

## 5. Spektroskopische Untersuchungen mit Bilin Analoga

Phytochrome sind Photorezeptoren, die durch rotes bzw. dunkelrotes Licht reversibel in die beiden Zustände  $P_r$  und  $P_{fr}$  umgewandelt werden können. Die Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge führt beim Chromophor in einem ersten Schritt zur *Z/E*-Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung (Rüdiger 1983). Auf die Isomerisierung folgen mehrere Protein-Chromophor-Interaktionen, infolgedessen eine Reihe von Intermediaten durchlaufen werden. Trotz diverser Studien über die strukturellen Änderungen des Chromophors während der Photokonversion (Wagner 2005; Andel 2000; Mizutani 1994; Kneip 1994; Mroginski 2004) ist die Datenlage darüber, ob es außer der Photoisomerisation der 15,16-Doppelbindung noch zu weiteren Konformations- bzw. Konfigurationsänderungen des Chromophors während der Photokonversion kommt, unklar. In der AG Inomata (Japan) wurden zur Klärung einiger dieser Fragen eine Reihe synthetischer Biliverdin Derivate hergestellt, bei denen die Konformation und Konfiguration der Methinbrücken des Chromophors durch Ethenbrücken arretiert sind. So wurden Bilinanaloga mit allen möglichen Konformationen und Konfigurationen der Methinbrücke zwischen den Ringen C und D synthetisiert, sowie die beiden Konformere 5Zs und 5Za (Abbildung 5.1). Dabei bezeichnet die Zahl fünf bzw. 15 das Kohlenstoffatom der Methinbrücke, der erste Buchstabe gibt die Konfiguration der Doppelbindung der Methinbrücke an und der zweite Buchstabe gibt die Konformation der Einfachbindung an die syn oder anti sein kann.

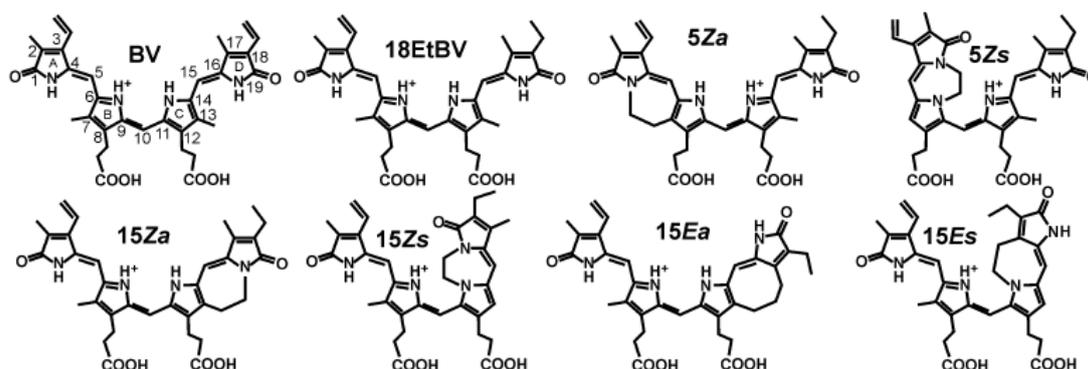


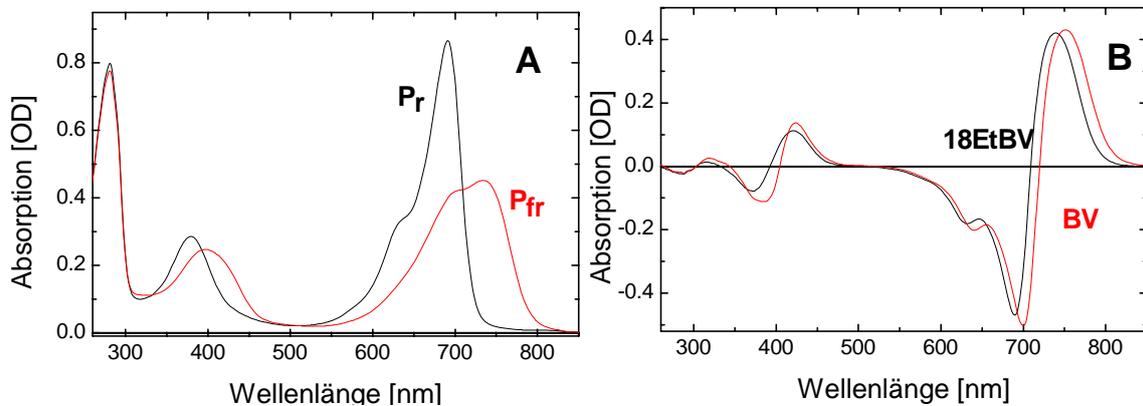
Abbildung 5.1: Darstellung der in der AG Inomata synthetisierten arretierten Chromophore (aus Inomata 2006).

Aus Synthesegründen besitzen alle arretierten Chromophore an Position 18 des Chromophors statt der Vinylgruppe (BV) eine Ethylgruppe (Abbildung 5.1). Aus diesem Grund wurde das 18EtBV-Addukt von M15 zur Kontrolle spektroskopisch und kinetisch untersucht. Auf diese Weise wird auch der Einfluss der 18 Vinylgruppe von Biliverdin auf diese Eigenschaften untersucht, da 18EtBV bis auf die 18 Ethylgruppe mit BV identisch ist.

### 5.1 Einfluss des C18 Substituenten des Chromophors

Durch den Austausch der C18-Vinylgruppe von BV durch die C18-Ethylgruppe bei 18EtBV wird das konjugierte System des Chromophors verringert. Dementsprechend sind die Spektren von M15 mit 18EtBV auch um etwa zehn nm kurzweilig verschoben (Abbildung 5.2). So liegt das Absorptionsmaximum des  $P_r$ -Zustandes statt bei 702 nm bei 690 nm und der des  $P_{fr}$ -Zustandes statt bei 747 nm bei 735 nm. Ansonsten ähneln die Spektren denen des BV-

Adduktes, allerdings ist das Verhältnis der Absorption der Q- zur Soretbande beim 18EtBV-Addukt größer. Weiterhin scheint das  $P_{fr}/P_r$ -Verhältnis beim 18EtBV-Addukt in Richtung  $P_r$ -Zustand verschoben zu sein im Vergleich zum BV-Addukt (Abbildung 5.3).

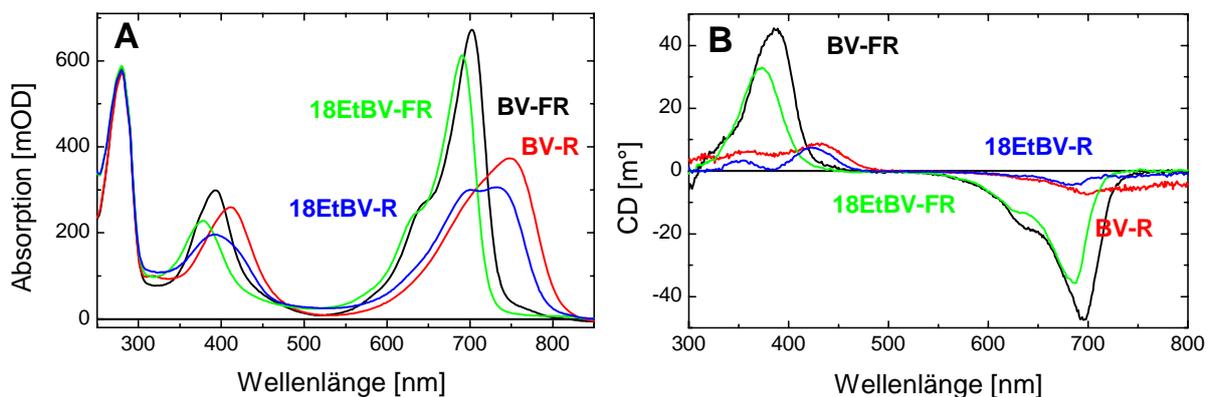


**Abbildung 5.2: Absorptions- und Differenzspektren des 18EtBV Adduktes von Agp1-M15**

(A) Absorptionsspektren von mit 18EtBV assemblierten Agp1-M15 nach roter ( $P_{fr}$ ) und dunkelroter ( $P_r$ ) sättigender Beleuchtung. (B) Vergleich der Differenzspektren ( $P_{fr}-P_r$ ) von mit BV assemblierten und mit 18EtBV assemblierten Agp1-M15. Die Spektren des BV Adduktes wurden anhand der Absorption bei 280 nm auf die 18EtBV-Addukte skaliert. Bedingungen: pH 7,8;  $T=20^\circ\text{C}$ , 20 mM Tris und im Fall des 18EtBV Adduktes 50 mM NaCl.

Auch der Vergleich der Differenzspektren zeigt, dass der größte Unterschied bei den Absorptionsspektren die Lage des Absorptionsmaximums ist.

Die CD-Spektren des 18EtBV-Adduktes nach roter (R) und dunkelroter Beleuchtung (FR) (Abbildung 5.3) stimmen, was Verlauf und Änderung nach roter Beleuchtung angeht, mit denen von M15 überein. Wie schon bei den Absorptionsspektren sind die Maxima im Vergleich zu M15 kurzwellig verschoben. Weiterhin fällt auf, dass die Rotationsstärke des 18EtBV-Adduktes in der dunkelrot beleuchteten Form geringer ist als bei M15. Die 18-Ethylgruppe wirkt sich also auf die Rotationsstärke aus.

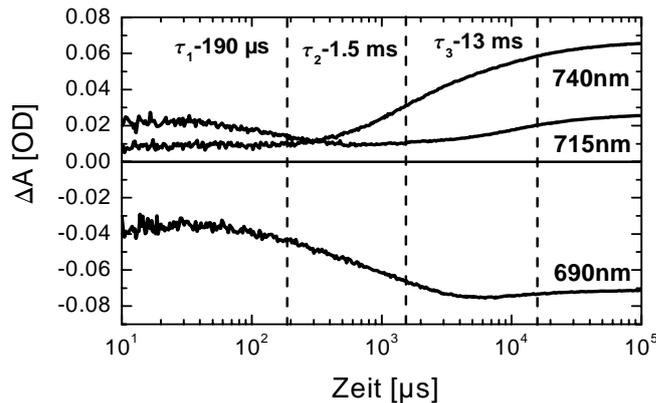


**Abbildung 5.3: Absorptions- (A) und CD-Spektren (B) von M15-BV und M15-18EtBV**

Absorptions- (A) und CD-Spektren (B) von M15-BV und M15-18EtBV nach sättigender roter (R = LED 680 nm) und dunkelroter (LD = 785 nm) Beleuchtung. Die Absorptionsspektren des 18EtBV Adduktes wurden auf die Absorption bei 280 nm von M15-BV skaliert bei einer Schichtdicke von fünf mm. Die Skalierung wurde auch für die CD-Spektren übernommen, die allerdings bei  $d = \text{ein cm}$  gemessen wurden. Bedingungen: BV: 20 mM Tris, pH 7,8; 18EtBV: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,8.

