

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Herstellung von isotopenmarkiertem PCB

Partiell isotopenmarkiertes PCB oder PΦB fand in Phytochrom bisher in schwingungsspektroskopischen Untersuchungen eine Anwendung: der Austausch saurer Protonen gegen Deuteronen ist einfach und wird daher routinemäßig eingesetzt, um Signale dieser Gruppen zu erkennen. Weiterhin wurden auch andere, kovalent gebundene Protonen gegen Deuteronen ersetzt: Andel und Mitarbeiter nutzten 5,10,15-trideutero-PΦB für eine Zuordnung der *hydrogen-out-of-plane*- (HOOP-)Moden (Andel et al., 2000), für den gleichen Zweck wird bei Knipp 5-deutero-PCB verwendet (Knipp et al., 1997). Die Verwendung anderer Isotope wurde ebenfalls publiziert. Förstendorf verwendete 1-¹⁸O-PCB für eine Zuordnung der Carbonylsignale in FTIR-Untersuchungen (Förstendorf et al., 2001). Die drei letztgenannten Arbeiten verwenden Isotopomere, deren Herstellung auf synthetischem Weg erfolgen muß, da es sich hier um kovalent gebundene Atome handelt. Es sind mehrere Synthesestrategien für PCB und PΦB beschrieben (für eine Übersicht s. Robben, 2000), die alle, bei Verwendung geeignet markierter Edukte, die Herstellung von entsprechend markierten Produkten erlauben. Aus diesem Grund ist eine vollständige Markierung von PCB oder PΦB mit ¹³C oder ¹⁵N oder eine Doppelmarkierung ¹³C/¹⁵N auf vollsynthetischem Weg sehr aufwendig und kostspielig, da alle Ausgangsstoffe vollständig markiert sein müssen, und die einzelnen Syntheseschritte mit teilweise erheblichen Verlusten verbunden sind. Problematisch ist dabei unter anderem die Produktion von Bilinen mit freien Propionatseitenketten. Bisher ist lediglich eine stereospezifische Synthese für PΦB-Dimethylester publiziert (Jacobi & Pippin, 2001). Zwar konnte gezeigt werden, daß die Stereochemie an Position 2 und 3 von PΦB keinen wesentlichen Einfluß auf Assemblierung und Photokonversion hat (s. Einleitung), für schwingungs- und NMR-spektroskopische Untersuchungen ist aber die Verwendung des korrekten Stereoisomers wünschenswert.

Um entsprechend markierte Proteine, Nukleinsäuren und andere Naturstoffe zu erhalten, läßt man einen diese Substanzen produzierenden Organismus in entsprechend isotopenangereichertem Nährmedium wachsen und isoliert die gewünschten Substanzen aus dem Organismus (Katz & Crespi, 1966). Die experimentelle Schwierigkeit besteht darin, einen geeigneten Organismus zu finden und Kulturbedingungen für das gewünschte Markierungsmuster bereitzustellen. Weiterhin muß ein Weg gefunden werden, die gesuchte Substanz aufzureinigen. Idealerweise erfüllt ein Protokoll zur Isotopenmarkierung neben diesen prinzipiellen Anforderungen noch folgende Prämissen:

- einfache und wenig wartungsintensive Handhabung
- möglichst effektiver Gebrauch der isotoopenmarkierten und teuren Ausgangsstoffe
- hohe Ausbeuten an Biomasse.

Ein für die Produktion von PCB geeigneter Organismus ist das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803. Hier werden bis zu 50 Vol-% des Cytosols von den Phycobilisomen (PBS) eingenommen, deren α - und β -Unterheiten als prothetische Gruppe ausschließlich PCB enthalten (Tooley et al., 2001). Dies gilt auch bei unterschiedlichen Lichtbedingungen, da *Synechocystis* keine chromatische Adaptation durchführt. Dies vereinfacht die Bereitstellung von entsprechend markiertem PCB beträchtlich, da lediglich eine Reinigung der PBS erfolgen muß, das daraus isolierbare PCB sollte dann frei von anderen Bilinen sein. Protokolle zur Aufreinigung von PBS und zur Kultur von *Synechocystis* sind in der Literatur beschrieben (Glazer, 1988; Castenholz, 1988), und mußten daher lediglich für die gewünschten Markierungsmuster adaptiert werden.

Eine Markierung mit ^{15}N ist unproblematisch, da die übliche N-Quelle für Blaualgen Nitrat ist. Nitrat ist in Lösung stabil und wird nicht ohne weiteres aus elementarem Stickstoff gebildet. Damit kann eine Verunreinigung durch andere Stickstoffquellen sehr leicht verhindert werden. Die Standardvorschrift zur Herstellung von BG11-Medium wurde daher nicht wesentlich modifiziert, sondern lediglich ^{15}N -angereichertes Nitrat verwendet. Durch eine konstante Belüftung gelangt $^{12}\text{CO}_2$ aus der Atmosphäre in die Kultur und kann von den Blaualgen verstoffwechselt werden (Abb. 9). Der limitierende Nährstoff ist in diesem Fall das Nitrat selber, wenn man eine Begrenzung der erreichbaren Biomasse durch die nicht mehr ausreichende Bestrahlungsintensitäten bei hohen Zelldichten außer acht läßt.

Eine Markierung mit ^{13}C erweist sich als problematischer, da die übliche Kohlenstoffquelle für Blaualgen das gasförmige CO_2 der Umgebungsluft ist. Daher ist es für einen hohen Anreicherungsgrad entscheidend, daß die Kultur von der Umgebungsluft isoliert wird. Dies ist konzeptuell auf zwei Wegen möglich. Es ließe sich eine isolierte, mit $^{13}\text{CO}_2$ angereicherte Umgebung schaffen, in der die Blaualgen im Prinzip wie im Fall der Stickstoffmarkierung wachsen. Dies setzt eine vollständige Kontrolle des isolierten Gasraumes voraus, was entsprechende technische Schwierigkeiten nach sich zieht. Hierzu gehören die Gasdichtigkeit des Systems, ein nicht zu vermeidendes Totvolumen an nicht gelöstem CO_2 , eine Abhängigkeit des gelösten, biologisch verwertbaren CO_2 von seinem Partialdruck und dem Gesamtdruck im Gasraum, die kontrollierte Zuführung von markiertem CO_2 und eine Möglichkeit, den Zustand der Kultur im isolierten Gasraum

zu kontrollieren. Ein Beispiel für eine erfolgreiche Anwendung dieser Herangehensweise ist beschrieben (Prytulla, 1994).

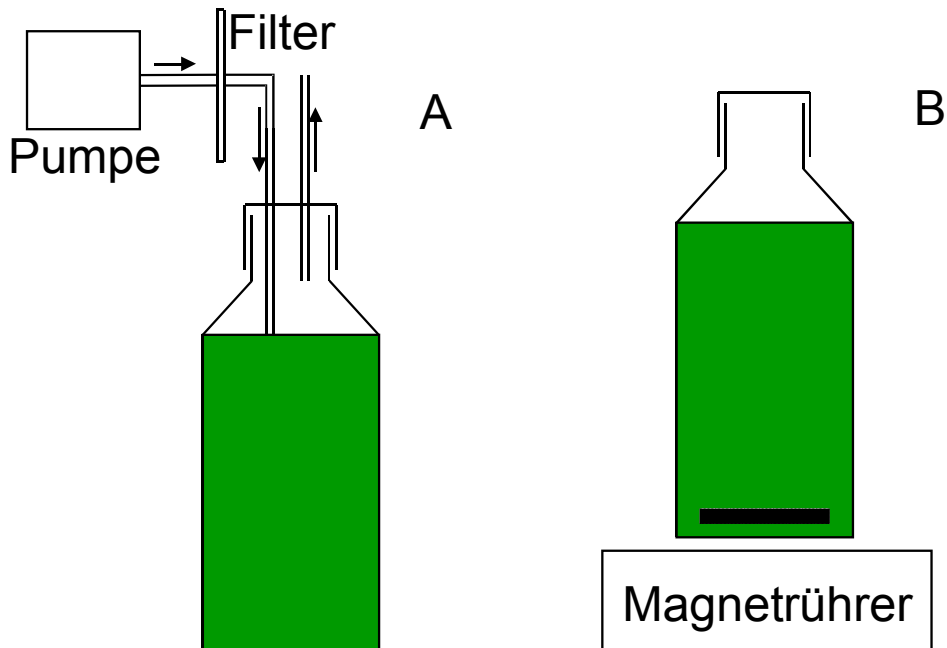
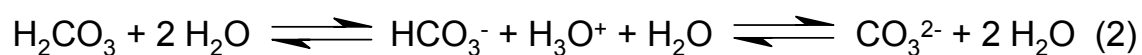
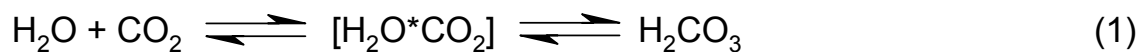


Abb. 9 Schematischer Aufbau der Kulturgefäße zum photoautotrophen Wachstum von unmarkierten und ^{15}N -markierten Zellen (A), sowie von $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -markierten Zellen (B).

Einem anderen, hier entwickelten Ansatz liegen die biochemischen Eigenschaften von CO_2 zu Grunde. Als Anhydrid der Kohlensäure unterliegt es in einem wässrigen Medium folgenden Gleichgewichtsreaktionen:



Der pH einer Kulturlösung für *Synechocystis* sollte zwischen 8-10.5 liegen (A. Wilde, persönl. Mitteilung). Die unter diesen Bedingungen dominierende Komponente ist das HCO_3^- . Das bedeutet,

das für jedes Mol CO_2 , das aus der Luft in Lösung geht (Reaktion 1), ein Proton freigesetzt wird (Reaktion 2). Gleichzeitig gelangt hauptsächlich das ungeladene CO_2 durch die Zellmembran (Reaktion 3) (Richmond, 1986), so daß prinzipiell für jedes Mol in die Zelle aufgenommenes C ein OH⁻ entsteht, das durch konstant nachgeliefertes CO_2 kompensiert wird. CO_2 erfüllt also eine doppelte Funktion als Nährstoff und pH-wirksame Pufferkomponente. Dieses Verhalten legt die direkte Bereitstellung von HCO_3^- als Salz nahe. Dies hat den zusätzlichen Vorteil, daß die Konzentration an biologisch verwertbarem Kohlenstoff wesentlich leichter zu kontrollieren ist als im Fall der indirekten Zugabe als Gas.

Allerdings muß in diesem Fall noch eine zusätzliche, metabolisch inerte Komponente zugefügt werden, die den pH-Wert des Mediums im geeigneten Bereich konstant hält. Stellt man den Zellen lediglich HCO_3^- zur Verfügung, wird die Kultur chlorotisch und stirbt. Der pH-Wert einer solchen Lösung liegt erwartungsgemäß > 11 (vgl. Reaktion 3). Als metabolisch inerte, aber pH-aktive Komponente wurde N-cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure (CHES) gewählt, dessen pKa-Wert von 9.4 für einen pH-Bereich von 8.5-10.5 geeignet ist (Beynon & Easterby, 1996). CHES kann von *Synechocystis* nicht verstoffwechselt werden, obwohl es anteilmäßig die dominierende gelöste Komponente ist. Dies zeigt sich daran, daß eine Kultur von *Synechocystis* nicht überlebt, wenn lediglich CHES als Kohlenstoffquelle angeboten wird. Gleichzeitig ist es als Substanz nicht toxisch, da die Zellen problemlos in Gegenwart von CHES wachsen, wenn ihnen ausreichend HCO_3^- zur Verfügung gestellt wird. Das System ist geschlossen und wird durch einen Magnetrührer kontinuierlich durchmischt (Abb. 9B).

In der gewählten Zusammensetzung ist der limitierende Nährstoff das HCO_3^- , die Gesamtmenge an vorhandenem HCO_3^- bestimmt die Ausbeute an Biomasse. Die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von HCO_3^- ist willkürlich gewählt und nicht in Hinblick auf maximal erreichbare Biomasse optimiert. Das Verhältnis [C]/[N] beträgt 10.8, die Gesamtmenge an Nitrat ist im Vergleich zur Originalvorschrift um den Faktor 4 reduziert. Dieser Wert orientiert sich an den publizierten mittleren Verhältnissen in verschiedenen Blaualgen (Richmond, 1986). Er wurde jedoch nicht weiter auf *Synechocystis* und die gewählten Kulturbedingungen abgestimmt. Das Verhältnis [CHES]/[HCO_3^-] liegt bei 1.26, um eine ausreichende Pufferkapazität zu gewährleisten. Der pH-Wert einer stationären Kultur beträgt ca. 10, bei einem Anfangs-pH von ca. 8.2. Für eine ausgewachsene Kultur ist kein gelöstes HCO_3^- mehr nachweisbar, was auf eine quantitative Umsetzung hindeutet. Beläßt man die Kultur in diesem Zustand, ist sie nicht mehr überlebensfähig. Dies ist eine weitere Bestätigung, daß CHES nicht als Kohlenstoffquelle dienen kann.

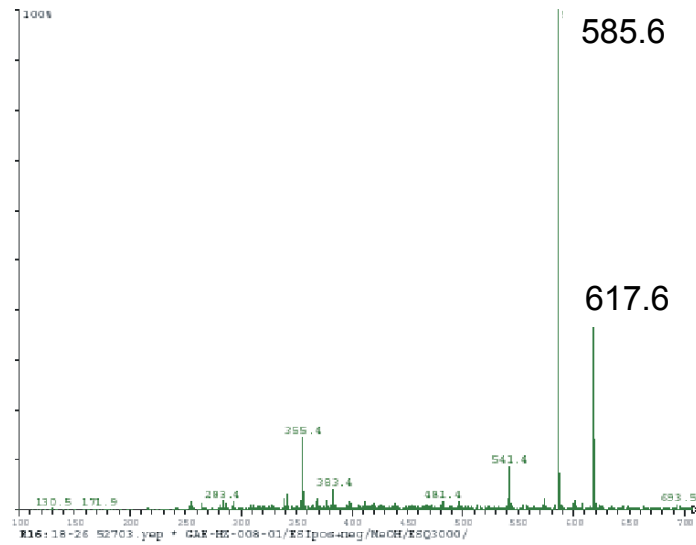
Die Isolierung von PCB erfolgt über die Isolierung der PBS und nachfolgende Methanolyse im Soxhlett-Extraktor zur Gewinnung von freiem PCB. Beides gelingt in guten Ausbeuten nach publizierten Verfahren. Im nächsten Schritt wurde das isolierte Produkt hinsichtlich Identität und Reinheit überprüft.

Die UV/vis-spektralen Parameter von Cph1Δ2, das mit auf dem hier vorgestellten Weg erhaltenen Bilin assembliert wurde, entsprechen den publizierten Werten für mit PCB assemblierten Protein (Yeh et al., 1997). Eine Analyse des aufgereinigten Pigments mittels HPLC und ESI-MS bestätigt ebenfalls, dass es sich um PCB handelt. Die chemische Identität des isolierten Bilins wird damit als gesichert betrachtet.

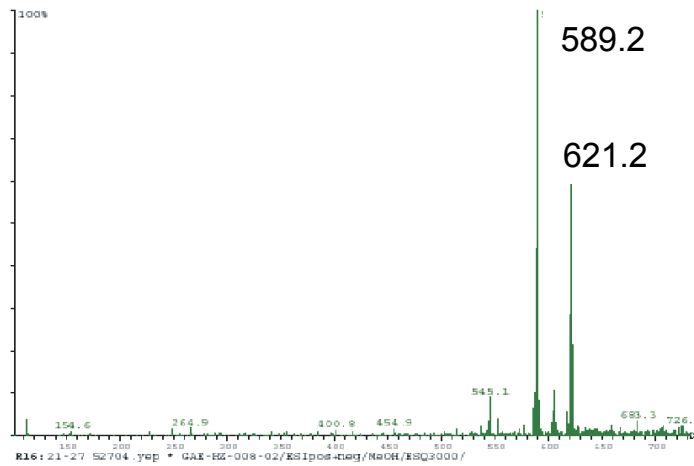
Neben kleinen Mengen an Verunreinigungen, die sich als Derivate des PCBs erklären lassen, werden keine detektierbaren Mengen weiterer Biline gefunden (Abb. 10 und 11). Es wird aber auch deutlich, dass immer signifikante Mengen des 3¹-Methoxyaddukts gebildet werden. Methoxyadduktbildung erfolgt am freien PCB (Beuhler et al., 1976), daher werden zwei Diastereoisomere beobachtet. Diese könnten den zwei klar separierten *peaks* bei 6.346 min und 7.211 min im HPLC-Chromatogramm entsprechen, die beide identische UV-vis-Spektren aufweisen (nicht gezeigt).

Eine Massenanalyse der markierten Verbindungen zeigt, dass die gewünschte Markierung praktisch vollständig ist. Für ¹⁵N-markiertes PCB wird eine Masse von 589 Dalton erwartet, für ¹³C/¹⁵N-PCB von 622 Dalton. Die anscheinend nicht vollständige Markierung des doppelt markierten PCB lässt sich durch eine geringe Menge einer unmarkierten Kultur und gelöstem ¹²CO₃⁻ erklären, die als initiales Inokulum der doppelt markierten Kultur diente. Dies wird bestätigt durch das Vorhandensein einer geringen Menge unmarkierten PCBs bei m/z 585 in Abb. 10C. Die ¹⁵N-markierte Kultur hatte zum Zeitpunkt der Messung schon mehrere Medienwechsel hinter sich, so dass hier kein unmarkiertes PCB mehr nachweisbar ist.

A



B



C

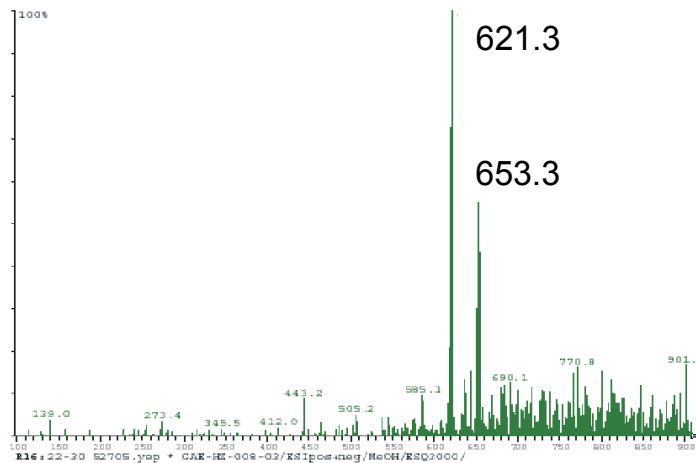


Abb. 10 ESI-MS-Spektren von unmarkiertem PCB (A, HPLC-Chromatogramm in Abb. 11 gezeigt), ¹⁵N-(B) und ¹³C/¹⁵N-markiertem PCB (C). die jeweiligen Signale bei 617.6, 621.2 und 653.3 m/z entsprechen dem 3-Methoxy-PCB.

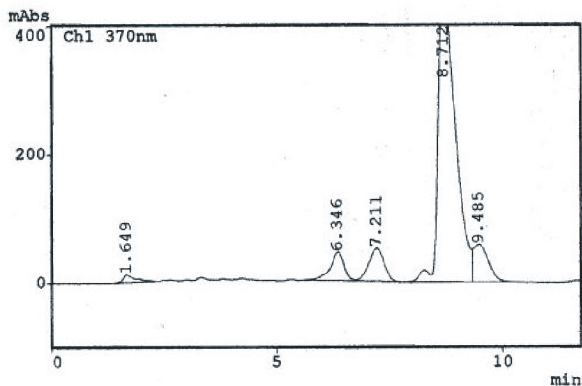


Abb. 11 HPLC-Chromatogram von unmarkiertem PCB nach Methanolyse. Der Hauptpeak bei 8.172 min entspricht freiem PCB, die beiden Signale bei 6.346 min und 7.211 min sind die 3^1 -Methoxyaddukte von PCB.

Aufgrund der schlecht definierten Kulturbedingungen (bezüglich u. a. Temperatur, Lichtmenge pro Fläche, Expositionszeit, Schichtdicke der Kulturlösung, spektrale Gradienten bei höheren Zelldichten) wurden entsprechend schlecht reproduzierbare Wachstumskurven erhalten. Weiterhin ist die Menge an erhaltenem PCB pro g Naßgewicht Zellen nur schlecht zu quantifizieren, da immer signifikante, aber variable Mengen an 3^1 -Methoxy-PCB und verschiedenen Abbauprodukten gebildet werden (W. Gärtner, persönliche Mitteilung), und Methoden zur Quantifizierung und/oder Abtrennung dieser Komponenten nicht routinemäßig zur Verfügung standen. Die Anwesenheit dieser Komponenten ist aber unproblematisch, da während der Rekonstitution von apo-Cph1 Δ 2 die vollständige Absättigung des Proteins mit PCB experimentell überprüft wurde. Dabei sind kleinere Mengen von freiem Biliverdin (BV), das der metabolische Vorläufer von PCB ist (s. Einleitung), unproblematisch, da BV von Cph1 Δ 2 nicht kovalent gebunden werden kann (Lamparter et al., 1997). Für die Bereitstellung von markiertem PCB in für die durchgeführten Messungen notwendiger Menge ist das hier entwickelte Protokoll ausreichend.

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen kann markiertes PCB in FTIR-Messungen (F. Siebert, persönl. Mitteilung an P. Schmieder) und Festkörper-NMR (J. Matysik, persönl. Mitteilung) zur Anwendung kommen. Da der gesamte cyanobakterielle Organismus markiert wird, können auch andere Bestandteile von *Synechocystis* einer sinnvollen wissenschaftlichen Verwertung zugeführt werden: so läßt sich aus den Thylakoidmembranen z. B. Photosystem I isolieren, das für NMR- und EPR-ENDOR-Messungen verwendet werden kann (M. Antonkin, persönl. Mitteilung). Ebenso ist die Isolation von ^{13}C -markiertem Chlorophyll möglich, mit dem IR-Messungen durchführbar sind (K. Heyne, persönl. Mitteilung).

2.2 Analytische Ultrazentrifugation

Vorhergehende Untersuchung zur Quartärstruktur von Cph1 wurden mit Größenausschlußchromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) (Lamparter et al., 1997; Lamparter et al., 2001; Park et al., 2000a; Esteban et al., 2005) und fluoreszenzbasierten Methoden (Otto et al., 2003) durchgeführt. Park et al. und Esteban et al. beschreiben außerdem Versuche mit einem Cph1 Δ 2-ähnlichen Fragment (Cph1D, Pos. 1-490, rekombinant hergestellt, und F1 aus partieller Proteolyse, Pos. 56-520), Otto et al. benutzten Cph1 Δ 2. Nicht publizierte SEC-Experimente von Jon Hughes wurden mit Cph1 Δ 2 durchgeführt.

Diese Versuche hatten ergeben, daß Cph1 in der Pr- und der Pfr-Form als Dimer vorliegt, wobei eine Änderung des Elutionsprofils bei Bildung der Pfr-Form beobachtet wurde (Lamparter et al., 2001). Cph1 Δ 2-Pr verhält sich wie ein Monomer, bei Phototransformation ergibt sich ein deutlicher Unterschied des hydrodynamischen Verhaltens (Abb. 12). Der Unterschied war groß genug, um spektral reines Cph1 Δ 2-Pfr herzustellen. Diese Experimente wurden von Jon Hughes durchgeführt.

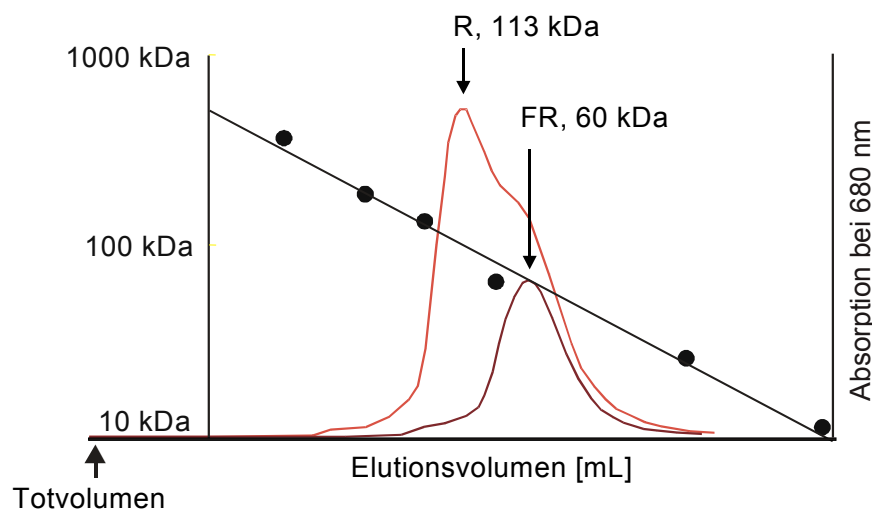


Abb. 12 Größenausschlußchromatogramm von Cph1 Δ 2 in der Pr- und der Pfr-Form, angezeigt durch die jeweils erfolgte Bestrahlung (FR für Pr, R für Pfr). Die apparenten Molekulargewichte sind ebenfalls gezeigt, zusammen mit dem Laufverhalten der verwendeten Markerproteine. Das zugrundeliegende Experiment wurde von Jon Hughes durchgeführt.

Ein ähnliches Ergebnis beim Übergang von der Pr- zur Pfr-Form wird auch von Esteban et al., gefunden und als verstärkte Dimerisierung des N-Terminus interpretiert. Die Position der Dimerisierungsoberfläche wird zwischen den Aminosäuren 472-520 und/oder 56-64 von Cph1

angegeben. Diese Autoren erwähnen ebenfalls, daß sie das F1-Fragment als spektral reines Pfr isolieren konnten. Die mit SEC gewonnenen Daten könnten allerdings auch auf einer Änderung der hydrodynamischen Form des Moleküls bei unveränderter Quartärstruktur oder auf unterschiedliche Interaktionen mit dem Matrixmaterial beruhen. Eine Kombination aus all diesen Faktoren wäre dabei natürlich auch denkbar.

