

Chromophorbindung und Photochemie der
 α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins
aus *Mastigocladus laminosus*



Maximilian Storf

Chromophorbindung und Photochemie der
 α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins
aus *Mastigocladus laminosus*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Maximilian Storf
aus Garmisch-Partenkirchen

November 2003

- | | |
|-------------------|----------------------|
| 1. Berichtstatter | Prof. Dr. H. Scheer |
| 2. Berichtstatter | Prof. Dr. W. Rüdiger |

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Phytochemie des Botanischen Instituts der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Scheer angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hugo Scheer, für die engagierte Betreuung dieser Arbeit, für sein Interesse an den Ergebnissen, die stete Bereitschaft zur Diskussion und die mir gewährte Forschungsfreiheit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Kai-Hong Zhao (College of Life Sciences and Technology, Wuhan, China) für die sehr gute und ergiebige Zusammenarbeit.

Für die Aufnahme der MS-Spektren möchte ich Dr. Peter Köhler und Frau I. Otte (Technische Universität, Garching) und Bernhard Granvogel in der Arbeitsgruppe von Dr. Lutz Eichacker danken. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Rainer Haeßner (Technische Universität, Garching) und Pawel Smialowski in der Arbeitsgruppe von Dr. Thaddäus Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) für die Aufnahme der NMR-Spektren bedanken.

Bedanken möchte ich mich ferner bei Brigitte Strohmann für ihre Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten, bei Matthias Plösch für seine Mitarbeit im Rahmen seiner Diplomarbeit und bei Steffi Schulz und Stephan Böhm für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises für das gute Arbeitsklima bedanken, besonders bei Brigitte Wilhelm, Ines Haame, Heike Snigula, Andrea Zehetner, Adela Garcia-Martin, Claudia Bubenzer, Paula Braun, Nina Kamhuber und Beate Ücker, die mir ans Herz gewachsen sind.

Mein Dank geht auch an meine Eltern und meine Schwestern für ihre Unterstützung und an Hanna und Mark für ihre Freundschaft.

Abbildung Umschlag:

Rohes Isolat der Phycobiline aus der Rotalge

Porphyra yezoensis, fotografiert im Rundkolben.

Das Isolat besteht aus ca. 60 % Phycoerythrobilin,
30 % Phycocyanobilin und einigen Nebenprodukten.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Zhao K.H., Deng M.G., Zheng M., Parbel A., Storf M., Meyer M., Strohmann B. & Scheer H. (2000) Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. *FEBS Lett.* 469, 9-13.
- Storf M., Parbel A., Meyer M., Strohmann B., Scheer H., Deng M.G., Zheng M., Zhou M. & Zhao K.H. (2001) Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/PecF, a lyase-isomerase for the photoactive 3¹-Cys- α 84-phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin. *Biochemistry* 40, 12444-12456.
- Foerstendorf H., Benda C., Gärtner W., Storf M., Scheer H. & Siebert F. (2001) FTIR studies of phytochrome photoreactions reveal the C=O bands of the chromophore: consequences for its protonation states, conformation, and protein interaction. *Biochemistry* 40, 14952-14959.
- Zhao K.H., Wu D., Wang L., Zhou M., Storf M., Bubenzer C., Strohmann B. & Scheer H. (2002) Characterization of phycoviolobilin phycoerythrocyanin- α 84-cystein-lyase-(isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*. *Eur. J. Biochem.* 269, 4542-4550.
- Zhao K.H., Ran Y., Sun Y.N., Li M., Zhou M., Storf M., Bubenzer C. & Scheer H. The two photochromic biliproteins: α -subunit of phycoerythrocyanin and cyanobacterial phytochrome in the same cyanobacterium PCC 7120. (in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Gallenfarbstoffe und Biliproteine - Ein kurzer historischer Überblick	1
1.2	Biliproteine als Lichtsammler der Photosynthese - Die Phycobilisomen	3
1.3	Die Biliproteine und ihre Chromophore	5
	Biliproteine und Biliproteinuntereinheiten	5
	Die Chromophore der Biliproteine	7
	Faktoren, welche die Absorptionseigenschaften der Biliproteine beeinflussen	10
1.4	Energietransfer im Phycobilisom	15
1.5	Chromophorbindung der Biliproteine	15
1.6	Komplementäre chromatische Adaptation	16
1.7	Die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins	17
	Die Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins	19
1.8	Das Phytochrom	21
	Die Photochemie des Phytochroms	22
1.9	Aufgabenstellung:	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Geräte	25
2.1.2	Chemikalien	26
2.1.3	Puffer und Lösungen	26
2.1.4	Medien	28
2.1.5	Organismen	29
2.1.6	Plasmide	29
2.1.7	Oligonucleotide	30
2.2	Molekularbiologische Arbeiten	30
2.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	30
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA	31
2.2.3	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	31
2.2.4	Agarosegelelektrophorese	32
2.2.5	Enzymatische Modifikation von DNA	32
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.7	Mutagenese von Plasmid-DNA	34
2.2.8	Transformation	35

2.3	Proteinchemische Arbeiten	35
2.3.1	Darstellung der Proteine durch Expression in <i>E. coli</i>	35
2.3.2	Zellaufschluß durch Ultraschall	36
2.3.3	Aufreinigung der Proteine durch Affinitätschromatographie	36
2.3.4	Dialyse	36
2.3.5	Konzentrierung von Proteinen	37
2.3.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	37
2.4	Isolierung und Darstellung der Chromophore	39
2.4.1	Generelle Arbeitsbedingungen	39
2.4.2	Isolierung von Phycocyanobilin aus <i>Spirulina platensis</i>	39
2.4.3	Isolierung von Phycoerythrobilin aus <i>Porphyra yezoensis</i>	39
2.4.4	Veresterung des Phycocyanobilins zum Phycocyanobilin-Dimethylester	40
2.4.5	Darstellung von Phytochromobilin	40
2.4.6	Darstellung von Biliverdin IX α aus Bilirubin IX α	41
2.4.7	Isolierung von Bilinen aus rekonstituierten Biliproteinen	41
2.4.8	Abspaltung von Phycoviolobilin aus rekonstituiertem α -Phycoerythrocyanin	41
2.5	Aufreinigung der Chromophore	42
2.6	Rekonstitutionen	43
2.6.1	Rekonstitution mit den rohen <i>E. coli</i> -Lysaten	43
2.6.2	Rekonstitution mit den aufgereinigten Proteinen	44
2.6.3	Denaturierung der rekonstituierten Biliproteine mit Harnstoff	44
2.7	Analytische Methoden	45
2.7.1	Analytische Dünnschicht-Chromatographie der Chromophore	45
2.7.2	Analytische HPLC der Rekonstitutionsprodukte	45
2.7.3	Belichtung zur Induktion photochemischer Effekte	46
2.8	Spektroskopie	48
2.8.1	Allgemeine Bedingungen	48
2.8.2	UV/Vis-Spektroskopie	48
2.8.3	Fluoreszenzspektroskopie	48
2.8.4	Circulardichroismus	48
2.8.5	NMR-Spektroskopie	49
2.8.6	Massenspektroskopie	49
2.9	Bioinformatische Methoden	50
2.9.1	Datenbanken	50
2.9.2	3D-Visualisierung von Proteinen	50
2.9.3	Sequenzanalysen	50
2.9.4	Andere bioinformatische Methoden	50

3	Ergebnisse und Diskussion	51
3.1	Isolierung und Modifikation der Bilin-Chromophore	51
3.1.1	Isolierung von Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin	53
3.1.2	Darstellung von Phytochromobilin aus Phycoerythrobilin	55
3.1.3	Einfluss von Detergens auf Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin	62
3.2	Darstellung der Proteine durch Expression in <i>E. coli</i>	67
3.2.1	Konstruktion und Mutagenese der Expressionsvektoren	67
3.2.2	Expressionsvektoren für die Mutanten von His ₆ -PecA	69
3.2.3	Expressionsvektoren für PecE, PecF, His ₆ -PecE, His ₆ -PecF	69
3.3	Genexpression und Aufreinigung der Proteine:	70
3.3.1	Darstellung der Apoproteine durch Expression in <i>E. coli</i>	70
3.3.2	Darstellung der Lyase-Isomerase-Untereinheiten durch Expression in <i>E. coli</i>	71
3.3.3	Affinitätschromatographische Reinigung der getaggtten Proteine	72
3.3.4	Darstellung und Aufreinigung der Mutanten von His ₆ -PecA	74
3.4	Rekonstitutionen:	76
3.4.1	Autokatalytische Rekonstitution mit dem Chromophor Phycocyanobilin	77
	Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts	79
	Abspaltung des Chromophors mit HBr/Trifluoressigsäure	84
	Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC	85
	Die Photochemie	88
	Behandlung mit PCMS	90
	Zusammenfassende Diskussion	93
3.4.2	Enzymatische Rekonstitution mit dem Chromophor Phycocyanobilin und der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase	95
	Absorptions-, Fluoreszenz-, CD-Spektren und Photochemie	98
	Abspaltung des Chromophors mit Ag ₂ SO ₄	104
	Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC	107
	Behandlung mit PCMS	109
	Zusammenfassende Diskussion	112
3.4.3	Rekonstitutionen mit den Chromophoren Phycoerythrobilin und Phycoerythrobilin- Dimethylester	114
	Autokatalytische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin	115
	Enzymatische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin	120
	Autokatalytische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin-Dimethylester	121
	Enzymatische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin-Dimethylester	125
	Zusammenfassende Diskussion	128
3.4.4	Rekonstitutionsversuche mit Phycocyanobilin-Dimethylester	129
3.4.5	Rekonstitutionsversuche mit den Chromophoren Biliverdin und Bilirubin	130

3.4.6	Autokatalytische Rekonstitution mit dem Chromophor Phytochromobilin _____	132
	Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts _____	133
	Die Photochemie _____	134
	Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC _____	137
	Zusammenfassende Diskussion _____	139
3.4.7	Enzymatische Rekonstitution mit dem Chromophor Phytochromobilin und der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase _____	140
	Absorptions-, Fluoreszenz-, CD-Spektren und Photochemie _____	140
	Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC _____	144
	Behandlung mit PCMS _____	146
	Zusammenfassende Diskussion _____	148
3.4.8	Rekonstitutionen mit den Nebenprodukten der Phytochromobilindarstellung _____	149
	Autokatalytische Rekonstitution mit $1_{P\Phi B}$ ([17,18-Propano]-Phycocyanobilin) _____	149
	Enzymatische Rekonstitution mit $1_{P\Phi B}$ ([17,18-Propano]-Phycocyanobilin) _____	151
	Rekonstitutionen mit $2_{P\Phi B}$ ($18^1, 18^2$ -Epoxy-Phycocyanobilin) _____	154
3.4.9	Rekonstitutionen der Apoprotein-Mutante His ₆ -PecA-C84S _____	157
3.4.10	Rekonstitutionen der Apoprotein-Mutanten His ₆ -PecA-C98S, His ₆ -PecA-C99S und His ₆ -PecA-C98S-C99S _____	158
	Autokatalytische Rekonstitutionen _____	160
	Enzymatische Rekonstitutionen _____	163
	Zusammenfassende Diskussion _____	169
3.5	NMR-Spektroskopie der Proteine _____	170
4	Abschließende Diskussion _____	174
4.1	Die Chromophorbindung der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins _____	174
4.1.1	Autokatalytische Chromophorbindung _____	174
4.1.2	Enzymatische Chromophorbindung _____	179
4.2	Die Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins _____	185
4.2.1	Möglicher Mechanismus der Photochemie _____	185
	Die Photochemie Typ I _____	185
	Die Photochemie Typ II _____	189
	Die Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins und des Phytochroms _____	194
5	Zusammenfassung _____	197
6	Literaturverzeichnis _____	200

Abkürzungen

$1_{P\Phi B}, 2_{P\Phi B}, 3_{P\Phi B}$	Produkte der Phytochromobilindarstellung
3E-P Φ B	$\Delta 3,3^1$ -E-Phytochromobilin
α -PC	α -Untereinheit des Phycocyanins
α -PEC	α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins
α -PEC	α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BR	Bilirubin
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Biliverdin
CCA	komplementären chromatischen Adaptation
CpcE, CpcF	Untereinheiten der Phycocyanobilin- α -Phycocyanin-Lyase
Cys	Cystein
DBV	Dihydrobiliverdin
DBV-DME	Dihydrobiliverdin-Dimethylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
His ₆ -PecA	Apoprotein der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins mit einem N-terminalen His ₆ -Tag
His ₆ -PecE, His ₆ -PecF	Untereinheiten der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- $\alpha 84$ -Cystein-Lyase-Isomerase mit einem N-terminalen His ₆ -Tag
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HSQC	heteronuclear single-quantum coherence
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalaktosid
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LDAO	N-Dodecyl-N,N-dimethylaminoxid
Lyase-Isomerase	Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- $\alpha 84$ -Cystein-Lyase-Isomerase
<i>M. lamosus</i>	<i>Mastigocladus lamosus</i>
MBV	Mesobiliverdin

<i>P. yezoensis</i>	<i>Porphyra yezoensis</i>
PC	Phycocyanin
PCB	Phycocyanobilin
PCB-DME	Phycocyanobilin-Dimethylester
PCB-PC-Lyase	Phycocyanobilin- α -Phycocyanin-Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEB-DME	Phycoerythrobilin-Dimethylester
PEC	Phycoerythrocyanin
PecA	Apoprotein der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins
PecE, PecF	Untereinheiten der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase
PEG	Polyethylenglykol
P _{fr}	Dunkelrot absorbierende Form des Phytochroms
PhyA	Phytochrom A
P _r	Hellrot absorbierende Form des Phytochroms
PUB	Phycourobilin
PUB-DME	Phycourobilin-Dimethylester
PVB	Phycoviolobilin
PVB-PEC-Lyase-Isomerase	Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase
P Φ B	Phytochromobilin
<i>S. platensis</i>	<i>Spirulina platensis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
v/v, w/v	Volumen/Volume, Gewicht/Volumen
Z- α _I , E- α _I , Z- α _{II} , E- α _{II}	Vier stabile Formen der Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins

1 Einleitung

1.1 Gallenfarbstoffe und Biliproteine - Ein kurzer historischer Überblick

Gallenfarbstoffe bei Wirbeltieren

Als Gallenfarbstoffe oder Biline werden Verbindungen bezeichnet, die strukturell dem Bilirubin, dem Hauptfarbstoff der Galle von Säugetieren, gleichen.

Die Wissenschaft begann Anfang des 19. Jahrhunderts sich mit den Farbstoffen der Galle bei Mensch und Wirbeltieren zu beschäftigen. Thenard (Thenard 1807) und Berzelius (Berzelius 1808) extrahierten aus Gallensteinen gelbe und grüne Farbstoffe. Diese Farbstoffe wurden von Virchow (Virchow 1847) als Abbauprodukte des Blutfarbstoffes erkannt. Mitte des 19. Jahrhunderts konnten der grüne und der gelbe Gallenfarbstoff als Reinstoff gewonnen werden. Heintz (Heintz 1851) nannte den grünen Farbstoff Biliverdin und der gelbe Farbstoff wurde von Städeler (Städeler 1864) als Gallenroth bzw. Bilirubin bezeichnet. Die Struktur des Bilirubins als offenkettiges Tetrapyrrol und somit auch das Grundgerüst der übrigen Gallenfarbstoffe wurde durch Siedel und Fischer (Siedel & Fischer 1933) aufgeklärt. Fischer und seinen Mitarbeiter gelang auch die Synthese von Gallenfarbstoffen, wie die Synthese von Bilirubin und Biliverdin (Fischer & Plieninger 1942). 1976 schließlich wurden die Röntgenkristallstrukturen von Bilirubin (Bonnett *et al.* 1976) und Biliverdin-Dimethylester (Sheldrick 1976) veröffentlicht.

Gallenfarbstoffe und Biliproteine bei Pflanzen und photosynthetischen Bakterien

Gallenfarbstoffe bei Säugetieren, die Abbauprodukte des Häms darstellen, können an Proteine gebunden vorkommen, so ist das Bilirubin häufig an Serumalbumin gebunden. Die Proteinbindung ist jedoch nie kovalent. Anders ist dies bei den Gallenfarbstoffen von Pflanzen und photosynthetischen Bakterien, die mit wenigen Ausnahmen kovalent an Proteine gebunden sind, also in Biliproteinen vorkommen. Wissenschaftler haben bereits vor mehr als eineinhalb Jahrhunderten begonnen sich mit diesen Biliproteinen zu beschäftigen, da sie in Cyanophyceen (Blualgen) und Florideen (Rotalgen) in auffällig großen Mengen vorhanden sind. Nees isolierte (Nees 1837) aus dem Cyanobakterium *Oscillatoria* neben

dem Chlorophyll einen blauen wasserlöslichen Farbstoff, den er Phycocyanin nannte. Den bei Rotalgen reichlich vorkommenden roten Farbstoff, der bei Beschädigung der Pflanze ins Wasser übertritt, nannte Kützing Phycoerythrin (Kützing 1843). 1884 brachte Engelmann Phycoerythrin und Phycocyanin mit der Photosynthese in Zusammenhang (Engelmann 1884). Anfang des 20. Jahrhunderts hat Kylin gezeigt, dass Phycocyanin und Phycoerythrin in Cyanobakterien und in Rotalgen auch nebeneinander und in verschiedenen Modifikationen vorkommen können, wodurch die unterschiedlichsten Färbungen dieser Organismen zu erklären waren (Kylin 1910).

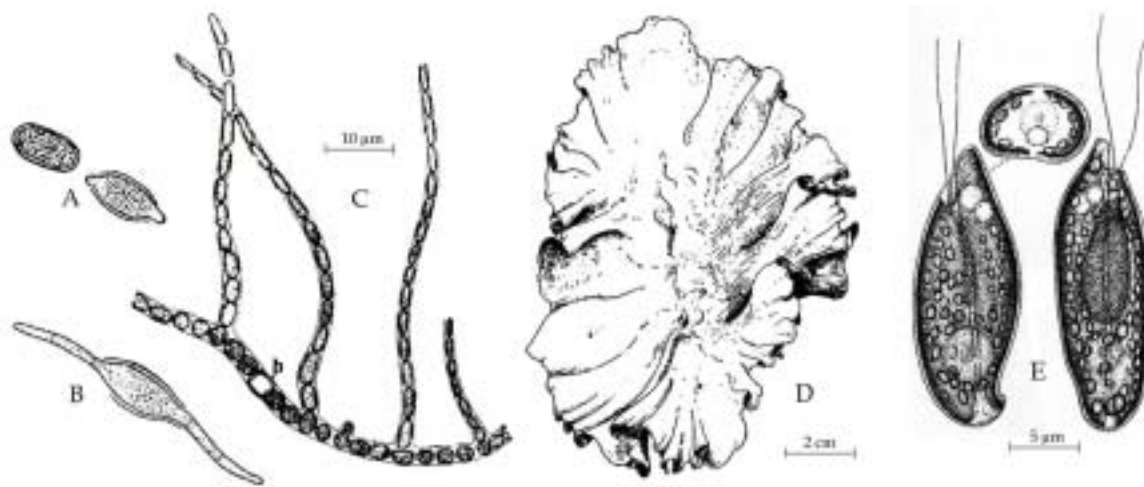


Abbildung 1-1:

Biliproteinhaltige Organismen: Cyanobakterien, Rotalgen und Cryptophyceen

A - C: *Mastigocladus laminosus*, ein thermophiles Cyanobakterium, das in heißen Quellen vorkommt; A, B: Spore (Akinet) und frühes Keimungsstadium, C: Zellfäden mit echten Verzweigungen (h: Heterocyste, zur Stickstofffixierung befähigte Zelle).

D: Thallus von *Porphyra yezoensis*, einer Rotalge, die im chinesischen Meer wächst und in Asien ein beliebtes Nahrungsmittel darstellt.

E: *Cryptomonas rostratiformis*, einzelliger Planktonorganismus in Teichen und Seen.

(A-D nach Fritsch 195); E nach Huber-Pestalozzi 1968)

Kylin konnte um 1910 auch nachweisen, dass Phycocyanin und Phycoerythrin aus einer Protein- und einer Farbstoffkomponente bestehen, und somit Chromoproteine sind, indem er diese Biliproteine mit Pepsin behandelte (Kylin 1910, Kylin 1912). Die abgespaltenen Chromophore konnte Lemberg mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie und durch Oxidations- und Reduktionsreaktionen als Gallenfarbstoffe bzw. Biline identifizieren und nannte daher den blauen Farbstoff Phycocyanobilin (PCB) und den roten Farbstoff Phycoerythrobin (PEB) (Lemberg 1930, Lemberg 1933). Ende der 50er Jahre wurden Biliproteine in einer weiteren Algengruppe, den Cryptophyceen, gefunden. Es handelt sich dabei um einzellige Flagellaten, die als Planktonorganismen sowohl im Süßwasser als auch im Meer vorkommen (Allen *et al.* 1959, O'hEocha & Raftery 1959, Haxo & Fork 1959). 1965/1966 entdeckten

Gantt und Conti in Rotalgen und später auch in Cyanobakterien die Phycobilisomen, auf der Thylakoidmembran aufsitzende Lichtsammelkomplexe, die aus Biliproteinen aufgebaut sind (Gantt & Conti 1965, Gantt & Conti 1966a, Gantt & Conti 1966b). Neben dem blauen Phycocyanobilin (PCB) und dem roten Phycoerythrobilin (PEB), deren Struktur 1967 von Chapman et al. durch NMR-Studien aufgeklärt wurde (Chapman *et al.* 1967, Cole *et al.* 1967), wurden noch zwei weitere Chromophore von Phycobiliproteinen entdeckt: 1968 das gelbe Phycourobilin (PUB) in bestimmten Phycoerythrinen (Chapman *et al.* 1968) und 1976 das violette Phycoviolobilin (PVB) in einem neu entdeckten Biliprotein, dem Phycoerythrocyanin (Bryant *et al.* 1976). Ab Mitte der 80er Jahre konnten die 3D-Strukturen vieler Phycobiliproteine mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden, so z.B. die Strukturen von Phycoerythrocyanin und Phycocyanin des Cyanobakteriums *Mastigocladus laminosus* (Schmidt *et al.* 1987, Dürring *et al.* 1990).

Das Phytochrom

Neben der großen Gruppe der Phycobiliproteine, die an der Photosynthese beteiligt sind, gibt es eine weitere wichtige Gruppe von Biliproteinen, die Phytochrome. 1945 wurde dieser photochemisch aktive Lichtsensor in grünen Pflanzen von Hendricks aktionsspektroskopisch entdeckt (Parker *et al.* 1945), konnte aber aufgrund seiner geringen Konzentration und Instabilität erst 1959 angereichert und spektroskopisch untersucht werden (Butler *et al.* 1959). 1964 schlug Siegelman vor, dass es sich bei dem Chromophor um einen Gallenfarbstoff handeln könnte, was 1969 durch Rüdiger auch bestätigt wurde (Rüdiger & Correll 1969). In den letzten Jahren wurden Phytochrome auch in Cyanobakterien (Hughes *et al.* 1997) und in nicht photosynthetischen Bakterien gefunden (Davis *et al.* 1999).

1.2 Biliproteine als Lichtsammler der Photosynthese:

Die Phycobilisomen

Phycobilisomen wurden Mitte der sechziger Jahre durch Gantt und Conti erstmals bei der Rotalge *Porphyridium cruentum* elektronenmikroskopisch erfasst (Gantt & Conti 1965, Gantt & Conti 1966a, Gantt & Conti 1966b) und als Lichtsammelkomplexe von Cyanobakterien und Rotalgen erkannt (Gantt 1986, Wehrmeyer 1983). Die Phycobilisomen sind hoch organisierte Komplexe, die aus verschiedenen Biliproteinen und Linkerpolypeptiden aufgebaut sind und häufig in regelmäßigen parallelen Reihen auf der Thylakoidmembran angeordnet sind

(Mörschel & Mühlethaler 1983, Mörschel & Rhiel 1987). Ein Phycobilisom ist in der Regel mit zwei Photosystemen II assoziiert, auf welche die absorbierte Energie übertragen werden kann (Chereskin *et al.* 1985, Clement-Metral *et al.* 1985). Unter bestimmten Lichtbedingungen (Bald *et al.* 1996, Sidler 1994) oder in Photosystem II-freien Mutanten (Mullineaux 1994, Mullineaux 1992) kann jedoch auch eine Energieübertragung auf das Photosystem I erfolgen.

