

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund

Seit den Anfängen der organischen Chemie beschäftigen sich Wissenschaftler mit Gallenfarbstoffen, den sogenannten Bilinen (lat. bilis: Galle). So konnten Thenard und Berzelius aus den Gallensteinen von Menschen verschiedene Farbstoffe isolieren (Thenard, 1807; Berzelius, 1808). Diese Farbstoffe wurden später weiter aufgereinigt und in Anlehnung an ihre Farbe als Biliverdin (ital./span. verde: grün) bzw. Bilirubin (lat. ruber: rot) bezeichnet (Heintz, 1851; Städeler, 1864). Die Vermutung, daß sie als Abbauprodukte des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin entstehen, geht auf Rudolf Virchow zurück (Virchow, 1847). Die Strukturen von Biliverdin und Bilirubin wurden knapp 100 Jahre später durch Totalsynthese aufgeklärt (Fischer & Plieninger, 1942). Damit war ein offenkettiges Tetrapyrrol als Grundgerüst aller Biline bekannt¹.

Biline kommen in der Natur fast immer an Proteine gebunden vor, weil sie in freier Form entweder instabil oder toxisch sind. So ist freies Bilirubin ein natürliches Antioxidans und ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Zum anderen können durch die Wechselwirkung des Bilins mit dem Protein bestimmte biologisch wichtige Eigenschaften erreicht werden, die keine der Komponenten alleine hat. Einen solchen Komplex zwischen Protein und einem Bilin als prosthetischer Gruppe bezeichnet man als Biliprotein. Die Verbindung zwischen Bilin und Protein kann dabei sowohl nicht-kovalenter Natur sein, wie bei Serumalbumin-Bilirubinkomplexen, als auch kovalent erfolgen, wie bei den Biliproteinen der photosynthetischen Organismen.

¹ Der Begriff „Tetrapyrrol“ wird allgemein nicht in einem strikt chemischen Sinn verwendet. s. Moss, 1988:

„Tetrapyrrole“ is a term used widely, but loosely, to refer to a member of a class of compounds whose molecules have four rings of the pyrrole type, generally linked together by single-atom bridges between the alpha positions of the five-membered pyrrole rings. The common arrangements of the four rings for which this name is used are macrocyclic (as in the porphyrins) and linear (as in the bile pigments)“.

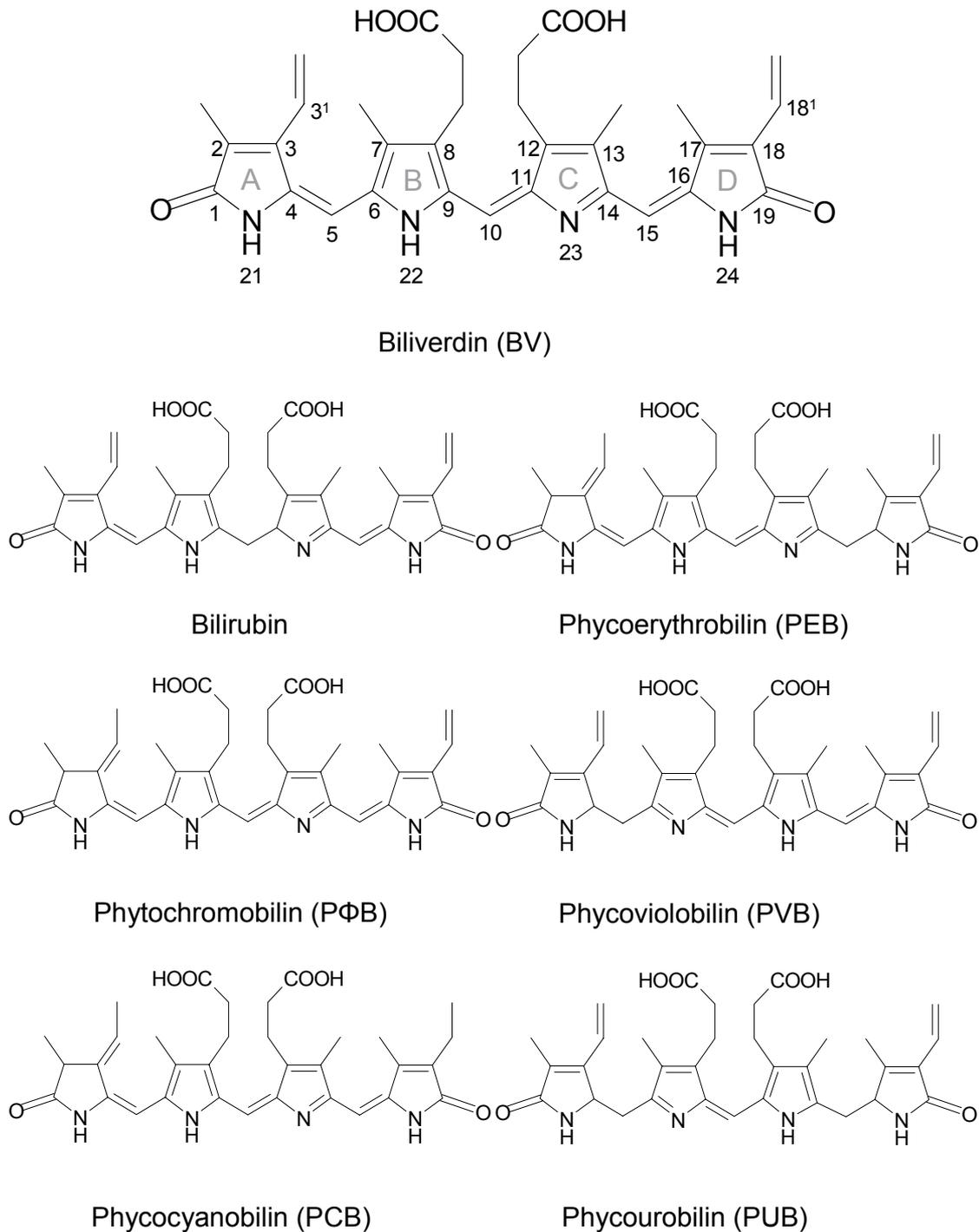


Abb. 1 Strukturen freier Biline. Die Numerierung erfolgt analog der bei Biliverdin gezeigten, das Fehlen der Position 20 erklärt sich aus der Biosynthese (s. unten). Die Strukturen von PVB und PUB sind hypothetisch, da sie bisher nicht in freier Form isoliert werden konnten (Storf et al., 2001). Der Name Phycoviolobilin ist synonym mit Phycobiliviolin (Bishop et al., 1987).

Biliproteine aus photosynthetischen Organismen wurden ebenfalls schon sehr früh untersucht. Esenbeck isolierte aus dem Cyanobakterium *Oscillatoria* sp. neben dem Chlorophyll einen intensiv blauen Farbstoff, den er Saprocyanin nannte (griech. sapros: verfault, kyanos: blau)

(Esenbeck, 1836). Dieser Name wurde von Kützing (Kützing, 1843) in Phykokyan geändert (griech. phycos: Tang). Dieser Name entspricht dem heutigen Phycocyanin. Weiterhin isolierte er aus Rotalgen einen ebenfalls wasserlösliche Farbstoff, den er Phykoerythrin nannte, was dem heutigen Phycoerythrin entspricht (griech. erythro-: rot). Durch Pepsinbehandlung dieser Farbstoffe konnte nachgewiesen werden, daß sie aus einem Protein- und einem Farbstoffanteil bestehen (Kylin, 1910; Kylin, 1912). Einige Zeit später wurde erkannt, daß es sich bei diesen Farbstoffen um Biline handelt (Lemberg, 1930; Lemberg & Bader, 1933). Konsequenterweise wurde der blaue Farbstoff Phycocyanobilin (PCB), der rote Phycoerythrobilin (PEB) genannt.

1.2 Biosynthese von Bilinen

Photosynthetische Organismen wie Pflanzen und Cyanobakterien bilden, ausgehend von atmosphärischem CO₂, eine Reihe von geschlossen- und offenkettigen Tetrapyrrolen, die an vielen essentiellen biologischen Prozessen beteiligt sind. Im Folgenden soll die Biosynthese der Biline kurz skizziert werden, der prinzipielle Ablauf ist dabei in Cyanobakterien und Pflanzen gleich (Abb. 2).

Die erste Substanz, die ausschließlich als Vorstufe für die Biosynthese aller Tetrapyrrole existiert, ist 5-Aminolävulin säure (ALA). 8 Moleküle ALA werden enzymatisch zu 4 Molekülen des assymetrischen Pyrrolderivats Porphobilinogen kondensiert, die dann zum ersten geschlossenen Tetrapyrrol Uroporphyrinogen III weiterreagieren. Dabei kommt es zu einer Umlagerung des C-Ringes, so daß in allen nachfolgenden Verbindungen die Ringe B und C ein spiegelbildliches Substitutionsmuster aufweisen. Aus Uroporphyrinogen III können entweder durch Einlagerung von Co³⁺ Cobalamin (Vit. B₁₂) oder durch Decarboxylierung und teilweise Reduktion der Seitenketten Protoporphyrin IX entstehen. Aus dieser Verbindung können durch enzymatische Einlagerung von Fe²⁺ entweder Häm und letztlich die Biline, oder aber, durch Einlagerung von Mg²⁺, Chlorophyll entstehen. Dieser Schritt ermöglicht es dem jeweiligen Organismus, die metabolischen Flüße beider Substanzen zu kontrollieren und ist entsprechend reguliert (Cornah et al., 2003). Einlagerung von Fe²⁺ führt zur Bildung von Protohäm. Oxidative Decarboxylierung bewirkt die Öffnung des geschlossenen Tetrapyrrols zum ersten Bilin, dem Biliverdin IXa. Der Verlust eines Kohlenstoffs spiegelt sich im Fehlen der Position 20 in der Numerierung der Biline wider (s. Abb. 1). BV hat die höchste Anzahl konjugierter Doppelbindungen (DB) aller Biline und keine Stereozentren; durch verschiedene, teilweise stereospezifische Reduktions- und Isomerisierungsschritte entstehen andere, chirale Biline, deren konjugierte Systeme entsprechend verkürzt sind. So kann die Bildung von PCB, in der Rhodophytenart *Cyanidium caldarium*, über zwei verschiedene Reduktionsschritte erfolgen, die von jeweils unterschiedlichen Enzymen vermittelt werden. Weiterhin existiert in Blaualgen noch ein

direkter Weg von BV zu PCB, der durch das Enzym Phycocyanobilin:Ferredoxinoxidoreduktase (PcyA) vermittelt wird (Frankenberg et al., 2001) und direkt PCB liefert.