Um diese verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten zu überprüfen und eindeutig interpretieren zu können, wurden AUZ-Experimente durchgeführt. Weiterhin lassen sich auf diesem Weg andere, für die weitere Untersuchung wichtige Fragen beantworten. Zu diesen gehören die Löslichkeit von Cph1Δ2-Pr und -Pfr, die Stabilität des jeweiligen Photoisomers, ein Modell der Quartärstruktur des Proteins im Pr- und Pfr-Zustand, ein thermodynamisches Verständnis der etwaigen Änderungen und eine Interpretation dieser Änderungen in Hinblick auf die Funktionsweise des Proteins. Die Methode des Sedimentationsgleichgewichts ist eine klassische Methode der Molmassenbestimmung von Makromolekülen (Svedberg & Pedersen, 1940). Als Absolutmethode hat sie den Vorteil, daß die bestimmbaren Molmassen unabhängig von der äußeren Form oder Solvation des untersuchten Moleküls sind.

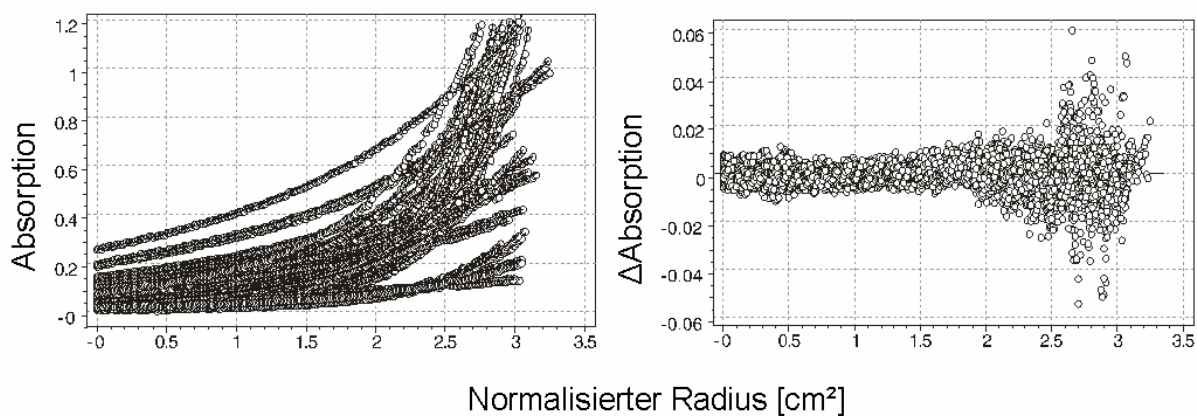


Abb. 13 Sedimentationsgleichgewichtsgradienten von Cph1Δ2-Pr bei drei verschiedenen Geschwindigkeiten und Anfangskonzentrationen wurden global an verschiedene theoretische Modelle angepaßt. Global heißt in diesem Fall, daß einige Parameter unabhängig von der gewählten Drehgeschwindigkeit und Anfangskonzentration sind. Dazu gehören das Molekulargewicht und der Assoziationskoeffizient des vorgegebenen Reaktionsschemas. Ein Modell wurde dann als richtig angesehen, wenn die Summe der Abweichungen zwischen experimentellen und theoretischen Kurven minimal war und kein anderes Modell als das gewählte die Daten besser beschreiben konnte. Diese Versuche zeigten eine deutliche Tendenz des Proteins zu dimerisieren (Abb. 13, Abb. 14). Experimentelle und theoretische (Monomer-Dimer Modell) Kurven von Cph1Δ2-Pr (links). Die Abweichung zwischen experimentellen und theoretischen Kurven (Residuen) ist rechts gezeigt. Experimentelle Bedingungen: 10 °C, 300 mM NaCl.

Systematische Variationen der Ionenstärke des verwendeten Lösungsmittels und der Temperatur zeigten, daß die Tendenz zur Dimerisierung durch hydrophobe Interaktionen vermittelt

wird. Dabei könnte es sich allerdings um ein Artefakt handeln, da der C-Terminus des Proteins molekularbiologisch vom Protein getrennt wurde und auf diesem Wege eine neue hydrophobe Oberfläche entstanden sein könnte. Andererseits wurde an gleicher Stelle eine hydrophile und sehr bewegliche Erweiterung um sechs Histidine eingeführt.

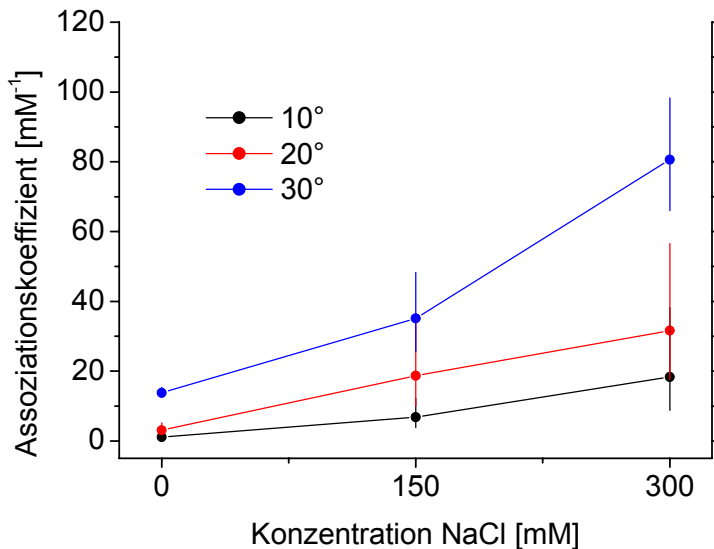


Abb. 14 Variation des Assoziationskoeffizienten für eine Monomer-Dimer-Assoziation als Funktion der Temperatur und der Ionenstärke, bestimmt aus Experimenten mit reinem Pr, analog den in Abb. 13 gezeigten.

Mit den erhaltenen experimentellen Daten war es möglich, neben dem Assoziationskoeffizienten die Molmasse von Cph1Δ2 zu bestimmen, indem dieser Parameter mit in die Kurvenanpassung einbezogen wurde. Die jeweiligen erhaltenen Werte sind in Übereinstimmung mit dem theoretisch erwarteten (59.2 kg/Mol, vgl. Tab 2). Dies ist ein Hinweis, daß die Annahmen die bei der Berechnung des partiellen spezifischen Volumens des Holoproteins gemacht wurden, gerechtfertigt sind. Weiterhin wird durch diese Übereinstimmung gezeigt, daß die experimentellen Daten den Parameterraum ausreichend gut beschreiben, um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen. Dies wird anschaulich, wenn man die konzentrationsabhängigen Partialkonzentrationen an Dimer mit den experimentell zugänglichen Konzentrationen vergleicht (Abb. 15). Sowohl Dimer als auch Monomer sind im gemessenen Konzentrationsbereich vorhanden.

Diese Versuche zeigen jedoch deutlich, daß unter den Bedingungen, wie sie für NMR-Messungen gewählt wurden (Proteinkonzentration > 300 μM, geringe Ionenstärke und relativ hohe Temperaturen) Cph1Δ2-Pr zum größten Teil dimerisiert vorliegt. Gleiches gilt für den Pfr-Zustand (s. unten).

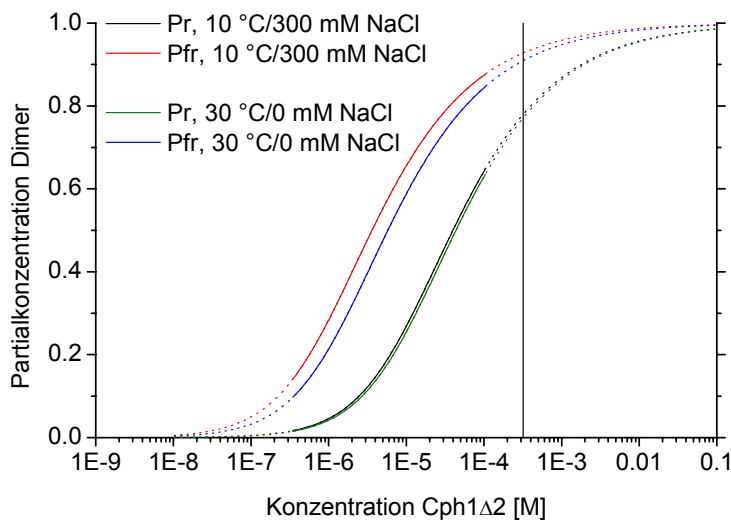


Abb. 15 *Partialkonzentration von $(Cph1\Delta 2)_2$ als Funktion der Gesamtkonzentration $Cph1\Delta 2$ (bezogen auf das Monomer). Die durchgezogenen Linien kennzeichnen den Konzentrationsbereich, über den die Messungen durchgeführt wurden, die durchbrochenen Linien sind die aus den bestimmten Assoziationskoeffizienten berechneten Verteilungen in Abwesenheit von thermodynamischen Nichtidealitäten. Die vertikale schwarze Linie gibt die*

Konzentration an, die mindestens für NMR-Messungen verwendet wurde. Die Assoziationskoeffizienten für Pr und Pfr bei 10 °C/300 mM NaCl wurden aus den in Abb. 13, Abb. 18 und Tab. 2 dargestellten Experimenten bestimmt, die Assoziationskoeffizienten bei 30 °C/0 mM NaCl entstammen den in Abb. 19 gezeigten Ergebnissen.

Um zu verstehen, wie sich die Bildung von $Cph1\Delta 2$ -Pfr auswirkt, wurde folgendes Experiment durchgeführt (Abb. 16): $Cph1\Delta 2$ -Pr wurde in den Zustand des apparenten Sedimentationsgleichgewichtes gebracht und der entsprechende Konzentrationsgradient aufgenommen. Direkt im Anschluß daran, und bei unveränderter Drehzahl, wurde an einer geeigneten radialen Position ein Wellenlängenspektrum über den Bereich 250-800 nm aufgenommen (Pr 1). Danach wurde die Zentrifuge gestoppt, die Lösungen mit R bestrahlt und bei gleicher Drehgeschwindigkeit wie vorher das Sedimentationsgleichgewicht eingestellt, der entsprechende Gradient und ein Wellenlängenspektrum aufgenommen (Pr/Pfr). Danach wurde die Lösung wieder mittels FR-Bestrahlung in den Pr-Zustand verwandelt und wie oben ein Konzentrationsgradient und ein Wellenlängenspektrum aufgenommen (Pr 2).

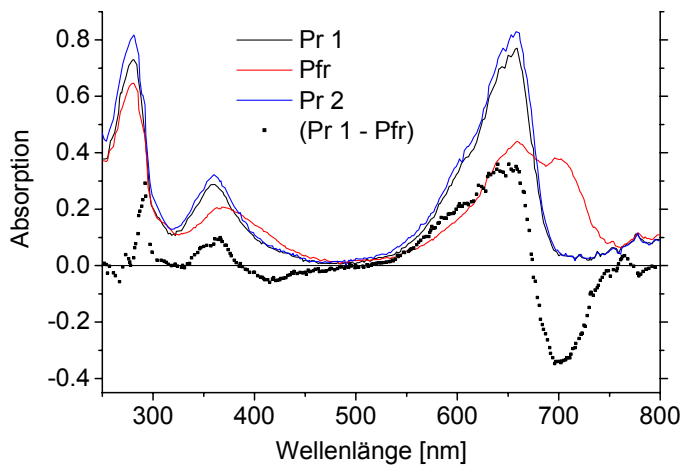
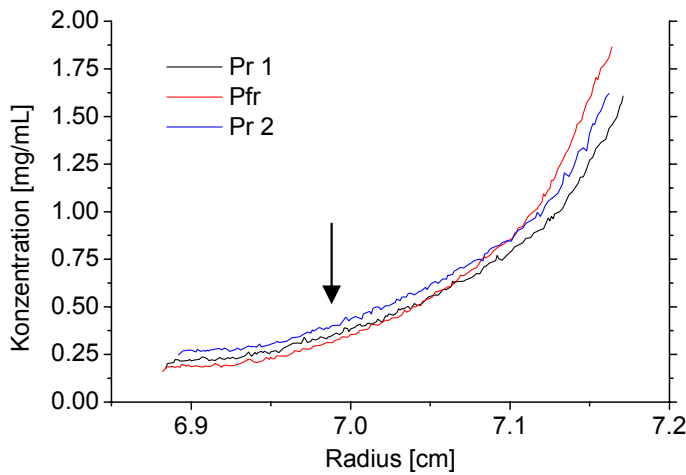


Abb. 16 oben:
Gleichgewichtsgradienten einer
nacheinander mit R und FR
bestrahlten Probe.
unten: Absorptionsspektren, die
an der mit einem Pfeil
markierten Position
aufgenommen wurden.
Experimentelle Bedingungen:
 10°C , 150 mM NaCl , $12\ 000\ \text{U/min}^{-1}$.

Diese Experimente demonstrierten, daß die Bildung von Cph1 Δ 2-Pfr die gemittelte Molmasse des Systems erhöhte, erkennbar an einer größeren Steilheit der Konzentrationsgradienten und an einer Zunahme des massengemittelten Molekulargewichts (Tab. 1). Diese Zunahme ist spezifisch und reversibel mit der Bildung von Pfr verbunden, da der Konzentrationsgradient derselben Lösung nach erneuter Phototransformation wieder flacher wird und die massengemittelten Molekulargewichte praktisch wieder auf den Anfangswert von Pr 1 zurückgehen (Tab. 1). Das aufgenommene Wellenlängenspektrum zeigt, daß tatsächlich ausreichend Pfr generiert wurde. Analysiert man die Gesamtmenge an Protein, die über die Gesamtlänge des Konzentrationsgradienten in Lösung ist (als extrapolierte Ladungskonzentration, c_{Lad} in Tab. 1), ist auch erkennbar, daß während dieser Phototransformation keine signifikante Menge an Protein aus der Lösung verschwindet. Dies zeigt die sehr gute Löslichkeit des Proteins in beiden spektralen Zuständen. Weiterhin wird deutlich, daß einmal gebildetes Pfr in Dunkelheit stabil ist, und keine erkennbare Dunkelrevertierung stattfindet. Die Einstellung des Sedimentationsgleichgewichtes dauerte in diesen Experimenten ca. 30 Stunden für jeweils einen Gradienten.

	0 mM NaCl	150 mM NaCl	300 mM NaCl
Pr 1			
Mw _{av} [kg/Mol]	57.25	54.86	61.68
c _{Lad} [mg/mL]	0.53	0.41	0.68
Pr/Pfr			
Mw _{av} [kg/Mol]	72.33	69.18	70.9
C _{Lad} [mg/mL]	0.55	0.46	0.73
Pr 2			
Mw _{av} [kg/Mol]	57.52	59.29	64.38
C _{Lad} [mg/mL]	0.53	0.42	0.69

Tab. 1 Modellfreie Analyse der globalen Massenmittel (Mw_{av}) und extrapolierten Ladungskonzentration (c_{Lad}) von nacheinander mit R-FR-R bestrahlten Lösungen.

Diese Experimente erlaubten eine modellfreie Aussage über die reversible Zu- und Abnahme der Gewichtsmittel. Um jedoch zu verstehen, welche Oligomere die Pfr-Form bildet, welche Kontaktfläche diese Oligomere haben, und ob eventuell gemischte Oligomere PrPfr entstehen, musste eine modellabhängige Analyse gewählt werden.

Mittels präparativer SEC war es möglich, eine Lösung von praktisch reinem Cph1Δ2-Pfr herzustellen (Abb. 17). Die mit dieser Lösung aufgenommenen Gleichgewichtsgradienten zeigten, daß Cph1Δ2-Pfr ebenfalls einem reversiblen Monomer-Dimer Gleichgewicht unterliegt (Abb. 18), allerdings mit einem Assoziationskoeffizienten, der deutlich über dem von Cph1Δ2-Pr bei gleichen experimentellen Bedingungen liegt (Tab. 2).

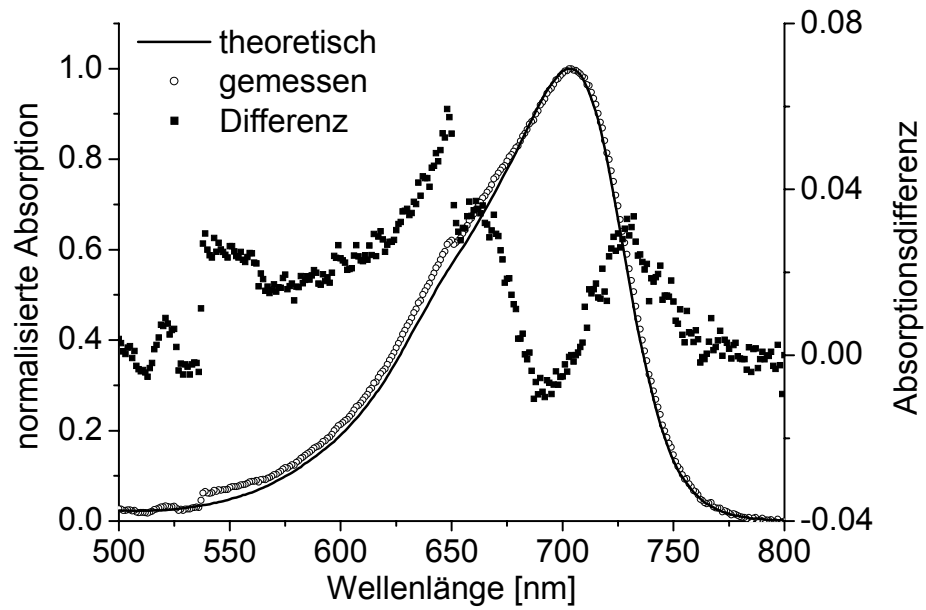


Abb. 17 Pfr-Probe, mit der das in Abb. 18. gezeigte Experiment durchgeführt wurde.

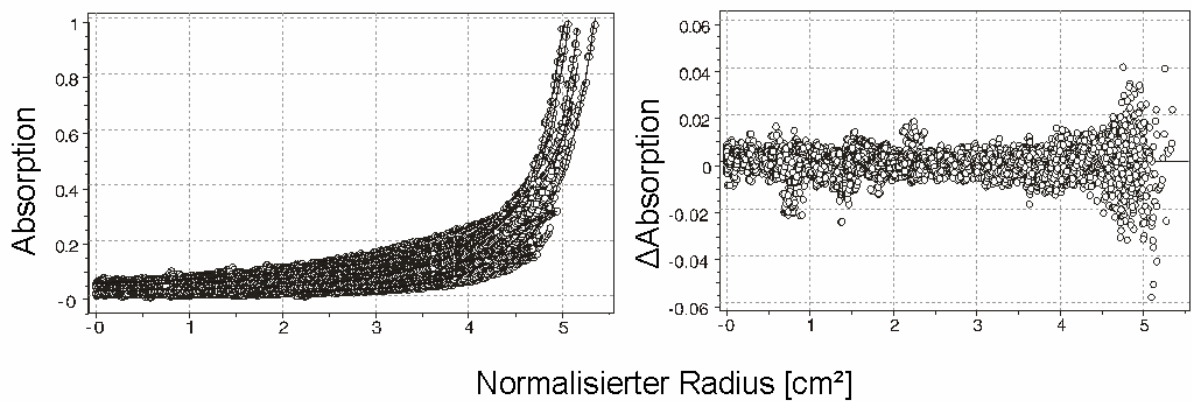


Abb. 18 Experimentelle und theoretische (Monomer-Dimer-Tetramer Modell) Kurven von Cph1Δ2-Pfr (links). Die Abweichung zwischen experimentellen und theoretischen Kurven (Residuen) ist rechts gezeigt. Experimentelle Bedingungen: 10 °C, 300 mM NaCl.

	Modell	Molekulargewicht [kg/Mol]	Assoziationskoeffizient Monomer-Dimer [mM ⁻¹]	r.m.s.d. (x 10 ⁻³)
Pr	Monomer-Dimer	61.3	19.8	4.95
		56-66.7	9.54-41.3	4.86-5.14
Pfr	Monomer-Dimer	67.2	96	4.87
		63.8-70.6	62.4-147.5	4.6-5.12
	Monomer-Dimer-Tetramer ^A	56.1	334.9	4.83
		50.1-62.2	147.9-758.7	4.56-5.07

Tab. 2 Vergleich der durch Kurvenanpassung bestimmten Parameter für Lösungen von Pr und Pfr. Die Experimente wurden bei gleichen Bedingungen durchgeführt (10° C, 300 mM NaCl). 95%-Konfidenzintervalle der jeweils bestimmten Parameter sind angegeben.

^A Die Bildung von höheren Polymeren als das Dimer ist sehr wahrscheinlich, ihr Charakter kann aber nicht eindeutig mit den vorhandenen Daten bestimmt werden. Die Annahme eines Tetramers wurde aus Plausibilitätsgründen gemacht. Die Annahme lediglich einer Monomer-Dimer Assoziation ist nicht ausreichend, um die Daten befriedigend zu beschreiben.

Im Fall von Cph1Δ2 war es möglich, die beiden heterologen Assoziationskoeffizienten für Pr und Pfr* simultan zu bestimmen. Durch systematische Variation der Lösungsbedingungen konnte gezeigt werden, daß die Interaktion zwischen Pfr*-Dimeren ebenfalls hydrophober Natur sind (Abb. 19). Die Übereinstimmung der theoretischen mit den experimentellen Kurven ist dabei bei Annahme von lediglich zwei Assoziationsreaktionen schon so gut, daß die Bildung von signifikanten Mengen gemischter PrPfr-Oligomere praktisch ausgeschlossen werden kann. Die Annahme einer zusätzlichen Assoziationsreaktion verbessert nicht die statistische Qualität der Kurvenanpassung.

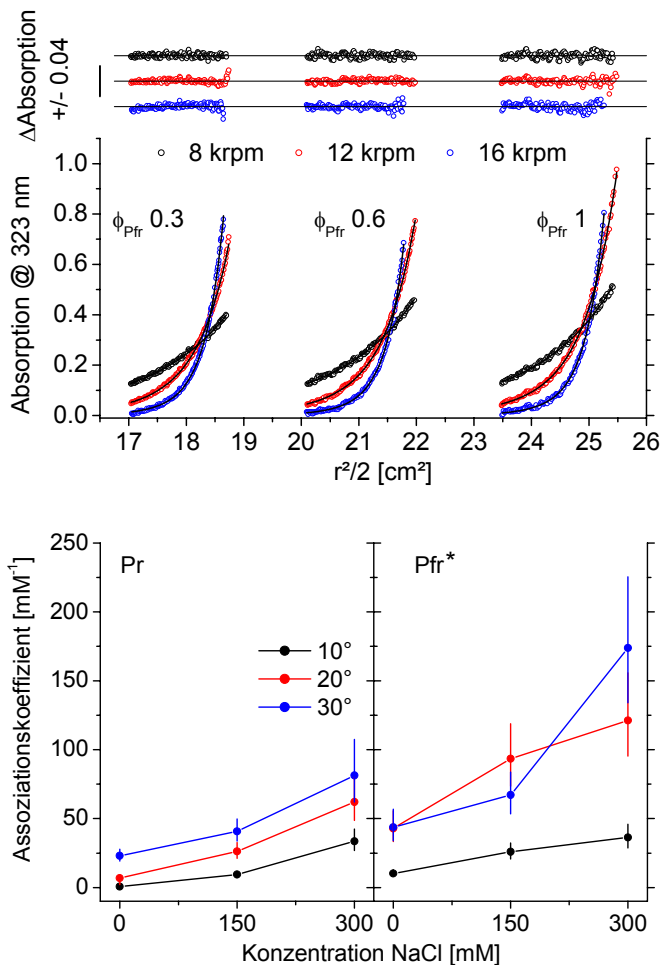


Abb. 19 Simultane Bestimmung von $K_{A, Pr}$ und K_{A, Pfr^*} (oben) und Variation der auf diesem Wege erhaltenen Werte für $K_{A, Pr}$ und K_{A, Pfr^*} (unten). Die 95%-Konfidenzintervalle sind angegeben.

Die vorgestellten Experimente zeigen, daß sich die strukturellen Änderungen des Chromophors in der Pr- und Pfr-Form an der Oberfläche des Proteins widerspiegeln, die dort eine spezifische Änderung der Quartärstruktur induzieren. Im Zusammenhang mit einer Signaltransduktion sind zwei Aspekte dieser Befunde relevant, die Übertragbarkeit der hier gefundenen Ergebnisse auf andere Phytochrome wird dabei vorausgesetzt.

Zum einen werden durch die Phototransformation unterschiedliche und Pr/Pfr-spezifische Interaktionsflächen exponiert, die dann mit geeigneten Interaktionspartnern reagieren könnten. Diese Interaktionen sind, wie hier gezeigt wurde, reversibel, was ihre Spezifität unterstreicht. Damit erfüllt der N-terminale, photosensorische Teil des Moleküls, mit dem hier gearbeitet wurde, die molekularen Voraussetzungen, um eigenständig eine Signaltransduktion auszulösen. Inwieweit die gefundene Homodimerisierung für die Interaktion mit anderen Interaktionspartnern relevant ist, müßten separate Untersuchungen zeigen. Tatsächlich gibt es Hinweise, daß der N-Terminus in manchen Phytochromen einen physiologischen Effekt auslösen kann: Matsushita et al. beschreiben Experimente mit dem N-Terminus von Phytochrom B, in denen ein dimerisiertes Konstrukt physiologisch aktiv ist (Matsushita et al., 2003).

Zum anderen ist es denkbar, daß im Vollängenprotein eine durch Licht induzierbare Dimerisierung des N-terminalen Teils die Kinaseaktivität des C-Terminus reguliert. Prototypische sensorische Histidinkinasen eines Zwei-Komponenten-Signalwegs bestehen aus einem regulatorischen und einem sensorischen Teil und sind als Dimere funktional. Dabei ist der regulatorische Teil für die Dimerisierung verantwortlich (Stock et al., 2000) und im Vergleich zwischen verschiedenen Histidinkinasen stark konserviert. Die Annahme liegt nahe, daß dies auch für die intramolekulare Regulation der Signalweitergabe gilt. Die jeweiligen Sensoren sind, entsprechend den vielfältigen Stimuli die wahrgenommen werden können, stark diversifiziert. In einem einfachen Modell würde durch die N-Termini von Phytochrom eine Umorientierung der C-Termini erreicht, die dann einen inter- und/oder intramolekularen Phosphotransfer ermöglichen würden. Im Fall von Cph1 zeigen jedoch die Pr- und die Pfr-Form Kinaseaktivität, wobei die Pr-Form die aktivere ist. Eine strenge Regulation dieser Funktion scheint also für die Signaltransduktion zumindest von Cph1 nicht notwendig zu sein. In pflanzlichen Phytochromen ist im C-Terminus ein zusätzlicher, aus zwei PAS-Domänen bestehender Bereich enthalten (s. Abb. 5). Inwieweit dieser Bereich eine Funktion innerhalb einer intermolekularen Signaltransduktion aufweist, die durch den N-Terminus reguliert werden könnte, ist nicht bekannt.