Es gibt morphologisch unterschiedliche Typen von Phycobilisomen, wobei die hemidiskoidale Form, die bei Cyanobakterien wie *Mastigocladus laminosus* am häufigsten vorkommt, am detailliertesten untersucht ist (Gantt 1980, Nies & Wehrmeyer 1980, Mörschel & Rhiel 1987, Sidler 1994, Ducret *et al.* 1996, Ducret *et al.* 1998, MacColl 1998). Eine schematische Darstellung der Thylakoidmembran mit hemidiskoidalem Phycobilisom ist in Abbildung 1-2 gezeigt.

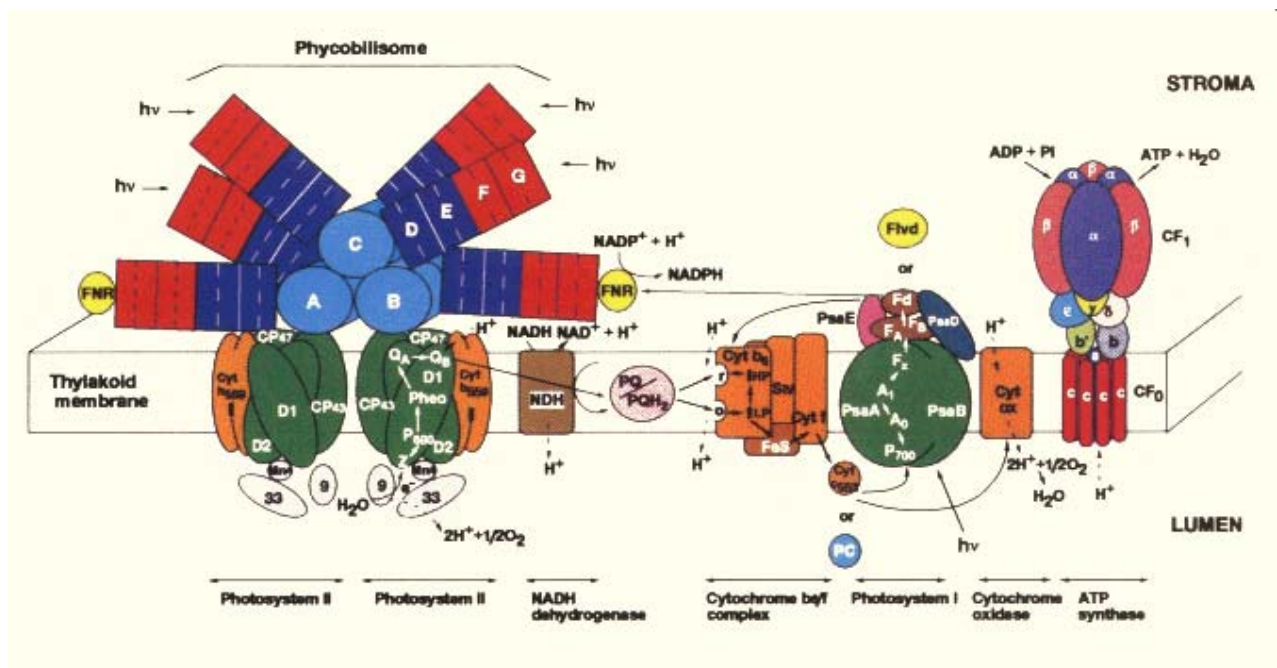


Abbildung 1-2:

Schematische Darstellung der Thylakoidmembran eines Cyanobakteriums mit hemidiskoidalem Phycobilisomen-Typ (Bryant 1994).

A, B, C = Kern aus Allophycocyanin; D - G: Stäbchen, aufgebaut aus Phycocyanin (D, E) und aus Phycoerythrin oder Phycoerythrocyanin (F, G)

Aufbau und Funktion der Phycobilisomen

Das Phycobilisom besteht aus einem Kern und peripheren Stäbchen. Den Kern bilden zwei, drei oder fünf zur Thylakoidmembran parallel liegende Zylinder. Sechs bis acht ebenfalls zylindrische Stäbchen stehen senkrecht auf den Zylindern des Kerns. Kern und Stäbchen sind aus scheibenförmigen Biliproteinaggregaten zusammengesetzt. Diese Scheiben bestehen aus zwei trimeren Phycobiliproteinen, die durch eine „Kopf-an-Kopf“ Aggregation zu einem hexameren Komplex zusammengelagert sind (Ficner *et al.* 1992, MacColl 1998). Die Phycobiliprotein-Scheiben sind im Phycobilisom so angeordnet, dass es zu einem Fluss der absorbierten Energie von außen nach innen, von den Stäbchen über den Kern hin zum Chlorophyll a in den Photosystemen kommen kann. Daher liegen die hochenergetisch absorbierenden (565 - 575 nm) Phycoerythrine bzw. Phycoerythrocyanine an der Peripherie der Stäbchen, die Phycocyanine, mit einer Absorption bei 615 - 640 nm im unteren Teil der Stäbchen und die niederenergetisch absorbierenden (650 - 670 nm) Allophycocyanine im Kern, die schließlich die Energie auf das bei 670 nm absorbierende Chlorophyll a des „special pairs“ im Photosystem II übertragen (Gantt 1975, Sidler 1994, Bald *et al.* 1996). Neben den lichtabsorbierenden Phycobiliproteinen enthalten die Phycobilisomen eine zweite Proteingruppe, die Linkerproteine. Die meist unpigmentierten Linkerproteine tragen zur Organisation und zur Stabilisierung der Phycobilisomen bei, können jedoch auch die spektralen Eigenschaften der Biliproteine beeinflussen (Tandeau de Marsac & Cohen-Bazire 1977, Glauser *et al.* 1993, Gottschalk 1993, Parbel 1997). Auch am Energietransfer können Linker beteiligt sein. So ist der große Linker L_{CM} (Core-Membrane Linker), der das Phycobilisom mit der Thylakoidmembran verbindet und einen Chromophor trägt, für den Transfer der Anregungsenergie vom Phycobilisomen zum Chlorophyll a des Reaktionszentrums im Photosystem II verantwortlich (Glazer 1989, Sidler 1994).

1.3 Die Biliproteine und ihre Chromophore

Biliproteine und Biliproteinuntereinheiten

Biliproteine entstehen bei der Dissoziation von Phycobilisomen. Werden die Zellen aufgebrochen und der Zellinhalt gelangt in Puffer geringerer Ionenstärke, so lösen sich die Phycobilisomen in ihre Bestandteile, die Biliproteine, auf und können analysiert werden (Füglister *et al.* 1981, Glazer 1988).

Die Phycobiliproteine lassen sich aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften in vier Klassen einteilen:

Phycoerythrine (PE): $\lambda_{\max} = 560 - 575 \text{ nm}$

Phycoerythrocyanine (PEC): $\lambda_{\max} = 575 \text{ nm}$

Phycocyanine (PC): $\lambda_{\max} = 615 - 640 \text{ nm}$

Allophycocyanine (APC): $\lambda_{\max} = 650 - 655 \text{ nm}$

Diese Phycobiliproteine unterscheiden sich hauptsächlich durch die Art und Anzahl ihrer kovalent gebundenen Chromophore, wodurch ihre unterschiedlichen Absorptionseigenschaften zustande kommen. Sie sind sich jedoch in Struktur und Aufbau sehr ähnlich, was 3D-Strukturen aller vier Biliproteinklassen zeigen (Düring *et al.* 1990, Düring *et al.* 1991, Figner *et al.* 1992, Brejc *et al.* 1995). Auch die Aminosäuresequenzen zeigen deutliche Homologien (Apt *et al.* 1995, MacColl 1998).

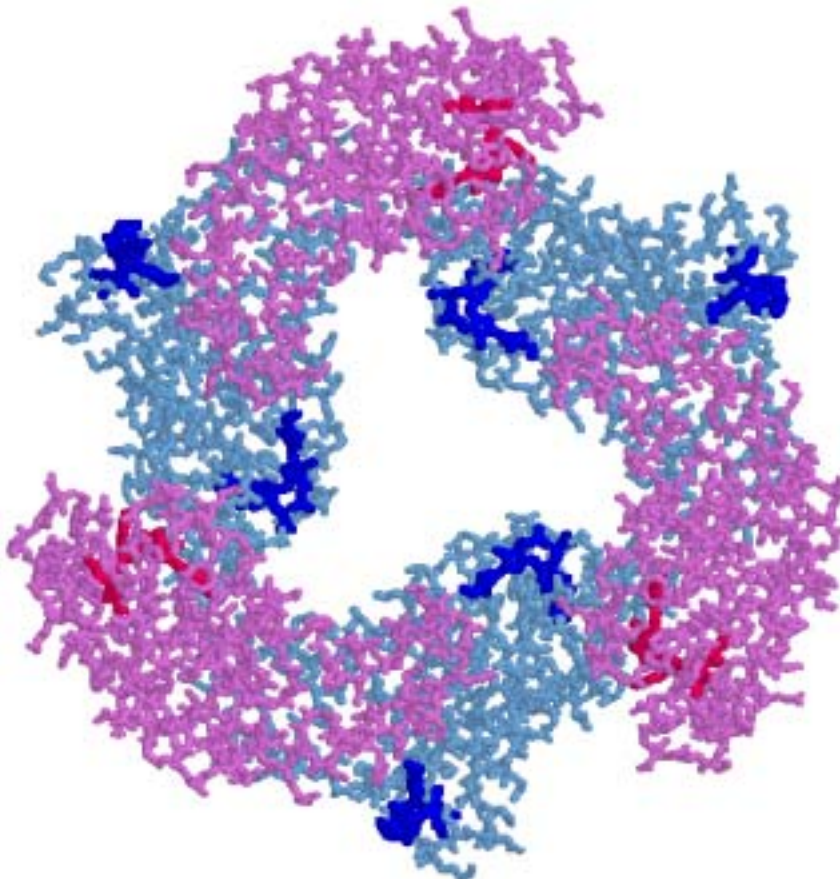


Abbildung 1-3:

Röntgenkristallstruktur des Phycoerythrocyanin-Trimers des PEC aus *Mastigocladus laminosus* (Düring *et al.* 1990). Die α -Untereinheiten sind rosa dargestellt, die β -Untereinheiten hellblau. Die kovalent gebundenen Chromophore sind rot (Phycoviolobilin) und dunkelblau (Phycocyanobilin) dargestellt.

Die Phycobiliproteine bestehen aus jeweils zwei Untereinheiten, α und β , die in äquimolaren Mengen auftreten (Glazer & Cohen-Bazire 1971) und Molekulargewichte zwischen 15000 und 20000 Da aufweisen. Die kleinere α -Untereinheit trägt in der Regel ein bis zwei Phycobiline als Chromophore, während die größere β -Untereinheit bis zu vier Phycobiline besitzen kann (Rüdiger 1994). Die beiden Untereinheiten lagern sich zunächst zu einem Monomer ($\alpha\beta$) zusammen. Aus drei Monomeren bildet sich ein ringförmiges Aggregat mit dreifacher Symmetrie, das Trimer ($\alpha\beta$)₃, das die kleinste Baueinheit der Phycobilisomen darstellt. Diese scheibenförmigen Trimere (Durchmesser 11 nm, Dicke 3 nm) besitzen ein zentrales 3 nm großes Loch und können unter Beteiligung der Linkerproteine zu Hexameren aggregieren, die schließlich die Phycobilisomen aufbauen. (Ficner & Huber 1993, Düring *et al.* 1991)

Die Chromophore der Biliproteine

Die Phycobiliproteine verdanken ihre Fähigkeit zur Lichtabsorption prosthetischen Gruppen, bei denen es sich um Gallenfarbstoffe handelt, die auch Phycobiline genannt werden. Dies sind offenkettige Tetrapyrrole, die über Thioetherbrücken kovalent an Cysteine der Biliproteine gebunden sind (Rüdiger 1971, Scheer 1981, Bishop *et al.* 1987).

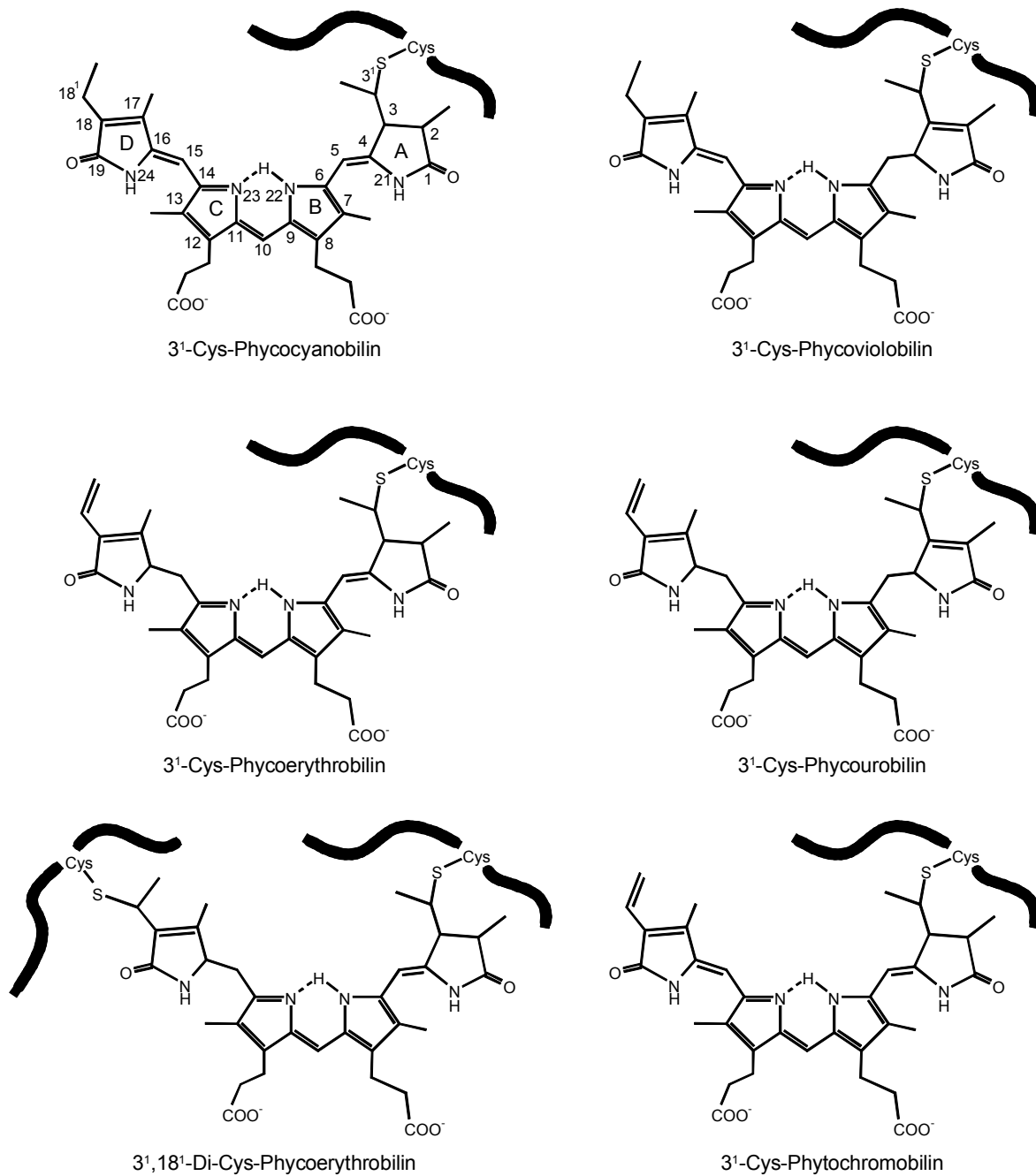
In Phycobiliproteinen von Cyanobakterien und Rotalgen wurden bislang vier verschiedene Biline gefunden, die sich durch Lage und Anzahl der Doppelbindungen unterscheiden und in der Tabelle 1-1 aufgelistet sind. In Abbildung 1-4 sind die dazugehörigen Strukturformeln der gebundenen Phycobiline dargestellt. Die Nomenklatur der Biline erfolgt nach Beale (Beale 1993) und Scheer (Scheer 2003).

Tabelle 1-1:

Phycobiline aus Cyanobakterien und Rotalgen

freies Phycobilin	gebundenes Phycobilin	konjugierte Doppelbindungen
Phycocyanobilin (PCB)	3 ¹ -Cys-Phycocyanobilin	8
Phycoerythrobilin (PEB)	3 ¹ -Cys-Phycoerythrobilin bzw. 3 ¹ ,18 ¹ -Di-Cys-Phycoerythrobilin	6
Phycoviolobilin* (PVB)	3 ¹ -Cys-Phycoviolobilin	7
Phycourobilin (PUB)	3 ¹ -Cys-Phycourobilin bzw. 3 ¹ ,18 ¹ -Di-Cys-Phycourobilin	5

*oder Phycobiliviolin (PXB) (Bishop *et al.* 1987)

**Abbildung 1-4:**

Struktur gebundener Chromophore der Phycobiliproteine und des Phytochroms, die gestreckte Konformation der gebundenen Phycobiline ist nur schematisch gezeigt. Der Proteinanteil ist als schwarzer Balken angedeutet. Die Nomenklatur erfolgt nach Scheer (Scheer 2003).

Die Chromophore sind am A-Ring an der Position 3¹ oder seltener doppelt mit dem A- und dem D-Ring an den Positionen 3¹ und 18¹ an Cysteine des Proteins gebunden (Nagy *et al.* 1985, Bishop *et al.* 1986, Bishop *et al.* 1987).

Die Biliproteine C-Phycocyanin¹ und Allophycocyanin haben ausschließlich PCB, das C-Phycoerythrin ausschließlich PEB als Chromophore gebunden. Andere Biliproteine, wie das Phycoerythrocyanin und die CU-Phycoerythrine tragen jedoch zwei verschiedene Chromophore, das Phycoerythrocyanin z.B. ein PVB an der α -Untereinheit und zwei PCB an der β -Untereinheit (Bishop *et al.* 1987). Der Chromophorgehalt verschiedener Biliproteine ist in Tabelle 1-2 dargestellt. Diese Tabelle zeigt zudem, daß die Cysteine in den Biliproteinuntereinheiten, die als Chromophorbinderstellen dienen, stark konserviert sind (MacColl 1998).

Tabelle 1-2:

Phycobilingehalt und Chromophorbinderstelle in diversen Biliproteinen

Biliprotein	Bindeungsstelle des Bilins*					
	α 75	α 84	α 140	β 50/60	β 84	β 155
Allophycocyanin		PCB			PCB	
C-Phycocyanin		PCB			PCB	PCB
Phycoerythrocyanin		PVB			PCB	PCB
R-Phycocyanin		PEB			PCB	PEB
Phycocyanin WH8501		PUB			PCB	PCB
C-Phycoerythrin		PEB	PEB	PEB	PEB	PEB
CU-Phycoerythrin ^a		PEB	PUB	PUB	PEB	PEB
CU-Phycoerythrin ^b	PUB	PEB	PEB	PUB	PEB	PEB

*(Ong & Glazer 1987, Frank *et al.* 1978, Füglistaller *et al.* 1983, Swanson *et al.* 1991, Sidler *et al.* 1981, Sidler *et al.* 1986)

^a *Synechococcus* sp. WH 8103 PE(I); ^b *Synechococcus* sp. WH 8020 PE(II)

Die Aufgabe der Biliproteine im Phycobilisom ist die Absorption von Sonnenlicht in Bereichen, in denen das Chlorophyll a des Reaktionszentrums schlecht absorbiert, und der Transfer der absorbierten Lichtenergie zu den Reaktionszentren. Die Biliproteine im Phycobilisom sind so beschaffen und aufeinander abgestimmt, dass Photonen über einen weiten Energiebereich absorbiert werden können. So können z.B. die Phycobilisomen von

¹ Der erste vorangestellte Buchstabe bei den Biliproteinen zeigt an, in welchen Organismen diese Proteine vorkommen; so steht das C für Cyanobakterien, das R für Rotalgen und das B für eine bestimmte Unterklasse der Rotalgen, den Bangiophycidae. Das als zweites vorangestellte U bei CU-Phycoerythrin zeigt an, dass neben dem Hauptchromophor PEB zusätzlich das PUB in diesen Biliproteinen vorkommt.

Rotalgen lückenlos in einem Bereich von 500 - 670 nm absorbieren (Canaani *et al.* 1980, Gantt *et al.* 1979, Scheer 1981).

Hauptsächlich verantwortlich für die Fähigkeit zur Lichtabsorption eines Biliproteins ist die chemische Struktur des Phycobilin-Chromophors. Daneben gibt es jedoch mehrere weitere Faktoren, welche einen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften der Chromophore im Biliprotein haben können.

Faktoren, welche die Absorptionseigenschaften der Biliproteine beeinflussen

I. Die chemische Struktur der Chromophore

Die Biline sind offenkettige Tetrapyrrole. Ein entscheidender Faktor für die Absorption von Licht ist die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen und somit die Größe des π -Elektronensystems (siehe Tabelle 1-1 und Abbildung 1-4).

Gut sind die Absorptionsunterschiede der verschiedenen Phycobiline aufgrund ihres unterschiedlich langen konjugierten Systems an denaturierten Biliproteinen zu erkennen. In Biliproteinen, die mit Harnstoff bei einem pH unter 3,0 denaturiert werden, hat das entfaltete Protein keinen Einfluss mehr auf die Absorption der Chromophore und somit ist nur noch die unterschiedliche Anzahl der konjugierten Doppelbindungen für die Absorption verantwortlich. So absorbieren denaturierte Biliproteine mit

3¹-Cys-Phycocyanobilin (8 konjugierte Doppelbindungen) bei 663 nm (Glazer & Fang 1973),
3¹-Cys-Phycoviolobilin (7 konjugierte Doppelbindungen) bei 594 nm (Zhao & Scheer 1995),
3¹-Cys-Phycoerythrobilin (6 konjugierte Doppelbindungen) bei 555 nm (Glazer 1975) und
3¹-Cys-Phycourobilin (5 konjugierte Doppelbindungen) bei 500 nm (Alberte *et al.* 1984).

II. Protonierung der Biline

Eine Protonierung der Bilinchromophore, wobei basische Stickstoffatome der Pyrrolringe protoniert werden, führt zu einer Rotverschiebung und Intensivierung des langwelligen Maximums (Falk 1989). Beispielsweise verschiebt sich das Maximum des Phycocyanobilins gelöst in MeOH durch Zugabe von 2 % HCl von 600 nm auf 690 nm und der Extinktionskoeffizient steigt dabei um den Faktor 3 (Brandlmeier *et al.* 1981, Gossauer & Hirsch 1974).

Ob eine Protonierung des Chromophors in nativen Biliproteinen eine Rolle spielt wird kontrovers diskutiert. (Siebert *et al.* 1990, Kikuchi *et al.* 1997, Stanek & Grubmayr 1998b, Foerstendorf *et al.* 2001). Stanek und Grubmayr beispielsweise halten eine Protonierung von PCB in Phycocyanin, bei der ein dem protonierbaren Stickstoff benachbarter Asparaginsäurerest des Proteins eine Rolle spielen könnte, für möglich (Stanek & Grubmayr 2000).

