

3 Zusammenfassung & abschließende Diskussion

3.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sind verschiedene biophysikalische Methoden zur Untersuchung der Struktur-Funktionsbeziehungen in cyanobakteriellem Phytochrom 1 (Cph1), bzw. seinem N-terminalen, photochromen Teil (Cph1 Δ 2, Aminosäuren 1-514) durchgeführt worden. Eine notwendige Voraussetzung, insbesondere für NMR-spektroskopische Untersuchungen, ist es, ausreichende Mengen von uniform ^{13}C - und/oder ^{15}N -markiertem PCB zur Verfügung zu haben. Hierzu wurde in dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt. Die vorgestellte Methode erfüllt einige der allgemeinen Anforderungen zur Gewinnung markierter Naturstoffe: es ist robust, einfach zu handhaben und die teuren Ausgangssubstanzen werden praktisch vollständig umgesetzt. Weiterhin wurde ein Protokoll zur Isolierung von PCB aus den markierten Organismen entwickelt. Gleichzeitig konnte auch das Apoprotein uniform und in hohem Maße mit Deuterium angereichert werden. Eine differentielle Markierung des Cph1 Δ 2-Systems ist damit experimentell möglich.

Durch analytische Ultrazentrifugation wurde die sehr gute Löslichkeit von Cph1 Δ 2 bestätigt. Weiterhin wurde gezeigt, daß beide spektrale Formen in einem Temperaturbereich zwischen 10 ° und 30 °C stabil sind, also keine thermische Umwandlung der Pr- oder der Pfr-Form erfolgt. Für spektroskopische Methoden in Lösung sind damit zwei entscheidende Voraussetzungen für die Messung sowohl der Pr- als auch der Pfr-Form erfüllt. Weiterhin wurde eine Änderung der Assoziationsaffinität als Funktion der Pr- und Pfr-Form sowohl qualitativ als auch quantitativ beschrieben. Damit ist mit thermodynamischen Parametern eine Strukturänderung an der Oberfläche des Proteins nachgewiesen. Diese Änderung ist sowohl reversibel als auch spezifisch und legt damit eine Funktion in Zusammenhang mit der Regulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen von Cph1 nahe.

Sowohl die Pr- als auch die Pfr-Form wurden mit Resonanz-Raman Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen Spektren sind im Vergleich zu vorhergehenden Messungen von deutlich besserer Qualität und erlauben eine detaillierte Auswertung. Durch den Austausch von sauren Protonen gegen Deuteronen und die Verwendung von ^{15}N -markiertem PCB konnte eine umfassende Modenzuordnung erreicht werden. Die experimentellen Befunde sprechen für einen in beiden Formen protonierten Chromophor. Ein Vergleich der gemessenen mit berechneten Spektren für verschiedene Konformationen und Konfigurationen des Chromophors zeigt für die Pr-Form eine größere Übereinstimmung der ZZZasa-Konfiguration, im Fall der Pfr-Form ist sie für einen ZZEssa-

konfigurierten Chromophor größer. Insgesamt jedoch ist hier die Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten Spektren deutlich schlechter als für die Pr-Form.