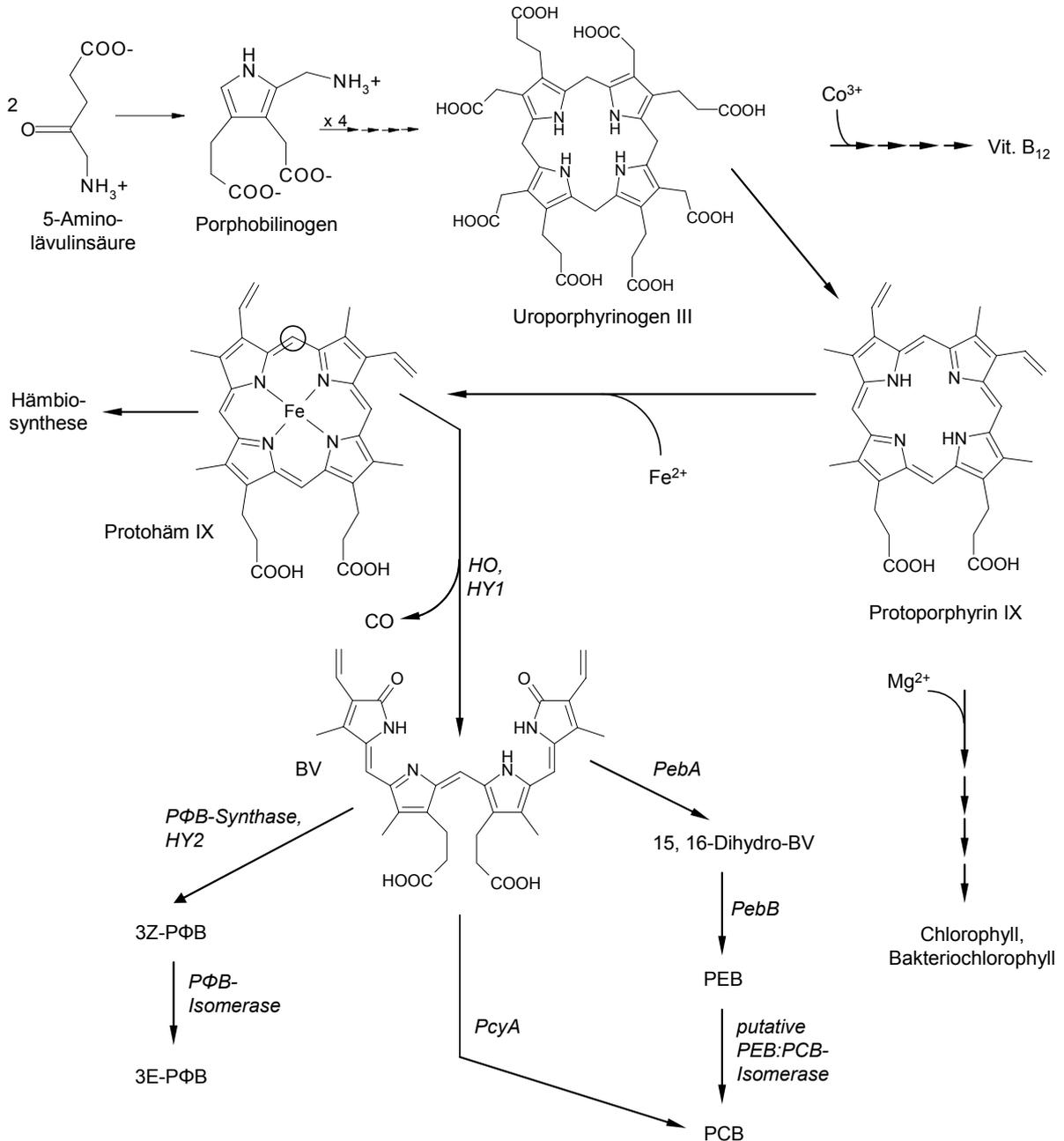


Abb. 2 Übersicht über die Biosynthese biologischer wichtiger Tetrapyrrole und Bilinchromophore (modifiziert nach Beale, 1993). HO: Hämoxygenase, PebA: 15,16-Dihydrobiliverdin:ferredoxinoxidoreduktase, PebB: 3Z-PEB:ferredoxinoxidoreduktase. HY1 und HY2 wurden ursprünglich als funktionale Phytochrommutanten in *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Koornneef et al., 1980), kodieren aber für die gezeigten Enzyme (Kohchi et al., 2001; Davis et al., 1999a). Der mit einem Kreis markierte Kohlenstoff bei Protophäm IX wird aus dem Ringsystem entfernt.

1.3 Optische Eigenschaften von Biliproteinen und beeinflussende Faktoren

Wie oben erwähnt können Biline und Biliproteine ganz verschiedene optische Eigenschaften aufweisen, die in der Färbung der jeweiligen Substanzen am augenfälligsten werden und sich auch in der Namensgebung niedergeschlagen haben. Neben der chemischen Struktur des Chromophors gibt es weitere Faktoren, die die optischen Eigenschaften von Biliproteinen beeinflussen (Falk, 1989; Storf, 2003), die hier kurz dargestellt werden.

1.3.1 Konjugierte Doppelbindungen (DB)

Die Größe des konjugierten π -Elektronensystems hat einen entscheidenden Einfluß auf die Absorptionsmaxima der jeweiligen Biline. So absorbiert

3^1 -Cys-Phycocyanobilin (8 konjugierte DB) bei 663 nm (Glazer & Fang, 1973),

3^1 -Cys-Phycoviolobilin (7 konjugierte DB) bei 594 nm (Zhao & Scheer, 1995),

3^1 -Cys-Phycocerythrobilin (6 konjugierte DB) bei 555 nm (Glazer & Hixson, 1975) und

3^1 -Cys-Phycourobilin (5 konjugierte DB) bei 500 nm (Alberte et al., 1984).

Die zitierten Werte wurden an denaturierten Biliproteinen gemessen, so daß ein Einfluß der Proteinumgebung weitgehend ausgeschlossen werden kann.

1.3.2 Protonierung

Protonierung des basischen Pyrrolstickstoffs bewirkt eine Rotverschiebung und Erhöhung des langwelligen Absorptionsmaximums, also eine Steigerung des entsprechenden Extinktionskoeffizienten (Brandlmeier et al., 1981; Gossauer & Hirsch, 1974). Die Protonierung von in Methanol gelöstem Phycocyanobilin durch 2% HCl führt zu einer Verschiebung des langwelligen

Absorptionsmaximums von 600 nm auf 690 nm, der entsprechende Extinktionskoeffizient steigt dabei um den Faktor 3.

1.3.3 Konformation und Konfiguration

Freie Biline weisen in Lösung eine zyklisch-helikale, in z. B. den Phycocyaninen eine gestreckte Konformation auf (Scheer 1981). Damit einhergehend erfolgt eine deutliche Erhöhung des Extinktionskoeffizienten des langwelligen Absorptionsmaximums von ca. 20 000 Mol⁻¹ cm⁻¹ auf ca. 100 000 Mol⁻¹ cm⁻¹.

Die Konjugation der einzelnen DB, bzw. die Delokalisation über mehrere Pyrrolringsysteme hinweg erfolgt über Methinbrücken zwischen den Ringen. Eine Methinbrücke besteht formal aus einer Einfach- und einer Doppelbindung. Eine Torsion der Ringe zueinander hat einen Einfluß auf die Konjugation des Gesamtsystems. Ein Torsionswinkel Θ von 90 ° um die formale Einfachbindung bewirkt eine vollständige Entkopplung der jeweiligen Subchromophore links und rechts der Brücke. Eine Verringerung des Torsionswinkels bewirkt eine graduell zunehmende Konjugation, was sich in der bathochromen Verschiebung der Absorptionsmaxima niederschlägt (Falk 1989).

Ebenso wirkt sich eine Z/E-Isomerie auf die Absorptionseigenschaften der Biline aus. So zeigt das 15E-Isomere des PΦB eine hypsochrome Verschiebung um ca. 80 nm im Vergleich zum 15Z-Isomeren (Thümmler & Rüdiger, 1983a).

1.3.4 Proteinumgebung

Neben einem Einfluß auf die Konformation der Biline wirkt sich die Proteinumgebung auch auf die Fluoreszenz der Bilinchromophore und ihre photochromen Eigenschaften aus. So zeigt PCB in isoliertem Phycocyanin eine starke Fluoreszenz und kein photochromes Verhalten. PΦB in Phytochrom A (PhyA) hat in der Pr-Form kaum fluoreszierende Eigenschaften, ist dafür aber photochrom². Die Pfr-Form zeigt keine meßbare Fluoreszenz. Die gleiche Beobachtung wurde auch

² Photochromie ist die Bezeichnung für eine durch sichtbares oder UV-Licht hervorgerufene reversible Umwandlung eines Stoffes in einen anderen, der sich von der Ausgangsverbindung durch sein Absorptionsspektrum unterscheidet. Die Rückreaktion kann durch Licht anderer Wellenlänge oder durch Wärme ausgelöst werden. Der Begriff Photochromizität wird synonym verwendet.

für PCB in Cph1 gemacht (Sineshchekov et al., 1998). Die Energiebarriere für die Photochromie wird im Fall von Phycocyanin mit > 100 kJ/Mol angegeben, im Fall von Cph1 beträgt sie etwa 5 kJ/Mol (Sineshchekov, 1995, Sineshchekov et al., 1998). Dabei ist im erwähnten Fall die Verknüpfung zwischen beiden Chromophoren und den Apoproteinen gleich, ebenso die Zahl der konjugierten DB. Ob ein Chromophor auf Lichtanregung mit Fluoreszenz oder einer photochemischen Reaktion reagiert, wird von seinen Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung bestimmt. Ebenso lässt sich Photochromie als molekulare Eigenschaft in den meisten Biliproteinen durch eine partielle Denaturierung durch z. B. Harnstoff induzieren (Scheer, 1981). Die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins zeigt ebenfalls photochrome Eigenschaften (Siebzehnrübl et al., 1989).

1.4 Phycobiliproteine: Lichtsammelpigmente für die Photosynthese

Cyanobakterien synthetisieren eine Gruppe von Chromoproteinen, deren Aufgabe es ist, den zur Verfügung stehenden Wellenlängenbereich und den Absorptionsquerschnitt der Photosysteme I und II zu erweitern. Dabei handelt es sich um Phycobiliproteine. Zwei weitere Gruppen von photosynthetischen Organismen nutzen ebenfalls Phycobiliproteine als Antennenpigmente: die Rhodophyten und die Cryptophyten. In Pflanzen und Grünalgen wird diese Aufgabe durch die Lichtsammelkomplexe LHCI und LHCII (Abkürzungen abgeleitet von *light-harvesting complex*) übernommen, die molekular einen völlig anderen Aufbau haben und keine Biline, sondern Chlorophylle und Carotenoide enthalten (Bassi et al., 1990). Die Phycobiliproteine der prokaryotischen Cyanobakterien und die Lichtsammelkomplexe der eukaryontischen Pflanzen können daher als Beispiel einer konvergenten Evolution betrachtet werden.