III. Einfache oder doppelte Bindung der Biline

Die Phycobiline sind stets am A-Ring an der Position 3¹ über eine Thioetherbrücke an ein Cystein gebunden. PEB und PUB können auch doppelt an zwei Cysteine gebunden vorkommen, dabei sind sie zusätzlich am D-Ring an der Position 18¹ gebunden (siehe Abbildung 1-4). So sind z.B. ein PEB in der β -Untereinheit des B-Phycoerythrin aus *Porphyridium cruentum* (Schoenleber *et al.* 1984) und ein PUB in der β -Untereinheit des R-Phycoerythrin aus *Gastroclonium coulteri* (Nagy *et al.* 1985) doppelt gebunden. Die Absorptionsspektren von Peptiden mit einfach und doppelt gebundenem PEB unterscheiden sich, so ist das langwellige Absorptionsmaximum des Peptids mit doppelt gebundenem PEB um 10 nm rotverschoben (Lundell *et al.* 1984). Dagegen gibt es keinen Unterschied in der Absorption von Peptiden mit einfach und doppelt gebundenem PUB (Klotz & Glazer 1985).

IV. Die Geometrie der Chromophore im Protein

Die freien Phycobiline weisen eine zyklisch-helikale Konformation auf (Scheer 1981). Diese freien Chromophore sind jedoch ungeeignet als Lichtsammler (Scheer 1982, Braslavsky *et al.* 1983, Falk 1989). Sie besitzen eine zu geringe Absorption im sichtbaren Bereich ($\epsilon \approx 2 \times 10^4$), sind chemisch und photochemisch sehr instabil, und ihnen ist ein effektiver Energietransfer aufgrund ihres sehr kurzlebigen angeregten Zustands ($\approx 10^{-12}$ s) nicht möglich (Scheer 1999).

Durch die Bindung des Chromophors an das Biliprotein ändern sich jedoch die Konformationen der Biline, und damit ihre Absorptionseigenschaften, drastisch. Zum einen wird das Bilin gestreckt in die Bindungstasche des Proteins eingelagert, was zu einem Anstieg der Absorption im sichtbaren Spektralbereich um mehr als das Fünffache führt ($\epsilon \approx 10^5$). Zum anderen wird die Beweglichkeit des Chromophors durch das Protein so weit eingeschränkt, dass Energie nicht mehr durch innere Konversion als Wärme abgegeben werden kann und sich somit die Lebenszeit des angeregten Zustands stark erhöht ($\approx 2 \times 10^{-9}$ s) (Scheer & Kufer 1977, Scheer 1982, Scheer 2003). In isolierten Biliproteinuntereinheiten zeigt sich die eingeschränkte Beweglichkeit der Chromophore anhand der starken Fluoreszenz (Scheer 1999).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Absorption der Biline im nativen Phycobiliprotein beeinflusst, ist die Torsion von Methinbrücken zwischen den Pyrrolringen, wenn sie ein Teil des absorbierenden π -Elektronensystems sind. Eine Methinbrücke besteht formal aus einer Doppel- und einer Einfachbindung. Diesen beiden Bindungen entsprechen in der Molekülorbitalbeschreibung Zwischenformen, die im Extremfall gleich sind. Kommt es an einer solchen formalen Einfachbindung, die sich in einem konjugierten Systems befindet, zu einer Torsion, so bewirkt dies eine graduelle Verschiebung der Absorptionsbanden. Die Verschiebung ist in der Regel hypsochrom, bei kleinem Torsionswinkel ($\theta < 30^\circ$) kann sie jedoch auch bathochrom sein. Bei einem Torsionswinkel von 90° kommt es zu einer vollständigen Entkopplung der beiden Subchromophore (Falk 1989). Diese Absorptionsverschiebung ist in Abbildung 1-5 links dargestellt.

Veranschaulicht wird diese Verschiebung der Absorption von Falk anhand des Aetiobiliverdin-IV γ (Abbildung 1-5 rechts), ein Bilin mit 8 konjugierten Doppelbindungen, das in Chloroform ein Absorptionsmaximum von 624 nm hat. Wird das Molekül chemisch so modifiziert, dass es zu einer 90° Torsion an der C5-Methinbrücke kommt, so verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 528 nm, bei einer Torsion an der C10-Methinbrücke kommt es zu einer Blauverschiebung des Maximums auf 403 nm (Falk 1989).

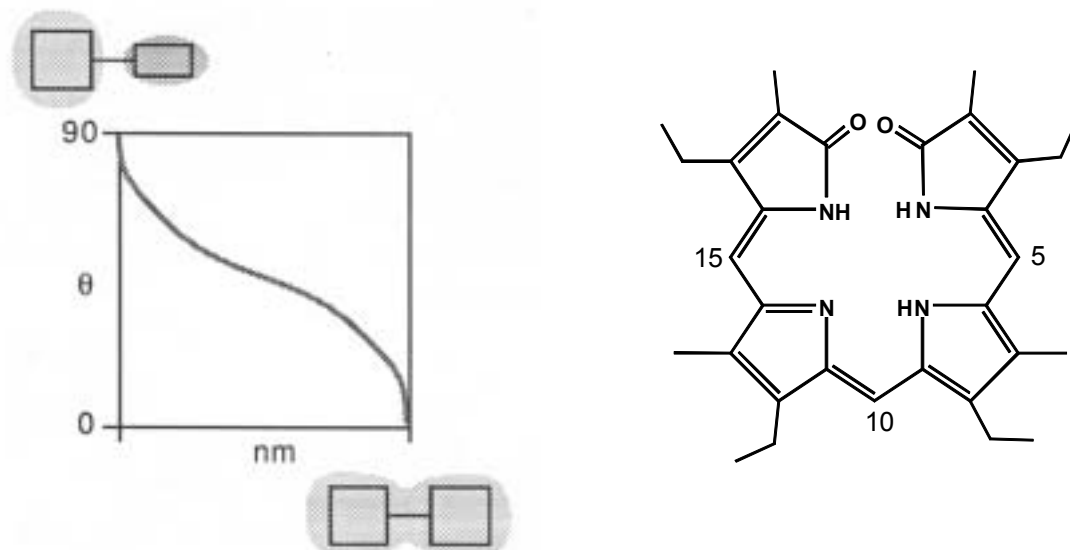


Abbildung 1-5:

links: Abhängigkeit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums eines Chromophors vom Torsionswinkel θ (in Grad) an einer am π -Elektronensystem beteiligten Methinbrücke (nach Falk 1989).

rechts: Strukturformel des Aetiobiliverdin-IV γ .

Auch die Diastereomere, d.h. die Z- und E-Isomere an den Methinbrücken oder an konjugierten peripheren Doppelbindungen, können unterschiedliche Absorption zeigen, allerdings ist der Effekt in der Regel gering. Größere Unterschiede in der Absorption der Isomere entstehen nur dann, wenn sich dabei die Form des π -Elektronensystems und/oder

wenn sich die Torsionswinkel im Chromophor deutlich ändern (Falk 1989). So führt bei den β -Cys155-PCB-Chromophoren von Phycocyanin und Phycoerythrocyanin aus *Mastigocladus laminosus* die zu den anderen PCB-Chromophoren dieser Biliproteine verschiedene Konformation und Torsion an der C15-Methinbrücke zu einer deutlichen kurzwelligen Verschiebung des Absorptionsmaximum (Schirmer *et al.* 1985, Schmidt *et al.* 1987, Fischer *et al.* 1988, Dürring *et al.* 1990, Parbel *et al.* 1997).

V. Interaktion des Bilins mit der Proteinumgebung

Das Protein hat nicht nur Einfluss auf die Geometrie des Chromophors, sondern es kann auch durch geladene Aminosäurereste die Form des absorbierenden π -Elektronensystems und somit auch die Absorptionseigenschaften des Chromophors verändern. Ein Beispiel für Chromophore, die sich aufgrund einer unterschiedlichen Proteinumgebung in ihrer Anregungsenergie, also Absorption, unterscheiden, sind die 545- und 566-nm Form des Phycoerythrobilins (MacColl *et al.* 1992, MacColl 1998).

VI. Aggregation der Biliproteinuntereinheiten

Die Aggregation der Biliproteinuntereinheiten zu Monomeren, Trimeren und schließlich Hexameren beeinflusst ebenfalls in erheblichem Ausmaß die Absorptionseigenschaften der Biliproteine. So haben die Monomere und Trimere von C-Phycocyanin und insbesondere Allophycocyanin zum Teil deutlich unterschiedliche Absorptions- und Fluoreszenzspektren.

Tabelle 1-3:

Absorptionsmaxima von Biliproteinen in verschiedenen Aggregationszuständen (nach MacColl 1998).

Protein	Aggregation	λ_{\max} (nm)
Allophycocyanin	Monomer ($\alpha\beta$)	614
	Trimer ($\alpha\beta$) ₃	650
	Trimer ($\alpha\beta$) ₃ + 8,9-kDa-Linker ^a	652
Allophycocyanin B	α -Untereinheit ^c	645
	β -Untereinheit ^c	617
	Trimer ($\alpha\beta$) ₃ ^c	670
C-Phycocyanin	Monomer ($\alpha\beta$)	614
	Trimer ($\alpha\beta$) ₃	621
	Trimer ($\alpha\beta$) ₃ + 27-kDa-Linker ^b	638
	Trimer ($\alpha\beta$) ₃ + 32,5-kDa-Linker ^b	629

^a (Füglister *et al.* 1987)

^b (Yu *et al.* 1981)

^c (Lundell & Glazer 1981)

VII. Benachbartes Bilin in Aggregaten

Bei der Aggregation von Biliproteinen können sich zwei Biline (z.B. α -84/ β -84) sehr nahe kommen. So könnte es zwischen den beiden benachbarten Bilinen zu einer mäßig starken excitonischen Kopplung, also zu einer elektronischen Wechselwirkung der angeregten aromatischen Ringsysteme kommen, was zu einer Aufspaltung der entsprechenden Energieniveaus der beiden Biline führt. Dies hätte nicht nur spektrale Auswirkungen sondern könnte auch einen Effekt auf die Lichtsammlung und Energieübertragung ausüben. Eine excitonische Kopplung wird bei Phycocyanin-Trimeren (Debreczeny *et al.* 1995, Pizarro & Sauer 2001) und Allophycocyanin-Trimeren für möglich gehalten (Edington *et al.* 1995, Edington *et al.* 1996).

VIII. Einfluss der Linker

Schließlich stellen noch die Linker einen Faktor dar, der die Absorption von Biliproteinen beeinflussen kann. Biliproteine und Biliproteinkomplexe mit und ohne Linker wurden sehr gut untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Linker, neben ihren strukturbildenden und stabilisierenden Aufgaben in den Phycobilisomen, auch wenn sie in der Regel keine Chromophore tragen, Einfluss auf die Absorption und Fluoreszenz haben (Reuter & Nickel-Reuter 1993, Yu *et al.* 1981, Gottschalk *et al.* 1991, Schneider *et al.* 1995, Pizarro & Sauer 2001). In Tabelle 1-3 sind Absorptionsänderungen durch Linker für Allophycocyanin- und C-Phycocyanin-Trimere dargestellt. Es wurde auch festgestellt, dass Biliproteine mit Linkern zu schnellerem Energietransfer in der Lage sind (Wendler *et al.* 1986).

Diese acht Faktoren zeigen, dass die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Biliproteine qualitativ (Lage der Absorptionsmaxima) und quantitativ (Extinktionskoeffizienten) in weiten Bereichen ausgezeichnet modifiziert werden können. Somit sind die nativen Chromophore und damit die Biliproteine ideal für Lichtsammlung und Energietransfer. Damit die Biline in den Biliproteinen diese guten Absorptionseigenschaften zeigen, ist jedoch viel Protein pro Chromophor nötig. So beträgt das Verhältnis von Protein zu Chromophor in den Biliproteinen ca. 20, in den Antennen höherer Pflanzen dagegen nur 3 (Scheer 1999). Daher ist für den Aufbau der Phycobilisomen deutlich mehr Energie notwendig als für den Aufbau von Lichtsammelkomplexen in höheren Pflanzen.

1.4 Energietransfer im Phycobilisom

Die Lichtenergie wird in den Phycobilisomen von außen nach innen wahrscheinlich strahlungslos durch den Förster-Mechanismus übertragen (Scheer 1986, Suter & Holzwarth 1987, Glazer 1989). Dieser Mechanismus beruht auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor- und Akzeptor-Chromophor und ermöglicht bei einer optimalen Ausrichtung der Chromophore zueinander einen effektiven Energietransfer über Entfernungen von bis zu 100 Å pro Transferschritt (Förster 1967). Für den Energietransfer ist also neben den Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften auch die richtige Ausrichtung der Chromophore im Biliprotein entscheidend. Dafür müssen die Chromophore an ihrer Bindungsstelle „stereochemisch korrekt“ gebunden sein (Fairchild & Glazer 1994c, Fairchild *et al.* 1992b). Praktisch zeigte sich im Fall des sehr gut untersuchten PC, dass alle wichtigen Parameter des Förster-Transfers, d.h. Abstand, Geometrie und Überlappungsintegral, für jedes Chromophorpaar unterschiedliche Beiträge zur Optimierung leisten.

1.5 Chromophorbindung der Biliproteine

Pro Biliproteinuntereinheit werden bis zu zwei verschiedene Biline an bis zu vier Bindungsstellen kovalent an Cysteine gebunden (Swanson *et al.* 1991, MacColl 1998). Über die Mechanismen dieser regio- und stereospezifischen Chromophorbindung an die Apoproteine ist noch wenig bekannt (Schluchter & Glazer 1999). Beim C-Phycocyanin aus *Synechococcus* sp. PCC 7002, das als erstes Phycobiliprotein hinsichtlich der Chromophorbindung untersucht wurde (Arciero *et al.* 1988a), bindet PCB autokatalytisch an die Bindungsstellen α -84 und β -84. Das dritte PCB allerdings, das *in vivo* eine andere Stereochemie aufweist (Schirmer *et al.* 1985), wird *in vitro* nicht autokatalytisch an β -155 gebunden. Jedoch auch die Bindung an α -84 und β -84 ist unspezifisch, denn zum Teil wird das PCB zu Mesobiliverdin oxidiert (Arciero *et al.* 1988b).

Eine korrekte Bindung von PCB an die α -84-Bindungsstelle von C-Phycocyanin wurde mit Hilfe einer Lyase, die von den Genen *cpcE* und *cpcF* codiert wird, erreicht. Diese Lyase bewirkt eine stereochemisch korrekte Bindung und verhindert eine Oxidation des PCB während der Bindung (Fairchild *et al.* 1992, Swanson *et al.* 1992, Fairchild & Glazer 1994a). Diese Lyase scheint spezifisch für den α -84 Chromophor des PC zu sein. In Mutanten, in denen die Gene für CpcE oder CpcF ausgeschaltet wurden, findet man PC, dem nur der α -84-Chromophor fehlt. Alle anderen Chromophorbindungsstellen der Biliproteine sind nicht betroffen (Fairchild *et al.* 1992).

Die Gene für die Lyase, die aus den zwei verschiedenen Proteinuntereinheiten CpcE und CpcF besteht (Fairchild *et al.* 1992, Swanson *et al.* 1992, Zhou *et al.* 1992), befinden sich auf dem cpc-Operon, auf dem sich auch die Gene für die beiden Biliprotein-Untereinheiten des C-Phycocyanins (*cpcA*, *cpcB*) und für Linker (*cpcC*, *cpcD*, *cpcG*) befinden (Bryant, Sidler 1994) (siehe Abbildung 1-6).

Homologe Gene, die ebenfalls für Lyasen codieren könnten, gibt es in anderen Biliprotein-Operons (Kufer *et al.* 1991, Jung *et al.* 1995) aber auch in andere Genregionen von Cyanobakterien (Kahn *et al.* 1997, Schluchter & Glazer 1999). In *Mastigocladus laminosus* z.B. wurden homologe Gene nur für zwei verschiedene Lyasen gefunden, *cpcE/cpcF* und *pecE/pecF*. Geht man davon aus, dass die Lyasen nur für eine Bindungsstelle spezifisch sind, so reicht dies für die 11 verschiedenen Chromophorbindingstellen in Biliproteinen, selbst wenn einige Chromophore autokatalytisch gebunden werden, bei weitem nicht aus. Es müssen demnach Lyasen existieren, die keine Homologien zu den bekannten Lyasen zeigen. Selbst die bekannten Lyasen sind kaum untersucht. Es ist so gut wie nichts über die Mechanismen der Chromophorbinding bekannt, die von den Lyasen katalysiert werden.

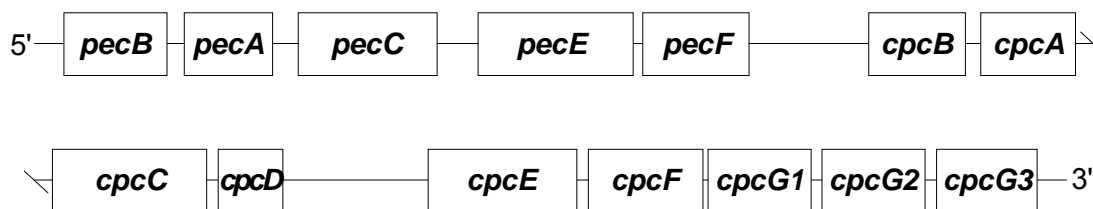


Abbildung 1-6:

pec/cpc-Operon des Cyanobakteriums *Mastigocladus laminosus* (nach Sidler 1994)

1.6 Komplementäre chromatische Adaptation (CCA)

Manche Cyanobakterien sind fähig, sich an unterschiedliche Lichtverhältnisse anzupassen, indem sie die Zusammensetzung ihrer Phycobilisomen verändern. Organismen, die zu dieser komplementären chromatischen Adaptation (CCA) in der Lage sind, bilden z.B. im Rotlicht überwiegend die blauen Phycocyanine. Im Grünlicht dagegen, z.B. unter Wasser oder unter einem Blätterdach, bilden sie vermehrt die roten Phycoerythrine oder das purpurfarbene Phycoerythrocyanin (Füglistaller *et al.* 1981, Parbel 1997). Gut untersucht ist die CCA bei *Fremyella diplosiphon* (= *Calothrix* sp. PCC 7601) (Vogelmann & Scheibe 1978, Grossman *et al.* 1988, Grossman & Kehoe 1997, Scheer 1999).

Während der CCA wird nicht nur die Synthese von Phycocyanin und Phycoerythrin bzw. Phycoerythrocyanin reguliert, sondern auch die Linkersynthese wird z.T. massiv beeinflusst. Man nimmt sogar an, dass den Linkern eine Schlüsselrolle bei der CCA zukommt, da für die Assemblierung von rotlicht- bzw. grünlichtadaptierten Phycobilisomen von *Fremyella diplosiphon* ein unterschiedlicher Satz an spezifischen Linkern notwendig ist (Tandeau de Marsac 1977, MacColl 1998).

Für die CCA sind Lichtrezeptoren notwendig, welche die Lichtveränderungen registrieren. Über diese Rezeptoren, die man Phycochrome genannt hat, ist bis heute noch wenig bekannt. Man kennt lediglich die Aktionsspektren, die solche Rezeptoren haben müssten. So liegen die Extrema des Aktionsspektrums für *Fremyella diplosiphon* bei 540 nm und 650 nm (Vogelmann & Scheibe 1978, Hughes & Lamparter 1999). Bis heute konnte ein solcher Rezeptor nicht isoliert werden. Im Rahmen der Suche wurde ein photoreversibles Chromoprotein gefunden (Kufer & Björn 1989, Björn 1979), das als Phycochrom b bezeichnet wurde. Allerdings stellte sich heraus, dass es sich dabei wohl nicht um ein Phycochrom, also um einen sensorischen Lichtrezeptor, handelt, denn die Differenzmaxima dieses Chromoproteins bei 500 nm und 570 nm stimmen nicht mit dem Aktionsspektrum der CCA von *Fremyella diplosiphon* oder anderen Cyanobakterien überein (Björn & Björn 1980, Hughes & Lamparter 1999). Es stellte sich vielmehr heraus, dass es sich bei diesem Phycochrom b, das eine ausgeprägte reversible Photochemie zeigt und nur in phycoerythrocyaninhaltenen Blaualgen gefunden wurde, um die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins (α -PEC) handelt (Björn & Björn 1980, Maruthi Sai *et al.* 1992). Obwohl die physiologische Bedeutung dieser ausgeprägten Photochemie des α -PEC nicht bekannt ist (Zhao *et al.* 1993), ist dieses Biliprotein ein interessantes Untersuchungsobjekt, um z.B. einen Einblick in die Mechanismen der Photochemie eines Chromoproteins zu erhalten (Zhao *et al.* 1993).

1.7 Die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins

Phycoerythrocyanin (PEC) kommt in einigen Cyanobakterien anstelle von Phycoerythrin vor (Bryant 1982, MacColl 1998). Es wurde erstmals 1976 von Bryant *et al.* für das Cyanobakterium *Anabaena variabilis* beschrieben (Bryant *et al.* 1976). 1981 konnte es auch aus *Mastigocladus laminosus* isoliert werden (Füglister *et al.* 1981, Nies & Wehrmeyer 1981). Die 3D-Struktur des purpurfarbenen PEC aus *Mastigocladus laminosus* ist bekannt und weist den typischen trimeren Aufbau der Phycobiliproteine auf (Düring *et al.* 1990) (siehe Abbildung 1-3). Die rosafarbene α -Untereinheit trägt einen PVB-Chromophor am Cystein α -84, die blaue β -Untereinheit besitzt zwei PCB-Chromophore an Cystein β -84 und Cystein β -155. Die beiden Untereinheiten können durch Gelfiltration in 63 mM Ameisensäure

(Füglister *et al.* 1981) oder durch isoelektrische Fokussierung voneinander getrennt werden (Schmidt *et al.* 1988, Zhao & Scheer 1995).

Die isolierte α -Untereinheit ist ein globuläres, 18 kDa großes, aus 8 α -Helices bestehendes Chromoprotein, das zu einer ausgeprägten reversiblen Photochemie fähig ist (Schirmer *et al.* 1985, Siebzehnrübl *et al.* 1989, Düring *et al.* 1990, Zhao & Scheer 1995).

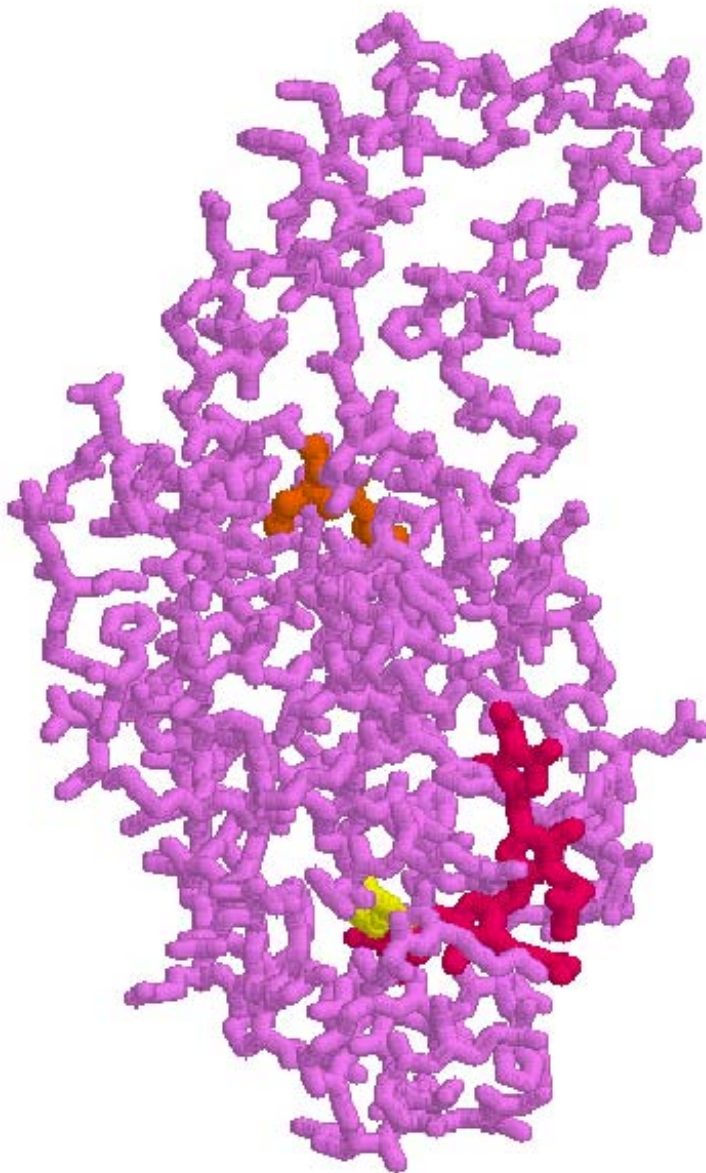


Abbildung 1-7:

Röntgenkristallstruktur der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins (α -PEC) mit einer Auflösung von 2,7 Å (Düring *et al.* 1990). Das α -PEC (rosa) hat am Cystein α -84 (gelb) als Chromophor ein Phycoviolobilin (rot) kovalent gebunden. Das α -PEC ist zu einer reversiblen Photochemie fähig, die durch die Cysteine α -98 und α -99 (orange) moduliert werden kann (siehe Abbildung 1-9).