2.3 Resonanz-Raman Spektroskopie

Die ersten Resonanz-Raman (RR-)spektren von Phytochrom in der Pr-Form wurden 1988 von Fodor et al. publiziert (Fodor et al., 1988), zwei Jahre später auch für die Pfr-Form (Fodor et al., 1990). Weitere experimentelle und theoretische Untersuchungen folgten (Matysik et al., 1995; Andel et al., 1996 und 2000; Kneip, 1998; Kneip et al., 1999; Mroginski et al., 2004; Mizutani et al., 1991; Mizutani et al., 1994). Einige Arbeiten beschäftigen sich mit Phytochromen prokaryotischen Ursprungs, Cph1 und Agp1 (Remberg et al., 1997; Kneip, 1998; Borucki et al., 2005). Da der Chromophor *in situ* gemessen wird, ist RR-Spektroskopie die bisher einzige Methode, mit der Aussagen zur Konformation der Methinbrücken gemacht werden konnten. Die Interpretation der experimentellen Daten ist jedoch widersprüchlich (Andel et al., 2000; Mroginski et al., 2004; s. Einleitung). Dies gilt auch für Aussagen zur Protonierung des Chromophors (Fodor et al., 1990; Mizutani et al., 1994; Kneip et al., 1999). Eine exakte Interpretation der gemessenen Spektren setzt eine möglichst genaue Zuordnung einzelner Moden⁵ voraus. Experimentell gelingt dies durch die Verwendung verschiedener Isotope und durch Vergleich von experimentellen und theoretischen Spektren. Beide Möglichkeiten wurden hier angewendet.

RR-Spektren von Cph1 Δ 2 wurden in den beiden Grundzuständen Pr und Pfr gemessen, jeweils von mit ¹⁴N- und ¹⁵N-markiertem PCB rekonstituiertem Protein und in H₂O und D₂O. Von jedem Zustand gibt es also insgesamt 4 Spektren. Die Abbildungen 20 und 21 zeigen die gemessenen RR-Spektren im Überblick.

Die Spektren weisen ein sehr hohes Signal-Rausch-Verhältnis auf, so daß auch kleine Banden zuverlässig identifiziert werden können. Das Rauschen kann im Bereich zwischen 1750-1800 cm⁻¹ beurteilt werden, da hier keine scharfen Raman-aktiven Banden des Proteins oder des Chromophors erwartet werden.

Aufgrund der Anregungswellenlänge von 1064 nm, die relativ weit vom Absorptionsmaximum sowohl der Pr- als auch der Pfr-Form liegt, und der daraus resultierenden schwächeren Resonanzverstärkung des Chromophors, werden teilweise auch Proteinmoden mit signifikanter Intensität erhalten. Diese sind jedoch in ihrer Lage und relativen Stärke bekannt (Kneip, 1998). Die einzige scharfe Proteinbande liegt bei den hier gemessenen Spektren bei 1005 cm⁻¹ und wird symmetrischen Ringstreckungen von Phenylalanin zugeschrieben. Die Lage dieser Bande ist zwischen

⁵ Eine Mode ist die Summe aller Schwingungen von N Atomen, die mit gleicher Frequenz und Phase, aber durchaus unterschiedlichen Amplituden schwingen.

einzelnen Spektren von Cph1 Δ 2 sehr konstant und dient somit als interner Standard für die Genauigkeit der gemessenen Wellenzahlen und als relativer Maßstab der Ramanaktivität des Chromophors. Zwischen einzelnen Phytochromen variiert die Position dieser Bande jedoch etwas: im Fall von Phytochrom A liegt sie bei 1001 cm⁻¹ (Kneip, 1998), im Fall von Agp1 bei 1007 cm⁻¹ (von Stetten, 2005). Die Gründe für diese Variation sind im Moment nicht klar. Weiterhin dient die relative Höhe dieser Bande einer Abschätzung, wie rein das gemessene Protein war.

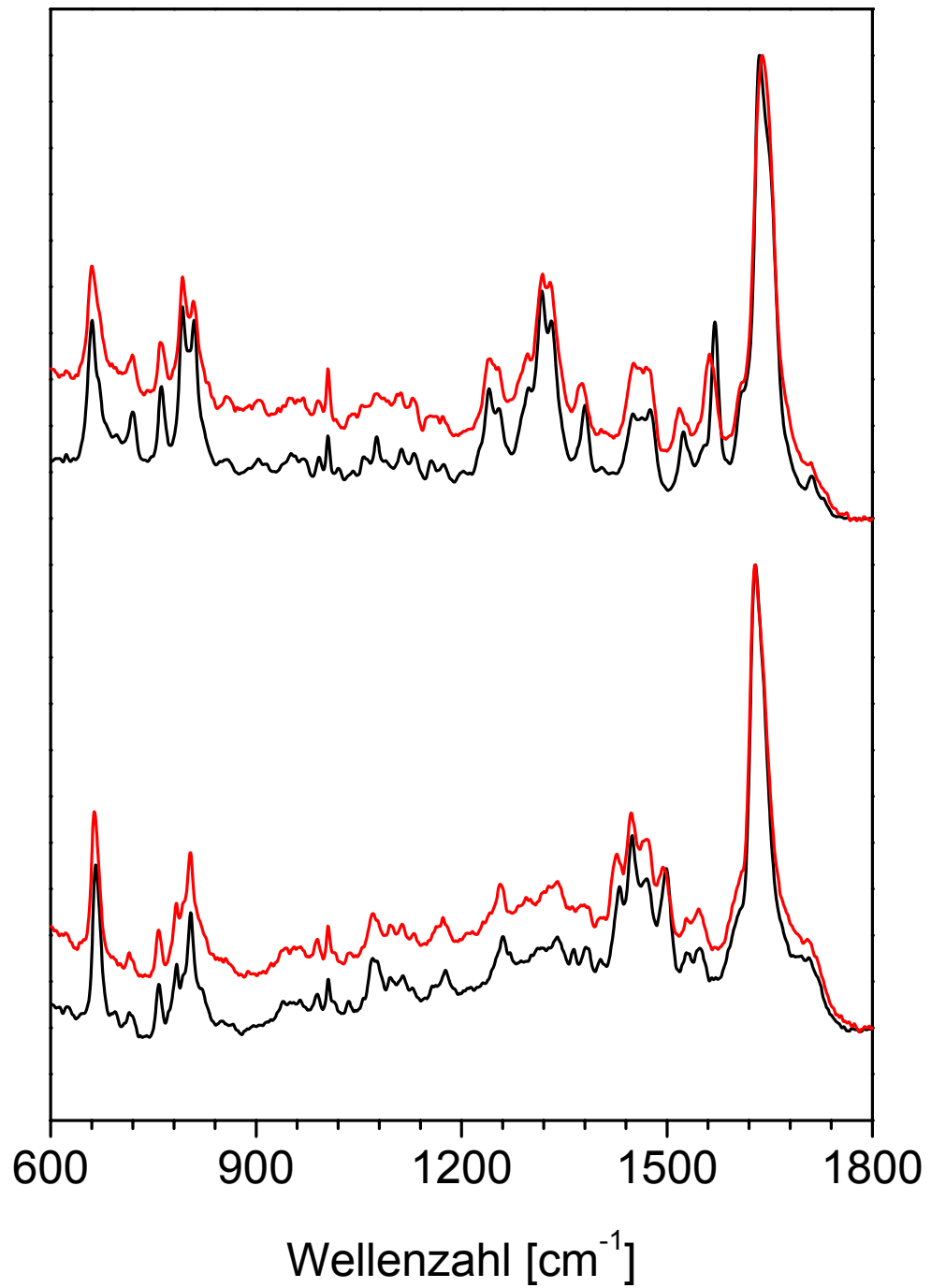


Abb. 20 RR-Spektrum der Pr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen.

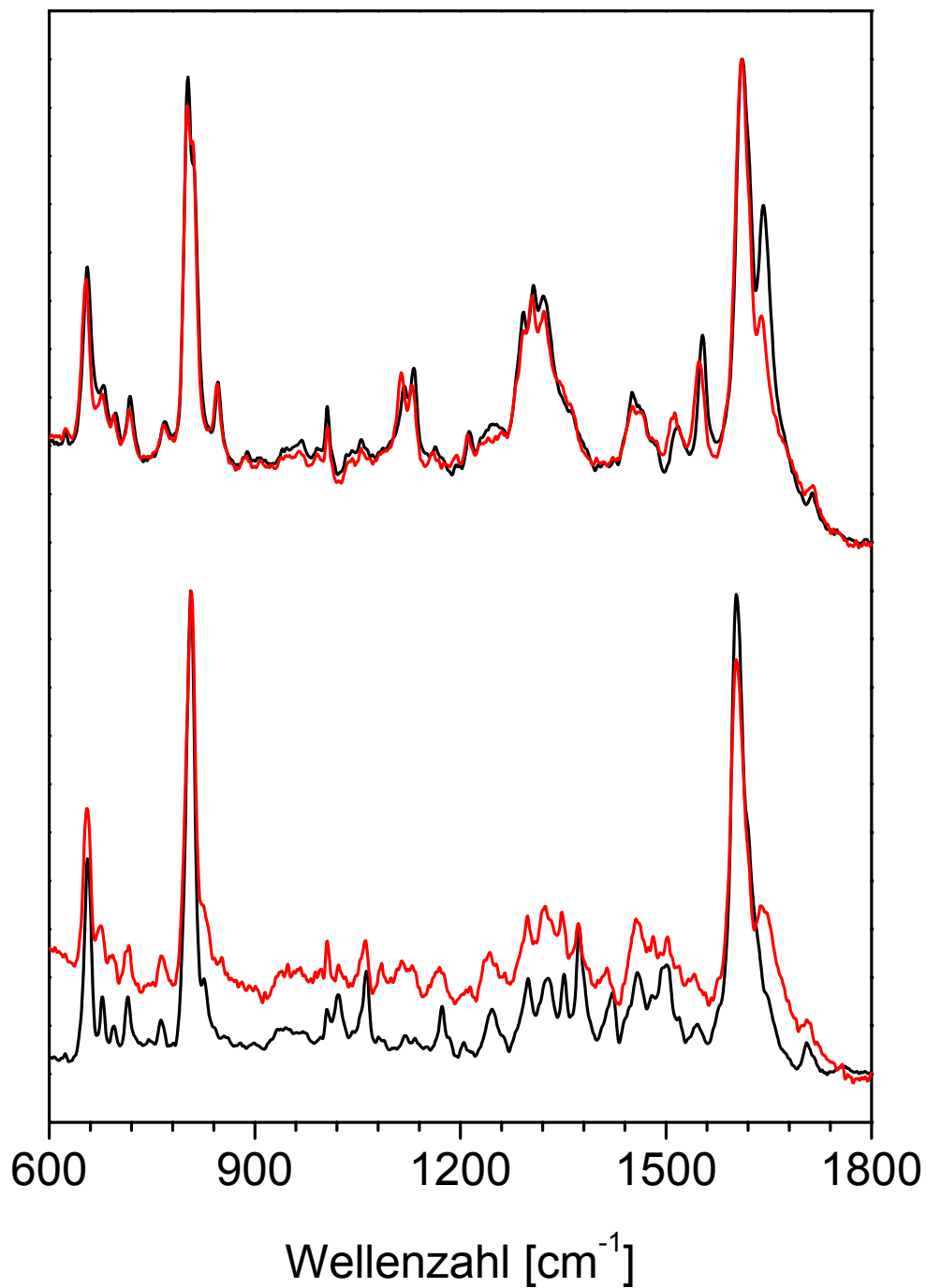


Abb. 21 RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ₂, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen.

Weitere Proteinbanden finden sich im Bereich um 1200-1300 cm⁻¹, hier liegen Moden der Amid III-Bande und Schwingungen der Aminosäureseitenketten. Um 1460 cm⁻¹ liegen Banden, die Deformationsschwingungen von CH₂-Gruppen zugeordnet werden. Im Bereich um 1650 cm⁻¹

schließlich liegen Moden der Amid I-Bande. Im Bereich zwischen $750\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ und um 1070 cm^{-1} gibt es ein Signal, das dem optischen Glas der Sammellinse und dem Fenster des Kryostaten zugeordnet wird.

Das Vorhandensein solcher Banden ist insofern unproblematisch, als ihre Intensität im besonders interessanten Bereich oberhalb von 1500 cm^{-1} im Vergleich zu Signalen des Chromophors sehr gering ist. Dies gilt weniger für den Bereich zwischen 1400 cm^{-1} und 1200 cm^{-1} , die Intensität von Proteinbanden erreicht hier die der Signale des Chromophors. Hierauf wird bei der Interpretation der Spektren Rücksicht genommen. Unterhalb von 1000 cm^{-1} ist die Intensität der Chromophorsignale wieder deutlich stärker, so daß man hier davon ausgehen kann, daß die vorhandenen Hintergrundbanden keinen signifikanten Einfluß auf die Lage und relative Intensität der Chromophorbanden haben.

Durch die Verwendung von Cph1 Δ 2 anstatt Cph1 könnten Unterschiede in den jeweiligen RR-Spektren auftreten. Im Fall von PhyA ergab der Vergleich von Spektren eines C-terminal verkürzten und heterolog exprimierten Konstruktes mit dem nativ aufgereinigten Protein kaum Unterschiede der RR-Spektren (Kneip et al., 1997; Kneip, 1998), die dann unterhalb von 1000 cm^{-1} bei vereinzelt Banden auftraten. Dieser Bereich ist sensitiv auf kleine konformationelle Unterschiede in den Substituenten. Damit kann davon ausgegangen werden, daß die Konfiguration⁶ der Methinbrücken in Cph1 Δ 2 denen des Vollängenproteins entspricht. Dies ist auch angesichts der kaum veränderten UV/vis-Spektren zu erwarten.

2.3.1 Zuordnung der Banden aufgrund ihrer Isotopenverschiebungen

Die Zuordnung einzelner Moden gelingt empirisch aufgrund ihrer unterschiedlichen Lage bei Verwendung verschiedener Isotope und durch Vergleich mit quantenchemisch berechneten Spektren. Bei einem Austausch von sauren Protonen gegen Deuteronen sind die erhaltenen Verschiebungen am stärksten, da der relative Massenzuwachs am größten ist. Teilweise sind die beobachteten Verschiebungen so drastisch, daß eine direkte Zuordnung der neu entstandenen Mode nicht ohne weiteres möglich ist. Im Fall eines Austausches von ^{14}N gegen ^{15}N wird in erster und sehr grober Näherung erwartet, daß die beobachtbaren Veränderungen gering sind und so eine direkte Zuordnung der Banden erfolgen kann. Eine solche klassische Betrachtungsweise stößt bei

⁶ Im folgenden wird vereinfachend von der Konfiguration der Methinbrücken gesprochen, auch wenn damit Konfiguration und Konformation gemeint sind.

quantenphysikalischen Phänomen, wie sie der RR-Spektroskopie zugrunde liegen, jedoch schnell an ihre Grenzen.

In einem ersten Schritt wurden die erhaltenen Banden in ihre Komponenten dekonvuliert. Da *a priori* nicht bekannt ist, wieviele Komponenten in einer Bande enthalten sind, dient als Kriterium für eine plausible Zerlegung die visuelle Inspektion der angepaßten und gemessenen Kurven und die Minimierung der Abweichung zwischen beiden. Nicht immer ist auf diesem Weg eine befriedigende Beschreibung der gemessenen Spektren zu erhalten, was auf eine Reihe von Gründen zurückzuführen sein kann: kleine, wenig intensive oder flache Banden können mitunter nicht korrekt beschrieben werden, die Kurvenanpassung legt eine globale Basislinie fest, die für den betrachteten Bereich jedoch uneinheitlich sein kann und im Fall der durch Subtraktion erhaltenen Pfr-Spektren durchaus noch einen Anteil Pr enthalten kann, der sich nicht anpassen läßt. Teilweise werden Banden, die entweder zum Protein gehören oder aber von residuellem Pr stammen, in der Kurvenanpassung mitberücksichtigt. Dennoch kann i. d. R. auf diesem Weg eine plausible und reproduzierbare Beschreibung der Spektren erfolgen. Abb. 22 verdeutlicht den Sachverhalt. Die auf diesem Wege erhaltenen Bandenmaxima sind mit einer Unsicherheit von $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ behaftet. Bei einer Zuordnung einzelner Banden aufgrund ihrer Isotopenverschiebung wurde als zusätzliches Kriterium noch die visuelle Inspektion der gemessenen Spektren zu Hilfe genommen, um zu einer plausiblen Zuordnung zu gelangen. Der Übersichtlichkeit wegen werden die Spektren in einzelnen Regionen dargestellt: von $1800\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$, von $1400\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ und von $900\text{-}600 \text{ cm}^{-1}$, die Zuordnung einzelner Moden erfolgt für jeden dieser Bereiche ebenfalls separat.

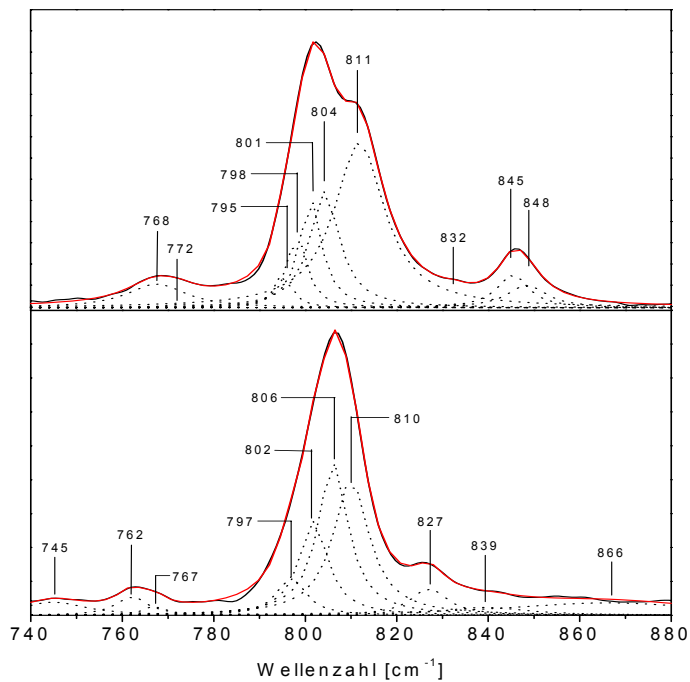


Abb. 22 Bandenanpassung an die Pfr-Form von Cph1Δ2, ¹⁴N-PCB, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten). Die schwarze Kurve zeigt das gemessene, die rote das angepasste Spektrum, die durchbrochenen Linien zeigen die erhaltenen Komponenten. C. Kneip (Kneip, 1998) findet in demselben Bereich für Cph1 folgende Bandenmaxima: (854, 844, 831, 824, 808, 799, 781, 761) cm⁻¹ (H₂O) und (851, 838, 826, 817, 805, 798, 741) cm⁻¹ (D₂O). Eine scheinbare zusätzliche Komponente um 780 cm⁻¹ konnte nicht aufgelöst werden.

2.3.2 Pr-Form

Die Abbildungen 23-25 zeigen die einzelnen Regionen der Pr-Spektren (vgl. Abb. 20) in der Übersicht, die Tabellen 3-5 zeigen die durch Bandenanpassung erhaltenen Maxima.

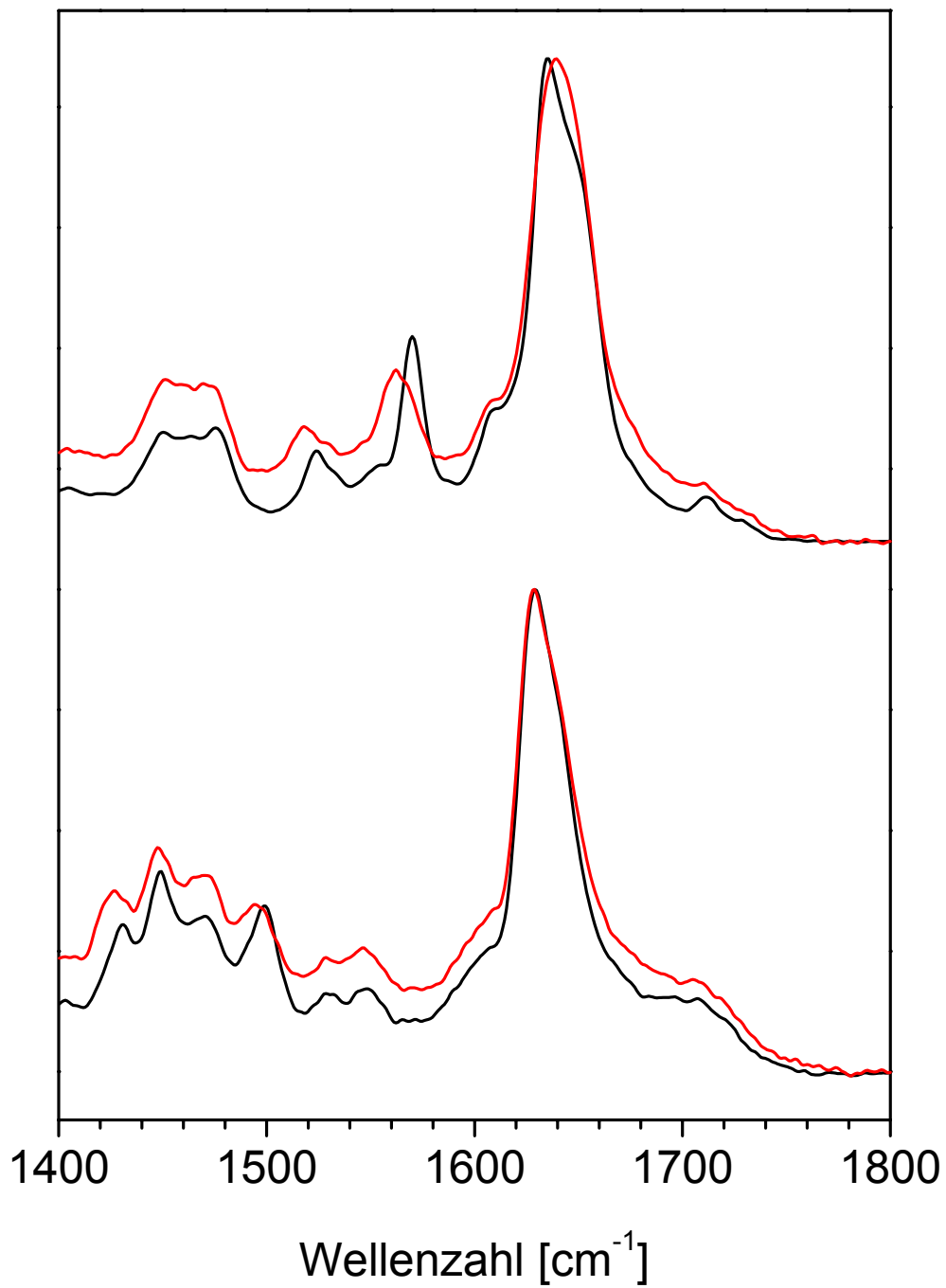


Abb. 23 RR-Spektrum der Pr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen.

$^{14}\text{N}/^1\text{H}$	$^{15}\text{N}/^1\text{H}$	$^{14}\text{N}/^2\text{H}$	$^{15}\text{N}/^2\text{H}$
1653	1651	1639	1639
1642	1641	1630	1629
1633	1632	1624	1624
1609	1607	1605	1608
-	1568	1557	1551
1570	1562	1552	1546
1554	1557	1548	1540
1549	1545	1543	1529
		1537	-
1534	1530	1533	-
1524	1532	1528	-
		1522	-
1477	1476	1502	1501
1464	1469	1498	1495
1455	1461	1491	1487
1449	1451	1474	1475
-	1443	1467	1467
		-	1463
		1454	1453
		1448	1447
		1431	1434
		1426	1427
		-	1421

Tab. 3 Durch Bandenanpassung erhaltene Maxima der Pr-Form im Bereich 1800-1400 cm^{-1} (vgl. Abb. 23). Vorgeschlagene Moden mit einem klaren N-Anteil sind gelb markiert.

Im Bereich zwischen 1700 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} liegen nur wenige Banden. Sie werden C=O-Streckschwingungen zugeordnet (Kneip, 1998; Förstendorf et al., 2001) und zeigen nur geringe Raman-Aktivität. Eine detailliertere Analyse kann mittels FTIR-Spektroskopie erfolgen, da C=O-Streckschwingungen hohe IR-Extinktionskoeffizienten aufweisen. In diesem Frequenzbereich werden jedoch keine anderen Moden erwartet, so daß diese Zuordnung eindeutig ist. Zwischen 1590 cm^{-1} und 1650 cm^{-1} finden sich die intensivsten Signale des gesamten Spektrums. Diese Banden sollten einen starken C=C-, C-C- und C-N-Streckschwingungscharakter aufweisen. Dies wird bestätigt durch das

Verhalten bei Deuterierung: die intensivste Bande um 1640 cm^{-1} verschiebt sich zu niederen Wellenzahlen, diese Verschiebung wird daher auf Moden mit einem starken C-N-Anteil zurückgeführt. Eine Bandenanalyse der protonierten Probe zeigt, daß das intensivste Signal aus mindestens drei einzelnen Komponenten zusammengesetzt ist. Die Komponente bei 1653 cm^{-1} (^{14}N) bzw. 1651 cm^{-1} (^{15}N) weist dabei den stärksten N-Anteil auf. Dieses Verhalten wird durch eine Normalmodenanalyse bestätigt: im betrachteten Bereich werden drei Moden vorhergesagt, von denen diejenige mit der höchsten Frequenz zu über 50% aus einer C-N-Streckschwingung besteht. Bei Deuterierung wird sie aus dem betrachteten Bereich hinaus verschoben. Dieses Verhalten kann als Hinweis auf einen protonierten Chromophor gewertet werden.