In Cyanobakterien liegen die Phycobiliproteine in hochorganisierten, cytosolischen, aber membranassoziierten Komplexen aus Biliproteinen und Linkerproteinen vor, den sog. Phycobilisomen (PBS), die erstmals Mitte der 60er Jahre durch Gantt und Conti elektronenmikroskopisch in der Rotalge *Porphyridium cruentum* beschrieben wurden (Gantt & Conti, 1965; Gantt & Conti, 1966a; Gantt & Conti, 1966b). In der Regel ist ein Phycobilisom mit zwei Photosystemen II assoziiert, unter bestimmten Bedingungen kann jedoch auch eine Energieübertragung auf das Photosystem I erfolgen (sog. *state transition*) (Sidler, 1994). Schematisch besteht ein Phycobilisom aus einem Kern und peripheren Stäbchen. Sechs bis acht zylindrische Stäbchen stehen senkrecht auf dem aus zwei bis fünf zylindrigen Untereinheiten angeordneten Kern,

der Kern selbst liegt parallel zur Thylakoidmembran. Die strukturelle Organisation und Stabilität der Phycobilisomen wird durch sog. Linkerproteine gewährleistet. Neben dieser strukturellen Aufgabe erfüllen manche Linkerproteine eine Aufgabe bei der Energieweiterleitung und der Beeinflussung der optischen Eigenschaften der Biline selbst (Glazer, 1985; Sidler, 1994). Kern und Stäbchen setzen sich aus mehreren aneinandergelagerten „Scheiben“ zusammen, die von je zwei trimeren Phycobiliproteinen gebildet werden. Die Phycobiliproteine selbst sind Heterodimere aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die durch die Buchstaben α und β unterschieden werden und in äquimolaren Verhältnissen vorkommen. Die Stöchiometrie des oben erwähnten Trimers ist also $(\alpha\beta)_3$ (s. Abb. 3). Die α - und β -Untereinheiten haben Molekulargewichte im Bereich zwischen 15-20 kDa, die kleinere der Untereinheiten wird als α -, die größere als β -Untereinheit bezeichnet. In der Regel trägt die α -Untereinheit ein oder zwei Biline als Chromophor, die β -Untereinheit kann dagegen bis zu vier Chromophore tragen.

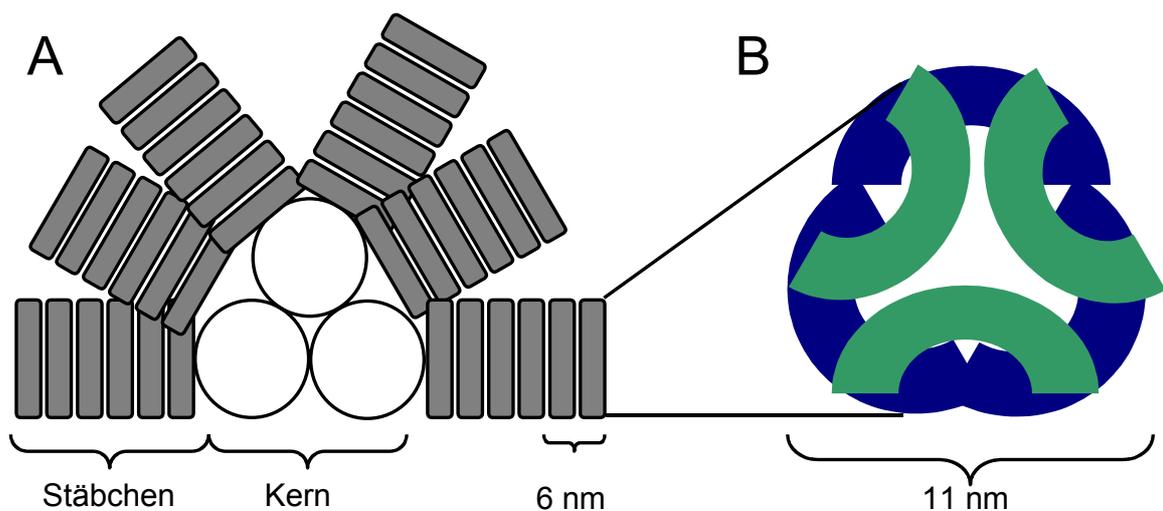


Abb. 3 Schematischer Aufbau eines hemidiscoidalen PBS mit trizylindrischem Kern (A, modifiziert nach Sidler, 1994) und eines Scheibchens, um 90° aus der Bildebene gedreht dargestellt (B, nach Düring et al., 1990). Die α -Untereinheiten sind grün, die β -Untereinheit blau dargestellt.

Die Phycobiliproteine werden aufgrund ihrer optischen Eigenschaften in vier verschiedene Klassen eingeteilt, die Phycoerythrine (PE, λ_{\max} 500-575 nm), Phycoerythrocyanine (PEC, λ_{\max} 575-585 nm), Phycocyanine (PC, λ_{\max} 615-640 nm) und die Allophycocyanine (APC, λ_{\max} 650-655 nm). Die Anordnung der einzelnen Komponenten der PBS erlaubt einen Energietransfer von außen nach innen hin zum Photosystem II (s. Abb. 4). Die hochenergetisch absorbierenden Biliproteine wie Phycoerythrine und Phycoerythrocyanine liegen daher am weitesten vom Kern entfernt. Daran

schliessen sich die Phycocyanine an. Der Kern selbst wird von Allophycoyanin gebildet, das letztendlich die gesammelte Energie auf das im Bereich um 670-680 nm absorbierende Chlorophyll a überträgt.

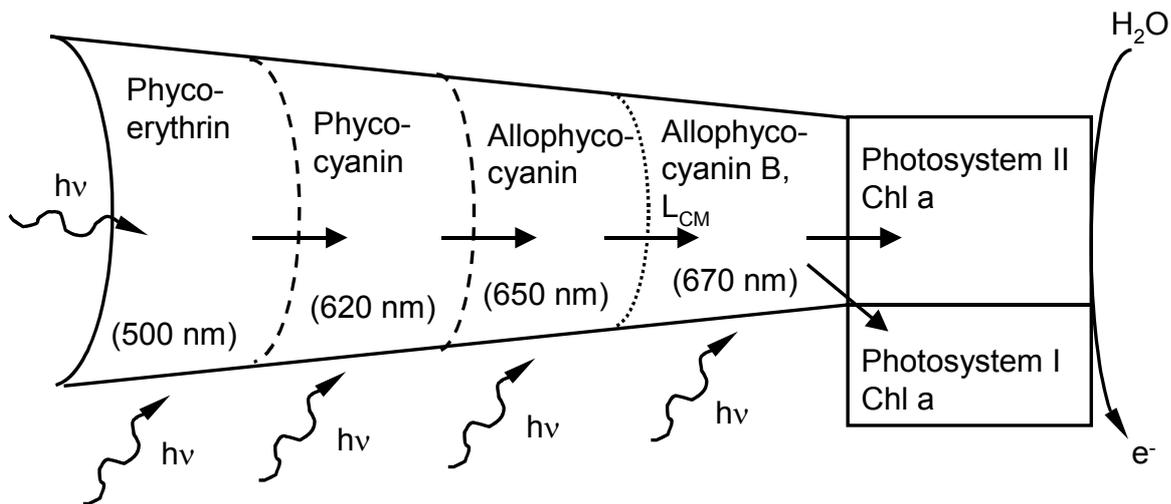


Abb. 4 Schematische Darstellung der Funktion in von PBS in Cyanobakterien (modifiziert nach Sidler, 1994). Chl a: Chlorophyll a, L_{CM} : core-membrane linker biliprotein.

Die einzelnen Phycobiliproteine unterscheiden sich in der Art der gebundenen Chromophore, zeigen aber untereinander deutliche Sequenzidentitäten und ähnliche Raumstrukturen. An Bilinen wurden bisher in Phycobiliproteinen aus Cyanobakterien PCB, PEB, PVB und PUB gefunden, die kovalent durch eine Thioetherverknüpfung an ein konserviertes Cystein des jeweiligen Apoproteins gebunden werden. Die Anknüpfung erfolgt in der Regel an Position 3¹ des Bilins, es sind aber auch Fälle einer doppelten Anbindung an Position 3¹ und 18¹ beschrieben (Bishop et al., 1986, Bishop et al., 1987). Es ist kein Fall einer nicht-kovalenten Bilinbindung in einem Phycobiliprotein bekannt. Die Anbindung des freien Chromophors an das Apoprotein erfolgt teilweise autokatalytisch, was durch *in vitro*-Anknüpfung des Chromophors an das Apoprotein gezeigt werden konnte (Arciero et al., 1988a), teilweise ist für die korrekte Anbindung eine separate Lyase notwendig (Arciero et al., 1988b, Fairchild et al., 1992, Swanson et al., 1992), die in manchen Fällen auch die Funktion einer Isomerase übernimmt (Storf et al., 2001).

Die Energie des absorbierten Lichts wird in den Phycobilisomen strahlungslos durch Förster-Transfer übertragen (Förster, 1967). Durch die Anordnung der Biliproteine als monotone Funktion ihrer Absorptionseigenschaften wird sichergestellt, daß der Transfer der einmal absorbierten Energie immer zum entsprechenden Photosystem hin erfolgt.

1.5 Phytochrom: ein sensorisches Biliprotein

Die Bedeutung von Licht für das Leben von obligat phototrophen und sessilen Organismen wie Pflanzen ist offensichtlich. Es ist daher nicht überraschend, daß Pflanzen und andere auf Licht angewiesene Lebewesen ausgeklügelte Mechanismen der Lichtwahrnehmung entwickelt haben, die es ihnen erlauben, sich an veränderte Lichtbedingungen anzupassen.