Mit Hilfe von isotoopenmarkiertem PCB und Apoprotein konnten die ersten homo- und heteronuklearen NMR-Spektren des intakten und funktionalen Chromophors eines Phytochroms gemessen werden. Protoniertes PCB in nahezu vollständig deuteriertem Protein wurde für die Messung von NOE-Spektren des Chromophors verwendet. Die Anzahl an Proteinprotonen und der daraus resultierenden Signale ist jedoch immer noch zu hoch, um alle Chromophorsignale zu erkennen und zuzuordnen. Eine in sich konsistente Zuordnungsstrategie basierend auf NOE-Spektren wurde vorgestellt. Unter Verwendung von ^{15}N -markiertem PCB konnten ^1H - ^{15}N -HMQC- und 1D- ^{15}N -Spektren aufgenommen werden. In den ^1H - ^{15}N -HMQC-Spektren beider Formen wurden erst nach extrem langen Meßzeiten Signale erhalten, allerdings weniger als aufgrund der Konstitution von PCB erwartet. Neben einem reversiblen Austausch von sauren Protonen des Chromophors trägt auch seine Beweglichkeit innerhalb der Bindungstasche zur extremen Linienverbreiterung der Signale bei. Diese Mobilität konnte durch die Messung von ^1H - ^{13}C -HMQC-Spektren bestätigt werden, in denen ebenfalls eine extrem lange Meßzeit nötig war, um Signale zuerst der Methyl-, dann von anderen Kohlenstoffatomen zu erhalten. Eine Protonierung aller vier Stickstoffe von PCB in der Pr- und der Pfr-Form konnte mit Hilfe von eindimensionalen ^{15}N -Spektren nachgewiesen werden. Im Vergleich mit für verschiedene Konfigurationen und Konformationen berechneten ^{15}N -chemischen Verschiebungen wurde eine größere Ähnlichkeit für einen ZZZssa-konfigurierten Chromophor im Fall von Pr gefunden. Für die Pfr-Form liefert die ZZEssa-Konfiguration die bessere Übereinstimmung. Die Ergebnisse aus RR- und NMR-spektroskopischen Messungen sind bezüglich der Protonierung und der Chromophorkonfigurationen in Übereinstimmung.

3.2 Summary

A number of biophysical techniques have been used in this work to understand the structure-function relationship in Cyanobacterial Phytochrome 1, or rather its N-terminal, photochromic part (Cph1 Δ 2, amino acids 1-514). A condition precedent to successful NMR-spectroscopic experiments is the availability of uniformly ^{13}C - and/or ^{15}N -labeled PCB. A protocol has been developed in this work for this purpose. The method meets some of the general requirements for the production of labeled natural compounds: it is robust, easy to handle and the expensive starting materials are quantitatively consumed. Deuterated apoprotein could be produced with a high level of isotopic enrichment. Differential labeling of Cph1 Δ 2 is thus experimentally feasible.

Using analytical ultracentrifugation the very good solubility of Cph1 Δ 2 was confirmed. It was also shown that the two spectral forms are stable in the temperature range between 10 ° and 30 °C. No thermal reversion of the Pr- or the Pfr-form was observed. Thus two essential conditions for spectroscopic measurements in solution are fulfilled for both the Pr- and the Pfr-form. Furthermore, a change in the strength of association as a function of Pr and Pfr was characterised both qualitatively and quantitatively. These thermodynamic parameters indicate a structural change on the surface of the protein. This change is both reversible and specific and therefore suggests a function in the regulation of protein-protein interactions of Cph1.

Both the Pr- and the Pfr-form were examined with Resonance-Raman spectroscopy. Compared to previous measurements the spectra obtained are of superior quality and allow for a detailed interpretation. Using ¹⁵N-labeled PCB in conjunction with a reversible protonation and deuteration, a comprehensive assignment of chromophore modes could be achieved. A comparison of measured and calculated spectra for various conformations and configurations of the chromophore shows a better agreement for the ZZZasa-configuration in case of Pr. For Pfr, it is better for a ZZEssa-configuration. Overall, the agreement between measured and calculated spectra is significantly worse compared to Pr.

Using isotopically labeled PCB and apoprotein, the first homo- and heteronuclear NMR-spectra of the intact and functional chromophore of a phytochrome could be measured. Unfortunately the spectra do not contain sufficient information for a complete assignment and structure calculation. Protonated PCB in an almost completely deuterated protein was used for the measurement of NOE-spectra of the chromophore. However, the number of protons in the protein and the resulting signals are still too high to allow a complete identification of signals specific for the chromophore. Consequently, a comprehensive assignment is not possible. A self-contained assignment strategy based on NOE-spectra was presented. Using ¹⁵N-labeled PCB, ¹H-¹⁵N-HMQC and 1D-¹⁵N-spectra were recorded. Signals in the ¹H-¹⁵N-HMQC spectra were obtained only after an extremely long measurement time and contained less signals than expected from the constitution of PCB. In addition to a reversible exchange of acidic chromophore protons the mobility of the chromophore in its binding pocket also contributes to the extreme line-broadening of the signals. This mobility was confirmed with ¹H-¹³C-HMQC spectra. In this case as well, an extremely long measurement time was required to obtain signals, first from the methyl-, then from other carbon atoms. That all four nitrogens of PCB in Pr and Pfr are protonated was shown by recording 1D-¹⁵N-spectra. Comparing ¹⁵N-chemical shifts calculated for a number of different conformations and configurations, a better agreement was found for a ZZZasa-configured chromophore in case of Pr. For Pfr, a ZZEssa configuration is more similar. The