Im Frequenzbereich zwischen 1570 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} findet man bei Deuterierung deutliche Veränderungen des Spektrums, ebenso beobachtet man die stärksten Verschiebungen für die protonierte Probe bei Austausch $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$. Beides ist ein Hinweis auf den starken N-Anteil dieser Mode. Die intensivste Bande findet sich bei 1570 cm^{-1} ($^{14}\text{N}/^1\text{H}$). Für eine C-N-Streckschwingung ist diese Frequenz sehr niedrig, so daß davon ausgegangen wird, daß ein signifikanter N-H-*in-plane*- (ip-)Anteil vorliegt. Tatsächlich wird für diese Mode eine fast ausschließliche Zusammensetzung aus N-H-ip-Bestandteilen vorhergesagt (s. unten und Anhang). Aufgrund ihrer drastischen Verschiebung kann diese Bande als Markerbande dienen, um den Erfolg einer Deuterierung experimentell zu überprüfen. Die korrespondierende Bande der N-D-ip-Schwingung wird zwischen 1100 cm^{-1} und 1050 cm^{-1} vorhergesagt. Sie ist ein weiterer Hinweis auf einen protonierten Chromophor von Cph1Δ2.

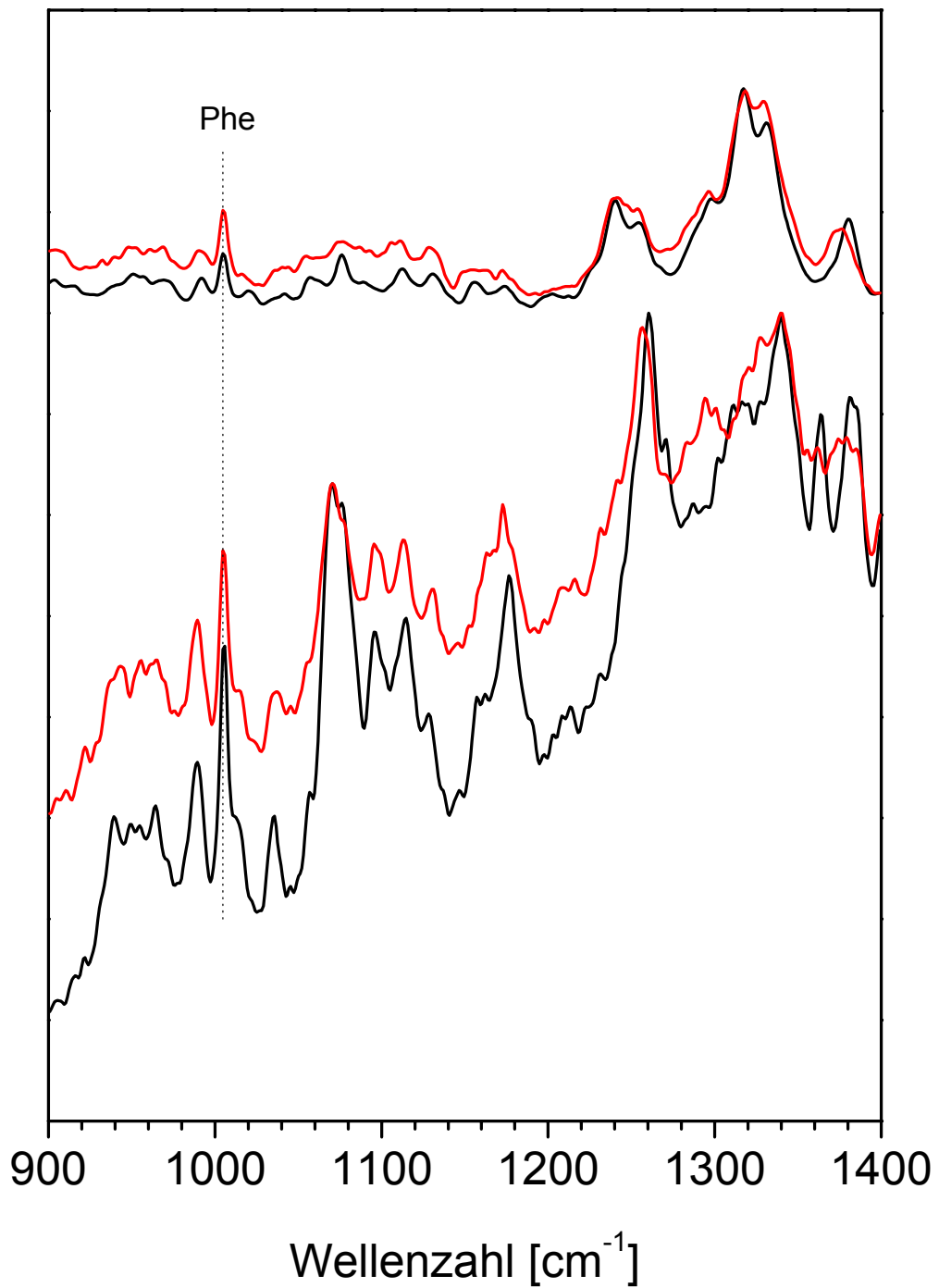


Abb. 24 RR-Spektrum der Pr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen. Die Phenylalanin zugeschriebene Bande ist markiert.

$^{14}\text{N}/^1\text{H}$	$^{15}\text{N}/^1\text{H}$	$^{14}\text{N}/^2\text{H}$	$^{15}\text{N}/^2\text{H}$
1393	1393	1399	1389
-	1387	1386	1386
1380	1377	1381	1379
1372	1370	1376	1374
1346	1346	1365	1369
-	1333	1361	1362
1333	1329	1350	1354
1317	1324	1345	1345
-	1319	1340	1340
-	1313	1335	1335
1297	1296		
1287	1286	1287	1284
1268	1270	1277	1277
1255	1255	1271	1271
1240	1248	1264	1261
-	1243	-	1259
-	1238	1260	1255
-	1234	1252	1248
1225	1224	1244	1241
1202	1207	1238	1232
1174	1172	1231	1223
		1224	-
		1181	1184
		-	1179
		1177	1173
		1173	-

Tab. 4 Durch Bandenanpassung erhaltene Maxima der Pr-Form im Bereich 1400-900 cm^{-1} (vgl. Abb. 24). Vorgeschlagene Moden mit einem klaren N-Anteil sind gelb markiert.

Unterhalb von 1500 cm^{-1} werden Moden erwartet, die starke Anteile von C-C- und C-N-Streckschwingungen sowie C-H- und N-H-ip-Komponenten enthalten. Die relative Zunahme von Banden in diesem Bereich bei Deuterierung kann als Hinweis gewertet werden, daß die C-ND⁺-Koordinate in stärkerem Maße als die C-NH⁺-Koordinate auf mehrere Moden verteilt ist, da man bei Deuterierung lediglich eine Verschiebung um 20-40 cm^{-1} erwarten würde und nicht, wie beobachtet,

um 200 cm^{-1} (Wang & Poirier, 1997). Gleichzeitig sind die beobachteten Signale hier relativ schwach und es treten Banden des Proteins mit vergleichbarer Intensität auf. Von einer detaillierten Auswertung im Bereich unterhalb etwa 1200 cm^{-1} wurde deshalb abgesehen. Dennoch gelingt die Zuordnung von Chromophormoden mit einem teilweise beachtlichen N-Anteil, sowohl in der protonierten als auch der deuterierten Form (Tab. 5). Aufgrund der starken Kopplung der Moden in diesem Bereich mit anderen Koordinaten (Nemeth, K. und Mark, F., aus Kneip, 1998) sollte dieser Bereich besonders sensibel auf kleine konformationelle Details des Chromophors reagieren, deren genaues Verständnis zum heutigen Zeitpunkt jedoch noch nicht möglich scheint.

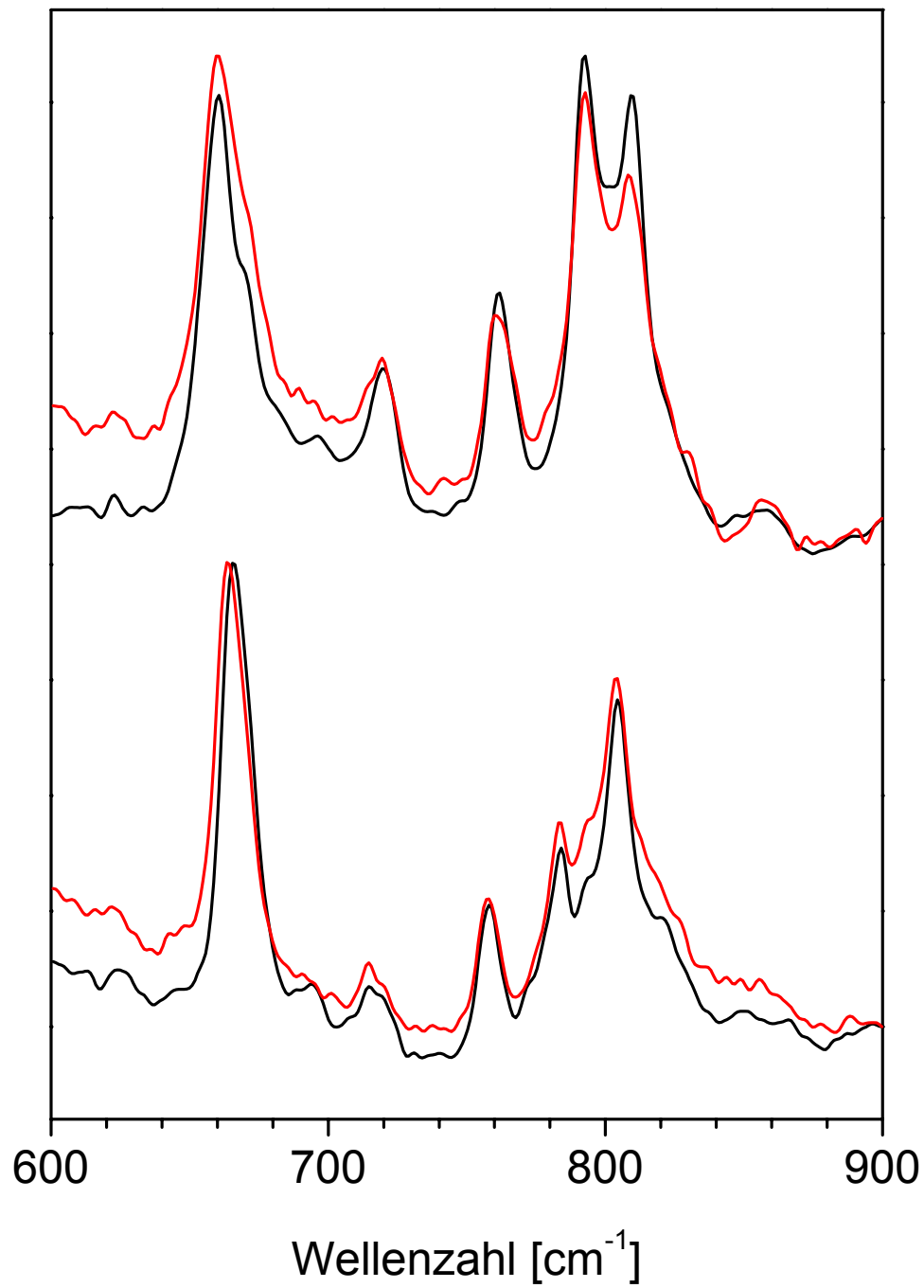


Abb. 25 RR-Spektrum der Pr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ₂, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen.

$^{14}\text{N}/^1\text{H}$	$^{15}\text{N}/^1\text{H}$	$^{14}\text{N}/^2\text{H}$	$^{15}\text{N}/^2\text{H}$
824	831	821	818
-	821	-	813
-	813	804	804
810	809	794	793
801	798	784	783
792	792	776	775
-	778	763	764
-	767	758	758
762	763	755	-
747	759		
740	741	724	-
-	724	720	720
720	720	714	715
711	714		
		671	671
697	690	666	665
684	-	663	662
671	671		
667	662		
664	659		

Tab. 5 Durch Bandenanpassung erhaltene Maxima der Pr-Form im Bereich 900-600 cm^{-1} (vgl. Abb. 25). Vorgeschlagene Moden mit einem klaren N-Anteil sind gelb markiert.

Unterhalb von 900 cm^{-1} zeigen sich wieder stärkere Banden. Im Bereich um 800 cm^{-1} werden sie C-H-out-of-plane- (oop-)Moden der Methinbrücken zugeschrieben (Andel et al., 2000; Matysik et al., 1995; Knipp et al., 1997). Die Intensität dieser Moden soll mit der Torsion der Pyrrolringe korrelieren, die im Vergleich zur Pfr-Form geringe Intensität dieser Moden würde also eine im Vergleich zur Pfr-Form (s. unten) geringere Torsion des Chromophors in der Pr-Form anzeigen. Es ist aber zu beachten, daß solche direkten strukturellen Interpretationen aus Schwingungsspektren problematisch sind. Im Vergleich zu PhyA sind diese Moden in Cph1 klarer separiert (Remberg et al., 1997), unabhängig vom eingebauten Chromophor (PCB oder PΦB). Dies wird entsprechend als Hinweis gewertet, daß die Torsionen zwischen den einzelnen Ringen in Cph1 etwas verändert ist. Die Veränderungen bei Austausch $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ und bei Deuterierung deuten auf

Kopplungen mit N-H-oop-Koordinaten. Dies wird von einer Normalkoordinatenanalyse bestätigt. Der Bereich um 660 cm^{-1} weist Deformations- und Biegeschwingungen der Pyrrolringe aus (von Stetten, 2005). Daher ist es nicht überraschend, hier eine leichte, aber deutliche Kopplung mit N-haltigen Koordinaten festzustellen, allerdings bleibt auch nach einer Bandenanpassung unklar, ob die beobachtete Verschiebung auf einer oder mehreren Banden lokalisiert ist.

2.3.3 Pfr-Form

Die Abbildungen 26-28 zeigen die einzelnen Regionen der Pfr-Spektren (vgl. Abb. 21) in der Übersicht, die Tabellen 6-8 zeigen die durch Bandenanpassung erhaltenen Maxima.

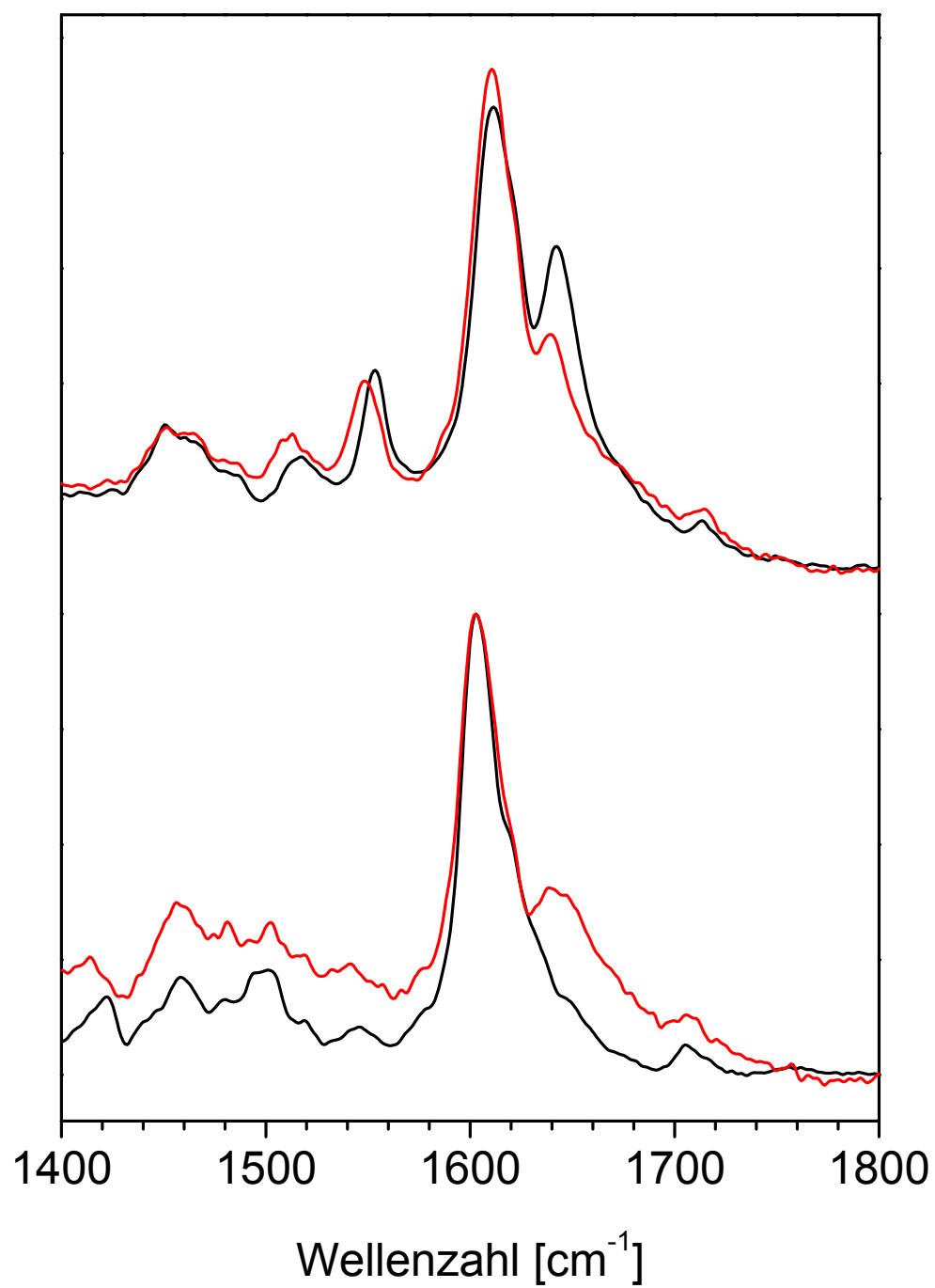


Abb. 26 RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen.

$^{14}\text{N}/^1\text{H}$	$^{15}\text{N}/^1\text{H}$	$^{14}\text{N}/^2\text{H}$	$^{15}\text{N}/^2\text{H}$
1648	1642	1646	1649
1641	1637	1633	1638
1623	1619	1620	1620
1616	1612	1609	1609
1608	1606	1603	1600
-	1555	1578	1578
1553	1548	1505	1502
-	1524	1500	-
1518	1519	1494	1493
1511	1513	1479	1481
1502	1506	-	1474
		-	1467
1488	1487	1462	1463
1481	1480	1456	1457
1467	1469	1447	-
1461	1465	1439	-
1455	1460	1422	1421
1451	1451	1415	1414
1438	1443	1406	1408
		-	1400

Tab. 6 Durch Bandenanpassung erhaltene Maxima der Pfr-Form im Bereich 1800-1400 cm^{-1} (vgl. Abb. 26). Vorgeschlagene Moden mit einem klaren N-Anteil sind gelb markiert.

Für den Frequenzbereich zwischen 1700 cm^{-1} und 1750 cm^{-1} finden sich im Spektrum der Pfr-Form ebenfalls Moden mit einem C=O-Streckschwingungscharakter, sie sind jedoch noch schlechter als in der Pr-Form zu erkennen. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da für eine voll phototransformierte Probe lediglich ein Anteil von 70% Pfr erreicht werden kann. Das breite und unstrukturierte Signal oberhalb von 1650 cm^{-1} in den Spektren der deuterierten Form geht auf die Amid III-Bande zurück. Um 1630 cm^{-1} wird das Signal der C=C- und C=N-Streckschwingungen gefunden, das qualitativ das gleiche Verhalten wie in der Pr-Form aufweist, jedoch sind alle Moden zu tieferen Wellenzahlen verschoben. Eine solche Verschiebung läßt sich nicht allein durch eine Z \rightarrow E-Isomerisierung zwischen den Ringen C und D erklären: die Berechnung der Normalmoden der möglichen 15Z- und 15E-Isomere zeigt keine deutlichen Verschiebungen zu tieferen Wellenzahlen (Fodor et al., 1990; Andel et

al.; 1996; Mroginski et al., 2004), unabhängig vom benutzten Verfahren. Da es keine Hinweise auf eine weitere Doppelbindungsisomerisierung gibt (Rüdiger et al., 1983) könnte die beobachtete Frequenzverschiebung auf eine Rotation um eine Einfachbindung zurückzuführen sein. Tatsächlich ist eine Rotation um die Einfachbindung der Ringe A und B in der Lage den beobachteten Effekt qualitativ wiederzugeben (Mroginski et al., 2004). Die Mode mit dem stärksten N-Anteil bei 1641 cm^{-1} in der protonierten Form ist deutlich von den Moden mit einem stärkeren C=C-Streckschwingungsanteil abgesetzt. Sie weist einen wesentlich geringeren Anteil einer C-N-Streckschwingung als die entsprechende Mode in der Pr-Form auf. Die allgemeine Tendenz einer Verschiebung zu tieferen Wellenzahlen findet sich ebenfalls für die einen starken N-Anteil aufweisende Mode bei 1553 cm^{-1} ($^{14}\text{N}/^1\text{H}$). Aufgrund ihres analogen Verhaltens bei Austausch $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ und bei Deuterierung wird diese Bande einen ähnlichen Charakter wie die im Pr-Spektrum bei 1570 cm^{-1} auftauchende haben. Die geringere Isotopenverschiebung bei Austausch $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ (5 cm^{-1} anstatt 7 cm^{-1} in der Pr-Form) kann durch einen Anteil einer C-C-Streckschwingung erklärt werden, die eine Normalmodenberechnung der ZZEssa-Konfiguration findet. Dieser Anteil findet sich nicht für die Pr-Form. Zusammenfassend kann anhand dieser Befunde davon ausgegangen werden, daß der Chromophor auch in der Pfr-Form protoniert ist.

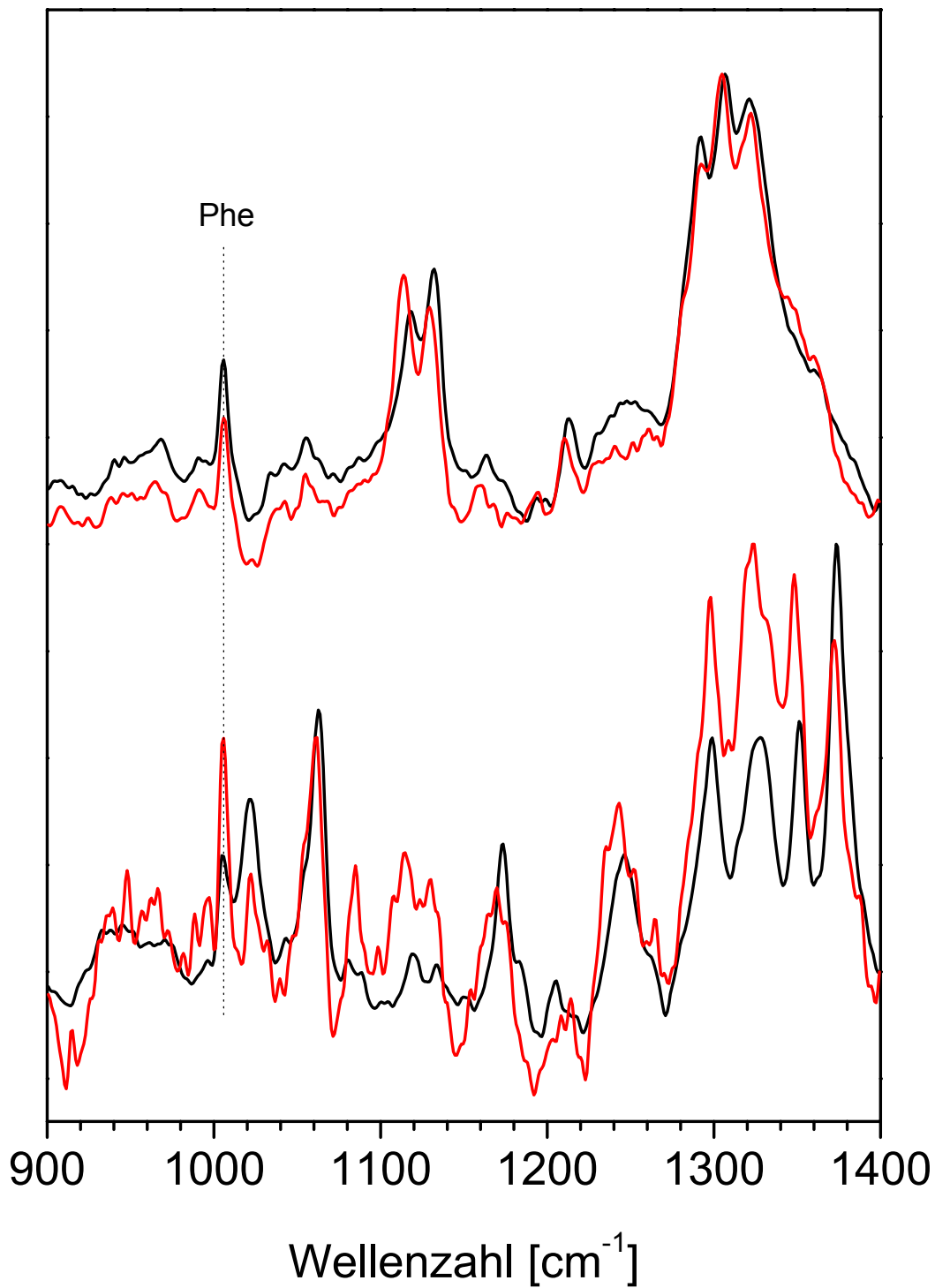


Abb. 27 RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (oben) und D₂O (unten) gemessen. Die Phenylalanin zugeschriebene Bande ist markiert.