Einige frühe Untersuchungen hatten bereits einen Einfluß der Lichtqualität auf die Entwicklung von Pflanzen nachgewiesen (u. a. Garner & Allard, 1920, Flint & McAlister, 1937; Parker et al., 1945). Dieser Einfluß wurde von Borthwick und Mitarbeitern genauer charakterisiert. Sie untersuchten die gegensätzliche Wirkung von rotem und dunkelrotem Licht auf die Keimung von Salatsamen (*Lactuca sativa* L.): nach Rotlichtbestrahlung (im Bereich 580 – 680 nm) wurde Keimung induziert. Wurden die mit Rotlicht bestrahlten Samen direkt anschließend mit dunkelrotem Licht (> 700 nm) bestrahlt, konnte die Keimung unterdrückt werden. Erfolgte danach wieder eine Rotlichtbestrahlung, wurde wieder Keimung induziert: entscheidend ist also der jeweils zuletzt gegebene Lichtimpuls (Borthwick et al., 1952a). Diese Effekte sind maximal für Licht von 660 bzw. 720 nm. Die Existenz einer physiologisch reversiblen Reaktion ließ vermuten, daß es sich um EIN sensorisches Molekül in zwei verschiedenen spektralen Formen handelt. Im gleichen Jahr konnte gezeigt werden, daß eine vergleichbare Rot/Dunkelrot steuerbare Reaktion die Blütenbildung der Zuckerspitzklette (*Xanthium saccharatum* Wallr.) beeinflußt (Borthwick et al., 1952b), also ein äquivalenter Mechanismus in verschiedenen Entwicklungsphasen von Pflanzen wirksam ist: „Many aspects of growth and maturation of plants are known from the close similarity of their action spectra to be controlled by a reversible photoreaction.“ (Hendricks et al., 1956). In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, daß die physiologische Antwort auf rot/dunkelrotes Licht (Internodienverlängerung der Feuerbohne (*Phaseolus vulgaris* L.) eine exponentiell sättigbare Funktion erster Ordnung der eingestrahlten Lichtenergie (Lichtenergie x Bestrahlungszeit) ist. 1959 wurde ein erstes *in vivo* Differenzspektrum publiziert, das durch rot/dunkelrot Bestrahlung etiolierter Keimlinge von Mais (*Zea mais* L.) generiert wurde und ein Maximum/Minimum im Bereich der oben beschriebenen

maximalen physiologischen Wirksamkeit hat. In der gleichen Arbeit gelang die Anreicherung eines entsprechenden Pigmentes aus Maiskeimlingen in Lösung und die Aufnahme von mehreren konsekutiven rot/dunkelroten Differenzspektren (Butler et al., 1959). Der Name Phytochrom für das so nachgewiesene Pigment wurde ein Jahr später geprägt (Butler et al., 1960). Die Isolierung des entsprechenden intakten Proteins nahm etwas mehr Zeit in Anspruch (Vierstra & Quail 1982), nachdem mehrere Versuche photochrome, aber partiell proteolytisch abgebaute Proteine ergeben hatten (u. a. Siegelman & Firer, 1964; Mumford & Jenner, 1966, Gardner et al., 1971, Rice & Briggs, 1973; für eine Übersicht: Pratt, 1978). Der Nachweis eines Bilins als prosthetischer Gruppe erfolgte 1969 (Rüdiger & Correl, 1969). Die Namensgebung dieses Moleküls erfolgte entsprechend der für andere Biline: Phytochromobilin, PΦB. Erste Mutanten, deren Lichtwahrnehmung gestört war, wurden 1980 phänotypisch beschrieben (Koornneef et al., 1980). Später zeigte sich, daß es sich hierbei teilweise um Mutanten der Chromophorbiosynthese handelt (s. Abb. 2). Die Klonierung und Sequenzierung der ersten Phytochromgene aus *Avena sativa* gelang 1984 (Hershey et al., 1985, Hershey et al., 1987). Weitere Mutationsstudien folgten (für eine Übersicht: Fankhauser & Chory, 1997), und ergaben klare Hinweise auf spezifische Funktionen einzelner Phytochrome.

Phytochrom³ ist damit eines der biologisch am besten charakterisierten Photorezeptorproteine, das mit homologen Sequenzen in Pflanzen, Pilzen, Algen und Bakterien vertreten ist (s. unten). Es handelt sich um lösliche, sensorische Biliproteine, die frei durch Licht zwischen zwei spektral unterschiedlichen Formen photokonvertierbar sind (Photochromie), der rot (um 660 nm, R) absorbierenden Pr-Form (*Phytochrome red absorbing*) und der dunkelrot (um 730 nm, FR) absorbierenden Pfr-Form (*Phytochrome farred absorbing*)⁴. Dabei gilt: jedes Phytochrom ist photochrom, aber nicht jedes photochrome Biliprotein ist damit schon ein Phytochrom. Photochromie ist eine molekulare Eigenschaft und impliziert noch keine sensorischen Aufgaben, die auf der Ebene eines Organismus, also physiologisch, definiert sind. Ebenso bezieht sich die Angabe einer „roten“ und „dunkelroten“ Wellenlänge auf die Situation in pflanzlichen Phytochromen, der genaue Bereich ist eine Funktion des gebundenen Chromophors und der jeweiligen Proteinumgebung (s. oben). Phytochrom ist in fast allen Entwicklungsstadien von Pflanzen aktiv und beeinflusst die Entwicklung der entsprechenden Organismen in vielfältiger Weise (s. oben) und im Zusammenspiel mit anderen Photorezeptoren: Keimung, Deetiolierung, Chloroplastendifferenzierung,

³ Damit sind im Folgenden vereinfachend alle Arten von Phytochromen gemeint. DAS Phytochrom gibt es nicht.

⁴ Vor kurzem wurde ein phytochromartiges Protein (RpBphB3) beschrieben, das bei Rotlichtbestrahlung mit der reversiblen Bildung einer Form mit blauverschobenem Absorptionsmaximum reagiert. Diese wurde als Pnr-Form (Phytochrome near red) bezeichnet (Giraud et al., 2005).

Schattenvermeidungsreaktion, Blütenbildung, Ausbildung von Speicherorganen, Wahrnehmung von Lichtrichtung und Regulation zirkadianer Rhythmen sind Beispiele solcher Reaktionen in höheren Pflanzen. Weiterhin können Phytochrome verschiedene Lichtintensitäten voneinander unterscheiden (sog. HIR, *high irradiance response*, LFR: *low fluency response* und VLFR: *very low fluence response*). Entsprechend komplex sind die prinzipiellen Mechanismen der Signalverarbeitung und -integration und die regulatorischen Mechanismen, die einen gegebenen Effekt hervorrufen, ein Überschießen der Reaktion jedoch vermeiden: In Arabidopsis gibt es fünf verschiedene Phytochrome (PhyA-E), die sich in ihrer Sequenz und photochromen Reaktion sehr ähneln, aber für verschiedene physiologische Reaktionen verantwortlich sind. Dies wird unter anderem durch eine unterschiedliche räumliche und zeitliche Verteilung der Subtypen erreicht: zum Beispiel ist PhyA vor allem im etiolierten Keimling vorhanden, nicht aber in der deetiolierten Pflanze. Die Umwandlung des Pr-Zustandes von PhyA, der biologisch inaktiv ist, in den biologisch aktiven Pfr-Zustand führt zu einem schnellen, Ubiquitin-vermittelten Abbau des Proteins (sog. Typ-I Phytochrom), gleichzeitig wird die Transkription des Gens abgeschaltet (Somers & Quail, 1995; Canton & Quail, 1999; Clough et al., 1999). PhyB dagegen ist in der deetiolierten Pflanze vorhanden und dort in seiner Konzentration weitgehend lichtunabhängig (sog. Typ-II Phytochrom). Das aktive Pfr revertiert jedoch thermisch wieder zurück zum inaktiven Pr. Diese thermische Reversion kann durch andere Proteine reguliert werden (Sweere et al., 2001).

Die Mechanismen der Signalweiterleitung sind ebenfalls sehr vielfältig: für viele Phytochrome induziert die Bildung der Pfr-Form eine Translokation des Moleküls in den Kern, von wo aus die Transkription verschiedener Gene reguliert wird (Nagy & Schäfer, 2000; Huq et al., 2003). Für Phytochrome selbst ist keine direkte DNA-bindende Aktivität beschrieben worden; dieser Effekt wird also im Zusammenspiel mit anderen Proteinen reguliert. Ebenso gibt es eine Anzahl von Proteinen, die die primären Effekte von Phytochrom verstärken oder abschwächen, selbst aber keine bekannte sensorische Funktion aufweisen. Andere Befunde lassen sich durch einen transkriptionsbasierten Mechanismus nicht erklären, zum einen weil sie zu schnell ablaufen, um durch Neusynthese von RNA/Protein vermittelt zu sein (z. B. Mittmann et al., 2005), zum anderen weil sie durch Substanzen inhibierbar sind, die keinen bekannten Effekt auf die Transkription/Translation der untersuchten Organismen haben (z. B. Romero & Lam, 1993). Für eine Übersicht über aktuelle Entwicklungen auf dem Feld der Signalweiterleitung von Phytochromen und anderen Photorezeptoren siehe z. B. (Quail, 2002; Smith, 2000; Wang & Deng, 2004).

Im Gegensatz zur Entdeckung pflanzlicher Phytochrome erfolgte die Entdeckung von prokaryotischen Phytochromen nicht ausgehend von einem beobachtbaren physiologischen Effekt, sondern durch Sequenzvergleich zwischen Pflanzenphytochromen und DNA-Sequenzen

prokaryotischer Genome (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997). Die Ähnlichkeit der *in vitro*-Eigenschaften der klonierten Proteine - rot/dunkelrot revertierbare Photochromie, Bindung eines offenkettigen Tetrapyrrols -, zusätzlich zu ihrer Sequenzähnlichkeit mit den pflanzlichen Homologen ließ den Schluß zu, daß es sich bei solchen Molekülen höchstwahrscheinlich ebenfalls um Phytochrome, also rot/dunkelrot sensitive Photorezeptoren handelt. Inzwischen ist auch für mindestens ein solches Molekül eine klare sensorische Funktion nachgewiesen (Giraud et al., 2002): in *Bradyrhizobium* ORS278 erfolgt die Bildung des Photosyntheseapparates abhängig von der umgebenden Lichtqualität mit einem Maximum des Effekts bei 750 nm, entsprechend weist das Protein BrBphP (*Bradyrhizobium bacteriophytochrome photoreceptor*) ein Absorptionsmaximum in genau diesem Bereich auf. Wird das Gen molekularbiologisch inaktiviert, zeigen die mutierten Organismen diesen regulatorischen Effekt nicht mehr. BrBphP zeigt eine rot/dunkelrot revertierbare Photochemie und bindet ein offenkettiges Tetrapyrrol, wahrscheinlich Biliverdin, als prosthetische Gruppe. BrBphP ist damit eines der biologisch am besten charakterisierten photochromen Biliproteine aus Prokaryoten. Bei anderen gibt es experimentelle Hinweise auf eine biologische Funktion als Photorezeptoren, z. B. Regulation der Deinoxanthinbildung in *Deinococcus radiodurans* (Davis et al., 1999b) und positive und negative Phototaxis in *Synechocystis* sp. PCC6803 (Wilde et al., 2002; Yoshihara & Ikeuchi, 2004a; Choi et al., 1999). Für weitere Proteine ist lediglich ein Effekt auf eine lichtabhängige Signaltransduktionskaskade nachgewiesen, zusätzlich zu Sequenzhomologien zu bekannten Phytochromen (Schmitz et al., 2000; Kehoe & Grossman, 1996; Terauchi & Ohmori, 2004). So führt ein genetisches Ausschalten des Gens *cikA* in *Synechococcus elongatus* sp. PCC7942 zu einer fehlenden Synchronisation des circadianen Rhythmus mit den experimentell vorgegebenen Hell/Dunkel-Phasen. Eine Bilin-bindende Funktion des Proteins wurde jedoch nicht experimentell nachgewiesen, sondern lediglich aufgrund von Sequenzhomologien postuliert (Schmitz et al., 2000). Im Folgenden wird der Begriff Phytochrom allerdings auch für Proteine benutzt werden, die keine nachgewiesene sensorische Funktion haben, sondern nur bekannten Phytochromen ähnliche Aminosäuresequenzen.