results from RR- and NMR-measurements are in agreement regarding the protonation and the configuration.

3.3 Abschließende Diskussion

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß Cph1 Δ 2 alle molekularen Voraussetzungen erfüllt, um als eigenständiges Rezeptormolekül zu funktionieren. Es ist in der Lage, einen spezifischen Stimulus zu detektieren und zu transformieren. Die molekularen Voraussetzungen für eine Signalweiterleitung sind ebenfalls gegeben, da die detektieren Stimuli spezifische Änderungen an der Oberfläche des Proteins induzieren und so die Voraussetzung für veränderte Protein-Protein-Wechselwirkungen schaffen. Cph1 Δ 2 ist ein molekularbiologisches Artefakt, das in einer natürlichen Umgebung nicht vorkommt. Dennoch ist seine Photochromie ein prototypisches Signalereignis. Cph1 und Cph1 Δ 2 bieten damit die interessante Perspektive, daß in einem Rezeptormolekül der komplette Weg von der Signalwahrnehmung, über die $11Z$ - $11E$ -Transformation zur $11E$ -weiterleitung strukturell charakterisierbar ist. Strukturelle und mechanistische Untersuchungen an Cph1 Δ 2 sind damit von generellem Interesse für ein molekulares Verständnis der Wirkungsweise biologischer Rezeptoren.

Mehrere Aspekte der Struktur-Funktionsbeziehungen in Phytochromen verdienen hinsichtlich dieser Arbeit eine kritische Diskussion.

Die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein sind sowohl kovalenter als auch nicht-kovalenter Art. Die kovalente Anknüpfung ist keine notwendige Voraussetzung für die Photochromie von Phytochromen (s. Einleitung). Die Konstitution des Chromophors erlaubt an mehreren Stellen die Ausbildung von z. B. polaren Interaktionen zum Protein. Die Ausbildung von H-Brücken an den Ringstickstoffen, den Carbonylsauerstoffen der A- und D-Ringe und polaren Aminosäuren wird von mehreren Autoren postuliert (u. a. Förstendorf et al., 2001; Andel et al., 1996; Kneip et al., 1999). Hinweise auf H-Brücken konnten auch in dieser Arbeit gefunden werden: besonders N24 scheint an einer solchen Interaktion beteiligt zu sein. Eine detailliertere Beschreibung der Interaktionen verschiedener Substrukturen von PCB und vor allem eine quantitative Aussage ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit leider nicht möglich. Für die beiden Propionatreste, die im Protein wahrscheinlich deprotoniert sind, gibt es Hinweise, daß sie funktional sowohl für die korrekte Bindung des freien Chromophors als auch für eine korrekte Phototransformation wichtig sind (s. Einleitung). Keine der bisher verwendeten spektroskopischen Methoden konnte jedoch über diese Gruppen Auskunft geben. Dies gilt auch für die Ergebnisse dieser Arbeit. Als *ultima ratio* zur Klärung dieser Fragen bietet sich die vollständige Strukturaufklärung eines Phytochroms mittels