$^{14}\text{N}/^1\text{H}$	$^{15}\text{N}/^1\text{H}$	$^{14}\text{N}/^2\text{H}$	$^{15}\text{N}/^2\text{H}$
1366	-	1390	1389
1360	1360	1381	-
1343	1322	1373	1372
1332	1317	1362	-
1327	1309	1351	1349
1320	1305	1342	-
1306	1301	1330	1332
1292	1293	1322	1323
1283	1282	1314	1318
1217	1216	-	1309
1212	1211	1299	1297
1131	1128	1252	1252
1118	1115	1246	1243
1108	1111	1239	1236
		1228	1214
		1185	1175
		1173	1169
		1164	-

Tab. 7 Durch Bandenanpassung erhaltene Maxima der Pfr-Form im Bereich 1400-900 cm^{-1} (vgl. Abb. 27). Vorgeschlagene Moden mit einem klaren N-Anteil sind gelb markiert.

Im Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} wird bei Deuterierung ein der Pr-Form vergleichbares Verhalten beobachtet, also ein quantitativer Zuwachs an Banden, bei gleichzeitiger schwacher relativer Intensität. Auffallend sind die intensiven Signale um 1120 cm^{-1} im protonierten Zustand: ein vergleichbares Bandenmuster fehlt in der Pr-Form. Im Pfr-Spektrum von PhyA wird in diesem Frequenzbereich keine Struktur vergleichbarer Intensität gefunden (Kneip et al., 1999). Die Sensitivität dieser Struktur auf H/D-Austausch und ihr deutlicher N-Anteil deuten auf Moden mit starken C-N-Streckschwingungsanteilen, die auch in einer Normalmodenberechnung für diesen Bereich vorhergesagt werden. Bei Deuterierung scheinen sich diese Moden auf mehrere andere im Bereich zwischen 1200-1350 cm^{-1} zu verteilen, deren Identifizierung nur noch teilweise gelingt.

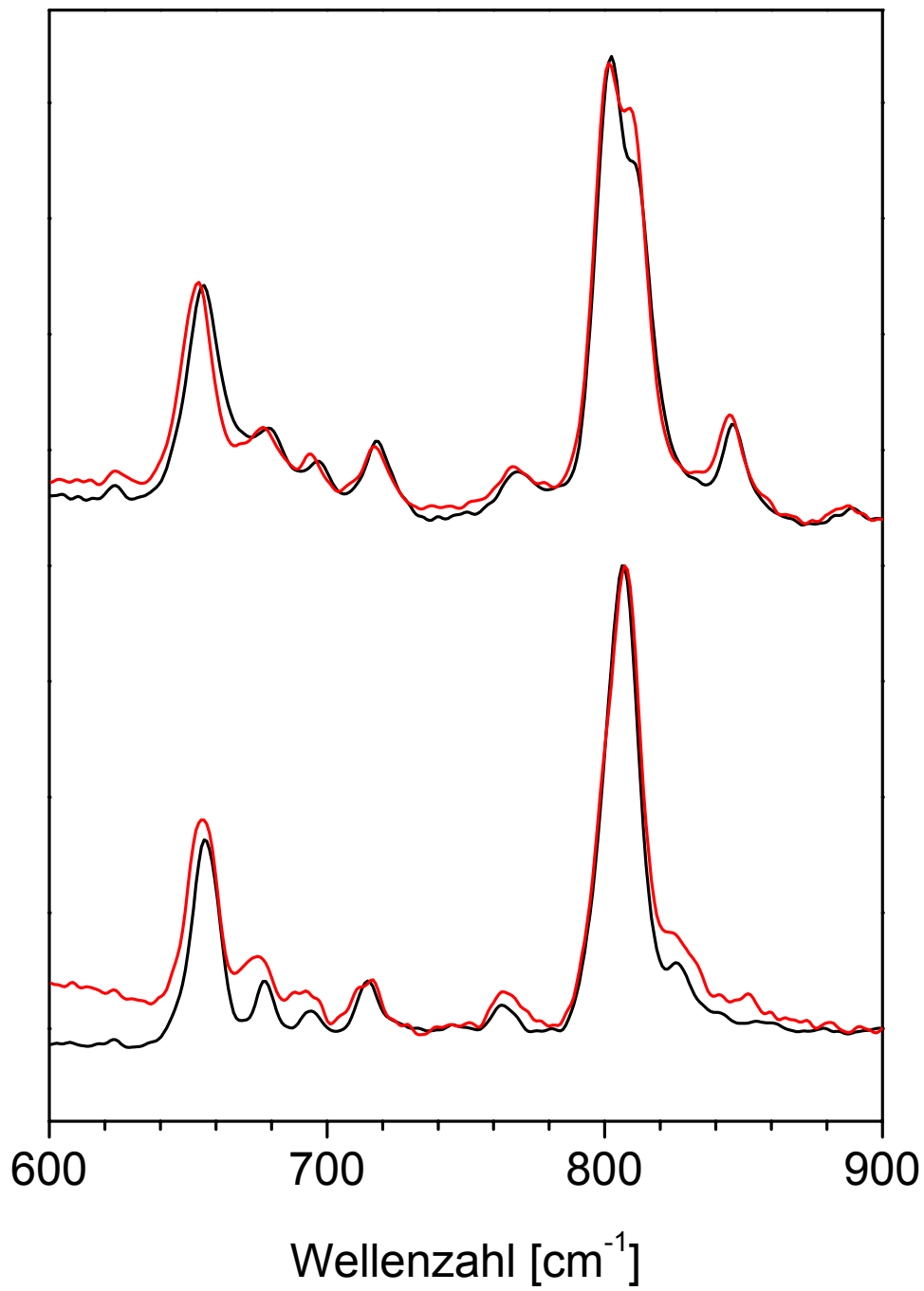


Abb. 28 RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ^{14}N - (schwarz) und ^{15}N - (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1 Δ 2, jeweils in H_2O (oben) und D_2O (unten) gemessen.

$^{14}\text{N}/^1\text{H}$	$^{15}\text{N}/^1\text{H}$	$^{14}\text{N}/^2\text{H}$	$^{15}\text{N}/^2\text{H}$
848	-	839	832
845	845	827	825
832	831	810	810
811	813	806	806
804	809	802	799
801	802	797	-
798	798	767	765
795	763	762	761
772	774	745	-
718	717	714	716
-	708	-	710
698	695	697	696
680	678	692	691
666	669	678	676
-	655	661	-
655	651	657	655
		655	-
		652	-

Tab. 8 Durch Bandenanpassung erhaltene Maxima der Pfr-Form im Bereich 900-600 cm^{-1} (vgl. Abb. 28). Vorgeschlagene Moden mit einem klaren N-Anteil sind gelb markiert.

Im Bereich unterhalb von 900 cm^{-1} wird ein qualitativ ähnliches Verhalten wie in der Pr-Form beobachtet, die Bande um 810 cm^{-1} ist jedoch wesentlich intensiver. In allen Markierungsmustern der Pfr-Form weist diese Bande die höchste relative Intensität auf, die sogar noch die der Banden im Bereich zwischen 1600-1650 cm^{-1} übersteigt. Diese Bande wurde einer C15-HOOP-Mode von PhyA zugeordnet (s. oben), also genau an der Methinbrücke, an der es zu einer Änderung der Konfiguration kommt. Sie gewinnt Ramanaktivität durch Torsion der beiden Ringe C und D und ist ein Hinweis auf eine größere Abweichung von einer planaren Geometrie in der Pfr-Form. Für 15E-anti-Isomere von PCB, PΦB und BV ist dies nicht überraschend, da die beiden Methylgruppen an C13 und C17 eine planare Geometrie durch gegenseitige sterische Interaktionen behindern. Ein gewisser N-Anteil dieser Mode zeigt Kopplungen mit N-H-oop-Schwingungen an. Die für solche Moden recht hohe Lage deutet auf eine Einbindung der entsprechenden Pyrrolstickstoffe in Wasserstoffbrücken hin. Eine interessante Beobachtung hinsichtlich dieser Bande ist von Kneip gemacht worden: sie fand eine

Verschiebung des Maximums der entsprechenden Bande für PhyA, die mit der Abkühlungsgeschwindigkeit der Probe korrelierte (Kneip, 1998). Diese Verschiebung wurde mit der Existenz konformationeller Subzustände des Chromophors in der Pfr-Form bei Raumtemperatur in Verbindung gebracht. Eine Temperaturabhängigkeit des Maximums dieser Bande wird auch von Matysik gefunden (Matysik et al., 1995). Die hier gemessenen Proben können alle als schockgefroren betrachtet werden. Damit wäre das Gleichgewicht konformationeller Subzustände bei Raumtemperatur konserviert, eine genaue Analyse scheint zum jetzigen Zeitpunkt jedoch verfrüht. Auffallend ist ein qualitativer Unterschied zur Pr-Form: dort liegen die entsprechenden Banden deutlich separiert vor (s. Abb. 25), während sie in der Pfr-Form zusammenfallen. Die Abfolge mehrerer kleiner, N-haltiger Banden im Bereich 700-660 cm^{-1} kann N-H-oop-Moden der einzelnen Ringe zugeschrieben werden. Der intensiven Bande um 650 cm^{-1} liegen, wie in der Pr-Form, Biege- und Torsionsschwingungen der Pyrrolringe zugrunde.

2.3.4 Vergleich der gemessenen mit berechneten Spektren

Durch einen Vergleich von berechneten mit gemessenen Spektren können Rückschlüsse auf die Konformation und Konfiguration der Methinbrücken des Chromophors gezogen werden. Gleichzeitig ist auf diesem Wege eine detaillierte Modenzuordnung möglich. Anhand von RR-Messungen sind für die Pr- und die Pfr-Form bisher je zwei unterschiedliche Konfigurationen für den Chromophor von PhyA vorgeschlagen worden. Hierbei handelt es sich zum einen um die ZZZasa- oder ZEZaas-Konfiguration für die Pr-Form und die ZEEaaa- oder ZZEsa-Konfiguration für die Pfr-Form (Mroginski et al., 2004; Andel et al., 2000; s. Einleitung). Auf die trotz unterschiedlicher Chromophore (PΦB, PCB, BV) hohe qualitative Ähnlichkeit aller bisher mit RR-Spektroskopie untersuchten Phytochrome (PhyA, Cph1, Agp1) ist mehrfach hingewiesen worden (Remberg et al., 1997; Kneip, 1998; von Stetten, 2005). Daher wird davon ausgegangen, daß im Fall von Cph1 bzw. Cph1Δ2 die für PhyA vorgeschlagenen Chromophorkonfigurationen ebenfalls relevant sind. Die für die verschiedenen Konfigurationen berechneten Spektren werden im Folgenden mit den experimentellen verglichen, Abbildung 29 zeigt die entsprechenden Spektren in der Übersicht. Die berechneten Spektren wurden dankenswerterweise von David von Stetten und Maria-Andrea Mroginski (TU Berlin) zur Verfügung gestellt.

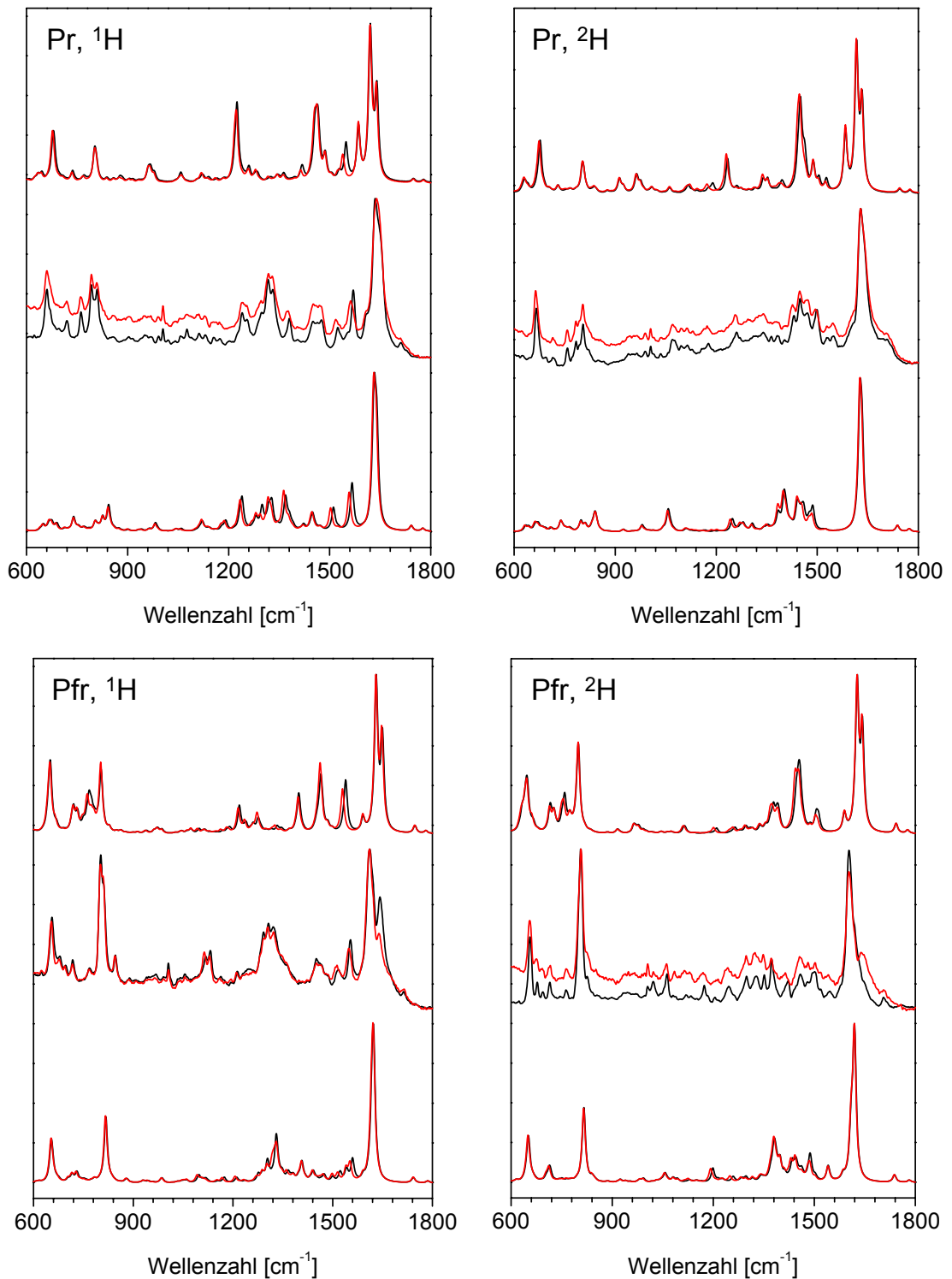


Abb. 29 Theoretische und experimentelle RR-Spektren der Pr- und Pfr-Formen von mit ^{14}N - (schwarz) und ^{15}N - (rot) markiertem PCB rekonstituiertem Cph1 Δ 2, jeweils in H_2O (links) und D_2O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEZaaS-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZZasa-Konfiguration unten gezeigt.

Bei einem Vergleich der berechneten mit den gemessenen Spektren müssen die Defizite und Annahmen der Berechnungen berücksichtigt werden, für Details der verwendeten Verfahren und Skalierungsfaktoren wird auf die Literatur verwiesen (von Stetten, 2005; Mroginski et al., 2004; Magdo et al. 1999; Mroginski et al., 2000; Becke, 1993), das folgende gilt sinngemäß auch für die Berechnung von ^{15}N -chemischen Verschiebungen für verschiedene Chromophorkonfigurationen (s. 2.4, NMR-Spektroskopie). Die größte Vereinfachung besteht vor allem in der Vernachlässigung von Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein, da die Struktur des Chromophors *in vacuo* berechnet wird. Wechselwirkungen zwischen Protein und Chromophor, die einen Einfluß auf die Chromophorstruktur haben könnten, können daher natürlich nicht abgeschätzt werden. Einige der Substituenten des Tetrapyrrolgrundgerüsts werden erheblich mit dem Protein wechselwirken (s. Einleitung), die Zuordnung von Moden, die starke Anteile solcher Gruppen zeigen, wird also problematisch sein. Die beiden Propionatseitenketten wurden für die Simulationen gegen ihre Methylester ausgetauscht, um intramolekulare Wasserstoffbrücken bei der Geometrieoptimierung zu verhindern, die im Protein so wahrscheinlich nicht existieren. Dies ist insofern unproblematisch, als carboxylische C=O-Streckschwingungen ohnehin nur eine geringe Ramanaktivität aufweisen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Veresterung dieser Gruppen nur einen geringen Einfluß auf die berechneten Spektren im Frequenzbereich unterhalb 1000 cm^{-1} hat (Mroginski et al., 2004). Die im Protein vorhandene Thioetherverknüpfung wurde durch eine Ethylseitenkette ersetzt. Zur Ladungskompensation des einfach geladenen Chromophors wurde ein Chloridion benutzt. Resonanzeffekte werden von dem benutzten Verfahren nicht mitberechnet. Weiterhin werden die Intensitäten von Moden mit starkem C-N-Streckschwingungsanteil und Methylgruppendeformationen systematisch überschätzt. Für Biline betrifft dies hauptsächlich den Frequenzbereich zwischen $1200\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ (s. oben). Die Übereinstimmung der berechneten und gemessenen Banden wird für PhyA im Mittel mit $\pm 11\text{ cm}^{-1}$ angegeben.

Die Struktur des Chromophors ist durch die Konfiguration der Methinbrücken nur unvollständig beschrieben. Die einzelnen Substituenten können eine Vielzahl von Konformationen einnehmen, die wahrscheinlich in manchen Fällen von Wechselwirkungen mit dem Protein beeinflusst sein werden. Für die Konformation einzelner Propionatseitenketten konnte ein Einfluß auf die berechneten Spektren praktisch ausschließlich im Bereich unterhalb von 1000 cm^{-1} gefunden werden (von Stetten, 2005; Mroginski et al., 2004). Aus dem oben ausgeführten und der erwarteten Lage einzelner Arten von Schwingungen wie Streck- und Deformationsschwingungen, ergibt sich eine Einteilung in drei spektrale Bereiche, die sich in ihrer Aussagekraft hinsichtlich der Bestimmung der Methinbrückenkonfiguration unterscheiden. Zwar finden auch andere strukturelle Eigenschaften des

Chromophors ihren Niederschlag in den gemessenen Spektren, doch ist ein detailliertes Verständnis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Am charakteristischsten für die Konfiguration der Methinbrücken ist der Bereich zwischen 1500 cm^{-1} und 1700 cm^{-1} . Diese Region enthält vor allem C=C-, C-C- und C-N-Streckschwingungen. Sie reagiert recht unempfindlich auf unterschiedliche Konformation einzelner Substituenten, spiegelt aber Veränderungen an den Methinbrücken sehr empfindlich und auf charakteristische Weise wieder. Weiterhin sind die erhaltenen Signale in diesem Bereich auf wenigen Moden lokalisiert und deutlich erkennbar.

Im Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1500 cm^{-1} liegen ebenfalls C-C- und C-N-Streckschwingungen, die aber stark mit anderen Koordinaten koppeln. Die gemessenen Signalintensitäten sind relativ schwach und zahlreich. Es treten Signale des Proteins auf, deren Intensität mit denen des Chromophors vergleichbar sind. Eine genaue Unterscheidung gelingt nicht in allen Fällen (s. oben). Die Übereinstimmung der berechneten und gemessenen Spektren in diesem Bereich dient also lediglich als untergeordnetes Entscheidungskriterium. Unterhalb von 1000 cm^{-1} werden Signale erwartet, die C-H- und N-H-oop-Moden enthalten. Dieser Bereich ist auch empfindlich auf die Konformation der Substituenten. Für eine Entscheidung über die Konfiguration nur der Methinbrücken ist eine Übereinstimmung mit den gemessenen Spektren in diesem Bereich unerheblich. Es wurden weiterhin die Ramanspektren sämtlicher verwendeter Isotopensubstituierungen berechnet. Die Reproduzierbarkeit der beobachteten Verschiebungen dient als weiteres Kriterium für eine Entscheidung über die Richtigkeit einer Chromophorkonfiguration.

Die Zuordnung einzelner Moden gelingt für die unterschiedlichen Spektralbereiche unterschiedlich gut. Eine detaillierte Aufstellung findet sich im Anhang.

2.3.5 Pr-Form

Die Abbildungen 30-32 zeigen die gemessenen und berechneten Spektren für die Pr-Form. Die gemessenen Spektren entsprechen den in Abschnitt 2.3.2 schon gezeigten.

2.3.5.1 1800 – 1400 cm⁻¹

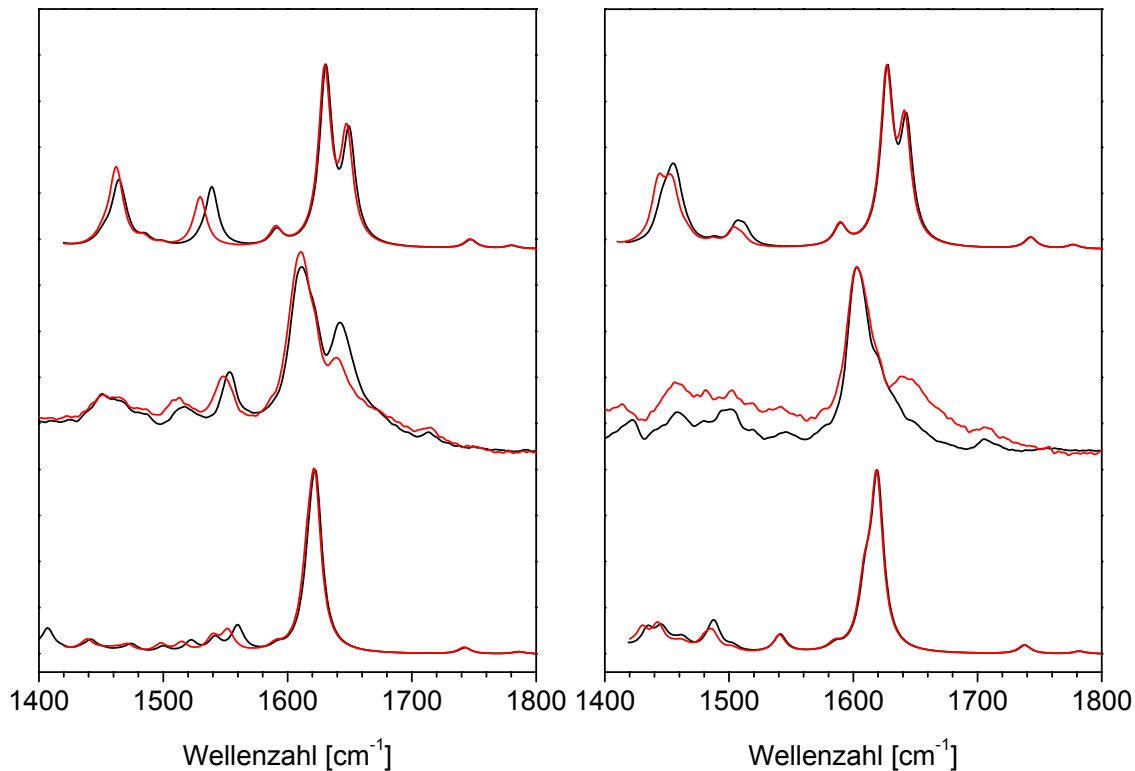


Abb. 30 Theoretische und experimentelle RR-Spektrum der Pr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (links) und D₂O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEEaas-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZZasa-Konfiguration unten gezeigt.

In diesem für die Chromophorkonfiguration besonders charakteristischen Bereich reproduziert das für die ZZZasa-Konfiguration berechnete Spektrum die experimentellen Befunde für die Pr-Form deutlich besser als die ZEEaas-Konfiguration. In der protonierten Form werden für beide Konfigurationen alle erkennbaren Banden an realistischen Positionen reproduziert. Die für die ZEEaas-Konfiguration berechnete Doppelbande um 1640 cm⁻¹ könnte durchaus in der gemessenen, breiten Struktur bei entsprechender Position enthalten sein. Das Signal um 1590 cm⁻¹ wird jedoch nicht korrekt beschrieben: hier ist ein deutlicher N-Anteil der beteiligten Moden festzustellen, der nicht gefunden wird. Die ZZZasa-Konfiguration beschreibt dagegen die Struktur um 1640 cm⁻¹ in akzeptabler Weise und gibt das Verhalten der beiden Signale bei 1590 cm⁻¹ und 1510 cm⁻¹ korrekt wieder. Dies gilt auch für das in D₂O gemessene Spektrum.

2.3.5.2 1400-900 cm⁻¹

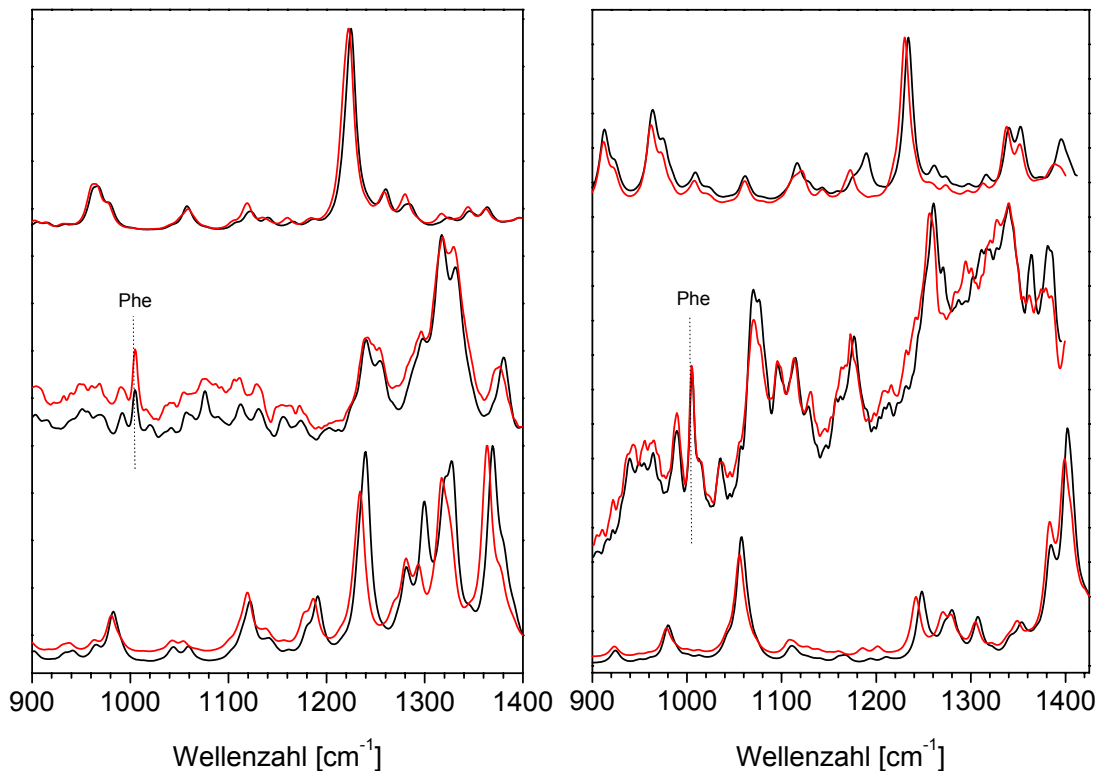


Abb. 31 Theoretische und experimentelle RR-Spektrum der Pr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (links) und D₂O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEZaas-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZZasa-Konfiguration unten gezeigt. Die Phenylalanin zugeschriebene Bande ist markiert.

