY-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen. Nach einer kurzen Inkubationsphase bei 18°C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 100 μM IPTG induziert und die Zellen für weitere 48 Stunden bei 18°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.1.4. Proteinaufreinigung

Cph1 Δ 2 wurde als Holoprotein aufgereinigt. Die Herstellung des PCB-Chromophors mit entsprechenden Markierungsmustern sowie dessen Aufreinigung werden in Kapitel 3.2 beschrieben. Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zusammensetzung aller für die Aufreinigung benutzten Puffer ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Puffer für die Aufreinigung von Cph1Δ2. Alle Puffer hatten einen pH-Wert von 7,8 und wurden vor ihrer Verwendung filtriert.

Puffer	Komponente	Konzentration
TES	Tris/HCl, pH 7,8	50 mM
	EDTA	5 mM
	NaCl	300 mM
TIS10	Tris/HCl, pH 7,8	50 mM
	Imidazole	10 mM
	NaCl	300mM
TIS250	Tris/HCl, pH 7,8	50 mM
	Imidazole	250 mM
	NaCl	300 mM
AmS	Tris/HCl, pH 7,8	50 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	3,3 M
	NaCl	300 mM

Die Bakterienzellen wurden aufgetaut und in kaltem TES-Puffer mit 1 mM DTT resuspendiert. Nach Zugabe von Benzonase, einer Protease-freien Nuclease (Novagen, EMD Chemicals, San Diego, CA, USA; Menge siehe Herstellerangabe), wurden die Zellen mittels einer *French-Pressure Cell* (2 Durchläufe bei 120 MPa) aufgeschlossen und die Zelltrümmer sowie hochmolekulare Aggregate bei 25000 g für 20 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurde PCB mit dem gewünschten Markierungsmuster hinzugegeben, so dass alle weiteren Aufarbeitungsschritte unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt werden mussten. Um die Sättigung von apo-Cph1Δ2 mit PCB zu bestimmen, wurden UV/vis-Spektren der P_r und P_{fr}-Form aufgenommen und (P_r)-(P_r/P_{fr})-Differenzspektren berechnet (siehe Kapitel 2.4), Sättigung war erreicht, wenn freies PCB im Spektrum nachweisbar war. Die löslichen Proteine wurden dann mit Ammoniumsulfatpuffer (AmS; Volumenverhältnis 1:1) ausgefällt, abzentrifugiert (75000 g, 20 Minuten), in TIS10-Puffer resuspendiert und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (25000 g, 10 Minuten) auf eine mit TIS10-Puffer äquilibrierte FPLC-Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA superflow, FPLC grade, Qiagen, Hilden) aufgetragen. Die Säule wurde zur Entfernung unerwünschter Proteine mit 30 mM Imidazol (12% TIS250-Puffer) gewaschen, zur Elution des Zielproteins wurde ein Konzentrationsgradient von 30 mM

bis 250 mM Imidazol (12%-100% TIS250) verwendet. Eluiertes holo-Cph1 Δ 2 wurde nochmals mit AmS-Puffer ausgefällt und in kaltem TES resuspendiert. Falls nötig, wurde als weiterer Aufreinigungsschritt eine Größenausschlußchromatographie (SEC: *size exclusion chromatography*) auf einer Sephacryl-Säule (Sephacryl 300, Amersham Pharmacia/GE, Uppsala, Schweden) mit TES als Laufmittel durchgeführt. Holo-Cph1 Δ 2 wurde in TES bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Präparation entsprechender NMR-Proben wird in Kapitel 3.4. beschrieben.

Zur Verfolgung der Reinigungsprozedur und zur Überprüfung der Reinheit des Proteins dienen zwei Methoden. Zum einen wurden Gelelektrophoresen mit 10%-igen SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli durchgeführt (*Laemmli, 1970*). Eine andere Möglichkeit, um den Reinheitsgrad einer holo-Cph1 Δ 2 Präparation zu ermitteln, ist die Bestimmung des Spezifischen Absorptionsverhältnisses (SAR: *specific absorbance ratio*) des langwelligen Absorptionsmaximums der P_r-Form $\lambda_{\max}(\text{R})$ bei 654 nm zum Absorptionsmaximum bei 280 nm. Nach der FPLC-IMAC-Aufreinigung konnte ein SAR von ≥ 1 erreicht werden, was für die meisten weiteren Anwendungen ausreichend war. Die Proteinkonzentration wurde mittels UV-vis-Absorptionsspektroskopie unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten ϵ von 82 mM⁻¹ cm⁻¹ für $\lambda_{\max}(\text{R})$ bei 654 nm (*Hahn et al., 2006*) bestimmt.

3.2. Chromophorherstellung

Für die Gewinnung von Phycocyanobilin (PCB) ist das Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC6803 ein idealer Organismus. Zum einen enthalten seine Phycobilisomen Phycocyanin und Allophycocyanin als Biliproteine und somit ausschließlich PCB als chromophore Gruppe. Zum anderen ist die Kultivierung von *Synechocystis sp.* PCC6803 relativ einfach und Protokolle für Markierung und Aufreinigung bereits etabliert (*Glazer, 1988; Strauss et al., 2005a*). Eine axenische *Synechocystis sp.* PCC6803 Startkultur wurde dankenswerterweise von A. Wilde (Humboldt-Universität, Berlin) zur Verfügung gestellt.

3.2.1. *Synechocystis* PCC6803 Zellkultur

Das Standard-Medium für die Kultivierung von phototrophen Blaualgen ist BG11 (*Castenholz, 1988*). Da der PCB-Chromophor für NMR-Messungen allerdings spezifisch isotopenmarkiert sein muss, ist es nötig, dem Standard-BG11-Medium [¹³C]- und/oder [¹⁵N]-markierte Verbindungen zuzusetzen und es dahingehend zu modifizieren. Da dies von *Strauss et al.* bereits ausführlich beschrieben worden ist (*Strauss et al., 2005a*), erfolgt an dieser Stelle lediglich eine verkürzte Darstellung.

Für die Präparation von [^{15}N]-PCB wurde $\text{Na}[^{15}\text{N}]\text{O}_3$ in einer Konzentration von 17,65 mM als Stickstoffquelle benutzt. Alle Medium-Komponenten wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Eine pH-Wert-Einstellung war nicht nötig. Die Cyanobakterien wurden unter konstanter Weißlicht-Bestrahlung (Sylvania GroLux, Osram, München) bei Raumtemperatur in 2 Liter Laborflaschen (Schott, Mainz, Germany) kultiviert. Die Kulturen wurden permanent mit steril gefilterter Luft (Acro50[®], Pall, East Hills, NY, USA) aus einer Pumpe begast (Flussrate: 6 l/min), da die Cyanobakterien das Kohlendioxid der Luft für ihren Stoffwechsel benötigen. Zwischen Pumpe und Filter wurde die Luft zusätzlich durch eine Gaswaschflasche mit destilliertem Wasser geleitet.

Für doppelt markiertes [$^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$]-PCB wurde das BG11-Medium mit CHES (N-cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure, metabolisch inert, 60 mM) gepuffert. Der pH-Wert des Mediums musste dementsprechend auf 8,0 eingestellt werden. Die $\text{Na}[^{15}\text{N}]\text{O}_3$ -Konzentration wurde auf 4,41 mM abgesenkt und $\text{NaH}[^{13}\text{C}]\text{O}_3$ mit einer Konzentration von 47,6 mM wurde als Kohlenstoffquelle zugefügt. Alle Mediumkomponenten wurden in destilliertem Wasser gelöst und in vorher autoklavierte Laborflaschen steril filtriert. Die Kulturen wurden mittels eines Magnetrührers permanent bewegt.

Das Zellwachstum wurde spektrophotometrisch überwacht. Die Zellen erreichten nach ca. drei bis vier Wochen einen stationären Zustand ($\text{OD}_{750} \sim 2-3$) und konnten geerntet werden. Jeweils 10-15 Volumenprozent einer gesättigten Kultur des passenden Markierungsmusters wurden als Inokkulum für frisches Medium verwendet.

3.2.2. PBS Isolation und PCB Präparation

Um die Integrität der Phycobilisomen zunächst aufrecht zu erhalten, wurden alle Aufreinigungsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die cyanobakteriellen Zellen wurden mittels Zentrifugation (5000 g, 10 Minuten) geerntet, in 0,75 M K_nPO_4 , pH 7,0 resuspendiert und in einer *French-Pressure cell* (2 Durchgänge bei 120 MPa) aufgeschlossen. Zelltrümmer und Membranfragmente wurden durch Zentrifugation (75000 g, 20 Minuten) von den löslichen Proteinen getrennt. Der Überstand nach der Zentrifugation, der sowohl die PBS als auch Chlorophyll und Carotenoide enthält, wurde anschließend für eine Stunde mit 1% v/v Triton X-100 inkubiert, um eventuell noch anhaftende Thylakoidmembranfragmente zu entfernen. Nach nochmaliger Zentrifugation (75000 g, 10 Minuten) wurden die PBS mit Methanol (50% v/v) präzipitiert und zur Entfernung von Chlorophyll und Carotenoiden mehrmals mit kaltem Methanol gewaschen. Diese Prozedur ist einfacher und schneller durchzuführen als die PBS-Isolation mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation (Glazer, 1988), obwohl sie nicht so effektiv hinsichtlich der Entfernung des Chlorophylls ist. Das PCB wurde mittels 24-stündiger Methanolyse in einem Soxhlet-Extraktor von den PBS-Proteinen extrahiert und im Anschluß im

Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Die Lagerung der methanolischen PCB-Lösung erfolgte im Dunkeln bei -80°C . Weil freies PCB, wenn es Licht ausgesetzt ist, oxidiert, wurden die letzten Aufreinigungsschritte unter grünem Sicherheitslicht durchgeführt.

Die Quantifizierung des PCB erfolgte mittels UV-vis-Absorptionsspektroskopie in Methanol/5% HCl unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten ϵ von $37,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für λ_{max} bei 690 nm (Cole et al., 1967).

3.2.3. PCB Präparation aus *Spirulina platensis*

Für die Präparation von unmarkiertem PCB konnte auch ein anderes Cyanobakterium – *Spirulina platensis* – verwendet werden. *Spirulina* sind als Pellets sprüh-getrockneter Algen kommerziell erhältlich. Nach Zugabe von Wasser brechen die Zellen aufgrund des osmotischen Schocks auf. Die PBS, die ebenfalls lediglich PCB als chromophore Gruppe tragen, sind in diesem wässrigen Auszug löslich und können mit Methanol präzipitiert werden. Alle weiteren Aufreinigungsschritte entsprechen denen für die PCB-Präparation aus *Synechocystis* (Kapitel 3.4.2.).

3.3. Präparation von markiertem α -C-Phycocyanin aus *Mastigocladus laminosus*

Ein Protokoll für die Präparation von uniform markiertem [^{15}N] und/oder [^{13}C]-PCB in *Synechocystis sp.* PCC6803 wurde bereits etabliert (Kapitel 3.2.). Die Isolation einzelner Biliproteine aus cyanobakteriellen Phycobilisomen und die Auftrennung in ihre jeweiligen Untereinheiten ist ebenfalls bereits beschrieben worden (Nies & Wehrmeyer, 1980; Füglistaller et al., 1981; Köst-Reyes et al., 1987; Reuter, 1989; Wiegand et al., 2002). Wir entschieden daher, Prozeduren von Nies & Wehrmeyer sowie von Köst-Reyes et al. zu modifizieren, um α -C-Phycocyanin (α -C-PC) aus den markierten *Synechocystis* Kulturen, die bereits im Labor vorhanden waren, zu isolieren. Unglücklicherweise scheiterten diese Versuche, da die physikalischen Eigenschaften (Molekulargewicht, isoelektrische Punkte usw.) von *Synechocystis* α - und β -C-PC zu ähnlich sind, als dass sie mit den beschriebenen Methoden trennbar wären. Hingegen unterscheiden sich die C-PC α - and β -Untereinheiten des thermophilen Cyanobakteriums *Mastigocladus laminosus* deutlich in ihren isoelektrischen Punkten ($\text{pI}_{\alpha}=6,1$, $\text{pI}_{\beta}=5,0$). Daher schien eine Untereinheitentrennung mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung möglich. Eine axenische Startkultur von *Mastigocladus laminosus* wurde freundlicherweise von H. Scheer (Ludwig-Maximilian-Universität, München) zur Verfügung gestellt.

3.3.1. *Mastigocladus laminosus* Zellkultur

Das Standard-Medium für die Kultivierung von *Mastigocladus laminosus* (synonym: *Fischerella* PCC7603) ist anorganisches Castenholz-Medium (Castenholz, 1988).

Da jedoch wiederum eine für NMR-Zwecke spezifische Isotopenmarkierung der Kulturen notwendig war, musste das Medium dementsprechend modifiziert werden. Dies geschah in Anlehnung an die von Strauss *et al.* beschriebene Methode für die Markierung von *Synechocystis* sp. PCC6803 (Strauss *et al.*, 2005a). Für die Präparation von [¹⁵N]- α -C-PC wurde Na[¹⁵N]O₃ in einer Konzentration von 9,23 mM (anstelle von 8,24 mM NaNO₃ + 0,99 mM KNO₃) als Stickstoffquelle benutzt. Um die Abwesenheit von Kaliumionen im Medium zu kompensieren, wurde Na₂HPO₄ mit der gleichen Menge K₂HPO₄ ersetzt. Eine detaillierte Beschreibung des modifizierten Castenholz-Mediums findet sich in Tabelle 3. Alle Medium-Komponenten wurden in destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt. Die Cyanobakterien wurden unter konstanter Weißlicht-Bestrahlung (Sylvania GroLux, Osram, München) in 2 Liter Laborflaschen (Schott, Mainz, Germany) in einem 50°C-Wasserbad kultiviert. Die Kulturen wurden permanent mit steril gefilterter Luft (Acro50[®], Pall, East Hills, NY, USA) aus einer Pumpe begast (Flussrate: 6 l/min). Zwischen Pumpe und Filter wurde die Luft zusätzlich durch eine Gaswaschflasche mit destilliertem Wasser geleitet.

Das Zellwachstum wurde spektrophotometrisch überwacht. Die Zellen erreichten nach ca. 9 bis 13 Tagen einen stationären Zustand (OD₆₈₀ ~ 1) und konnten geerntet werden. Jeweils 10-15 Volumenprozent einer gesättigten Kultur wurden als Inokkulum für frisches Medium verwendet.

Tabelle 3: Castenholz-Medium zur Kultivierung von *Mastigocladus laminosus*.

Komponente	Kultur	
	unmarkiert	[¹⁵ N]-markiert
NaNO ₃	8,24 mM	Na[¹⁵ N]O ₃ : 9,23 mM
KNO ₃	0,99 mM	
Na ₂ HPO ₄	0,77 mM	K ₂ HPO ₄ : 0,77 mM
MgSO ₄	0,406 mM	0,406 mM
CaSO ₄ * 2 H ₂ O	0,349 mM	0,349 mM
NaCl	0,137 mM	0,137 mM
Nitrilotriessigsäure (NTA)	0,523 mM	0,523 mM
FeCl ₃	1,79 µM	1,79 µM
Spurenelemente	0,5 ml/l	0,5 ml/l
Spurenelemente	CaSO ₄ * 2 H ₂ O Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O CoCl ₂ * 6 H ₂ O ZnSO ₄ * 7 H ₂ O H ₃ BO ₃ MnSO ₄ * H ₂ O H ₂ SO ₄ (konz.)	0,111 mM 0,103 mM 0,189 mM 1,74 mM 8,09 mM 13,48 mM 0,5 ml/l

3.3.2. PBS Isolation and Biliprotein-Auftrennung

Um die Integrität der Phycobilisomen zunächst aufrecht zu erhalten, wurden alle Aufreinigungsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die cyanobakteriellen Zellen wurden mittels Zentrifugation (5000 g, 10 Minuten) geerntet, in 0,75 M K_nPO₄, pH 7,0 resuspendiert und in einer *French-Pressure cell* (2 Durchgänge bei 120 MPa) aufgeschlossen. Zelltrümmer und Membranfragmente wurden durch Zentrifugation (75000 g, 20 Minuten) von den löslichen Proteinen getrennt. Der Überstand nach der Zentrifugation, der sowohl die PBS als auch Chlorophyll und Carotenoide enthält, wurde anschließend für eine Stunde mit 1% v/v Triton X-100 inkubiert, um eventuell noch anhaftende Thylakoidmembranfragmente zu entfernen.

Die Entfernung von Chlorophyll und Carotenoiden erfolgte mittels Sucrosedichtegradientenzentrifugation nach (*Glazer, 1988*). Zu diesem Zweck wurde der Überstand auf einen Sucrosedichtegradienten (1,5/1,0/0,75/0,5 M Sucrose (1:1:1,5:1 v/v) in 0,75 M K_nPO₄, pH 7,0)

aufgetragen und dieser in einem *swing-out* Rotor bei 110000 g für 18 Stunden bei 18°C zentrifugiert. Die die PBS enthaltende Fraktion wurde entnommen und mittels Ultrafiltration (Amicon Ultrafiltrations-Rührzelle, MWCO 50000, Millipore, Billerica, MA, USA) von Sucrose und Phosphat frei gewaschen. Die nun reine PBS-Fraktion wurde dann auf eine FPLC-Ionenaustauschersäule (Q-Sepharose FF, Amersham Biosciences/GE) aufgetragen, um mit einem Gradienten von 5 bis 200 mM K_2PO_4 , pH 7,0 die einzelnen Biliproteine zu separieren. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels Absorptionsspektroskopie auf das Vorhandensein von C-Phycocyanin (C-PC) hin überprüft. Fraktionen, die C-PC enthielten, wurden vereinigt, mittels Gelfiltration auf Sephadex G-25 (Amersham Biosciences/GE) salzfrei gewaschen und lyophilisiert.

3.3.3. Trennung der C-Phycocyanin α - und β -Untereinheiten

Die Trennung der C-PC α - und β -Untereinheiten erfolgte mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung in Ultrodex[®] Dextran Gel (Amersham Biosciences/GE) mit 8 M Harnstoff nach (Köst-Reyes *et al.*, 1987). Die gesamte Prozedur erfolgte unter Lichtausschluss und konstanter Stickstoff-Begasung, um eine Oxidation der Chromophore zu verhindern. Zusätzlich wurde die Elektrophorese-Apparatur auf 4°C gekühlt.

6 g Ultrodex[®] wurden in 200 ml 6 M Harnstoff gelöst. Die entstandene Aufschlämmung wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um sie weiter quellen zu lassen. Am nächsten Tag wurden 50-60 ml des Überstandes sorgfältig dekantiert, zum Rest 2 ml Servalyl[®] 3-7 (40% w/v, analytical grade, Serva, Heidelberg) hinzugegeben und die Gel-Lösung entgast. In 6 M Harnstoff getränkte Filterstreifen (1.5 cm x 11 cm) wurden an der Anoden- und Kathodenseite der Gelkammer platziert und das Gel gegossen. Dann wurde das Gel für 18 Stunden stehen gelassen. Dabei verlor es 20% seines Gewichtes (Verdunstung von Flüssigkeit, Kontrolle der Masse!) und der Harnstoff konzentrierte sich auf 8 M auf. Die Filterstreifen wurden durch neue ersetzt, die mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt waren.

Anodenpuffer: 1 M *ortho*-Phosphorsäure

Kathodepuffer: 1 M NaOH

Um im Gel einen pH-Gradienten auszubilden (pH 4 auf Anodenseite, pH 6 auf Kathodenseite), musste das Gel vor-fokussiert werden (1500 V, 40 mA, 15 W, 1100 V/h), bis der Strom auf ein Drittel reduziert war. Danach wurde ein Stück des Geles auf der Anodenseite entnommen (3 cm x 9 cm). Etwa 50 mg lyophilisiertes C-PC wurden in 2 ml 8M Harnstoff gelöst, mit der entnommenen Gelmasse vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Masse wieder an die Stelle, wo das Gel vorher entnommen wurde,

zurückgegeben. Es wurde ein elektrisches Feld angelegt (1500 V, 40 mA, 15 W, 4000 V/h) und die Probe so lange fokussiert, bis beide Untereinheiten komplett getrennt waren, also ihren jeweiligen isoelektrischen Punkt ($pI_{\alpha}=6,1$, $pI_{\beta}=5,0$) im Gradienten erreicht hatten. Die vollständige Trennung war auch sichtbar, da die Untereinheiten jeweils andere Chromophore tragen und sich dadurch farblich unterschieden.

Nach der Trennung wurden beide Untereinheiten mit 100 mM K_nPO_4 , pH 7,0 aus der Gelmasse eluiert. Anschließend wurde der Harnstoff aus den Proteinlösungen mittels Dialyse gegen 100 mM K_nPO_4 , pH 7,0 für 20 Stunden entfernt. Die Produkte wurden in Dunkelheit bei 4°C gelagert. Reinheit, Markierungsgrad und Unversehrtheit der Untereinheiten wurde absorptionspektroskopisch, massenspektrometrisch und mittels SDS-PAGE kontrolliert.

3.4. NMR Probenpräparation

3.4.1. *holo-Cph1Δ2*

Die in TES gelagerten *holo-Cph1Δ2*-Proben mussten für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen umgepuffert und aufkonzentriert werden. Zum einen wurden Messungen in NMR-Puffer (50 mM Na_nPO_4 , pH 7,8, 1 mM EDTA) + 10% (v/v) $[^2H]_2O$, zum anderem in reinem $[^2H]_2O$ durchgeführt (siehe Kapitel 3.5.).

Zur Überführung in andere Puffer wurde *holo-Cph1Δ2* zunächst aus TES mit AmS-Puffer gefällt und anschließend in kleinen Volumina des entsprechenden Lösungsmittels resuspendiert.

Zum Aufkonzentrieren der Probe dienten Vivaspin-Konzentratoren (MWCO 30000, Millipore, Billerica, MA, USA), die vor ihrer Benutzung jeweils dreimal mit dem maximal möglichen Volumen des entsprechenden Puffers gewaschen wurden. Dies war notwendig, um in der Membran der Konzentratoren enthaltenes Glycerin zu entfernen, das bei NMR-Messungen störende Signale verursacht. Die Proben wurden auf ca. 500 μ l eingeeengt und in NMR-Röhrchen mit 5 mm Innendurchmesser überführt. Sie hatten standardmäßig eine Konzentration von 300-500 μ M bei einem SAR von ≥ 1 (siehe Kapitel 3.1.4.).

3.4.2. *Phototransformation*

Aufgrund der spektralen Überlappung von P_r und P_{fr} ist es nicht möglich, durch Bestrahlung allein reine P_r - oder P_{fr} -Proben zu erhalten. Im photostationären Gleichgewicht, das sich nach R- oder FR-Bestrahlung einstellt, sind immer beide Zustände vorhanden („ P_r “: 97% P_r , 3% P_{fr} ; „ P_{fr} “: 30% P_r , 70% P_{fr} ; siehe Kapitel 2.3.4.). Der Grundzustand, der sich nach Assemblierung von apo-Cph1Δ2 mit PCB einstellt und der jeweils als erstes vermessen wurde, ist P_r . Für die Aufnahme von Spektren der P_{fr} -Form mussten die jeweiligen Proben mit Rotlicht bestrahlt werden.

Die für die NMR-Messungen verwendeten holo-Cph1 Δ 2-Proben lagen in Konzentrationen vor, bei denen die optische Dichte im Absorptionsmaximum von P_r so hoch war, dass ein Eindringen des phototransformierenden Lichtes in die im NMR-Röhrchen (5 mm Durchmesser) befindliche Probe mit den zur Verfügung stehenden Lichtquellen nicht erreicht werden konnte. Um in diesen Proben vollständige Phototransformation zu erreichen, wurden sie aus dem NMR-Röhrchen entnommen, mit Hilfe einer gasdichten Hamiltonspritze in ein ausreichend langes Glasröhrchen mit 1 mm Innendurchmesser gesaugt, welches dann rundum mit Rotlicht bestrahlt wurde, solange bis die Probe im photostationären Gleichgewicht war.

Die Einstellung des Photogleichgewichtes wurde überprüft, indem ein Aliquot der transformierten Probe entsprechend ihrer Konzentration verdünnt und ein Absorptionsspektrum aufgenommen (250-800 nm) wurde. Die Probe wurde dann eine weitere Minute mit Rotlicht bestrahlt und es wurde erneut ein Absorptionsspektrum gemessen. Wenn zwischen beiden Spektren keine Änderungen erkennbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass die konzentrierte Probe komplett phototransformiert war.

3.4.3. α -C-Phycocyanin

Für die Aufnahme der NMR-Spektren von α -C-Phycocyanin mussten die gelagerten Proben (α -C-PC in 100mM K_nPO₄, pH 7,0) lediglich aufkonzentriert und mit [²H]₂O (10%, v/v) dotiert werden. Zum Aufkonzentrieren der Probe dienten Vivaspin-Konzentratoren (MWCO 5000, Millipore, Billerica, MA, USA), welche vor ihrer Benutzung jeweils dreimal mit dem maximal möglichen Volumen des entsprechenden Puffers gewaschen wurden (siehe Kapitel 3.4.1.). Die Proben wurden auf ca. 500 μ l eingengt und in NMR-Röhrchen mit 5 mm Innendurchmesser überführt. Sie hatten standardmäßig eine Konzentration von 500 μ M.

3.5. NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden in Zusammenarbeit mit P. Schmieder an Spektrometern der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Für alle Spektren wurden Probenröhrchen mit 5 mm Innendurchmesser (500 μ l Probenvolumen, siehe Kapitel 3.4.) verwendet. Alle gezeigten Spektren wurden bei 300 K (27°C) gemessen. Die messtechnischen Daten der einzelnen Messungen sind in Tabelle 4 gezeigt. Alle Spektren wurden mit dem Programm TopSpin 1.3 (Bruker, Karlsruhe) prozessiert und anschließend zur Analyse in Sparky (Goddard & Kneller, 1989) transferiert.

Tabelle 4: Parameter der einzelnen NMR-Messungen.