Mit Ausnahme der Rotationsstärke gleichen sich die CD Spektren der beiden Addukte, so dass man sagen kann, dass der Chromophor wohl in beiden Addukten dieselbe Stereochemie besitzt.

Die Kinetik des 18EtBV-Adduktes von M15 nach Laseranregung bei 640 nm wurde analog zu denen der BV Addukte von FL und M15 bei 35 Wellenlängen gemessen. In Abbildung 5.4 sind die drei charakteristischen Wellenlängen bei 690, 715 und 740 nm dargestellt, die aufgrund der kurzwelligen Verschiebung des Absorptionsmaximums den charakteristischen Wellenlängen bei 700, 725 und 750 nm des BV Adduktes von M15 entsprechen.

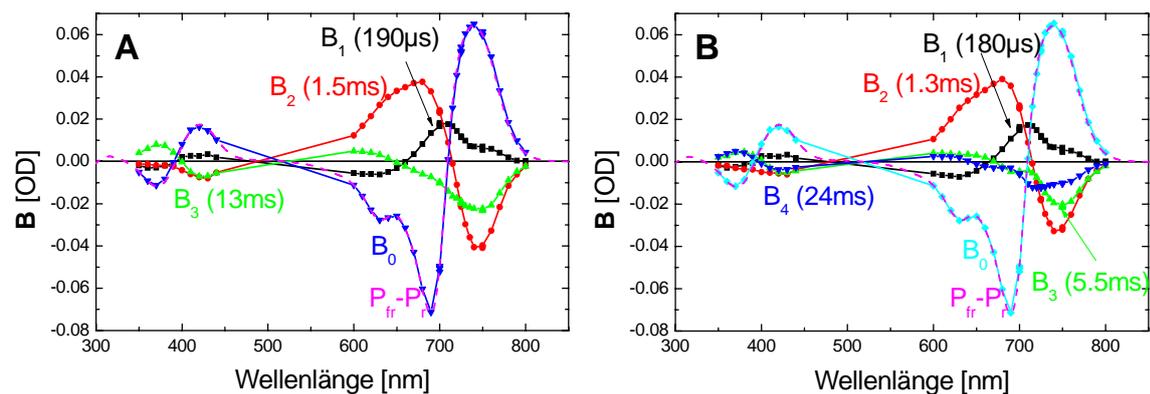


**Abbildung 5.4: Zeitspuren des 18EtBV-Adduktes von Agp1 nach Anregung bei 640 nm.**

Die Wellenlängen der Zeitspuren sind in der Darstellung angegeben. Die Ergebnisse des simultanen Fits sind durch vertikale gestrichelte Linien dargestellt. Bedingungen: 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8, T=20°C.

Die in Abbildung 5.4. dargestellten Zeitspuren von M15-18EtBV durchlaufen in etwa dieselben spektralen Änderungen nach Anregung bei 640 nm wie M15-BV und FL-BV. Im Zeitbereich zwischen zehn und 100  $\mu\text{s}$  werden die für den Lumi-R-Zustand charakteristischen spektralen Änderungen bei diesen Wellenlängen beobachtet (siehe Kap.3). Schon anhand der Zeitspuren ist zu erkennen, dass der Endzustand hier schneller erreicht wird als bei M15-BV oder FL-BV. Bei der SVD-Zerlegung wurden vier spektrale Komponenten erhalten, die allerdings mit einer Summe von drei Exponentialfunktionen gefittet werden konnten, wobei die Zeitkonstanten  $\tau_1=190 \mu\text{s}$ ,  $\tau_2 = 1,5 \text{ ms}$  und  $\tau_3 = 13 \text{ ms}$  erhalten wurden. Mit vier Exponentialfunktionen wurde der Fit nur geringfügig besser, wobei die daraus erhaltenen Amplituden  $B_3$  ( $\tau_3 = 5,5 \text{ ms}$ ) und  $B_4$  ( $\tau_4 = 24 \text{ ms}$ ) sich sehr ähnlich waren (Abbildung 5.5).

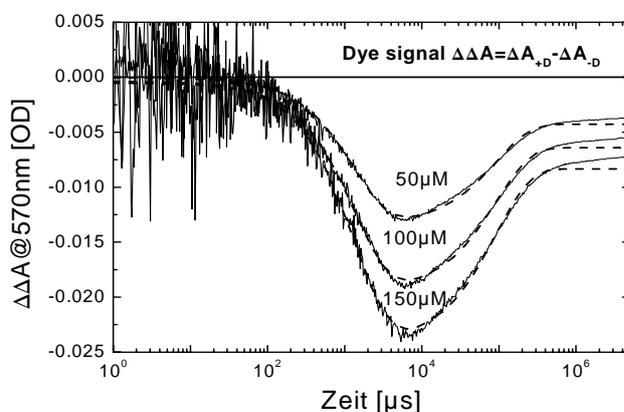
Die Amplituden  $B_1$  und  $B_2$  sind in beiden Fällen nahezu unverändert. Außerdem stimmte in beiden Fällen das extrapolierte Endspektrum mit dem skalierten stationären Differenzspektrum hervorragend überein, und es kommt zu keiner Verbesserung durch die Verwendung von vier Exponentialfunktionen. Weiterhin zeigen die Amplitudenspektren des Fits mit drei Exponentialfunktionen dieselben spektralen Charakteristika wie die der beiden BV-Addukte von FL und M15, weshalb der Fit mit den drei Exponentialfunktionen die Realität sehr gut widerspiegelt. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass auch beim 18EtBV-Addukt in der Kinetik der  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion dieselben Intermediate durchlaufen werden wie bei den beiden BV-Addukten von M15 und FL. Während die Amplituden des 18EtBV-Adduktes sehr gut mit denen von M15-BV übereinstimmen, sind die Zeitkonstanten bei 18EtBV bei allen drei Übergängen kleiner als beim entsprechenden BV-Addukt. Insbesondere die dritte Zeit von M15-18EtBV, die der  $P_{fr}$ -Bildung entspricht, ist um eine Zehnerpotenz kleiner als bei M15-BV (13ms  $\Leftrightarrow$  210 ms). Die Kinetik des 18EtBV-Adduktes ist im Vergleich zum BV-Addukt also beschleunigt und im besonderen die  $P_{fr}$ -Bildung.



**Abbildung 5.5: Amplitudenspektren von M15-18EtBV**

(A) Darstellung der Amplitudenspektren bei Fit mit drei Exponentialfunktionen und (B) bei Fit mit vier Exponentialfunktionen.  $B_1$ - $B_4$  sind die Amplitudenspektren der jeweiligen Übergänge,  $B_0$  ist das daraus berechnete Endspektrum und  $P_{fr}-P_r$  ist das auf  $B_0$  skalierte Differenzspektrum der stationären Messungen.

Die Messung der Protonenänderungen im Medium nach Anregung bei 640 nm in einer ungepufferten Probe zeigte auch beim 18EtBV-Addukt dasselbe Charakteristikum wie sie für M15-BV und FL-BV gefunden wurde. Mit der Meta- $R_C$ -Bildung bei 1,3 ms kommt es zu einer Protonenabgabe ins Medium, während es mit der  $P_{fr}$ -Bildung bei 95 ms zu einer Protonenaufnahme kommt. Wie schon bei den vorangegangenen Messungen, wird die  $P_{fr}$ -Bildung durch die Zugabe von Kresolrot langsamer. Allerdings ist der Effekt im Fall von 18EtBV deutlich stärker ausgeprägt (18EtBV: 13ms  $\rightarrow$  95 ms; BV: 209ms  $\rightarrow$  520 ms).



**Abbildung 5.6: Transientes Farbstoffsignal von Kresolrot bei 570nm**

Transiente Absorptionsänderungen des pH-Indikators Kresolrot bei den drei Konzentrationen 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M und 150  $\mu$ M bei 570 nm in der Anwesenheit von M15-18EtBV nach Anregung bei 640 nm. Die gestrichelten Kurven stellen den simultanen Fit des Farbstoffsignals mit den entsprechenden 740 nm-Zeitspuren von M15-18EtBV dar. Bedingungen: 50 mM NaCl, pH 7,8,  $T=20^\circ\text{C}$  kein Puffer.

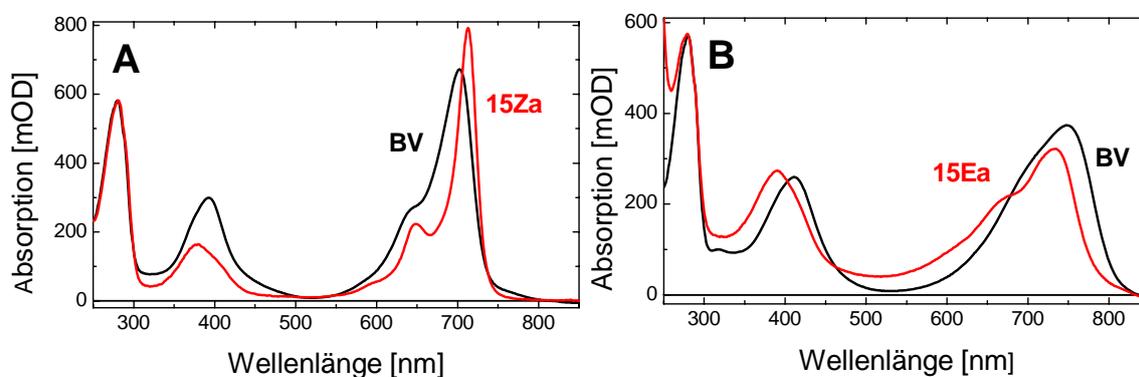
Die Amplitude der Protonenaufnahme ist beim 18EtBV-Addukt erheblich größer als bei M15-BV und FL-BV. Beim 18EtBV-Addukt werden etwa zwei Drittel der vorher abgegebenen Protonen wieder aufgenommen, während es bei M15 etwa 55 Prozent waren. Insgesamt zeigt sich, dass durch den Austausch der C18-Vinylgruppe des Chromophors durch eine Ethylgruppe nicht nur das konjugierte System verändert wird, sondern dass die Vinylgruppe auch einen Einfluss auf die Kinetik der  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion hat. Der Austausch der C18-Vinylgruppe durch die C18-Ethylgruppe führt zu einer Beschleunigung der Kinetik, was mit der

höheren Flexibilität der Ethylgruppe oder mit „Charge-Transfer“-Wechselwirkungen mit Aromatischen Seitenketten in der Bindungstasche zu tun haben kann.