Das Vorhandensein eines Photorezeptors, der in einem für die Photosynthese essentiellen Wellenlängenbereich aktiv ist, ist für phototrophe Prokaryoten leicht aus ökologischen Gründen vorstellbar. Phytochrom-ähnliche Proteine sind aber auch in Organismen entdeckt worden, die keine Photosynthese betreiben und die in ihrer Entwicklung anscheinend nicht von Licht in einem Wellenlängenbereich > 400 nm beeinflusst werden, u. a. AtBphP1/2 aus *Agrobacterium tumefaciens* und PaBphP aus *Pseudomonas aeruginosa* (Lamparter et al., 2002; Karniol & Vierstra, 2003; Bhoo et al., 2001). Eine vorstellbare physiologische Rolle könnten diese Proteine aufgrund ihrer Bilin-bindenden Aktivität ausüben: dabei wäre das Apoprotein ein ligandengesteuerter Rezeptor für freies Bilin. Bindung des Liganden könnte dann eine entsprechende Signaltransduktion auslösen (Wegele et al.,

2004; Tasler et al., 2005; Montgomery & Lagarias, 2002). Für *Agrobacterium tumefaciens* wurde gezeigt, daß der Gentransfer auf *Arabidopsis thaliana* und *Phaseolus acutifolius* durch sichtbares Licht nicht näher spezifizierter Qualität gefördert werden kann (Zambre et al., 2003). Inwieweit dieser Effekt mit einem in *Agrobacterium* vorhandenen putativen Photorezeptor korreliert, war nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

1.6 Aufbau & Eigenschaften von Phytochromen

Alle bisher untersuchten Phytochrome sind lösliche Proteine, die als Dimere vorliegen. Der Aufbau der Monomere ist modular und kann in zwei große funktionale Einheiten zerlegt werden, einen N-terminalen Teil, in dem die Chromophorbindung erfolgt und der photochrom ist, und einen C-terminalen Teil, dessen Funktion variabel ist, dessen Entfernung aber keinen Einfluß auf die Photochromie des N-terminalen Bereiches hat. Der C-terminale Teil ist in Pflanzenphytochromen durch die sog. *hinge*-Region mit dem N-Terminus verknüpft. Diese *hinge*-Region ist gegenüber Proteasen am empfindlichsten und wird entsprechend am schnellsten angegriffen, eine Eigenschaft, die lange Zeit die Isolierung eines nativen Phytochroms verhindert hat (s. oben). Der Übergang zwischen C- und N-terminalem Teil liegt in Pflanzenphytochromen im Bereich der Aminosäure 650, bei den bisher untersuchten prokaryotischen um die Aminosäure 500. Der Begriff „Domäne“ wird hier bewußt vermieden, da es mehrere mögliche Definitionen dieses Begriffes mit entsprechend verschiedenen konzeptuellen Schwerpunkten gibt (Jaenicke, 1999), die bei Anwendung auf ein aus Apoprotein und prosthetischer Gruppe bestehendes Holoprotein wie Phytochrom jedoch schnell zu unklaren und widersprüchlichen Ergebnissen führen. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die verschiedenen funktionalen Bereiche entlang der Primärstruktur von pflanzlichem Phytochrom und Cph1.

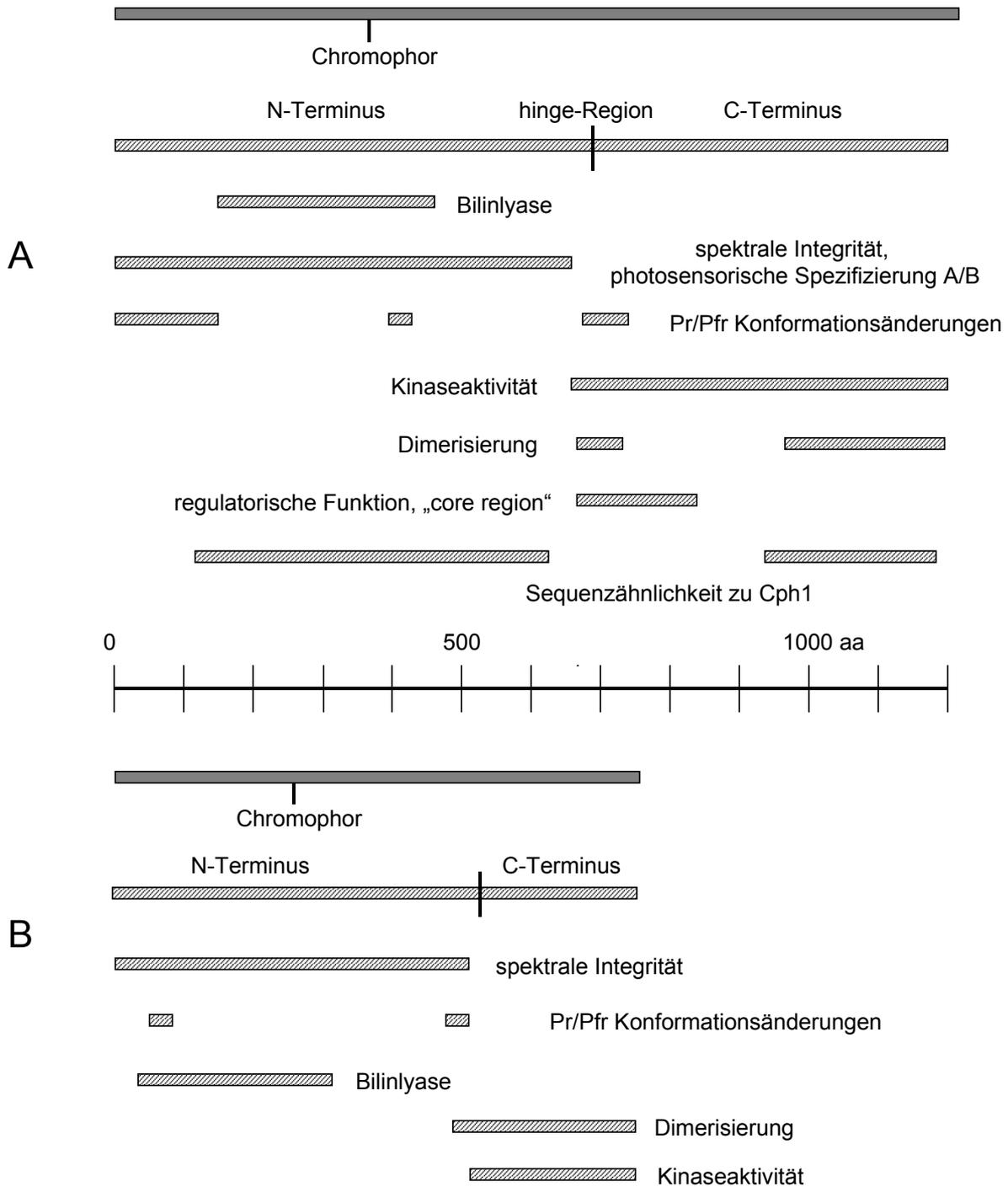


Abb. 5 Schematischer Aufbau von pflanzlichem Phytochrom (A) und Cph1 (B). Die angegebene Skala (Mitte) gilt für A und B. Graue Balken zeigen das gesamte Protein und die Position der Chromophorbindingstelle. Gestrichelte Balken zeigen funktionale Regionen an. Die Position der hinge-Region ist durch einen senkrechten Strich markiert. Modifiziert nach (Quail, 1997; Park et al., 2000a; Esteban et al., 2005.).

Die Bindung eines entsprechenden Bilins an das Apoprotein kann entweder kovalent oder nicht-kovalent erfolgen. In pflanzlichen Phytochromen ist kein Fall einer nicht-kovalenten Bindung

bekannt. Hier erfolgt die Verbindung zwischen Apoprotein und Bilin durch autokatalytisches Knüpfen einer Thioetherbindung an Position 3¹ der Ethylidenseitenkette von PΦB, ein Prozeß, der als Autoassemblierung bekannt ist und unabhängig vom C-Terminus erfolgt (Lagarias & Lagarias, 1989; Wu & Lagarias, 2000). Diese Verknüpfung erfolgt an ein konserviertes Cystein um die Position 320 des Apoproteins. Im Fall prokaryotischer Phytochrome gibt es Beispiele sowohl kovalenter als auch nicht-kovalenter Verknüpfungen zwischen Bilin und (heterolog exprimiertem) Apoprotein (Jorissen et al., 2002), eine kovalente Anbindung der prosthetischen Gruppe ist also keine notwendige Voraussetzung für die beobachtete Photochromie. Dies wurde auch durch Experimente mit einem modifizierten Chromophor bestätigt, der nicht mehr kovalent gebunden werden konnte, aber ein photochromes Addukt mit einem von Hafer-PhyA abgeleiteten Apoprotein lieferte (Lindner et al., 2000). Es werden BV und PCB als Chromophore gefunden, in einem Fall wird die Verwendung von Phycourobilin postuliert (Yoshihara et al., 2004b). Einigen Phytochromen aus Prokaryoten fehlt das oben erwähnte konservierte Cystein. Hier werden zwei andere Möglichkeiten der kovalenten Bindung diskutiert: Davis et al. schlagen als bindende Aminosäure ein Histidin vor, das dem in pflanzlichen Phytochromen bindenden Cystein direkt benachbart ist. Dieses Histidin ist ebenfalls konserviert. Der Bindungstyp wird von den Autoren als Schiffsche Base bezeichnet (Davis et al., 1999b). Ein Histidin besitzt allerdings kein primäres Amin, wenn es an einer Chromophorbindung beteiligt ist, könnte es sich um ein Amidin handeln (Quest, 2003). In Agp1 konnte gezeigt werden, daß ein Cystein an Position 20 für die kovalente Bindung von Biliverdin verantwortlich ist (Lamparter et al., 2003; Lamparter et al., 2004a). Ein gewisser Unterschied besteht in Hinblick auf die Chromophorselektivität verschiedener Phytochrome: PCB, PEB und PΦB tragen eine Ethylidenseitenkette an Position 3 des A-Rings, Biliverdin trägt dort eine Vinylgruppe (s. Abb. 1). In Cph1 erfolgt eine kovalente Bindung nur an die Ethylidenseitenkette, nicht aber an eine Vinylseitenkette (Lamparter et al., 1997). In Agp1 ist die Situation umgekehrt (Lamparter et al., 2003). Inwieweit dieser Unterschied auf einen unterschiedlichen Mechanismus der Bindungskatalyse verweist, ist bisher noch nicht untersucht. Interessanterweise führt die Einführung eines Cysteins an der den Pflanzenphytochromen homologen Position zur kovalenten Thioetherbindung eines geeigneten Bilins (Lamparter et al., 2003; Quest et al., 2004). In Agp1 kann so die kovalente Bindung von PCB induziert werden. Im Gegensatz zu den Phycobiliproteinen bindet in der Regel jedoch jeweils nur ein Bilin an ein apo-Phytochrommonomer, soweit dies untersucht wurde. Eine Ausnahme stellt hier Cph2 dar, das sowohl im N- als auch im C-terminalen Bereich je ein Molekül PCB bindet, von denen jedoch nur das im N-Terminus photochrom ist (Park et al., 2000b, Wu & Lagarias, 2000).