Protein/ Chromophor	Experiment/ Lösungsmittel	Spektrometer/ Probenkopf	Meßparameter	Bemerkungen
^2H]-Cph1Δ2 + ^{15}N]-PCB	^{15}N]-1D/ NMR-Puffer +10% D ₂ O	DRX600 (600 MHz)/ 10 mm BBO	Pr/Pfr: NS: 200000; TD: 65536	Gemessen von H. Strauss (Strauss et al., 2005a)
^2H]-Cph1Δ2 + ^{15}N]-PCB	^{15}N]-HMQC/ NMR-Puffer +10% D ₂ O	DMX750 (750 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	Pr/Pfr: NS: 5120; TD (F2/F1): 512/60	+ 11-Echo Wasserunterdrückung (Sklenar & Bax, 1987)
^2H]-Cph1Δ2 + ^{13}C]-PCB	^{13}C]-HMQC/ D ₂ O	DMX750 (750 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	Pr/Pfr: NS: 16; TD (F2/F1): 4096/256; SW (F2/F1): 12500/3750Hz	schwache Vorsättigung zur HOD-Unterdrückung
^2H]-Cph1Δ2 + ^1H]-PCB	NOESY/ D ₂ O	AV900 (900 MHz)/ 5 mm TXI	Pr/Pfr: NS: 144; TD (F2/F1): 512/64; SW (F2/F1): 15150/12500Hz	schwache Vorsättigung zur HOD-Unterdrückung; τ_{mix} : 50 + 20ms
^2H]-Cph1Δ2 + ^{13}C]-PCB	3D-HMQC-NOESY/ D ₂ O	DMX750 (750 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	Pr: NS: 64; TD (F3/F2/F1): 512/30/55; SW (F3/F2/F1): 12500/3750/10000Hz Pfr: NS: 80; TD (F3/F2/F1): 512/25/57; SW (F3/F2/F1): 12500/3750/10000Hz	schwache Vorsättigung zur HOD- Unterdrückung; τ_{mix} : 50ms; ^{13}C]-shifts in F2
^2H]-Cph1Δ2 + ^1H]-F/T + ^{13}C]-PCB	^{13}C]-HMQC/ D ₂ O	DMX750 (750 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	Pr/Pfr: NS: 16; TD (F2/F1): 4096/256; SW (F2/F1): 12500/3750Hz	schwache Vorsättigung zur HOD-Unterdrückung
^2H]-Cph1Δ2 + ^1H]-F/T + ^{13}C]-PCB	3D-HMQC-NOESY/ D ₂ O	DMX750 (750 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	Pr: NS: 64; TD (F3/F2/F1): 512/30/55; SW (F3/F2/F1): 12500/3750/10000Hz Pfr: NS: 64; TD (F3/F2/F1): 512/25/57; SW (F3/F2/F1): 12500/3750/10000Hz	schwache Vorsättigung zur HOD- Unterdrückung; τ_{mix} : 50ms; ^{13}C]-shifts in F2
^{15}N]-α-C-PC	^{15}N]-HMQC/ 100 mM K _n PO ₄ , pH 7,0 +10% D ₂ O	DRX600 (600 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	NS: 8; TD (F2/F1): 1024/512; SW (F2/F1): 20000/6100Hz	+ 11-Echo Wasserunterdrückung (Sklenar & Bax, 1987)
^{15}N]-α-C-PC	NOESY/ 100 mM K _n PO ₄ , pH 7,0 +10% D ₂ O	DRX600 (600 MHz)/ Cryo 5 mm TCI	NS: 32 TD (F2/F1): 512/32 SW (F2/F1): 20000/13900Hz	N-Entkopplung; τ_{mix} : 100ms

4. Präparation von Cph1Δ2 und α-C-Phycocyanin

Wie bereits in Kapitel 2.5. beschrieben, ist die Aufnahme interpretierbarer NMR-Spektren von Cph1Δ2 sowie die Resonanzzuordnung der auftretenden Signale nicht trivial. Die Gesamtgröße des Proteins sowie das Verhältnis der Protonen in Apoprotein und Chromophor machen spezifische Markierungsstrategien notwendig, um generell die Signalanzahl in den Spektren zu reduzieren und die Signale des Chromophors eindeutig identifizieren zu können. Das Apoprotein musste daher deuteriert und der PCB-Chromophor mit Heterokernen angereichert werden. Nach Expression des deuterierten Proteins und Assemblierung mit PCB des gewünschten Markierungsmusters musste das erhaltene Holoprotein anschließend zur Herstellung einer qualitativ hochwertigen NMR-Probe von den übrigen Proteinen der Zelle abgetrennt und aufgereinigt werden.

Die Präparation von [¹⁵N]-markiertem α-C-Phycocyanin wurde notwendig, da die Zuordnung der [¹⁵N] chemischen Verschiebungen von [¹⁵N]-PCB in Cph1Δ2 nicht über weitere Daten aus z.B. NOESY-Spektren gelang. α-C-Phycocyanin diente hier also als Modellsystem, das als Biliprotein eine strukturelle Verwandtschaft zu Phytochromen zeigt und dessen 3D-Struktur bekannt ist. Daher sollte es möglich sein, für α-C-Phycocyanin gemessene Resonanzen mit den vorhandenen Strukturdaten zu korrelieren und zuzuordnen. Die daraus gewonnenen Informationen sollten eine Interpretation der Cph1Δ2 Spektren ermöglichen.

4.1. Präparation von [²H]-Cph1Δ2 mit [¹H]- oder [¹³C/¹⁵N]-PCB

Die Expression von möglichst vollständig deuteriertem Cph1Δ2 war entscheidend für die Aufnahme interpretierbarer NMR-Spektren (Kapitel 2.5.). Eine für die rekombinante Proteinexpression notwendige Kultivierung der *E.coli*-Bakterien in deuteriertem M9-Medium als Schüttelkultur brachte weder zufrieden stellende Proteinausbeuten noch den erforderlichen Deuterierungsgrad. Beide Probleme konnten allerdings durch die Verwendung eines Hochzell-dichte-Mikrofermentationssystems überwunden werden (Kapitel 3.1.3.). Mit Hilfe der Software-kontrollierten Bakterien-Kultivierung und Proteinexpression war es möglich, die Ausbeute an rekombinantem Protein deutlich zu steigern (bei gleichzeitiger Reduktion der Kosten für isotope markierte Nährstoffe), sowie den Deuterierungsgrad entscheidend zu verbessern.

Im Folgenden ist exemplarisch die Aufreinigung von [²H]-Cph1Δ2 + [¹H]-PCB aus einer 400 ml Hochzell-dichtefermentationskultur gezeigt. Nach Zellaufschluss und Chromophor-Assemblierung wurde das Zielprotein, welches einen C-terminalen His₆-tag trägt, von den übrigen löslichen Proteinen mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) abgetrennt. Die

einzelnen Elutionsfraktionen wurden mittels UV/vis-Spektroskopie und SDS-PAGE auf das Vorhandensein von Cph1Δ2 hin überprüft und die entsprechenden Fraktionen anschließend vereinigt, aufkonzentriert und für die jeweiligen NMR-Messungen präpariert. In Abbildung 8 sind das Elutionsprofil der Chromatographie, das entsprechende SDS-Polyacrylamid-Gel sowie die UV/vis-Spektren der fertigen NMR-Probe dargestellt. Durchschnittlich konnten aus 400 ml Hochzelldichtefermentationskultur 35 – 40 mg sauberes Protein mit einem SAR von ≥ 1 (Kapitel 3.1.4.) präpariert werden.

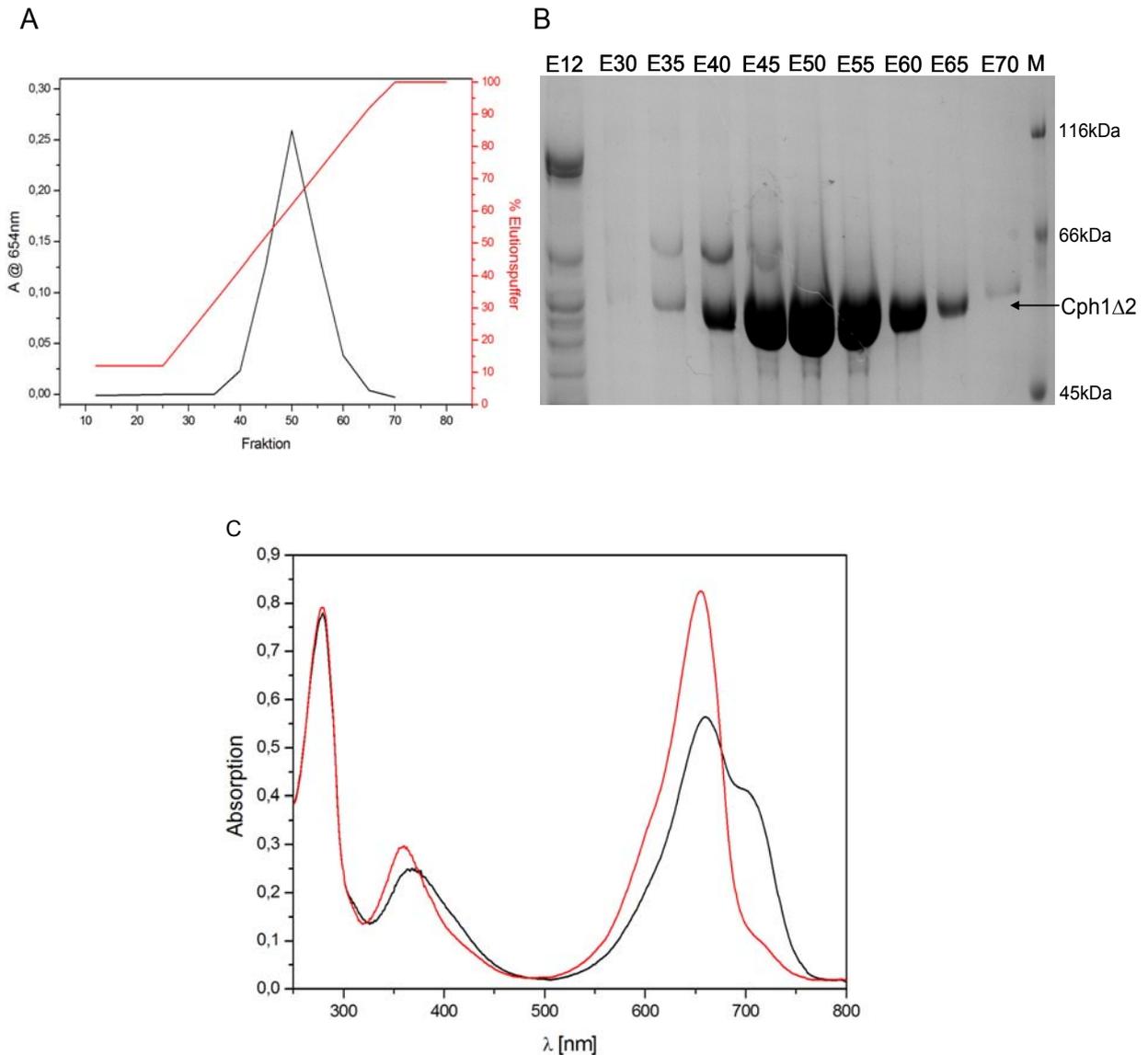


Abbildung 8: Aufreinigung von [²H]-Cph1Δ2 + [¹H]-PCB. (A) Elutionsprofil der Ni²⁺-Chelat-Chromatographie. Zum Vergleich sind die Absorption bei 654 nm ($\lambda_{\max}(P_r)$) sowie der lineare Gradient des Elutionspuffers gegen die einzelnen Fraktionen aufgetragen. (B) SDS-PAGE einzelner Fraktionen nach Ni²⁺-Chelat-Chromatographie. (C) UV/vis-Absorptionsspektren der fertigen NMR-Probe in einer 1:100 Verdünnung. Um die Funktionalität des Proteins zu überprüfen, wurde zunächst ein Spektrum des P_r-Grundzustandes aufgenommen (rot). Anschließend wurde die Probe photokonvertiert und ein Spektrum der P_{fr}-Form gemessen (schwarz). Die fertige Probe hatte eine Konzentration von ca. 0,9 mM und der SAR war ungefähr 1.

4.2. Präparation von α -C-Phycocyanin

Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen an α -C-Phycocyanin (α -C-PC) mußte das Protein markiert, d.h. mit NMR-aktiven [^{15}N]-Kernen angereichert werden. Im Gegensatz zu Phytochromen besitzen Phycobiliproteine jedoch keine intrinsische Lyaseaktivität. Damit wird die Etablierung eines *E.coli*-Überexpressionssystems für holo- α -C-PC deutlich erschwert, da hierfür die Co-Expression der PCB-Biosynthesegene (*hox1*: Hämoxygenase, Häm \rightarrow BV; *pcyA*: PCB-Ferredoxin-Oxidoreduktase, BV \rightarrow PCB), von apo- α -C-PC (*cpcA*) sowie der heterodimeren Lyase (*cpcE* und *cpcF*, Anbindung von PCB an apo- α -C-PC) notwendig wäre (Tooley et al., 2001). Zur Vermeidung dieser nicht trivialen Aufgabe wurde daher versucht, die Prozedur, die bereits für die Produktion und Isolierung von markiertem PCB aus *Synechocystis* PCC 6803 angewandt wurde (siehe 3.2.1. und Strauss et al., 2005a), für die Gewinnung von markiertem holo- α -C-PC aus seinem nativen Wirt zu adaptieren. Wie jedoch bereits unter 3.3. beschrieben, scheiterten alle Versuche der Präparation von α -C-PC aus *Synechocystis* PCC 6803, da sich beide C-PC-Untereinheiten in ihren physikalischen Eigenschaften zu ähnlich sind und eine präparative Trennung so unmöglich wurde. Im Gegensatz zu C-PC aus *Synechocystis* PCC 6803 unterscheiden sich die α - und β -Untereinheit des C-PC aus *Mastigocladus laminosus* deutlich in ihren isoelektrischen Punkten ($\text{pI}_\alpha = 6,1$, $\text{pI}_\beta = 5,0$) und ein Protokoll für die Trennung beider Untereinheiten mittels präparativer isoelektrischer Fokussierung existierte bereits (Köst-Reyes et al., 1987).

Zum Zwecke der Markierung wurde die Zusammensetzung des *Mastigocladus* Kultur-Mediums modifiziert, um lediglich eine einzige Stickstoffquelle ($\text{Na}[^{15}\text{N}]\text{O}_3$) zu nutzen. Die Cyanobakterien wuchsen normal, nach einer Woche konnte man ca. 5 g Zellen aus einem Liter Kultur ernten. Anschließend wurden die Phycobilisomen mittels Dichtegradientenzentrifugation von den anderen löslichen Bestandteilen der Zellen abgetrennt und die einzelnen Phycobilisomen-Biliproteine mit Ionenaustausch-Chromatographie getrennt. In Abbildung 9 sind der Verlauf der Chromatographie sowie die Bestimmung der Natur der Biliproteine mittels UV/vis-Spektroskopie gezeigt. Jedes Biliprotein zeigt ein spezifisches UV/vis-Spektrum, anhand dessen es identifiziert werden kann.

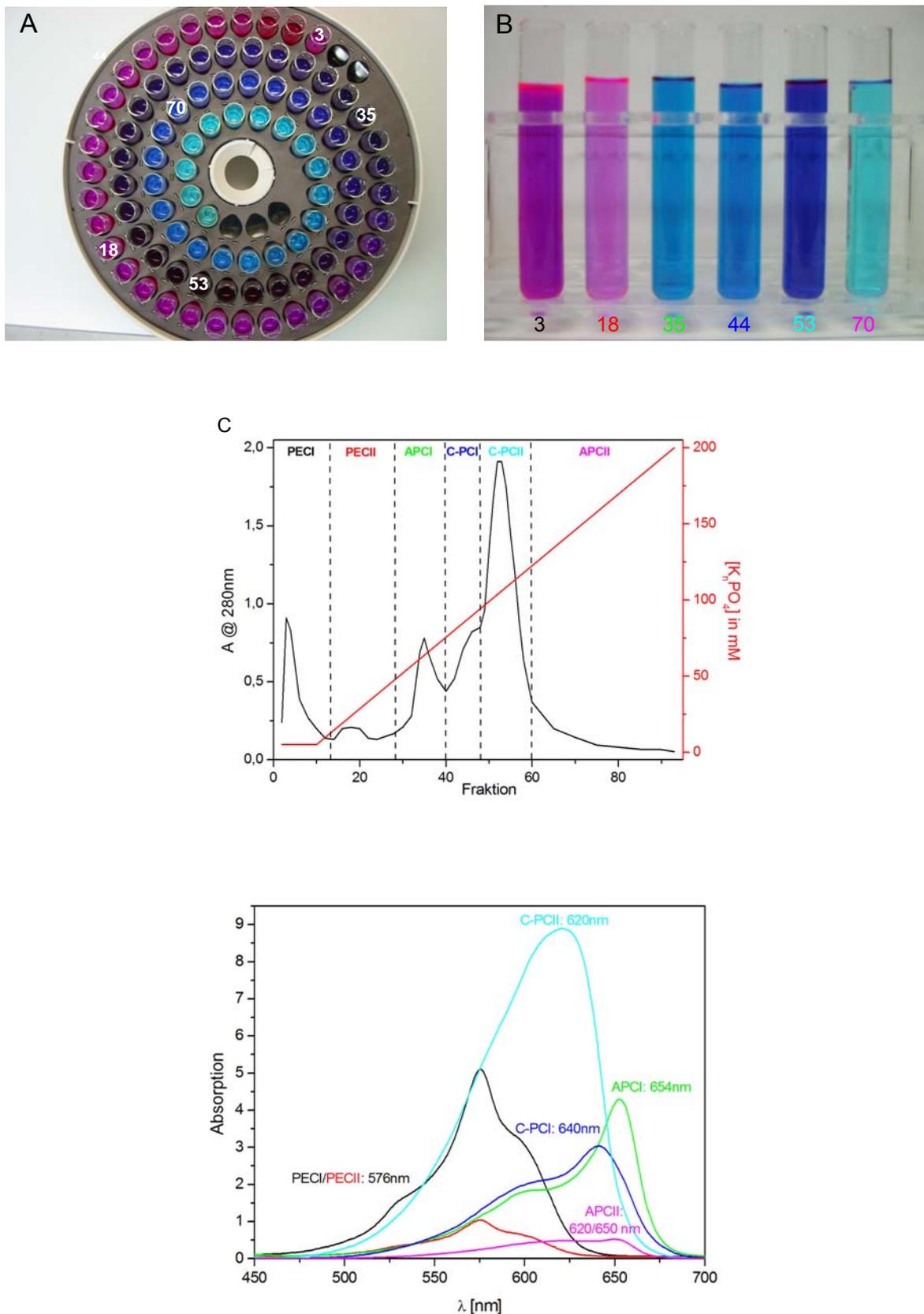


Abbildung 9: Isolierung der einzelnen Biliproteine aus den Phycobilisomen von *Mastigocladus laminosus* mittels Ionenaustauschchromatographie. (A/B) Fraktionierte Biliproteine nach der Chromatographie. Man kann die unterschiedlichen Biliproteine schon an ihrer Farbe erkennen. (C) Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie. Zum Vergleich sind die Absorption bei 280 nm sowie der lineare Gradient des Elutionspuffers gegen die einzelnen Fraktionen aufgetragen. (D) Absorptionsspektren der einzelnen Biliprotein-Fractionen zu deren Identifizierung (PEC: Phycoerythrocyanin, APC: Allophycocyanin, PC: Phycocyanin).

Die präparative isoelektrische Fokussierung von C-PC ergab zwei deutlich voneinander unterscheidbare farbliche Zonen, die der α- und β-Untereinheit entsprachen (Abbildung 10A). Der Reinheitsgrad der Untereinheiten wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 10B). Aus dem UV/vis-Spektrum (Abbildung 10C) kann der Quotient Q der Absorptionen im sichtbaren Bereich (A_{vis}) und nahen UV-Bereich (A_{nuv}) bestimmt und daraus auf den Zustand des Chromophors geschlossen werden. Für cyclische, denaturierte Tetrapyrrol-Chromophore ergibt sich ein Quotient < 1 , für lineare, native Tetrapyrrol-Chromophore von $>> 1$ (Scheer, 1982). In diesem Fall konnte ein Quotient von etwa 7 bestimmt werden, was auf eine native α-C-PC-Präparation hinweist (Kupka, 2006). Eine MALDI-Analyse der präparierten α-Untereinheit ergab einen Markierungsgrad von ca. 90% (Abbildung 11).

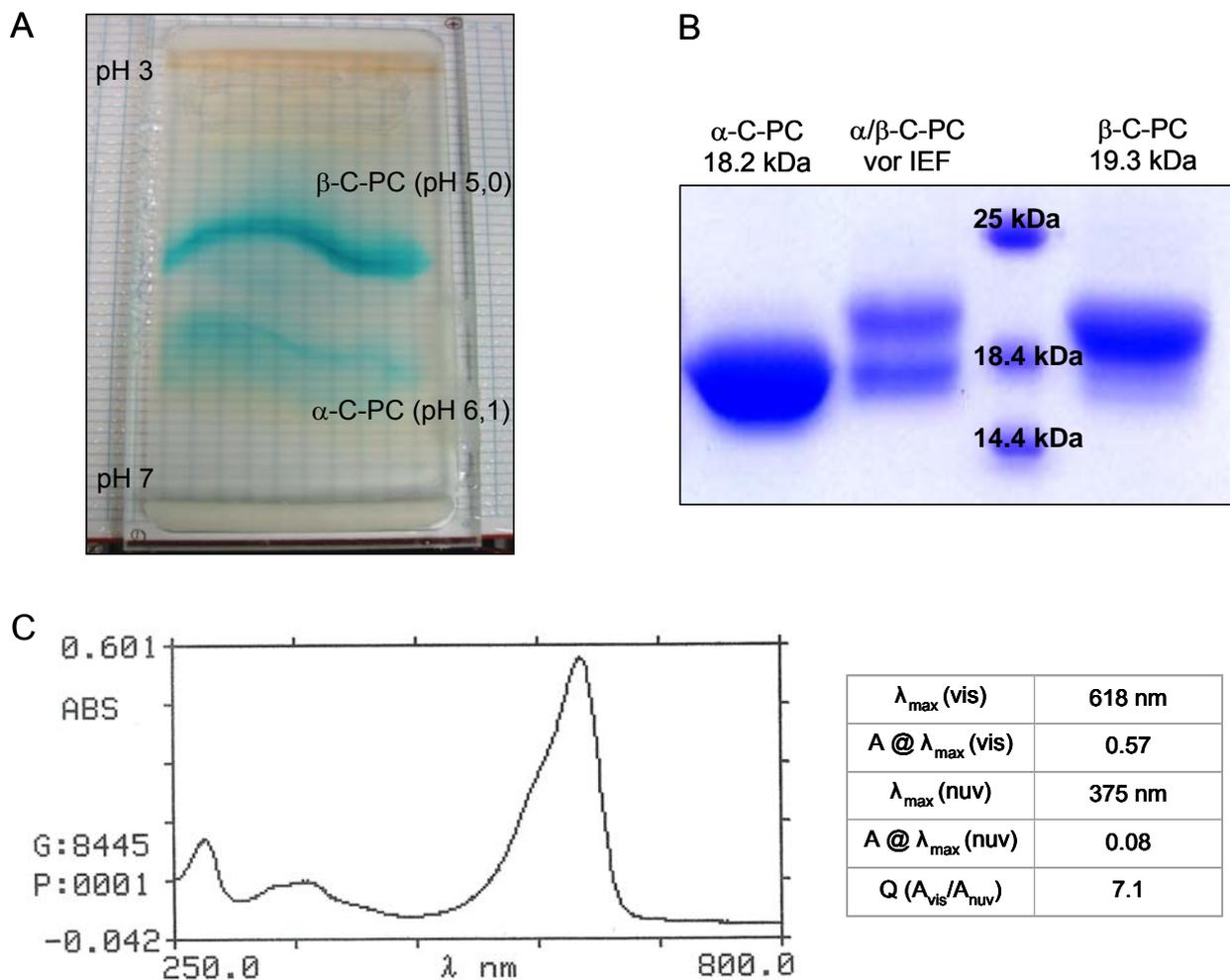
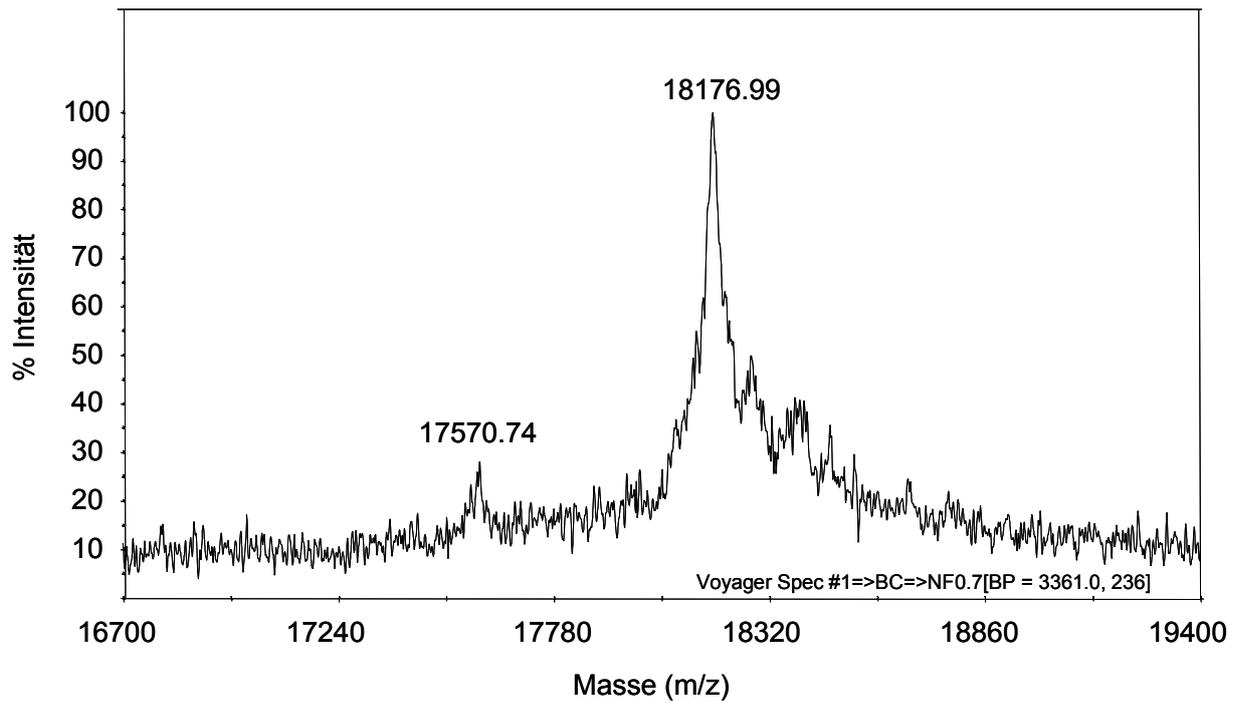


Abbildung 10: Aufreinigung von $[^{15}N]$ -α-C-Phycocyanin. (A) Isoelektrische Fokussierung (IEF). Nach Abschluss der Prozedur waren α- und β-Untereinheit präparativ getrennt und ergaben zwei deutlich voneinander unterscheidbare farbliche Zonen. (B) SDS-PAGE der Proben vor und nach IEF. (C) UV/vis-Absorptionsspektrum des isolierten α-C-PC. Das Verhältnis der Absorption im sichtbaren Bereich ($A @ \lambda_{max}(vis)$) zur Absorption im nahen UV-Bereich ($A @ \lambda_{max}(nuv)$) gibt Aufschluss über Zustand des Chromophors (siehe Text).



	erwartete Masse	MALDI-Daten
α-C-PC (nicht gezeigt)	17979 Da	17977 Da
[¹⁵ N]-α-C-PC	18198 Da	18177 Da (~90%)

Abbildung 11: MALDI-Analyse des präparierten [¹⁵N]-α-C-Phycocyanin. [¹⁵N] konnte zu 90% im Protein angereichert werden.