## 5.2 Stereochemie der C/D-Methinbrücke des Chromophors

In der AG Inomata wurden Bilinanaloga synthetisiert, bei denen alle vier möglichen Geometrien der Methinbrücke zwischen den Ringen C und D des Chromophors durch Ethylenbrücken fixiert waren. Die Assemblierung dieser Analoga mit Agp1 und anschließende spektrale Untersuchung in der AG Lamparter ergab, dass das Spektrum des 15Za-Adduktes (Struktur siehe Abbildung 5.1) ein  $P_r$  ähnliches Spektrum ergab und dass das 15Ea-Addukt ein  $P_{fr}$  ähnliches Addukt ergab (Inomata 2005). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass die Methinbrücke der Ringe C und D des Chromophors in  $P_r$  die 15Za- und in  $P_{fr}$  die 15Ea-Konformation/Konfiguration einnimmt. Die Addukte mit den 15Zs und 15Es zeigten keine spektralen Änderungen, die zu einem für Phytochrom charakteristischem Spektrum führen (Inomata 2005), weshalb diese beiden Addukte in dieser Arbeit auch nicht näher untersucht wurden.

Ein Vergleich der Absorptionsspektren des 15Za- und 15Ea-Adduktes mit M15 und den  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Spektren von M15-BV ist in Abbildung 5.7 zu sehen. Wie schon erwähnt zeigt das M15-15Za-Addukt (Abbildung 5.7 A) ein  $P_r$  ähnliches Spektrum. Allerdings ist das Absorptionsmaximum der Q-Bande trotz des kleineren konjugierten Systems mit 714 nm um etwa zehn bis zwölf nm im Vergleich zur  $P_r$ -Form von M15-BV langwellig verschoben. Weiterhin fällt auf, dass die Banden des 15Za-Adduktes viel schärfer sind, wodurch es zu einer Trennung der beiden in der Q-Bande steckenden Banden kommt (714 nm und 649 nm). Auch das Verhältnis der Absorption der Q-Bande zur Soretbande des 15Za-Adduktes ist wesentlich größer als die des BV-Adduktes.



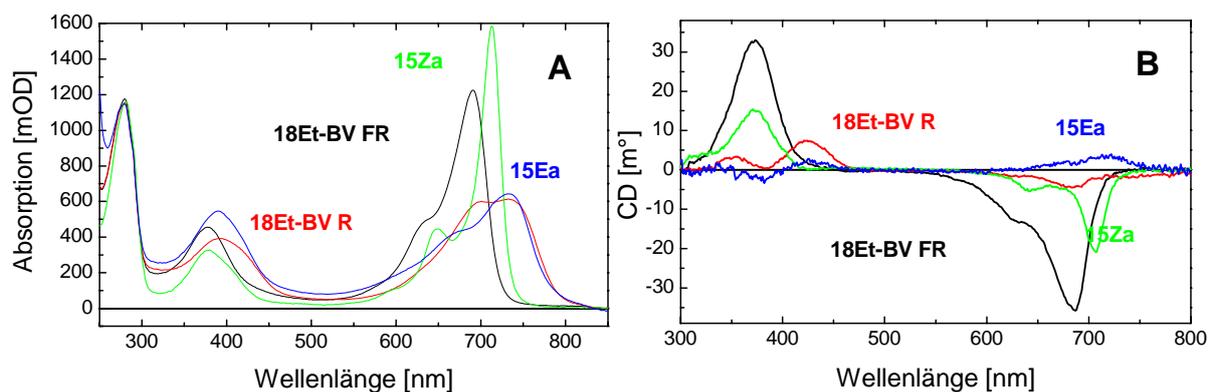
**Abbildung 5.7: Absorptionsspektren der 15Za, 15Ea und dem BV-Addukt von Agp1**

(A) UV-Vis-Spektren von M15 mit BV und dem arretierten Chromophor 15Za assembliert. Das BV Addukt liegt in der  $P_r$ -Form vor. Beide Spektren wurden anhand der 280 nm Absorption aufeinander skaliert (Faktor für das 15Za Addukt 1,28). (B) UV-Vis Spektren des BV-Adduktes in der  $P_{fr}$ -Form und des 15Ea-Adduktes. Die Skalierung erfolgte analog zu A (Faktor für das 15Ea-Addukt 2).

Das Absorptionsmaximum des 15Ea-Adduktes (739 nm) ist im Vergleich zum  $P_{fr}$ -Spektrum des BV-Adduktes wie man es aufgrund des kürzeren konjugierten Systems erwarten würde um etwa zehn nm kurzwellig verschoben. Auch beim 15Ea-Addukt besteht die Q-Bande aus zwei Übergängen. Im Gegensatz zum 15Za-Spektrum kann das Maximum der zweiten Bande nicht bestimmt werden, da die beiden Banden zu stark überlappen.

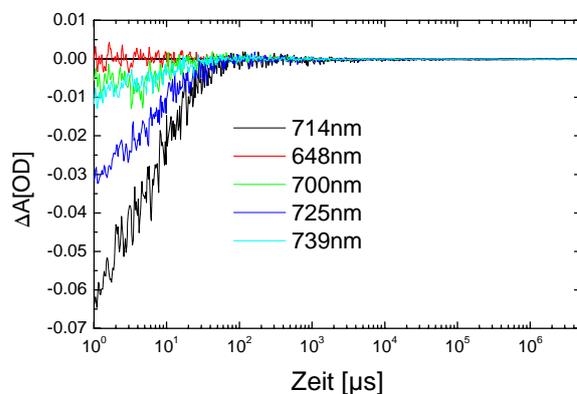
In Abbildung 5.8 B sind die CD-Spektren der 15Za (grün) und 15Ea (blau) Addukte mit M15 dargestellt. Obwohl das 15Za Addukt eine größere Oszillatorstärke aufweist, wie der  $P_r$  Zu-

stand des 18EtBV Adduktes ist die Rotationsstärke des 15Za Adduktes kleiner. Vorzeichen und Verlauf hingegen gleichen dem der P<sub>r</sub>-Form des 18EtBV Adduktes. Die geringere Rotationsstärke des 15Za Adduktes könnte auf einen kleineren Torsionswinkel der Methinbrücke zwischen Ring C und D hinweisen, der durch die Fixierung der Ethylenbrücke verursacht wird. Überraschender ist das CD-Spektrum des 15Ea Adduktes. Hier wird bei etwa 730nm ein positives CD-Signal gemessen, was der in Kapitel 3 gestellten Hypothese widerspricht wie der Vorzeichenwechsel bei pflanzlichem Phytochrom und Cph1 bei der P<sub>r</sub>/P<sub>fr</sub> Konversion zustande kommt. Insgesamt ist das Signal jedoch sehr klein, so dass das positive Signal eventuell nicht relevant ist.



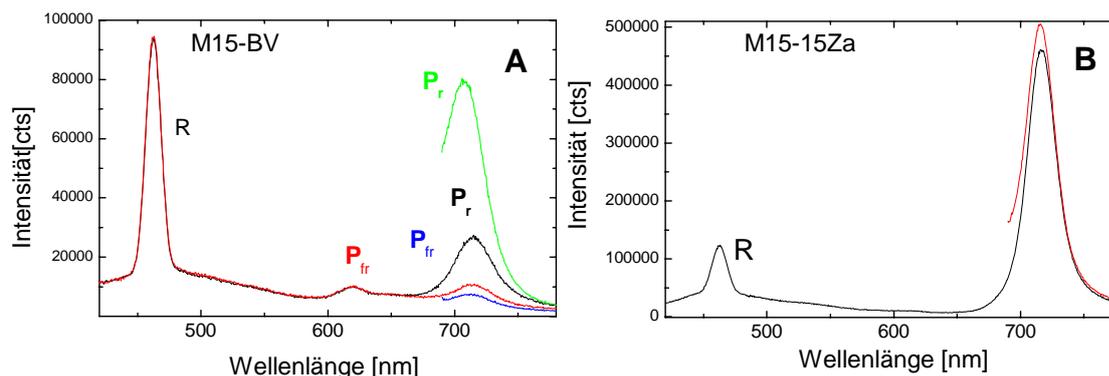
**Abbildung 5.8: Absorptions- und CD-Spektren des 15Za und 15Ea sowie des 18EtBV Adduktes**  
**(A)** Absorptionsspektren des 18EtBV-Adduktes mit M15 nach roter (R) und dunkelroter Beleuchtung (FR) und der 15Za- und 15Ea-Addukte. Die 15Ea- und 15Za-Spektren wurden auf die gleiche Absorption bei 280 nm skaliert und alle Spektren wurden auf eine Schichtdicke von  $d = \text{ein cm}$  skaliert.  
**(B)** Die den Absorptionsspektren entsprechenden CD-Spektren bei  $d = \text{ein cm}$ . Bedingungen: 20 mM Tris, 50 mM NaCl und pH 7,8.

Durch die Arretierung der Methinbrücke zwischen den Ringen C und D des Chromophors sollte die Z/E-Isomerisierung verhindert werden. Bei Untersuchungen der Kinetik nach Anregung im roten Bereich sollten also keine spektralen Veränderungen feststellbar sein. Aus diesem Grund wurden die Absorptionsänderungen einer M15-15Za-Lösung nach Anregung bei 640 nm bei mehreren Wellenlängen verfolgt (635, 648, 670, 700, 714, 725, 739, 750, 764, 360, 381 und 410 nm).



**Abbildung 5.9: Ausgewählte Zeitspuren von M15-15Za nach Anregung bei 640 nm**  
 Bedingungen: 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8 und  $T=20^{\circ}\text{C}$ .





**Abbildung 5.11: Emissionsspektren des BV und 15Za Adduktes von Agp1**

(A) Die Emissionsspektren des BV-Adduktes vom M15 nach Anregung bei 400 (schwarze und rote Kurve) und 680 nm (grüne und blaue Kurve) in den beiden Grundzuständen  $P_r$  und  $P_{fr}$ . (B) zeigt die Fluoreszenz des 15Za-Adduktes nach Anregung bei 400 (schwarz) und 680 nm (rot). Bedingungen: 20 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7,8,  $T = 20^\circ\text{C}$ . Die Spaltbreite in der Anregung betrug zwei nm bei einer Schichtdicke von vier mm und die Spaltbreite in der Emission betrug zehn nm bei einer Schichtdicke von zehn mm.

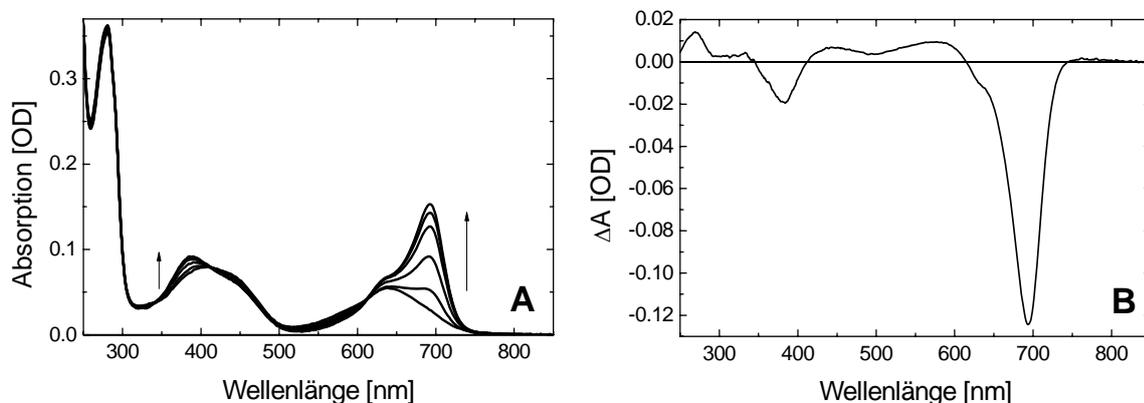
Beim 15ZaAddukt hingegen wird den Erwartungen nach ein größeres Fluoreszenzsignal bei 716 nm gefunden, obwohl die Absorption bei den Anregungswellenlängen geringer war als beim BVAddukt. Eine Normierung des 15Za- und BV-Signals auf die Absorption bei 680 nm (Daten nicht gezeigt) führt zu dem Ergebnis, dass das Fluoreszenzsignal des 15Za-Adduktes etwa 30-mal so groß ist wie das des BV-Adduktes (M15-BV: 30.000 cps; M15-15Za: 900.000 cps). Das Signal bei 620 nm ist bei der gewählten Skalierung nicht zu erkennen, ist aber noch vorhanden. Auch bei 470 nm zeigt M15-15Za noch Fluoreszenz in Form einer breiten Bande.