Der C-Terminus weist in vielen Phytochromen eine Homologie zu Histidinkinasen auf, wie sie typischerweise in sog. Zwei-Komponenten-Signalketten vorkommen (Schneider-Poetsch, 1992;

Stock et al., 2000). Für prokaryotische Phytochrome konnte die entsprechende Autophosphorylierung und ein Transfer der Phosphorylgruppe auf ein anderes Protein, den sog. *response-regulator*, durch *in vitro*-Experimente bestätigt werden (Jorissen et al., 2002; Lamparter et al., 2001; Yeh et al., 1997). Diese Experimente zeigten teilweise auch eine Abhängigkeit der Transkinaseaktivität als Funktion von Pr und Pfr (siehe aber Tasler et al., 2005), in allen erwähnten Untersuchungen zeigte jedoch auch das Apoprotein deutliche Auto- und Transkinaseaktivität.

In Pflanzenphytochromen handelt es sich um eine Serin/Threoninkinaseaktivität (Yeh & Lagarias, 1998). Es konnten mehrere Substrate der Kinasereaktion identifiziert werden (z. B. Ahmad et al., 1998; Mas et al., 2000; Fankhauser et al., 1999), die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierungen ist teilweise gesichert und wird als Mechanismus der Signalmodulation beschrieben (Ryu et al., 2005). Entsprechend dieser indirekten Wirkung auf die Signalweiterleitung ist der C-Terminus nicht für alle Phytochrom-vermittelten Effekte eine notwendige Voraussetzung (Matsushita et al., 2003). Im Fall des BrBphP fehlt die erwähnte Homologie des C-Terminus zu Histidinkinasen (Giraud et al., 2002). Für PhyA und PhyB konnte gezeigt werden, daß ihre C-Termini austauschbar und die jeweiligen N-Termini für die Spezifität verantwortlich sind (Wagner et al., 1996). Eine generalisierte Aussage zur Funktion der einzelnen Teile des Phytochrommoleküls in den vielfältigen Signalwegen ist im Moment nicht möglich.

1.7 Das cyanobakterielle Phytochrom 1, Cph1

Bei diesem Protein handelt es sich um das erste beschriebene Phytochrom aus einem prokaryotischen Organismus (Hughes et al., 1997; Yeh et al., 1997), dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (ORF slr0473). Die Entdeckung von Phytochrom-ähnlichen Sequenzen in einem prokaryotischen Organismus führte unter anderem zu einer Neubewertung des Ursprungs dieser Proteinfamilie (Herdman et al., 2000; Lamparter, 2004b). Das Apoprotein besteht aus 748 Aminosäuren. Sein nativer Chromophor ist PCB, wie durch homologe Überexpression des Proteins gezeigt werden konnte (Hübschmann et al., 2001). Er wird *in vitro* in das Apoprotein kovalent und autokatalytisch eingebaut (Lamparter et al., 1997). Die Bindung des Chromophors an das Apoprotein erfolgt wahrscheinlich an ein den Pflanzenphytochromen homologes Cystein, ein direkter Nachweis dieser Bindung analog den für Agp1 durchgeführten Versuchen steht aber noch aus. Eine C-terminale Deletionsmutante (Aminosäuren 1-514, Cph1 Δ 2) zeigt immer noch Autoassemblierung und eine intakte Photochromie (Yeh et al., 1997). Durch Einfügen der beiden für die Biosynthese von PCB aus

Häm notwendigen Enzyme HO und PcyA in *E. coli*, zusätzlich zu einem für das Apoprotein kodierenden Enzym, ist es gelungen, funktionales Cph1-Holoprotein direkt zu gewinnen (Gambetta & Lagarias, 2001; Landgraf et al., 2001). Entsprechend dem im Vergleich zu PΦB um eine DB verkürzten π -Elektronensystem des PCB sind die Absorptionsmaxima der Pr- und der Pfr-Form um etwa 20 nm blauverschoben. Das Apo- und das Holoprotein zeigen Auto- und Transkinaseaktivität zu einem *response-regulator*, Rcp1, der auf demselben Operon wie Cph1 lokalisiert ist. Im Holoprotein ist diese Transkinaseaktivität abhängig vom Pr- oder Pfr-Zustand, wobei der Pr-Zustand der aktive ist (Yeh et al., 1997; Lamparter et al., 2001). Ein Nachweis der physiologischen Funktion von Cph1 steht noch aus, obwohl einige Untersuchungen in dieser Hinsicht publiziert wurden. Fiedler et al. konnten ein vermindertes phototrophes Wachstum von Mutanten nachweisen, die kein Cph1 mehr exprimierten (Fiedler et al., 2004). Hübschmann et al. zeigen eine Regulation der Transkription mehrerer Gene in *Synechocystis* sp. PCC6803 in Abhängigkeit von rotem und dunkelrotem Licht (Hübschmann et al., 2005). Garcia-Dominguez et al. konnten zeigen, daß die Transkription von *cph1* und *rcp1* in Dunkelheit hoch-, bei Licht herunterreguliert ist (Garcia-Dominguez et al., 2000), wobei in Gegenwart von Glucose keine verstärkte Transkription in Dunkelheit stattfindet. Singh und Sherman weisen eine Regulation der Transkription von *cph1* und *rcp1* durch die Histidinkinase Hik8 nach, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Generationszeit von *cph1rcp1*-Doppelmutanten unter phototrophen, mixotrophen und heterotrophen Bedingungen und verschiedenen Hell/Dunkel-Perioden im Vergleich zur unmutierten Kontrolle nachweisen (Singh & Sherman, 2005). Hik8 spielt eine Rolle im Glucosestoffwechsel von PCC6803. Die beiden letztgenannten Arbeiten weisen auf eine Rolle von Cph1 beim Übergang zu verschiedenen Lichtintensitäten hin. Wilde et al. fanden keinen Effekt von Cph1 auf die phototaktische Mobilität von PCC6803, wohl aber von Cph2 (Wilde et al., 2002). Zusammenfassend deutet insbesondere die regulierte und konstitutive Transkription von *cph1* auf eine biologische Funktion dieses Proteins hin.

Aufgrund seines prokaryotischen Ursprungs ist eine heterologe Expression in z. B. *E. coli* für Cph1 und Cph1Δ2 problemlos und erfolgt in guten Ausbeuten (Lamparter et al., 1997, Park et al., 2000a). Damit sind viele strukturelle und mechanistische Untersuchungen an Cph1 möglich, die mit Pflanzenphytochromen, aufgrund ihrer relativ zu Cph1 aufwendigeren Gewinnung, nur mit Schwierigkeiten durchführbar sind. Entsprechend zahlreich sind die mit Cph1 oder Cph1Δ2 publizierten Untersuchungen, auf die hier nicht detailliert eingegangen werden soll. Zusammenfassend ergaben diese Untersuchungen große Ähnlichkeiten zum Verhalten pflanzlicher Phytochrome. Cph1Δ2 hat für spektroskopische Experimente, die Informationen über den Chromophor liefern sollen, den zusätzlichen Vorteil, daß der Massenanteil des Chromophors relativ zum Apoprotein erhöht ist. Im Fall von Cph1 liegt dieses Verhältnis bei 6.9×10^{-3} , bei Cph1Δ2 beträgt

es 9.9×10^{-3} . Aufgrund der praktisch nicht veränderten Photochromie von Cph1 Δ 2 kann die mit diesem Protein gewonnene Information als repräsentativ für das Verhalten des Chromophors im unmutierten Protein betrachtet werden, obwohl es sich um ein artifizielles, d. h. so nicht in der Natur vorkommendes System handelt. Cph1 ist, auch aufgrund dieser Untersuchungen, als ein Modellsystem für die Photochromie von Phytochromen allgemein akzeptiert.

1.8 Bisherige Strukturuntersuchungen an Phytochromen

Um zu einem detaillierten Verständnis der Struktur-Funktionsbeziehung von Phytochromen zu gelangen, hat man sich seit der Isolierung des Holo Proteins verschiedener Methoden bedient, die entweder auf eine Strukturbestimmung des Apoproteins, des (isolierten) Chromophors oder des Holo Proteins abzielen. Fast alle diese Untersuchungen wurden mit Phytochrom A aus verschiedenen Quellen durchgeführt, da sich dieser Phytochromtyp von allen in eukaryotischen Organismen vorkommenden Phytochromen am einfachsten in den benötigten Mengen isolieren läßt. Seit der Entdeckung von Phytochromen aus prokaryotischen Organismen sind viele Erkenntnisse mit diesen Molekülen gewonnen worden, da sie wesentlich leichter rekombinant zugänglich sind als pflanzliche Phytochrome. Besonderes Augenmerk wurde dabei der Photochromie gewidmet, der als prototypischer Mechanismus molekularer Informationsverarbeitung generelles Interesse zukommt. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die bisher publizierten Ergebnisse und die verwendeten experimentellen Strategien versucht werden. Mechanistische Untersuchungen zur Photochromie und zu einzelnen Intermediaten des Photozyklus werden dabei nicht berücksichtigt. Weiterhin wird die Annahme gemacht, daß die Ergebnisse, die an verschiedenen Phytochromen mit verschiedenen Chromophoren (PCB, P Φ B und BV) gewonnen wurden, auf alle anderen Phytochrome übertragen werden können. Es wird also von der Existenz einer generischen Phytochromstruktur ausgegangen.