5. Resultate: Protonierungszustand des Chromophors in P_r und P_{fr}

Die Frage nach dem Protonierungszustand des Chromophors ist für das Verständnis des Photozyklus von Phytochromen insofern von Bedeutung, als dass für die Photokonversion von P_r zu P_{fr} anhand kinetischer Messungen eine transiente De-/Reprotonierung des Chromophors postuliert wurde (*van Thor et al., 2001; Borucki et al., 2005; von Stetten et al., 2007*). Ob der Chromophor in den beiden stabilen Photoisomeren allerdings vollständig protoniert ist oder nicht, konnten diverse spektroskopische Untersuchungen nicht eindeutig klären (siehe Kapitel 2.4.2.). In einem Review-Artikel von Lagarias und Mitarbeitern (*Rockwell et al., 2006*) wird eine vollständig protonierte P_{fr} -Form angezweifelt. Sie und andere Gruppen postulieren für diesen Zustand einen Chromophor, bei dem sich die zwei Pyrrol-Stickstoffatome der Ringe B und C ein Proton „teilen“. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, mit Hilfe NMR-spektroskopischer Untersuchungen an Cph1 den Protonierungszustand des Chromophors in beiden Photoisomeren eindeutig zu klären. Durch die Aufnahme von $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektren sollte die Anzahl und Position Stickstoff-gebundener Protonen im Chromophor bestimmt und eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen postulierten Modellen somit möglich werden. Vergleiche mit geeigneten Modellsubstanzen sollten die Zuordnung und Interpretation der Phytochrom-Spektren erleichtern.

5.1. α -C-Phycocyanin als Modellsystem

Für die Zuordnung und Interpretation der $[^{15}\text{N}]$ chemischen Verschiebungen in den Phytochrom-Spektren musste ein strukturell verwandtes Modellsystem gefunden werden. Die α -Untereinheit des Biliproteins C-Phycocyanin (α -C-PC) stellt aus mehreren Gesichtspunkten solch ein geeignetes Modellsystem dar. Zum einen trägt α -C-PC wie Phytochrome einen kovalent gebundenen linearen Tetrapyrrol-Chromophor als prosthetische Gruppe, auch wenn das Protein an sich nicht photochrom ist. Mit 18,2 kDa ist das lösliche Protein sehr gut geeignet für eine NMR-spektroskopische Untersuchung. Zum anderen sind für α -C-PC aus verschiedensten Organismen Strukturdaten aus röntgenkristallographischen Untersuchungen erhältlich (siehe Abbildung 12). Damit wird es möglich, aus NMR-Messungen für α -C-PC erhaltene chemische Verschiebungen mit den vorhandenen Strukturdaten zu korrelieren und zu interpretieren. Anschließend können die gewonnenen Informationen mit den Ergebnissen der NMR-Messungen für Cph1 verglichen werden, was eine Auswertung letzterer überhaupt erst möglich macht.

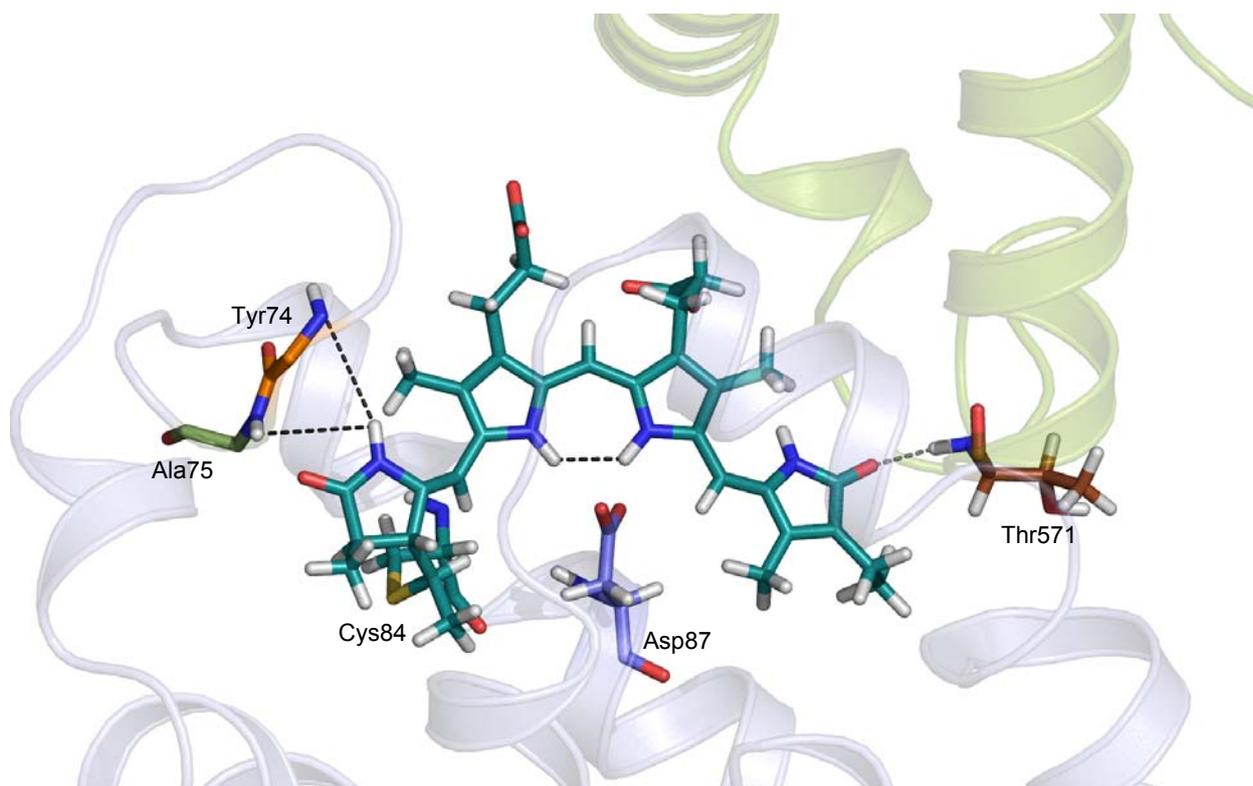


Abbildung 12: Struktur der Chromophor-Bindetasche von α -C-Phycocyanin. Anhand dieses Modells konnten die in den $[^{15}\text{N}]$ -HMQC- und NOESY-Spektren gemessenen Resonanzen zugeordnet werden.

5.2. $[^{15}\text{N}]$ -HMQC und NOESY von α -C-Phycocyanin

Abbildung 13 zeigt das $[^{15}\text{N}]$ -HMQC Spektrum von $[^{15}\text{N}]$ - α -C-PC. Man findet Signale zwischen 6,5 und 10 ppm ($\delta[^1\text{H}]$) und zwischen 105 und 135 ppm ($\delta[^{15}\text{N}]$). Diese stammen von $[^1\text{H}]$ - $[^{15}\text{N}]$ -Paaren im Protein und sind typisch für eine vorwiegend α -helikale Struktur. Neben diesen „gewöhnlichen“ Signalen gibt es zusätzlich vier einzelne Signale mit spezifischen chemischen Verschiebungen ($\delta[^1\text{H}]$: 9,5 – 13,5 ppm; $\delta[^{15}\text{N}]$: 145 – 170 ppm), die von den vier $[^1\text{H}]$ - $[^{15}\text{N}]$ -Paaren der Pyrrol-Ringe im PCB-Chromophor herrühren. Eine genauere Zuordnung dieser Signale zu den einzelnen Ringen gelingt mit Hilfe vorhandener Kristallstrukturen des C-Phycocyanins aus *Mastigocladus laminosus* (Schirmer et al., 1985; Schirmer et al., 1987) (Abbildung 12) sowie mit Informationen aus einem zusätzlich aufgenommenen NOESY-Spektrum (Abbildung 14). In einem NOESY-Spektrum sieht man Signale zwischen räumlich benachbarten Protonen, die nicht weiter als 4 Å voneinander entfernt sind. Im hier aufgenommenen α -C-PC NOESY sind von den vier Signalen, die mit Hilfe des $[^{15}\text{N}]$ -HMQC Spektrums den Protonen der $[^1\text{H}]$ - $[^{15}\text{N}]$ -Paare im PCB-Chromophor zugeordnet werden können, zwei über einen NOE miteinander verbunden. Aus einem Vergleich mit der Kristallstruktur des C-PC kann man ableiten, dass lediglich die $[^1\text{H}]$, $[^{15}\text{N}]$ -Paare der Ringe B und C räumlich so eng benachbart sind, um ein Signal im NOESY hervorrufen zu können. Eine genaue Unterscheidung der beiden Signale ist nicht möglich, für die weitere Diskussion allerdings auch nicht zwingend

erforderlich. Das Proton eines anderen $[^1\text{H}]-[^{15}\text{N}]$ -Paares zeigt NOEs zu zwei Aminoprotonen im Protein und kann somit nach Vergleich mit der Kristallstruktur als das am A-Ring des PCB-Chromophors identifiziert werden (siehe Abbildung 12). Es befindet sich nahe der Aminoprotonen von Ala75 und Tyr74. Damit kann das verbleibende Signal dem Proton des $[^1\text{H}]-[^{15}\text{N}]$ -Paares im Ring D zugeordnet werden. Wie in der Kristallstruktur zu sehen ist, ist der D-Ring im intakten C-PC-Trimer über eine Wasserstoffbrücke mit Thr571 der β -Untereinheit verbunden. Da im Rahmen dieser Arbeit lediglich isoliertes α -C-PC vermessen wurde, konnten solche Interaktionen und dementsprechende Signale hier nicht beobachtet werden.

In HMQC-Spektren werden Korrelationen von direkt aneinander gebundenen Kernen über skalare Kopplungen detektiert. Damit ist als erste Schlussfolgerung aus diesen Messungen festzuhalten, dass in α -C-PC alle vier Stickstoffe des PCB-Chromophors protoniert sind, da jede Korrelation ein Signal gibt und insgesamt vier Signale dem PCB-Chromophor zugeordnet werden konnten. Die vollständige Protonierung des Chromophors in α -C-PC wurde aufgrund bisheriger Untersuchungen lediglich postuliert, allerdings nie eindeutig gezeigt. Desweiteren lässt sich nach Auswertung der α -C-PC-Spektren feststellen, dass sich chemische Verschiebungen von bis zu 170 ppm ($\delta[^{15}\text{N}]$) immer noch protonierten Stickstoffatomen zuordnen lassen.

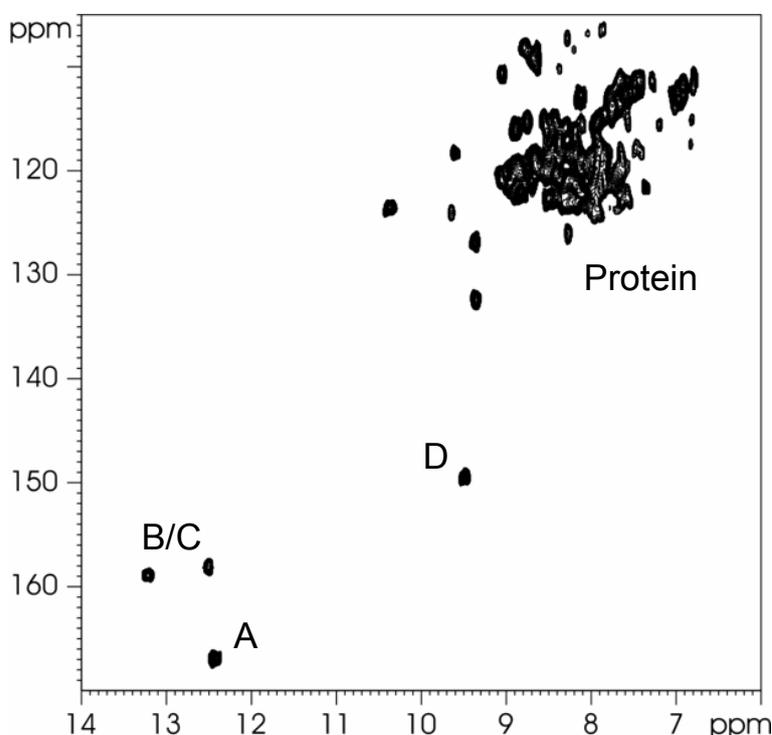


Abbildung 13: $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektrum von α -C-Phycocyanin. Die Signale zwischen 6,5 und 10 ppm ($\delta[^1\text{H}]$) und 105 und 135 ppm ($\delta[^{15}\text{N}]$) stammen von Protonen-Stickstoff-Korrelationen im Protein. Die Zuordnung der Signale der vier Protonen-Stickstoff-Paare des Chromophors gelang nach Aufnahme eines weiteren NOESY-Spektrums (siehe Text und Abbildung 14).

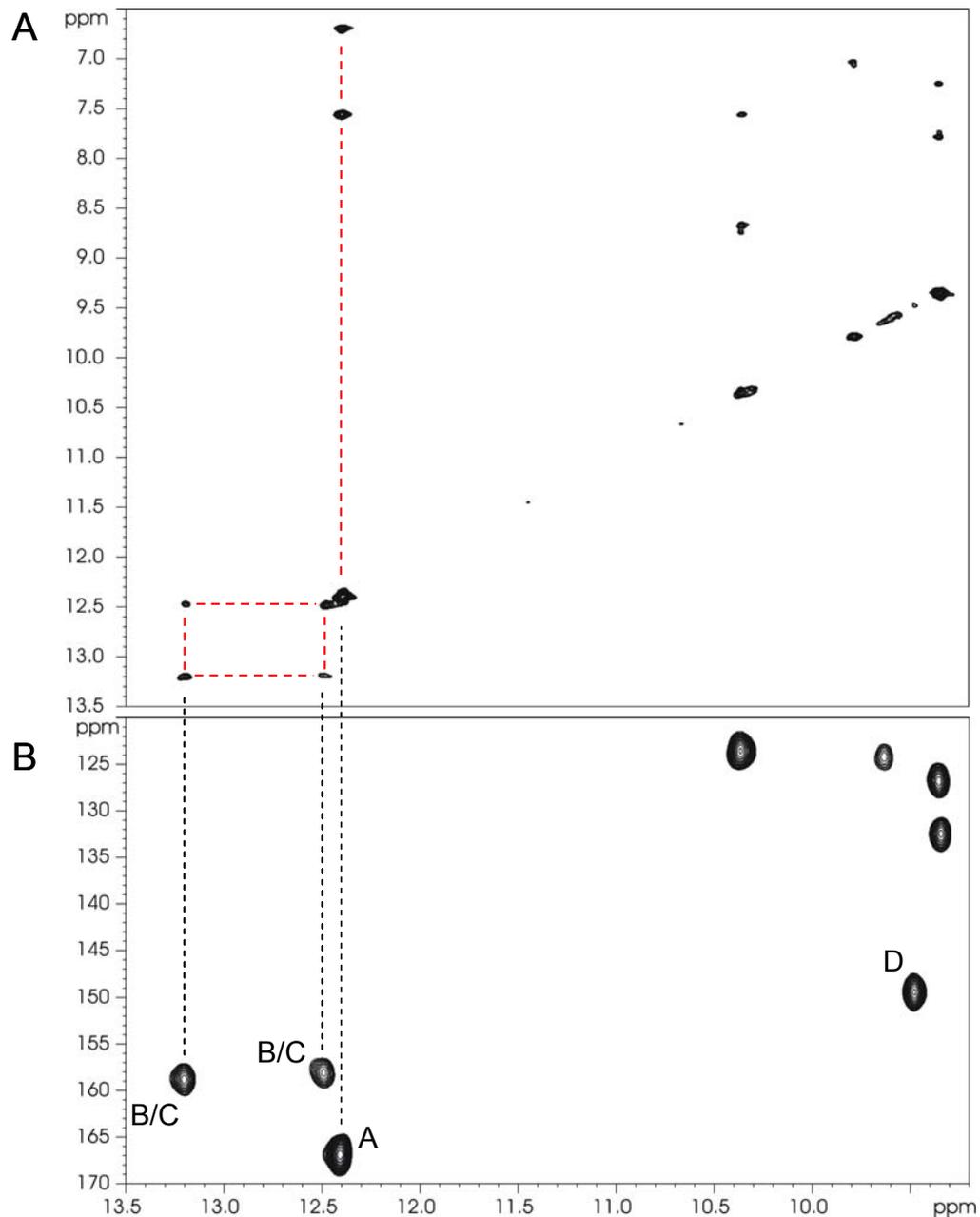


Abbildung 14: Zuordnung der Signale der vier Stickstoff-gebundenen Protonen des PCB-Chromophors in α -C-Phycocyanin. (A) NOESY-Spektrum von α -C-Phycocyanin. Zwei der vier genannten Protonen koppeln miteinander (rote Linie), eines zeigt Interaktionen mit zwei Aminoprotonen des Proteins (schwarze Linie). Für das übrige Proton wurden keine NOEs detektiert. Nach Korrelation dieser Daten mit den Informationen aus der 3D-Röntgenstruktur (Abbildung 12) war eine Zuordnung der Resonanzen möglich. (B) Ausschnitt aus dem $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektrum von α -C-Phycocyanin. Die Zuordnung der Signale der vier Protonen-Stickstoff-Paare des Chromophors zu den jeweiligen Ringen gelang durch Auswertung des NOESY-Spektrums.

5.3. $[^{15}\text{N}]$ -HMQC und $[^{15}\text{N}]$ -1D von Cph1 Δ 2

$[^{15}\text{N}]$ -1D-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{15}\text{N}]$ -PCB wurden bereits von H. Strauss im Rahmen seiner Dissertation aufgenommen (Strauss *et al.*, 2005a). Die Aufnahme solcher Spektren war notwendig, da anhand der ebenfalls aufgenommenen $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{15}\text{N}]$ -PCB, welche in Abbildung 15 gezeigt sind, keine eindeutige Zuordnung der Chromophor-Signale erfolgen konnte. Neben den Signalen der im Protein in natürlicher Häufigkeit

vorkommenden [^{15}N]-Kernen ($\delta[^{15}\text{N}] \sim 120\text{ppm}$), die sich aufgrund der extrem langen Messzeit bereits zeigen, findet man im P_r -Spektrum lediglich zwei Signale, die vom Chromophor stammen ($\delta[^{15}\text{N}]$ 132 und 158ppm). Das P_{fr} -Spektrum zeigt verminderte Signalintensitäten dieser zwei Signale sowie ein weiteres Chromophor-Signal bei ca. 138 ppm. Ein eindeutiger Nachweis des Protonierungszustandes des Chromophors ist damit nicht möglich. Für einen ungeladenen Chromophor würde man drei Signale erwarten, ein vollständig protonierter Chromophor müsste vier Signale im HMQC liefern. Das Fehlen von Signalen könnte also ein Indiz für eine unvollständige Protonierung des Chromophors sein. Die hohen Signalbreiten der Chromophor-Signale (und damit einhergehend die geringen Intensitäten) sprechen allerdings eher für Austauschphänomene, die die Sensitivität der HMQC-Messungen einschränken. So könnten die Pyrrol-Protonen mit den Lösungsmittelprotonen austauschen. Eine andere Möglichkeit ist das Vorhandensein von Konformationssubzuständen, die sich ineinander umwandeln und in denen die Pyrrol-Protonen jeweils eine leicht andere chemische Umgebung haben. Dies würde im Mittel die Signale ebenfalls stark verbreitern. Eine ausführlichere Diskussion des dynamischen Verhaltens des Chromophors erfolgt in Kapitel 7.

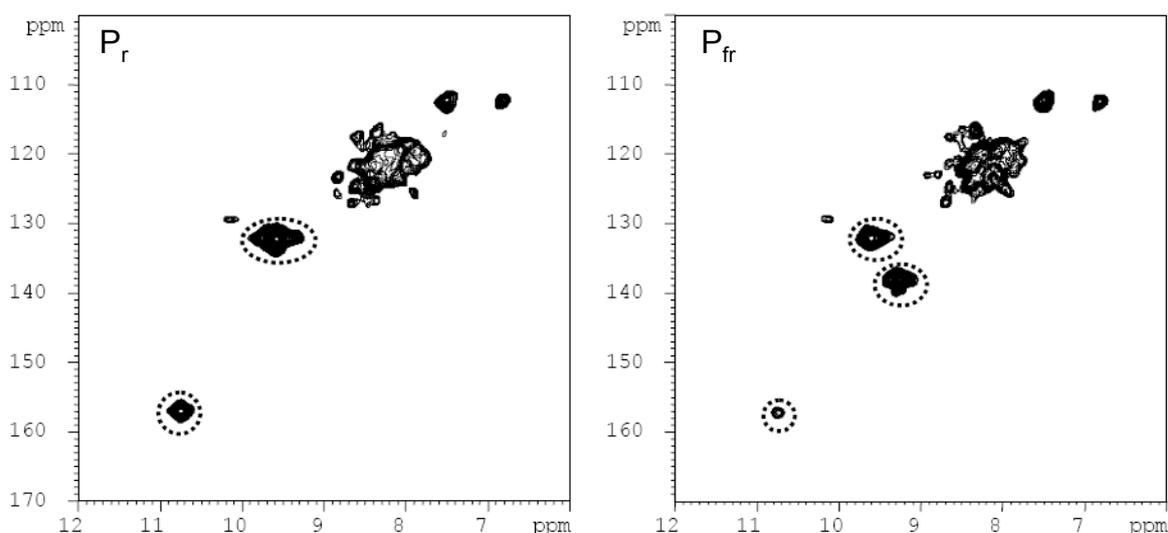


Abbildung 15: [^{15}N]-HMQC-Spektren von [^2H]-Cph1 Δ 2 + [^{15}N]-PCB in der P_r -Form (links) und der P_{fr} -Form (rechts). Die Chromophor-Signale (eingekreist) zeigten sich erst nach langer Messzeit. Eine Auswertung dieser Spektren im Hinblick auf die Beantwortung der gestellten Fragen war nicht möglich. Daher wurden zusätzlich [^{15}N]-1D-Spektren aufgenommen (siehe Text und Abbildung 16).

Die Aufnahme von [^{15}N]-1D-Spektren hat den Vorteil, dass Signale unabhängig von der Protonierung des Stickstoffkerns erhalten werden. Protonierte und nicht-protonierte Kerne unterscheiden sich lediglich in ihren chemischen Verschiebungen. Allerdings ist die direkte Messung der [^{15}N]-chemischen Verschiebung aufgrund des schlechten gyromagnetischen Verhältnisses von [^{15}N] auch eher unempfindlich, was eine größere Probenmenge nötig macht und zu langen

Messzeiten führt. Für die Beantwortung der Frage nach dem Protonierungszustand des Chromophors in Cph1Δ2 war die Aufnahme solcher 1D-Spektren allerdings essentiell.

Abbildung 16 zeigt $[^{15}\text{N}]$ -1D-Spektren für $[^{15}\text{N}]$ - α -C-Phycocyanin sowie für $[^2\text{H}]$ -Cph1Δ2 + $[^{15}\text{N}]$ -PCB im Photogleichgewicht und für beide „reinen“ Photoisomere. Das Spektrum für $[^{15}\text{N}]$ - α -C-Phycocyanin wurde aus dem $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektrum (Abbildung 13) konstruiert, in dem alle Signale auf die $[^{15}\text{N}]$ -Achse projiziert wurden. Das P_{fr} -Spektrum ist ein Differenzspektrum, in dem das P_r -Spektrum mit entsprechender Wichtung vom P_r/P_{fr} -Gleichgewichtsspektrum subtrahiert wurde. Die Messzeit für die Aufnahme der einzelnen Spektren betrug jeweils ca. 14 Tage.