Der größte Unterschied zwischen M15-BV und M15-15Za besteht am Signal oberhalb 700 nm. Nicht nur das das Signal des BV Adduktes etwa um den Faktor 30 kleiner ist, es ändert sich auch in Abhängigkeit vom Zustand der Probe ( $P_r$  oder  $P_{fr}$ ).

### 5.3 Stereochemie der A/B-Methinbrücke des Chromophors

In der Vergangenheit wurde öfter spekuliert, dass die anfängliche Z/E Isomerisierung nicht die einzige Konformations- und/oder Konfigurationsänderung während der Photokonversion ist (Andel 2000; Mroginski 2004). Nach Mroginski (Mroginski et. al. 2004) weisen die Resonanz Raman Daten von Phy A auf eine Rotation um die 5,6-Einfachbindung der Methinbrücke zwischen den Ringen A und B des Chromophors hin. In den beiden Kristallstrukturen der CBD („Chromophor Binding domain“) des  $P_r$ -Zustandes lag diese Methinbrücke des BV Chromophors in einer 5Zs-Geometrie vor (Wagner 2005/2006; Yang 2007). Um die Geometrie der Methinbrücke, die die Ringe A und B verbindet, zu bestimmen, wurden Agp1-M15 mit den beiden Bilinanaloga 5Zs und 5Za, bei denen die Geometrie durch Ethylenbrücken fixiert ist, assembliert (Inomata 2006). So wies das Spektrum des 5Zs-Adduktes im Dunkeln mit geringen Abweichungen die  $P_r$ -Charakteristika auf und der Chromophor war kovalent mit dem Protein verknüpft (Inomata 2006). In Abbildung 5.12 A ist das Absorptionsspektrum des 5Zs-Adduktes nach Assemblierung im Dunkeln und nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680 nm) dargestellt. Das Absorptionsmaximum der Q-Bande liegt mit 692 nm nahe an dem der Kontrolle (18EtBV: 690 nm). Auch der Verlauf der Bande ist mit dem des  $P_r$ -Spektrums von 18EtBV vergleichbar. Allerdings ist die Absorption in Bezug auf die Bande bei 280 nm sehr gering, was auf Probleme beim Einbau schließen lässt, da auch die Assemblierung etwas

verzögert war (Inomata 2006). Die Soret-Bande ist im Vergleich zu der des 18EtBV-Adduktes stark verbreitert. Dies könnte auf die fehlende positive Ladung auf dem Pyrrolstickstoff des Ringes B zurückzuführen sein (Abbildung 5.1).



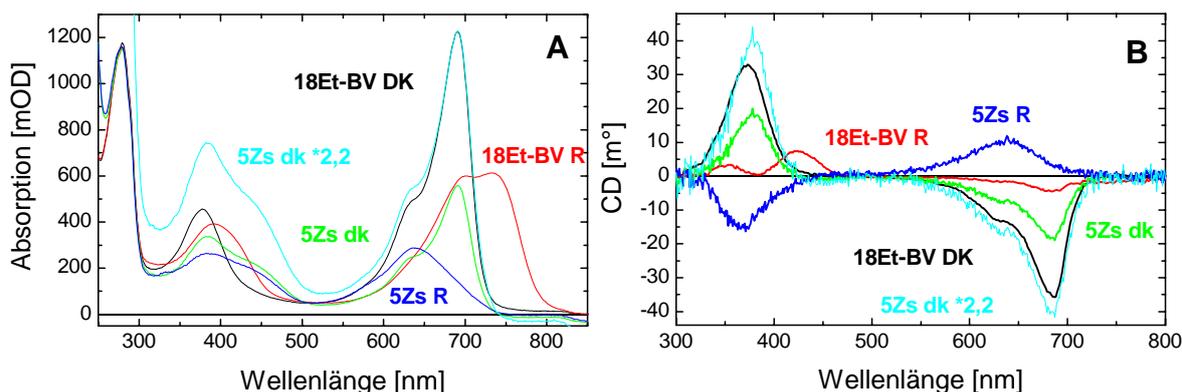
**Abbildung 5.12: Absorptions- und Differenzspektrum des 5Zs-Adduktes von Agp1**

(A) Absorptionsspektren des 5Zs Adduktes nach Assemblierung im Dunklen („dark state“), nach sättigender roter Beleuchtung (LED 680 nm) und nach 5, 20, 60 und 120 min Dunkelreversion.

(B) Differenzspektrum des rot beleuchteten Zustandes minus dem Dunkelassemblierten Zustand. Bedingungen: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, fünf mM EDTA und pH 7,8.

Rotes Licht führt beim 5Zs-Addukt zu einer Bleichung in der Q- und Soretbande (Abbildung 5.12 B). Das Absorptionsmaximum des Photoproduktes der Q-Bande liegt bei 636 nm. Außer einer undefinierten Absorptionzunahme zwischen 400 und 600 nm fehlt jegliche Absorptionzunahme bei 750 nm, die auf die Bildung des  $P_{fr}$ - oder Meta- $R_C$ -Zustandes schließen lassen.

Das CD-Spektrum des Dunkelzustandes von 5Zs ist, was Verlauf und Vorzeichen betrifft, nahezu identisch zu dem CD-Spektrum des  $P_r$ -Zustandes von 18EtBV (Abbildung 5.13 B).



**Abbildung 5.13: Absorptions- und CD-Spektren des 5Zs und 18Et-BV Adduktes**

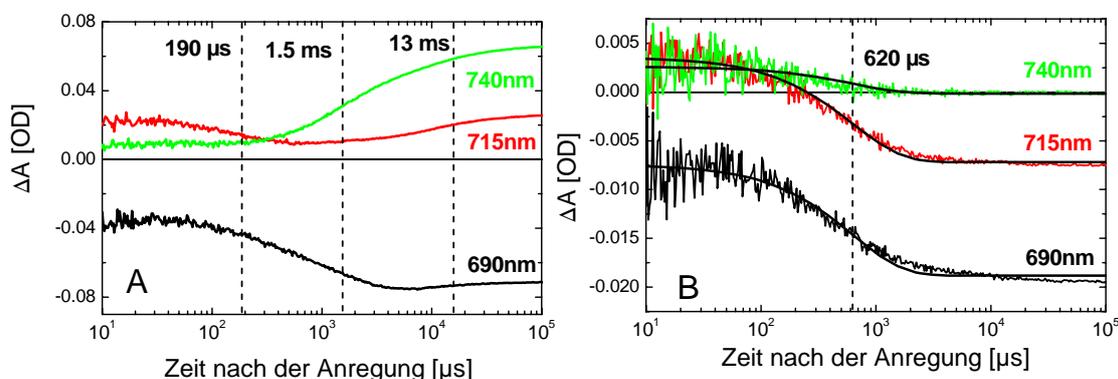
Darstellung der Absorptionsspektren (A) und der CD-Spektren (B) des 18EtBV-Adduktes mit M15 im  $P_r$ - (schwarz) und  $P_{fr}$ -Zustands (rot) im Vergleich mit den Spektren des 5Zs-Adduktes von M15 des Dunkelzustandes (grün dk) und nach roter Beleuchtung (R: blau). Der hellblaue Graph wurde durch Skalierung des Dunkelzustandes von 5Zs auf das Absorptionsmaximum der Q-Bande von 18EtBV erhalten (\*2,2). Bedingungen: 20mM Tris, 50mM NaCl, pH 7,8.

Bei der Skalierung auf das Absorptionsmaximum der Q-Bande sind die absoluten Werte der Rotationsstärke sogar etwas größer als beim 18EtBV-Addukt. Die Arretierung scheint also im

Dunkelzustand keinen großen Einfluss auf die Chiralität des Chromophors in der Bindungstasche zu haben. Nach roter Beleuchtung kommt es in beiden Banden zu einem Vorzeichenwechsel. Das Maximum der Q-Bande wird dabei wie bei den Absorptionsspektren kurzwellig nach 636 nm verschoben. Das CD-Spektrum des Photoproduktes ähnelt damit in keiner Weise dem des  $P_{fr}$ -Zustandes, sondern weist vielmehr erstmalig beobachtete Eigenschaften auf.

Das 5Zs-Addukt lässt sich durch rotes Licht, anders als das BV- und 18EtBV-Addukt, nicht in den  $P_{fr}$ -Zustand überführen, wie die fehlende Absorptionzunahme im Absorptions- und CD-Spektrum zeigt. Für die 5,6-Einfachbindung der Methinbrücke der Ringe A und B wurde eine Rotation im Verlauf der Photokonversion vorhergesagt (Mroginski 2004). Um zu untersuchen, wie sich die Blockierung dieser Methinbrücke auf die Kinetik der  $P_r$ -/ $P_{fr}$ -Photokonversion auswirkt, wurde die Kinetik des 5Zs-Adduktes nach Anregung bei 640 nm untersucht. Da das Photoprodukt des 5Zs-Adduktes nicht durch Beleuchtung in den Ausgangszustand zurück konvertiert werden konnte und da auch die Dunkelreversion sehr langsam war (Abbildung 5.12), wurde die Probe bei jeder Wellenlänge nur viermal angeregt, wobei die Probe nach zwei Anregungen für 30 Minuten unter Lichtausschluss regenerierte. Aufgrund dieser Messmethodik kommt es sukzessive zu einer Ausbleichung der Probe, so dass nur Messungen bei acht unterschiedlichen Wellenlängen angefertigt wurden. Aufgrund der geringen Anzahl an Zeitspuren wurde keine SVD Zerlegung angefertigt, so dass lediglich die entsprechenden Zeitspuren mit denen des 18EtBV-Adduktes verglichen werden (Abbildung 5.14). Das Signal des 5Zs-Adduktes ist stärker verrauscht als das der Kontrolle (18EtBV), was auf die geringere Anzahl der Anregungen pro Wellenlänge zurückzuführen ist.