1.8.1 Röntgenstrukturanalyse und kernmagnetische Resonanz

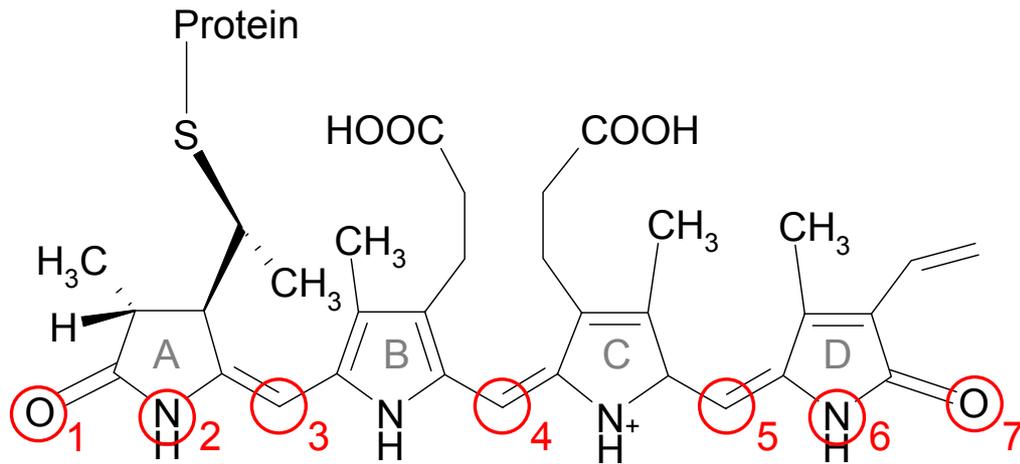
Beide Methoden können als „Absolutmethoden“ der Strukturaufklärung betrachtet werden, da beide prinzipiell in der Lage sind, die relative Lage einzelner Atome eines Moleküls direkt aus den Meßdaten zu bestimmen. Somit ist eine Visualisierung der Molekülstruktur ohne Bezug auf Vergleichssubstanzen möglich.

Bisher ist noch keine mittels Röntgenstrukturanalyse bestimmte Struktur irgendeines Phytochroms bekannt. Im Gegensatz dazu stehen mehrere hochaufgelöste Kristallstrukturen von Phycobilinen zur Verfügung (z. B. Düring et al., 1991), die auch eine Strukturbestimmung des gebundenen Chromophors erlauben. Tatsächlich sind diese Strukturen auch oft als Modelle für eine Struktur des Chromophors in Phytochrom herangezogen worden, trotz offensichtlicher Unterschiede in den Eigenschaften der Chromophore in den Proteinen (s. oben).

Eine wichtige Erkenntnis über die molekularen Veränderungen des Chromophors von Haferphytochrom A beim Übergang der Pr- in die Pfr-Form erhielt man aus Untersuchungen mit kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, im Folgenden NMR). Anhand der Lage der Methinprotonen in einem eindimensionalen Protonenspektrum konnte gezeigt werden, daß die beobachtete Rot-/Dunkelrotverschiebung nach entsprechender Bestrahlung mit einer Z/E-Isomerisierung um die Doppelbindung zwischen Position 15 und 16 korreliert (Rüdiger et al. 1983; Thümmler et al., 1983a). Dabei wurde jedoch nicht der Chromophor in der intakten Proteinmatrix untersucht, sondern Chromopeptide einer tryptischen Verdauung. Ein Vergleich des UV/vis-Spektrums der aus der Pr- bzw. Pfr-Form isolierten Chromopeptide macht jedoch klar, daß diese Z/E-Isomerisierung allein nicht die spektralen Veränderungen des Phytochroms erklären kann: das aus Pfr isolierte Chromopeptid zeigt ein blauverschobenes Spektrum, während es im Protein rotverschoben ist (Thümmler & Rüdiger, 1983a). Dies deutet auf zusätzliche Interaktionen des Proteins mit dem Chromophor, die zur Erklärung des beobachteten Effektes herangezogen werden müssen. Weiterhin konnte die Struktur von PCB und PΦB mit NMR aufgeklärt werden (Cole et al., 1967; Lagarias & Rapoport, 1980). In der letztgenannten Arbeit gelang auch der Nachweis der kovalenten Verknüpfung an ein Cystein der Proteinmatrix, da hier mit Proteinfragmenten aus PhyA gearbeitet wurde. NMR-Untersuchungen des Chromophors in einer intakten, d. h. funktionalen Proteinumgebung sind nicht bekannt.

1.8.2 Schwingungsspektroskopische Methoden

Solche Methoden messen die Energie von Molekülgruppenschwingungen, die durch sterische und elektrostatische Wechselwirkungen bestimmt werden. Durch Vergleich mit Modellsubstanzen und der Berechnung von Spektren für verschiedene Chromophorkonfigurationen und -konformationen versucht man, Strukturinformationen abzuleiten. Sowohl Infrarot- (IR-) als auch Resonanz-Raman- (RR-)methoden wurden verwendet. Abb. 6 gibt eine Übersicht über die bisherigen Befunde.



- 1 relativ schwache Wasserstoffbrückenbindung in Pr, stärker hydrophobe Umgebung in Pfr (Förstendorf et al., 2001)
- 2 schwächere Wasserstoffbrückenbindung in Pfr (Förstendorf et al., 2001)
- 3 Θ_{AB} ist größer in Pfr (Förstendorf et al., 2001)
- 4 Θ_{BC} ist größer in Pr (Matysik et al., 1995)
- 5 Θ_{CD} ist größer in Pfr (Fodor et al., 1990; Matysik et al., 1995)
- 6 Wasserstoffbrückenbindung in Pr (Förstendorf et al., 2001)
- 7 hydrophobe Umgebung in Pr und Pfr (Förstendorf et al., 2001); Salzbrücken in Pr und Pfr, „*anchor-and-release-mechanism*“ (Andel et al., 1996)

Abb. 6 Übersicht über bisher publizierte schwingungsspektroskopische Ergebnisse zur Struktur des Chromophors in der Pr- und Pfr-Form. Die abgebildete Struktur ist PΦB, manche der erwähnten Untersuchungen beziehen sich auf PCB.

1.8.3 Chemische Modellverbindungen

Durch Synthese von Chromophoranaloga mit bekannten Modifikationen und Beschreibung ihrer Eigenschaften alleine oder in Wechselwirkung mit dem Protein versucht man, bestimmte strukturelle und funktionale Eigenschaften von Phytochrom zu verstehen. Solche Modellverbindungen sind essentiell in Kombination mit NMR-, IR- und RR-Methoden. So gelangen Rüdiger et al. die Zuordnung der beobachteten chemischen Verschiebungen (s. oben) zum entsprechenden Konfigurationsisomer durch Vergleich mit den Spektren geeigneter Modellsubstanzen (Rüdiger et al., 1983). Die Aufklärung der Konstitution und Stereochemie des PΦB gelang durch Chromatabbau und Vergleich der erhaltenen Abbauprodukte mit Modellsubstanzen bekannter Zusammensetzung (Rüdiger & Correl, 1969; Klein et al., 1977; Weller & Gossauer, 1980). Weiterhin wird durch Austausch von sauren Protonen zu Deuteronen eine verbesserte Zuordnung

sowohl von IR- als auch von RR-Signalen erreicht. Ein selektiver Austausch von ^{16}O in Position 1 von PCB gegen ^{18}O erlaubte die Unterscheidung der beiden Carbonylfunktionen an Ring A und D (Förstendorf et al., 2001).

Durch den Einbau von Chromophoranaloga mit unterschiedlich großen Substituenten an verschiedenen Positionen konnte die sterische Toleranz der Proteintasche des PhyA bzw. PhyB untersucht werden und wichtige Funktionen der einzelnen Gruppen bestimmt werden (s. Abb. 7). Durch Biliverdinanaloga konnten Lamparter et al. zeigen, daß Agp1 über die Vinylgruppe des A-Rings kovalent an Biliverdin bindet (Lamparter et al., 2003). Die Verwendung von Biliverdinanaloga mit fixierter Konformation und Konfiguration, sog. „*locked chromophore*“ und ein Vergleich der Absorptionsspektren von mit diesen Chromophoren rekonstituiertem Agp1 erlaubte einen Rückschluß auf die Konformation und Konfiguration des BV in der Pr- und Pfr-Form von Agp1 (Inomata et al., 2005). Eine an die Pr-/Pfr-Bildung erinnernde Veränderung des Absorptionsspektrums konnte durch Bildung eines Methyliminoesters am A-Ring von PCB-Dimethylester erreicht werden (Micura & Grubmayr, 1994). Die Bildung eines Seryliminoesters zeigte ein analoges Verhalten (Micura & Grubmayr, 1995). Dies ist insbesondere deshalb interessant, weil in z. B. PhyA ein Serin direkt benachbart dem chromphorbindenden Cystein 321 ist. Die Bildung eines Lactimanions am A-Ring von Cysteinyl-PCB-Dimethylester zeigt ebenfalls eine deutliche Rotverschiebung im Vergleich zur Lactamstruktur (Grubmayr & Stanek, 1998). Beide Modelle für die Pr-/Pfr-Photochromie stehen jedoch im Widerspruch zu schwingungsspektroskopischen Befunden, die einen Carbonylsauerstoff an der entsprechenden Position finden (Förstendorf et al., 2001).

Modifikationen des Proteins durch selektiven Austausch einzelner Aminosäuren (ortsgerichtete Mutagenese) sind ebenfalls publiziert worden. Durch ein fehlendes Modell der Raumstruktur eines Phytochroms ist die Anzahl an möglichen Substitutionen in einem gegebenen Phytochrom sehr groß und eine Interpretation der erhaltenen Daten entsprechend schwieriger als im analogen Fall der gezielten Modifikation des Chromophors. Daher wird auf diese Untersuchungen nicht näher eingegangen.

Eine Protonierung aller Stickstoffe sowohl in der Pr- als auch der Pfr-Form wird in vielen Untersuchungen postuliert (Siebert et al., 1990, Förstendorf et al. 1996 und 2001, Fodor et al., 1990, Andel et al., 1996 und 2000, Kneip et al., 1999). Andere Arbeiten finden einen deprotonierten Chromophor in der Pfr-Form (Mizutani et al., 1991 und 1994).