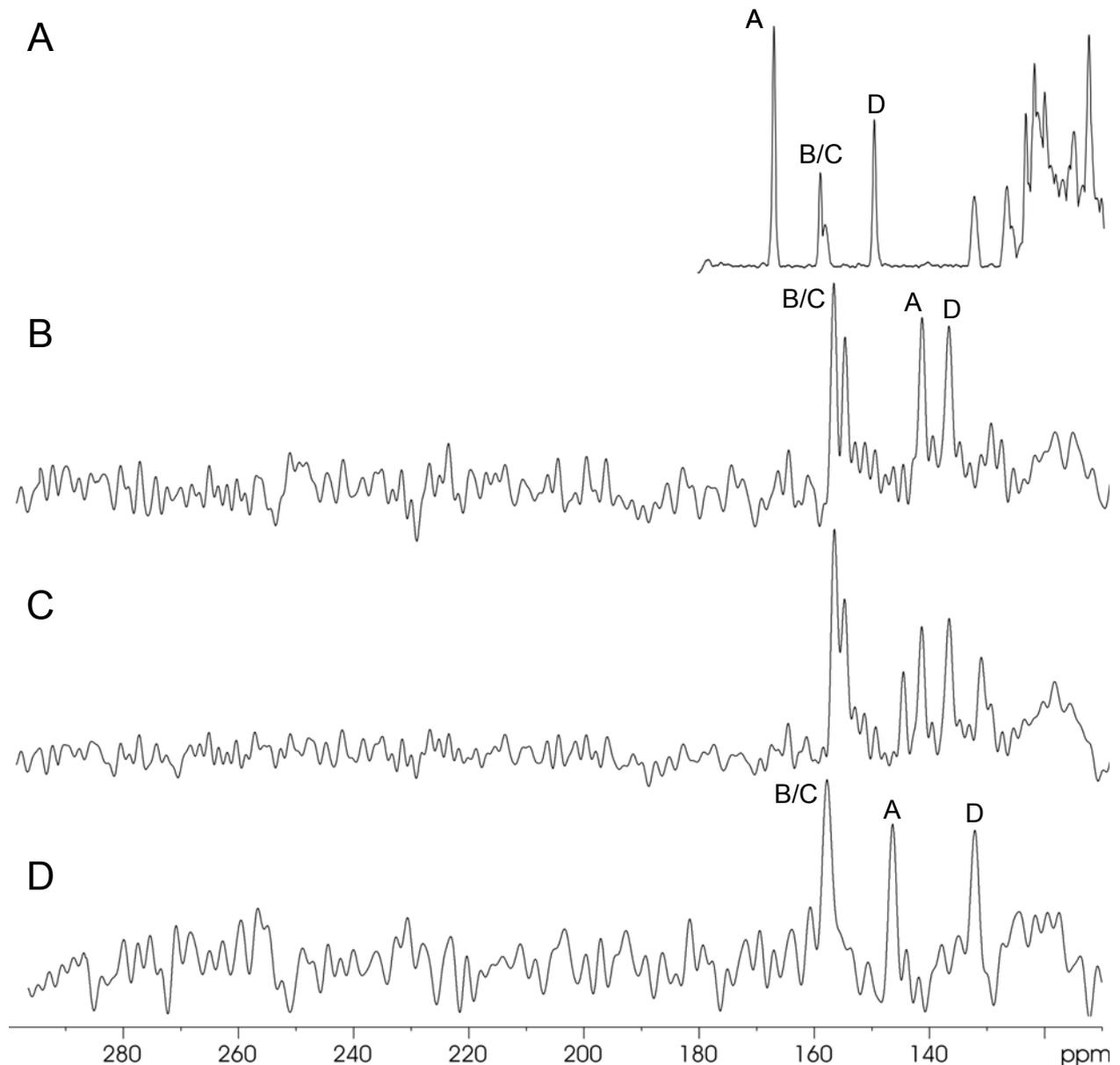


Abbildung 16: 1D- $[^{15}\text{N}]$ -Spektren von α -C-Phycocyanin aus *Mastigocladus laminosus* und Cph1Δ2. (A) Das 1D- $[^{15}\text{N}]$ -Spektrum von α -C-Phycocyanin wurde aus $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektrum (Abbildung 13) konstruiert. Die spektrale Breite ist daher dieselbe wie im 2D-Spektrum (180 – 110 ppm). (B) 1D- $[^{15}\text{N}]$ -Spektrum der „reinen“ P_{fr} -Form von Cph1Δ2 (siehe Text). (C) Experimentelles 1D- $[^{15}\text{N}]$ -Spektrum der P_{fr} -Form (Photogleichgewicht) von Cph1Δ2. (D) Experimentelles 1D- $[^{15}\text{N}]$ -Spektrum der P_r -Form von Cph1Δ2.

Im α -C-Phycocyanin-Spektrum sowie in den P_r - und P_{fr} -Spektren von Cph1 Δ 2 sind jeweils vier Signale mit [^{15}N]-chemischen Verschiebungen von 130 bis 170 ppm zu finden. Die Zuordnung der α -C-PC Signale gelang über die Aufnahme zusätzlicher NOESY-Spektren und Vergleiche mit vorhandenen 3D-Strukturdaten (Kapitel 5.2.). Im Gegensatz dazu erfolgte die Zuordnung der Signale zu den einzelnen Stickstoff-Protonen-Paaren im PCB-Chromophor von Cph1 Δ 2 sowie die Bestimmung des Protonierungsgrades des Chromophores durch Vergleiche mit Modellsubstanzen, da die Aufnahme entsprechender [^{15}N]-editierter NOESY-Spektren für dieses System aufgrund stark verbreiteter Signale und damit einhergehender geringer Signalintensitäten nicht möglich war.

Falk und Mitarbeiter haben verschiedenste offenkettige Tetrapyrrol-Derivate in organischen Lösungsmitteln NMR-spektroskopisch untersucht (Falk & Müller, 1985; Falk, 1989). Während die [^1H]-chemischen Verschiebungen stark vom Lösungsmittel beeinflusst werden, sind die [^{15}N]-chemischen Verschiebungen durchaus mit denen unserer Messungen vergleichbar. Abbildung 17 zeigt zwei dieser Modellsubstanzen. In Abbildung 17A ist Aetiobiliverdin-IV γ in zwei tautomeren Formen dargestellt, in denen ein Proton zwischen zwei Stickstoffen „sitzt“. Die resultierende [^{15}N]-chemische Verschiebung von ~210 ppm ist ein Durchschnittswert, der sich aus der [^{15}N]-chemischen Verschiebung von einem Stickstoff-Proton-Paar und einem unprotonierten Stickstoff ergibt. In Abbildung 17B ist die Struktur eines 1,19-Dioxo-2,3-dihydrobilin-Derivats mit dazugehörigen [^{15}N]-chemischen Verschiebungen gezeigt. Diese konnten für die Zuordnung der Signale der [^{15}N]-1D-Spektren von Cph1 Δ 2 genutzt werden (siehe Abbildung 16), da sich drei der vier Stickstoffe in dieser Verbindung in chemisch ähnlicher Umgebung befinden wie der Phytochrom-Chromophor.

Betrachtet man nun die Anzahl der gemessenen Signale und vergleicht man die gemessenen chemischen Verschiebungen, die sich für den [^{15}N]-markierten Chromophor in Cph1 Δ 2 ergeben, mit denen der Modellsubstanzen und vor allem mit denen des [^{15}N]-markierten Chromophors in α -C-Phycocyanin, kann man ableiten, dass der PCB-Chromophor in Cph1 Δ 2 sowohl in P_r als auch in P_{fr} vollständig, d.h. an allen vier Pyrrol-Stickstoffen protoniert ist.

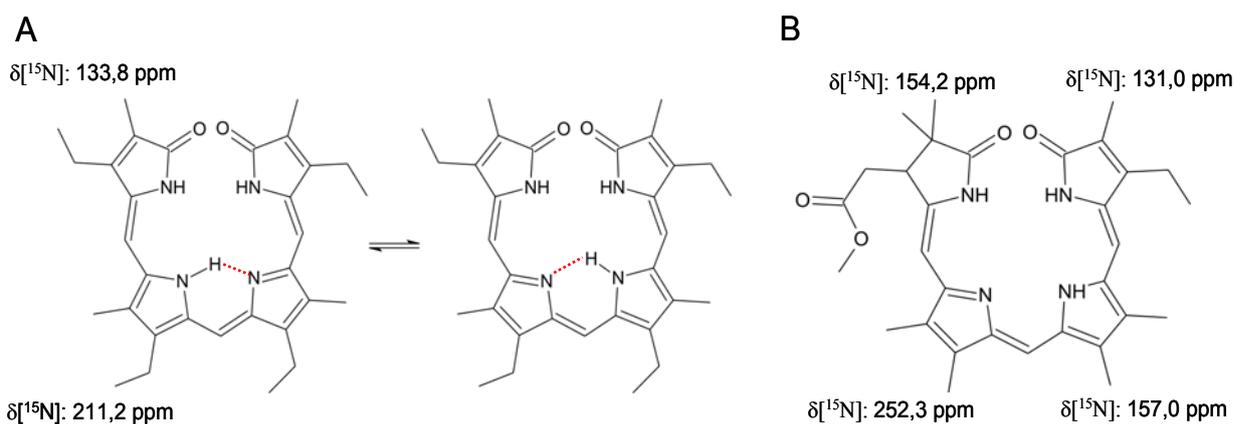


Abbildung 17: Modellsubstanzen für die Zuordnung der $[^{15}\text{N}]$ -chemischen Verschiebungen des PCB-Chromophors in Cph1 Δ 2. (A) Aetiobiliverdin-IV γ in zwei tautomeren Zuständen. (B) 1,19-Dioxo-2,3-dihydrobilin-Derivat.

5.4. Diskussion

Um den Protonierungszustand des PCB-Chromophors in Cph1 zu bestimmen, wurden 1D- und 2D-Spektren von $[^{15}\text{N}]$ -PCB + $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 sowie von $[^{15}\text{N}]$ - α -C-Phycocyanin aufgenommen. Das Phycobiliprotein α -C-Phycocyanin diente dabei als Modell für ein Protein mit kovalent gebundenem Bilin-Chromophor, von dem die 3D-Struktur aus röntgenkristallographischen Untersuchungen zur Verfügung stand. Damit war es möglich, die gemessenen chemischen Verschiebungen zuzuordnen und im Hinblick auf strukturelle Aspekte zu interpretieren. Neben α -C-PC konnte für die Zuordnung der chemischen Verschiebungen auch auf bereits existierende NMR-Spektren anderer Modellsubstanzen - Derivate linearer Tetrapyrrole - zurückgegriffen werden.

Die Aufnahme des $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektrums von α -C-PC diente, wie erwähnt, vorrangig der Interpretation der chemischen Verschiebungen des Chromophors in Cph1 Δ 2. Allerdings konnten damit auch neue Erkenntnisse über den Protonierungszustand des Chromophors in diesem System gewonnen werden. Das Auftreten von vier Signalen, die sich spezifisch den Protonen-Stickstoff-Paaren des Tetrapyrrols zuordnen lassen, ist ein Beweis für die vollständige Protonierung des PCB-Chromophors in α -C-PC, da sich in $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektren nur Korrelationen über skalare Kopplungen zwischen direkt aneinander gebundenen Wasserstoff- und Stickstoffkernen detektieren lassen. Eine vollständige Protonierung des Chromophors in α -C-PC wurde in früheren Untersuchungen immer postuliert, allerdings konnte sie bisher noch nie eindeutig gezeigt werden.

Für die Interpretation der $[^{15}\text{N}]$ -chemischen Verschiebungen des $[^{15}\text{N}]$ -PCB in Cph1 Δ 2 war weiterhin interessant, dass der protonierte Stickstoff am Ring A von α -C-PC eine chemische Verschiebung von 170 ppm aufwies und solche Verschiebungen dementsprechend immer noch protonierten Stickstoffatomen zugeordnet werden können.

Das [^{15}N]-HMQC-Spektrum von [^{15}N]-PCB + [^2H]-Cph1 Δ 2 war in den Intensitäten der Chromophor-Signale nicht ausreichend, um eindeutige Rückschlüsse auf den Protonierungszustand des Chromophors zu ziehen. Als Grund dafür sind dynamische Effekte des Chromophors in der Bindetasche des Proteins anzuführen, die genauer in Kapitel 7 beleuchtet werden. Erst mit Hilfe von 1D- ^{15}N -Spektren konnten entsprechende Aussagen getroffen werden. Sowohl im P_r - als auch im P_{fr} -Spektrum konnten vier Signale detektiert werden, die sich jeweils den vier Protonen-Stickstoff-Paaren im PCB-Chromophor zuordnen ließen. Allein die Tatsache, dass jeweils vier Signale im Bereich zwischen 130 und 170 ppm auftreten, unterstützt die Hypothese der vollständigen Protonierung des Chromophors in beiden Photoisomeren. Würden sich zwei Stickstoffatome ein Proton „teilen“, wie es die Lagarias-Gruppe postuliert hat, würde man ein Signal mit einer [^{15}N]-chemischen Verschiebung von über 200 ppm erwarten. Gänzlich unprotonierte Stickstoffkerne sollten aufgrund des Fehlens des NOE-Effektes wesentlich schwächere Signale bei über 250 ppm ergeben. Es sind jedoch keine Signale in diesen Bereichen der Spektren detektierbar.

Aufgrund der extrem langen Messzeiten für die einzelnen Spektren stellt sich natürlich die Frage nach der Stabilität der Probe und einer möglichen Dunkelreversionsreaktion von P_{fr} zu P_r . Letztere würde zwar die Intensitäten der einzelnen Signale verringern, nicht jedoch ihre Position im Spektrum. Das bedeutet, dass im P_r - P_{fr} -Differenzspektrum weiterhin nur die P_{fr} -Signale erscheinen. Sollte sich die Qualität der Probe während der Messung verschlechtern, könnten die detektierten Signale auch von nicht identifizierten Proben-Artefakten herrühren. In einem solchen Fall könnten eventuell auftretende Signale bei $\delta[^{15}\text{N}] > 220$ ppm zu schwach sein, als dass sie im Spektrum erschienen, und dementsprechend würde ein unprotonierter Stickstoffkern nicht zu erkennen sein. Auf Grundlage unabhängiger NMR-Messungen über längere Zeiträume sowie zahlreicher biochemischer Untersuchungen (Yeh *et al.*, 1997; Strauss *et al.*, 2005b; Hahn *et al.*, 2006) ist jedoch davon auszugehen, dass holo-Cph1 Δ 2 über lange Zeit stabil und auch die Dunkelreversion vernachlässigbar ist.

Die eben gemachten Aussagen unterstützen zusammen genommen sehr stark die Theorie, nach der alle vier Stickstoffe des Tetrapyrrol-Chromophors in Phytochromen sowohl in P_r wie auch in P_{fr} protoniert sind (Hahn *et al.*, 2007). Inzwischen wurden diese Ergebnisse auch anhand von NMR-Messungen am Phytochrom SyA-Cph1 aus *Synechococcus sp.* bestätigt (Ulijasz *et al.*, 2008).

Weitergehende Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen wären höchst spekulativ, da es aufgrund der kaum verstandenen Abhängigkeiten der [^{15}N]-chemischen Verschiebungen von einer Struktur, speziell in komplexen Proteinumgebungen, generell schwierig ist, aus den Verschiebungen strukturelle Informationen zu erlangen. Natürlich fällt beim Betrachten der 1D-Spektren

auf, dass die Stickstoffkerne der Ringe B und C in α -C-PC und in Cph1 Δ 2 ähnliche Verschiebungen aufweisen, wohingegen sich die Stickstoffkerne der A-Ringe in ihren Verschiebungen deutlich unterscheiden. Doch ist dies gleichbedeutend mit strukturellen Gemeinsamkeiten und Unterschieden? Dagegen spricht, dass in α -C-PC die Pyrrolstickstoffe der Ringe B und C als Wasserstoffbrückenpartner und Gegenion zu Asp-87 fungieren (Abbildung 12). In der 3D-Struktur des DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* kann ein entsprechender Rest mit eventuell ähnlicher Funktion nicht gefunden werden. Daher ist die Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen wohl eher Zufall.

6. Resultate: Räumliche Struktur des Chromophors in P_r und P_{fr}

Um die räumliche Struktur des Chromophors in der Proteinbindetasche zu bestimmen, sollten verschiedene 2D- und 3D-Spektren aufgenommen werden. In $[^{13}\text{C}]$ -HMQC-Spektren des Chromophors, die bereits von H. Strauss im Rahmen seiner Dissertation gemessen wurden (*Strauss et al., 2005a*), konnten die Methylgruppen identifiziert werden, eine Zuordnung der Resonanzen allein mit diesen Daten gelang jedoch nicht. Die starken Signale in diesen Spektren sollten es jedoch möglich machen, $[^{13}\text{C}]$ -editierte HMQC-NOESY-Spektren aufzunehmen. Zusammen mit Daten aus 2D-NOESY-Spektren sollte so versucht werden, die Stereochemie des Chromophors an den drei Methin-Brücken zu bestimmen.

Zur Aufnahme der angegebenen Spektren war es nötig, das Apoprotein möglichst vollständig deuteriert zu exprimieren und vor dem sich anschließenden Aufreinigungsprozess mit protoniertem oder $[^{13}\text{C}]$ -markiertem PCB zu assemblieren. Die Deuterierung des Apoproteins sollte zu einer generellen Reduzierung der Proteinsignale und somit zu einer eindeutigen Identifizierung der Chromophorsignale im 2D-NOESY führen, die Einführung von $[^{13}\text{C}]$ -Kernen in den Chromophor die Aufnahme von heteronuklearen 2D- und vor allem 3D-Spektren ermöglichen.

In allen Fällen wurden Spektren der P_r - und der P_{fr} -Form aufgenommen, zunächst immer vom P_r -Grundzustand, der sich nach Assemblierung von apo-Cph1 Δ 2 mit PCB im Dunkeln einstellt, anschließend nach Phototransformation der Probe auch von der P_{fr} -Form. Wie bereits unter 3.4.2. erwähnt, sind im photostationären Gleichgewicht nach Rotlicht-Bestrahlung noch ca. 30% P_r vorhanden. Ein Vergleich der P_r - und P_{fr} -Spektren macht jedoch eine Unterscheidung der Signale beider Photozustände möglich, da es nur in sehr wenigen Fällen zu einer Signalüberlagerung kommt. Daher konnte auf die Darstellung der reinen P_{fr} -Form mittels Größenausschlusschromatographie verzichtet werden.

6.1. $[^{13}\text{C}]$ -HMQC

Wie bereits erwähnt, wurden die ersten $[^{13}\text{C}]$ -HMQC-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{13}\text{C}]$ -PCB bereits von H. Strauss aufgenommen, eine Resonanzzuordnung erfolgte allerdings nicht. Da der PCB-Chromophor bei diesen Messungen vollständig $[^{13}\text{C}]$ -markiert war, würde man in einem $[^{13}\text{C}]$ -HMQC-Spektrum Signale für alle C-H-Gruppen im Molekül erwarten. Die einzigen Signale, die sich zeigten, waren jedoch lediglich die der sechs Methylgruppen, die vom „Methyl-TROSY-Effekt“ profitieren (*Tugarinov et al., 2003*). Die entsprechenden Spektren für P_r und P_{fr} sind in Abbildung 18 gezeigt. Man sieht sechs Signale in der P_r -Form und zwölf Signale im

P_r/P_{fr} -Photogleichgewicht (jeweils sechs für P_r und P_{fr}). Während sich die $[^{13}\text{C}]$ -chemischen Verschiebungen nach Photokonversion kaum ändern, zeigen einige $[^1\text{H}]$ -chemische Verschiebungen deutliche Unterschiede in beiden Photoisomeren.

Die grobe Zuordnung der einzelnen Signale zu den entsprechenden Methyl-Gruppen konnte anhand der $[^{13}\text{C}]$ -chemischen Verschiebungen vorgenommen werden. Demnach gehören die Signale zwischen 11 und 15 ppm ($\delta[^{13}\text{C}]$) und 1,5 und 2,3 ppm ($\delta[^1\text{H}]$) zu den Methylgruppen, die direkt am aromatischen System gebunden sind ($\text{C}7'$, $\text{C}13'$ und $\text{C}17'$). Die übrigen drei Signale entsprechen den Methylgruppen $\text{C}2'$, $\text{C}3'$ und $\text{C}18'$. Eine eindeutige Zuordnung konnte erst durch die Aufnahme von NOESY- bzw. $[^{13}\text{C}]$ -editierten HMQC-NOESY-Spektren erreicht werden. Dies wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben.

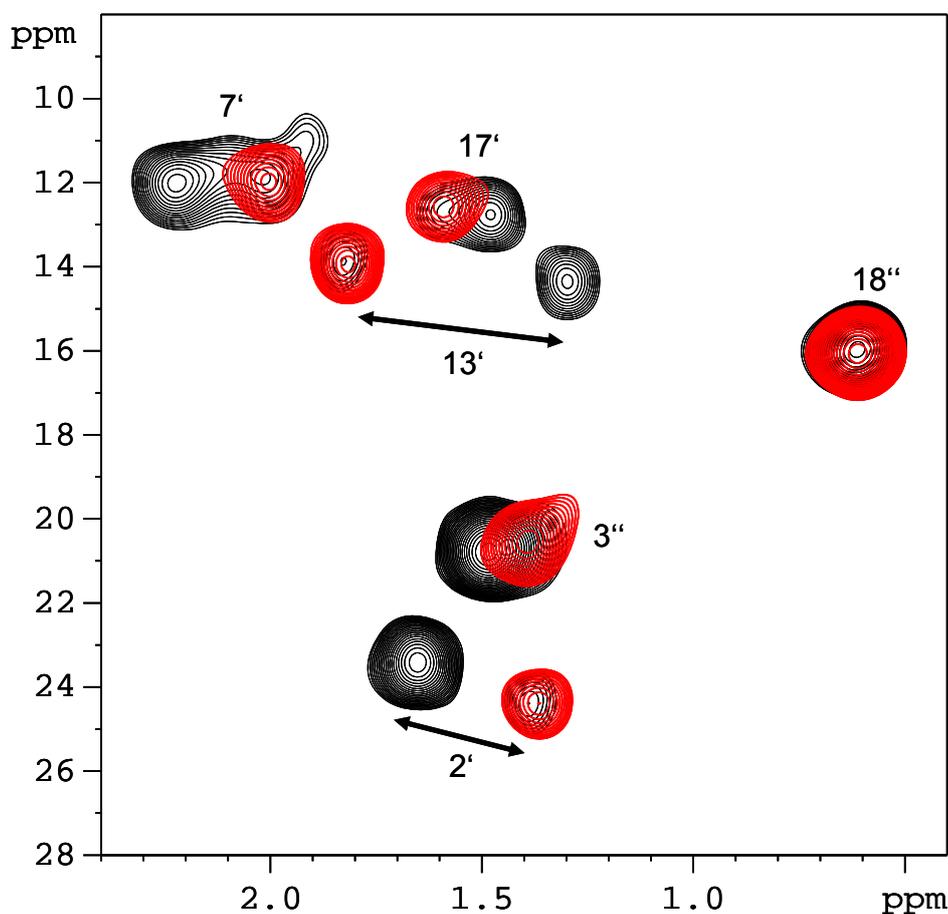


Abbildung 18: $[^{13}\text{C}]$ -HMOC-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{13}\text{C}]$ -PCB in der P_r -Form (schwarz) und der P_{fr} -Form (rot). Es konnten lediglich die Methylgruppen des PCB-Chromophors, nicht jedoch andere Protonen-Kohlenstoff-Korrelationen detektiert werden. Die eindeutige Zuordnung der Resonanzen erfolgte nach Aufnahme weiterer 2D-NOESY- und 3D-HMOC-NOESY-Spektren.

6.2. 2D-NOESY und 3D-HMOC-NOESY

Um Informationen über die Konformation des PCB-Chromophors in Cph1 zu erhalten, war die Aufnahme homonuklearer NOESY-Spektren nötig. Für diese Spektren wurde deuteriertes Cph1 Δ 2 mit nativem, protoniertem PCB assembliert. Abbildung 19 zeigt solche NOESY-

Spektren der P_r - und P_{fr} -Form des Proteins. Wie sofort deutlich wird, ist es nicht gelungen, das Protein vollständig zu deuterieren. Ausserdem führen die starken Linienbreiten der Chromophorsignale zu einem Intensitätsverlust dieser relativ zu den verbleibenden Hintergrundsignalen des Proteins, welche besonders stark im Bereich der Methylgruppen sind. Dennoch konnten die meisten Resonzen zugeordnet werden. In dem Bereich des Spektrums, in dem die Korrelationen zwischen den Protonen der Methin-Brücken zu anderen Protonen im Chromophor erscheinen, finden sich keine residualen Proteinsignale. (Bei einem Deuterierungsgrad von 98% verbleiben noch 2% Protonen im Protein. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei dieser Protonen nahe genug sind, um einen NOE hervorzurufen (4Å), beträgt damit nur 2% von 2%, also 0,04%.)

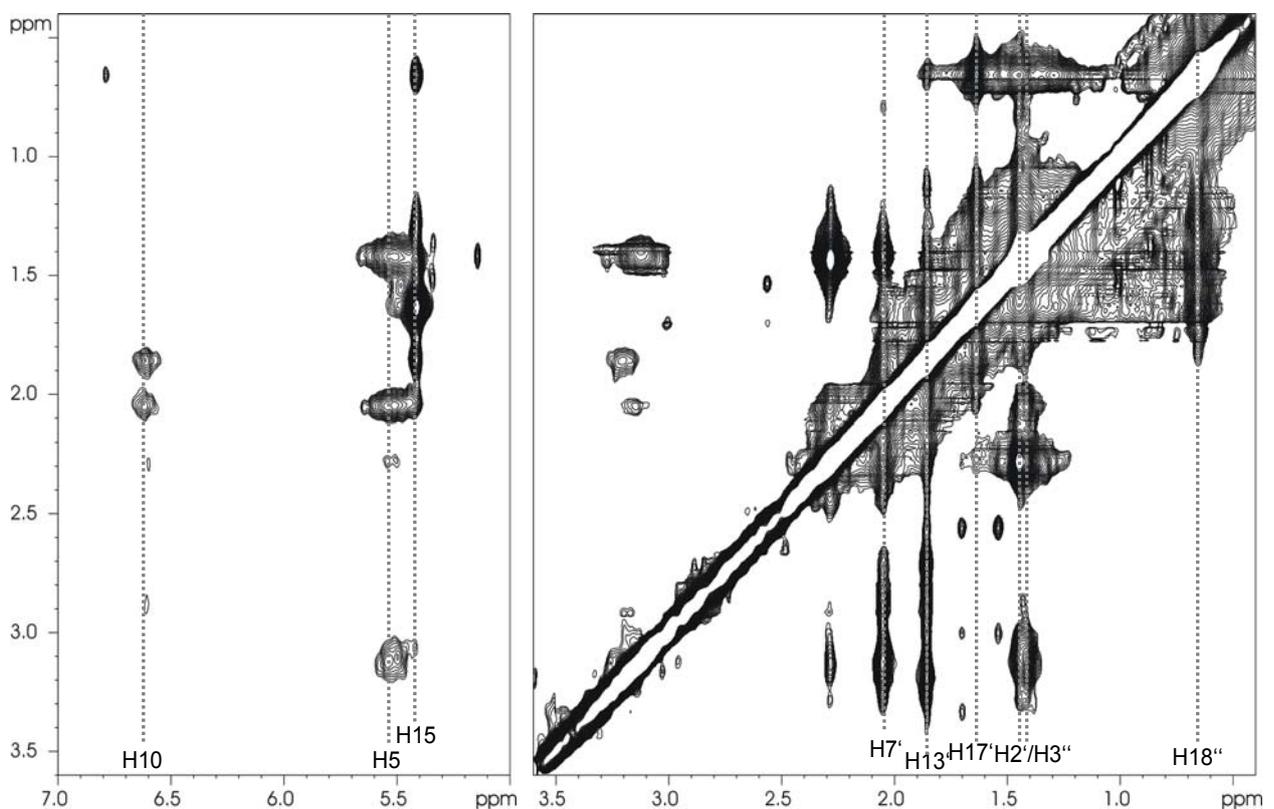


Abbildung 19: 2D-NOESY-Spektrum von $[^2\text{H}]\text{-Cph1}\Delta 2 + [^1\text{H}]\text{-PCB}$ in der P_r -Form. Der rechte Teil zeigt den Bereich der aliphatischen Protonen, in dem neben Signalen vom Chromophor noch residuale Proteinsignale erscheinen. Der linke Bereich, der Korrelationen der Methin-Protonen zeigt, ist frei von Proteinsignalen. Eine eindeutige Zuordnung der Signale erfolgte nach Aufnahme weiterer 3D-HMQC-NOESY-Spektren.