Der Vergleich bei den drei charakteristischen Zeitspuren 690, 715 und 740 nm des 5Zs Adduktes und des 18Et-BV Adduktes zeigt (Abbildung 5.14), dass Vorzeichen und relative Amplituden der Absorptionsänderungen im frühen Zeitbereich vergleichbar sind und somit charakteristisch für den Lumi-R-Zustand. Die Zeitspuren des 5Zs-Adduktes konnten mit einer Exponentialfunktion gefittet werden und führten zu einer Zeitkonstante von 620  $\mu$ s.



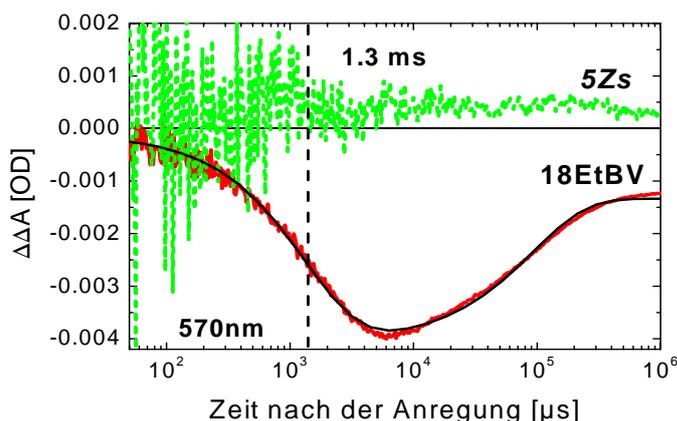
**Abbildung 5.14: Transiente Absorptionsänderungen von M15-18EtBV (A) und M15-5Zs (B) bei den angezeigten Wellenlängen.**

Die Daten wurden von zehn  $\mu$ s bis einer s simultan mit drei Exponentialfunktionen (A) oder einer (B) gefittet. Die Zeitkonstanten sind durch die vertikalen gestrichelten Linien markiert. Bedingungen: 20 mM Tris, 50mM NaCl,  $T=20^{\circ}\text{C}$  und pH 7,8. Die Konzentrationen betragen bei (A) ungefähr 20  $\mu$ M und (B) ungefähr fünf  $\mu$ M.

Im Bereich dieser Zeitkonstanten ( $\tau_1 = 620 \mu$ s) kommt es bei 690 und 715 nm zu einer Absorptionsabnahme, wie sie auch beim ersten Übergang des 18EtBV-Adduktes beobachtet wird, der der  $\text{Meta-R}_A$ -Bildung entspricht. Nach diesen Änderungen können keine weiteren Absorptionsänderungen mehr beobachtet werden, insbesondere bei 740 nm kommt es nicht zu der für die  $\text{Meta-R}_C$ - oder  $P_{fr}$ -Bildung typische Absorptionzunahme. Zwar ist die Zeitkonstante des Überganges beim 5Zs-Addukt größer (620  $\mu$ s) als beim 18EtBV-Addukt, aber auf-

grund der ähnlichen Verläufe der Zeitspuren scheint es so, als ob die Kinetik nach der Meta- $R_A$ -Bildung abbricht.

Der Übergang von Meta- $R_A$  nach Meta- $R_C$  war bisher in allen vorangegangenen Untersuchungen bei Agp1 mit einer Protonenabgabe ins Medium verbunden. In Abbildung 5.15 ist das transiente Absorptionssignal des pH-Indikators Kresolrot bei 570 nm der Kontrolle (18EtBV) und des 5Zs-Adduktes dargestellt. Die Protonenabgabekomponente von 18EtBV hatte eine Zeitkonstante von 1,3 ms und stimmte hervorragend mit der Zeitkonstanten der Meta- $R_C$ -Bildung (1,5 ms) überein.



**Abbildung 5.15:** Die transienten Absorptionsänderungen des pH Indikators Kresolrot (Konz. 100  $\mu$ M) bei 570 nm einer M15-18EtBV- (rot) und M15-5Zs- (grün) Lösung.

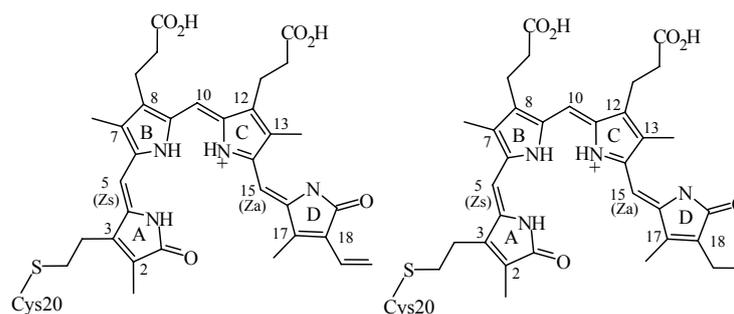
Das Signal des 18EtBV-Adduktes wurde mit zwei Exponentialfunktionen gefittet (schwarze Linie). Die Zeitkonstante der Protonenabgabe von 1,3 ms ist durch eine vertikale gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die beiden Signale wurden anhand der anfänglichen Absorptionsänderungen auf dieselbe Menge an Lumi-R skaliert.

Beim 5Zs-Addukt hingegen konnte im gesamten Zeitbereich kein Farbstoffsignal detektiert werden (Abbildung 5.15). Wie schon bei den Blitzlichtmessungen oben ist das Signal des 5Zs-Adduktes stärker verrauscht. Um die beiden Farbstoffsignale miteinander vergleichen zu können, wurden sie anhand der anfänglichen Absorptionsänderungen auf die gebildete Menge von Lumi-R skaliert. Das fehlende Protonensignal und der Abbruch der Kinetik nach einem Übergang führen zu dem Schluss, dass die Kinetik der  $P_r$ -/ $P_f$ -Photokonversion beim 5Zs-Addukt im Meta- $R_A$ -Zustand hängen bleibt.

## 5.4 Diskussion

### 5.4.1 Bedeutung des C18 Substituenten des Chromophors

Aus technischen Gründen besitzen alle in der AG Inomata synthetisierten arretierten Chromophore statt der C18-Vinylgruppe des BV-Chromophors eine Ethylgruppe. Zur Kontrolle wurden die spektralen Eigenschaften und die Kinetik der  $P_r$ / $P_{fr}$ -Photokonversion des 18EtBV-Adduktes von Agp1 untersucht, wobei der 18EtBV-Chromophor bis auf die C18-Ethylgruppe identisch mit BV ist (Abbildung 5.16).



**Abbildung 5.16: Strukturformel des BV- und 18EtBV-Chromophors nach der Assemblierung im  $P_r$ -Zustand**

Die Geometrie des Chromophors wurde von der Struktur des DrBphP aus Wagner 2005 übernommen.

Die Absorptionsspektren des 18EtBV-Adduktes in den beiden Zuständen  $P_r$  und  $P_{fr}$  sind denen des BV-Adduktes sehr ähnlich. Durch die fehlende Vinylgruppe ist das konjugierte System von 18Et-BV um eine Doppelbindung kleiner als bei BV, weshalb die Absorptionsmaxima des 18EtBV-Adduktes um etwa zehn nm kurzwellig verschoben sind. Auch bei pflanzlichem Phytochrom wurde beim PCB-Addukt im Vergleich zum PΦB-Addukt, bei PCB ist die C18-Vinylgruppe von PΦB zur Ethylgruppe reduziert worden, eine kurzwellige Verschiebung des Absorptionsmaximums um etwa 15 nm gefunden (Schmidt 1996; Ruddat 1997; Remberg 1998) und liegt damit in der Größenordnung, die in diesem Fall gefunden wurde. Das größere Verhältnis in der Absorption der Q- (R-rot) und der Soret-Bande (B-blau) des 18EtBV-Adduktes deutet auf eine gestrecktere Geometrie des Chromophors hin (Falk 1989; Fischer 2005). Da beim 18EtBV nur die Vinylgruppe an Position 18 durch eine Ethylgruppe ersetzt ist, kann das eigentlich nur bedeuten, dass das 18EtBV-Addukt einen kleineren Torsionswinkel zwischen den Ringen C und D einnimmt. Das heißt zwischen der C18-Vinylgruppe von BV und einem Aminosäurerest der Bindungstasche muss eine Wechselwirkung bestehen, durch die der größere Torsionswinkel stabilisiert wird. Aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften kämen dafür nur aromatische („Stacking“) und positiv geladene Aminosäuren in Frage. In den beiden bisher veröffentlichten Kristallstrukturen von Phytochrom (Wagner 2005; Yang 2007) werden eine Reihe solcher Aminosäuren in der Umgebung von Ring D gefunden (Y166, R192, F193 und H280), für die allerdings meist eine Interaktion mit der C19-Carbonylgruppe des Chromophors beschrieben wird. Bei Cph1 führt der Austausch von Tyrosin (Y176, der Homologe Rest in Agp1 ist Y166) durch Histidin zu einem stark fluoreszierenden Phytochrom (siehe auch Kap. 6), was mit einer sterischen Blockierung der Isomerisation erklärt wird (Fischer 2004). Bei Agp1 zeigte dieselbe Mutante allerdings nicht diesen Effekt (Kap. 6), was auf Unterschiede in der Bindungstasche zwischen diesen beiden Phytochromen hinweist. Eine Interaktion zwischen der 18-Vinylgruppe und der Bindungstasche im  $P_r$ -Zustand kann zurzeit also nicht bewiesen werden, so dass die Möglichkeit besteht, dass das unterschiedliche R/B-Verhältnis eine andere Ursache hat. Allerdings würde ein geringerer Torsionswinkel auch die geringere Rotationsstärke des 18EtBV-Adduktes in den CD-Spektren erklären. Da die CD-Spektren ansonsten mit denen des BV-Adduktes vergleichbar sind, kann man annehmen, dass die 18-Ethylgruppe nicht zu weiteren Änderungen der Chromophorgeometrie beiträgt.

In der Kinetik der  $P_r/P_{fr}$ -Photokonversion wirkt sich der Austausch der Vinyl- durch die Ethylgruppe deutlich aus. Während die spektralen Änderungen der Kinetik mit denen der beiden BV-Addukte von M15 und FL vergleichbar sind, wird die Kinetik durch die Ethylgruppe

stark beschleunigt (Tabelle 5.1). Aufgrund der vergleichbaren transienten Absorptionsänderungen, die mit der gleichen Anzahl an Exponentialfunktionen gefittet werden können, kann man trotz der beschleunigten Kinetik davon ausgehen, dass beim 18EtBV-Addukt nach Anregung bei 640 nm dieselben Intermediate durchlaufen werden und es deshalb zu vergleichbaren Konformationsänderungen bei Chromophor und Protein kommt.

Addukt	$\tau_1$	$\tau_2$	$\tau_3$
M15-BV	260 $\mu$ s	2,7 ms	210 ms
M15-18EtBV	190 $\mu$ s	1,5 ms	13 ms

Tabelle 5.1: Zeitkonstanten der  $P_r$ -/ $P_{fr}$ -Photokonversion des BV- und 18EtBV-Adduktes von Agp1-M15.