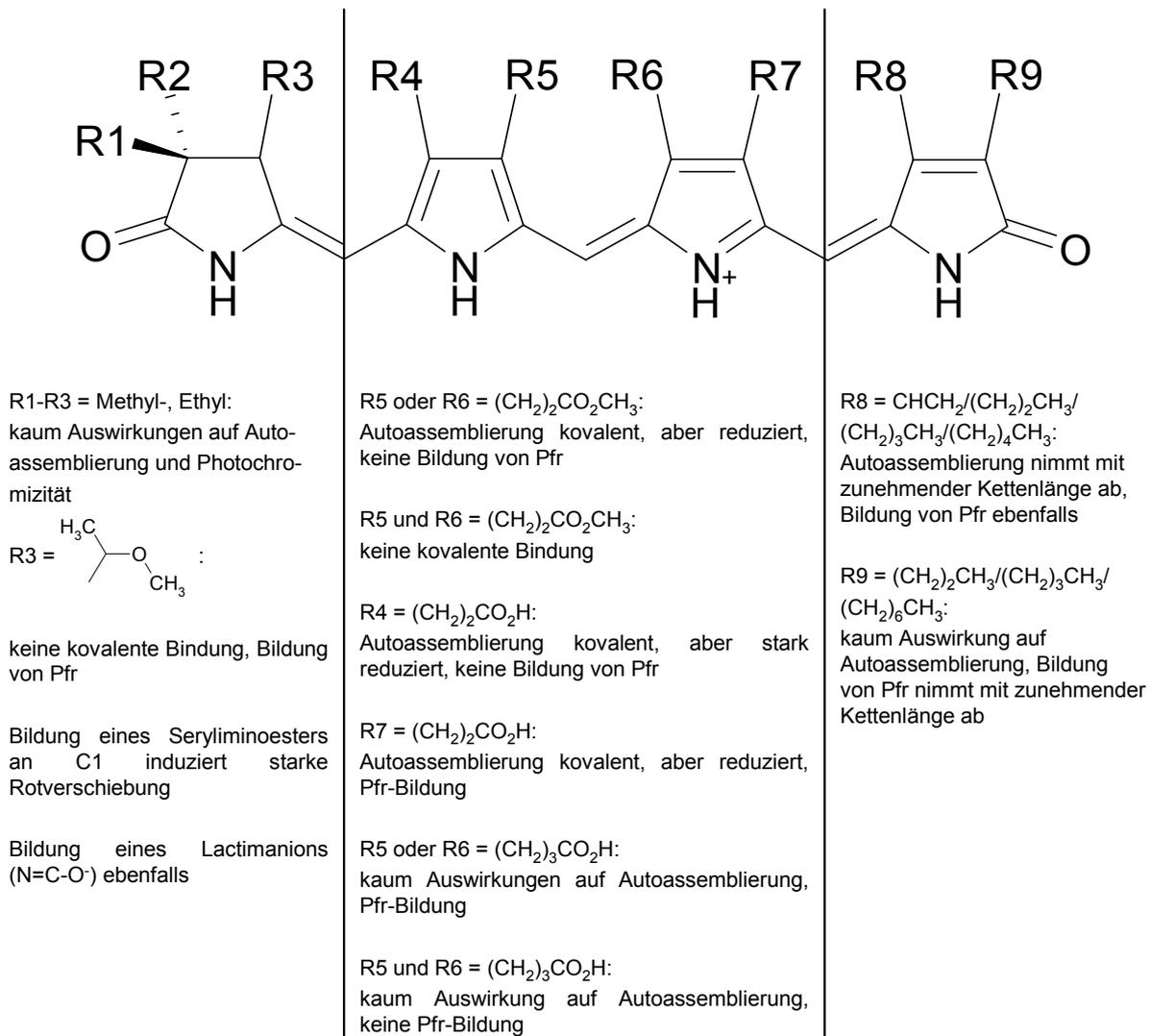


Abb. 7 Übersicht über die mittels chemisch modifizierter Chromophore erhaltenen Strukturhinweise, nach Hanzawa et al., 2001; Lindner et al., 1998 und 2000; Bhoo et al., 1997; Grubmayr & Stanek, 1998; Micura & Grubmayr, 1995. Es wurde jeweils nur ein Rest modifiziert, die anderen Substituenten entsprechen dann jeweils PCB bzw. PΦB.

Die Konformation und Konfiguration des Chromophors wird in der Pr-Form mit ZZZasa (Kneip et al., 1999, Mroginski et al., 2004) oder ZEZaas (Andel et al., 1996 und 2000) angegeben. Für die Pfr-Form werden ZZEssa (Mroginski et al., 2004) und ZEEaaa (Andel et al., 1996 und 2000) diskutiert. In Agp1 wurde durch BV-Analoga mit fixierter Konfiguration und Konformation eine 15Za- und 15Ea-Struktur für Pr und Pfr gefunden (Inomata et al., 2005). Mit NMR konnte eine 15Z- und 15E-Konfiguration für Pr und Pfr nachgewiesen werden (Rüdiger et al., 1983).

1.8.4 Weitere Methoden

Eine relativ frühe elektronenmikroskopische Untersuchung (Jones & Erickson, 1989) an *Avena*-Phytochrom A zeigt das Molekül als ein Y-förmiges Dimer (Abb. 8). Dabei wurden die auseinanderstrebenden Äste des Moleküls als die jeweiligen N-Termini identifiziert und der gemeinsame Stamm als die C-Termini. Ein vergleichbares Bild ergibt sich mit Röntgenkleinwinkelstreuung (Nakasako et al., 2005).

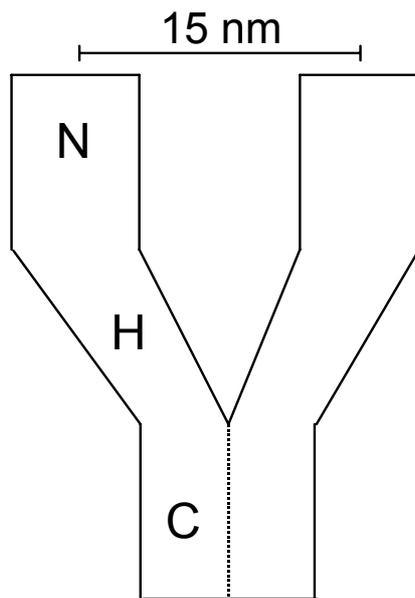


Abb. 8 Schematische Darstellung des dimerisierten Phytochrommoleküls, modifiziert nach Jones & Erickson, 1989. Die einzelnen Buchstaben bezeichnen den N-terminalen- (N) und C-terminalen- (C) Bereich. H gibt die „hinge“-Region an.

Die Quartärstruktur von Phytochrom A aus *Avena sativa* L. wurde u. a. mit analytischer Ultrazentrifugation untersucht (Jones & Quail, 1986; Hunt & Pratt, 1980). In beiden Untersuchungen zeigte sich, daß das Molekül als Dimer vorliegt. Unterschiede der Molmasse als Funktion von Rot-/Dunkelrotbestrahlung wurden nicht untersucht und eine untere Nachweisgrenze der Dissoziation nicht angegeben. Die Chromophorgeometrie wurde auch mit Circular dichroismusspektroskopie (CD-Spektroskopie) untersucht (Borucki et al., 2003). In dieser Arbeit ist zum ersten Mal das CD-Spektrum von reinem Pfr gezeigt. Die entgegengesetzten Vorzeichen des Chromophorsignals im roten Spektralbereich bei Bildung von Pr und Pfr wurden mit verschiedenen Chiralitäten des Chromophors in Verbindung gebracht, es wurde aber kein Modell für diesen Chiralitätswechsel vorgeschlagen. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte mittels Fluoreszenzresonanztransfer einen Abstand der Chromophore in (dimerem) Cph1 von etwa 5-6 nm messen (Otto et al., 2003). In einer anderen Untersuchung am gleichen Molekül konnte jedoch mit der gleichen Methode kein Fluoreszenztransfer nachgewiesen werden, was auf einen Abstand von > 10 nm zwischen den Chromophoren hindeutet (Sineshchekov et al., 2002).

1.9 Zielstellung

Das Wissen über die Struktur-Funktionsbeziehungen in Phytochromen ist rudimentär und teilweise widersprüchlich. Bisher ist noch kein Modell vorgeschlagen worden, daß die beobachteten Phänomene in Zusammenhang mit der Photochromie schlüssig erklären würde.

Um zu einem strukturellen Verständnis des Chromophors in der Pr- und der Pfr-Form und seinen entsprechenden Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung zu gelangen, kann man sich der NMR-Spektroskopie bedienen, wie dies schon im Fall von Bakteriorhodopsin erfolgreich durchgeführt wurde (Patzelt et al., 2002). Im Fall von Phytochrom sind solche Untersuchungen noch nicht am intakten Protein durchgeführt worden. Eine notwendige Voraussetzung solcher Untersuchung ist die Möglichkeit, die einzelnen Komponenten des zu untersuchenden Systems mit Heterokernen (^2H , ^{13}C , ^{15}N) anzureichern. Aufgrund seiner guten Expression in *E. coli* erscheint Cph1, bzw. Cph1 Δ 2 dafür besonders geeignet. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, das Apoprotein und den Chromophor, PCB, in unterschiedlicher Weise zu markieren, allerdings ist bisher kein Protokoll für die uniforme Markierung von PCB mit entweder ^{15}N oder ^{13}C oder beiden Isotopen publiziert. Weiterhin war unbekannt, ob Cph1, bzw. Cph1 Δ 2 in für NMR-Untersuchungen ausreichendem Maße aufkonzentriert werden könnte und die notwendige Stabilität für NMR-Messungen aufweisen würde. Mit stabilen Isotopen markierter Chromophor wäre auch für schwingungsspektroskopische Untersuchungen wie RR und IR von Interesse.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie sich die lichtabhängige Isomerisierung des Chromophors auf die Proteinmatrix überträgt, die das wahrgenommene Signal weitergibt (s. oben). Intermolekulare Wechselwirkungen laufen an der Oberfläche der jeweiligen Moleküle ab. Es könnte möglich sein, daß die reversible Bildung von Pr bzw. Pfr unterschiedliche Interaktionsoberflächen exponieren würde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch Anwendung mehrerer biophysikalischer Methoden verschiedene strukturelle Aspekte des Phytochromsystems zu untersuchen. Neben der NMR-Spektroskopie sollten dazu auch schwingungsspektroskopische Methoden und analytische Ultrazentrifugation eingesetzt werden. Die Verwendung dieser Methoden erforderte die Etablierung von molekularbiologischen und biochemischen Verfahren zur Darstellung des Proteins und des Chromophors in ausreichender und der jeweiligen Methode angepaßten Form. In Zusammenhang mit NMR-Spektroskopie war eine möglichst vollständige Deuterierung des Proteins und eine Markierung des Chromophors mit ^{13}C und/oder ^{15}N nötig. Damit sollte die spezifische Extraktion struktureller Information über den Chromophor in seiner nativen Bindungstasche ermöglicht werden. Markiertes

PCB sollte auch bei schwingungsspektroskopischen Untersuchungen zum Einsatz kommen, um auf diesem Wege eine bessere Zuordnung der beobachteten Signale zu einzelnen Schwingungsmoden zu ermöglichen. Mit analytischer Ultrazentrifugation sollte schließlich die Quartärstruktur von Cph1 Δ 2 als Funktion des Pr- und des Pfr-Zustandes untersucht werden.