Abbildung 20 zeigt die Bereiche der Methin-Protonen-Korrelationen aus den 2D-NOESY-Spektren von $[^2\text{H}]\text{-Cph1}\Delta 2 + [^1\text{H}]\text{-PCB}$ in P_r - und P_{fr} -Form. Beim Betrachten der Linienbreiten wird die bemerkenswerte und bereits schon angesprochene Dynamik des Chromophors in der Proteinbindetasche deutlich. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 21 eindimensionale Schnitte aus den 2D-NOESYs gezeigt. Diese wurden parallel zur F2-Achse gezogen und zeigen einen Querschnitt der Korrelationen zwischen den Methin-Protonen und anderen Chromophor-Protonen. Mit Hilfe dieser Schnitte ist die Bestimmung der Linienbreiten der Methin-Protonen-

Signale möglich. In P_r weisen die Signale von H5 und H10 Linienbreiten von über 100 Hz auf, wohingegen das H15-Signal nur 30 Hz breit ist. Dies bedeutet für das 2D-NOESY, dass von H5 und H10 nur wenige Korrelationen zu sehen sind, die Signalen von großer Intensität entsprechen. Für H15 ergaben dementsprechend auch schwächere Korrelations Signale. Die Situation ändert sich für H5 allerdings drastisch bei Photokonversion zu P_{fr} . Hier findet man zwei sich überlappende Signale von stark reduzierter Linienbreite (60Hz). Dies führt im 2D-NOESY zum Auftreten von zwei Signalsätzen für H5, einer deutlich schwächer als der andere. Die Linienbreiten von H10 und H15 in P_{fr} verändern sich nicht wesentlich.

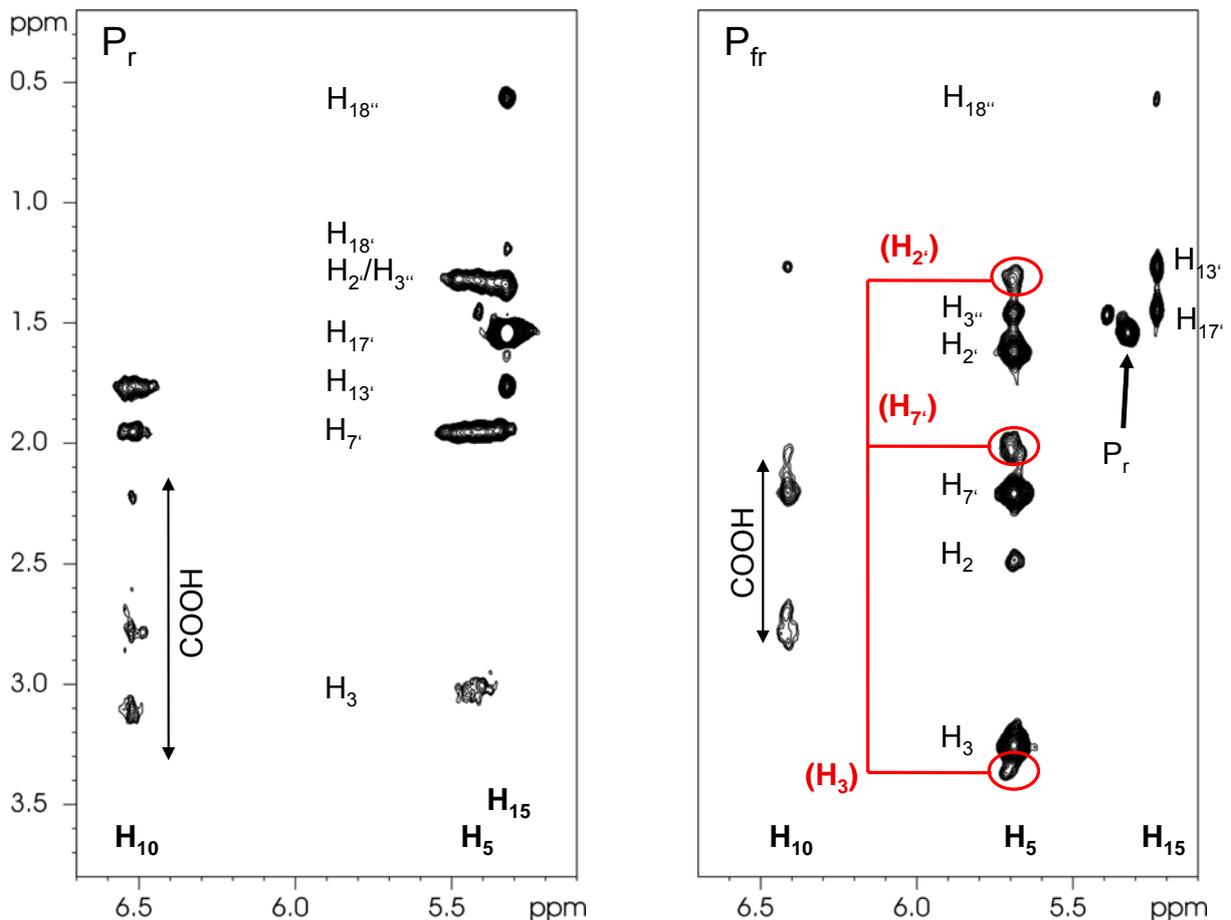


Abbildung 20: 2D-NOESY-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^1\text{H}]$ -PCB (Bereich der Methin-Protonen) in der P_r -Form (links) und der P_{fr} -Form (rechts). Die Zuordnung der Methin-Protonen ist unten im jeweiligen Spektrum, die der anderen Protonen direkt neben den Signalen angegeben.

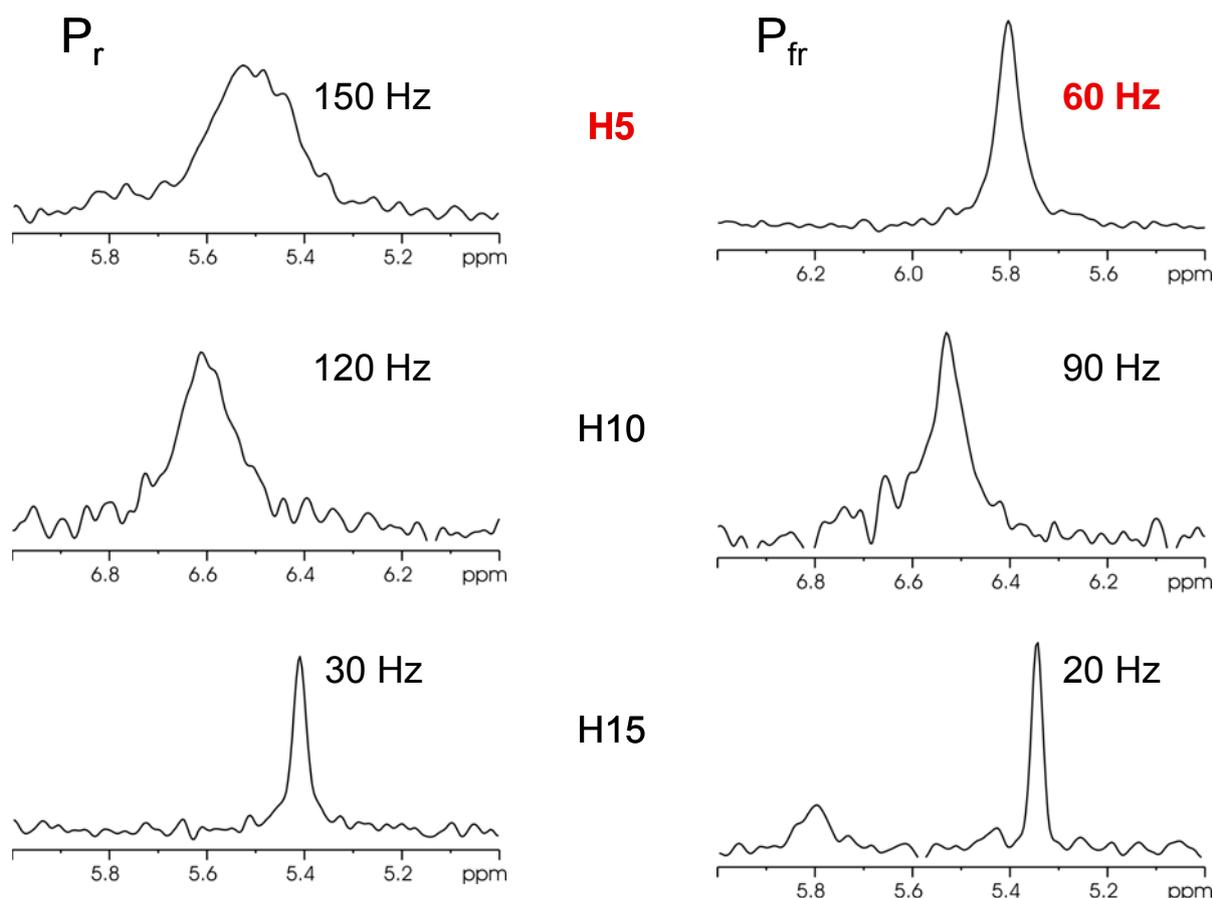


Abbildung 21: 1D-Schnitte aus den NOESY-Spektren in Abbildung 20 zur Bestimmung der Linienbreiten der Signale der Methin-Protonen. In der P_{fr} -Form zeigen sich für H5 zwei Signale mit stark reduzierter Linienbreite (hier nur eines gezeigt).

Nachdem in den $[^{13}\text{C}]$ -HMQC-Spektren die Methylgruppen solch starke Signale ergaben, war es möglich, $[^{13}\text{C}]$ -editierte HMQC-NOESY-Spektren aufzunehmen. In diesen zeigen sich lediglich Signale, die von Korrelationen zwischen Chromophor-Methylgruppen und anderen Chromophor-Protonen herrühren. Zusammen mit der Deuterierung des Proteins führt das heteronukleare Editieren der Spektren zu einer stärkeren Unterdrückung residualer Proteinsignale. Im Vergleich zu den 2D-NOESY-Spektren ist die Auflösung der 3D-HMQC-NOESYs in der indirekten Protonendimension allerdings drastisch reduziert. Eine Unterscheidung der beiden H5-Signalsätze ist hier dementsprechend nicht möglich.

Aufgrund der spezifischen Dynamik und der gestreckten Konformation des Chromophors in der Bindetasche ist es schwierig, aus den NOESY-Spektren genügend Informationen für Strukturrechnungen zu erlangen. Man kann allerdings die Daten für eine Bestimmung der Stereochemie an den drei Methinbrücken des Chromophors C5, C10 und C15 nutzen. Wie bereits in Kapitel 2.4.2. beschrieben bezieht sich die dabei gebräuchliche Nomenklatur für die Beschreibung der stereochemischen Anordnung auf die Konfiguration der Doppelbindung (*Z*: *cis*; *E*: *trans*) und die Konformation der Einfachbindung (*s*: synperiplanar; *a*: antiperiplanar).

Die Signale von H10-Korrelationen sind in den 3D-HMQC-NOESY-Spektren nicht zu sehen. Die Methylgruppen sind räumlich nicht nahe genug. Daher kann die Stereochemie an der zentralen Methinbrücke C10 lediglich aus den 2D-NOESYs abgeleitet werden. Die Spektren in P_r und P_{fr} weisen dabei keine Unterschiede auf, d.h. nach Photokonversion kommt es hier zu keiner Änderung der Stereochemie. In beiden Spektren findet man Signale für Korrelationen von H10 zu den Protonen der beiden Propionat-Seitenketten der Ringe B und C sowie zu den Protonen der Methyl-Gruppen C7' und C13'. Diese zuletzt erwähnten Korrelationen resultieren aus einem Zwei-Stufen-Transfer der Magnetisierung über H8 bzw. H12 zu den entsprechenden Protonen an C7' und C13'. Daraus ergibt sich, dass H10 zu den beiden Propionat-Seitenketten hinzeigt, die Stereochemie an C10 ist demnach Z_S in P_r und P_{fr} .

Für die Bestimmung der Stereochemie an den beiden anderen Methin-Brücken C5 und C15 können die 3D-HMQC-NOESY-Spektren herangezogen werden. Die Situation an C5 ist in Abbildung 22, die an C15 in Abbildung 23 dargestellt. Beide Abbildungen zeigen Schnitte aus den 3D-Spektren an den jeweiligen chemischen Verschiebungen der darüber angegebenen Methylgruppen und entsprechen damit 2D-NOESYs. Mit je zwei möglichen Konformationen bzw. Konfigurationen an jeder der beiden Bindungen ergeben sich insgesamt vier mögliche Stereoisomere, die jeweils über den Spektren abgebildet sind. Für jedes dieser vier Isomere ergibt sich ein spezifisches NMR-Muster, wenn man berücksichtigt, dass nur Korrelationen zwischen Methylgruppen und anderen Protonen im Chromophor Signale im Spektrum ergeben und dass eine kurze Entfernung ein starkes Signal (rote Pfeile) und eine große Entfernung ein schwaches bzw. kein Signal (blaue Pfeile) hervorruft. Ein Vergleich der zu erwartenden Signale mit den tatsächlich gemessenen ermöglicht es also, die stereochemische Situation an C5 und C15 zu klären.

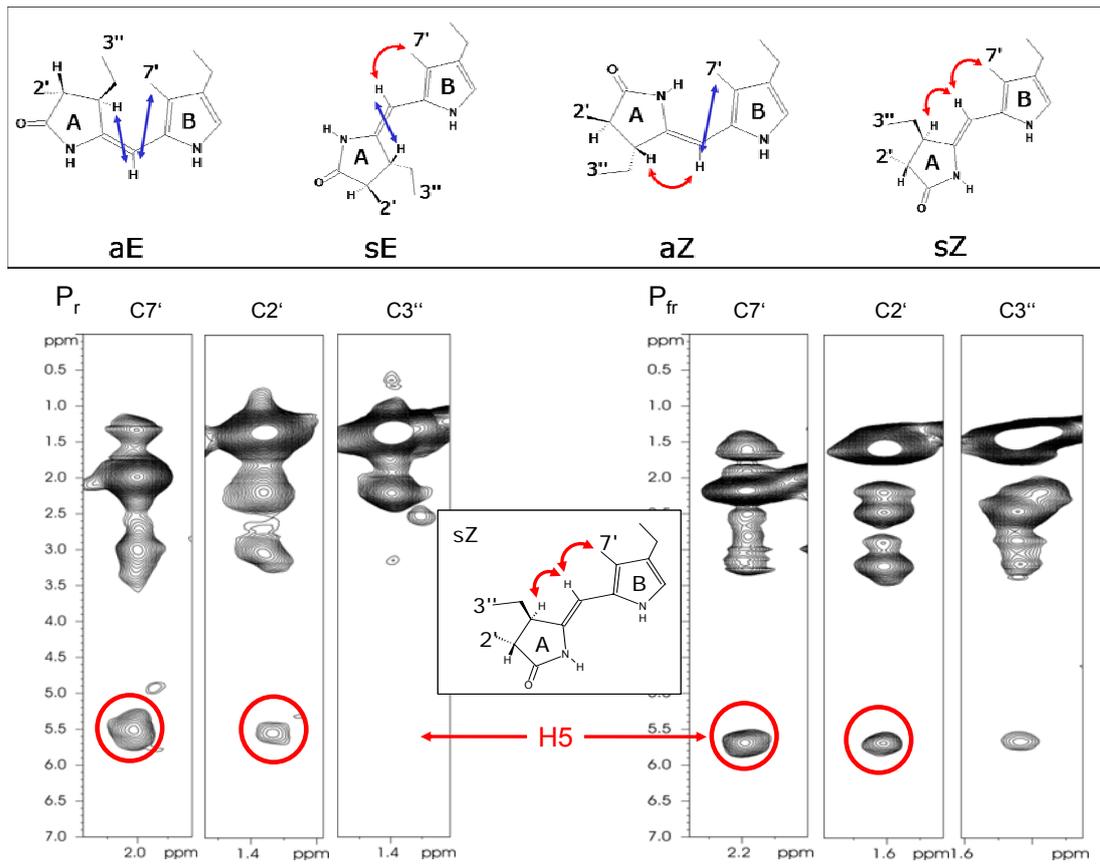


Abbildung 22: Mögliche Konformationen (oben) und Schnitte aus 3D-HMQC-NOESY-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{13}\text{C}]$ -PCB (unten) zur Bestimmung der Stereochemie an C5 des PCB-Chromophors (Erläuterungen im Text).

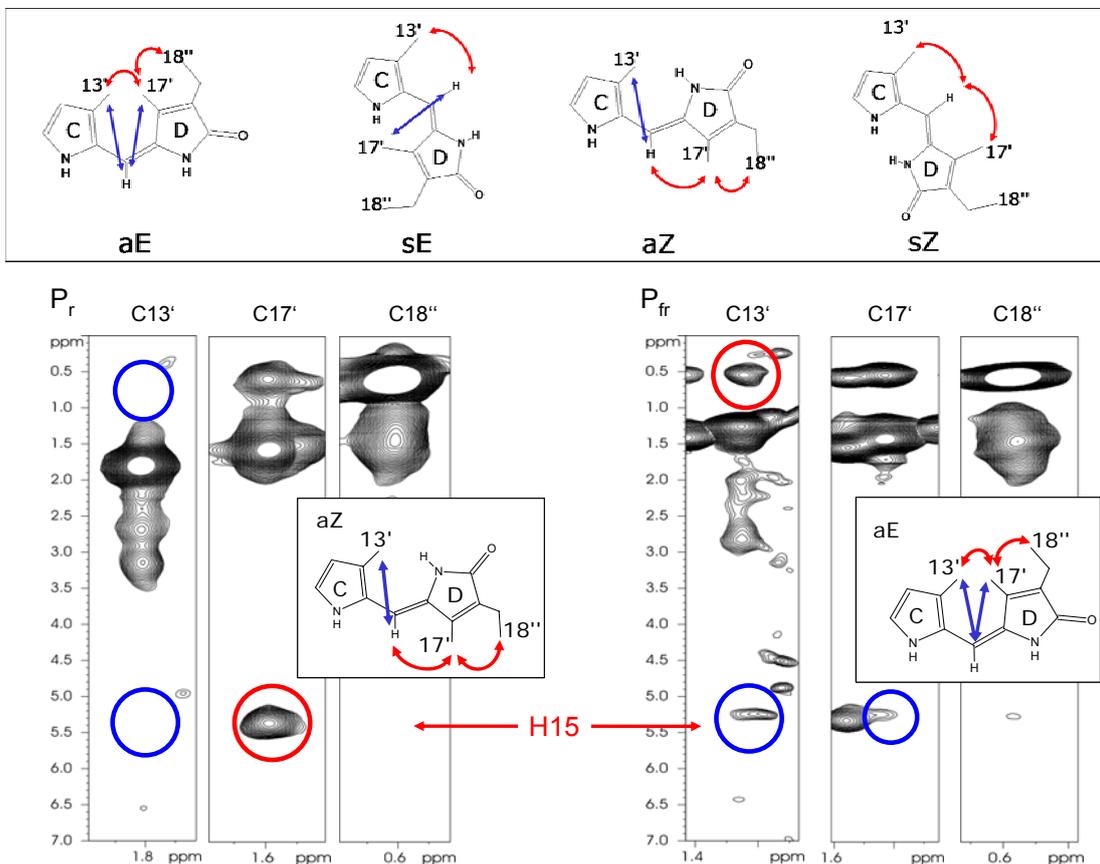


Abbildung 23: Mögliche Konformationen (oben) und Schnitte aus 3D-HMQC-NOESY-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{13}\text{C}]$ -PCB (unten) zur Bestimmung der Stereochemie an C15 des PCB-Chromophors (Erläuterungen im Text).

Die einzige Methylgruppe, die sich in direkter Nachbarschaft zu H5 befindet, ist C7'. Da H3 und die Protonen von C2' strukturell fixiert und sich räumlich nahe sind, führt ein kurzer Abstand zwischen H5 und H3 zwangsläufig immer zu einem Zwei-Stufen-Transfer der Magnetisierung von H5 über H3 zu den Protonen an C2'. Signale eines solchen Prozesses sind gegenüber solchen eines einstufigen Transfers von geringerer Intensität. Die starke Linienbreite der H5-Signale in P_r führt zusätzlich zu einem Verlust an Signalstärke. Im 2D-NOESY (Abbildung 20) findet man starke Korrelationen zwischen H5 und H3 und zwischen H5 und H7'. Im 3D-HMQC-NOESY zeigt sich ein Signal für eine H5-H7'-Korrelation. Desweiteren gibt es ein schwaches Signal zwischen H5 und H2', was aus dem angesprochenen Zwei-Stufen-Transfer herrührt. Damit kann für C5 in P_r eine *Zs*-Stereochemie abgeleitet werden. Diese Schlussfolgerung ist auch durch generelle stereochemische Überlegungen zu untermauern. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass das chirale C3-Atom in R-Konfiguration vorliegt (Klein et al., 1977; Lagarias & Rapoport, 1980). Ausserdem bestimmt die Bindestelle des Chromophors im Protein (Cys259) den Angriff der Seitenkette zum Chromophor. Dies wird in einem Modell der Bindetasche deutlich, welches auf Grundlage der 3D-Struktur des DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* (PDB-Code: 1ZTU) modelliert wurde und in Abbildung 24 dargestellt ist (Hahn et al., 2007). Es ist erkennbar, dass die Form der Bindetasche lediglich eine *Zs*- oder *Ea*-Stereochemie an C5 zulässt. Letzteres würde einen großen Abstand zwischen H5 und H7' zur Folge haben, was anhand der Spektren ausgeschlossen werden kann. Nach Photokonversion zu P_{fr} sind keine grundlegenden Änderungen im Spektrum zu erkennen. Die geringere Linienbreite der H5-Signale führt zu einer stärkeren Intensität der NOE-Signale. Ausserdem tritt dadurch ein zusätzliches Signal für eine H5-H3''-Korrelation auf, welches ebenfalls wieder von einem Zwei-Stufen-Transfer der Magnetisierung von H5 über H3 auf H3'' herrührt. Das allgemeine Signalmuster ändert sich allerdings nicht. Es können die gleichen Signale wie in P_r detektiert werden. Dementsprechend ist also auch in P_{fr} die Stereochemie an C5 *Zs*. Für den zweiten Signalsatz ergibt sich die gleiche Stereochemie. Hier können aber aufgrund der geringeren Intensitäten im 3D-Spektrum die Signale lediglich im 2D-NOESY aufgelöst werden.

Für die Situation an der C15-Methinbrücke zwischen den Ringen C und D führen ähnliche Überlegungen zur Bestimmung der Stereochemie. Im 3D-HMQC-NOESY der P_r -Form (Abbildung 23) ist ein starkes Signal zwischen der Methylgruppe C17' und H15 zu beobachten, nicht jedoch zwischen C13' und H15. Im 2D-NOESY (Abbildung 20) ergeben sich für dieselben Korrelationen jeweils ein starkes und ein schwaches Signal. Dieses spezifische Signalmuster entspricht einer *Za*-Stereochemie. Im Gegensatz zu C5 und C10 ändert sich die Situation für C15 jedoch nach Photokonversion zu P_{fr} . Beide Methylgruppen zeigen schwache Korrelationen mit H15. Ausserdem ergibt sich ein starkes Kreuzsignal zwischen C13' und C17' sowie ein weiterer

NOE zwischen C13' und C18'', welcher aus einem Zwei-Stufen-Transfer herrührt. Dementsprechend ist die Stereochemie an C15 in P_{fr} *Ea*.

Fasst man alle eben gemachten Aussagen zusammen, ergibt sich als allgemeine Konformation des Chromophors in P_r *ZZZssa* und in P_{fr} *ZZEssa*.

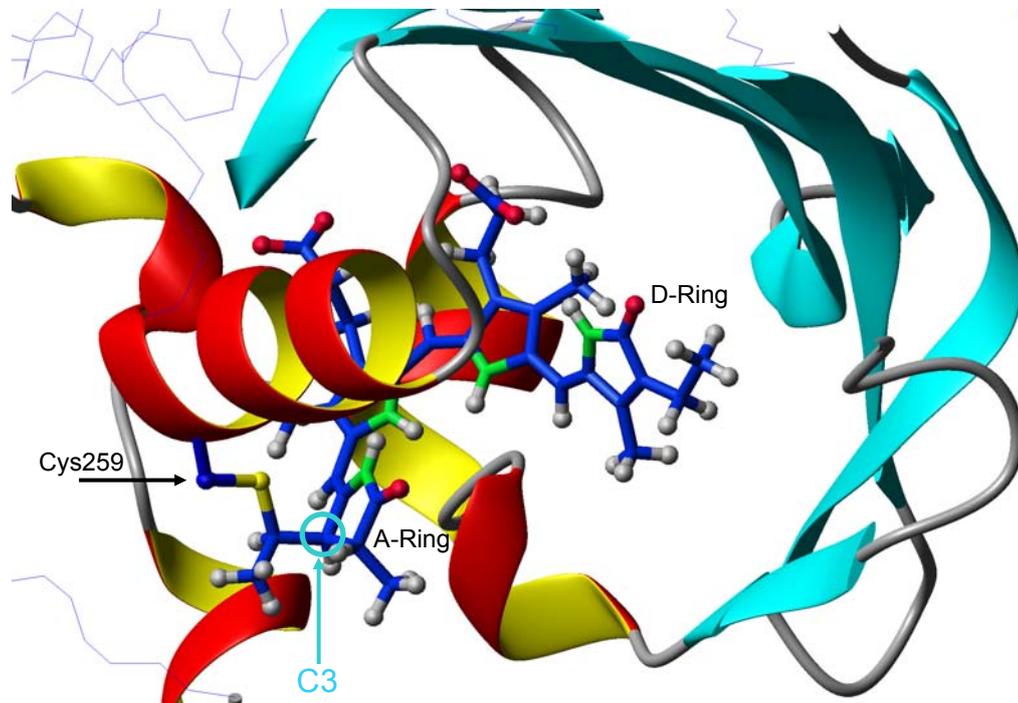


Abbildung 24: Modell der Bindetasche von Cph1. Grundlage hierfür war die 3D-Struktur des DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* (PDB-Code: 1ztu).