Die Photochemie des α -PEC

Im Gegensatz zu allen anderen an der Photosynthese beteiligten Phycobiliproteinen, welche im nativen Zustand nach Lichtanregung fluoreszieren, zeigt PEC neben der Fluoreszenz eine reversible, mechanistisch dem Phytochrom vergleichbare Photoreaktion (Siebzehrübl *et al.* 1989, Kufer & Björn 1989). Es existieren also mindestens zwei ineinander umwandelbare Formen des α -PEC, die sich in ihrer Absorption und auch in ihrer Proteinkonformation voneinander unterscheiden. Die Photochemie beruht hauptsächlich auf einer *Z/E*-Isomerisierung der $\Delta^{15,16}$ Doppelbindung (Zhao *et al.* 1995) des PVB-Chromophors der α -Untereinheit (Abbildung 1-8). Die *Z*-Form weist ein Absorptionsmaximum bei 566 nm auf und kann durch Belichtung mit gelbgrünem (570 nm) Licht in die bei $\lambda_{\max} = 507$ nm absorbierende *E*-Form überführt werden. Durch Belichtung mit blaugrünem (500 nm) Licht ist diese Photochemie vollständig reversibel.

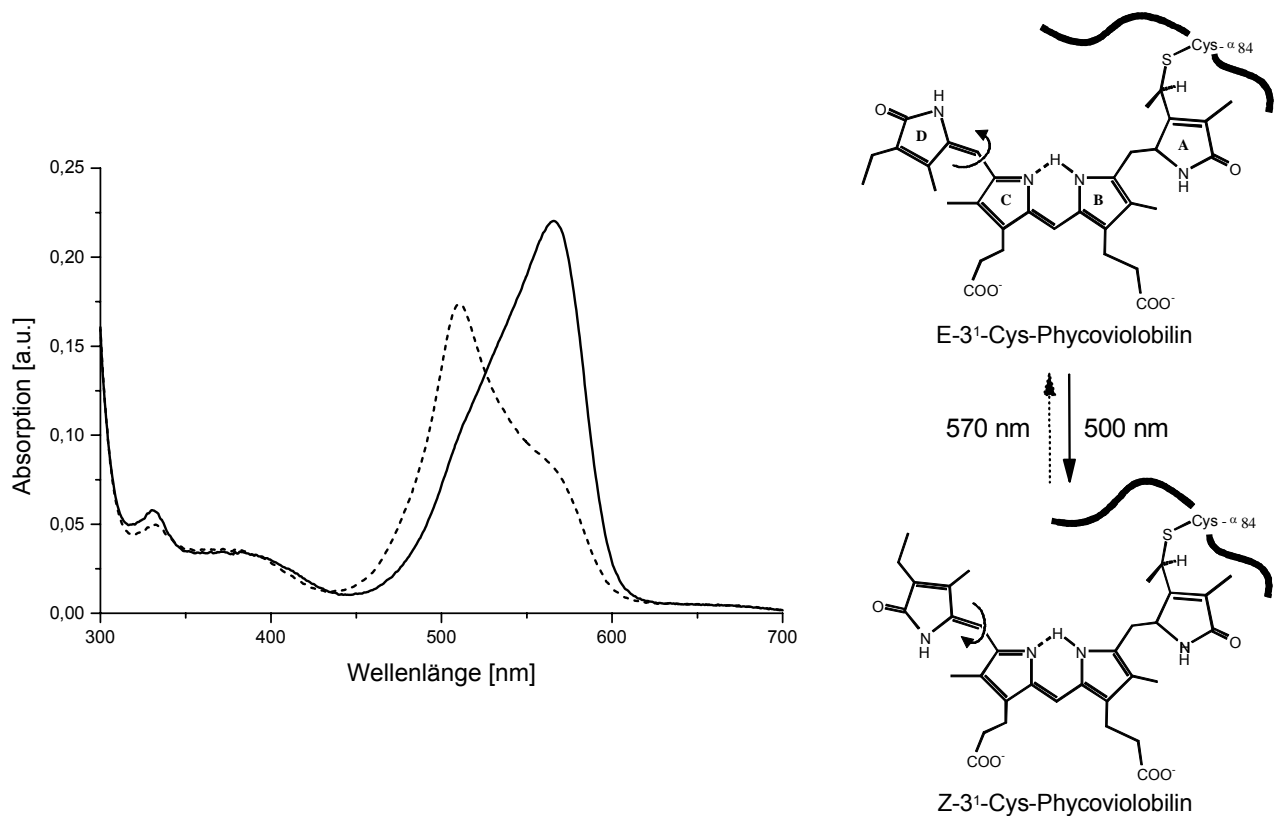


Abbildung 1-8:

Links: Die reversible Photochemie (Typ I) des α -PEC; Absorptionsspektren nach Belichtung mit 500 nm (—) und anschließender Belichtung mit 570 nm (-----).

Rechts: Strukturformeln der beiden $\Delta^{15,16}$ -Isomere des 3¹-Cys-Phycoviolobilins

Zusätzlich wird die Photochemie des Chromophors durch den Redoxzustand von zwei 17 Å entfernten Cysteinen 98 und 99 moduliert (Zhao & Scheer 1995, Zhao *et al.* 1995). Für die α -Untereinheit existieren demnach vier Zustände, die zum einen von der Konfiguration (Z- oder E-Konfiguration) des Chromophors und zum anderen vom Redoxzustand der SH-Gruppen an Cys-98 und Cys-99 abhängen. Der Redoxzustand legt dabei den Typ der Photochemie fest. So handelt es sich bei reduzierten SH-Gruppen um den beschriebenen Typ I und bei oxidierten SH-Gruppen um den Typ II (Abbildung 1-9).

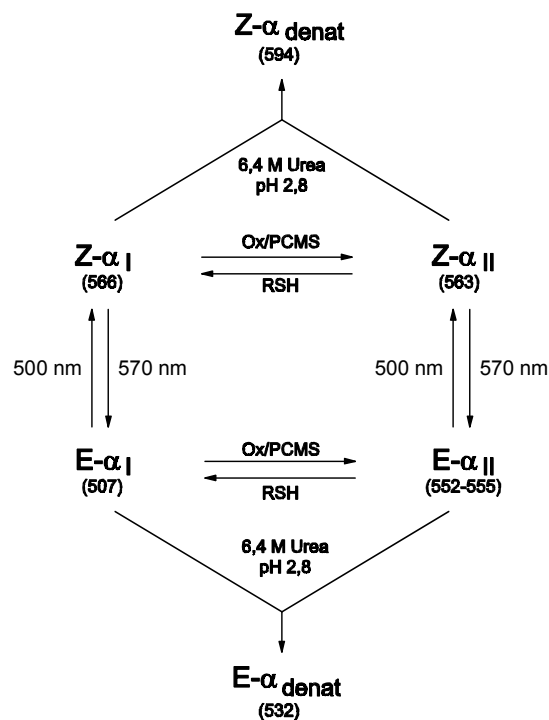


Abbildung 1-9:

Die vier stabilen Zustände des α -PEC, die sich paarweise durch Photoisomerisierung des Chromophors und durch Modifikation von Cys- α -98 und Cys- α -99 unterscheiden, sowie deren denaturierte Zustände (nach Zhao & Scheer 1995).

Die ausgeprägte Photochemie des α -PEC erinnert an die Photochemie des pflanzlichen Lichtrezeptors Phytochrom. Im Gegensatz zum Phytochrom ist die physiologische Funktion der reversiblen Photoreaktion des α -PEC noch weitgehend ungeklärt. Eine solche Funktion konnte bis heute nicht nachgewiesen werden, ist aber auch nicht ganz auszuschließen. Möglicherweise dient das PEC als Photorezeptor, der z.B. Einfluss auf die Aggregation der Phycobilisomen hat (Braune *et al.* 1988, Siebzehnrübl *et al.* 1989). Über die molekularen Mechanismen, die während der Photochemie des α -PEC zu der deutlichen Absorptionsänderung führen, ist, ähnlich wie auch beim Phytochrom, noch sehr wenig bekannt. Das α -PEC ist jedoch leichter zu untersuchen als das Phytochrom, denn es existiert eine Röntgenstruktur und das Protein ist wesentlich kleiner als das Phytochrom. Möglicherweise kann das α -PEC als Modell dienen, um die Photochemie des Phytochroms zu verstehen.

1.8 Das Phytochrom

Die Entwicklung und das Wachstum von Pflanzen sind stark von den Lichtverhältnissen ihres Habitats abhängig. Pflanzen besitzen mehrere Photorezeptorsysteme, die Richtung, Intensität, Einstrahlungsdauer und spektrale Zusammensetzung des einfallenden Lichts registrieren können. Die am besten untersuchten pflanzlichen Rezeptoren sind die Phytochrome, bei denen es sich um Phycobiliproteine handelt (Reviews: Rüdiger & Thümmler 1991, Gärtner 1997, Quail 2002). Phytochrome kommen nicht nur in grünen Pflanzen vor, sondern wurden in den letzten Jahren auch in Cyanobakterien (Hughes *et al.* 1997) und sogar in nicht photosynthetischen Bakterien gefunden (Davis *et al.* 1999).

Die Struktur des Phytochroms

Pflanzliche Phytochrome, welche im Cytosol lokalisiert sind, sind Homodimere aus zwei Polypeptiden von jeweils ca. 125 kDa. Ein Strukturmodell für das Phytochrom, von dem keine Röntgenkristallstruktur existiert, gründet sich auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Röntgenbeugungsexperimenten und lässt eine ausgeprägte Domänenstruktur erkennen (Jones & Erickson 1989, Tokutomi *et al.* 1989). Das Phytochromdimer hat eine Y-förmige Struktur, bei der die beiden N-terminalen chromophor-tragenden Domänen, die den kovalent gebundenen Chromophor Phytochromobilin tragen, die beiden freien Äste des Y bilden. Die beiden Untereinheiten lagern sich an der C-terminalen chromophorfreien Domäne zusammen und bilden den „Stamm“. Die N-terminale chromophortragende (N) und die C-terminale chromophorfreie Domäne (C) werden durch die Scharnier(=hinge)-Region (H) verknüpft. Diese liegt wahrscheinlich exponiert an der Proteinoberfläche, da sie besonders empfindlich für Angriffe durch Endopeptidasen ist (Gärtner 1997).

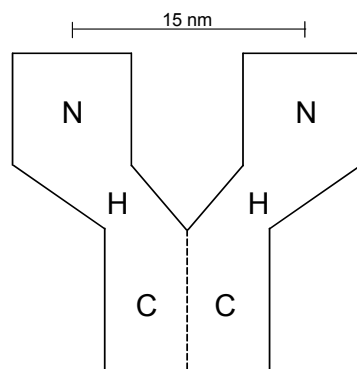


Abbildung 1-10:

Modell der dreidimensionalen Struktur von Phytochrom, erhalten aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen (nach Jones & Erickson 1989).

Die Funktion des Phytochroms

Durch das Phytochromsystem werden eine Vielzahl von unterschiedlichen Photomorphogenesen, wie z.B. die Samenkeimung, die Chloroplastenentwicklung und die Blütenbildung gesteuert (Schopfer & Brennicke 1999). In höheren Pflanzen gibt es verschiedene Phytochrome, die unterschiedlich stark in verschiedene Prozesse eingreifen. In *Arabidopsis thaliana* wurden 5 Phytochrome gefunden (Phytochrom A - E, Furuya 1993), die sich in ihrer Aminosäuresequenz, Stabilität und Konzentration in der Zelle unterscheiden und vermutlich verschiedene Reaktionen steuern (Quail 1994).

Die Funktion der Phytochrome als Lichtrezeptoren begründet sich auf einer reversiblen Photochemie. Die zwei ineinander umwandelbare Formen des Phytochroms unterscheiden sich nicht nur in ihrer Absorption, sondern als Folge der Photoreaktion auch in ihrer Proteinkonformation voneinander. Die eine Form, das P_r absorbiert rotes Licht um 660 nm, während die andere Form, das P_{fr} dunkelrotes (far-red) Licht bei etwa 730 nm absorbiert (Briggs & Rice 1972, Rüdiger & Thümmler 1991). Da sich die Absorptionsspektren überlappen, stellt sich bei Belichtung ein Photogleichgewicht zwischen den beiden Formen ein, dessen Lage von der spektralen Zusammensetzung des einfallenden Lichts abhängig ist. Gemäß diesem Photogleichgewicht kommt es zu unterschiedlichen physiologischen Antworten.

Das einfachste Modell zur Phytochromaktivität sieht die *de-novo*-Synthese des Phytochroms in seiner biologisch inaktiven P_r -Form in Dunkelheit vor. Durch Belichtung wird die P_r -Form in die biologisch aktive P_{fr} -Form umgewandelt (Furuya 1993). Das P_{fr} wird in den Zellkern translociert, bindet dort Transkriptionsfaktoren und aktiviert dadurch spezifische Gene. Daneben steuert P_{fr} auch über wenig bekannte Signalketten auf höherer Ebene physiologische Abläufe in der Pflanze, wie z.B. die Blatt- und Chloroplastenbewegung (Yatsunami & Kobayashi 1993, Gärtner 1997, Smith 2000). In Phytochrom A aus Hafer z.B. wurde eine Proteinkinaseaktivität nachgewiesen. Möglicherweise sind Phytochrome als lichtregulierte Kinasen an Proteinkinase-Kaskaden beteiligt (Quail 2002).

Die Photochemie des Phytochroms

Der erste Schritt der Photochemie des Phytochroms, die Umwandlung der P_r in die P_{fr} -Form, ist eine Z/E-Isomerisierung an der C15-Methinbrücke des Phytochromobilins (Rüdiger *et al.* 1983, Thümmler *et al.* 1983, Andel *et al.* 2000). Darauf folgt eine Serie von Dunkelreaktionen über mehrere Intermediate (Rüdiger & Thümmler 1991, Iwakami *et al.* 1996, Jorissen *et al.* 2002a, Scurlock *et al.* 1993), die schließlich zu einer Rotverschiebung

des Absorptionsmaximums um ca. 70 nm zu und einer Konformationsänderung des Proteins führt (Singh *et al.* 1989, Singh & Song 1990).

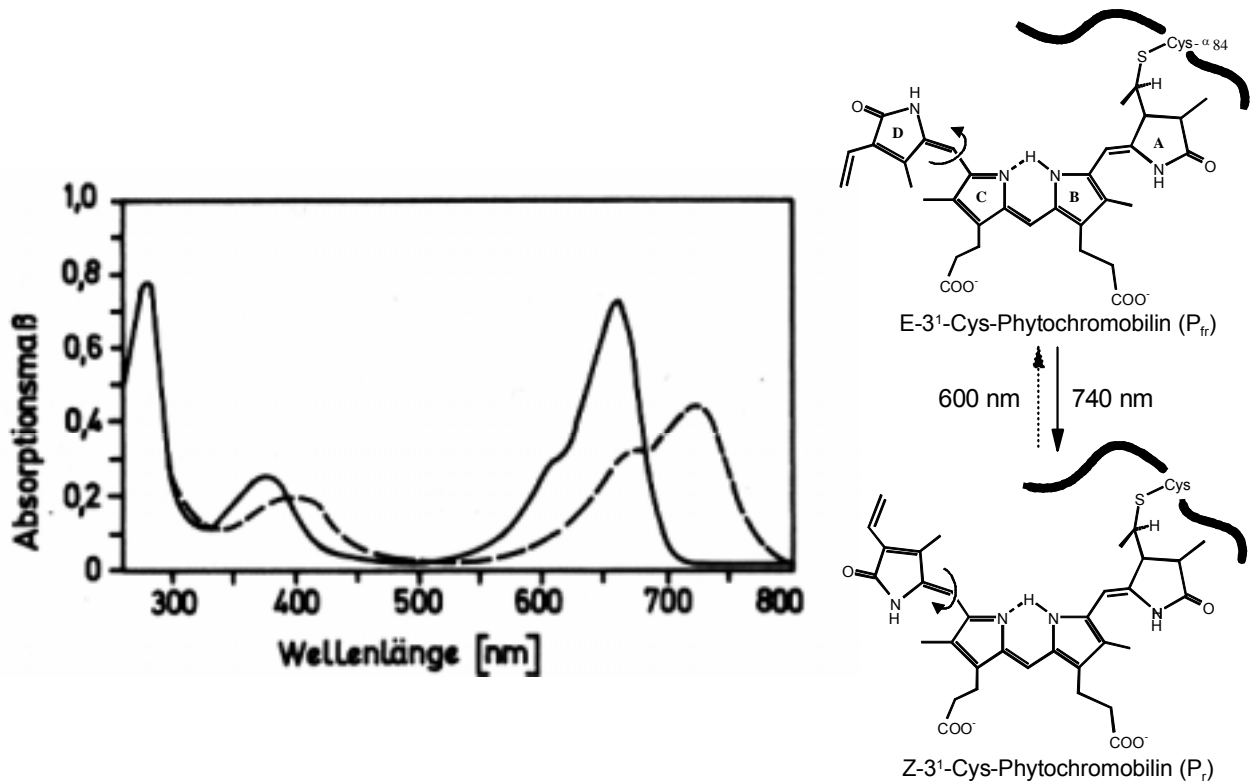


Abbildung 1-11:

Links: Die reversible Photochemie von Haferphytochrom; Absorptionsspektren nach Belichtung mit 600 nm (—) und anschließender Belichtung mit 740 nm (-----).

Rechts: Strukturformeln der beiden $\Delta^{15,16}$ -Isomere des 3¹-Cys-Phytochromobilins

Die Abläufe auf molekularer Ebene, die zu der deutlichen Verschiebung der Absorption während der Isomerisierung des Chromophors führen, werden kontrovers diskutiert. Unter anderem wurde vorgeschlagen, dass es während der Photochemie zu einer Deprotonierung des Chromophors (Mizutani *et al.* 1994, Andel *et al.* 1996, Kneip *et al.* 1999) oder zur Ausbildung eines Iminoethers am Ring A kommt (Stanek & Grubmayr 1998a, Stanek & Grubmayr 1998b).

1.9 Aufgabenstellung

Obwohl sich die Wissenschaft seit mehr als eineinhalb Jahrhunderten mit den pflanzlichen Biliproteinen beschäftigt, ist noch wenig über die molekularen Mechanismen der regio- und stereospezifischen Chromophorbindung bei den Phycobiliproteinen und der reversiblen Photochemie bei den Phytochromen bekannt. Ein ideales Untersuchungsobjekt stellt das α -PEC dar um diesen beiden Aspekten nachzugehen, nimmt es doch als photochemisch aktives Phycobiliprotein eine Zwitterstellung zwischen Phycobiliproteinen und Phytochromen ein.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Rekonstitutionssystem für das α -PEC zu etablieren, mit dessen Hilfe das durch Expression in *Escherichia coli* erhaltene Apoprotein mit verschiedenen Chromophoren rekonstituiert werden konnte. Ein geeignetes Mutagenesystem für das Apoprotein sollte daneben Rekonstitutionen mit modifizierten Apoproteinen ermöglichen.

Anhand der verschiedenen Rekonstitutionen sollte die Chromophorbindung des α -PEC untersucht werden. Das α -PEC besitzt mit dem Phycoviolobilin einen seltenen Chromophor, der nie als freies Bilin gefunden wurde. Interessant waren daher auch die Fragen, wann, wie und woraus dieser Chromophor entsteht. In Zusammenarbeit mit Prof. Kai-Hong Zhao und seinen Mitarbeitern (College of Life Sciences and Technology Wuhan, China) sollte dabei getestet werden, ob Enzyme an der Chromophorbindung beteiligt sind, ähnlich der PCB-PC-Lyase bei der Chromophorbindung von α -PC.

Daneben sollte anhand spektroskopischer Untersuchungen der verschiedenen Rekonstitutionsprodukte die Chromophor- und Proteindynamik während der Photochemie des α -PEC studiert werden. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob das α -PEC als gut charakterisiertes Modellprotein für das Phytochrom und seine Photochemie dienen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Zentrifugation

Kühlzentrifuge:	Centricon H-401 (Kontron, Eching) Rotor: F9S (Piramoone, Santa Clara, CA, USA)
Tischzentrifugen:	Sigma 3K18 C (B. Braun, Melsungen) Rotoren: 12154 12155 Biofuge fresco (Kendro, Hanau)

Elektrophorese

Elektrophoresekammer:	Mini-Protean II Dual-Slab Cell (Bio-Rad, München)
Spannungsquelle:	Constant Voltage Power Supply 1000/500 (Bio-Rad, München)

Dokumentation

Kamera Fluoreszenzgele:	CCD KP161 (Hitachi, Maidenhead, GB)
Kamera Proteingele:	Camedia C-1400XL (Olympus, Hamburg)

sonstige Geräte

Ultraschall:	Sonifier W-450 (Branson Ultraschall, Dietzenbach)
Thermocycler:	Mastercycler 5330 (Eppendorf, Hamburg)
Brutschrank:	B5028 (Heraeus, Hanau)
Thermoschüttler:	Orbit Environ Shaker (Lab-Line, Melrose Park, IL, USA)
Kryostat:	K20/DC1 (Thermo Haake, Karlsruhe)
Rotationsverdampfer:	Rotavapor-R (Büchi, Essen)
Schüttelwasserbad:	SW-20C (Julabo, Seelbach)
Sterilbank:	„laminar flow“ (Büttner Schilde Haas, Bad Hersfeld)

Alle übrigen Geräte und Hersteller werden bei den einzelnen Methoden genannt.