Die ZEZaas-Konfiguration reproduziert für die in H₂O gemessenen Spektren nicht die intensiven Signale oberhalb von 1250 cm⁻¹. Trotz der bekannten Schwäche in der Berechnung von Ramanintensitäten sollten in diesem Bereich stärkere Banden zu erwarten sein. Im Fall der ZZZasa-Konfiguration können alle Signale in befriedigendem Umfang zugeordnet werden und die gemessenen Isotopenverschiebungen werden annähernd reproduziert. Für die in D₂O gemessenen Spektren ist eine Bewertung problematischer, da die erhaltenen Signale zu verrauscht sind, um zu einer klaren Entscheidung zu gelangen. Die vergleichsweise schlechte spektrale Qualität erklärt sich durch eine vorhergesagte geringere Resonanzverstärkung des deuterierten Chromophors. Dieser Effekt zeigt sich entsprechend auch für die Pfr-Form und ist in den gemessenen Spektren erkennbar an der relativen Intensität der Phenylalaninbande bei 1005 cm⁻¹.

2.3.5.3 900-600 cm^{-1}

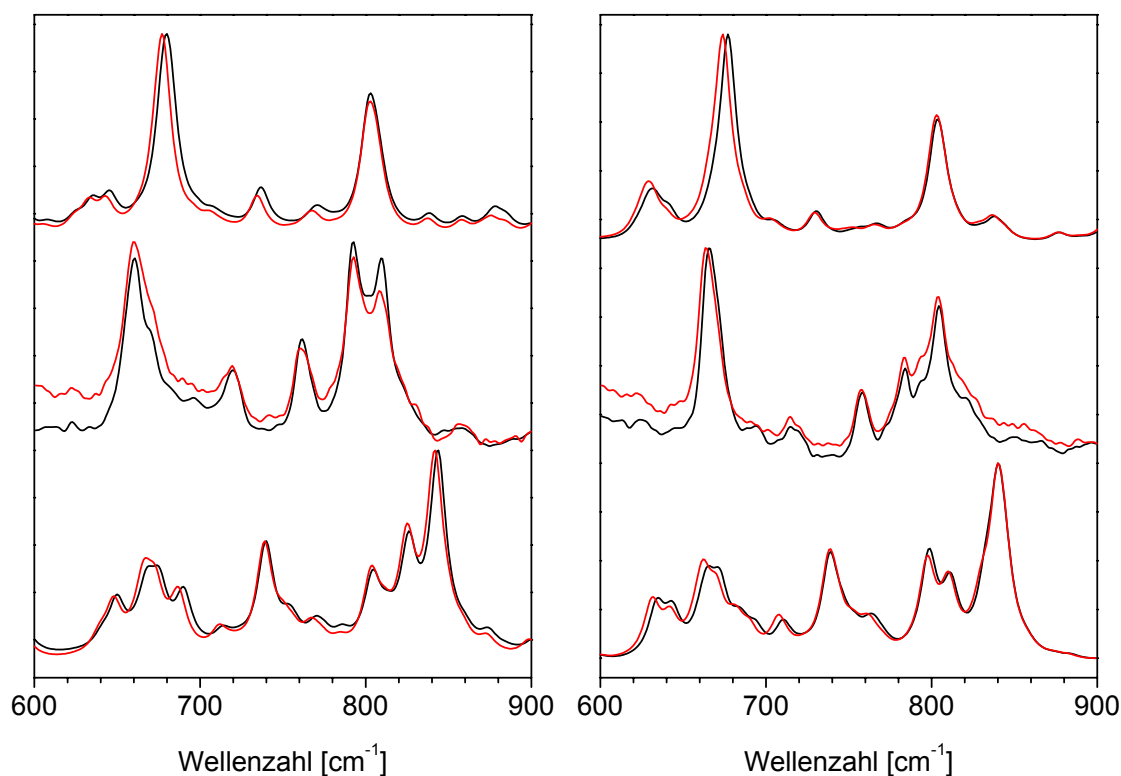


Abb. 32 Theoretische und experimentelle RR-Spektrum der Pr-Form von mit ^{14}N - (schwarz) und ^{15}N - (rot) rekonstituiertem Cph1 Δ 2, jeweils in H_2O (links) und D_2O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEZaa-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZZasa-Konfiguration unten gezeigt.

Wie erwähnt werden die Ramanspektren im Frequenzbereich unterhalb 1000 cm^{-1} stärker als in den anderen Bereichen von der Konformation der Substituenten beeinflusst. Daher ist es nicht überraschend, hier keine klaren Übereinstimmungen zwischen den theoretischen Spektren beider Konfigurationen zu finden. Eine genaue Zuordnung einzelner Moden ist hier mitunter zweifelhaft.

2.3.6 Pfr-Form

Die Abbildungen 33-35 zeigen die gemessenen und berechneten Spektren für die Pfr-Form. Die gemessenen Spektren entsprechen den in Abschnitt 2.3.3 schon gezeigten.

2.3.6.1 1800-1400 cm⁻¹

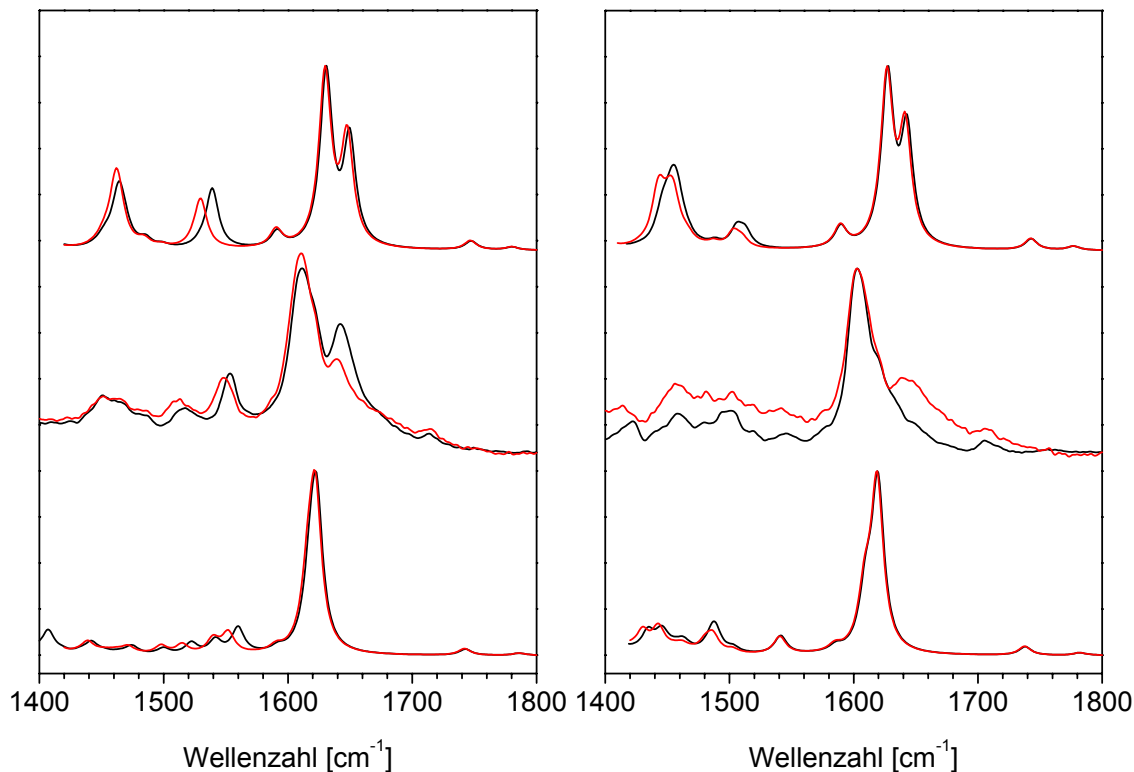


Abb. 33 Theoretische und experimentelle RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (links) und D₂O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEEaaa-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZEssa-Konfiguration unten gezeigt.

Im Fall der Pfr-Form ist die Übereinstimmung zwischen gemessenen und berechneten Spektren nicht so augenfällig wie für die Pr-Form. Beide vorgeschlagenen Konfigurationen geben die gemessene allgemeine Frequenzerniedrigung im Bereich zwischen 1500-1650 cm⁻¹ korrekt wieder. Die ZEEaaa-Konfiguration beschreibt die beobachtete Doppelbande bei 1640 cm⁻¹ der protonierten Form scheinbar besser als die ZZEssa-Konfiguration. Für die ZZEssa-Konfiguration wird eine relativ scharfe Bande vorhergesagt, die aus 3 einzelnen Moden besteht. Dies wird auch in der Bandenanpassung der gemessenen Spektren gefunden. Somit kann die ZZEssa-Konfiguration noch nicht ausgeschlossen werden. Das Signal um 1550 cm⁻¹ wird annähernd von beiden Konfiguration beschrieben, ebenso wie die Isotopenverschiebung bei Austausch ¹⁴N/¹⁵N. Das schwache Signal um 1520 cm⁻¹ wird lediglich von der ZZEssa-Konfiguration wiedergegeben. Im Fall der in D₂O gemessenen Spektren ist für die ZEEaaa-Konfiguration die Differenz der berechneten und gemessenen Frequenzen (15-20 cm⁻¹) für die intensive Bande bei 1610 cm⁻¹ deutlich größer als die Genauigkeit des verwendet Verfahrens (im Mittel

$\pm 11 \text{ cm}^{-1}$). Für die ZZEssa-Konfiguration ist die Übereinstimmung der Frequenzen ebenfalls nicht sehr gut, jedoch besser als im Fall der ZEEaaa-Konfiguration.

2.3.6.2 1400-900 cm^{-1}

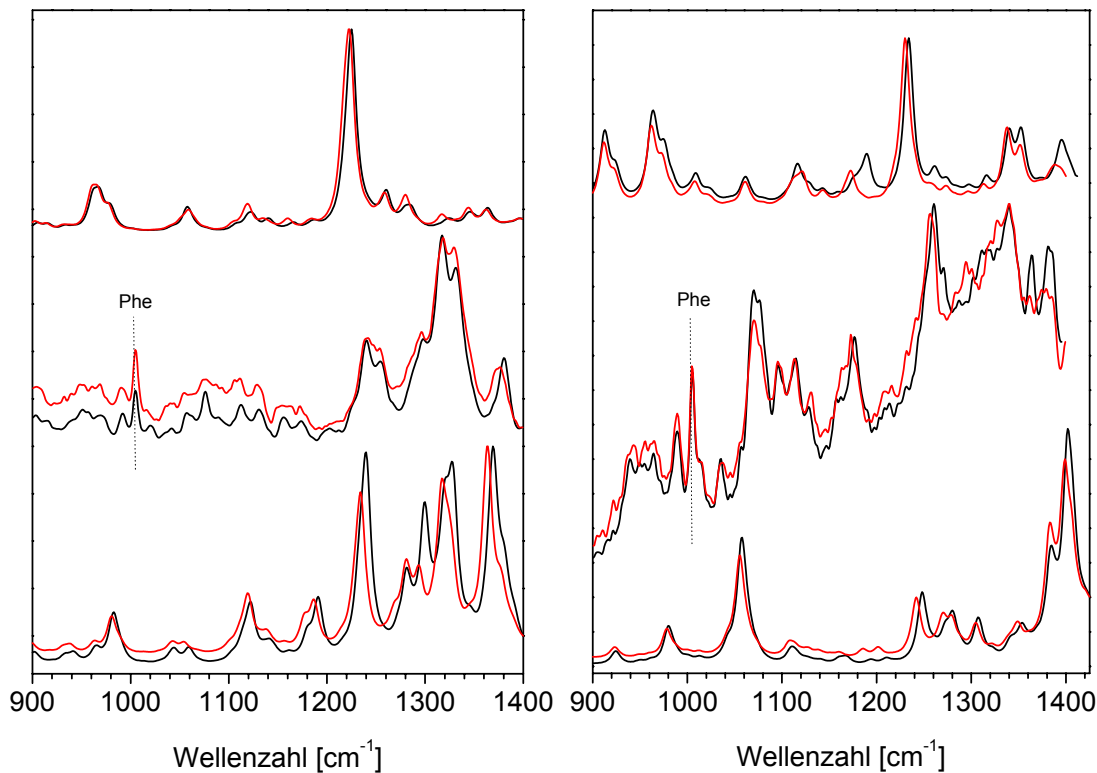


Abb. 34 Theoretische und experimentelle RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ^{14}N - (schwarz) und ^{15}N - (rot) rekonstituiertem Cph1 Δ 2, jeweils in H_2O (links) und D_2O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEEaaa-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZEssa-Konfiguration unten gezeigt. Die Phenylalanin zugeschriebene Bande ist markiert.

Für den Frequenzbereich zwischen 1400-900 cm^{-1} erscheint keine der beiden Konfigurationen die gemessenen Spektren in befriedigendem Maß zu beschreiben. Die intensiven Signale zwischen 1300-1350 cm^{-1} werden annähernd korrekt im Fall der ZZEssa-Konfiguration vorhergesagt, wenn auch mit schlechter Übereinstimmung hinsichtlich der Ramanintensitäten. Die für Cph1 Δ 2 charakteristische Doppelbande bei 1130 cm^{-1} und 1120 cm^{-1} wird in ihrer Intensität von keiner der beiden Konfigurationen vorhergesagt, sie kann am ehesten der recht flachen Struktur um 1100 cm^{-1} der ZZEssa-Konfiguration zugeordnet werden, besonders hinsichtlich des Verhaltens bei Austausch $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$.

2.3.6.3 900-600 cm⁻¹

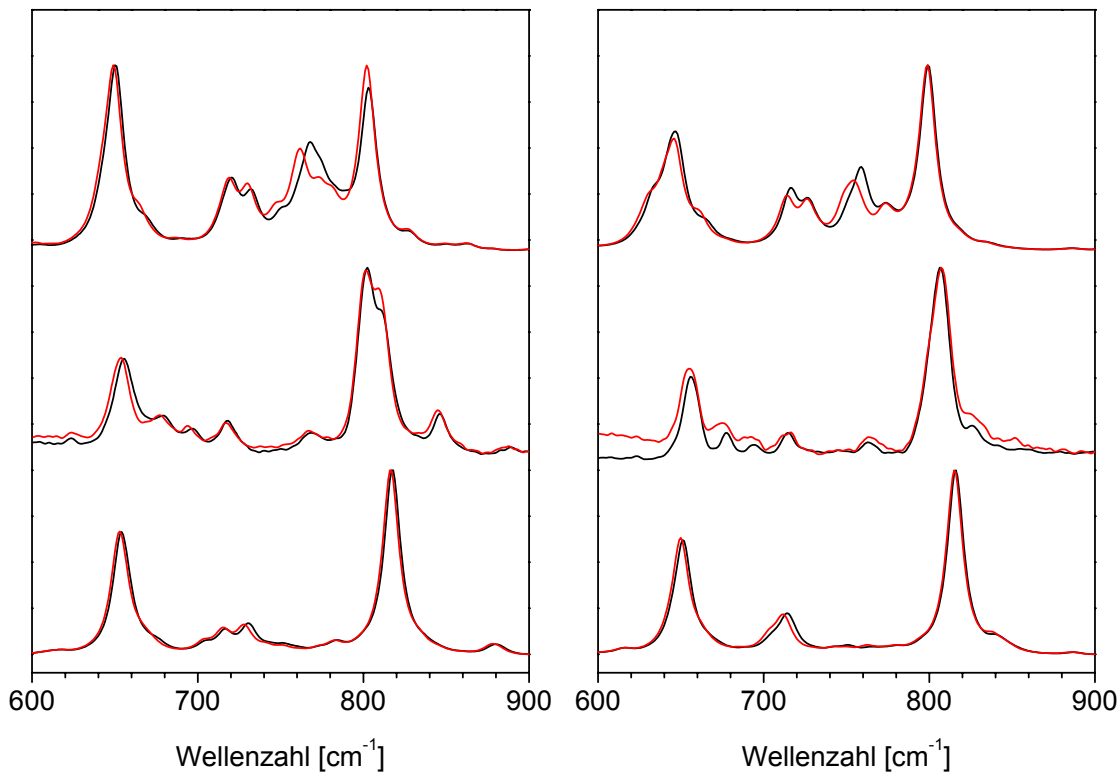


Abb. 35 Theoretische und experimentelle RR-Spektrum der Pfr-Form von mit ¹⁴N- (schwarz) und ¹⁵N- (rot) rekonstituiertem Cph1Δ2, jeweils in H₂O (links) und D₂O (rechts) gemessen. Die Spektren der ZEEaaa-Konfiguration sind jeweils oben, die gemessen in der Mitte, die ZZEssa-Konfiguration unten gezeigt.

Unterhalb von 1000 cm⁻¹ beschreiben beide vorgeschlagenen Konfigurationen die beobachteten Signale in befriedigender Weise. Die Intensität der Bande um 810 cm⁻¹ wird von keiner der beiden Konfigurationen korrekt beschrieben. Dies könnte ein Hinweis sein, daß die Torsion der beiden Ringe C und D im Protein stärker ist als für den freien Chromophor vorhergesagt.

Für die Pr-Form von Cph1Δ2 liefert die ZZZasa-Konfiguration die größte Übereinstimmung zwischen berechneten und gemessenen Spektren. Dies ist bemerkenswert, da für die Berechnung der Spektren eine *in vacuo* optimierte Geometrie des Chromophors verwendet wurde. Diese Übereinstimmung ist wesentlich besser als für die ZEZaas-Konfiguration. Das bedeutet für die Pfr-Form, daß die ZEEaaa-Konfiguration ausgeschlossen werden kann: da es keine experimentellen Hinweise auf eine weitere Doppelbindungsisomerisierung gibt, kann ein Chromophor, der ZZZ-

konfiguriert ist, nicht mit nur einer Doppelbindungsisomerisierung in eine ZEE-Konfiguration gelangen. Trotz der allgemein schlechteren Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentellen Spektren für die Pfr-Form kann man daher davon ausgehen, daß der Chromophor in der Pfr-Form ZZEssa konfiguriert ist. Die berechneten Ramanspektren für diese Konfiguration stehen in keinem offensichtlichen Widerspruch zu den gemessenen Spektren der Pfr-Form und geben die meisten der beobachteten Banden in akzeptabler Weise wieder.

Im Vergleich zu bisher publizierten Daten für intaktes Cph1 (Kneip, 1998; Remberg et al., 1997) sind die vorliegenden Spektren von wesentlich besserer Qualität. Dies liegt hauptsächlich an reinerem Protein, das für die Messungen Verwendung fand (SAR > 1 im Vergleich zu 0.5-0.6) und am günstigeren Massenverhältnis Protein/Chromophor im Fall des Deletionskonstruktes. Im Vergleich mit diesen Arbeiten sind in manchen Bereichen leichte Unterschiede in den Positionen der einzelnen Maxima festzustellen. Dies kann, neben der besseren Proteinqualität, daran liegen, daß die hier angegebenen Maxima durch Kurvenanpassung gewonnen wurden. Teilweise konnten so Mehrfachbanden aufgelöst werden, die in vorhergehenden Arbeiten als eine Bande angegeben werden, deren Maximum dann lediglich einen Mittelwert darstellt. Qualitativ sind die Spektren in guter Übereinstimmung.

Die experimentellen Befunde sind in Einklang mit einem in beiden spektralen Formen protonierten Chromophor. Damit werden vorherige Ergebnisse für pflanzliche Phytochrome bestätigt (Kneip et al., 1999; Andel et al., 2000).

Durch die verbesserte Spektrenqualität gelingt eine Identifizierung eines Großteils der Chromophorbanden. Die Verwendung von ¹⁵N-markiertem PCB erlaubt eine Unterscheidung von Chromophor- und Proteinsignalen im Bereich zwischen 1200-900 cm⁻¹. Durch Vergleich der gemessenen Banden mit den theoretisch berechneten wird eine umfassende Modenzuordnung erreicht (s. Anhang). Für eine strukturelle Interpretation der Ramanspektren ist eine möglichst umfassende und für alle experimentellen Bedingungen konsistente Modenzuordnung Voraussetzung.

Die gemessenen Spektren für die Pr-Form zeigen gute Übereinstimmungen mit den für eine ZZZasa-berechnete Konfiguration. Für die Pfr-Form ist die ZZEssa-Konfiguration die wahrscheinlichere. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden für PhyA (Mroginski et al., 2004) und unterstreicht, daß strukturelle Daten über den Chromophor in Cph1Δ2 auch für pflanzliche Phytochrome Relevanz haben.

Den berechneten Spektren liegen freie Chromophore zugrunde. Die hohe Ähnlichkeit der berechneten und gemessenen Spektren für die Pr-Form zeigt daher, daß der Chromophor relativ

wenig von den ihn umgebenden Aminosäuren beeinflusst wird. Umgekehrt kann man für die Pfr-Form davon ausgehen, daß aufgrund der insgesamt schlechteren Übereinstimmung der Spektren der Chromophor hier in seiner Konformation sowohl der Methinbrücken als auch der Torsion der einzelnen Ringe stärker durch das Protein beeinflusst ist. Eine realistische Berücksichtigung dieser Interaktionen setzt jedoch voraus, daß die dreidimensionale Struktur der Proteinmatrix bekannt ist. Dies ist zur Zeit nicht der Fall.

2.4 NMR-Spektroskopie

Neben der Kristallographie ist NMR-Spektroskopie zur Zeit die einzige Methode, die eine Strukturaufklärung von Molekülen mit atomarer Auflösung erlaubt. Obwohl eine steigende Anzahl von Proteinstrukturen mit Hilfe dieser Methode gelöst werden, sind nur wenige NMR-Experimente mit Phytochrom publiziert worden. Eine frühe Arbeit zeigt Protonenspektren von intaktem und partiell abgebauten PhyA (Song et al., 1982). Rüdiger et al. nutzten Fragmente von PhyA um die Konfiguration des Chromophors in der Pr- und der Pfr-Form zu untersuchen (Rüdiger et al., 1983). Untersuchungen, die mehrdimensionale oder heteronukleare Techniken einsetzen würden, sind bisher nicht publiziert. Die Hauptgründe hierfür sind die Größe der Moleküle, die mit ca. 120 kDa für ein typisches pflanzliches und ca. 80 kDa für ein typisches prokaryotisches Phytochrommonomer in einem für NMR-Spektroskopie immer noch kaum zugänglichen Größenbereich liegen. Zum anderen waren bis 1997 nur Phytochrome aus eukaryotischen Organismen bekannt (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997), für die eine rekombinante Expression in prokaryotischen Organismen problematisch ist. Eine Alternative ist die Expression in eukaryotischen Wirten wie z. B. den Hefen *Pichia pastoris* oder *Hansenula polymorpha*. Eine vollständige Anreicherung mit dem für die NMR-Spektroskopie von Proteinen mit einer molekularen Masse > 15 kDa wichtigen Deuterium ist in diesen Wirten zwar prinzipiell möglich, aber sehr ineffizient (Gardner & Kay, 1998; Katz & Crespi, 1966; Morgan et al., 2000). Sie gelingt i. d. R. einfacher in prokaryotischen Wirten.

Mit der Entdeckung von Phytochromen prokaryotischen Ursprungs änderte sich diese Ausgangslage: die erzielbaren Ausbeuten an rekombinantem Protein überstiegen die bisher publizierten Werte um ein Vielfaches. Weiterhin sollte es nun möglich geworden sein, isotonenangereichertes Phytochrom mit vertretbarem Aufwand in ausreichender Menge und Qualität zu produzieren. Damit wären die notwendigen Voraussetzungen erfüllt, mit NMR-spektroskopischen Methoden eine Struktur des Chromophors, seiner Bindungstasche und des gesamten Proteins zu erhalten. Für andere Chromoproteine wurden vergleichbare Untersuchungen schon erfolgreich durchgeführt (Patzelt et al., 2002; Dux et al., 1998; Rubinstenn et al., 1998).

Der experimentelle Ansatz, der diesen Untersuchungen zugrunde liegt, ist der einer getrennten Synthese von Chromophor und Protein, die mit unterschiedlichen Markierungsmustern ausgestattet werden. Diese differentielle Markierung erlaubt es, gezielt Informationen über den Chromophor in seiner Proteinumgebung zu erhalten (Patzelt et al., 2002) oder nur über das Protein selbst (Rubinstenn et al., 1998). Diese Strategie kann auch auf Phytochrom angewendet werden. Aufgrund der Bilinlyasefunktion von apo-Phytochromen und apo-Cph1 Δ 2 (s. Einleitung) ist die

experimentelle Umsetzung dieser Strategie sehr einfach, da lediglich apo-Cph1Δ2 und PCB zusammengegeben werden müssen, damit funktionales, d. h. photochromes Cph1Δ2 entsteht.