6.3. $[^{13}\text{C}]$ -HMQC und 3D-HMQC-NOESY mit $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{13}\text{C}]$ -PCB + $[^1\text{H}]$ -Phe/Tyr

Für die genauere Charakterisierung der Chromophor-Bindetasche, d.h. der Interaktionen zwischen Aminosäuren und Chromophor, wurde ein „reverser“ Markierungsansatz gewählt. Dabei ist das gesamte Protein deuteriert, lediglich einige spezifisch ausgewählte Aminosäuren liegen nativ, also protoniert vor. Damit sollten in NOESY-Spektren Korrelationen zwischen Protonen dieser Aminosäuren und Protonen des Chromophors, die sich in enger räumlicher Nähe zueinander befinden, zu detektieren sein. Nach Auswertung der 3D-Struktur des homologen Proteins DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* und zahlreicher Mutationstudien an verschiedenen Phytochromen wurden Phenylalanin und Tyrosin als geeignete Aminosäuren identifiziert. Tabelle 5 zeigt das Vorkommen dieser Reste in der Bindetasche von DrBphP sowie die Besetzung der homologen Position in Cph1, Abbildung 25 die Struktur der Bindetasche von DrBphP. Die möglichen Bedeutungen der Aminosäuren zur Stabilisierung der Chromophor-

Position innerhalb der Bindetasche und zur Weiterleitung der Lichtsignale wurden bereits in Kapitel 2.4.4. beschrieben.

Tabelle 5: Phenylalanin und Tyrosin in der Bindetasche von DrBphP aus *Deinococcus radiodurans* sowie die Besetzung der homologen Position in Cph1 Δ 2.

DrBphP <i>Deinococcus radiodurans</i>	← Position →	Cph1 <i>Synechocystis PCC6803</i>
Tyr	176	Tyr
Phe	198	Tyr
Phe	203	Tyr
Tyr	216	Phe
Ser	257	Tyr
Tyr	263	Tyr

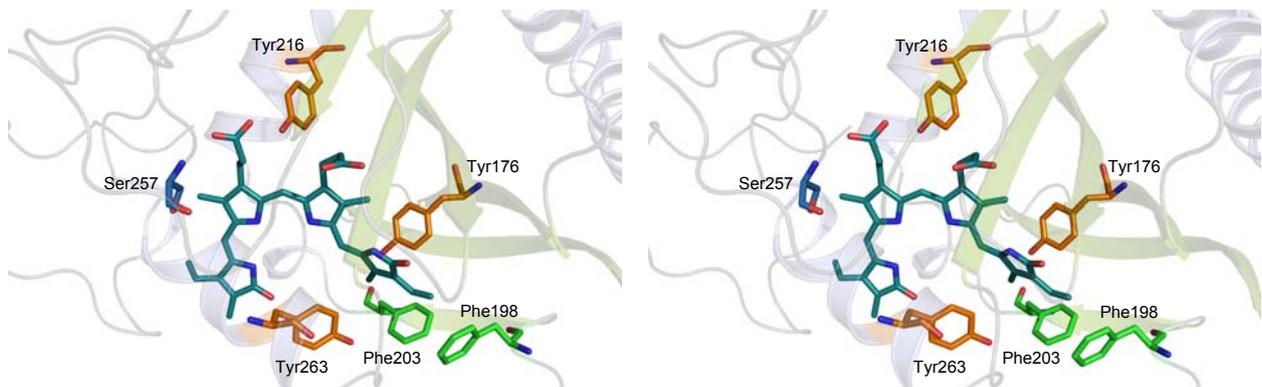


Abbildung 25: Stereoansicht der Bindetasche von DrBphP aus *Deinococcus radiodurans*. Anhand der Struktur sowie den Ergebnissen diverser Mutationsstudien (siehe Text) wurden Phenylalanin und Tyrosin für den reversen Markierungsansatz in Cph1 Δ 2 ausgewählt.

Die Expression von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^1\text{H}]$ -Phe/Tyr wurde in einem speziellen Medium durchgeführt, welches aus deuteriertem Bakterienlysat bestand und zu dem im Überschuss protoniertes Phenylalanin und Tyrosin zugefügt wurde. Dies war möglich, da Phenylalanin und Tyrosin im Medium in niedrigen Konzentrationen vorlagen und somit die zugesetzten nicht-deuterierten Aminosäuren primär verstoffwechselt wurden. Die Tatsache, dass es sich bei dem deuterierten Medium um ein Vollmedium handelte, führte zu verhältnismäßig hohen Zelldichten und dementsprechend guten Ausbeuten an rekombinantem Protein. Aus einem Liter Kultur erhielt man nach Aufreinigung etwa 30 mg Protein. Dieses wurde mit $[^{13}\text{C}]$ -PCB assembliert. Anschließend wurden $[^{13}\text{C}]$ -HMQC- und 3D-HMQC-NOESY-Spektren aufgenommen. Abbildung 26 zeigt eine Überlagerung von Schnitten aus den 3D-Spektren von $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^{13}\text{C}]$ -PCB (Abbildung 26A) bzw. $[^2\text{H}]$ -Cph1 Δ 2 + $[^1\text{H}]$ -Phe/Tyr + $[^{13}\text{C}]$ -PCB (Abbildung 26B) jeweils in der P_r -Form an den chemischen Verschiebungen der Methylgruppen. Wie man

deutlich erkennt, sind im Spektrum der revers markierten Probe zusätzliche NOE-Signale zwischen Chromophor-Methylgruppen und Phe/Tyr-Seitenkettenprotonen zu erkennen.

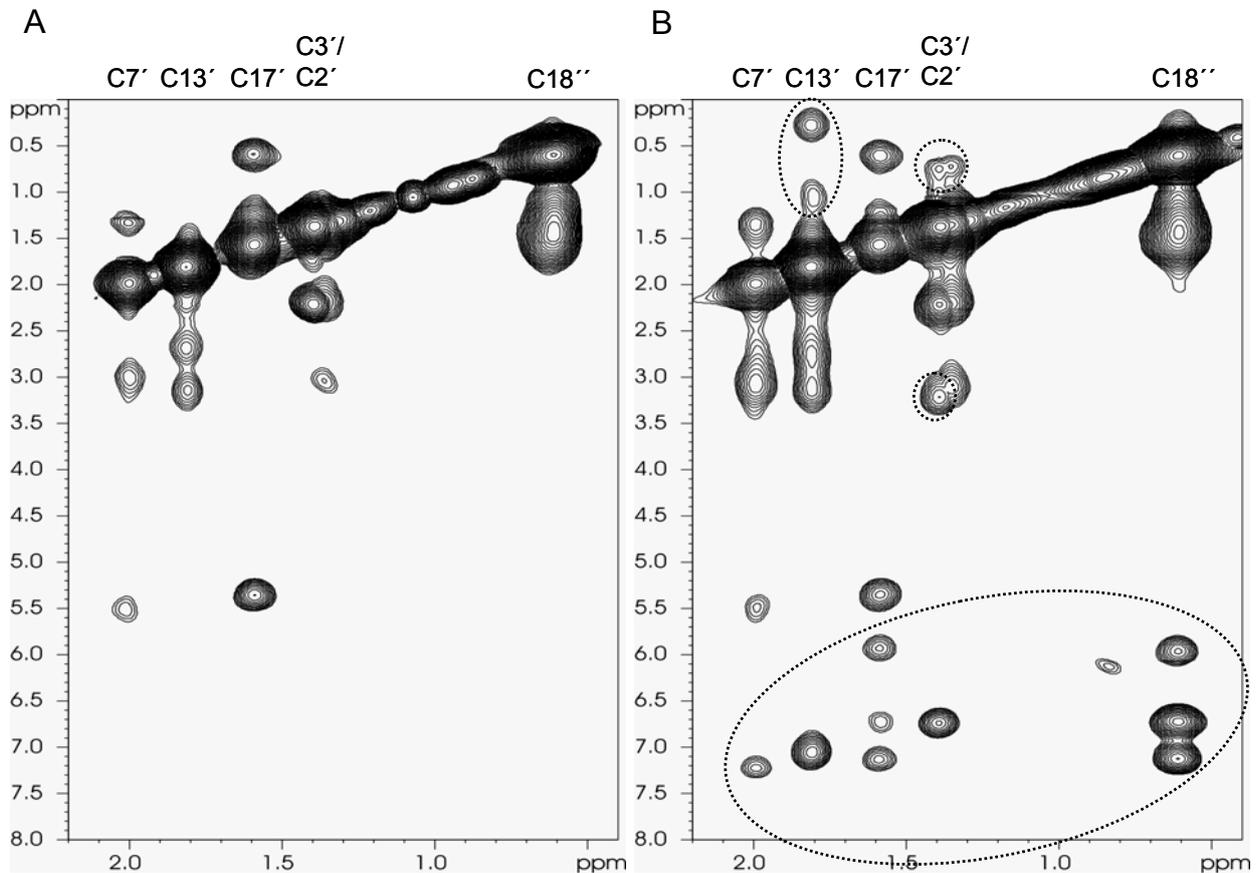


Abbildung 26: Reverse Markierung. Überlagerung von Schnitten aus 3D-HMQC-NOESY-Spektren (geschnitten an den jeweiligen chemischen Verschiebungen der darüber angegebenen Methylgruppen) von $[^2\text{H}]\text{-Cph1}\Delta 2 + [^{13}\text{C}]\text{-PCB}$ (A) und $[^2\text{H}]\text{-Cph1}\Delta 2 + [^1\text{H}]\text{-Phe/Tyr} + [^{13}\text{C}]\text{-PCB}$ (B), beide in der P_r -Form. Die Protonierung von Phe und Tyr führt zu zusätzlichen NOEs (eingekreist), die allerdings nicht eindeutig zugeordnet werden konnten (siehe Text).

Die Spektren der P_{fr} -Form waren im Gegensatz zu den P_r -Spektren von deutlich schlechterer Qualität. Eine eindeutige Zuordnung der Signale zu den spezifischen Protonen der jeweiligen Aminosäure-Seitenkette erwies sich daher als äußerst schwierig. Hinzu kommt, dass Protonen mehrerer Aminosäuren in solch enger räumlicher Nachbarschaft zu Methyl-Protonen des Chromophors stehen, dass sie alle NOE-Signale hervorrufen. Generell ist aber das Auftreten gut aufgelöster Signale zwischen Chromophor-Methylgruppen und den Seitenketten-Protonen ein Indiz dafür, dass mit diesem Ansatz tatsächlich Informationen über die Bindetasche und Interaktionen spezifischer Aminosäuren mit dem Chromophor gewonnen werden können. Es ist allerdings nötig, die spezifischen Aminosäuren hinsichtlich ihrer Häufung in der Bindetasche genauer auszuwählen, um Signale nach Aufnahme der Spektren eindeutig zuordnen zu können.

6.4. Diskussion

Für die Beschreibung der allgemeinen Konformation freier Biline ist es generell ausreichend, die Stereochemie an den drei Methinbrücken – also die Konfiguration der Doppelbindung und die Konformation der Einfachbindung – zu beschreiben. Da die Pyrrol-Ringe an sich starre Einheiten darstellen, sind auch eventuell vorhandene Substituenten, sobald die Orientierung der Ringe festgelegt ist, stereochemisch eindeutig definiert. Desweiteren erfordert das aromatische System des linearen Tetrapyrrols an sich eine annähernd planare Struktur. Ist das Bilin jedoch als Protein-Kofaktor in eine peptidische Bindetasche eingebettet, spielen neben dem aromatischen System auch andere Faktoren für seine Konformation eine Rolle, z.B. sterische oder elektronische Effekte der das Bilin umgebenden Protein-Seitenketten. Abweichungen von einer planaren Chromophor-Struktur sind zu erwarten und zeigten sich auch in den bisher vorliegenden Kristallstrukturen diverser Biliproteine. Die Verwendung der Standard-Nomenklatur für freie Biline ist auch in diesen Fällen möglich, allerdings beschreiben hier *Z*- oder *E*-Konfigurationen bzw. *s*- oder *a*-Konformationen eher bestimmte „Konformationsgruppen“ mit einem gewissen Spielraum an Torsionswinkeln. In dem hier untersuchten System sind diese Spielräume von besonderer Bedeutung, da der PCB-Chromophor in Cph1 nicht starr sondern beweglich ist, was im Falle der C5-Methinbrücke zum Auftreten von zwei Signalsätzen in der P_{fr} -Form führt. Diese repräsentieren allerdings nicht zwei gänzlich unterschiedliche Konformationen. Die NOE-Daten zeigen hier, dass beide Signalsätze zu einer „Konformationsgruppe“ gehören.

Trotz der Beweglichkeit des Chromophors in der Bindetasche (siehe auch Kapitel 7) war es möglich, die Daten der NOESY-Spektren hinsichtlich der Bestimmung der allgemeinen Konformation auszuwerten. Auch wenn durch die spezifische Dynamik des Chromophors die Winkel zwischen den einzelnen Ringebenen um einige Grad variieren, ändern sich die Abstände der Protonen nicht drastisch. Es erfolgte keine quantitative, sondern eine phänomenologische Auswertung der NOE-Signale, also lediglich eine Abschätzung der zu erwartenden NOEs („stark“ bzw. „schwach“ / „nicht vorhanden“) und ein Abgleich mit den gemessenen Spektren. Dennoch konnte die „Konformationsgruppe“ für beide stabilen Photoisomere eindeutig bestimmt werden – *ZZZssa* in P_r und *ZZEssa* in P_{fr} . Das bedeutet, dass die einzig auftretende strukturelle Veränderung des Chromophors nach Lichtdetektion eine Isomerisierung des D-Rings ist. Eine gewisse strukturelle Heterogenität der Chromophorkonformation innerhalb einer „Konformationsgruppe“ konnte kürzlich für verschiedene Phytochrome auch mittels FT-RR-Studien gezeigt werden (von Stetten *et al.*, 2008).

Eine Bestimmung der allgemeinen Konformation anhand der verschiedenen aufgenommenen 2D- und 3D-NOESY-Spektren war also möglich. Es konnten aus den Spektren allerdings nicht genügend Informationen für eine Strukturberechnung des Chromophors in der Bindetasche gewonnen werden. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Natürlich spielt wieder die Chromophordynamik eine Rolle (Kapitel 7). Aber auch die relativ geringe Anzahl an Protonen im Chromophor stellt diesbezüglich ein generelles Problem dar. Mit Hilfe der [^{13}C]-editierten NOESY-Spektren konnten die Resonanzen der Korrelationen zwischen den Protonen der Methylgruppen und denen der Methin-Brücken eindeutig zugeordnet werden. Da eine vollständige Deuterierung des Apoproteins nicht gelang, sind die Regionen im 2D-NOESY, in denen die Resonanzen anderer Korrelationen innerhalb des Chromophors (z.B. Methyl - Methyl oder Methyl - aromatische Protonen) liegen, von Korrelationen residueller Protein-Protonen überlagert. Des Weiteren brachte der reverse Markierungsansatz nicht die gewünschten Informationen über Interaktionen spezifischer Aminosäure-Seitenketten der Proteinbindetasche und dem Chromophor. Die Aufnahme von [^{15}N]-editierten NOESY-Spektren war gar nicht erst möglich (siehe Kapitel 5).

Die Änderungen der chemischen Verschiebungen sind an sich ein sensibler Indikator für strukturelle Veränderungen. Allerdings ist die Korrelation zwischen chemischer Verschiebung und Struktur nicht trivial. Hierfür sind quantenchemische Berechnungen erforderlich. Für die Interpretation der [^{15}N]-chemischen Verschiebungen des PCB-Chromophors in Cph1 wurde dies bereits praktiziert, allerdings war die Übereinstimmung zwischen den theoretisch berechneten und den gemessenen Spektren nicht zufrieden stellend (Mroginski *et al.*, 2004; Strauss, 2006). Wie beschrieben (Kapitel 5) führte hier der Vergleich mit geeigneten Modellsubstanzen zu einer Zuordnung der Resonanzen. Für die [^{13}C]-chemischen Verschiebungen waren solche Berechnungen nicht notwendig, da hier die eindeutige Zuordnung der vorhandenen Resonanzen durch die Auswertung aller zur Verfügung stehenden Spektren erreicht werden konnte. Die Berechnung von Resonanzen für nicht-Methyl-Kohlenstoffe erübrigte sich, da Korrelationen dieser keine Signale im Spektrum ergaben.

7. Resultate: Chromophor-Dynamik

In dieser Arbeit wurde bereits mehrfach die spezifische Dynamik des Chromophors in der Proteinbindetasche angesprochen. Diese erschwerte die Aufnahme auswertbarer NMR-Spektren für die Bestimmung des Protonierungszustandes des Chromophors, für dessen Konformationsbestimmung sowie für eine generelle Charakterisierung seiner Proteinumgebung.

In den [^{15}N]-HMQC-Spektren von [^{15}N]-PCB in Cph1 Δ 2 konnten auch nach einer extrem langen Messzeit von fünf Tagen nicht alle Stickstoff-Protonen-Korrelationen des Chromophors detektiert werden. Aus der Aufnahme von 1D-[^{15}N]-Spektren und Vergleichen mit Modellsubstanzen konnte dennoch geschlossen werden, dass in beiden Photoisomeren alle vier Pyrrol-Stickstoffe des PCB protoniert sind. Die Abwesenheit der entsprechenden Signale im HMQC deutete auf Austauschphänomene hin. Dabei kommt zum einen der Austausch der Stickstoff-gebundenen Protonen mit dem umgebenden Wasser, zum anderen das Auftreten von Konformationssubzuständen des Chromophors, bei dem das gemessene Signal ein Mittel der Signale aller Subzustände darstellt (s.u.), oder aber eine Kombination beider Phänomene in Frage. In jedem Fall kommt es zu einer starken Verbreiterung der Signale, was mit einem Verlust an Signalintensität einhergeht. Die Änderung der Messtemperatur sowie des äußeren Magnetfeldes sollte die Dynamik und somit die Linienbreiten der Signale beeinflussen. Dahingehende Versuche brachten allerdings keine neuen Erkenntnisse (*Strauss et al., 2005a*). Auch die aufgenommenen [^{13}C]-HMQC-Spektren von [^{13}C]-PCB in Cph1 Δ 2 wiesen eine relativ schlechte Sensitivität auf. Auch hier konnten nach langen Messzeiten lediglich die Methylgruppen, nicht jedoch die anderen Protonen-Kohlenstoff-Korrelationen im Chromophor detektiert werden. Da Kohlenstoff-gebundene Protonen nicht mit dem Lösungsmittel austauschen können, erklärt sich die geringe Sensitivität der Spektren hier allein durch das Vorliegen verschiedener Subkonformationen des Chromophors.

Die NMR-Spektroskopie an sich stellt eine im besonderen Maße geeignete Methode zur Aufklärung und Quantifizierung dynamischer Prozesse in biologischen Systemen dar. Allerdings ist hierfür eben die Aufnahme von [^{15}N]-HMQC-Spektren (H/D-Austausch, Messung von Relaxationszeiten) oder [^{13}C]-HMQC-Spektren (Messung von Relaxationszeiten) nötig. Dies ist für das Cph1 Δ 2-PCB-System, wie beschrieben, nicht möglich, da sich in den entsprechenden Spektren nicht alle Korrelationen zeigen. Anhand der vorliegenden Daten sowie durch Vergleiche mit den Daten des Modellsystems α -C-Phycocyanin lassen sich aber allgemeine Aussagen über die Beweglichkeit des Chromophors und seine Lage innerhalb der Proteinbindetasche treffen.

Intermolekulare dynamische Prozesse wie der Austausch saurer Protonen im Molekül mit Protonen aus dem umgebenden Lösungsmittel sind erkennbar an den [^1H]-chemischen Verschiebungen der jeweiligen Korrelationen und an deren Linienbreiten. Für α -C-Phycocyanin, wo der PCB-Chromophor durch ein starkes Wasserstoffbrücken-Netzwerk fest positioniert ist, haben die Pyrrol-Protonen die chemischen Verschiebungen, die man für an Stickstoff gebundene Protonen in linearen Tetrapyrrolen erwartet. Ausserdem sind die Linienbreiten ihrer Signale klein. Lediglich das Stickstoff-Protonen-Paar am D-Ring, der im intakten C-Phycocyanin über Wasserstoffbrücken mit der β -Untereinheit verknüpft ist, weist eine deutlich geringere chemische Verschiebung auf, da es in der isolierten α -Untereinheit nun dem Lösungsmittel exponiert ist. Der PCB-Chromophor in Cph1 Δ 2 hingegen liefert für die Pyrrol-Protonen chemische Verschiebungen, die zwischen denen von Wasserprotonen und Pyrrol-Protonen in α -C-Phycocyanin liegen. In der Stickstoffdimension weisen die Signale im [^{15}N]-HMQC schmale, in der Protonendimension starke Linienbreiten auf.

Man kann davon ausgehen, dass der PCB-Chromophor in Cph1 Δ 2, falls überhaupt, durch ein deutlich schwächeres Wasserstoffbrücken-Netzwerk in der Bindetasche positioniert ist als in α -C-Phycocyanin, dass seine Pyrrol-Protonen dem Lösungsmittel stärker exponiert sind und somit die Relaxation auch deutlich beschleunigt ist. Diese unterschiedliche Dynamik desselben Chromophors in zwei verschiedenen Proteinen – α -C-Phycocyanin und Cph1 Δ 2 – geht einher mit der Unterschiedlichkeit beider Proteine hinsichtlich der Photochromizität und damit hinsichtlich ihrer Funktion. C-Phycocyanin ist als Bestandteil der Antennenkomplexe von Cyanobakterien nicht photochrom, d.h. der Chromophor vollzieht nach Lichtdetektion keine Isomerisierung. Die relativ feste Positionierung des Chromophors im Protein sowie auch der einzelnen Biliproteine innerhalb der Antennen ermöglicht einen verlustfreien Energietransfer hin zum photosynthetischen Reaktionszentrum. In Cph1 Δ 2 erfolgt als erster Schritt nach der Detektion von Licht spezifischer Wellenlänge eine Isomerisierung der Doppelbindung zwischen den Ringen C und D von PCB und somit eine Rotation des D-Ringes, welche eine gewisse Flexibilität des Chromophors sowie auch den entsprechenden Platz innerhalb der Bindetasche erfordert.

Die intramolekulare Dynamik des schon erwähnten konformativen Umwandlungsprozesses kann mit den vorhandenen Daten ebenfalls nur semi-quantitativ beschrieben werden. In einem solchen Prozess (z.B. "gehinderte" Rotation um eine Einfachbindung) verändern Spins ihre Positionen und somit ändert sich auch ihre chemische Umgebung. Bei der Beschreibung der allgemeinen Konformation des PCB-Chromophors in Cph1 Δ 2, d.h. der Bestimmung der Konformation der Einfachbindungen an den drei Methinbrücken, spielt die Dynamik dieser Konformationsumwandlung eine entscheidende Rolle.

Bewegt sich ein Molekül langsam (relativ zur NMR-Zeitskala), zeigen sich im Spektrum zwei Signale der beiden austauschenden, sich in unterschiedlicher Umgebung befindlichen Spins. Je schneller die Bewegung des Moleküls wird, umso mehr verbreitern sich die beiden Signale und nähern sich einander an. Am Koaleszenzpunkt bildet sich ein sehr breites „Durchschnittssignal“ beider Zustände, welches sich bei weiter steigender Bewegungsgeschwindigkeit wieder verschmälert. Ein sehr schneller Austausch ist schließlich gekennzeichnet durch ein „Durchschnittssignal“ natürlicher Linienbreite.

Die Signale der Methin-Protonen können somit hinsichtlich ihres Austauschverhaltens charakterisiert werden. Die Signale des H15-Protons an der Methin-Brücke zwischen Ring C und D weisen die niedrigsten Linienbreiten auf (30 Hz in P_r , 20 Hz in P_{fr}). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der $[^{15}\text{N}]$ -HMQC-Spektren, in denen das Protonen-Stickstoff-Paar des D-Rings das stärkste Signal liefert. An dieser Stelle ist das Molekül also sehr flexibel, es kommt zu einem schnellen Austausch zwischen zwei Konformationen. Die Signale des H10-Protons zwischen den Ringen B und C sind koaleszenzbedingt stark verbreitert (120 Hz in P_r , 90 Hz in P_{fr}), was wiederum mit schwächeren Signalen der Protonen-Stickstoff-Paare der Ringe B und C im $[^{15}\text{N}]$ -HMQC übereinstimmt und auf einen dementsprechend langsameren Austausch und eine geringere Flexibilität hindeutet. Das P_r -Signal des H5-Protons zwischen Ring A und Ring B ist mit 150 Hz noch breiter als die H10-Signale. Für das entsprechende Protonen-Stickstoff-Paar des A-Rings wurde im $[^{15}\text{N}]$ -HMQC kein Signal detektiert. In der P_{fr} -Form ergeben sich zwei Signale mit einer Linienbreite von 60 Hz. Der konformative Umwandlungsprozess erfolgt hier also so langsam, das Molekül ist dementsprechend an dieser Stelle so unbeweglich, dass man die Signale beider Konformere sieht.