2.1.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Lösungsmittel in der höchstmöglichen Reinheitsstufe sowie bidestilliertes Wasser verwendet. Die Bezugsquellen von Enzymen und anderen Substanzen für molekularbiologische Arbeiten sind in Klammern angegeben.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer nach (Maniatis <i>et al.</i> 1989)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Serva, Heidelberg) 40 % (w/v) Saccharose
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Heidelberg) 40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Blau-Entfärbelösung	10 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
FSB (Frozen Storage Buffer) nach (Hanahan 1983)	100 mM KCl 45 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 3 mM HAcOCl ₃ 10 mM Kaliumacetat 10 % (v/v) Glycerin pH 6,2
His-Startpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 1 M NaCl
His-Waschpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 1 M NaCl 100 mM Imidazol
His-Elutionspuffer (Imidazol)	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 1 M NaCl 1 M Imidazol
His-Elutionspuffer (EDTA)	20 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0 1 M NaCl 50 mM EDTA

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lagerpuffer	50 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,2 150 mM NaCl
Ligase-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,6 10 mM MgCl ₂ 1 mM ATP (Sigma, Deisenhofen) 1 mM α-Dithiothreitol 25 % (w/v) Polyethylenglycol-8000
Low Melt Agarose Puffer	0,2 M Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
Lysozymlösung	10 mM Tris/HCl pH 8,0 5 mg/ml Lysozym (Serva, Heidelberg) 1 mM EDTA 50 mM Glucose
Mung Bean Nuklease-Puffer	50 mM Natriumacetat pH 5,0 30 mM NaCl 1mM ZnSO ₄
Natriumacetat-Lösung	3 M Natriumacetat/Essigsäure pH 4,8
Rekonstitutionspuffer	50 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,2 500 mM NaCl
Rekonstitutionspuffer ME	50 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,2 500 mM NaCl 1 mM β-Mercaptoethanol
SDS-PAGE-Auftragspuffer	625 mM Tris/HCl pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 0,003 (w/v) Bromphenolblau (Serva, Heidelberg) 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris/Acetat pH 8,0 1 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,5 1 mM EDTA
Vent [®] DNA-Polymerase-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 8,8 10 mM KCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1% Triton X 100

2.1.4 Medien

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH = 7,5
R-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 0,2 % (w/v) Glucose pH = 7,5
SOB-Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ pH = 6,8 – 7,5
SOC-Medium:	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose pH = 6,8 – 7,5
¹⁵ N-Minimalmedium	9,3 mM (¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄ 40 mM KH ₂ PO ₄ 30 mM K ₂ HPO ₄ 0,5 % (w/v) Glucose 0,1 % (w/v) Citronensäure-Monohydrat 0,05 % (w/v) NaCl 2 mM MgSO ₄ 170 µM Thiamin 170 µM EDTA 150 µM Eisencitrat 80 µM MnCl ₂ 50 µM Zinkacetat 50 µM Borsäure 10 µM CoCl ₂ 10 µM CuCl ₂ 10 µM Na ₂ MoO ₄ pH 6,8 - 7,5

Alle Medien wurden durch 20 minütiges Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.1.5 Organismen

Escherichia coli-Stämme

Der Stamm DH5 α (Hanahan 1983) wurde für sämtliche Klonierungen ohne nähere Angaben verwendet. Es handelt sich dabei um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgendem Genotyp:

F⁻, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻ m_K⁺), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*lacZYA-argF*)U169, ϕ 80d*lacZ* Δ M15.

Für die Expression von Proteinen wurde der Stamm BL21(DE3) (Studier & Moffat 1986) verwendet, der durch folgenden Genotyp beschrieben ist:

B, F⁻, *ompT*, *hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm gal* (DE3).

Mutagenisierte Plasmide wurden zur Klonierung in den superkompetenten Stamm Epicurian Coli[®] XL1 Blue supercompetent (Stratagene, Amsterdam, NL; *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F'*proAB lacI^fZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]) transformiert.

Mastigocladus laminosus

neuere Nomenklatur: *Fischerella* sp. PCC 7603

Mastigocladus (*M.*) *laminosus* ist ein zur Ordnung der Stigonematales gehörendes thermophiles Cyanobakterium. Es besitzt Heterocysten und Akineten (siehe Abbildung 1-1). Ursprung des in dieser Arbeit verwendeten Wildtyps waren heiße Quellen auf Island. Dort geerntet wurde *M. laminosus* zunächst in Zürich (Arbeitsgruppe Prof. Zuber) in Kultur genommen, gelangte später nach Marburg (Dr. Nies, Prof. Wehrmeyer) und von dort schließlich nach München.

2.1.6 Plasmide

Für die Expression wurde der Vektor pET30a (Novagen, Schwalbach; Kan^R, T7*lac*, f1 ori, His-Tag, S-Tag, Enterokinase-, Thrombin-Schnittstelle) verwendet.

Als Klonierungsvektor wurde pUC19 (nach Yanisch-Perron *et al.* 1985; New England Biolabs, Frankfurt am Main; Amp^R, *lacZ*) verwendet.

2.1.7 Oligonucleotide

Primer für die Klonierung von pecA

Name	Sequenz 5' → 3'
pecA(ATG)	ATGAAGACCCCGTTAACCG
pecA(<i>Hind</i> III)	CGCTGTTAAGCTTTAGCTC

Für die Mutagenese verwendete Primer

Name	Sequenz 5' → 3'
pecA-C84S forward	CAGAAGGGAAAGCAAAGAGCGTACGGGATATCGACCAT
pecA-C84S reverse	ATGGTCGATATCCCGTACGCTCTTTGCTTTCCCTTCTG
pecA-C98S forward	CACAATTAGCTACAGCTGTGTAGTTGGCGGTACTG
pecA-C98S reverse	CAGTACCGCCAACACTACACAGCTGTAGCTAATTGTG
pecA-C99S forward	CACAATTAGCTACTGCAGTGTAGTTGGCGGTACTG
pecA-C99S reverse	CAGTACCGCCAACACTACACTGCAGTAGCTAATTGTG
pecA-C98SC99S forward	CGCACAATTAGCTACAGCAGTGTAGTTGGCGGTACTG
pecA-C98SC99S reverse	CAGTACCGCCAACACTACACTGCTGTAGCTAATTGTGCG

Die verwendeten Oligonukleotide wurden in der Abteilung von Prof. D. Oesterhelt (Max Planck Institut für Biochemie, München) von Uta Schimankov hergestellt.

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Anzucht von *E. coli*

E. coli wurde für molekularbiologische Arbeiten bei 37 °C in Gegenwart geeigneter Antibiotika auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium kultiviert. Die Proteinexpression erfolgte in R-Medium bzw. in ¹⁵N-Minimalmedium. Dauerkulturen wurden aus Übernachtskulturen durch Zugabe von 20 % Glycerin hergestellt und bei – 70 °C aufbewahrt.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden verschiedene Methoden verwendet. Plasmid-DNA für die meisten Arbeiten wurde nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979) isoliert:

5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* in LB-Medium wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen 5 – 10 min bei Raumtemperatur in 100 µl Lysozymlösung inkubiert. Anschließend wurden zunächst 200 µl SDS-Lösung und sofort 150 µl Natriumacetat-Lösung zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis wurde zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Phenol/CHCl₃-Extraktion (siehe 2.2.3) durchgeführt. Um vor enzymatischen Modifikationen die Plasmid-DNA von RNA zu befreien, wurde der Plasmid-DNA 2 µl RNase-Lösung (10 mg/ml RNase) zugesetzt und der Ansatz anschließend 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 260 µl H₂O und 40 µl Natriumacetat-Lösung wurde nochmals eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

DNA, welche zur Sequenzierung verwendet werden sollte, wurde mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Angabe des Herstellers isoliert. Für größere Mengen Plasmid-DNA (100 ml *E. coli*-Kulturvolumen) wurde der Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Diese Methoden beruhen auf der alkalischen Lyse und einer anschließenden Reinigung über eine Anionenaustauschersäule. Die Ausbeuten an DNA betragen bei „low copy“ Plasmiden, wie dem Expressionsvektor pET-30, etwa 0,5 bis 1 µg/ml Kulturvolumen.

2.2.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Die Phenol/Chloroform-Extraktion diente zur Abtrennung von Proteinen. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen Phenol:Chloroform (1:1) versetzt, kurz gemischt und 5 min zentrifugiert (15500 g, 4 °C, Tischzentrifuge). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) vermischt und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt. Anschließend wurde die DNA mit zwei Volumina eiskaltem absolutem Ethanol bei –20 °C für 60 min gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15500 g) bei 4 °C pelletiert und mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das Pellet 30 min an der Luft getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1 %igen Agarosegelen, die auf Glasplatten (7,5 x 5 cm) mit einem Volumen von 10 ml gegossen wurden. Als Gel- und Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Gele wurden sowohl für analytische Zwecke (Agarose NA; Amersham Pharmacia, Freiburg) als auch für präparative Zwecke (Large DNA Low Melt Agarose; Biozym, Hamburg) verwendet. Die DNA-Lösungen wurden vor dem Auftragen mit 1/3 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und bei 50 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Anfärbung der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid, das dem Gel direkt (1 µg/ml Gelvolumen) zugesetzt wurde. Die DNA/Ethidiumbromid-Fluoreszenz (590 nm) kann durch UV-Licht (254 nm) angeregt werden und wurde mit Hilfe einer Kamera dokumentiert. Als Marker für die Größen- und Konzentrationsbestimmung wurden *HindIII* oder *BstEII* verdaute Lambda-Phagen DNA (Stamm: c1857*ind1 Sam7*) verwendet.

DNA-Fragmente, die im präparativen Maßstab durch Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt worden sind, konnten durch folgende Methode aus dem Gel (Large DNA Low Melt Agarose; Biozym, Hamburg) isoliert werden:

Die zu eluierenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Gelmatrix wurde mit dem gleichen Volumen 65 °C warmen Low Melt Agarose Puffer versetzt und 10 min bei 65 °C unter mehrmaligem vortexen inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem selben Volumen Phenol gemischt bis die Mischung homogen war. Danach wurde erneut für 10 min bei 65 °C inkubiert und anschließend zur Phasentrennung 10 min bei RT zentrifugiert (15000 g). Es bildeten sich drei Phasen, wobei die obere wässrige Phase die DNA enthielt und einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen wurde.

2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Restriktionsverdau

Die in TE-Puffer gelöste DNA wurde für die Restriktion mit einem geeigneten (entsprechend den Angaben des Herstellers) Restriktionspuffer versetzt. Waren für eine Restriktion der DNA zwei Restriktionsenzyme notwendig, so konnten sie gemeinsam in einem geeigneten Puffer oder nacheinander mit Pufferwechsel inkubiert werden. Der gepufferten DNA-Lösung wurden 1 bis 3 Units Enzym pro µg DNA zugesetzt (Anteil der Enzymlösung am Gesamtvolumen darf 10 % (v/v) nicht überschreiten) und bei der für das Restriktionsenzym angegebenen Temperatur für 3 h oder über Nacht inkubiert. Die Reaktion wurde bei

analytischen Restriktionen durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer gestoppt. Bei präparativen Restriktionen wurde im Anschluß an die Inkubation eine Phenol/Chloroform-Extraktion der DNA durchgeführt.

5'-Phosphorylierung mit T4 Polynukleotid-Kinase

Die Phosphorylierung von 5'-Enden ist bei Oligonukleotiden und DNA aus PCR wichtig, um eine Ligation zu ermöglichen, da hier synthesebedingt kein 5'-Phosphatende vorhanden ist. Diese Reaktion wurde mit äquimolaren Mengen 5'-OH DNA und dATP für 40 min bei 37 °C mit T4 Polynukleotid-Kinase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in 100 mM Imidazol/HCl-Puffer pH 6,4 unter Zugabe von 10 % PEG 8000 durchgeführt.

Verdau mit Mung Bean Nuklease

Überhängende 5'-Enden von Restriktionsenzym-Schnittstellen können durch Verdau mit Mung Bean Nuklease (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in „blunt ends“ umgewandelt werden. Dazu wurde die mit einem Restriktionsenzym geschnittene DNA in Mung Bean Nuklease-Puffer mit 0,75 Units Mung Bean Nuklease pro µg DNA versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgte anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion.

Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man das kovalente Verknüpfen zweier DNA-Stränge durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende. Dabei sind sowohl intra- als auch intermolekulare Reaktionen möglich. So kann eine durch PCR amplifizierte codierende Sequenz in einen geschnittenen Expressionsvektor eingefügt werden. Die Ligation wurde in Ligase-Puffer unter Zugabe von 1 Unit T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt am Main) in einem Volumen von 10 µl durchgeführt. Dabei wurden Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei die Menge an Vektor DNA 200 ng betrug. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation von *E. coli* (DH5α) verwendet.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR-Reaktion wird mit Hilfe einer DNA-Polymerase und zweier gegenläufiger Primer ein dazwischen liegender DNA-Abschnitt selektiv amplifiziert. Durch Denaturierung und anschließende Renaturierung wird den Primern die Bindung an ihre komplementären Sequenzen auf dem Matrizenstrang ermöglicht. Ausgehend von diesen Primern katalysiert eine hitzestabile DNA-Polymerase (Vent[®] DNA-Polymerase) die Synthese des vollständigen komplementären Strangs, der in folgenden Zyklen ebenfalls als Matrize für die Bindung der spezifischen Primer dient. Durch Wiederholung des beschriebenen Zyklus kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung des DNA-Abschnitts. Falls erforderlich können bei der PCR-Reaktion durch Primer, die nicht vollständig komplementär zur Matrizen-DNA sind, Mutationen oder neue Restriktions-Schnittstellen an den Enden amplifizierter DNA-Bereiche eingeführt werden.

Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Bedingungen in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt:

1 µg Matrizen-DNA, je 50 µM der beiden Primer, 2 Units Vent[®] DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt am Main), 1x Vent[®] DNA-Polymerase-Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main), 4 mM MgSO₄, 200 µM dNTPs, 100 µg/ml Rinderserumalbumin (BSA). Die Proben werden mit 50 µl Chill-Out Liquid Wax (Biozym, Hamburg) überschichtet. Die Amplifizierungsreaktion erfolgt im Thermocycler. Nach einer initialen Denaturierung für 3 min bei 95 °C erfolgt die Denaturierung in jedem Zyklus für 1 min bei 94 °C, das Annealing der Primer für 1 min bei der für die Primer errechneten Schmelztemperatur T_m (nach Thein & Wallace 1986) und die Elongation bei 74 °C für 30 sec bis 1 min (um die abnehmende Aktivität der Vent[®] DNA-Polymerase auszugleichen, wird die Polymerisationszeit bei jedem Zyklus ausgehend von 30 sec um eine Sekunde erhöht). Der Zyklus wurde 30 x wiederholt. Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden die Proben 5 min bei 4 °C zentrifugiert, die wässrige Phase abgenommen und die amplifizierte DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert.

2.2.7 Mutagenese von Plasmid-DNA

Zur Einführung von Punktmutationen in den Expressionsplasmiden, die zu einem gezielten Austausch von Aminosäuren führten, wurde der QuikChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, NL) verwendet. Die Details der Durchführung sind dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen. Die eingebrachten Punktmutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert.

2.2.8 Transformation

Kompetente Bakterien

Die transformationskompetenten Bakterienzellen wurden nach der Methode des „frozen storage of competent cells“ von (Hanahan 1983, Hanahan 1985) hergestellt. Von einer SOB-Agarplatte wurden Einzelkolonien eines *E. coli*-Stammes abgenommen (1 Kolonie pro 10 ml Kulturmedium) und im gewünschten Gesamtvolumen SOB-Medium suspendiert. Die Kultur wurde in einem Erlenmeyerkolben, der mindestens das 10- bis 30-fache Kulturvolumen hat, bis zu einer Zelldichte von $6-9 \times 10^7$ Zellen/ml bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (15 min, 750 bis 1000 g, 4 °C) pelletiert, das Pellet in einem Drittel des Ausgangsvolumens FSB resuspendiert und 10 bis 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen im 12,5-ten Teil des Ausgangsvolumens FSB aufgenommen. Die Suspension wurde in zwei Schritten mit DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) versetzt und weitere 10 bis 15 min auf Eis gestellt. Die so behandelten Zellen wurden in Aliquots (50 µl) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

Transformation

Für die Transformation wurde die DNA-Lösung (Volumen 5 – 10 µl) zu 50 µl kompetenten Zellen gegeben und der Ansatz 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz einem Hitzeschock (90 sec bei 42 °C) unterzogen und 200 µl SOC-Medium zugegeben. Die transformierten Zellen wurden 1 h bei 37 °C geschüttelt, auf einem entsprechenden Selektionsagarmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3 Proteinchemische Arbeiten

2.3.1 Darstellung der Proteine durch Expression in *E. coli*

Für die Darstellung der Proteine durch Expression wurde der Expressionsvektor pET30a (Novagen, Schwalbach) und der *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3) verwendet. In diesem Expressionssystem ist die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induzierbar. Mit dem Expressionsvektor transformierte *E. coli*-Zellen wurden in R-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin bzw. in ¹⁵N-Minimalmedium mit 15 µg/ml Kanamycin über Nacht angezogen. Mit dieser Übernachtskultur wurde die Hauptkultur (1 l) 1:100 angeimpft und bei 37 °C mit 180 U/min im Thermoschüttler inkubiert. Bei einer Zelldichte von $6-9 \times 10^7$ Zellen/ml

($OD_{600}=0,45-0,5$) wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur weitere 3 - 5 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 8000 g zentrifugiert und mit 50 mM K_2HPO_4 -Puffer pH 6,6 gewaschen. Die Kulturen konnten bis zur Weiterverarbeitung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

2.3.2 Zellaufschluß durch Ultraschall

Die Zellen aus 1 l Expressionskultur wurden in 30 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,6 (für die Rekonstitution im Lysat) oder in 30 ml His-Startpuffer (für die Aufreinigung durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie) resuspendiert. Es folgte der Aufschluß im Sonifier für 30 min bei 45 W. Die Suspension wurde zentrifugiert (30 min, 15000 g) und anschließend in der Rekonstitution oder in der Affinitätschromatographie eingesetzt .

2.3.3 Aufreinigung der Proteine durch Affinitätschromatographie

Die Fusionsproteine His₆-pecA, His₆-pecE und His₆-pecF, die am N-Terminus eine Tag-Region mit u.a. einem His₆-Tag besitzen, können mittels Affinitätschromatographie an einer mit Ni^{2+} beladenen Chelating Sepharose™ Fast Flow-Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt werden. Die Überstände aus dem Zellaufschluß durch Ultraschall bzw. die zentrifugierten Rekonstitutionsansätze wurden auf die mit Ni^{2+} (2 Säulenvolumen 50 mM $NiSO_4$) beladene und anschließend mit 5 Säulenvolumen His-Startpuffer äquilibrierte Chelating Sepharose™ Fast Flow-Säule aufgetragen. Durch Waschen mit 8 Säulenvolumina His-Startpuffer und 5 Volumina His-Waschpuffer wurden unspezifisch an das Säulenmaterial gebundene Proteine entfernt. Mit 5 Vol His-Elutionspuffer (EDTA) wurden die Apoproteine in 2 – 5 ml Fraktionen von der Säule eluiert werden. Rekonstituiertes, und somit gefärbtes His₆-pecA konnte mit His-Elutionspuffer (Imidazol) eluiert werden. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE auf Gehalt und Reinheit der Proteine überprüft.

2.3.4 Dialyse

Zur Entfernung der hohen NaCl-Konzentration und des EDTA bzw. Imidazols wurden die Eluate zweimal gegen das mindestens 500-fache Volumen geeigneter Puffer bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ dialysiert. Dabei wurden Dialyseschläuche SERVAPOR® dialysis tubing (MWCO 12000 - 14000) Ø 6 mm oder 16 mm (Serva, Heidelberg) verwendet. His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF, die in Rekonstitutionen eingesetzt werden sollten, wurden gegen Rekonstitutionspuffer ME dialysiert. Die aufgereinigten Rekonstitutionsansätze wurden gegen Lagerpuffer dialysiert, um sie u.a. spektroskopisch untersuchen, mit Trypsin zu verdauen oder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lagern zu können.

2.3.5 Konzentrierung von Proteinen

Die Konzentrierung der aufgereinigten und rekonstituierten Proteine erfolgte durch Ultrafiltration mit Ultrafree 15 Biomax 10K (Milipore, Bedford, MA, USA), die eine Ausschlußgrenze von 10 kDa aufweisen. Die Konzentrierung erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C und 2000 g nach Angaben des Herstellers.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Protein Assay ESL (Roche, Mannheim) durchgeführt.

2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(nach Laemmli 1970)

Mit dieser Standardmethode der Proteinanalytik ist eine Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht möglich. Die unterschiedliche Ladung der Proteinmoleküle wird dabei durch die Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (SDS) proportional zur Größe der Proteine kompensiert. Somit definiert allein die Molekülgröße der Proteine ihre elektrophoretische Beweglichkeit. Die Auftrennung erfolgt in einer vernetzten Matrix aus Polyacrylamid. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems mit Trenn- und Sammelgel mit unterschiedlichen pH-Bedingungen wird eine Konzentrierung der Probe und somit eine höhere Auflösung der Trennung erzielt.

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte auf Mini-Gelen mit einer Dicke von 0,75 mm in einer horizontalen Elektrophoreskammer, wobei die Konzentration des Acrylamids im Trenngel 15 % (w/v) und im Sammelgel 5 % (w/v) betrug. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 1:1 mit SDS-PAGE-Auftragspuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese wurde 30 min mit 50 V im Sammelgel und 90 min bei 150 V im Trenngel durchgeführt.

Trenngel (15 %):

50 % (v/v)	rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe) (29,2 : 0,8 % w/w Acrylamid:Bisacrylamid)
375 mM	Tris/HCl pH 8,8
0,1 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	APS
0,1 % (v/v)	TEMED

Sammelgel (5 %):

16,7 % (v/v)	rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe) (29,2 : 0,8 % w/w Acrylamid:Bisacrylamid)
125 mM	Tris/HCl pH 6,8
0,1 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	APS
0,05 % (v/v)	TEMED

Zink-Färbung

Auf SDS-PAGE aufgetrennte Biliproteine bilden zusammen mit Zn^{2+} einen stark fluoreszierenden Komplex im Gel (Berkelman & Lagarias 1986). Die Gele wurden nach der Gelelektrophorese in 1,3 M Zinkacetat-Lösung inkubiert. Nach 30 min wurden die Gele in bidestilliertem H_2O gewaschen. Anschließend wurde die orangefarbene Fluoreszenz durch UV-Licht (365 nm) angeregt und mit Hilfe einer Kamera dokumentiert. Im Anschluß konnte das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt werden.

Färbung mit Coomassie-Blau

Im Anschluß an die Gelelektrophorese oder nach der Zink-Färbung wurden die Gele in Coomassie-Blau-Färbelösung überführt und 30 min unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung wurden die Gele über Nacht in Coomassie-Blau-Entfärbelösung geschüttelt. Die Gele wurden anschließend mit einer Digital-Kamera fotografiert und ausgewertet.

Als Molekulargewichtsmarker wurde SDS-7 (Sigma, Deisenhofen) verwendet:

SDS-7:	MW (kDa):
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
GAPDH (Kaninchen)	36
Carboanhydrase (Rind)	29
Trypsin-Inhibitor (Rind)	24
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	20,1
α -Lactalbumin (Rind)	14,2

2.4 Isolierung und Darstellung der Chromophore

2.4.1 Generelle Arbeitsbedingungen

Alle Arbeiten mit Gallenfarbstoffen, Biliptiden und Biliproteinen erfolgte in einem abgedunkelten Raum unter Schutzlicht. Die Gallenfarbstoffe bzw. Gallenfarbstoffester wurden trocken oder in DMSO gelöst unter Argon bei – 20 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.4.2 Isolierung von Phycocyanobilin aus *Spirulina platensis*

40 g sprühgetrocknete *Spirulina platensis* (Behr, Bonn) wurden 3 mal mit 500 ml heißem Methanol aufgeschwemmt, 30 min gerührt und abgenutscht. Durch diesen Arbeitsgang wurden Chlorophyll a und Carotinoide entfernt. Der Algenrückstand wurde in 400 ml Methanol / 1 % Na-Ascorbat (v/w) unter Rühren bei 70 - 80 °C unter Argon über Nacht am Rückfluss gekocht. Dabei wurde anfangs 1h mit Argon begast. Während des Kochen in Methanol wurde ein Teil des Phycocyanobilin (PCB) vom Apoprotein abgespalten und ging in Lösung. Der Algenrückstand wurde von der blaugrünen Lösung abgenutscht. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt und mit 400 ml 0,1 M HCl versetzt. Die Lösung wurde mehrmals mit 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Chlorophyll a, bzw. Pheophytin a und Carotine lösten sich im Diethylether und konnten so abgetrennt werden. Die wässrige Phase, die den Bilinchromophor enthält, wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die abgetrennten Chloroform-Phasen wurden vereinigt, über NaCl getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Es folgte die säulenchromatographische Aufreinigung des PCB (siehe 2.5.1).