Der Vergleich der Zeitkonstanten des BV- mit dem 18EtBV-Addukt (Tabelle 5.1) zeigt, dass es in allen Übergängen des 18EtBV-Adduktes zu einer Beschleunigung kommt. Während die Rate der Meta- $R_A$ -Bildung nur geringfügig schneller ist, ist die Zeitkonstante der Meta- $R_C$ -Bildung beim 18EtBV nur noch halb so groß und die der  $P_{fr}$ -Bildung um ein Zehntel kleiner als bei den entsprechenden Übergängen des BV-Adduktes. Das bedeutet, dass bei den beiden letzten Übergängen Konformationsänderungen des Chromophors oder der Bindungstasche erfolgen müssen, wodurch die C18-Vinylgruppe in Kontakt zu anderen Aminosäuren in der Bindungstasche kommt, die die jeweiligen Übergänge verlangsamen. Welche Gruppen dafür verantwortlich sind, ist noch schwieriger zu beantworten als beim  $P_r$ -Zustand, da nicht genau bekannt ist, welche Gruppen der Bindungstasche im Laufe der Photokonversion der 18-Vinylgruppe so nahe kommen, dass dadurch die Photokonversion zwar verzögert, aber nicht verhindert wird. In der Arbeit von Yang wird zwar über eine 15Ea-Tasche spekuliert (Yang et al 2007), diese bringt aber für dieses Problem keine neuen Erkenntnisse, da die Tasche aus den oben erwähnten Aminosäuren besteht. Eine Substitution dieser Aminosäuren könnte in diesem Fall Aufschluss darüber geben. Auch bei pflanzlichem Phytochrom wurde ein Einfluss des C18-Substituenten des Chromophors auf die Kinetik gefunden. So führte die 18-Ethylgruppe immer zu einer Beschleunigung der Kinetik und im frühen Zeitbereich sogar zu einer unterschiedlichen Kinetik (Schmidt 1996; Braslavsky 1997; Ruddat 1997; Remberg 1998). In allen Fällen wurde angenommen, dass es sich dabei um einen sterischen Effekt handelt, der sich darin äußert, dass durch die größere Flexibilität des Substituenten an Ring D dieser leichter an starren Aminosäureresten der Bindungstasche vorbeigeführt werden kann. Selbst bei einer Studie, bei der der Vinylrest durch die sterisch anspruchsvollen Substituenten Isopropyl und tert-butyl ersetzt wurde (Robben 2001), konnte kein Einfluss auf die Spektren der beiden Zustände  $P_r$  und  $P_{fr}$  gefunden werden. Lediglich die Dunkelreversion von  $P_{fr}$  nach  $P_r$  war bei den sterisch anspruchsvollen Substituenten stark verlangsamt. All dies lässt auf einen sterischen Einfluss der C18-Ethylgruppe schließen. Beim *Deinococcus* Phytochrom DrBphP zeigten alle Aminosäuren, die im  $P_r$ -Zustand in Kontakt zum Ring D stehen (Y176 (Y166 Agp1), F203 (F193), Y263 (Y253) und H290 (H280)) nach ihrer Substitution eine veränderte Photokonversion (Wagner 2008). Da aber eine dreidimensionale Struktur des  $P_{fr}$ -Zustandes fehlt, wurden keine Aussagen zur Funktion dieser Aminosäuren getätigt. Außerdem liegen von diesen Mutanten keine kinetischen Daten vor, mit denen man auf den oder die Aminosäure schließen könnte, die mit der Vinylgruppe interagieren. Da die Substitution der 18-Vinylgruppe durch eine Ethylgruppe lediglich zu einer Beschleunigung der Kinetik führt, scheint es sich in diesem Fall tatsächlich um einen sterischen Effekt zu handeln. Das bedeutet aber auch, dass es in der Umgebung von Ring D während der Meta- $R_C$ - und  $P_{fr}$ -Bildung zu großen Konformationsänderungen kommt.

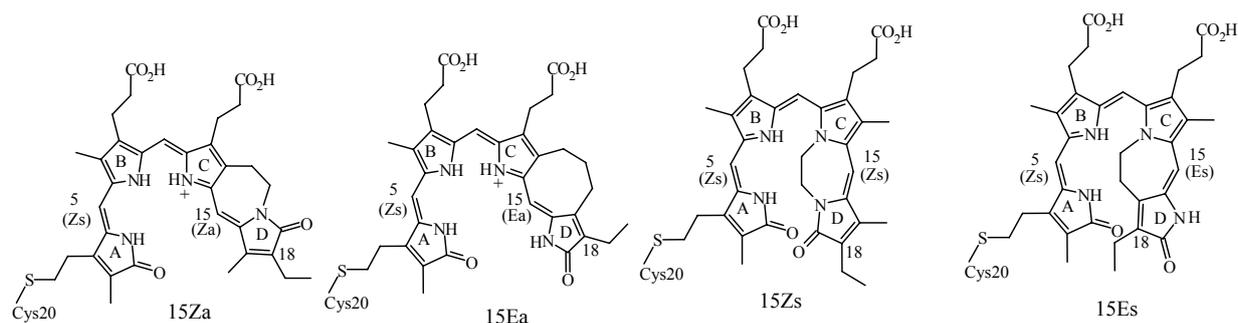
### 5.4.2 Konformations- und Konfigurationsänderungen des Chromophors

Die strukturellen Veränderungen des Chromophors während der Photokonversion wurden in zahlreichen Arbeiten untersucht (Wagner 2005; Anzel 2000; Mizutani 1994; Kneip 1999; Mroginski 2004). Trotz allem gab es bei Beginn der Arbeit keine klaren Vorstellungen darüber, ob es außer der anfänglichen Z/E-Isomerisierung des Chromophors (Rüdiger 1983; Fodor 1990; Hildebrandt 1992; Mizutani 1994; Anzel 1996; Kneip 1999; Anzel 2000) noch zu weiteren Änderungen der Chromophorgeometrie kommt und wenn ja, zu welchen.

Durch die Synthese von synthetischen Bilinanaloga, bei denen die Konformation und Konfiguration der Methinbrücken durch Ethylenbrücken in definierten Geometrien fixiert sind, ergab sich die Möglichkeit einer Zuordnung von Chromophorstrukturen zu bestimmten Photozuständen (Inomata 2005; Inomata 2006; Seibeck 2007).

#### 5.4.2.1 Konformation und Konfiguration der C/D-Methinbrücke

Zur Klärung, welche Konformation und Konfiguration die Methinbrücke zwischen den Ringen C und D des Chromophors einnimmt, wurden die in der AG Inomata synthetisierten Bilinanaloga verwendet, bei denen alle vier möglichen Stereoisomere dieser Methinbrücke fixiert waren (Abbildung 5.17).



**Abbildung 5.17: Strukturformeln der in 15Za, 15Ea, 15Zs und 15Es arretierten Chromophore wie sie nach der Assemblierung mit Agp1 in der Bindungstasche im  $P_r$ -Zustand vorliegen sollten**

Nur bei der Assemblierung der beiden Chromophore, bei denen die 14,15-Einfachbindung in der anti-Konformation vorliegt, wurden Spektren erhalten, bei denen es zu einer Absorptionzunahme im roten Spektralbereich kam (Inomata 2005). Bei den Chromophoren 15Zs und 15Es kam es stattdessen zu einer Absorptionzunahme im Bereich bei 430 und 433 nm (Inomata 2005). Das nach der Assemblierung erhaltene Spektrum mit dem 15Za-Chromophor ähnelte stark den  $P_r$ -Spektren von Phytochrom. Die 15Z-Konfiguration wurde schon früh durch NMR-Studien verifiziert (Rüdiger 1983), während für die Konformation der 14,15-Einfachbindung bisher beide Möglichkeiten diskutiert wurden. Kneip schloss aus seinen schwingungsspektroskopischen Daten auf eine anti-Konformation, wohingegen bei Tokutomi die syn-Konformation favorisiert wurde. In den beiden bakteriellen Phytochromen DrBphP und RpBphP3 lag der Chromophor im  $P_r$ -Zustand in der 15Za-Geometrie vor, wie die beiden Kristallstrukturen zeigten. Anhand des erhaltenen Spektrums des 15Za-Adduktes kann man also davon ausgehen, dass auch bei Agp1 der Chromophor in  $P_r$  die 15Za-Stereochemie einnimmt.

Die spektrale Bandbreite der Banden des 15Za-Adduktes ist geringer als beim entsprechenden BV- oder 18EtBV-Addukt, wodurch die beiden Banden der Q-Bande gut getrennt sind. Diese

geringere spektrale Bandbreite könnte seine Ursache in der Fixierung der C/D-Methinbrücke haben, wodurch diese weniger beweglich wird. Weiterhin ist das Absorptionsmaximum der Q-Bande mit 714 nm um etwa 24 nm langwellig gegenüber dem P<sub>fr</sub>-Spektrum des 18EtBV-Adduktes (690 nm) verschoben und zeigt auch eine stärkere Absorption. In den beiden Kristallstrukturen ist der Ring D des Chromophors um etwa 40° zum Ring C verdreht. Durch die Arretierung ist diese Torsion stark eingeschränkt. Eine geringere Torsion führt zu einer besseren Überlappung des konjugierten Systems, infolgedessen es zu einer langwelligen Verschiebung und einer Absorptionzunahme kommt. Da auch das 15Za-CD-Spektrum eine geringe Rotationsstärke aufweist, deutet vieles darauf hin, dass die Arretierung zu einem geringeren Torsionswinkel der C/D-Methinbrücke führt, was sich in der größeren Oszillatorstärke und der bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums äußert.

Das Absorptionsspektrum des 15Ea-Chromophors gleicht vom Verlauf her den P<sub>fr</sub>-Spektren von Phytochrom. Anders als beim arretierten 15Za-Chromophor kommt es beim 15Ea-Chromophor nicht zu einer langwelligen Verschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zum P<sub>fr</sub>-Zustand des 18EtBV-Adduktes (739 nm zu 740 nm). Der arretierte 15Ea-Chromophor in Agp1 ist in seiner Geometrie anscheinend dem 18EtBV-Chromophor in Agp1 sehr ähnlich. Überraschend ist in diesem Hinblick das kleine positive CD-Signal der Q-Bande des 15Ea-Adduktes. Nach der in Kapitel 3 aufgestellten Hypothese würde für einen planaren Ring D eher ein negatives CD-Signal erwartet, dass durch den Torsionswinkel von Ring A zur Ebene B/C entsteht.

Allerdings wurde für das 15Ea-Addukt (Inomata 2005) ein vom P<sub>fr</sub>-Zustand des 18EtBV-Adduktes abweichendes Proteolysemuster gefunden. Das 15Ea-Addukt weist also anscheinend trotz der spektralen Übereinstimmung mit dem P<sub>fr</sub>-Zustand eine andere Proteinkonformation auf. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Chromophorkonformation nicht vollständig mit der des 18EtBV im P<sub>fr</sub>-Zustand übereinstimmt. Bis zur Lösung einer Phytochromstruktur im P<sub>fr</sub>-Zustand sind Aussagen über die genaue Chromophorgeometrie schwierig und erschweren die Interpretation der Daten.