Die Produktion von rekombinantem, isotonenmarkiertem apo-Cph1Δ2 gelingt in guten Ausbeuten (s. Kapitel 4, Material und Methoden), die Herstellung von markiertem PCB ist detailliert dargestellt worden (s. Abschnitt 2.1, Herstellung von isotonenmarkiertem PCB). Mehrere Markierungsmuster sind möglich und wurden für NMR-Experimente genutzt, die im Folgenden besprochen werden (jeweils PCB/Protein): $^1\text{H}/^2\text{H}$, $^1\text{H}^{15}\text{N}/^2\text{H}$, $^1\text{H}^{15}\text{N}/^1\text{H}$ und $^1\text{H}^{13}\text{C}^{15}\text{N}/^2\text{H}$. Zusätzlich kann das Lösungsmittel entweder protoniert (H_2O) oder deuteriert (D_2O) sein.

2.4.1 Gemessene Spektren

2.4.1.1 $^1\text{H}/^2\text{H}$ in D_2O

Für ein 100%-ig deuteriertes Protein in einem vollständig deuterierten Lösungsmittel würde man ausschließlich Signale der kovalent gebundenen Protonen des Chromophors erhalten. Dieser Markierungsgrad ist in der Praxis jedoch nicht zu erreichen. Kommerziell erhältliches D_2O hat lediglich eine Reinheit von etwa 98%, daher wird immer auch ein entsprechender Anteil des Proteins protoniert sein. Diese Tatsache ist aufgrund des Massenunterschieds zwischen Protein und PCB problematisch. Das Apoprotein besitzt ca. 4100 kovalent gebundene Protonen, der Chromophor dagegen nur 38. Nimmt man für eine Modellrechnung einen (sehr hohen) Deuterierungsgrad des Proteins von 98% an, beträgt das molare Verhältnis von Protein- zu Chromophorprotonen 2.16 (82/38, die Bindungstöchiometrie Chromophor:Protein ist 1:1). Dieser Wert stellt wahrscheinlich die untere Grenze dar, die experimentell erreicht werden kann. Im eindimensionalen (1D-)Protonenspektrum einer solchen Probe werden die Signale des Proteins in einem signifikanten Maß vorhanden sein (Abb. 36). Sie sind nicht von denen des Chromophors unterscheidbar. Diese Situation ist weniger problematisch in einem NOE-(*Nuclear Overhauser Effect*-) Spektrum: damit ein Signal entsteht, müssen sich zwei Protonen näher als etwa 7 Å zueinander befinden. Die Wahrscheinlichkeit, daß genügend der stochastisch verteilten Proteinprotonen diese Bedingung erfüllen, sollte deutlich kleiner sein, als diejenige für die Chromophorprotonen (Abb. 37).

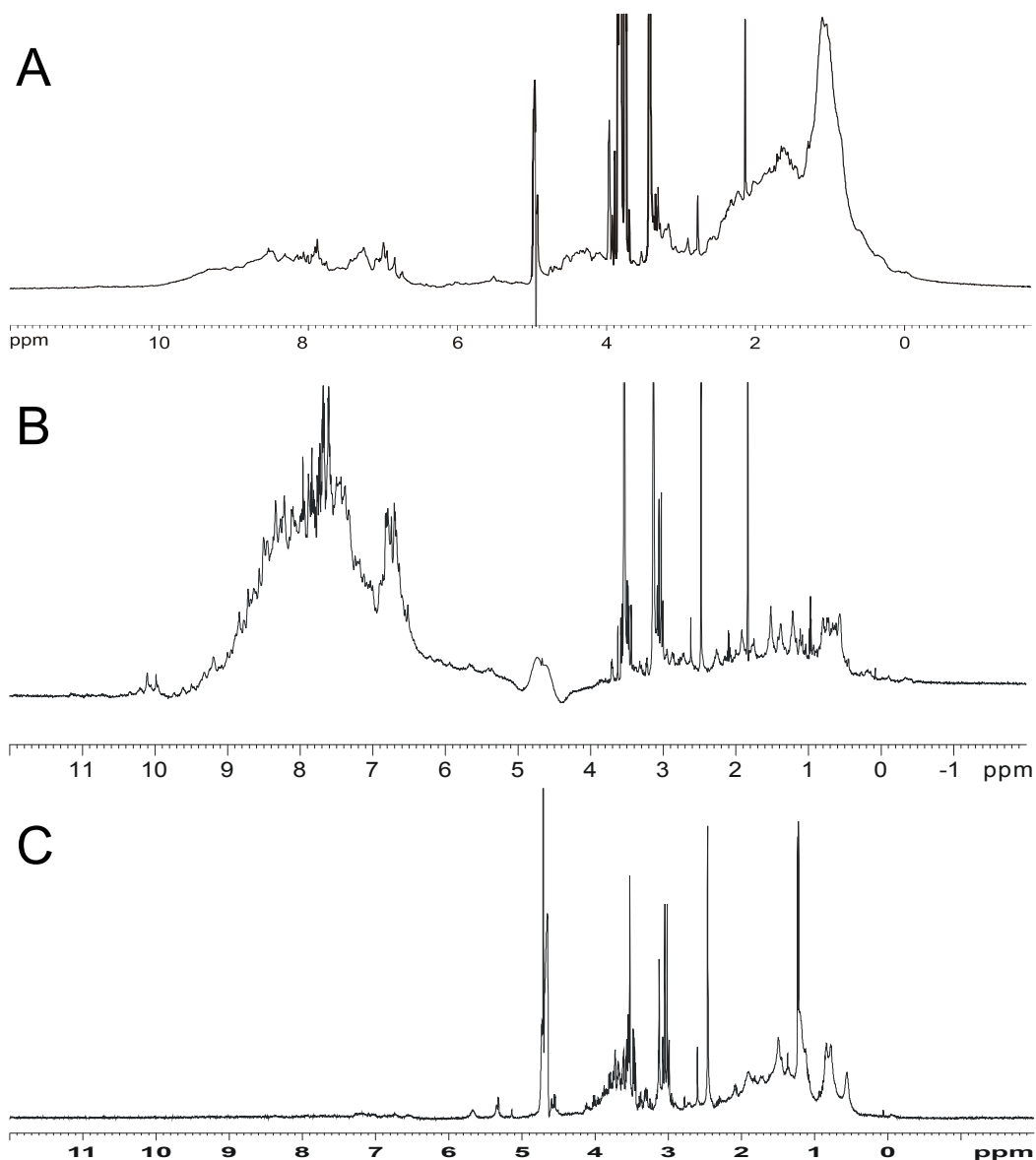


Abb. 36 Eindimensionale ^1H -Spektren der Pr-Form mehrerer Proteinpräparationen, die mit verschiedenen Chargen komplexer und Minimalmedien erhalten wurden. A: ^2H -Silantes Vollmedium, B: ^2H - ^{15}N -Silantes Vollmedium, C: ^2H -M9-Minimalmedium. Anhand der Signalintensitäten der kovalent gebundenen Protonen aromatischer Aminosäuren um 7 ppm ist zu erkennen, daß die Deuterierung mit kommerziell erhältlichen komplexen Medien von Charge zu Charge nicht reproduzierbar und von unterschiedlicher Qualität ist. Die Deuterierung in Minimalmedium ist jedoch sehr gut und scheint nahe am experimentell erreichbaren Optimum zu liegen.

Für eine Auswertung der in den NOE-Kreuzsignalen enthaltenen Abstandsinformation ist es nötig, die erhaltenen Signale den einzelnen Protonen des Chromophors zuzuordnen (s. Abschnitt 2.4.2, Zuordnungsstrategien). Damit ein NOE-Signal entsteht, müssen zwei Protonen lediglich räumlich nahe benachbart sein, unabhängig von ihren jeweiligen chemischen Verknüpfungen. Offensichtlich reicht jedoch dieses zusätzliche Selektionskriterium nicht aus, um Signale der wenigen, noch vorhandenen Proteinprotonen zu unterdrücken.

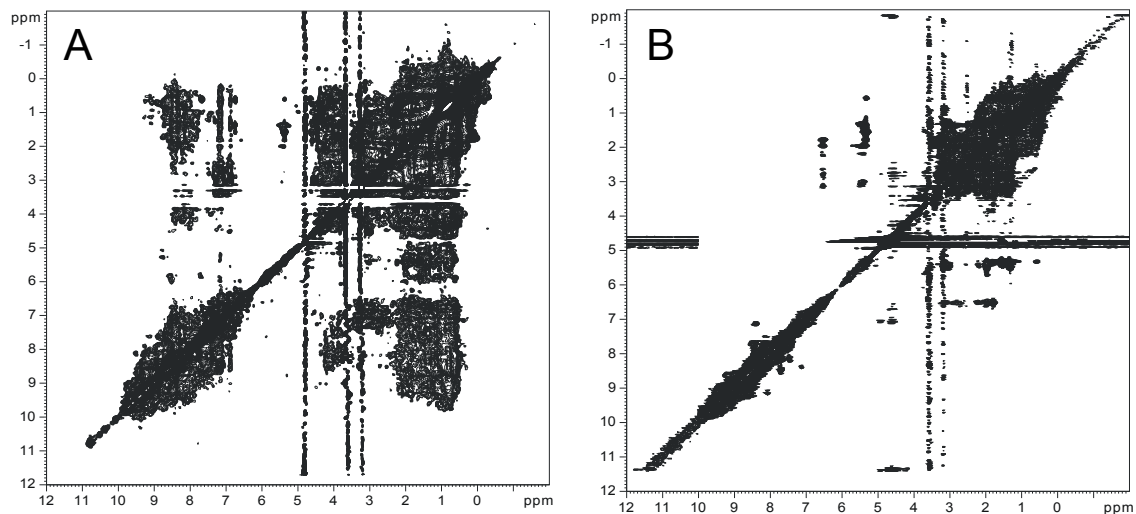


Abb. 37 NOE-Spektren zweier deuterierter Proteine. A: ^2H -Silantes Vollmedium, B: ^2H -M9 Minimalmedium, die entsprechenden eindimensionalen Spektren sind in Abb. 36A und 36C gezeigt. Auch in dem Spektrum der am besten deuterierten Probe sind einzelne Signale im Bereich der aliphatischen Protonen kaum aufgelöst.

2.4.1.2 $^1\text{H}^{15}\text{N}/^2\text{H}$ in H_2O

Mit Hilfe einer solchen Probe können in einem protonierten Lösungsmittel die chemischen Verschiebungen der vier Pyrrolstickstoffe und der an sie gebundenen Protonen erhalten werden. Bei einer Probenkonzentration um $330 \mu\text{M}$ ist es mit dem verwendeten Meßaufbau möglich, ein ^1H - ^{15}N -HMQC- (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*)-Spektrum des entsprechend markierten Proteins aufzunehmen (nicht gezeigt). Für ein mit ^{15}N -PCB rekonstituiertes Protein waren allerdings auch nach mehreren Stunden keine Signale meßbar. Nach einer Erhöhung der Meßzeit auf etwa 130 Stunden sind einige Korrelationen erkennbar, die in Abb. 38 gezeigt sind. Die Signale des Chromophors liegen außerhalb oder am Rand des Bereiches für Proteinkorrelationen, was ihre Identifizierung wesentlich erleichtert. Das sehr breite und unstrukturierte Signal um 120 ppm kann dem Protein zugeschrieben werden und resultiert aus dem im Protein in natürlicher Häufigkeit (0.37 %) vorkommenden ^{15}N .

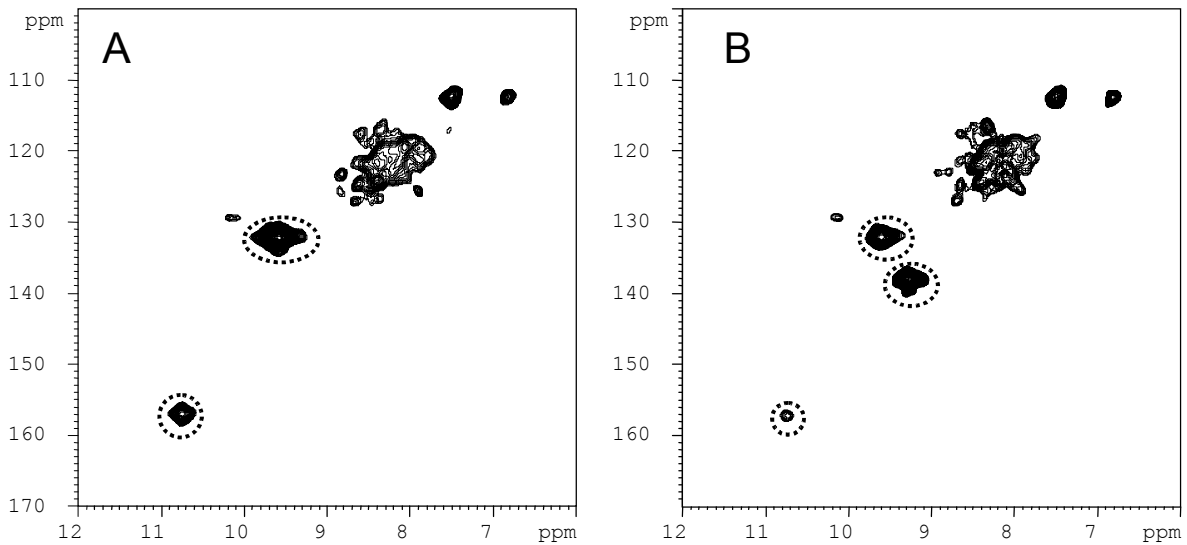


Abb. 38 ^1H - ^{15}N -HMQC nach 130 Stunden Meßzeit. A: Pr-Form, B: Pfr-Form. Die Signale des Chromophors sind durch Kreise markiert.

Für die Pr-Form werden mindestens drei Signale erwartet, da ungeladenes PCB drei an Stickstoff gebundene Wasserstoffatome hat. Ein viertes Signal würde demnach einen vollständig protonierten Chromophor anzeigen. Es sind jedoch nur zwei Signale zu erkennen, die weiterhin eine erhebliche Linienbreite aufweisen und erst nach einer extrem langen Meßzeit überhaupt gemessen werden konnten. Die Messung der photokonvertierten Probe zeigt ein zusätzliches Signal um 138 ppm und eine verminderte Intensität der beiden Signale der Pr-Form, wie dies für eine Probe im Photogleichgewicht (0.7 Pfr/0.3 Pr) zu erwarten ist.

Vor allem zwei Gründe können für die geringe Sensitivität des ^{15}N -HMQC-Experiments verantwortlich sein. Zum einen ist es denkbar, daß ein schneller Austausch mit Lösungsmittelprotonen stattfindet. Zum anderen können mehrere konformationelle Subzustände vorliegen, die leicht ineinander umwandelbar sind. Ein gegebener Pyrrolstickstoff würde sich dann während der Meßzeit in unterschiedlichen chemischen Umgebungen befinden und das daraus resultierende Signal wäre ein mittleres Signal dieser Zustände mit einer hohen Linienbreite, wie sie tatsächlich beobachtet wird. Eine Kombination aus beiden Vorgängen ist dabei natürlich auch denkbar. Beide Austauschphänomene hängen von der Temperatur ab, die Linienverbreiterung aufgrund eines konformationellen Austauschs kann zusätzlich durch die Stärke des verwendeten äußeren Magnetfeldes beeinflusst werden. Im Bereich 5-35 °C und zwischen 600 und 900 MHz konnten allerdings keine Unterschiede der gemessenen Spektren beobachtet werden.

Aufgrund der extrem geringen Sensitivität des Systems ist es nicht möglich, die Kinetik des Protonenaustauschs oder die Mobilität des Chromophors mit den in dieser Situation üblichen Techniken (H-D-Austausch, Messungen der Relaxationszeit) genauer zu charakterisieren.

2.4.1.3 $^1\text{H}^{15}\text{N}/^1\text{H}$ in H_2O

Die Detektion der ^{15}N -chemischen Verschiebung erfolgt in einem HMQC-Spektrum in der indirekten Dimension. Eine direkte Detektion in einem eindimensionalen Spektrum ist ebenfalls möglich, aufgrund des schlechten gyromagnetischen Verhältnisses von ^{15}N ist eine derartige Messung allerdings sehr unempfindlich. Entsprechend lang sind die notwendigen Meßzeiten, zusätzlich zu der verwendeten etwa vierfach größeren Probenmenge und einem speziellen Probenkopf. Die direkte Messung der ^{15}N -chemischen Verschiebung hat jedoch den Vorteil, daß ein Signal unabhängig von der Protonierung des entsprechenden Stickstoffs erhalten wird (Abb. 39).

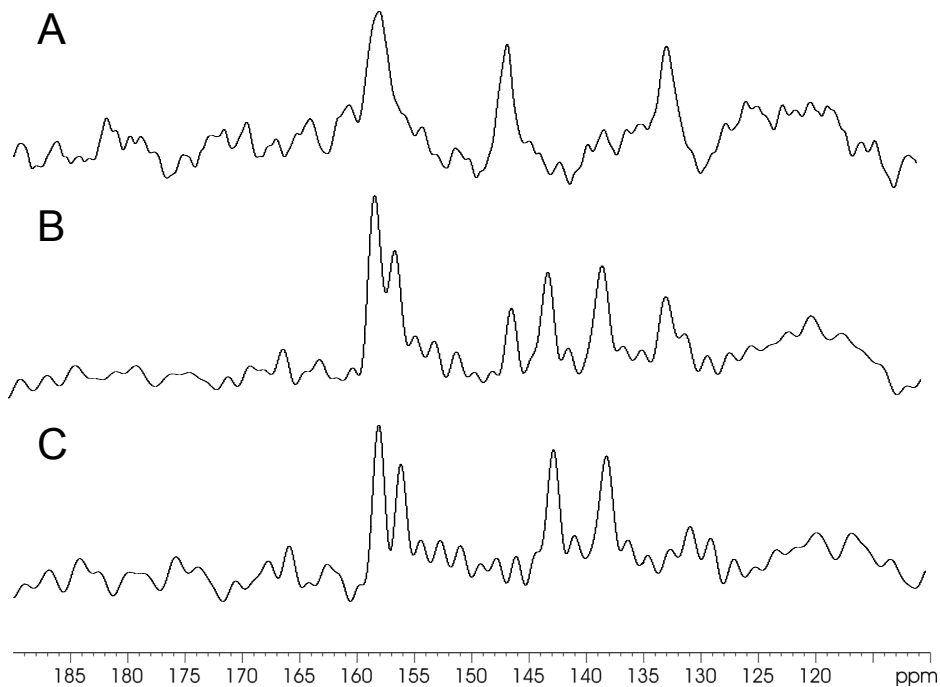


Abb. 39 $1\text{D-}^{15}\text{N}$ -Spektren der Pr-Form (A), einer Pr/Pfr-Mischung (B) und der Differenz aus (B) und (A), die nur Signale der Pfr-Form enthält. Die Meßzeit betrug für die in A und B gezeigten Spektren jeweils 15 Tage.

Für die Pr-Form werden vier Signale erhalten, die bei 132.1, 146.2, 157.2 und 158.1 ppm liegen. Die beiden letztgenannten liegen dicht beieinander und sind daher in der Abbildung nicht getrennt.

Daß es sich um einen Doppelpeak handelt, ist an der praktisch doppelten Intensität im Vergleich zu den beiden anderen Signalen erkennbar. Die praktisch gleiche Lage dieser Signale ist ein Hinweis, daß sich die zugehörigen Stickstoffe in einer chemisch sehr ähnlichen Umgebung befinden. Im ^1H - ^{15}N -HMQC (s. Abb. 38) ist der peak bei 146.1 ppm nicht detektierbar, die beiden peaks um 158 ppm zeigen ein relativ schwaches Signal. Dabei kann nicht entschieden werden, ob es sich tatsächlich um ein einheitliches oder, wie im 1D-Spektrum der Pr-Form, um eigentlich zwei Signale handelt. Der peak bei 132.1 ppm zeigt die stärkste ^1H - ^{15}N -Korrelation. Die Pfr-Form zeigt ebenfalls vier Signale, die bei 137.9, 142.7, 156.1 und 157.9 ppm liegen. Im ^1H - ^{15}N -HMQC zeigt lediglich der peak 137.9 ppm eine eindeutige Korrelation. Ob das schwache Signal bei 158 ppm von der noch vorhandenen Pr-Form stammt, oder Anteile der Pfr-Form enthält, kann nicht entschieden werden. Der peak bei 142.7 ppm ist nicht detektierbar.

Die Lage der ^{15}N -chemischen Verschiebungen erlauben eine Aussage über den Protonierungszustands des entsprechenden Pyrrolstickstoffs, da Werte für die chemischen Verschiebungen verschiedener pyrrolischer Verbindungen publiziert sind (Limbach et al., 1984; Falk & Müller, 1985; Falk, 1989). Für deprotonierte Pyrrole liegen die ^{15}N -chemischen Verschiebungen oberhalb von 220 ppm, für protonierte Pyrrole sind diese Werte mindestens 80 ppm hochfeldverschoben. Die hier gemessenen Werte liegen alle unterhalb von 160 ppm und zeigen damit einen an allen vier Stickstoffen protonierten Chromophor an. Dies gilt für die Pr- und die Pfr-Form. Gleichzeitig sind die Linienbreiten der einzelnen Signale sehr ähnlich, im Gegensatz zu den heterogenen Linienbreiten der Stickstoff-gebundenen Protonen (s. Abb. 38). Dies ist ein Hinweis, daß diese Protonen schnell mit Lösungsmittelprotonen austauschen und könnte bedeuten, daß die entsprechenden Stickstoffe zum Lösungsmittel hin exponiert sind.

2.4.1.4 $^1\text{H}^{15}\text{N}^{13}\text{C}/^2\text{H}$ in D_2O

Mit Hilfe dieses Markierungsmusters können an Kohlenstoff gebundene Protonen detektiert werden. Aufgrund der zusätzlichen Selektion durch eine weitere Isotopenmarkierung des Chromophors kommt hier das generelle Problem der ungenügenden Deuterierung des Proteins nicht zum Tragen.

Abb. 40 zeigt die nach einer Meßzeit von etwa 45 Minuten erhaltenen ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektren. Es sind lediglich Signale im gezeigten Bereich der Methylgruppen sichtbar. Für eine vollständig markierte Probe erwartet man auch im Fall eines ^1H - ^{13}C -HMQC Spektrums mit den verwendeten Geräten und Techniken ein Spektrum in einem Zeitraum von Minuten.

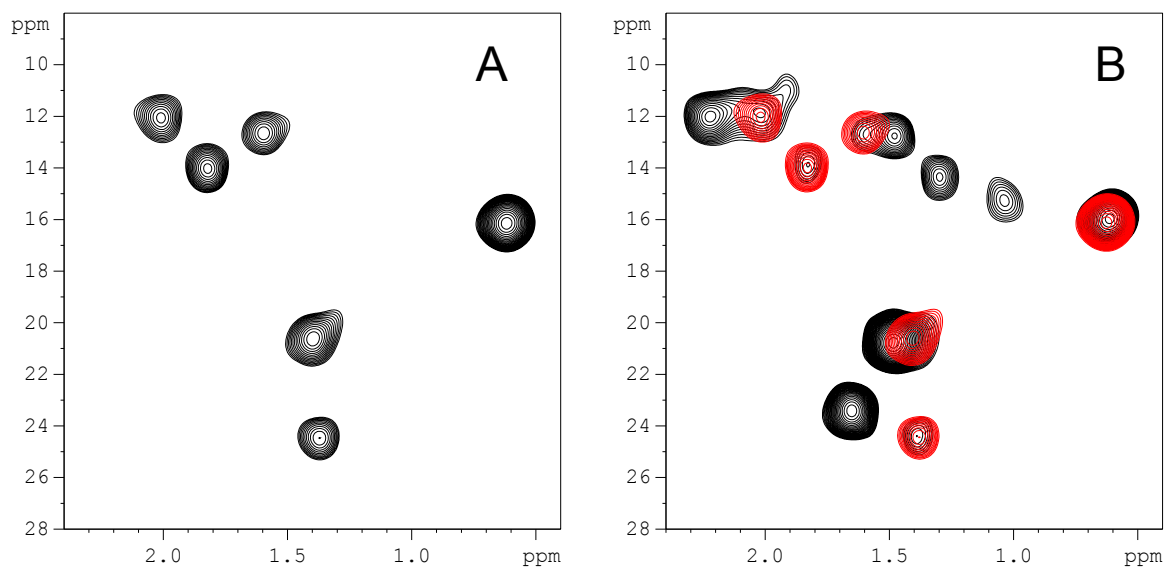


Abb. 40 ^1H - ^{13}C -HMQC nach 45 Minuten Meßzeit. A: Pr-Form, B: Pfr-Form, Signale der Pr-Form aus A sind rot dargestellt.

Eine Erhöhung der Meßzeit auf etwa 70 Stunden ergibt zusätzliche Signale auch außerhalb des Bereichs der aliphatischen Kohlenstoffe. Die Spektren sind in Abb. 41 gezeigt.

Da ein Austausch mit Lösungsmittelprotonen im Fall von kovalent gebundenen Protonen nicht möglich ist, liefert die geringe Empfindlichkeit des ^{13}C -HMQC-Experiments einen weiteren Hinweis, daß der Chromophor in seiner Bindungstasche in mehr als einem konformationellen Subzustand vorliegt. Die besondere Sensitivität der Methylgruppen in einem ^1H - ^{13}C -HMQC-Experiment konnte theoretisch und experimentell gezeigt werden (Ollerenshaw et al., 2003; Tugarinov et al., 2003). Daher ist es nicht überraschend, daß die entsprechenden Signale auch am schnellsten erhalten werden.