2.4.3 Isolierung von Phycoerythrobilin aus *Porphyra yezoensis*

50 g getrocknete Rotalgen *Porphyra yezoensis* (im Lebensmittelhandel als trockene Algenplatten erhältlich) wurden grob zerkleinert, 30 min in 1000 ml Wasser aufgeschwemmt. Danach wurde das Wasser durch Auspressen der Algen weitgehend entfernt. Anschließen wurden die Algen 3 mal 30 min in 1000 ml heißem Methanol gerührt. Durch diesen Arbeitsgang konnte der größte Teil des Chlorophylls und der Carotinoide entfernt werden. Die Algen wurden in 1600 ml Methanol / 1 % Na-Ascorbat (v/g) unter Argon bei 70 – 80 °C unter Rühren über Nacht am Rückfluss gekocht. Der Algenrückstand wurde von der tiefroten Lösung abgenutscht. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 400 ml eingeeengt,

in einen Scheidetrichter überführt und mit 400 ml 0,1 M HCl versetzt. Die Lösung wurde mehrmals mit 100 – 200 ml Diethylether ausgeschüttelt. Chlorophyll bzw. Pheophytin und Carotine lösten sich im Diethylether und konnten so abgetrennt werden. Die wässrige Phase, die neben Phycoerythrobilin (PEB) auch PCB enthielt, wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die abgetrennten Chloroform-Phasen wurden vereinigt, über NaCl getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das PEB konnte durch Säulenchromatographie vom PCB und Nebenprodukten abgetrennt werden (siehe 2.5.1).

2.4.4 Veresterung des Phycocyanobilins mit BF₃/Methanol zum Phycocyanobilin-Dimethylester

45 mg rohes, nicht aufgereinigtes PCB wurden in 30 ml warmem Methanol aufgenommen, mit 11 ml 20 %iger BF₃-Lösung in Methanol versetzt und 20 min am Rückfluss unter Argon bei 65 - 70 °C gekocht. Anschließend wurden 30 ml Chloroform zugegeben, die Lösung in einen Scheidetrichter überführt und mit 50 ml Wasser versetzt. Die abgetrennte Chloroform-Phase, die den Phycocyanobilin-Dimethylester (PCB-DME) enthielt, wurde über NaCl getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Um reinen PCB-DME zu erhalten war eine Aufreinigung über eine Kieselgelsäule notwendig (siehe 2.5.1).

Phycoerythrobilin-Dimethylester (PEB-DME) stammt von Prof. A. Gossauer (Fribourg, CH).

2.4.5 Darstellung von Phytochromobilin

15 mg aufgereinigtes PEB wurde in 30 ml DMSO gelöst, mit 30 ml CH₂Cl₂ versetzt und 30 min bei 65 °C mit Argon begast. Anschließend wurden 750 µl in HCl gelöstes FeCl₃ (2,5 mg/ml) zugegeben und 1,5 h am Rückfluss bei 65 °C gekocht. Die Lösung wurde anschließend in einen Scheidetrichter überführt, kurz abgekühlt, und mit 200 ml 0,1 M HCl versetzt. Diese Lösung wurde dreimal mit ca. 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die Biline gehen dabei in die CH₂Cl₂-Phase. Die abgetrennten CH₂Cl₂-Phasen wurden vereinigt, über NaCl getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Das Phytochromobilin (PΦB) konnte anschließend chromatographisch von den Nebenprodukten und dem nicht umgesetzten PEB abgetrennt werden (siehe 2.5.1).

2.4.6 Darstellung von Biliverdin IX α aus Bilirubin IX α

(nach Scheer 1984)

50 mg Bilirubin IX α (Fluka, Deisenhofen) wurden in 50 ml DMSO unter Rühren gelöst und mit Argon begast. Nach 15 min wurden über einen Zeitraum von 15 min nach und nach 50 mg in 10 ml DMSO gelöstes 2,3-Dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon zugegeben. Nach weiteren 15 min wurden 500 ml Chloroform zugegeben, die Lösung in einen Scheidetrichter überführt und mit 350 ml Wasser versetzt. Die abgetrennte Chloroform-Phase, die das Biliverdin IX α enthielt, wurde 3 mal mit Wasser gewaschen, über NaCl getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Bis zur chromatographischen Aufreinigung (siehe 2.5.2) wurde das Biliverdin unter Argon bei -20°C aufbewahrt.

2.4.7 Isolierung von Bilinen aus rekonstituierten Biliproteinen mittels in Trifluoressigsäure gelöstem HBr

100 - 200 mg gefriergetrocknetes rekonstituiertes Biliprotein wurden in 30 ml Trifluoressigsäure gelöst und 30 min mit HBr über ein Einleitungsrohr begast. Dabei wurde soviel HBr eingeleitet, dass ein leichtes Perlen des Gases in der Lösung auftrat. Die Lösung wurde anschließend unter Rühren 30 min bei $75 - 85^{\circ}\text{C}$ unter Argon am Rückfluss gekocht. Danach wurden das HBr und die Trifluoressigsäure mit Argon abgeblasen. Der Rückstand wurde in ca. 50 ml Methanol gelöst und abgenutscht. Nach Zugabe von 50 ml Diethylether wurde die Lösung in einen Scheidetrichter überführt. Die organische Phase wurde mehrmals mit 0,1 M HCl extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen, die den Chromophor enthalten, wurden mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phase, in der sich die Biline gelöst haben, wurde mit NaCl getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

2.4.8 Abspaltung von Phycoviolobilin aus α -Phycoerythrocyanin

80 mg Ag_2SO_4 wurden in 7 ml H_2O unter Zugabe von 0,8 ml Essigsäure gelöst. Anschließend wurden 5 - 10 mg PVB-Addukt, gelöst in 3 ml H_2O , zugegeben und 2 Stunden unter Argon bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 10 ml CH_2Cl_2 vermischt. Nach Zentrifugation (10.000 g, 10 min) wurde die CH_2Cl_2 -Phase, die den PVB-Chromophor enthält, abgenommen, über NaCl getrocknet und anschließend am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Das Rohprodukt konnte chromatographisch auf Kieselgel RP 8 aufgetrennt werden (siehe 2.5.1).

2.5 Aufreinigung der Chromophore

2.5.1 Säulenchromatographie

Phycocyanobilin (PCB)

Stationäre Phase: Kieselgel RP 8 (23-63 μm) 60 Å (ICN, Eschwege)

Mobile Phase: 40 % 2-Propanol, 60 % 50 mM KPP pH 2,1 (v/v)

Phytochromobilin (PΦB)

Stationäre Phase: Kieselgel RP 8 (23-63 μm) 60 Å

Mobile Phase: 35 % 2-Propanol, 65 % 50 mM KPP pH 2,1 (v/v)

Phycoerythrobilin (PEB)

Stationäre Phase: Kieselgel RP 8 (23-63 μm) 60 Å

Mobile Phase: 30 % 2-Propanol, 70 % 50 mM KPP pH 2,1 (v/v)

Phycocyanobilin-Dimethylester (PCB-DME)

Stationäre Phase: Kieselgel 60 H (Merck, Darmstadt), 3 % Na-Ascorbat

Mobile Phase: 2 % 2-Propanol, 98 % Chloroform (v/v)

2.5.2 Dünnschichtchromatographie

Biliverdin IX α (BV IX α) wurde im Gegensatz zu den übrigen Bilinen auf präparativen Kieselgelplatten aufgereinigt.

Herstellung der präparativen Kieselgelplatten: 100 g Kieselgel 60 H (Merck, Darmstadt) wurden mit ca. 250 ml destilliertem H₂O verrührt. Als Oxidationsschutz wurden 3 % Natriumascorbat zugegeben. Nach 1 h Quellung wurde das Kieselgel auf 20 x 20 cm Glasplatten mit einer Schichtdicke von 0,75 mm aufgetragen und etwa 2 Tage an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Man erhält dabei ca. 8 Platten.

Stationäre Phase: Kieselgel 60 H

Mobile Phase: obere Phase von Toluol : Essigsäure : H₂O (5:5:1)

Die Pigmentbanden wurde von der Kieselgelplatte abgenommen und in Essigsäure aufgenommen, mit Chloroform und H₂O versetzt und in einen Scheidetrichter überführt. Die Chloroform-Phase, die das BV IX α enthielt, wurde über NaCl getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Chromophor wurde bei -20°C unter Argon gelagert.

2.6 Rekonstitutionen

2.6.1 Rekonstitution mit den rohen *E. coli*-Lysaten

Bei dieser Methode wurden für die Rekonstitution *E. coli*-Lysate verwendet. Um die Lysate zu erhalten, wurden Zellen aus 1 l Expressionskultur in 30 ml 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,6 resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen.

Die Lysate, die PecA oder His₆-PecA enthielten, wurden sowohl allein als auch zusammen mit den Lysaten, die PecE bzw. His₆-PecE und PecF bzw. His₆-PecF enthielten, in der Rekonstitution eingesetzt. Die Konzentration der Proteine in den Lysaten, die ein Volumen von 30 ml aufwiesen, betrug für PecA und His₆-PecA zwischen 2 und 4 mg/ml, für PecE und His₆-PecE zwischen 1 und 2 mg/ml und für PecF und His₆-PecF zwischen 0,7 und 1,2 mg/ml, wobei die getaggten Proteine eine etwas höhere Konzentration aufwiesen. Die Lysate wurden so eingesetzt, dass der Rekonstitutionsansatz das Apoprotein und die beiden Lyase-Untereinheiten in etwa äquimolaren Mengen enthielt. Zu den Lysaten wurden die in DMSO gelösten Biline ebenfalls in zum Apoprotein äquimolarer Menge bis zu einer DMSO-Endkonzentration von 1 % (v/v) zugegeben. Die Rekonstitutionsansätze wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Rekonstitutionen dauerten, abhängig von den eingesetzten Lysaten und Chromophoren, zwischen 1 und 18 h.

Typische Rekonstitutionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

Autokatalytische Rekonstitution:

10 ml	Lysat mit PecA bzw. His ₆ -PecA
50 µl	Chromophor in DMSO (15 mg/ml)

Enzymatische Rekonstitution:

10 ml	Lysat mit PecA bzw. His ₆ -PecA
20 ml	Lysat mit PecE bzw. His ₆ -PecE
30 ml	Lysat mit PecF bzw. His ₆ -PecF
50 µl	Chromophor in DMSO (15 mg/ml)

Von diesen Schemen abweichende Rekonstitutionsansätze, wie z.B. bei den Rekonstitutionen mit den His₆-PecA-Mutanten, sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.6.2 Rekonstitution mit den aufgereinigten Proteinen

Bei dieser Rekonstitutionsmethode (Zhao *et al.* 2000, Storf *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2002) wurden die Proteine nach der Aufreinigung über Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie und der Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer ME verwendet. Die Rekonstitution wurde in einer Mischung aus Tris-HCl-Puffer und Kaliumphosphat-Puffer durchgeführt. Die Proteine His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF wurden äquimolar eingesetzt und der Chromophor in leichtem Überschuß zugegeben. Daneben waren noch NaCl, Mercaptoethanol, Mn²⁺, Triton X-100 und Glycerin notwendige Bestandteile für eine erfolgreiche Rekonstitution.

Ein typischer Rekonstitutionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

100 mM Tris/HCl pH 7,5

15 - 20 mM Kaliumphosphat

150 - 200 mM NaCl

5 mM Mercaptoethanol

3 mM MnCl₂

1 % (v/v) Triton X-100

10 % (v/v) Glycerin

je 15 - 25 µM von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF

(wobei entweder nur His₆-PecA oder alle drei Proteine eingesetzt wurden)

20 - 30 µM Chromophor gelöst in DMSO

(Endkonzentration des DMSO im Rekonstitutionsansatz 1 % (v/v))

Die Rekonstitutionsansätze wurden 2 – 3 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde spektroskopisch kontrolliert, wann eine Rekonstitution abgeschlossen war.

2.6.3 Denaturierung der rekonstituierten Biliproteine mit Harnstoff

Biliproteine können durch Zugabe von Harnstoff denaturiert werden. In 8 M Harnstoff liegen sie vollständig entfaltet vor. Durch Entfernung bzw. Verdünnung des Harnstoffs kann die Denaturierung rückgängig gemacht werden (Murphy & O'Carra 1970, Kufer 1980, Siebzehrübl *et al.* 1989). Die Berechnung der eingesetzten Harnstoff-Mengen erfolgte unter Berücksichtigung des Eigenvolumens von Harnstoff und des damit verbundenen Verdünnungseffekts. So wurden 0,48 g Harnstoff mit 0,63 ml Puffer bzw. Probe versetzt, um eine Konzentration von 8 M Harnstoff in einem Volumen von 1 ml zu erreichen. Die anschließende Renaturierung wurde durch Verdünnen der Probe mit 150 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 um 1:10 auf 0,8 M Harnstoff erreicht.

2.7 Analytische Methoden

2.7.1 Analytische Dünnschicht-Chromatographie der Chromophore

Die Reinheit der Chromophore konnte mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie bestimmt werden. Es wurden dabei folgende Systeme verwendet:

für PCB, PEB, PΦB, PVB, PCB-DME, PEB-DME

Stationäre Phase: RP-8 F_{254s}, HPTLC-Platten, 10x10 cm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: 2-Propanol : 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2,1 (40 : 60)

R_f-Werte:

PEB 0,38; PΦB 0,30; PCB 0,26; PVB 0,24; PEB-DME 0,22; PCB-DME 0,18

für die Veresterung von PCB zu PCB-DME

Stationäre Phase: Kieselgel 60, HPTLC-Platten, 10x10 cm (Merck, Darmstadt)

Mobile Phase: Methylethylketon : H₂O : Essigsäure (95 : 5 : 0,3)

R_f-Werte:

PCB-DME 0,90; PCB 0,73

2.7.2 Analytische HPLC der Rekonstitutionsprodukte

Um die Rekonstitutionsprodukte mittels HPLC analysieren zu können, mussten sie mit der Protease Trypsin abgebaut werden, wodurch neben verschiedenen Proteinfragmenten ein Chromophor-tragendes Tripeptid entstand.

Tryptischer Verdau von rekonstituierten Biliproteinen

Für den tryptischen Verdau wurde das über Ni²⁺-Chelat-Affinitätschromatographie rekonstituierte His₆-PecA zunächst gegen 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, 500 mM NaCl pH 6,6 dialysiert. Anschließend wurden 5 mal alle 3 h pro mg rekonstituiertem Protein 3000 Units Trypsin zugegeben. Für 9 h über Nacht wurden jedoch einmal 15000 Units pro mg Protein zugegeben. Nach 24 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 % (v/v) Essigsäure gestoppt. Um unvollständig verdautes Protein von den Peptiden abzutrennen, wurde der Ansatz über eine Sephadex G-25 Medium (85 - 260 μm) Säule (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit dem Laufmittel 30 % (v/v) Essigsäure aufgereinigt. Anschließend wurde die Probe entsalzt und konzentriert. Dazu diente eine SepPak C18 Säule (Waters, Milford, USA).

Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 0,1 % (v/v) TFA gewaschen und mit Acetonitril / 0,1% TFA (60 : 40) eluiert. Das Eluat wurde unter einem Argonstrom getrocknet und im HPLC-Laufmittel aufgenommen. Anschließend wurde die HPLC bei Raumtemperatur durchgeführt.

Durchführung der HPLC

Mit Hilfe der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC; High Performance Liquid Chromatography) konnten die tryptischen Chromopeptide aufgetrennt und gleichzeitig spektroskopisch analysiert werden.

Zur HPLC-Analyse diente folgendes System:

Pumpen: Programmierbares Gradientensystem der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg), bestehend aus 2 HPLC Pumpen 2248, LC Controller 2252 und Hochdruckmischer.

Detektion: Dioden-Array-Spektrometer Tidas (J & M, Aalen)

Säule: LiChrospher® 100 RP-18 5 µm (Merck, Darmstadt)

Laufmittel: A: 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,1
B: Acetonitril

Gradient: lineare Übergänge

Zeit [min]	0	20	35
A : B	80 : 20	60 : 40	80 : 20

Flussrate: 1 ml / min

2.7.3 Belichtung zur Induktion photochemischer Effekte

Lichtquelle

Als Standardlichtquelle für die Induktion photochemischer Effekte diente eine Kaltlichtquelle Modell Intralux 150H (150W) der Firma Volpi (Denzlingen). Ein Filteraufsatz erlaubte eine Bestrahlung mit Licht bestimmter Wellenlängen.

Filter

Wellenlänge Farbe	[nm]	Filterbezeichnung	Halbwertsbreite in [nm]	max. Transmission in [%]
blauviolett	430	430 HLX 11-9	9,2	83
blaugrün	500	15-10280 S-SEU 2-4	6,0	75
gelbgrün	577	577 3C S-LPG 2-1	7,6	74
orange	600	600 S-NOY 11-1	9,6	93
rot	639	15-10480 BFZ 3-4	8,7	88
dunkelrot	700	7000 36 REV 3-4	9,8	83

Bei den eingesetzten Filtern handelt es sich um Interferenzfilter der Firma Dr. Seitner Meß- und Regeltechnik (Herrsching).

Messung

Die Induktion photochemischer Effekte erfolgte indem die Proben in einer abgeschlossenen Apparatur bei Raumtemperatur mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt wurden. Dabei wurde für die Untersuchung der Photochemie des rekonstituierten α -PEC in der Regel der Belichtungszyklus 500 nm – 577 nm – 500 nm durchgeführt. Nach jeder Belichtung, die jeweils 3 min dauerte, wurde ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen. Für andere Rekonstitutionsprodukte wurden zum Teil andere Belichtungszyklen gewählt, die jeweils im Ergebnisteil angegeben werden.

Berechnung der $\Delta\Delta A$ -Werte

Für die quantitative Bestimmung einer photochemischen Reaktion wurde der $\Delta\Delta A$ -Wert berechnet. Hierzu wurde der ermittelte Differenzbetrag (Maximum *minus* Minimum) des betreffenden Absorptionsdifferenzspektrums (kurzwellig belichtet *minus* langwellig belichtet) prozentual zur Absorption des Maximum der kurzwellig belichteten Form berechnet - es gilt:

$$\Delta\Delta A_{xxx/yyy} = \left| \frac{\Delta A_{xxx} - \Delta A_{yyy}}{A^{\max}} \right| \cdot 100\%$$

ΔA_{xxx} = langwelliges Maximum des Differenzspektrums (kurzwellig belichtet *minus* langwellig belichtet) bei xxx nm

ΔA_{yyy} = kurzwelliges Minimum des Differenzspektrums (kurzwellig belichtet *minus* langwellig belichtet) bei yyy nm

ΔA_{yyy}^{\max} = Absorptionsmaximum der kurzwellig belichteten Form bei yyy nm

Die Grundlage für die Berechnung der $\Delta\Delta A$ -Werte des rekonstituierten α -PEC waren folgende Differenzspektren:

Spektrum der dritten Belichtung (500 nm) des oben angegebenen Belichtungszyklen *minus* Spektrum der zweiten Belichtung (577 nm). Die Berechnung der $\Delta\Delta A$ -Werte anderer Rekonstitutionsprodukte erfolgte analog hierzu.

2.8 Spektroskopie

2.8.1 Allgemeine Bedingungen

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Spektren der Rekonstitutionsprodukte wurden soweit nicht anders angegeben in Rekonstitutionspuffer, die der freien Biline in MeOH / 2 % HCl aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA) und Spectacle 1.55 (LabControl, Köln).

2.8.2 UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Absorptionsspektren wurden entweder mit einem Lambda 2 Spektralphotometer und der Software PECSS 3.2 oder mit einem Lambda 25 UV/VIS Spectrometer und der Software UV Winlab Vers. 2.85.04 von Perkin Elmer (Überlingen) aufgenommen.

2.8.3 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Fluoreszenzspektren diente ein Spex Fluorolog 221 Fluorimeter (Jobin-Yvon, Grasbrunn) mit Software von Dr. A. Pazur. Die Detektion erfolgte mit einem Hamamatsu-Photomultiplier R 374 (300 - 800 nm).

2.8.4 Circulardichroismus

Die CD-Spektren wurden am Dichrograph CD (Jobin-Yvon, Grasbrunn) mit dem Detektor Hamamatsu-Photomultiplier R 374 (300 - 800 nm) und der firmeneigenen Software Dichrograph Software Vers. 1.1 aufgenommen.

2.8.5 NMR-Spektroskopie

¹H-NMR-Spektroskopie

Für die Strukturaufklärung der Produkte der Oxidation von Phycoerythrobilin mit FeCl₃ wurden ¹H-NMR-Spektren von Dr. Rainer Haeßner (Technische Universität, Garching) mit einem 600 MHz-Gerät der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde d₅-Pyridin verwendet.

2D-NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie kann die 3D-Struktur von Proteinen aufgeklärt werden. Somit können z.B. durch Vergleich der Konformation verschiedener photochemischer Formen des α-PEC Informationen über die Proteindynamik gewonnen werden.

Für die Aufnahme von ¹⁵N-HSQC-Spektren musste His₆-PecA mit ¹⁵N markiert werden. Dazu wurde die Expression des Apoproteins in ¹⁵N-Minimalmedium für 5 h durchgeführt. Nach der Aufreinigung mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie wurde gegen Lagerpuffer dialysiert. Vor der Messung wurde 10 % D₂O zugegeben. Die Spektren wurden von Pawel Smialowski in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Holak (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) mit einem 600 MHz-Gerät der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgenommen.

2.8.6 Massenspektroskopie

Die Massenspektren der Chromophore wurden von Dr. P. Köhler und I. Otte (Fakultät Lebensmittelchemie, Technische Universität, Garching) mit einem LCQ-Massenspektrometer (Thermo Finnigan, Bremen) gemessen. Spektren zur Bestimmung der Proteinmassen wurden mit einem TSQ Triple Quadrupol Mass Spectrometer (Thermo Finnigan, Bremen) von Patric Hoerth in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Haehnel (Institut für Biologie, Freiburg i.Br.) und mit einem Q-ToF I (Mikromass, Manchester, GB) von Bernhard Granvogel in der Arbeitsgruppe von Dr. L. Eichacker aufgenommen.

2.9 Bioinformatische Methoden

2.9.1 Datenbanken

Die Suche nach Protein- und Nucleotidsequenzen erfolgte hauptsächlich in den Datenbanken Swiss-Prot und TrEMBL (<http://us.expasy.org/sprot/>). Als Datenbank für 3D-Strukturen diente die Brookhaven protein data base (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/cgi/>).

2.9.2 3D-Visualisierung von Proteinen

RasMol (<http://www.umass.edu/microbio/rasmol/>) ist ein frei verfügbares Programm mit dem Moleküle dreidimensional dargestellt und in Echtzeit bewegt werden können. Durch eine eingebaute Makrosprache können verschiedene Operationen durchgeführt werden, wie z.B. die Berechnung von Atomabständen und Torsionswinkeln.

2.9.3 Sequenzanalysen

BLAST und PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) wurden verwendet um verwandte Sequenzen in Datenbanken zu finden (Suchalgorithmus nach Atschul et al., BLOSUM62-Matrix).

Die Alignments von Protein- bzw. DNA-Sequenzen wurden mit folgenden Programmen durchgeführt:

ALION (<http://fold.stanford.edu/alion/>), für globale Alignments von zwei Sequenzen (Needleman & Wunsch Algorithmus, BLOSUM62-Matrix), geeignet für nah verwandte Sequenzen.

ALION (<http://fold.stanford.edu/alion/>) oder SIM (<http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>), für lokale Alignments von zwei Sequenzen (Smith & Waterman Algorithmus, BLOSUM62-Matrix), geeignet für divergente Sequenzen.

CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), für multiple Alignments zum Vergleich mehrerer Sequenzen (Feng & Doolittle Algorithmus).

Die Restriktionsanalyse von Nucleotidsequenzen wurde mit dem Programm EMBOSSrestrict (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/restrict.html>) durchgeführt.

2.9.4 Andere bioinformatische Methoden

Die Berechnung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes von Proteinen erfolgte mit den Programmen Compute pI/Mw (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html) und PeptideMass (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>). Für die Berechnung der Molekulargewichte von Bilinen wurde IsoPro 2.1 (<http://members.aol.com/msmssoft/>) verwendet.

3 Ergebnisse und Diskussion

Eines der grundlegenden Ziele dieser Arbeit war die Etablierung eines Rekonstitutions-systems für die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins (α -PEC) aus *Mastigocladus (M.) laminosus*.

In den letzten Jahren gelangen bereits Rekonstitutionen von Biliproteinen, wie die Rekonstitution des Apo- $\alpha\beta$ -Phycocyanins aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 durch Arciero et al. (Arciero et al. 1988b, Arciero et al. 1988a, Arciero et al. 1988c) und des Apo-Phycoerythrins aus *Calothrix* sp. PCC 7601 durch Fairchild et al. (Fairchild et al. 1992, Fairchild & Glazer 1994a). Rekonstitutionen von Apo-Phytochrom mit verschiedenen Phycobilinen gelangen *in vitro* erstmals 1989 (Elich & Lagarias 1989) und sind seitdem eine wichtige Arbeitstechnik der Phytochromforschung. Für die Rekonstitutionen des α -PEC waren zunächst, neben dem Apoprotein, das in *E. coli* exprimiert werden sollte, Bilin-Chromophore notwendig.

3.1 Isolierung und Modifikation der Bilin-Chromophore

Da zu Beginn dieser Arbeit eine Isolierung des nativen Chromophors des α -PEC, dem Phycoviolobilin (PVB), nicht möglich war, wurden die ersten Rekonstitutionen mit Phycocyanobilin (PCB) durchgeführt. Das PCB unterscheidet sich vom Phycoviolobilin lediglich durch die Lage einer Doppelbindung (siehe Abbildung 1-4). Ein zweiter wichtiger Chromophor, der in Rekonstitutionen eingesetzt wurde, war das Phycoerythrobilin (PEB). PCB und PEB dienten auch als Edukte für weitere Chromophore, wie die PCB- und PEB-Dimethylester (PCB-, PEB-DME) sowie das Phytochromobilin (P Φ B). In Tabelle 3-1 sind die Absorptionseigenschaften und in Abbildung 3-1 die Strukturformeln der in den Rekonstitutionen eingesetzten Bilinen in ihrer zyklischen Konformation dargestellt. Eine solche zyklische Konformation nehmen die Gallenfarbstoffe frei in Lösung, in denaturierten Biliproteinen und in Bilipetiden ein. In nativen Biliproteinen liegen die Chromophore dagegen in gestreckter Konformation vor (Abbildung 1-4).

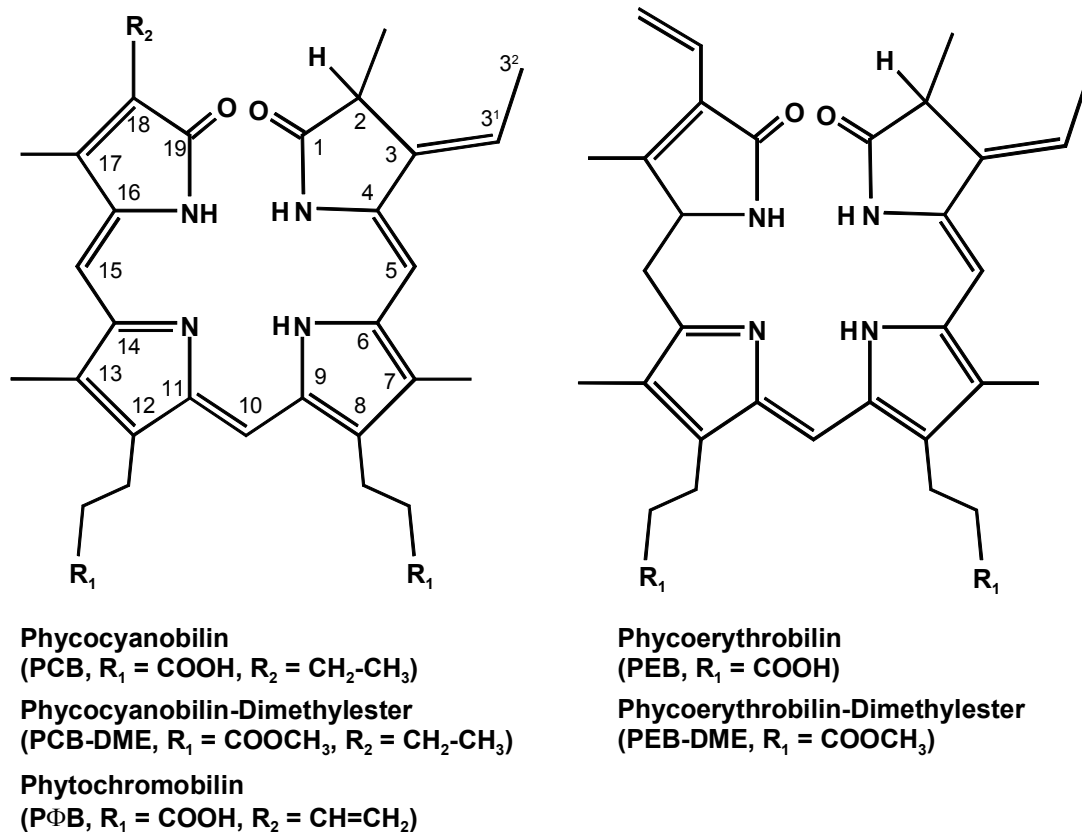
Tabelle 3-1:

Absorptionseigenschaften von Phycobilinen in ihrer zyklischen Konformation (als freie Chromophore oder gebunden an denaturierte Proteine bzw. Peptide).

Komponente	Lösungs- mittel	λ_{\max} Vis [nm] ($\epsilon \times 10^3$)	Referenz
$\Delta 3,3^1$ -E-Phycocyanobilin ^x	MeOH 2% HCl	690 (37,9)	(Gossauer & Hirsch 1974)
$\Delta 3,3^1$ -Z-Phycocyanobilin ^x	MeOH 2% HCl	685 (37,2)	(Weller & Gossauer 1980)
$\Delta 3,3^1$ -E-Phytochromobilin ^x	MeOH 2% HCl	708 (38,0)	(Weller & Gossauer 1980)
$\Delta 3,3^1$ -Z-Phytochromobilin ^x	MeOH 2% HCl	702 (24,5)	(Weller & Gossauer 1980)
Phycoerythrobilin ^x	MeOH 5% HCl	591 (25,2)	(Chapman <i>et al.</i> 1967)
3 ¹ -Cys-Phycocyanobilin, gebunden an denaturiertes C-PC aus <i>Spirulina platensis</i>	8 M Urea pH 2,0	662,5 (35,5)	(Glazer & Fang 1973)
3 ¹ -Cys Phytochromobilin, gebunden an denaturiertes Phytochrom aus <i>Triticum aestivum</i>	8 M Urea pH 2,0	680 (32,1)	(Brandlmeier <i>et al.</i> 1981)
3 ¹ -Cys-Phycoerythrobilin, gebunden an denaturiertes C-PE aus <i>Aphanocapsa</i> sp.	8 M Urea pH 1,9	555 (43,3)	(Glazer & Hixson 1975)
$\Delta 15,16$ -Z-3 ¹ -Cys-Phycoviolobilin, gebunden an denaturiertes α -PEC aus <i>Mastigocladus laminosus</i>	6,4 M Urea pH 2,8	594 (n.b.)	(Zhao & Scheer 1995)
$\Delta 15,16$ -E-3 ¹ -Cys-Phycoviolobilin, gebunden an denaturiertes α -PEC aus <i>Mastigocladus laminosus</i>	6,4 M Urea pH 2,8	532 (n.b.)	(Zhao & Scheer 1995)
3 ¹ -Cys-Phycourobilin, gebunden an denaturiertes B-PE aus <i>Porphyridium cruentum</i>	8 M Urea pH 1,9	495 (104)	(Glazer & Hixson 1977)
3 ¹ -Cys-Phycoviolobilin-haltiges Peptid; tryptisch verdautes α -PEC aus <i>Mastigocladus laminosus</i>	10 mM TFA	590 (38,6)	(Bishop <i>et al.</i> 1987)
3 ¹ -Cys-Mesobiliverdin-haltiges Peptid; tryptisch verdautes rekonstituiertes Mesobiliverdin-Addukt des α -C-PC aus <i>Synechococcus</i> sp.	10 mM TFA	686 (22,7)	(Arciero <i>et al.</i> 1988a)
3 ¹ -Cys-Dihydrobiliverdin-haltiges Peptid; tryptisch verdautes rekonstituiertes Dihydrobiliverdin- Addukt des α -C-PC aus <i>Synechococcus</i> sp.	10 mM TFA	562 (n.b.)	(Arciero <i>et al.</i> 1988a)

^x Dimethylester (Die Absorption der freien Säuren und der Dimethylester der freien Phycobiline stimmten überein, Brandlmeier *et al.* 1981.)

n.b. = nicht bestimmt

**Abbildung 3-1:**

Strukturen der in den Rekonstitutionen eingesetzten Phycobiline, dargestellt in ihrer zyklischen Konformation.

3.1.1 Isolierung von Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin

Die Gallenfarbstoffe PCB und PEB sind Chromophore von Biliproteinen, wie z.B. des Phycocyanins und Phycoerythrins, die beide weit verbreitet sind. So sind Phycocyanine hauptsächlich in Cyanobakterien zu finden, wogegen Phycoerythrine vor allem in Rotalgen, aber auch in Cyanobakterien, vorkommen. Diese beiden Chromophore PCB und PEB können, im Gegensatz zum PVB, dem nativen Chromophor des α -PEC, für das die nachfolgenden Isolierungsmethoden nicht anwendbar sind, leicht vom Protein abgespalten werden. Für die präparative Isolierung dieser Chromophore wurde die Methode nach (O'Carra & O'hEocha 1966) verwendet, bei der die Spaltung der Thioetherbindung mit kochendem Methanol durchgeführt wurde. Dabei handelt es sich um eine Eliminierungsreaktion (Gossauer & Weller 1978).

Für diese Arbeit wurden PCB und PEB aus Lebensmitteln gewonnen:

Das blaue PCB wurde aus *Spirulina (S.) platensis* gewonnen (Kunkel *et al.* 1993), einer Blaualge die als Nahrungsergänzungsmittel im Handel ist. Das rote PEB wurde aus *Porphyra (P.) yezoensis* isoliert (Cheng *et al.* 1990), einer Rotalge, die als Gemüse verzehrt oder als Nori zur Bereitung von Sushi verwendet werden kann. Es war von Vorteil, dass diese Organismen im Lebensmittelhandel käuflich waren, denn dadurch waren sie preisgünstig und eine aufwendige Anzucht war nicht notwendig.

Isolierung von Phycocyanobilin

Größere Mengen an PCB wurden aus der Blaualge *S. platensis* durch Kochen in Methanol isoliert. Die Ausbeute betrug pro 40 g sprühgetrockneter *S. platensis* 50 - 60 mg rohes PCB, dies entspricht ca. 45 - 55 % der in diesen Cyanobakterien enthaltenen PCB-Chromophore des Phycocyanins und des Allophycocyanins. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung des rohen Extrakts wurden 30 - 40 mg reines PCB erhalten, das in den Rekonstitutionen eingesetzt werden konnte. Das aufgereinigte PCB konnte unter Argon oder in DMSO gelöst bei -20 °C mehrere Monate ohne nennenswerten Abbau aufbewahrt werden. Als Nebenprodukt der PCB-Isolierung konnte hauptsächlich ein Chromophor mit den Absorptionsmaxima bei 351nm und 652 nm abgetrennt werden. Bei diesem Produkt, das ca. 20 % des rohen Isolats ausmachte, handelt es sich um das Phycocyanobilin-3¹-Methanol-Addukt, dessen Absorptionsmaxima in der Literatur mit 350 nm und 650 nm angegeben werden und das häufig bei der Methanolspaltung neben dem PCB entsteht (Beuhler *et al.* 1976, Troxler *et al.* 1979).

Isolierung von Phycoerythrobilin

Die Isolierung von PEB aus getrockneter *P. yezoensis* erfolgte mit der gleichen Methode. Bei der methanolischen Abspaltung des PEB ergab sich eine Ausbeute an rohem PEB von 14 - 18 mg pro 50 g Trockengewicht von *P. yezoensis*, was 35 - 45 % des Gesamt-PEB-Gehalts dieser Algen entspricht. Nach der Aufreinigung wurden ca. 8 - 10 mg reines PEB erhalten, das unter Argon oder in DMSO gelöst bei -20 °C mehrere Monate stabil war.

3.1.2 Darstellung von Phytochromobilin aus Phycoerythrobilin

Da das Phytochrom und somit sein Chromophor das Phytochromobilin (PΦB), nur in sehr geringen Mengen in Pflanzen vorkommen, ist eine Isolierung größerer Mengen sehr aufwendig. PΦB wurde daher durch chemische Modifikation von PEB dargestellt. Diese beiden Chromophore unterscheiden sich nur durch eine zusätzliche Doppelbindung des PΦB an Δ15,16. Durch Oxidation mit FeCl₃ ist es möglich, diese Doppelbindung in das PEB einzuführen (O'hEocha *et al.* 1961, Cornejo *et al.* 1992). Die hier verwendete Methode für die Darstellung des PΦB aus PEB, bei der die Methylenbrücke zwischen Ring C und D des PEB durch FeCl₃ zur Methinbrücke oxidiert wird (Abbildung 3-2), wurde von Maisch und Rüdiger entwickelt (unveröffentlicht) und im Rahmen dieser Arbeit optimiert.

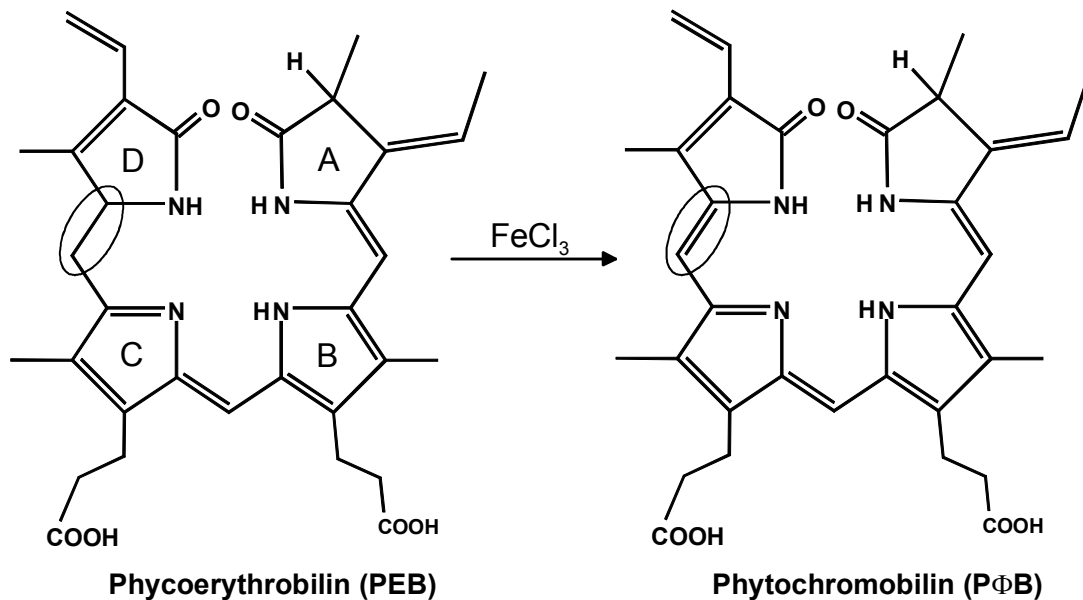


Abbildung 3-2:

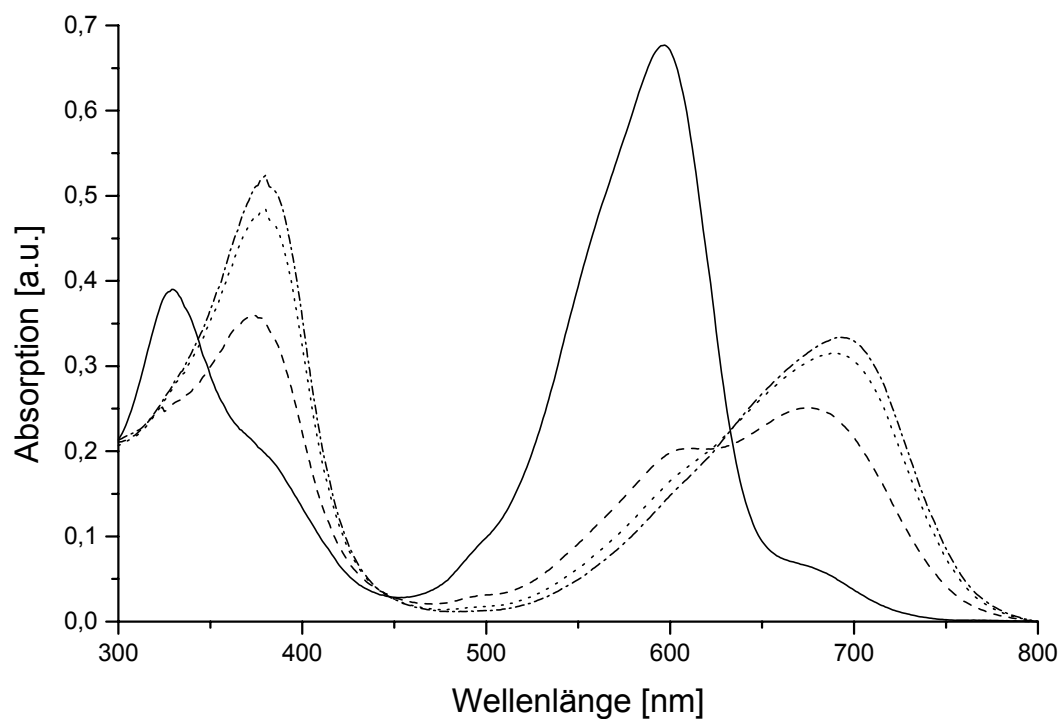
Darstellung von Phytochromobilin aus Phycoerythrobilin durch Oxidation mit FeCl₃.

Abbildung 3-3 zeigt den Reaktionsverlauf der Oxidation des PEB über einen Zeitraum von 90 Minuten. Das Maximum des PEB bei ca. 594 nm verschwand und ein neues langwelliges Maximum bei 693 nm entstand. Bei der Umsetzung kam es zur Bildung von 3 Produkten, die chromatographisch voneinander getrennt werden konnten. Bei der Trennung durch Dünnschichtchromatographie auf RP-8-Material mit dem Laufmittel 2-Propanol : 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 2,1 (40 : 60) ergaben sich für die 3 Produkte folgende R_f-Werte:

Produkt 1_{PΦB} : 0,42

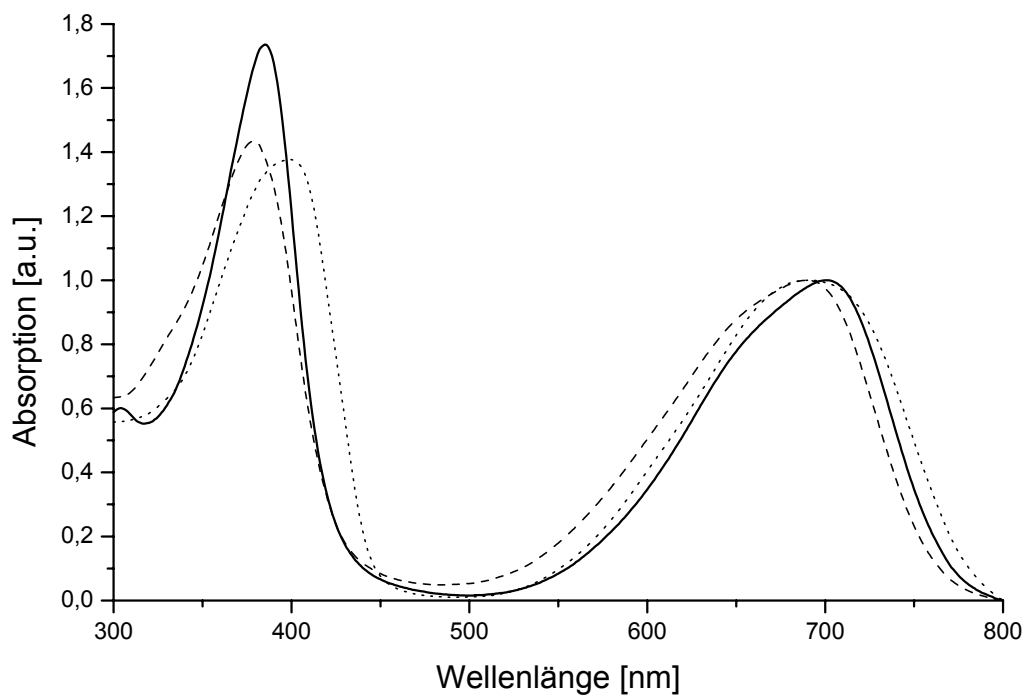
Produkt 2_{PΦB} : 0,36

Produkt 3_{PΦB} : 0,30.

**Abbildung 3-3:**

Umsetzung von PEB zu P Φ B durch Oxidation mit FeCl₃.

PEB vor Umsetzung (—), nach 30 min (-----), 60 min (·····) und 90 min (-·-·-·-) Reaktionszeit. Die Spektren wurden in MeOH / 2 % HCl aufgenommen.

**Abbildung 3-4:**

Absorptionsspektren der 3 aufgereinigten Produkte 1_{PΦB} (-----), 2_{PΦB} (·····) und 3_{PΦB} (—), die bei der Oxidation von PEB mit FeCl₃ entstehen, gemessen in MeOH / 2 % HCl.

In Abbildung 3-4 sind die Absorptionsspektren in MeOH / 2 % HCl der 3 Produkte $1_{P\Phi B}$, $2_{P\Phi B}$ und $3_{P\Phi B}$ dargestellt. Das Produkt $1_{P\Phi B}$ wies Absorptionsmaxima bei 378 nm und 689 nm auf und $2_{P\Phi B}$ zeigte Maxima bei 399 nm und 690 nm. Aus der Literatur sind Gallenfarbstoffe mit diesen spektralen Eigenschaften nicht bekannt.

Das Produkt $3_{P\Phi B}$ besaß als Absorptionsmaxima 384 nm und 702 nm, und das Verhältnis des kurzwelligen zum langwelligen Maximum betrug 1,6. Dies stimmt gut mit den Literaturwerten für das P Φ B überein (Weller & Gossauer 1980, Cornejo *et al.* 1992).

Tabelle 3-2:

Haupt- und Nebenpeaks der Massenspektren der 3 Produkte, die bei der Oxidation von PEB mit FeCl₃ entstanden sind.