Auch diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Funktionalität des Chromophors in Phytochromen. Am D-Ring, welcher nach Lichtdetektion rotiert, ist das PCB-Molekül am flexibelsten und hat auch am meisten Platz in der Bindetasche. Je weiter man sich vom D-Ring entfernt, umso starrer wird der Chromophor. Die Propionat-Seitenketten positionieren die Ringe B und C über Wasserstoff-/Salzbrücken, am A-Ring erfolgt die kovalente Bindung des Chromophors an das Protein und auch hier findet man ein ausgeprägtes Wasserstoffbrücken-Netzwerk. Schränkt man die Beweglichkeit des Chromophors am D-Ring z.B. durch ortsspezifische Aminosäure-Mutationen in der Proteinbindetasche (Tyr176His-Mutante in Cph1 Δ 2) ein, führt dies zur Verhinderung der lichtinduzierten Rotation desselben und zum Auftreten von Fluoreszenz (Fischer & Lagarias, 2004).

8. Abschließende Diskussion

Was bedeuten nun die vorliegenden Ergebnisse im Hinblick auf die Beantwortung der zu Beginn der Arbeit gestellten Fragen? Da bisher Röntgenkristallstrukturen von *full length* Phytochromproteinen in beiden stabilen Photozuständen fehlen, wird mit diversen anderen strukturellen und mechanistischen Untersuchungen versucht, Einblick in den Photozyklus von Phytochromen zu erlangen. Ziel dabei ist es, die molekulare Wirkungsweise dieses Photorezeptors generell zu verstehen. Die aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit gemachten Aussagen ergeben allein kein vollständiges Bild der tatsächlichen Verhältnisse im Protein. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Experimente kann dieses Bild jedoch verifiziert und verfeinert werden. Gerade auch die Anwendung von Methoden zur Untersuchung der nicht-stabilen Zwischenzustände im Photozyklus brachte Informationen, die mit den Schlüssen, die aus dieser Arbeit gezogen werden können, vereinbar sind.

Im P_r -Grundzustand befindet sich der Chromophor in *ZZZssa*-Konformation. Allerdings existieren innerhalb dieser „Konformationsgruppe“ zwei Konformere, die sich bezüglich der Diederwinkel an der Methinbrücke zwischen Ring A und B unterscheiden und in einem thermischen Gleichgewicht stehen (*van Thor et al., 2006; Rohmer et al., 2006; von Stetten et al., 2008; Hahn et al., 2008*). Nach Lichtabsorption isomerisiert zunächst die Doppelbindung zwischen Ring C und D von *Z* nach *E* (Lumi-R). Die Struktur des umgebenden Proteins wird davon nicht beeinflusst (*Foerstendorf et al., 1996; Foerstendorf et al., 2000; Foerstendorf et al., 2001*). Im sich anschließenden thermischen Zerfallsprozess zu Meta- R_a relaxieren sowohl Chromophor als auch die direkte Proteinumgebung. Während des Übergangs von Meta- R_a zu Meta- R_c wird ein Proton vom Chromophor transient an das umgebene Wasser abgegeben und vom Protein (vermutlich Asp207) aufgenommen. Die Reprotonierung des Chromophors (vermutlich durch His260) geht einher mit der Bildung von P_{fr} . Eine Beteiligung der genannten Aminosäuren am Protonen-Transfer ist aufgrund verschiedener Experimente wahrscheinlich (siehe Kapitel 2.4.). Damit scheint es einen für die De- und Reprotonierung des Chromophors unterschiedlichen Protonentranslokationsweg zu geben, was auf eine strukturelle Änderung im Protein nach Deprotonierung des Chromophors hindeutet, die auch gezeigt werden konnte (*Lamparter et al., 2001; Esteban et al., 2005; von Stetten et al., 2007; Noack, 2007*). Allerdings ist für diese strukturelle Änderung die PHY-Domäne essentiell. In der Kristallstruktur von Cph1 Δ 2 (PDB-Code: 2vea) ist die PHY-Domäne über eine Salzbrücke mit Asp207 verbunden. Nimmt Asp207 ein Proton aus der Umgebung auf, bricht diese Salzbrücke auf. Das Protein könnte sich vermutlich so umstrukturieren, dass eine Reprotonierung des Chromophors über Asp207 dann nicht mehr möglich ist. Durch diese Umstrukturierungen könnte es allerdings zu

einer Reprotonierung des Chromophors über His260 kommen. In P_{fr} ist der Chromophor wieder vollständig protoniert und in *ZZE_{ssa}*-Konformation. Auch hier liegen wieder zwei Konformere mit unterschiedlichen Diederwinkeln an der Methinbrücke zwischen Ring A und B vor (*Strauss et al., 2005a; van Thor et al., 2006; Rohmer et al., 2006; Hahn et al., 2007; von Stetten et al., 2008; Hahn et al., 2008*).

Wie sich gezeigt hat, können sterische Interaktionen von Chromophor und Aminosäureseitenketten in der Proteinbindetasche nicht die Haupttriebkraft der strukturellen Änderung des Proteins sein. Der Chromophor hat Platz in der Proteinbindetasche und ist durch ein eher loses Wasserstoffbrückennetzwerk positioniert. Vielmehr spielt die Umordnung dieses Netzwerkes, welche durch die Rotation des D-Rings nach Lichtabsorption herbeigeführt wird, eine Rolle. Wasserstoffbrücken werden gebrochen, Aminosäuren orientieren sich um und ermöglichen so die Protonentranslokation und die P_{fr} -Bildung. Die Energie der Konformationsumwandlung des Chromophors induziert dabei die funktionell relevante größere Umordnung im Protein, was die Signalkaskade auslöst. Damit sind auch die bemerkenswerten Änderungen im dynamischen Verhalten der Methinbrücke zwischen Ring A und B nicht Grund, sondern eher Resultat einer strukturellen Umorientierung des Proteins. Der Mechanismus der Photokonversion und die Konformationen der stabilen Photoisomere sind wohl in allen Phytochromen gleich. Ein unterschiedliches dynamisches Verhalten könnte hingegen die Unterschiedlichkeit verschiedener Phytochrome z.B. bezüglich der Bedeutung spezifischer Aminosäuren erklären.

9. Zusammenfassung / Summary

Die im Rahmen dieser Dissertation vorgenommenen Lösungs-NMR-Studien am cyanobakteriellen Phytochrom 1 (Cph1) bzw. dessen N-terminaler photosensorischer Domäne Cph1 Δ 2 befassten sich mit Fragen zum Protonierungszustand des Chromophors, zu dessen Dynamik in der Proteinbindetasche und zu seiner Konformation in den beiden Photoisomeren P_r und P_{fr}. Mit den Ergebnissen sollten Aussagen zur Detektion des Lichtsignals durch den Chromophor sowie der Weitergabe des Signals an das Protein zur Initiation der Signaltransduktionskaskade getroffen werden.

Für die unterschiedlichen NMR-Experimente mussten das Apoprotein und der PCB-Chromophor unterschiedliche Markierungsmuster aufweisen. Protokolle für die Bereitstellung des Probenmaterials existierten bereits oder wurden in dieser Arbeit optimiert. Es war dennoch schwierig, gut aufgelöste Spektren des Chromophors zu erhalten. Dies lag zum einen an Relaxationseffekten, zum anderen an der Gesamtgröße des Proteins (58kDa) und dessen im Vergleich zum Chromophor über hundertfach größerer Protonenzahl.

Als erste Resultate konnten nach Aufnahme von [¹⁵N]-1D und -HMQC-Spektren mit [¹⁵N]-PCB in deuteriertem Apoprotein und nach Vergleich der Spektren mit denen geeigneter Modellsubstanzen wie α -C-Phycocyanin die [¹⁵N]-chemischen Verschiebungen der Pyrrol-Stickstoffe des PCB zugeordnet werden. Auch α -C-Phycocyanin musste zu diesem Zweck NMR-spezifisch markiert hergestellt werden. Es konnte eindeutig bestätigt werden, dass der Chromophor in beiden Photoisomeren vollständig protoniert ist.

In einem [¹³C]-HMQC-Spektrum von [¹³C]-PCB in deuteriertem Apoprotein konnten lediglich die Methylgruppen des Chromophors, nicht jedoch die Methinbrücken detektiert werden. Trotzdem war es nach Aufnahme weiterer 2D-NOESY- und [¹³C]-editierter 3D-HMQC-NOESY-Spektren möglich, Resonanzen zuzuordnen und aus den so gewonnenen relativen Abstandsinformationen die allgemeine Konformation des Chromophors in der Proteinbindetasche für P_r (ZZZssa) und P_{fr} (ZZEssa) zu bestimmen. Die ermittelte P_r-Konformation stimmt mit der des PCB-Chromophors in der kürzlich veröffentlichten 3D-Kristallstruktur desselben Proteins (PDB-Code: 2vea) überein. Die P_{fr}-Konformation eines Phytochromchromophors war bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt.

Die spezifische Dynamik des Chromophors in der Proteinbindetasche beeinflusste die Aufnahme aller Spektren. Sie ergibt sich zum einen aus dem Austausch der Pyrrol-Protonen des Chromophors mit dem umgebenden Wasser, zum anderen aus konformationellen Subzuständen (räumliche Beweglichkeit innerhalb einer spezifischen *s*- oder *a*-Konformation), die der Chromophor einnimmt. Beides führte koaleszenzbedingt zu einer starken Verbreiterung der

Signale. Für die Methinbrücke zwischen Ring A und B des Chromophors konnten in der P_{fr}-Form sogar zwei Signalsätze detektiert werden.

Man kann davon ausgehen, dass der Chromophor deutlich weniger stark als z.B. in α -C-Phycocyanin durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk positioniert wird. Er ist dementsprechend sehr beweglich und seine Pyrrol-Protonen sind dem umgebenden Wasser exponiert. Allerdings nimmt die Beweglichkeit innerhalb des Chromophors vom D-Ring hin zum A-Ring ab.

Mit diesen Ergebnissen sowie unter Einbeziehung weiterer Untersuchungen kann geschlossen werden, dass keine starke Konformationsänderung des Chromophors strukturelle Veränderungen im Protein bewirkt, sondern eine Umordnung des Wasserstoffbrückennetzwerkes als Folge der Rotation des D-Rings nach Lichtdetektion dabei eine Rolle spielt. Zusammen mit einem Protonentranslokationsprozess könnten so größere strukturelle Umordnungen im Protein bewirkt werden, die die Signalweiterleitung beeinflussen.

The solution-state NMR studies of this thesis on cyanobacterial phytochrome 1 (Cph1) and its N-terminal photosensory domain Cph1 Δ 2 addressed questions about the protonation state of the chromophore, its dynamics inside the binding pocket and its conformation in the two different photoisomers P_r and P_{fr}. The results should promote a deeper understanding of the photo-conversion mechanism by giving new hints on how an incoming light signal is detected by the chromophore and how it is passed on to the protein to initiate the signalling cascade.

For the NMR experiments different labelling patterns for both the apoprotein and the chromophore had to be provided. Protocols for the preparation of the appropriate samples already existed but had to be optimized. Nevertheless it was very difficult to obtain well resolved signals from the chromophore. This is because of relaxation effects, the overall size of the holoprotein (58 kDa) and the number of protons in the protein that exceeds the number of protons in the chromophore by over a hundred times.

As first results it was possible to assign the tetrapyrrole nitrogen chemical shifts of the PCB-chromophore after recording [¹⁵N]-1D and -HMQC spectra of deuterated protein + [¹⁵N]-PCB and comparison of the obtained resonances with those from appropriate model compounds like α -C-phycoyanin. Accordingly, an NMR suitable α -C-phycoyanin sample had to be prepared. With these experiments the complete protonation of the chromophore in both photoisomers had been proven.

In [¹³C]-HMQC spectra using deuterated protein + [¹³C]-PCB the chromophore methyl groups but not the methine bridges could be detected. After recording additional 2D-NOESY and [¹³C]-edited 3D-HMQC-NOESY spectra it was, however, possible to assign resonances and to extract

relative distance information to determine the overall conformation of the chromophore in the binding pocket to be *ZZZssa* in P_r and *ZZEssa* in P_{fr} . The P_r conformation is consistent with those determined for the PCB-chromophore in the recently published 3D crystal structure of the same protein (PDB-code: 2vea). For the P_{fr} -form of an intact phytochrome no comparable information was available by that time.

The recording of all spectra was influenced by the specific dynamics of the chromophore in the binding pocket. It arises on one hand from an exchange of acidic protons in the molecule with protons from the surrounding solvent, on the other hand from the existence of certain conformational substates (inside one defined *s*- or *a*-conformation). Both exchange phenomena led to strong broadening of all signals. Actually, for the methine bridge between rings A and B two sets of signals could be detected in the P_{fr} -form.

It can be deduced that the chromophore in Cph1 is positioned in a weaker hydrogen bonding network compared to the chromophore in α -C-phycoerythrin. It is thus more flexible and its pyrrole protons are solvent exposed. The flexibility within the chromophore itself is reduced from the D-ring to the A-ring, though.

These results and those from further experiments allow the conclusion that the rotation of ring D after detection of the light signal does not directly affect structural changes in the protein but rather leads to a rearrangement of the hydrogen bonding pattern in the surrounding protein binding pocket. Together with a proton translocation process this altered H-bonding network can provoke an overall structural change in the protein that promotes signal transduction.

10. Literatur

Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366, 162-166.

Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O. & Cashmore, A. R. (1998) The CRY1 blue light photoreceptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A. *Mol. Cell* 1, 939-948.

Andel, F. 3., Lagarias, J. C. & Mathies, R. A. (1996) Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. *Biochemistry* 35, 15997-16008.

Andel, F. 3., Murphy, J. T., Haas, J. A., McDowell, M. T., van der Hoef, I., Lugtenburg, J., Lagarias, J. C. & Mathies, R. A. (2000) Probing the photoreaction mechanism of phytochrome through analysis of resonance Raman vibrational spectra of recombinant analogues. *Biochemistry* 39, 2667-2676.

Apt, K. E., Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1995) Evolution of the phycobiliproteins. *J. Mol. Biol.* 248, 79-96.

Bald, D., Kruij, J. & Rögner, M. (1996) Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystem? *Photosynth. Res.* 49, 103-118.

Benvenuto, G., Formiggini, F., Laflamme, P., Malakhov, M. & Bowler, C. (2002) The photomorphogenesis regulator DET1 binds the amino-terminal tail of histone H2B in a nucleosome context. *Curr. Biol.* 12, 1529-1534.

Berzelius, J. J. (1808) *Forelasningar Djurkemine* 2, 243.

Bhoo, S. H., Davis, S. J., Walker, J., Karniol, B. & Vierstra, R. D. (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature* 414, 776-779.

Bhoo, S. H., Hirano, T., Jeong, H.-Y., Lee, J.-G., Furuya, M. & Song, P. S. (1997) Phytochrome photochromism probed by site-directed mutations and chromophore esterification. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 11717-11718.

- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H. & Toole, V. K. (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38, 662-666.
- Borucki, B., von Stetten, D., Seibeck, S., Lamparter, T., Michael, N., Mroginski, M. A., Otto, H., Murgida, D. H., Heyn, M. P. & Hildebrandt, P. (2005) Light-induced proton release of phytochrome is coupled to the transient deprotonation of the tetrapyrrole chromophore. *J. Biol. Chem.* 280, 34358-34364.
- Botto, J. F., Sanchez, R. A., Whitelam, G. C. & Casal, J. J. (1996) Phytochrome A mediates the promotion of seed germination by very low fluences of light and canopy shade light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 110, 439-444.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H. & Chua, N.-H. (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* 77, 73-81.
- Brandlmeier, T., Scheer, H. & Rüdiger, W. (1981) Chromophore content and molar absorptivity of phytochrome in the P_r-form. *Z. Naturforsch.* 36, 431-439.
- Brejc, K., Ficner, R., Huber, R. & Steinbacher, S. (1995) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 249, 424-440.
- Briggs, W. R., Beck, C. F., Cashmore, A. R., Christie, J. M., Hughes, J., Jarillo, J. A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Rüdiger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M. & Watson, J. C. (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13, 993-997.
- Bryant, D. A. ed. (1994) *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. & Hendricks, S. B. (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 45, 1703-1708.

- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. & Liu, D. (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284, 760-765.
- Castenholz, R. W. (1988) Culturing methods for cyanobacteria. *Methods Enzymol.* 167, 68-93.
- Chen, M., Schwab, R. & Chory, J. (2003) Characterization of the requirements for localization of phytochrome B to nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14493-14498.
- Cherry, J. R., Hondred, D., Walker, J. M., Keller, J. M., Hershey, H. P. & Vierstra, R. D. (1993) Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell* 5, 565-575.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 8779-8783.
- Clack, T., Mathews, S. & Sharrock, R. A. (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* 25, 413-427.
- Cole, W. J., Chapman, D. J. & Siegelman, H. W. (1967) The structure of phycocyanobilin. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3642-3645.
- Davis, S. J., Vener, A. V. & Vierstra, R. D. (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286, 2517-2520.
- Deforce, L., Furuya, M. & Song, P. S. (1993) Mutational analysis of the pea phytochrome A chromophore pocket: chromophore assembly with apophytochrome A and photoreversibility. *Biochemistry* 32, 14165-14172.
- Ducret, A., Muller, S. A., Goldie, K. N., Hefti, A., Sidler, W., Zuber, H. & Engel, A. (1998) Reconstitution, characterization and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabena* sp. PCC7120. *J. Mol. Biol.* 278, 369-388.
- Ducret, A., Sidler, W., Wehrli, E., Frank, G. & Zuber, H. (1996) Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidisoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabena* sp. PCC7120. *Eur. J. Biochem.* 236, 1010-1024.

- Düring, M., Huber, R., Bode, W., Rübeler, R. & Zuber, H. (1990) Refined three-dimensional structure of phycoerythrocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* at 2.7Å. *J. Mol. Biol.* 211, 633-644.
- Düring, M., Schmidt, G. B. & Huber, R. (1991) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoerythrin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66Å resolution. *J. Mol. Biol.* 217, 577-592.
- Engelmann, T. W. (1883) Farbe und Assimilation. *Bot. Z.* 41, 1-29.
- Engelmann, T. W. (1902) Untersuchungen über die qualitativen Beziehungen zwischen Absorption des Lichtes und Assimilation in Pflanzenzellen. *Bot. Z.* 42, 81-105.
- Essen, L. O., Mailliet, J. & Hughes, J. (2008) The structure of a complete phytochrome sensory module in the P_r ground state. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 105, 14709-14714.
- Esteban, B., Carrascal, M., Abian, J. & Lamparter, T. (2005) Light-induced conformational changes of cyanobacterial phytochrome Cph1 probed by limited proteolysis and autophosphorylation. *Biochemistry* 44, 450-461.
- Falk, H. (1989) The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments. Springer-Verlag, Wien.
- Falk, H. & Müller, N. (1985) On the chemistry of pyrrole pigments. *Magn. Reson. Chem.* 23, 353-357.
- Fankhauser, C. (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 276, 11453-11456.
- Fankhauser, C., Yeh, K. C., Lagarias, J. C., Zhang, H., Elich, T. D. & Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* 284, 1539-1541.
- Ficner, R. & Huber, R. (1993) Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23 nm resolution and localization of the γ -subunit. *Eur. J. Biochem.* 218, 103-106.

- Ficner, R., Lobeck, K., Schmidt, G. & Huber, R. (1992) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 228, 935-950.
- Fiedler, B., Broc, D., Schubert, H., Rediger, A., Börner, T. & Wilde, A. (2004) Involvement of cyanobacterial phytochromes in growth under different light qualities and quantities. *Photochem. Photobiol.* 79, 551-555.
- Fiedler, S., Knocke, C., Vogt, J., Oschkinat, H. & Diehl, A. (2007) HCDF as a protein-labeling methodology. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 27, 11-14.
- Fischer, A. J. & Lagarias, J. C. (2004) Harnessing phytochrome's glowing potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17334-17339.
- Fischer, H. & Plieninger, H. (1942) Synthese des Biliverdins (Uteroverdins) und Bilirubins, der Biliverdine XIII α und III α , sowie der Vinylneoxanthosäure. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 274, 231.
- Fodor, S. P., Lagarias, J. C. & Mathies, R. A. (1990) Resonance Raman analysis of the Pr and Pfr forms of phytochrome. *Biochemistry* 29, 11141-11146.
- Foerstendorf, H., Benda, C., Gärtner, W., Storf, M., Scheer, H. & Siebert, F. (2001) FTIR studies of phytochrome photoreactions reveal the C=O bands of the chromophore: consequences for its protonation states, conformation, and protein interaction. *Biochemistry* 40, 14959.
- Foerstendorf, H., Lamparter, T., Hughes, J., Gartner, W. & Siebert, F. (2000) The photoreactions of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*: a low-temperature UV-Vis and FT-IR spectroscopic study. *Photochem. Photobiol.* 71, 655-661.
- Foerstendorf, H., Mummert, E., Schäfer, E., Scheer, H. & Siebert, F. (1996) Fourier-transform infrared spectroscopy of phytochrome: difference spectra of the intermediates of the photoreactions. *Biochemistry* 35, 10793-10799.
- Förster, T. (1967) Mechanism of energy transfer. *Comprehensive Biochem.* 22, 61-80.

- Franklin, K. A. & Whitelam, G. C. (2004) Light signals, phytochromes and cross-talk with other environmental cues. *J. Exp. Bot.* 55, 271-276.
- Füglister, P., Widmer, H., Sidler, W., Frank, G. & Zuber, H. (1981) Isolation and characterization of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Arch. Microbiol.* 129, 268-274.
- Gambetta, G. A. & Lagarias, J. C. (2001) Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10566-1571.
- Gantt, E. (1975) Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. *BioScience* 25, 781-788.
- Gantt, E. (1980) Structure and functions of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *Int. Rev. Cyt.* 66, 45-80.
- Gantt, E. & Conti, E. (1966a) Granule associate with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* 29, 423-434.
- Gantt, E. & Conti, E. (1966b) Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symp. Biol.* 19, 393-405.
- Gantt, E. & Conti, S. F. (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* 26, 365-381.
- Garcia-Dominguez, M., Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C. & Florencio, F. J. (2000) Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J. Bacteriol.* 182, 38-44.
- Gest, H. & Blankenship, R. E. (2004) Time line of discoveries: anoxygenic bacterial photosynthesis. *Photosynth. Res.* 80, 59-70.
- Giraud, E., Fardoux, J., Fourrier, N., Hannibal, L., Genty, B., Bouyer, P., Dreyfus, B. & Verméglio, A. (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* 417, 202-205.
- Glazer, A. N. (1988) Phycobiliproteins. *Methods Enzymol.* 167, 291-303.

Glazer, A. N. (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264, 1-4.

Glazer, A. N. & Cohen-Bazire, G. (1971) Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 1398-1401.

Glazer, A. N. & Fang, S. (1973) Chromophore content of blue-green algae phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* 248, 659-662.

Glazer, A. N. & Hixson, C. S. (1975) Characterization of R-phycoyanin. Chromophore content of R-phycoyanin and C-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 250, 5487-5495.

Goddard, T. D. and Kneller, D. G. (1989) Sparky 3, University of California, San Francisco, CA, USA.

Gossauer, H. & Hirsch, W. (1974) Bile pigments. IV. Total synthesis of racemic phycocyanobilin (phycobiliverdin) and of homophycobiliverdin. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 9, 1496-1513.

Govindjee & Krogmann, D. (2004) Discoveries in oxygenic photosynthesis (127-2003): a perspective. *Photosynth. Res.* 80, 15-57.

Grubmayr, K. & Stanek, M. (1998) Deprotonated 2,3-dihydrobilindiones - models for the chromophores of the far-red-absorbing form of phytochrome. *Chem. Eur. J.* 4, 1660-1666.

Guo, H., Mockler, T., Duong, H. & Lin, C. (2001) SUB1, an *Arabidopsis* Ca²⁺-binding protein involved in cryptochrome and phytochrome coaction. *Science* 291, 487-490.

Hahn, J., Kühne, R. & Schmieder, P. (2007) Solution-state ¹⁵N NMR spectroscopic study of α -C-phycoyanin: Implications for the structure of the chromophore-binding pocket of the cyanobacterial phytochrome Cph1. *ChemBioChem* 8, 2249-2255.

Hahn, J., Strauss, H. M., Landgraf, F. T., Gimenez, H. F., Lochnit, G., Schmieder, P. & Hughes, J. (2006) Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis. *FEBS J.* 273, 1415-1429.

Hahn, J., Strauss, H. M. & Schmieder, P. (2008) Heteronuclear NMR investigation on the structure and dynamics of the chromophore binding pocket of the cyanobacterial phytochrome Cph1. *J. Am. Chem Soc.* 130, 11170-11178.

Hanzawa, H., Inomata, K., Kinoshita, H., Kakiuchi, T., Jayasundera, K. P., Sawamoto, D., Ohta, H., Uchida, K., Wada, K. & Furuya, M. (2001) *In vitro* assembly of phytochrome B apoprotein with synthetic analogs of the phytochrome chromophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3612-3617.

Hardtke, C. S. & Deng, X.-W. (2000) The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond? *Plant Physiol.* 124, 1548-1557.

Hellmann, H. & Estelle, M. (2002) Plant development: regulation by protein degradation. *Science* 297, 793-797.

Hershey, H. P., Barker, R. F., Idler, K. B., Lissemore, J. L. & Quail, P. H. (1985) Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: complete amino acid sequences for two gene products expressed in etiolated *Avena*. *Nucleic Acids Res.* 13, 8543-8559.

Hershey, H. P., Barker, R. F., Idler, K. B., Murray, M. G. & Quail, P. H. (1987) Nucleotide sequence and characterization of a gene encoding the phytochrome polypeptide from *Avena*. *Gene* 61, 339-348.

Hershey, H. P., Colbert, J. T., Lissemore, J. L., Barker, R. F. & Quail, P. H. (1984) Molecular cloning of cDNA for *Avena* phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2332-2336.

Hübschmann, T., Börner, T., Hartmann, E. & Lamparter, T. (2001) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Eur. J. Biochem.* 268, 2055-2063.

Hübschmann, T., Yamamoto, H., Gieler, T., Murata, N. & Börner, T. (2005) Red and far-red light alter the transcript profile in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803: Impact of cyanobacterial phytochromes. *FEBS Lett.* 579, 1613-1618.

Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A. & Börner, T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* 386, 663.