Röntgenstrukturanalyse und/oder NMR-Spektroskopie an. Eine andere Möglichkeit ist die der „inversen Markierung“: hierbei würden einzelne protonierte Aminosäuren in eine deuterierte Proteinmatrix eingebaut und NOE-Signale zu einzelnen Gruppen des Chromophors gemessen. Mit der vorliegenden Arbeit wurden einige Voraussetzungen für eine solche Herangehensweise geschaffen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine halbquantitative Aussage zur Mobilität des Chromophors in seiner Bindungstasche gemacht werden. Sie ist deutlich von der des Proteins verschieden, was darauf hindeutet, daß der Chromophor in eine „geräumige“ Bindungstasche eingebaut ist. Andere Autoren finden ebenfalls Hinweise auf konformationelle Subzustände des Chromophors (Matysik et al., 1995; Kneip, 1998; Heyne, 2001; Sineshchekov, 1995). Weiterhin ist bekannt, daß die sterische Toleranz der Bindungstasche im Bereich des D-Rings überraschend groß ist (s. Einleitung). Darüberhinaus ist die erste Strukturänderung des Chromophors in der Umwandlung Pr → Pfr die Z,E-Isomerisierung des D-Rings (z. B. Kneip et al., 1999), was voraussetzt, daß die Bindungstasche in der Lage ist, beide Chromophorkonfiguration aufzunehmen, ohne daß die Proteinumgebung sich strukturell verändern müßte. Gleichzeitig löst diese Isomerisierung eine strukturelle Umorganisation des gesamten Proteins aus, die zu veränderten homo- und heterologen Protein-Protein-Interaktionen und letzten Endes zu morphologischen Veränderungen eines gesamten Organismus führt.

Dies scheinen widersprüchliche Befunde zu sein: wie gelingt es einem anscheinend lose gebundenen, kleinen und in seiner Bindungstasche mobilen Chromophor ein wesentlich größeres Molekül in seiner Struktur spezifisch zu beeinflussen, insbesondere da sterische Interaktionen nicht die hauptsächliche Triebkraft für die Strukturänderung des Proteins sein können?

Dieser Widerspruch existiert, wenn man vereinfachend zwei starre Strukturen des Proteins für die Pr- und die Pfr-Form annimmt (z. B. Smith 2000, Abb. 1; . Chen et al., 2004, Abb. 4). In diesem Zusammenhang ist oft die Rede von Phytochrom als einem „molekularen Schalter“ (z. B. Quail, 1991), was jeweils zwei starre Zustände nahelegt (Morgan & Morrison, 1999). Dieser Widerspruch löst sich auf, wenn man sich verdeutlicht, daß Proteine keine starren Körper sind, sondern eine Verteilung von Konformeren aufweisen, die in einem Gleichgewicht zueinander stehen, das thermisch reguliert ist (Frauenfelder et al., 1991). Die Umwandlungskinetiken zwischen zwei Konformeren sind abhängig von der Strukturebene, die man betrachtet (z. B. Aminosäureseitenketten, Sekundärstrukturelemente) und den Aktivierungsenergien für die Umwandlung zwischen einzelnen Subzuständen. In letzter Zeit sind einige Fälle beschrieben worden, in denen die Verteilung zwischen konformationellen Subzuständen funktionale Bedeutung hat (z. B. Volkman et al., 2001; Eisenmesser et al., 2005).

Möglicherweise trifft dies für Phytochrom zu: dem Chromophor käme dann die Aufgabe zu, die innere Enthalpie und Entropie der beiden Photoisomere Pr und Pfr zu regulieren. Dies könnte auch durch einen mobilen Chromophor in einer geräumigen Bindungstasche erreicht werden. Die Pr- oder Pfr-Form wären dann keine starren Zustände, sondern eine im zeitlichen Mittel jeweils unterschiedliche Verteilung konformationeller Subzustände des Proteins. Der limitierende Fall eines starren Zustandes wäre erreicht, wenn die Austauschkinetiken zwischen den beiden Subzuständen im Bereich von Stunden liegen würden.

In Analogie zu Enzym-Substrat Komplexen, bei denen das Protein die Konformation des Substrats beeinflusst, könnte man Phytochrom daher als „inverses Enzym“ betrachtet, in dem das „inverse Substrat“ des Chromophors die Konformation des Proteins reguliert.