Insgesamt zeigen der Einbau und die kovalente Verknüpfung aller vier Stereoisomere der Methinbrücke zwischen Ring C und D, dass die Bindungstasche gegenüber Substraten mit unterschiedlicher Konformation sehr tolerant ist. Für die Ausbildung der typischen spektralen Eigenschaften von Phytochrom hingegen spielt die Stereochemie der C/D-Methinbrücke eine entscheidende Rolle. Die bei den beiden syn-Konformeren beobachtete Zunahme im blauen Spektralbereich wird unter anderem durch die Torsion der B/C-Methinbrücke erklärt, deren Ursache in sterischen Problemen zwischen Ring D mit Aminosäuren der Bindungstasche liegen soll, die ansonsten den Ring D umgeben (Inomata 2006). Bei der Assemblierung der in syn-Konformation arretierten Chromophore kann der Ring D nicht in die dafür vorgesehene Bindungstasche gleiten, sondern es kommt zu der angesprochenen Torsion um die C10-Methinbrücke, was die beobachtete kurzwellige Verschiebung zur Folge hätte. In diesem Zusammenhang werden auch noch andere Möglichkeiten, wie ein nukleophiler Angriff auf die Doppelbindung der C10-Methinbrücke oder eine helikale Struktur des Chromophor diskutiert (Inomata 2005).

Auf jeden Fall wurde durch die Verwendung der arretierten Bilinanaloga auf elegante Weise die Konformation und Konfiguration der C/D-Methinbrücke für den P<sub>r</sub>-Zustand mit 15Za- und den P<sub>fr</sub>-Zustand mit 15Ea bestimmt, mit der Einschränkung, dass der Torsionswinkel zwischen Ring C und D stark eingeschränkt ist, so dass das Bild nicht vollständig ist. Geht man davon aus, dass alle Phytochrome vergleichbare Änderungen bei der Photokonversion durchlaufen, kann eine zusätzliche Rotation um die 14,15-Einfachbindung wie sie z.B. bei AnDel vorgeschlagen wurde (AnDel et al 2000) ausgeschlossen werden. Auf jeden Fall kann es als gesichert betrachtet werden, dass zumindest bei den BV einbauenden Phytochromen die Ste-

reochemie des Chromophors im  $P_r$ -Zustand die 15Za- und im  $P_{fr}$ -Zustand die 15Ea-Konformation/Konfiguration einnimmt.

### 5.4.2.2 Photochemie und Fluoreszenz des 15Za-Adduktes

Durch die Arretierung sollte die Z/E-Isomerisierung des 15Za-Chromophors verhindert werden. Beim Agp1-Addukt des 15Za-Chromophors konnten dann auch weder stationär noch transient die für die Photokonversion typischen Absorptionsänderungen beobachtet werden. Bei den transienten Messungen kommt es durch die Anregung zu einer wellenlängenabhängigen Abnahme in der Absorption, die zum Zeitpunkt von etwa 100  $\mu$ s wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen ist. Diese anfängliche Absorptionsabnahme kann ihre Ursache in einem langlebigen angeregten Zustand haben, oder es kann sich um einen Artefakt der Blitzlichtanregung handeln, was aufgrund des zeitlichen Rahmens wahrscheinlicher ist. Das 15Za-Addukt zeigt also wie erwartet keine Photoreaktion nach der Anregung.

Phycobiliproteine, die Bestandteil der Lichtsammelkomplexe des Photosystems sind, bauen ebenfalls lineare Tetrapyrrole ein und weisen nach der Assemblierung ähnliche Absorptionsspektren auf wie der  $P_r$ -Zustand bei den Phytochromen (Scheer 1981). Die Anregung führt in diesem Fall nicht zur Photoreaktion, sondern die zugeführte Energie wird durch Fluoreszenz abgegeben und mittels Förster-Transfer auf das nächste Phycobiliprotein übertragen (Scheer 2003). Die unterschiedliche Proteinmatrix führt also zu einer unterschiedlichen Photochemie. Da es auch beim 15Za-Chromophor nicht zur photoinduzierten Z/E-Isomerisierung kommt, bestand die Möglichkeit, dass die Fluoreszenz beim 15Za-Addukt größer ist als beim nicht arretierten Chromophor. So zeigte das PEB-Addukt des Pflanzenphytochroms Phy A eine starke Fluoreszenz, was auf die fehlende 15,16-Doppelbindung zurückgeführt wird, die bei PEB reduziert ist (Li 1995).

Wie die Untersuchung der stationären Fluoreszenz gezeigt hat, führt schon die Assemblierung von BV zu einem veränderten Fluoreszenzverhalten. Die Fluoreszenz bei 480 nm geht durch den Einbau stark zurück und es können zwei schwache Fluoreszenzbanden bei 620 und 708 nm detektiert werden. Durch die Assemblierung wird die durch Absorption aufgenommene Energie statt in Fluoreszenz in die Photoreaktion geleitet. Auch bei anderen Phytochromen konnte für die Q-Bande ein kleines Fluoreszenzsignal detektiert werden (Sineshchekov 1995), die bei Raumtemperatur in etwa den gleichen „Stokes-Shift“ (der Unterschied zwischen Absorptions- und Emissionsmaximum) aufwies. Auch der Rückgang der Fluoreszenz nach roter Beleuchtung wurde schon bei anderen Phytochromen beobachtet (Sineshchekov 1995). Das restliche Fluoreszenzsignal entspricht dabei in etwa dem  $P_r$ -Anteil nach roter Beleuchtung, so dass vermutet wird, dass der  $P_{fr}$ -Zustand gar nicht fluoresziert. Das wiederum bedeutet, dass entweder im  $P_{fr}$ -Zustand die Energie vollständig in die Photoreaktion geht oder dass es andere strahlungslose Desaktivierungskanäle gibt. Die Bande bei 620 nm war in allen Spektren annähernd gleich groß. Die Herkunft dieser Bande ist im Augenblick unklar, sie muss aber von einem höher angeregten Zustand kommen, da die Fluoreszenz aufgrund ihrer Entstehung (siehe Kap. 2) immer langwellig verschoben ist.

Beim 15Za-Addukt führt die Arretierung der C/D-Methinbrücke wie erwartet zu einer starken Fluoreszenzzunahme gegenüber dem nicht arretierten BV-Addukt. Auch beim 15Za-Addukt scheint es eine Bande bei etwa 620 nm zu geben, die allerdings im Vergleich zur Fluoreszenz der Q-Bande sehr gering ist. Diese Bande scheint also typisch für Agp1 zu sein, da sie in anderen Phytochromen bisher nicht beobachtet wurde.

Die Photoreaktion und die Fluoreszenz sind zwei Wege, über die ein angeregter Zustand zerfallen kann. Oftmals stehen diese beiden Deaktivierungskanäle in direkter Konkurrenz zueinander. Am Beispiel von Phycobiliproteinen und Phytochromen lässt sich der Einfluss der Pro-

teinmatrix auf das photochemische Verhalten besonders gut studieren. Obwohl in beiden Fällen dieselben Chromophore kovalent eingebaut werden, was auch noch zu ähnlichen Spektren führt, führen die Phycobiliproteine ihre aufgenommene Energie mittels Fluoreszenz ab und Phytochrome über die Photoreaktion, der *Z/E*-Isomerisierung. Durch den arretierten Chromophor 15Za konnte noch einmal ganz deutlich gezeigt werden, dass die *Z/E*-Isomerisierung der entscheidende Schritt für die Photoreaktion ist. Bei den Phycobiliproteinen muss diese Isomerisation also blockiert sein, was bedeutet, dass die Bindungstasche bei den Phycobiliproteinen spezifische Unterschiede aufweisen muss. Sequenzanalysen und Strukturanalysen könnten in diesem Bereich Aufschluss über das unterschiedliche photochemische Verhalten geben. Vor allem die Lokalisierung von Aminosäureresten die essentiell für die Photokonversion sind würde hilfreich sein.

### 5.4.2.3 Änderungen der Stereochemie der A/B-Methinbrücke des Chromophors

In den Kristallstrukturen des *Deinococcus* (DrBphP) und *Palustris* (RpBphP3) Phytochroms wurde die Stereochemie der A/B-Methinbrücke mit 5Zs bestimmt (Wagner 2005; Yang 2007). Für das Pflanzenphytochrom A wurde aufgrund von Dichtefunktional Rechnungen vorgeschlagen, dass es während der Photokonversion von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  zu einer Rotation um die 5,6-Einfachbindung kommt (Mroginski 2004).

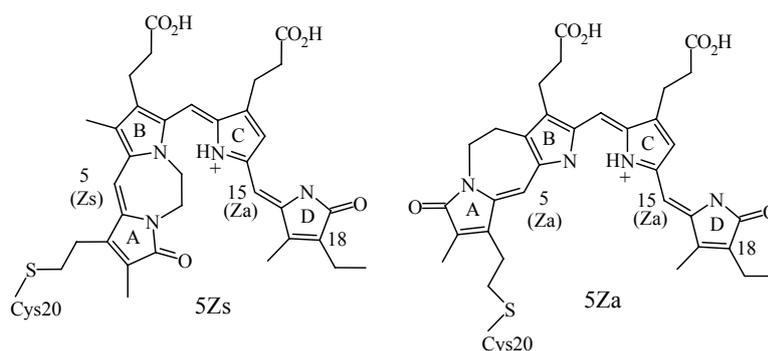


Abbildung 5.18: Strukturformeln der beiden arretierten Bilinanaloga 5Zs und 5Za, wie sie nach der Assemblierung mit Agp1 und der kovalenten Verknüpfung in der Bindungstasche vorliegen

Die Spektren der Addukte mit den beiden arretierten Konformeren 5Zs und 5Za führten in beiden Fällen zu  $P_r$  ähnlichen Spektren (Inomata 2006), wobei das Absorptionsmaximum des 5Za-Chromophors mit 672 nm um etwa 20 nm kurzwellig zum  $P_r$ -Spektrum des 18EtBV-Adduktes verschoben war und bei etwa 710 nm noch eine kleine Schulter in der Q-Bande aufweist. Das Absorptionsmaximum des 5Zs-Adduktes entspricht mit 692 nm ziemlich genau dem des  $P_r$ -Zustandes (Seibeck 2007; Inomata 2006) der Kontrolle (18EtBV-Addukt). Allerdings ist die Absorption geringer als bei der Kontrolle und auch die Soret-Bande ist im Vergleich zur Kontrolle stark verbreitert. Beim 5Zs-Chromophor wird die positive Ladung aufgrund der Ethylenbrücke auf Ring C lokalisiert, wohingegen sie ohne die Ethylenbrücke auf den Pyrrolsticktoffen von Ring B und C delokalisiert ist. Diese Lokalisierung kann zu Störungen in den elektronischen Wechselwirkungen führen, insbesondere die Ausbildung von wichtigen Wasserstoffbrücken, wie sie anscheinend bei Phytochrom ausgebildet werden, kann gestört sein (Wagner 2005, 2006 und Yang 2007). Bei 5Za ist die positive Ladung nicht auf

Ring C lokalisiert und im resultierenden Spektrum kann keine verbreitete Soretbande beobachtet werden, und auch das Verhältnis zwischen Q- und Soretbande ist besser als beim 5Zs-Addukt (Inomata 2006; Seibeck 2007). Da sich beim 5Zs-Addukt trotzdem noch ein  $P_r$  ähnlicher Zustand ausbildet, scheint diese Lokalisierung keinen entscheidenden Effekt auf diese Übergänge zu haben. Aufgrund des  $P_r$  ähnlichen Spektrums des 5Zs-Adduktes und der gefundenen 5Zs-Stereochemie in den Kristallstrukturen kann man davon ausgehen, dass in  $P_r$  von Agp1 der Chromophor in der 5Zs-Stereochemie vorliegt. Auch die Übereinstimmung des CD-Spektrums des 5Zs-Adduktes im Dunkeln mit den CD-Spektren des  $P_r$ -Zustandes sprechen für eine 5Zs-Geometrie der A/B-Methinbrücke.