- Inomata, K., Hammam, M. A., Kinoshita, H., Murata, Y., Khawn, H., Noack, S., Michael, N. & Lamparter, T. (2005) Sterically locked synthetic bilin derivatives and phytochrome Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens* form photoinsensitive Pr- and Pfr-like adducts. *J Biol Chem* 280, 24491-24497.
- Jenkins, G. I. (1997) UV and blue light signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 20, 773-778.
- Jordan, B. R. (1995) The effects of ultraviolet-B radiation on plants: A molecular perspective. *Adv. Bot. Res.* 22, 97-162.
- Jorissen, H. J., Quest, B., Remberg, A., Coursin, T., Braslavsky, S., Schaffner, K., Tandeau de Marsac, N. & Gärtner, W. (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.* 269, 2662-2671.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. & Taba, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3, 109-136.
- Karniol, B. & Vierstra, R. D. (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2807-2812.
- Karniol, B., Wagner, J. R., Walker, J. M. & Vierstra, R. D. (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Biochem. J.* 392, 103-116.
- Kehoe, D. M. & Grossman, R. (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273, 1409-1412.
- Kendrick, R. E. & Kronenberg, G. H. M. (1994) *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer, Dordrecht.

Kim, B. C., Tennessen, D. J. & Last, R. L. (1998) UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 15, 667-674.

Klein, G., Grombein, S. & Rüdiger, W. (1977) On the linkages between chromophore and protein in biliproteins, VI. Structure and protein linkage of the phytochrome chromophore. *Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem.* 358, 1077-1079.

Kneip, C., Hildebrandt, P., Schlamann, W., Braslavsky, S. E., Mark, F. & Schaffner, K. (1999) Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the Pr --> Pfr phototransformation of phytochrome: a resonance Raman spectroscopic study. *Biochemistry* 38, 15185-15192.

Köst-Reyes, E., Schneider, S., John, W., Fischer, R., Scheer, H. & Köst, H. P. (1987) Fast preparative isoelectric focusing of phycocyanin subunits in layers of granulated gels. *Electrophoresis* 8, 335-336.

Krauss, G. (2001) Signal transduction via the two-component pathway. In *Biochemistry of signal transduction and regulation* pp 377-384, Wiley-VCH, Weinheim.

Kupka, M. (2006) Statische und kinetische Untersuchungen zur Entfaltung von Phycocyanin aus *Mastigocladus laminosus*, Thesis/Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lagarias, J. C. & Lagarias, D. M. (1989) Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5778-5780.

Lagarias, J. C. & Rapoport, H. (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4821-4828.

Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G. & Abian, J. (2004) The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry* 43, 3659-3669.

- Lamparter, T., Esteban, B. & Hughes, J. (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur. J. Biochem.* 268, 4720-4730.
- Lamparter, T., Michael, N., Caspani, O., Miyata, T., Shirai, K. & Inomata, K. (2003) Biliverdin binds covalently to *Agrobacterium* phytochrome Agp1 via its ring A vinyl side-chain. *J. Biol. Chem.* 278, 33786-33792.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F. & Esteban, B. (2002) Assembly and spectral properties of phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11628-11633.
- Lamparter, T., Mittmann, F., Gärtner, W., Börner, T., Hartmann, E. & Hughes, J. (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11792-11797.
- Landgraf, F. T., Forreiter, C., Hurtado Picó, A., Lamparter, T. & Hughes, J. (2001) Recombinant holophytochrome in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 508, 459-462.
- Li, L. & Lagarias, J. C. (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J. Biol. Chem.* 267, 19204-19210.
- MacColl, R. (1998) Cyanobacterial phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* 124, 311-334.
- Más, P., Devlin, P. F., Panda, S. & Kay, S. A. (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408, 207-211.
- Mathews, S. (2006) Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol. Ecol.* 15, 3483-3503.
- Mizutani, Y., Tokutomi, S., Aoyagi, K., Horitsu, K. & Kitagawa, T. (1991) Resonance Raman study on intact pea phytochrome and its model compounds: evidence for proton migration during the phototransformation. *Biochemistry* 30, 10693-10700.
- Mizutani, Y., Tokutomi, S. & Kitagawa, T. (1994) Resonance Raman spectra of the intermediates in phototransformation of large phytochrome: deprotonation of the chromophore in the bleached intermediate. *Biochemistry* 33, 153-158.

- Montgomery, B. L. & Lagarias, J. C. (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* 7, 357-366.
- Mörschel, E., Koller, K. P., Wehrmeyer, W. & Schneider, H. (1977) Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*: I. Electron microscopy of phycobilisomes in situ and analysis of their architecture after isolation and negative staining. *Eur. J. Cell Biol.* 18, 118-129.
- Mroginski, M. A., Murgida, D. H., von Stetten, D., Kneip, C., Mark, F. & Hildebrandt, P. (2004) Determination of the chromophore structures in the photoinduced reaction cycle of phytochrome. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 16734-16735.
- Nagy, F. & Schäfer, E. (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 329-355.
- Ni, M., Tepperman, J. M. & Quail, P. H. (1999) Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light. *Nature* 400, 781-784.
- Nies, M. & Wehrmeyer, W. (1980) Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. *Planta* 150, 330-337.
- Noack, S. (2007) Biochemical investigations with the procaryotic phytochrome Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens*, Thesis/Dissertation, Freie Universität Berlin
- Okamoto, H., Matsui, M. & Deng, X.-W. (2001) Overexpression of the heterotrimeric G-protein α -subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13, 1639-1651.
- Osterlund, M. T., Hardtke, C. S., Wei, N. & Deng, X.-W. (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405, 462-466.
- Park, C. M., Shim, J. Y., Yang, S. S., Kang, J. G., Kim, J. I., Luka, Z. & Song, P. S. (2000) Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC6803 phytochrome cph1. *Biochemistry* 39, 6349-6356.

- Patzelt, H., Simon, B., terLaak, A., Kessler, B., Kühne, R., Schmieder, P., Oesterhelt, D. & Oschkinat, H. (2002) The structure of the active center in dark-adapted bacteriorhodopsin by solution-state NMR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9765-9770.
- Quail, P. H. (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20, 665.
- Quail, P. H. (1998) The phytochrome family: dissection of functional roles and signalling pathways among family members. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 1399-1403.
- Quail, P. H. (2002a) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 180-188.
- Quail, P. H. (2002b) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 85-93.
- Remberg, A., Ruddat, A., Braslavsky, S. E., Gärtner, W. & Schaffner, K. (1998) Chromophore Incorporation, Pr to Pfr Kinetics, and Pfr Thermal Reversion of Recombinant N-Terminal Fragments of Phytochrome A and B Chromoproteins. *Biochemistry* 37, 9983-9990.
- Remberg, A., Schmidt, P., Braslavsky, S. E., Gärtner, W. & Schaffner, K. (1999) Differential effects of mutations in the chromophore pocket of recombinant phytochrome on chromoprotein assembly and Pr-to-Pfr photoconversion. *Eur. J. Biochem.* 266, 201-208.
- Reuter, W. (1989) Spektrale, strukturelle und biochemische Charakterisierung des Phycobilisomenzentrums und einiger Konstituenten der Phycobilisomenperipherie von *Mastigocladus laminosus* unter Berücksichtigung der Funktion., Thesis/Dissertation, Philipps-Universität, Marburg/Lahn
- Reuter, W., Wiegand, G., Huber, R. & Manuel, E. (1999) Structural analysis at 2.2 Å of orthorhombic crystals presents the asymmetry of the allophycocyanin-linker complex, AP-Lc7.8, from phycobilisomes of *Mastigocladus laminosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1363-1368.
- Reymond, P., Short, T. W., Briggs, W. R. & Poff, K. L. (1992) Light-induced phosphorylation of a membrane protein plays an early role in signal transduction for phototropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4718-4721.

- Rockwell, N. C., Su, Y. S. & Lagarias, J. C. (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 837-858.
- Rohmer, T., Strauss, H. M., Hughes, J., de Groot, H., Gärtner, W., Schmieder, P. & Matysik, J. (2006) ^{15}N MAS NMR studies of Cph1 phytochrome: Chromophore dynamics and intramolecular signal transduction. *J. Phys. Chem. B* 110, 20580-20585.
- Rüdiger, W. (1994) Phycobiliproteins and phycobilins. In *Progress in phycological research 10* (Round, F. E. and Chapman, D. J., Eds.) pp 97-135, Biopress, Bristol, UK.
- Rüdiger, W. & Correll, D. L. (1969) Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Proteinbindung. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 723, 208-212.
- Rüdiger, W. & Thümmeler, F. (1994) The phytochrome chromophore. In *Photomorphogenesis in plants* (Kendrick, R. E. and Kronenberg, G. H. M., Eds.) pp 51-69, Kluwer, Dordrecht.
- Rüdiger, W., Thümmeler, F., Cmiel, E. & Schneider, S. (1983) Chromophore structure of the physiologically active form (Pfr) of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 6244-6248.
- Schäfer, E. & Bowler, C. (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO reports* 3, 1042-1048.
- Scheer, H. (1981) Biliproteine. *Angew. Chem.* 93, 230-250.
- Scheer, H. (1982) Phycobiliproteins: Molecular aspects of photosynthetic antenna systems. In *Light reaction path of photosynthesis* (Fong, F. K., Ed.) pp 7-45, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Scheer, H. (1986) Excitation transfer in phycobiliproteins. In *Photosynthesis III. Encyclopedia of plant physiology* (Staelin, L. A. and Arntzen, C. J., Eds.) pp 327-337, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Schirmer, T., Bode, W. & Huber, R. (1987) Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycoyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principle of phycobilin-protein interaction. *J. Mol. Biol.* 196, 677-695.

Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. & Zuber, H. (1985) X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structures. *J. Mol. Biol.* 184, 257-277.

Schmidt, G., Siebzehnrübl, S., Fischer, R., Rüdiger, W., Scheer, H., Schirmer, T., Bode, W. & Huber, R. (1987) ZZE-configuration of chromophore β -153 in C-phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*. *Z. Naturforsch.* 42, 845-848.

Schneider-Poetsch, H. A. W. (1992) Signal transduction by phytochrome: phytochromes have a module related to the transmitter modules of bacterial sensor proteins. *Photochem. Photobiol.* 56, 839-846.

Schneider-Poetsch, H. A. W., Braun, B., Marx, S. & Schaumburg, A. (1991) Phytochromes and bacterial sensor proteins are related by structural and functional homologies. Hypothesis on phytochrome-mediated signal-transduction. *FEBS* 281, 245-249.

Schroeder, D. F., Gahrtz, M., Maxwell, B. B., Cook, R. K., Kan, J. M., Alonso, J. M., Ecker, J. R. & Chory, J. (2002) De-etiolated1 (DET1) and damaged DNA binding protein1 (DDB1) interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Curr. Biol.* 12, 1462-1472.

Shacklock, P. S., Read, N. D. & Trewavas, A. J. (1992) Cytosolic free calcium mediates red light-induced photomorphogenesis. *Nature* 358, 753-755.

Sharrock, R. A. & Clack, T. (2002) Patterns of expression and normalized levels of the five *Arabidopsis* phytochromes. *Plant Physiol.* 130, 442-456.

Sharrock, R. A. & Quail, P. H. (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3, 1745-1757.

Sidler, W. (1994) Phycobilisomes and phycobiliprotein structures. In *Advances in photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria* (Bryant, D. A., Ed.) pp 139-216, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

Siebert, F., Grimm, R., Rüdiger, W., Schmidt, G. & Scheer, H. (1990) Infrared spectroscopy of phytochrome and model pigments. *Eur. J. Biochem.* 194, 921-928.

Sineshchekov, V. A. (1995) Photobiophysics and photobiochemistry of the heterogeneous phytochrome system. *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 125-164.

Sineshchekov, V. A., Hughes, J., Hartmann, E. & Lamparter, T. (1998a) Fluorescence and photochemistry of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Photochem. Photobiol.* 67, 263-267.

Sineshchekov, V. A., Ogorodnikova, O. B., Devlin, P. F. & Whitelam, G. C. (1998b) Fluorescence spectroscopy and photochemistry of phytochromes A and B in wild-type, mutant and transgenic strains of *Arabidopsis thaliana*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 42, 133-142.

Singh, A. K., McIntyre, L. M. & Sherman, L. A. (2003) Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Plant Physiol.* 132, 1825-1839.

Sklenar, V. & Bax, A. (1987) Spin-echo water suppression for the generation of pure-phase two-dimensional NMR-spectra. *J. Magn. Reson.* 74, 469-479.

Spudich, J. L., Yang, C. S., Jung, K. H. & Spudich, E. N. (2000) Retinylidene proteins: structures and functions from Archaea to humans. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 365-392.

Strauss, H. M. (2006) Struktur-Funktions-Untersuchungen an cyanobakteriellem Phytochrom Cph1, Thesis/Dissertation, Freie Universität Berlin

Strauss, H. M., Hughes, J. & Schmieder, P. (2005a) Heteronuclear solution-state NMR studies of the chromophore in cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* 44, 8244-8250.

Strauss, H. M., Schmieder, P. & Hughes, J. (2005b) Light-dependent dimerisation in the N-terminal sensory module of cyanobacterial phytochrome 1 (Cph1 Δ 2). *FEBS Lett* 579, 3970-3974.

Suter, G. W. & Holzwarth, A. R. (1987) A kinetic model for the energy transfer in phycobilisomes. *Biophys. J.* 52, 673-683.

Sweere, U., Eichenberg, K., Lohrmann, J., Mira-Rodado, V., Bäurle, I., Kudla, J., Nagy, F., Schäfer, E. & Harter, K. (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signalling. *Science* 294, 1108-1111.

Tasler, R., Mioises, T. & Frankenberg-Dinkel, N. (2005) Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 272, 1927-1936.

Tevini, M. & Teramura, A. H. (1989) UV-B effects on terrestrial plants. *Photochem. Photobiol.* 50, 479-487.

Thenard, L. J. (1807) *Mem. Phys. Chim. Arch.* 23.

Thümmler, F. & Rüdiger, W. (1983) Models for the photoreversibility of phytochrome. Z,E isomerisation of chromopeptides from phycocyanin and phytochrome. *Tetrahedron* 39, 1943-1951.

Thümmler, F., Rüdiger, W., Cmiel, E. & Schneider, S. (1983) Chromopeptides from phytochrome and phycocyanin. NMR studies of the Pfr and Pr chromophore of phytochrome and E, Z isomeric chromophores of phycocyanin. *Z. Naturforsch.* 38c, 359-368.

Tooley, A. J., Cai, Y. A. & Glazer, A. N. (2001) Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycoyanin holo-alpha subunit in a heterologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10560-10565.

Tugarinov, V., Hwang, P. M., Ollerenshaw, J. E. & Kay, L. E. (2003) Cross-correlated relaxation enhanced ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy of methyl groups in very high molecular weight proteins and protein complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 10420-10428.

Ulijasz, A. T., Cornilescu, G., von Stetten, D., Kaminski, S., Mroginski, M. A., Zhang, J., Bhaya, D., Hildebrandt, P. & Vierstra, R. D. (2008) Characterization of Two Thermostable Cyanobacterial Phytochromes Reveals Global Movements in the Chromophore-binding Domain during Photoconversion. *J. Biol. Chem.* 283, 21251-21266.

van Thor, J. J., Borucki, B., Crieleard, W., Otto, H., Lamparter, T., Hughes, J., Hellingwerf, K. J. & Heyn, M. P. (2001) Light-induced proton release and proton uptake reactions in the cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* 40, 11460-11471.

van Thor, J. J., Mackeen, M., Kuprov, E., Dwek, R. A. & Wormald, M. R. (2006) Chromophore structure in the photocycle of the cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biophys. J.* 91, 1811-1822.

Vierstra, R. & Quail, P. H. (1982) Native phytochrome: inhibition of proteolysis yields a homogeneous monomer of 124 kilodaltons from *Avena*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 5272-5276.

von Stetten, D., Gunther, M., Scheerer, P., Murgida, D. H., Mroginski, M. A., Krauss, N., Lamparter, T., Zhang, J., Anstrom, D. M., Vierstra, R. D., Forest, K. T. & Hildebrandt, P. (2008) Chromophore heterogeneity and photoconversion in phytochrome crystals and solution studied by resonance Raman spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 4753-4755.

von Stetten, D., Seibeck, S., Michael, N., Scheerer, P., Mroginski, M. A., Murgida, D. H., Krauss, N., Heyn, M. P., Hildebrandt, P., Borucki, B. & Lamparter, T. (2007) Highly conserved residues Asp-197 and His-250 in Agp1 phytochrome control the proton affinity of the chromophore and Pfr formation. *J. Biol. Chem.* 282, 2116-2123.

Wagner, D., Fairchild, C. D., Kuhn, R. M. & Quail, P. H. (1996) Chromophore-bearing NH₂-terminal domains of phytochromes A and B determine their photosensory specificity and differential light lability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4011-4015.

Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T. & Vierstra, R. D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore binding domain of phytochrome. *Nature* 438, 325-331.

Wagner, J. R., Zhang, J., Brunzelle, J. S., Vierstra, R. D. & Forest, K. T. (2007) High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J. Biol. Chem.* 282, 12298-12309.

Wiegand, G., Parbel, A., Seifert, M. H. J., Holak, T. A. & Reuter, W. (2002) Purification, crystallization, NMR spectroscopy and biochemical analyses of α -phycoerythrocyanin peptides. *Eur. J. Biochem.* 269, 5046-5055.

Wilde, A., Churin, Y., Schubert, H. & Börner, T. (1997) Disruption of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 gene with partial similarity to phytochrome genes alters growth under changing light qualities. *FEBS Lett.* **406**, 89-92.

Wilde, A., Fiedler, B. & Börner, T. (2002) The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol. Microbiol.* **44**, 981-988.

Witt, H. T. (2004) Steps on the way to building blocks, topologies, crystals and X-ray structural analysis of photosystems I and II of water-oxidizing photosynthesis. *Photosynth. Res.* **80**, 85-107.

Wu, S.-H. & Lagarias, J. C. (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry* **39**, 13487-13495.

Wu, S. H., McDowell, M. T. & Lagarias, J. C. (1997) Phycocyanobilin is the natural precursor of the phytochrome chromophore in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *J. Biol. Chem.* **272**, 25700-25705.

Yang, X., Kuk, J. & Moffat, K. (2008) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: Photoconversion and signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14715-14720.

Yanovsky, M. J. & Kay, S. A. (2003) Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 265-275.

Yeh, K. C. & Lagarias, J. C. (1998) Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13976-13981.

Yeh, K. C., Wu, S. H., Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* **277**, 1505-1508.

Young, J. I., Rho, S. H., Park, C. M., Yang, S. S., Kang, J. G., Lee, J. Y., Song, P. S. & Eom, S. H. (2002) Crystal structure of a cyanobacterial phytochrome response regulator. *Protein Sci.* **11**, 614-624.

11. Abbildungen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Photosynthese-Apparates aus Cyanobakterien (Bryant, 1994).	13
Abbildung 2: Strukturen freier Biline.	15
Abbildung 3: Domänenstruktur von Phytochromen verschiedener Organismen (nach Rockwell <i>et al.</i> , 2006).	22
Abbildung 4: Modell der Phytochrom-Signaltransduktion (Schäfer & Bowler, 2002).	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Photozyklus von Cph1, dazugehörige UV/vis- Spektren der P _r - und P _{fr} -Form sowie das entsprechende (P _r -P _{fr})-Differenzspektrum.	27
Abbildung 6: Dreidimensionale Struktur von DrBphP aus <i>Deinococcus radiodurans</i> und Cph1Δ2 aus <i>Synechocystis sp.</i> PCC6803.	35
Abbildung 7: Markierungsstrategien und mögliche Experimente zur Lösung der Struktur der Bindetasche von Cph1Δ2 mittels NMR-Spektroskopie.	39
Abbildung 8: Aufreinigung von [² H]-Cph1Δ2 + [¹ H]-PCB.	56
Abbildung 9: Isolierung der einzelnen Biliproteine aus den Phycobilisomen von <i>Mastigocladus laminosus</i> mittels Ionenaustauschchromatographie.	58
Abbildung 10: Aufreinigung von [¹⁵ N]-α-C-Phycocyanin.	59
Abbildung 11: MALDI-Analyse des präparierten [¹⁵ N]-α-C-Phycocyanin.	60
Abbildung 12: Struktur der Chromophor-Bindetasche von α-C-Phycocyanin.	62
Abbildung 13: [¹⁵ N]-HMQC-Spektrum von α-C-Phycocyanin.	63
Abbildung 14: Zuordnung der Signale der vier Stickstoff-gebundenen Protonen des PCB- Chromophors in α-C-Phycocyanin.	64
Abbildung 15: [¹⁵ N]-HMQC-Spektren von [² H]-Cph1Δ2 + [¹⁵ N]-PCB in der P _r -Form und der P _{fr} -Form.	65
Abbildung 16: 1D-[¹⁵ N]-Spektren von α-C-Phycocyanin aus <i>Mastigocladus laminosus</i> und Cph1Δ2.	66
Abbildung 17: Modellsubstanzen für die Zuordnung der [¹⁵ N]-chemischen Verschiebungen des PCB-Chromophors in Cph1Δ2.	68
Abbildung 18: [¹³ C]-HMQC-Spektren von [² H]-Cph1Δ2 + [¹³ C]-PCB in der P _r -Form und der P _{fr} -Form.	72
Abbildung 19: 2D-NOESY-Spektrum von [² H]-Cph1Δ2 + [¹ H]-PCB in der P _r -Form.	73
Abbildung 20: 2D-NOESY-Spektren von [² H]-Cph1Δ2 + [¹ H]-PCB (Bereich der Methin- Protonen) in der P _r -Form und der P _{fr} -Form.	74

-
- Abbildung 21:** 1D-Schnitte aus den NOESY-Spektren in Abbildung 20 zur Bestimmung der Linienbreiten der Signale der Methin-Protonen. **75**
- Abbildung 22:** Mögliche Konformationen und Schnitte aus 3D-HMQC-NOESY-Spektren von [²H]-Cph1Δ2 + [¹³C]-PCB zur Bestimmung der Stereochemie an C5 des PCB-Chromophors. **77**
- Abbildung 23:** Mögliche Konformationen und Schnitte aus 3D-HMQC-NOESY-Spektren von [²H]-Cph1Δ2 + [¹³C]-PCB zur Bestimmung der Stereochemie an C15 des PCB-Chromophors. **77**
- Abbildung 24:** Modell der Bindetasche von Cph1. **79**
- Abbildung 25:** Stereoansicht der Bindetasche von DrBphP aus *Deinococcus radiodurans*. **80**
- Abbildung 26:** Reverse Markierung. **81**

12. Tabellen

Tabelle 1: M9-Minimalmedium-Komponenten und Antibiotika für die Expression von $[^2\text{H}]_2\text{O}$ -Cph1 Δ 2.	42
Tabelle 2: Puffer für die Aufreinigung von Cph1 Δ 2.	45
Tabelle 3: Castenholz-Medium zur Kultivierung von <i>Mastigocladus laminosus</i> .	50
Tabelle 4: Parameter der einzelnen NMR-Messungen.	54
Tabelle 5: Phenylalanin und Tyrosin in der Bindetasche von DrBphP aus <i>Deinococcus radiodurans</i> sowie die Besetzung der homologen Position in Cph1 Δ 2.	80

13. Abkürzungen

2D/3D	zwei-/dreidimensional
AA	<i>amino acid</i>
Agp	Phytochrom aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AmS	Ammoniumsulfat
APC	Allophycocyanin
BphP	<i>bacterial phytochrome photoreceptor</i> , bakterielles Phytochrom
BV	Biliverdin
CD	<i>circular dichroism</i> , Circulardichroismus
CHES	N-cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
Cph	cyanobakterielles Phytochrom
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
Fph	<i>fungal phytochrom</i> , Pilzphytochrom
FR	<i>farred</i> , dunkelrot, 700-750 nm
FT-IR	<i>Fourier transform infra-red</i>
FT-RR	<i>Fourier-transform Resonance Raman</i>
HZDF	Hochzelldichtefermentation
HIR	<i>high irradiance response</i>
HMQC	<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>
HO	Hämoxygenase
HSQC	<i>heteronuclear single quantum coherence</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LED	<i>light emitting diode</i>
LFR	<i>low fluence response</i>
LHC	<i>light harvesting complex</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
Ni-NTA	Ni-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

NOE	<i>Nuclear Overhauser effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
OD	optische Dichte
PBS	Phycobilisom
PΦB	Phytochromobilin
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
PCC	<i>Pasteur culture collection</i>
PcyA	PCB-Ferredoxin-Oxidoreduktase
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEC	Phycoerythrocyanin
Phy	Phytochrom
P _{fr}	<i>phytochrome farred absorbing</i> , dunkelrot-absorbierendes Phytochrom
ppm	<i>parts per million</i>
P _r	<i>phytochrome red absorbing</i> , rot-absorbierendes Phytochrom
R	<i>red</i> , rot, 650-700 nm
Rcp	<i>response regulator für cyanobacterial phytochrome</i> , cyanobakterieller Antwortregulator
RR	<i>resonance Raman</i>
SAR	<i>specific absorbance ratio</i>
SEC	<i>size-exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
sp.	<i>species</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
vis	<i>visible</i>
VLFR	<i>very low fluence response</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol.	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>

14. Publikationsliste

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

Hahn, J., Kühne, R. & Schmieder, P. (2007) „Solution-state ^{15}N NMR spectroscopic study of α -C-phycoerythrin: Implications for the structure of the chromophore binding pocket of the cyanobacterial phytochrome Cph1.” *ChemBioChem* **8(18)**, 2249-2255

Hahn, J., Strauss, H.M. & Schmieder, P. (2008) „Heteronuclear NMR investigation on the structure and dynamics of the chromophore binding pocket of the cyanobacterial phytochrome Cph1.” *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11170-11178

Weitere Publikationen:

Hahn, J., Strauss, H.M., Landgraf, F.T., Giménez, H.F., Lochnit, P., Schmieder, P. & Hughes, J. (2006) „Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis.” *FEBS J.* **273(7)**, 1415-1429

Zeidler, M., Lang, C, Hahn, J. & Hughes, J. (2006) „Real time spectral analysis during phytochrome chromophore and chromoprotein purification.” *Int. J. Biol. Macromol.* **39(1-3)**, 100-103