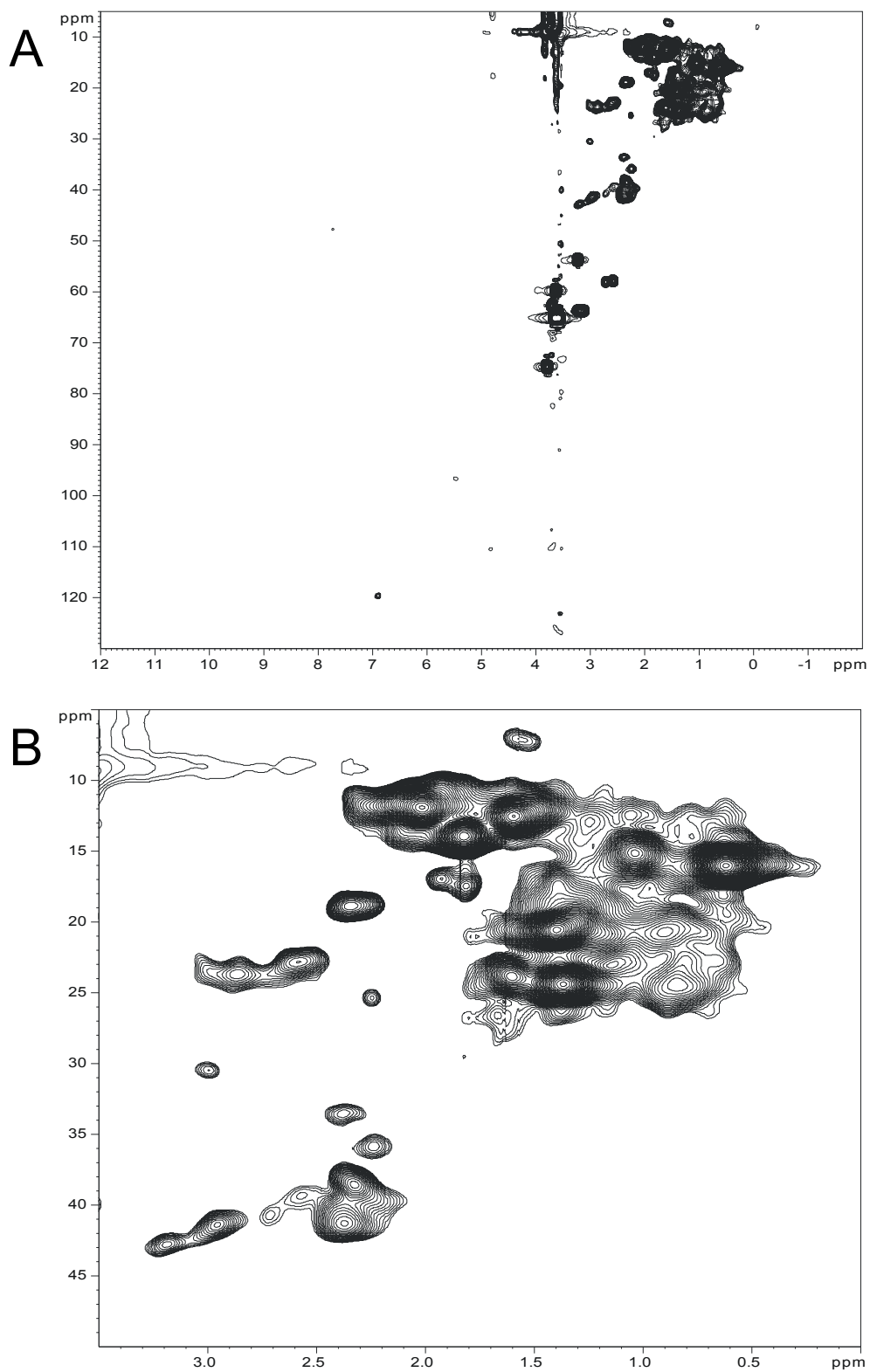


Abb. 41 ^1H - ^{13}C -HMOC der Pr-Form nach 70 Stunden Meßzeit. A: Übersicht, B: Bereich aliphatischer Kohlenstoffe.

2.4.2 Zuordnungsstrategien

Eine vollständige Zuordnung der gemessenen Signale ist nicht Bestandteil dieser Arbeit. Im Folgenden sollen jedoch Strategien aufgezeigt werden, mit denen eine solche Zuordnung möglich ist, und erste Ergebnisse dargestellt werden.

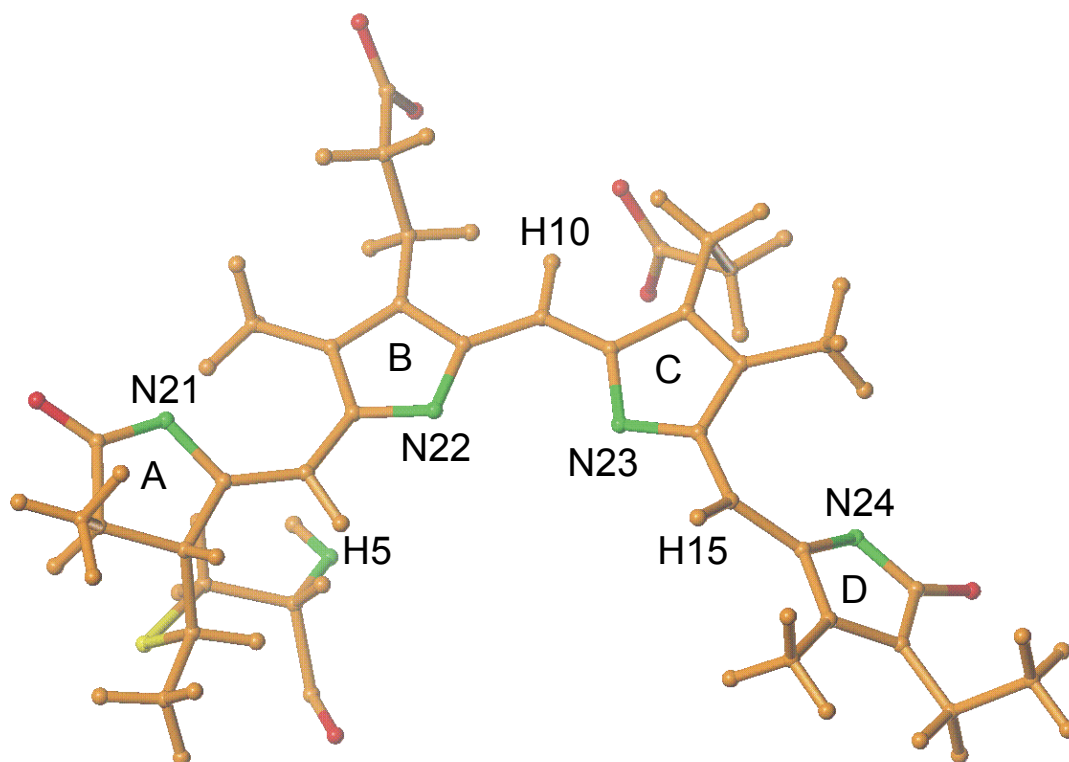


Abb. 42 Struktur von 3^1 -Cys-PCB aus der Kristallstruktur von Phycocyanin (pdb: 1CPC). Die Bezeichnung der Ringsysteme, die Numerierung der Pyrrolstickstoffe und der Methinbrückenprotonen ist zur Orientierung gezeigt.

2.4.2.1 $^1\text{H}/^2\text{H}$

Für den Idealfall, daß in einem NOE-Spektrum ausschließlich Signale des Chromophors enthalten und aufgelöst sind, ist eine Zuordnung der meisten Protonen aus einem NOE-Spektrum allein denkbar, wenn auch aufgrund der gestreckten Struktur des Chromophors schwierig. Dies soll beispielhaft anhand der PCB-Struktur aus Phycocyanin gezeigt werden (vgl. Abb. 42).

Eine grobe Unterteilung der chemischen Verschiebungen für einzelne Gruppen ist für eine solche Zuordnung hilfreich. Im Bereich zwischen 0 und 2.5 ppm werden Signale der Methylgruppen erwartet, zwischen 2 und 3.5 ppm die von Methylenprotonen, und oberhalb von 4 ppm die Signale

der Methinprotonen. Aufgrund seiner optischen Eigenschaften wird allgemein davon ausgegangen, daß PCB sowohl in der Pr- als auch der Pfr-Form in einer gestreckten und annähernd planaren Konformation vorliegt (s. Einleitung).

Unter diesen Voraussetzung gelingt die Zuordnung des Methinprotons H10 relativ leicht, da es das einzige ist, das keine Kreuzsignale zu einer der insgesamt sechs Methylgruppen aufweist. Die Unterscheidung zwischen H5 und H15 sollte aufgrund der unterschiedlichen Intensitäten der beiden zu erwartenden NOE-peaks zu den jeweiligen Methylgruppen gelingen. Für H15 werden unabhängig von der Konformation zwei relativ intensive Signale zu den Methylprotonen von C17' und C13' erwartet, für H5 lediglich zwei schwache zu C2' und C7'. Ein zusätzliches Unterscheidungskriterium zwischen H5 und H15 sind die Anzahl an NOE-peaks zu anderen als Methylgruppen. Für H15 können solche Signale ausgeschlossen werden, für H5 kann man eine relativ große Anzahl erwarten, so z. B. zu den Protonen an C2, C3 und C3'. Selbst für den Fall, daß sich die beiden Methinprotonen an C2 und C3 anhand ihrer chemischen Verschiebungen nicht von den anderen Methinprotonen unterscheiden lassen, wäre die Identifizierung von H15 eindeutig, da keine anderen Kreuzsignale als zu Methylgruppen auftreten dürfen.

Anhand der zugeordneten Methingruppen lassen sich nun Methylengruppen identifizieren. Ausgehend von H10 gelingt die Identifizierung der Methylengruppe C12' durch ihr Kreuzsignal mit der Methylgruppe C13', die wiederum ein Signal zu H15 aufweist. Damit wäre die andere Methylgruppe, die einen NOE-peak mit H15 zeigt, C17'. Dies erlaubt dann die Identifizierung der Methylengruppe C18'. Ein von der Konformation der Einfachbindung C18'-C18'' abhängiges Signal zwischen der Methylgruppe C18'' und C17' könnte ebenfalls eindeutig erkannt werden. In analoger Weise erfolgt die Identifizierung von C8' und C7'. Beide sollten ein deutliches Signal jeweils zu C8'' und C12'' zeigen. C7' sollte ein schwaches Signal zu H5 aufweisen. Damit wäre die andere Methylgruppe, die ein Kreuzsignal mit H5 zeigt C2'.

2.4.2.2 $^{15}\text{N}^1\text{H}/^2\text{H}$

Eine dem NOE-Spektrum entsprechende sequentielle Zuordnung des ^1H - ^{15}N -HMQC-Spektrums ist prinzipiell nicht möglich, da lediglich chemische Verknüpfungen zwischen Protonen und Stickstoff erkennbar sind, nicht aber zwischen den die Stickstoffe verbindenden Atome. Innerhalb eines NOE-Spektrums werden unter geeigneten Umständen Signale von Stickstoff-gebundenen Protonen erhalten, die mit Hilfe eines ^1H - ^{15}N -HMQC-Spektrums identifiziert werden können. Diese Information kann dann dazu dienen, die Signale der einzelnen Stickstoffe zuzuordnen.

2.4.2.3 $^{15}\text{N}^1\text{H}/^1\text{H}$

Allein anhand des 1D- ^{15}N -Spektrums von PCB kann keine Zuordnung der Signale zu den einzelnen Stickstoffen erfolgen. Eine Möglichkeit der Zuordnung besteht in der quantenchemischen Berechnung von chemischen Verschiebungen, analog der Berechnung von Ramanspektren (s. Abschnitt 2.3.4). Die chemischen Verschiebungen sind stark abhängig von der genauen Konformation der Methinbrücken und teilweise, allerdings weit weniger stark, von der Konformation der Seitenketten (M. Mroginski, D. v. Stetten, persönl. Mitteilung). Es wurden daher ^{15}N -chemische Verschiebungen für die in der Literatur vorgeschlagenen Chromophorkonformationen der Pr- (ZZZasa, bzw. ZEZAas) und der Pfr-Form (ZEEaaa, bzw. ZZEssa) berechnet. Die erhaltenen Daten sind in Abbildung 43 gezeigt (Mroginski et al., 2004, Andel et al., 2000). Die berechneten Spektren wurden dankenswerterweise von David von Stetten und Maria-Andrea Mroginski (TU Berlin) zur Verfügung gestellt.

In Übereinstimmung mit den Befunden für die RR-Messungen zeigt die ZZZasa-Konfiguration eine deutlich bessere qualitative Übereinstimmung mit den experimentellen Daten für die Pr-Form. Besonders die nah beieinander liegenden peaks um 158 ppm werden gut reproduziert. Weiterhin ist die Übereinstimmung der beiden peaks bei 132 und 146 ppm deutlich besser als für die ZEZAas-Konfiguration. Damit ergibt sich folgende Zuordnung der Signale für die ^{15}N -Spektren der Pr-Form: das Signal bei 146.2 ppm stammt von N21 an Ring A, bei 157.4 und 158.1 ppm von den beiden Stickstoffen N22 und N23 der Ringe B und C, und bei 132.1 ppm von N24 an Ring D.

Im Fall der Pfr-Form ist die Übereinstimmung weniger deutlich und eine Zuordnung schwieriger. Insgesamt reproduziert die ZZEssa-Konfiguration die gemessenen Spektren besser als die ZEEaaa-Konfiguration. Analog der Besprechung der RR-Spektren gilt, daß eine ZZZ-Konfiguration der Pr-Form im Prinzip schon eine Entscheidung für die Konfiguration der Pfr-Form bedeutet, da lediglich eine Doppelbindungsisomerisierung auftritt. Für die ZZEssa-Konfiguration ergeben sich folgende Zuordnungen: das Signal bei 137.9 ppm stammt von N24 an Ring D und bei 142.7 ppm von N22 des Ring B. Die nah beieinander liegenden Signale bei 156.1 und 157.9 ppm stammen dann von N23 an Ring C und N21 des A-Rings.

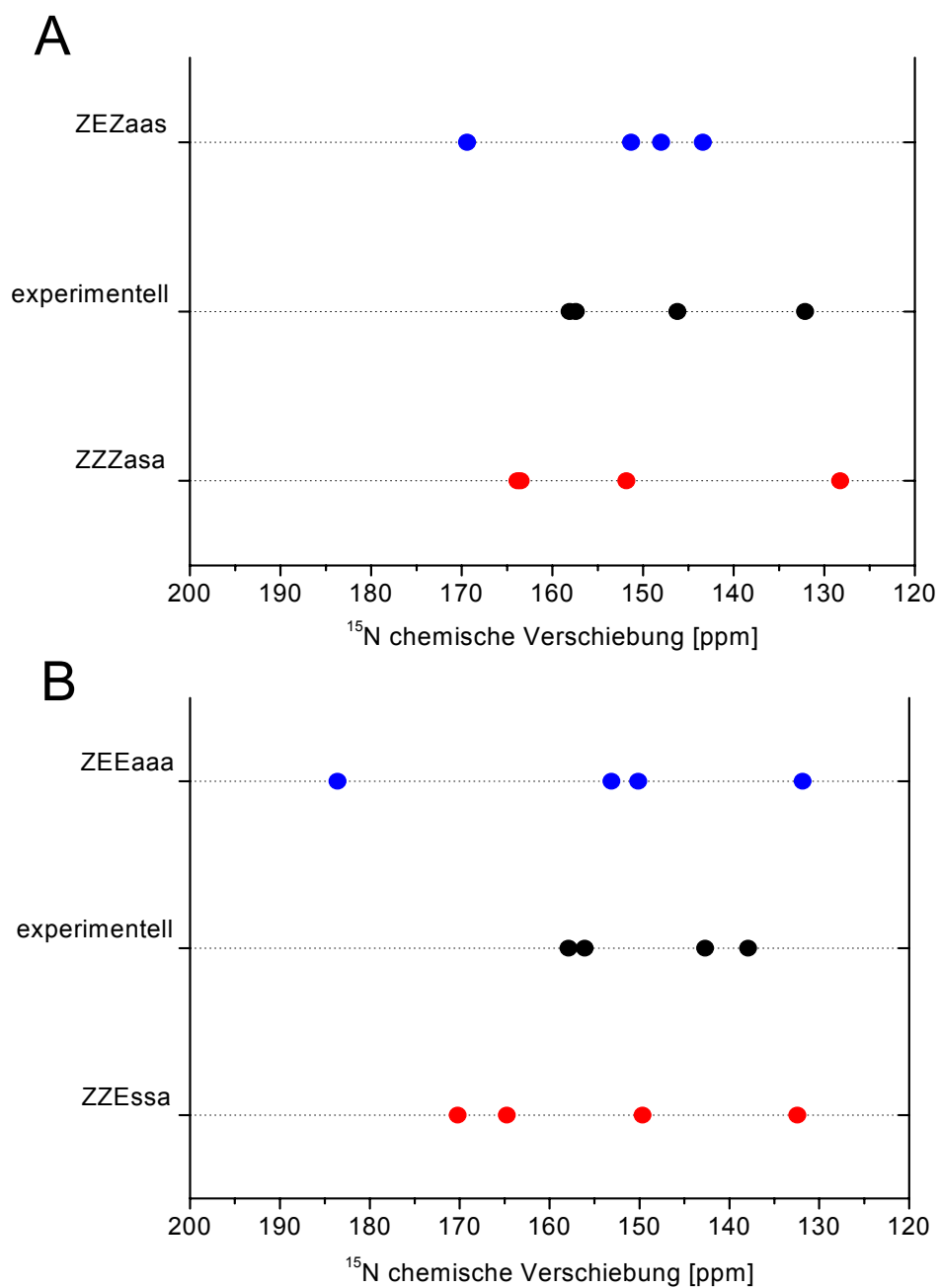


Abb. 43 Berechnete und gemessene chemische Verschiebungen von PCB in der Pr-Form (A) und Pfr-Form (B).

Im Zusammenhang mit den ^1H - ^{15}N -HMQC-Spektren bedeuten diese Zuordnungen, daß N21 in der Pr-Form nicht meßbar ist, N24 des D-Ringes jedoch das stärkste Signal liefert (s. Abb. 38). Der schwächere peak zeigt wahrscheinlich sowohl Beiträge des B- und des C-Ringstickstoffes, da sich beide in einer sehr ähnlichen chemischen Umgebung befinden, worauf die ähnlichen ^{15}N -chemischen Verschiebungen hindeuten (s. Abb. 39).

In der Pfr-Form kann lediglich das Signal des D-Rings zuverlässig identifiziert werden. Ein Signal von N22 fehlt, N23 oder N21 zeigen ^{15}N -chemische Verschiebungen, die sich nur geringfügig vom Signal der Pr-Form um 158 ppm unterscheiden. Um zwei peaks in einem ^1H - ^{15}N -HMQC-Spektrums klar unterscheiden zu können, sollten sie einen Unterschied von mehr als 1 ppm entweder in der Protonen- oder der Stickstoffdimension aufweisen. Das Signal bei 156.1 ppm sollte dann allerdings erkennbar sein, wenn es tatsächlich meßbar wäre. Der peak bei 158.1 ppm würde genau mit dem Signal der noch zu 30% vorhandenen Pr-Form zusammenfallen. Wenn er also meßbar ist, so ist seine Intensität sehr gering.

Die Tatsache, daß N24 des D-Rings das stärkste Signal im ^1H - ^{15}N -HMQC liefert, könnte bedeuten, daß das entsprechende Proton im Vergleich zu den anderen an Stickstoff gebundenen am langsamsten gegen ein Lösungsmittelproton austauscht. Es wäre dann in einem relativ abgeschirmten Bereich des Proteins lokalisiert, sowohl in der Pr- als auch der Pfr-Form. Wie oben erwähnt, sind H-D-Austauschexperimente, um diese Möglichkeit experimentell zu überprüfen, aufgrund der extrem langen Meßzeiten nicht machbar. RR-Messungen ergaben Hinweise auf Wasserstoffbrückenbindungen der Stickstoff-gebundenen Protonen (s. Abschnitt 2.3.3; Kneip, 1998). Es ist möglich, daß das an N24 gebundene Proton an einer Wasserstoffbrückenbindung beteiligt ist. Diese Möglichkeit wird gestützt durch die Beobachtung, daß die gemessenen chemischen Verschiebungen für N24 sowohl in der Pr- als auch in der Pfr-Form höher sind als die berechneten. Dieses Verhalten entspricht dem durch eine Wasserstoffbrücke entschirmten Stickstoff und kann auch quantenchemisch reproduziert werden (M. Mroginski, persönl. Mitteilung).

2.4.2.4 ^{13}C ^{15}N $^1\text{H}/^2\text{H}$

Eine konsistente Zuordnung allein anhand der ^1H - ^{13}C -Korrelation ist aus demselben Grund wie für das ^1H - ^{15}N -HMQC-Spektrum nicht möglich. Diese Spektren lassen jedoch eine klare Unterscheidung von Signalen des Proteins und des Chromophors zu. Diese Information kann dann dazu dienen, die für das NOE-Spektrum skizzierte Zuordnungsstrategie umzusetzen. Eine notwendige Voraussetzung für diese Art sequentieller Zuordnung ist die Identifizierung der Methinbrücken. Wie in Abb. 41 erkennbar, sind diese jedoch im Bereich oberhalb von 4 ppm (Protonendimension) kaum Signale erkennbar, so daß die Lage der verschiedenen Methinprotonen unbekannt bleibt. In der Pr-Form sind die sechs Methylgruppen des PCBs klar identifizierbar und gut voneinander getrennt. Für die Pfr-Form gibt es eine Überlappung der Signale bei 0.2 und 1.5 ppm (Protonendimension). Um welche Methylgruppen es sich im einzelnen handelt, kann nicht geklärt werden.

Die vorgestellten Ergebnisse sind die ersten heteronuklearen NMR-Spektren eines Phytochromchromophors *in situ*. Entsprechend können andere Untersuchungen nicht für eine relative Zuordnung genutzt werden. Dies gilt auch für z. B. Phycocyanin, dessen Struktur bekannt ist: es sind keine heteronuklearen NMR-Spektren dieses Proteins publiziert. Ein ^1H - ^{15}N -HMQC könnte bei einer relativen Zuordnung der ^{15}N -chemischen Verschiebungen der Pr-Form eine große Hilfe sein. Es ist auch unklar, wie hoch die Unsicherheit der berechneten chemischen Verschiebungen im Vergleich zu den experimentellen ist, da einfach kein Vergleich mit einem Tetrapyrrol in einem strukturell bekannten Biliproteinsystem möglich ist. Eine detaillierte Untersuchung des Einfluß der einzelnen Konformationsisomere auf die ^{15}N -chemischen Verschiebungen, entsprechend den Untersuchungen für Ramanspektren (Mroginski et al., 2004), ist derzeit in Arbeit (M. Mroginski, persönl. Mitteilung).

Die gemessenen ^{15}N -chemischen Verschiebungen zeigen einen in beiden spektralen Zuständen protonierten Chromophor an. Dieser Befund ist in Einklang mit anderen Arbeiten (z. B. Kneip et al., 1999; van Thor et al., 2001). Die gemessenen ^{15}N -chemischen Verschiebungen lassen sich am besten durch die Annahme eines ZZZasa-konfigurierten Chromophor in der Pr-Form beschreiben. Für die Pfr-Form gibt die ZEZssa-Konfiguration die experimentellen Befunde in akzeptabler Weise wieder. Durch den Vergleich der experimentellen und berechneten Spektren gelingt die Zuordnung aller vier Pyrrolstickstoffe im eindimensionalen ^{15}N -Spektrum. Die den Rechnungen zugrunde liegenden PCB-Strukturen wurden *in vacuo* berechnet. Die gute Übereinstimmung mit den gemessenen Daten zeigt an, daß die Struktur des Chromophors im Protein sehr ähnlich der in Abwesenheit der Proteinmatrix gefundenen ist. Dies zeigt sich auch in den nah beieinander liegenden Signale für die Ringstickstoffe N22 und N23: in der berechneten Struktur liegen die beiden zugehörigen Pyrrolringe B und C in einer Ebene zueinander. Die jeweilig gebundenen Protonen zeigen eine H-Brücke zu einem Chloridion. Daß die chemische Umgebung dieser beiden Stickstoffe *in situ* sehr ähnlich ist, zeigt sich an den sehr ähnlichen ^{15}N -chemischen Verschiebungen. Möglicherweise ist diese Umgebung analog der für PCB in Phycocyanin: hier sind die beiden Ringe praktisch in einer Ebene zueinander und die gebundenen Protonen sind an einer H-Brücke zu einem Aspartylrest beteiligt.

Eine detaillierte Strukturuntersuchung ist mit den vorhandenen Daten leider nicht durchführbar. Die für die meisten Strukturrechnungen essentiellen Abstandsinformationen aus einem NOE-Spektrum können zwar gemessen werden, sind aber gegen den Hintergrund des unzureichend deuterierten Proteins nicht auflösbar. Damit scheitert eine Identifizierung der Chromophorsignale, die für eine Zuordnung notwendige Voraussetzung. ^1H - ^{13}C -Korrelationen zeigen selektiv Signale des Chromophors, allerdings sind die besonders wichtigen Methinbrückenprotonen H5, H10 und H15

nicht erkennbar. Eine Zuordnung der Signale der Methylbrücken ist nicht möglich. Eine Möglichkeit, zu einer Zuordnung der Kohlenstoffsignale zu kommen, ist die Aufnahme von ^{13}C -editierten NOE-Spektren. Diese Experimente sind mit dem vorliegenden System machbar (P. Schmieder, persönl. Mitteilung), aber nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

Allgemein zeigen die heteronuklearen Spektren eine sehr große Linienbreite, die Aufnahme von sinnvollen Spektren ist sehr zeitaufwendig. Die Gründe hierfür sind sowohl ein schneller Austausch mit Lösungsmittelprotonen, im Fall von ^1H - ^{15}N -Korrelationen, und Übergänge zwischen zwei oder mehreren konformationellen Subzuständen im Fall der ^1H - ^{15}N - und ^1H - ^{13}C -Korrelationen. Variation der experimentellen Temperatur und der Spektrometerfrequenz können keines dieser Problem lösen. Eine detailliertere Untersuchung dieser Vorgänge ist aufgrund der notwendigen langen Meßzeiten nicht möglich, eine strukturelle Interpretation der experimentellen Befunde muß daher spekulativ bleiben. Eine Möglichkeit, trotzdem zu auswertbaren Abstandsinformationen mit NMR-Methoden zu kommen, ist die Möglichkeit, das Protein einzufrieren und einer festen Matrix zu vermessen (*solid-state* NMR). Solche Messungen werden in der Gruppe von Dr. Jörg Matysik an der Universität Leiden durchgeführt (persönl. Mitteilung).