Die Photokonversion des 5Zs- und 5Za-Adduktes führt im ersten Fall zu einer Bleichung in der Q- und Soretbande, wodurch ein Photoprodukt mit einem kurzwellig verschobenen Absorptionsmaximum (636 nm) gebildet wird, das im Dunkeln in den Ausgangszustand zurück konvertiert (Seibeck 2007, Inomata 2006). Beim 5Za-Addukt kommt es zu einer teilweise langwelligen Verschiebung, weshalb angenommen wird, dass die 5Za-Stereochemie der  $P_{fr}$ -Stereochemie der A/B-Methinbrücke sehr ähnlich ist (Inomata 2006).

Beim Pflanzenphytochrom Phy A konnte die Verschiebung der Resonanz Raman Bande der C=C Streckschwingung der A/B-Methinbrücke von Lumi-R nach  $P_{fr}$  nur durch eine Rotation um die 5,6-Einfachbindung erklärt werden (Mroginski 2004). Diese Rotation müsste dann bei einem der drei Übergänge von Lumi-R nach  $P_{fr}$  stattfinden. Die Ergebnisse der Blitzlichtmessungen mit dem 5Zs-Addukt, bei dem eine solche Rotation durch die Ethylenbrücke verhindert wird, deuten darauf hin dass die Rotation beim Übergang von Meta- $R_A$  nach Meta- $R_C$  stattfinden müsste. Die anfänglichen Absorptionsänderungen nach Anregung im Roten verlaufen für das 5Zs-Addukt ähnlich wie beim 18EtBV-Addukt, was anhand der Absorptionsänderungen zwischen zehn und 100  $\mu$ s bei den drei charakteristische Wellenlängen gut verfolgt werden kann (Abbildung 5.14). Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch beim 5Zs-Addukt ein Lumi-R ähnliches Intermediat gebildet wird, dass dann mit einer Zeitkonstanten von 620  $\mu$ s zerfällt. Die dabei auftretenden spektralen Änderungen sind vergleichbar mit denen der Meta- $R_A$ -Bildung und auch die Zeitkonstante liegt im für die Meta- $R_A$ -Bildung beobachteten Zeitbereich. Im Vergleich zur Kontrolle ist die Zeitkonstante für diesen Übergang aber dreimal so groß, so dass man davon ausgehen muss, dass es schon bei der Meta- $R_A$ -Bildung zu Störungen kommt, die vielleicht mit der Lokalisierung der positiven Ladung in Verbindung stehen. Nach der Bildung des Meta- $R_A$  ähnlichen Intermediates können keine weiteren spektralen Änderungen mehr beobachtet werden. Weiterhin konnte keine Protonenabgabe ins Medium beobachtet werden, wie sie für den Meta- $R_C$ -Übergang charakteristisch ist und auch die mit der Meta- $R_C$ -Bildung einhergehenden bathochrome Verschiebung der Absorption erfolgt nicht. Aufgrund dieser Daten kann man davon ausgehen, dass die arretierte A/B-Methinbrücke die Meta- $R_C$ -Bildung verhindert. Ob dabei, wie postuliert wurde (Mroginski 2004), eine Rotation um die 5,6-Einfachbindung verhindert wird, oder ob es zusätzlich zu einer Konfigurationsänderung ( $P_r$ : 5Zs  $\Rightarrow$   $P_{fr}$  5Ea) kommt wie von Inomata vorgeschlagen (Inomata 2006), werden erst weitere Experimente mit Chromophoren, die in dieser Konfiguration arretiert sind, zeigen. Wie schon bei den C15 arretierten Chromophoren kann die Einschränkung der Torsionswinkel durch die Arretierung hier eine noch nicht genau definierte Rolle spielen. Die Tatsache, dass nach roter Beleuchtung beim 5Za-Addukt kein richtiges  $P_{fr}$  gebildet wird, spricht gegen eine simple Rotation um die 5,6-Einfachbindung. Weiterhin darf man nicht außer Acht lassen, dass zwischen C5 und C6 keine Einfachbindung im klassischen Sinne besteht. Da die Methinbrücke am konjugierten System beteiligt ist, hat die Verbindung zwischen C5- und C6-Doppelbindungscharakter. Die Einfachbindung ist nur ein Hilfsmittel zur Beschreibung der Stereochemie.

Ein weiteres Problem ist das fehlende Proton auf dem Pyrrolstickstoff von Ring B. Die Möglichkeit, dass dieses Proton an der Meta- $R_C$ -Bildung beteiligt ist, kann nicht ausgeschlossen

werden. Wenn dem so ist, würde die Kinetik nicht aufgrund der Arretierung der A/B-Methinbrücke abbrechen, sondern aufgrund des fehlenden Protons und damit der fehlenden Teillaadung auf dem Pyrrolstickstoff. Zwar stimmt das Absorptionsmaximum des 5Zs-Addukt mit dem P<sub>r</sub>-Zustand des 18EtBV-Adduktes überein, in anderen Arbeiten aber konnte gezeigt werden, dass Änderungen im Proteingerüst, die zu einer veränderten Photokonversion führen, die Ausbildung eines P<sub>r</sub> ähnlichen Spektrums nur geringfügig beeinflussen (Fischer 2004; Oka 2004; Cherry 1993; Reiff 1985; Kneip 2000; Noack 2007; von Stetten 2007; Wagner 2008). Änderungen im Proteingerüst der Bindungstasche führen also nur zu geringen Unterschieden bei den spektralen Eigenschaften des P<sub>r</sub>-Zustandes, was bedeutet, dass dieser toleranter gegenüber Veränderungen ist, als die Photokonversion nach P<sub>fr</sub>.

Das CD-Spektrum des Photoproduktes des 5Zs-Adduktes unterscheidet sich total von denen des P<sub>r</sub>- und P<sub>fr</sub>-Zustandes des BV- und 18EtBV-Adduktes von Agp1. Auch bei den PCB und PΦB einbauenden Phytochromen wurde nie ein Vorzeichenwechsel in beiden Banden beobachtet (Litts 1983). Der Vorzeichenwechsel in beiden Banden lässt darauf schließen, dass der Chromophor eine umgekehrte Chiralität im Vergleich zum Ausgangszustand besitzt. Da die Arretierung der Ringe A und B mögliche Torsionswinkel stark einschränkt, kann man davon ausgehen, dass der Vorzeichenwechsel allein durch die Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung verursacht wird. Die  $\alpha$ -Untereinheit des Phycobiliproteins Phycoerythrocyanin (PEC) verwendet den Chromophor Phycoviolobin, bei dem die Doppelbindung der A/B-Methinbrücke reduziert ist, weshalb Ring A nicht am konjugierten System beteiligt ist. Im Gegensatz zu allen anderen an der Photosynthese beteiligten Phycobiliproteinen zeigt PEC neben der Fluoreszenz eine reversible, mechanistisch dem Phytochrom vergleichbare Photochemie (Storf 2003). Die Photochemie beruht dabei hauptsächlich auf einer Z/E-Isomerisierung der 15,16-Doppelbindung (Zhao 1995). Die CD-Spektren dieser beiden Zustände weisen, wie beim 5Zs-Addukt von Agp1 eine Umkehr des CD-Signals in beiden Banden auf (Zhao 1995). Da in beiden Fällen der Ring A nicht am konjugierten System beteiligt ist, kann man annehmen, dass der Wechsel von der Z- zur E-Konfiguration der 15,16-Doppelbindung zum Wechsel in der Chiralität führt. Da die kinetischen Daten des 5Zs-Adduktes für eine Blockierung der Meta-R<sub>C</sub>-Bildung sprechen, müssten die CD-Spektren des Lumi-R und Meta-R<sub>A</sub> Intermediates genau diesen Vorzeichenwechsel im Vergleich zum P<sub>r</sub>-Zustand aufweisen. Die CD-Spektren des P<sub>fr</sub>-Zustandes kommen dann durch Änderungen des Torsionswinkels der A/B-Methinbrücke und eventuell nachfolgende Änderungen der C/D-Methinbrücke während den Übergängen nach Meta-R<sub>C</sub> und P<sub>fr</sub> zustande. Auch bei den CD-Messungen mit dem Pflanzenphytochrom A, bei denen die Intermediate bei tiefen Temperaturen eingefangen wurden, kam es zu einem Vorzeichenwechsel beim Lumi-R Intermediat im Vergleich zum P<sub>r</sub>-Zustand (Eilfeld 1988). Die Intermediate Meta-R<sub>A</sub> und Meta-R<sub>C</sub> und der P<sub>fr</sub>-Zustand zeigten nur eine geringe Rotationsstärke. Da ansonsten keine CD-Daten über die Intermediate zur Verfügung stehen, wäre es zu einer Überprüfung der hier aufgestellten Hypothese nötig, die transienten Änderungen des CD-Signals nach roter Anregung zu messen. Weiterhin hilfreich könnten Resonanz-Raman-Messungen gerade des Photoproduktes hilfreich sein. Da mit dieser Methode der Protonierungszustand des Chromophors bestimmt werden kann, wäre es interessant zu wissen, ob der Chromophor im Photoprodukt noch protoniert wäre.

Auf jeden Fall sprechen alle Daten des 5Zs-Adduktes dafür, dass die Anregung der Q-Bande zur Ausbildung eines Lumi-R und Meta-R<sub>A</sub> ähnlichen Intermediates führt und dass die Meta-R<sub>C</sub>-Bildung durch die Arretierung der Methinbrücke zwischen den Ringen A und B des Chromophors blockiert ist. Ob es dabei zu einer einfachen Rotation um die C5/6-Einfachbindung kommt oder zu einer weiteren Isomerisation, wie bei Inomata (Inomata et al. 2006) vorgeschlagen, müssen weitere Experimente zeigen. Auf jeden Fall ist die Änderung der Stereochemie der A/B-Methinbrücke ein weiterer Schlüsselschritt für die P<sub>fr</sub>-Bildung.