Verbindung	Hauptpeak M ⁺ [m/z] (100 %)	Nebenpeaks M ⁺ [m/z] (%)
$1_{P\Phi B}$	585,3	269,1 (7)
$2_{P\Phi B}$	601,3	269,1 (16); 587,4 (28)
$3_{P\Phi B}$	585,3	269,1 (22)

Von allen drei Produkten wurden Massenspektren aufgenommen. Die ausgeprägtesten Peaks sind in Tabelle 3-2 eingetragen. Das Massenspektrum von $1_{P\Phi B}$ wies einen deutlichen Peak bei m/z 585,3 auf, also bei der Masse, bei der das P Φ B (monoisotopische Masse: 584,26 Da) zu erwarten ist. Allerdings unterscheidet sich das Absorptionsspektrum dieses Pigments deutlich von dem des P Φ B. Das Massenspektrum von $2_{P\Phi B}$ dagegen zeigte zwei Peaks, einen bei m/z 601,3 mit einer Intensität von 100 % und einen zweiten bei m/z 587,4 mit geringerer Intensität. Bei dem Massepeak m/z 587 kann es sich nicht um das Edukt PEB handeln, das bei dieser Masse erscheinen müsste, denn im Absorptionsspektrum ist keine Absorption bei 600 nm, bei der das PEB absorbieren würde, zu erkennen. Es könnte sich dabei entweder um ein weiteres Nebenprodukt, das nicht von $2_{P\Phi B}$ abgetrennt werden konnte, oder um ein Abbauprodukt von $2_{P\Phi B}$ handeln, das während der Probenvorbereitung oder der Massenspektroskopie entstanden ist. Der Peak bei 601,3 ergäbe sich aus der Masse des P Φ B und einem zusätzlichen Sauerstoff. Das Produkt $3_{P\Phi B}$, dessen Absorptionsspektrum dem des Phytochromobilins gleicht, zeigte im Massenspektrum einen Molekül-Peak m/z von 585,3, was mit der errechneten Molekülmasse für das Phytochromobilin von 584,7 Da übereinstimmt. Ein Peak bei m/z 269,1, der in allen drei Massenspektren zu erkennen war, dürfte vom Oxidationsmittel FeCl₃ * 6 H₂O (monoisotopische Masse: 268,90) stammen.

Um zu überprüfen, ob bei der Oxidation von PEB mit FeCl₃ P Φ B entstanden ist, und um die Struktur der Nebenprodukte aufzuklären, wurden von den drei Produkten ¹H-NMR-Spektren

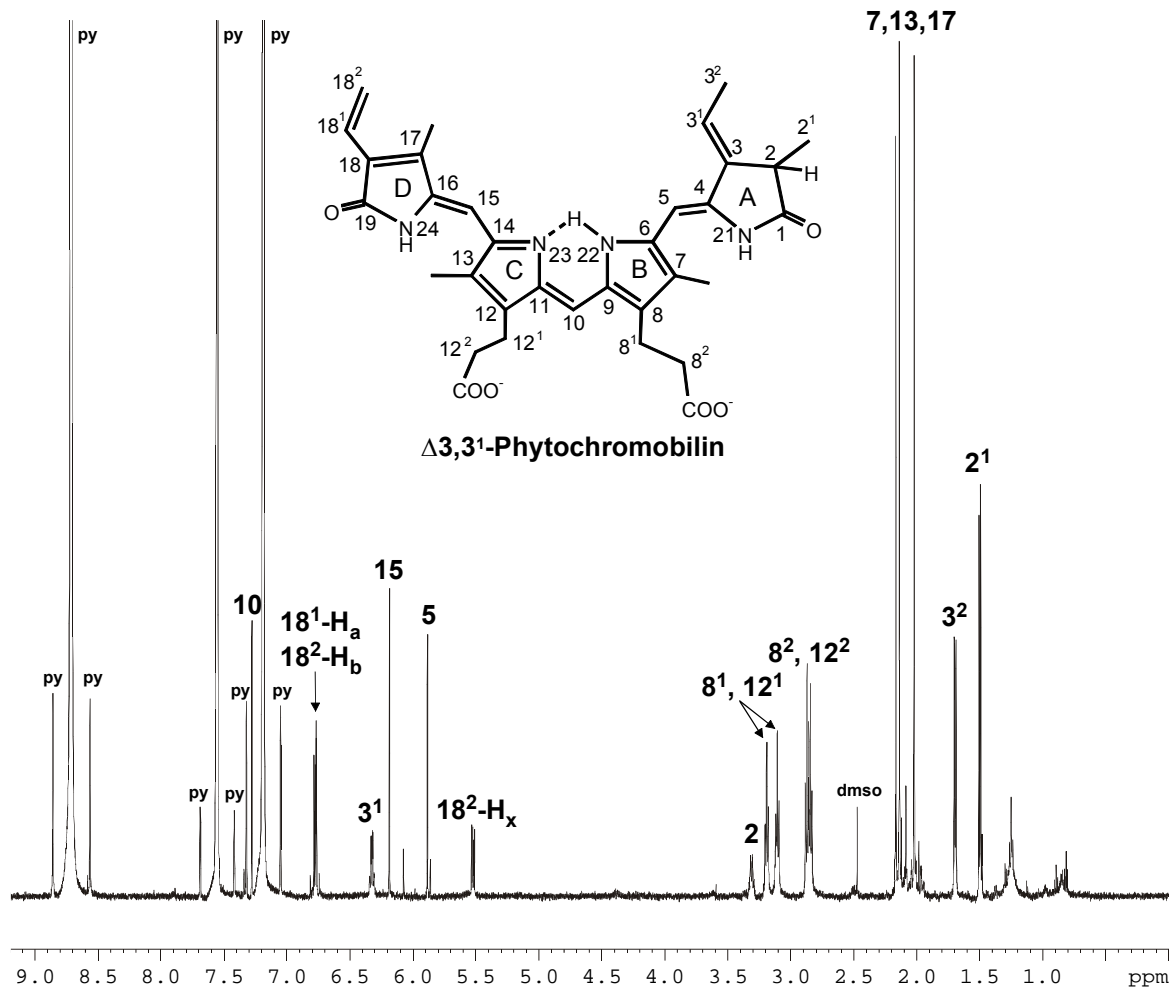
von Dr. Rainer Haeßner (Technische Universität München, Garching) auf einem 600 MHz-Gerät (DMX-600, Bruker, Karlsruhe) aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde Pyridin-*d*5 verwendet.

Tabelle 3-3:

¹H-NMR-Daten (in Pyridin-*d*5) der 3 Produkte, die bei der Oxidation von PEB entstanden sind, im Vergleich mit Δ 3,3¹-E-Phytochromobilin (3E-P Φ B) (Terry *et al.* 1995).

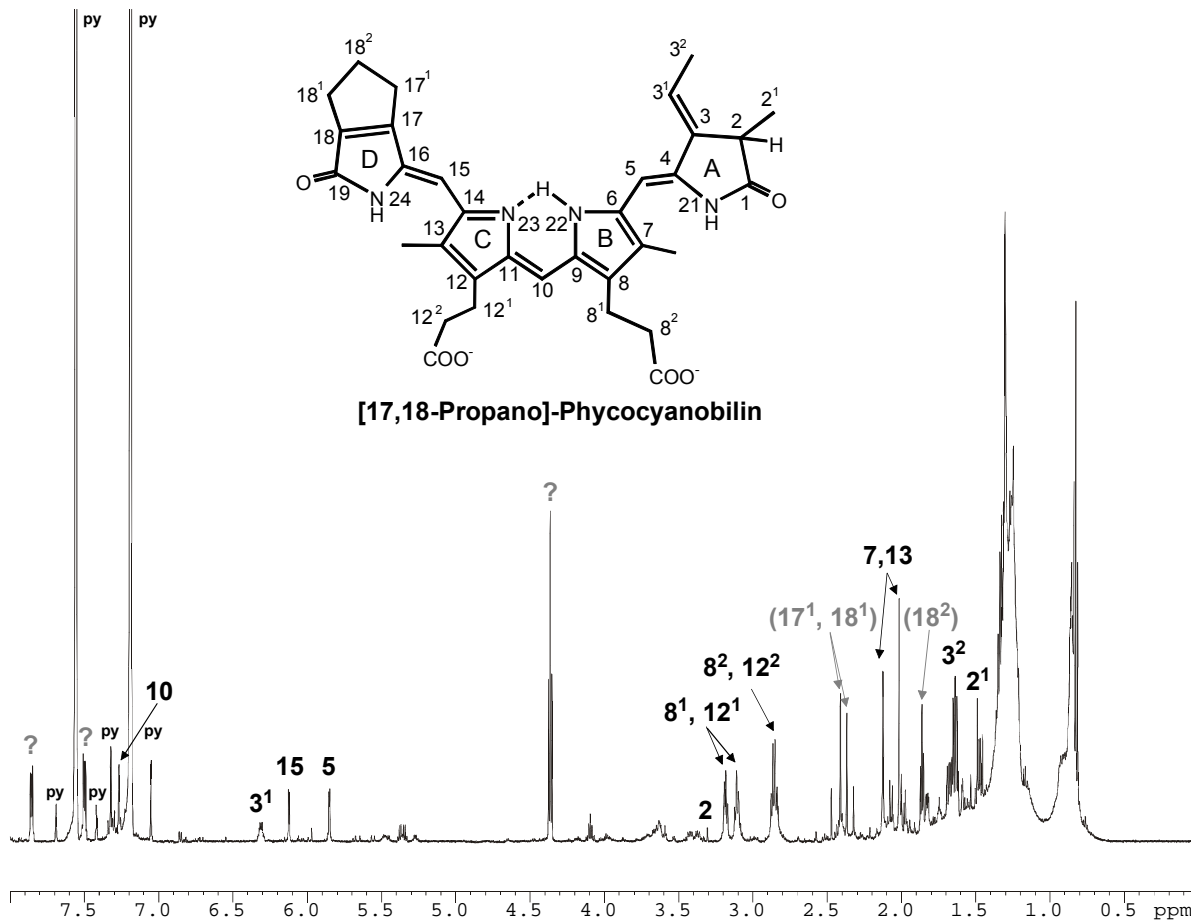
Proton	3E-P Φ B	1 _{PΦB}	2 _{PΦB}	3 _{PΦB}
2 ¹ -CH ₃	1,50	1,49	1,46	1,49
3 ² -CH ₃	1,69	1,67	1,70	1,70
18 ² -CH ₂		1,86		
7 ¹ -,13 ¹ -,17 ¹ -CH ₃	2,02 2,14 2,17		2,00 2,15 <u>2,63</u>	2,02 2,14 2,17
7 ¹ -,13 ¹ -CH ₃		2,00 2,13		
17 ¹ -,18 ¹ -CH ₂		2,37 2,41		
?			2,83	
8 ² , 12 ² -H	2,86	2,86	2,87	2,86
8 ¹ , 12 ¹ -H	3,12 3,18	3,11 3,17	3,09 3,18	3,11 3,19
2-H	3,31	3,33	3,33	3,31
?		4,37		
18 ² -H _x	5,52			5,52
5-H	5,89	5,85	5,84	5,88
15-H	6,19	6,12	<u>6,37</u>	6,19
3 ¹ -H	6,33	6,30	6,36	6,32
18 ² -H _b	6,76			3,77
18 ¹ -H _a	6,78			6,78
10-H	7,28	7,26	7,22	7,28

Signale die nicht (mit ? gekennzeichnet) oder nur unter Vorbehalt bestimmten Protonen zugeordnet werden konnten, sind grau unterlegt. Signale die im Vergleich zum 3E-P Φ B stark verschoben sind, sind unterstrichen.

**Abbildung 3-5:**

600 MHz ^1H -NMR-Spektrum von $3_{\text{P}\Phi\text{B}}$, das als $\Delta 3,3^1$ -E-Phytochromobilin identifiziert werden konnte, gemessen in Pyridin- d_5 . Das Spektrum ist hinsichtlich der Kernresonanz von H_2O korrigiert. (py = Pyridin- d_5 , dmsol = Dimethylsulfoxid)

Das ^1H -NMR-Spektrum des Produktes $3_{\text{P}\Phi\text{B}}$ (Abbildung 3-5) stimmte exakt mit dem ^1H -NMR-Spektrum des $\Delta 3,3^1$ -E-Phytochromobilin ($3\text{E-P}\Phi\text{B}$) überein (Terry *et al.* 1995). Da dieses Produkt auch in seiner Masse und seiner Absorption mit dem $\text{P}\Phi\text{B}$ übereinstimmt, handelt es sich beim Produkt $3_{\text{P}\Phi\text{B}}$ eindeutig um $\text{P}\Phi\text{B}$. Bei der Oxidation von PEB durch FeCl_3 und der anschließenden Chromatographie auf RP-8 konnte, wie die NMR-Spektroskopie zeigte, das $\text{P}\Phi\text{B}$ isomerenrein als $3\text{E-P}\Phi\text{B}$ gewonnen werden. Als größere Verunreinigung konnte im NMR-Spektrum lediglich DMSO ($\delta = 2,47$) detektiert werden, das in der Umsetzung als Lösungsmittel verwendet wurde. Da jedoch bei der Rekonstitution das $\text{P}\Phi\text{B}$ in DMSO gelöst eingesetzt wird, spielt diese Verunreinigung für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit keine Rolle.

**Abbildung 3-6:**

600 MHz ^1H -NMR-Spektrum von $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$, bei dem es sich um [17,18-Propano]-Phycocyanobilin handeln könnte, gemessen in Pyridin- d_5 . Das Spektrum ist hinsichtlich der Kernresonanz von H_2O korrigiert. Signale, die nicht (mit ? gekennzeichnet) oder nur unter Vorbehalt (in Klammern) Protonen zugeordnet werden konnten, sind grau markiert. (py = Pyridin- d_5 , dms = Dimethylsulfoxid)

Im NMR-Spektrum (Abbildung 3-6) des Produktes $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ war das Signal für das Proton an der 15-Methinbrücke ($\delta = 6,12$) vorhanden. Bei $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ wurde demnach die $\Delta 15,16$ -Einfachbindung des PEB durch FeCl_3 zur Doppelbindung oxidiert. Dagegen waren die Signale der 18-Vinylgruppe des PEB (18^1-H_a , 18^2-H_b , 18^2-H_x) nicht vorhanden. Auch fehlte ein Signal im Bereich der CH_3 -Gruppen an 7^1 , 13^1 , 17^1 . Dabei ist es am wahrscheinlichsten, dass das Signal für 17^1-CH_3 fehlt. Es dürfte also bei diesem Produkt zu einer Modifikation des D-Rings gekommen sein. Die Signale der übrigen Protonen des $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ stimmen mit denen des $3\text{E-P}\Phi\text{B}$ überein und weisen sehr ähnliche chemische Verschiebungen auf. Das Produkt $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ dürfte demnach eine Struktur aufweisen, die der des PCB und des $\text{P}\Phi\text{B}$ ähnelt und sich lediglich an C-17 und C-18 unterscheidet. Berücksichtigt man die Masse und die Absorption von $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ so ist eine Struktur am naheliegendsten, bei der sich am D-Ring aus der 18-Vinylgruppe und der 17-Methylgruppe ein isocyclischer Ring gebildet hat. Bei diesem Bilin würde es sich um das [17,18-Propano]-Phycocyanobilin ([17,18-Propano]-PCB) handeln. Die Struktur ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Den Protonen an 17^1 und 18^1 könnten die Signale bei $\delta = 2,37$

bzw. 2,41, den Protonen an 18² dem Signal bei $\delta = 1,856$ zugeordnet werden. Allerdings erscheinen im Spektrum noch Signale, die nicht zugeordnet werden konnten (mit ? markiert). Am auffälligsten ist dabei das Signal bei einer chemischen Verschiebung mit $\delta = 4,37$. Da das Signal deutlich stärker als die Signale des Bilins war, dürfte es nicht vom Produkt 1_{P_{ΦB}} stammen, sondern von einer Verunreinigung herrühren, die jedoch nicht identifiziert werden konnte.

Auch im NMR-Spektrum (Abbildung 3-7) des Produktes 2_{P_{ΦB}} war das Signal für das Proton der 15-Methinbrücke ($\delta = 6,37$) vorhanden, d.h. auch bei 2_{P_{ΦB}} kam es zu einer Oxidation an $\Delta 15,16$ des PEB durch FeCl₃.

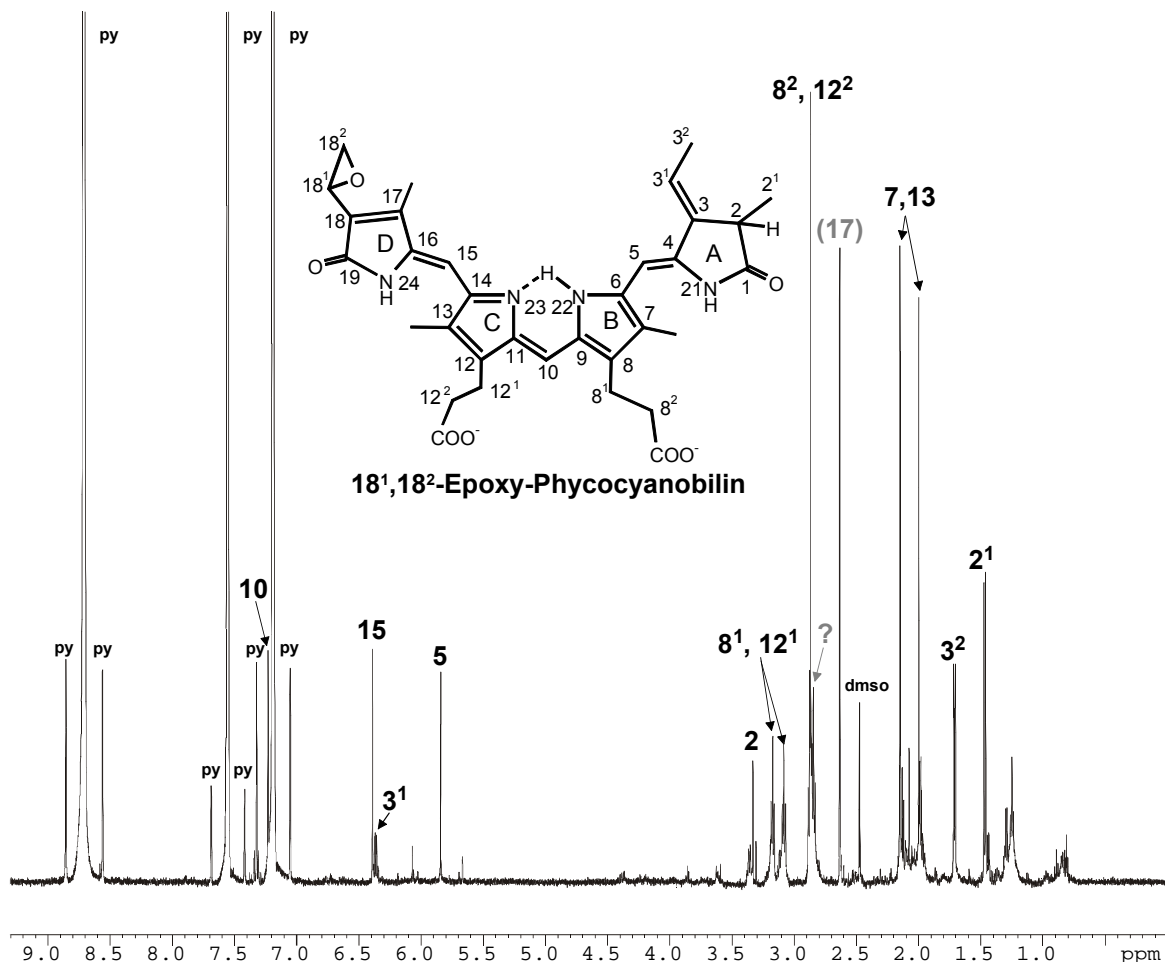


Abbildung 3-7:

600 MHz ¹H-NMR-Spektrum von 2_{P_{ΦB}}, bei dem es sich um 18¹,18²-Epoxy-Phycocyanobilin handeln könnte, gemessen in Pyridin-*d*₅. Das Spektrum ist hinsichtlich der Kernresonanz von H₂O korrigiert. Signale, die nicht (mit ? gekennzeichnet) oder nur unter Vorbehalt (in Klammern) Protonen zugeordnet werden konnten, sind grau markiert. (py = Pyridin-*d*₅, dmsol = Dimethylsulfoxid)

Die Signale der 18-Vinylgruppe des PEB waren (18^1-H_a , 18^2-H_b , 18^2-H_x) nicht vorhanden. Das Signal für die Protonen der 17^1 -Methylgruppe war, wie auch für das Proton der 15-Methinbrücke, im Vergleich zum NMR-Spektrum des PΦB deutlich tieffeldverschoben. Die Signale der übrigen Protonen des $2_{\text{P}\Phi\text{B}}$ stimmen mit denen des $3\text{E-P}\Phi\text{B}$ in ihrer chemischen Verschiebung weitgehend überein. Auch bei $2_{\text{P}\Phi\text{B}}$ dürfte es, wie bei $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$, lediglich neben der Oxidation an $\Delta 15,16$ zu einer Modifikation des D-Rings gekommen sein. Berücksichtigt man die Absorption und die Masse von $2_{\text{P}\Phi\text{B}}$, die um 16 größer ist als die Masse des PΦB, so scheint eine Struktur denkbar, bei der am D-Ring die Doppelbindung der 18-Vinylgruppe des PEB zu einer Epoxy-Gruppe oxidiert wurde. Bei diesem Bilin würde es sich um das $18^1,18^2$ -Epoxy-Phycocyanobilin ($18^1,18^2$ -Epoxy-PCB) handeln. Die Struktur ist in Abbildung 3-7 dargestellt. Die Epoxy-Gruppe würde auch die Verschiebung der Signale für 15-H und 17^1-CH_3 erklären, denn der elektronegative Sauerstoff entschirmt diese Protonen, wodurch deren Signale tieffeldverschoben werden. Das Signal bei $\delta = 2,83$ könnte der 18^2-CH_2 -Gruppe zugeordnet werden. In diesem Bereich zeigen Protonen einer CH_2 -Gruppe, die einem ringständigen Sauerstoff benachbart sind, Signale (Gordon & Ford 1972).

Die Oxidation von PEB durch FeCl_3 und die anschließende Chromatographie auf RP-8 ist eine geeignete Methode um PΦB in guter Reinheit zu gewinnen. Die Ausbeuten betragen dabei für das $3\text{E-P}\Phi\text{B}$, das isomerenrein gewonnen werden konnte, ca. 15 %. Als Nebenprodukte dieser Reaktion könnten das [17,18-Propano]-PCB und das $18^1,18^2$ -Epoxy-PCB entstanden sein. Für diese Verbindungen sind keine Extinktionskoeffizienten vorhanden. Geht man jedoch davon aus, dass deren Extinktionskoeffizient ähnlich dem des PCB ist, so ergeben sich Ausbeuten zwischen 5 und 8 %.

Das $3\text{E-P}\Phi\text{B}$ und die beiden Nebenprodukte waren jedoch im Gegensatz zu PCB und PEB sehr instabil. Selbst unter Argon bei -70°C konnten sie höchstens eine Woche aufbewahrt werden, bevor der Abbau zu massiv wurde. Die Pigmente wurden daher möglichst bald nach ihrer Darstellung und Aufreinigung in den Rekonstitutionen eingesetzt.

3.1.3 Einfluss von Detergens auf Phycocyanobilin und Phycoerythrobilin

Da die Phycobiline, vor allem die freien Säuren, schlecht wasserlöslich sind und die Rekonstitutionen in wässrigem Medium durchgeführt wurden, wurden die Biline in DMSO gelöst zugegeben. Zum Teil wurden in den Rekonstitutionen auch Detergentien, wie Triton X-100 eingesetzt, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Tatsächlich wurde dadurch auch eine Verdopplung der Rekonstitutionsgeschwindigkeit beobachtet. Triton X-100 hatte jedoch auch Einfluss auf die Chromophorbindung, der sich darin äußerte, dass bestimmte

Rekonstitutionsprodukte vermehrt gebildet wurden (Zhao *et al.* 2002). Der Einfluss von Triton X-100 auf Phycobiline zeigte sich auch an den Änderungen der Absorption, der Fluoreszenz und des Circular dichroismus nach Zugabe des Detergens.

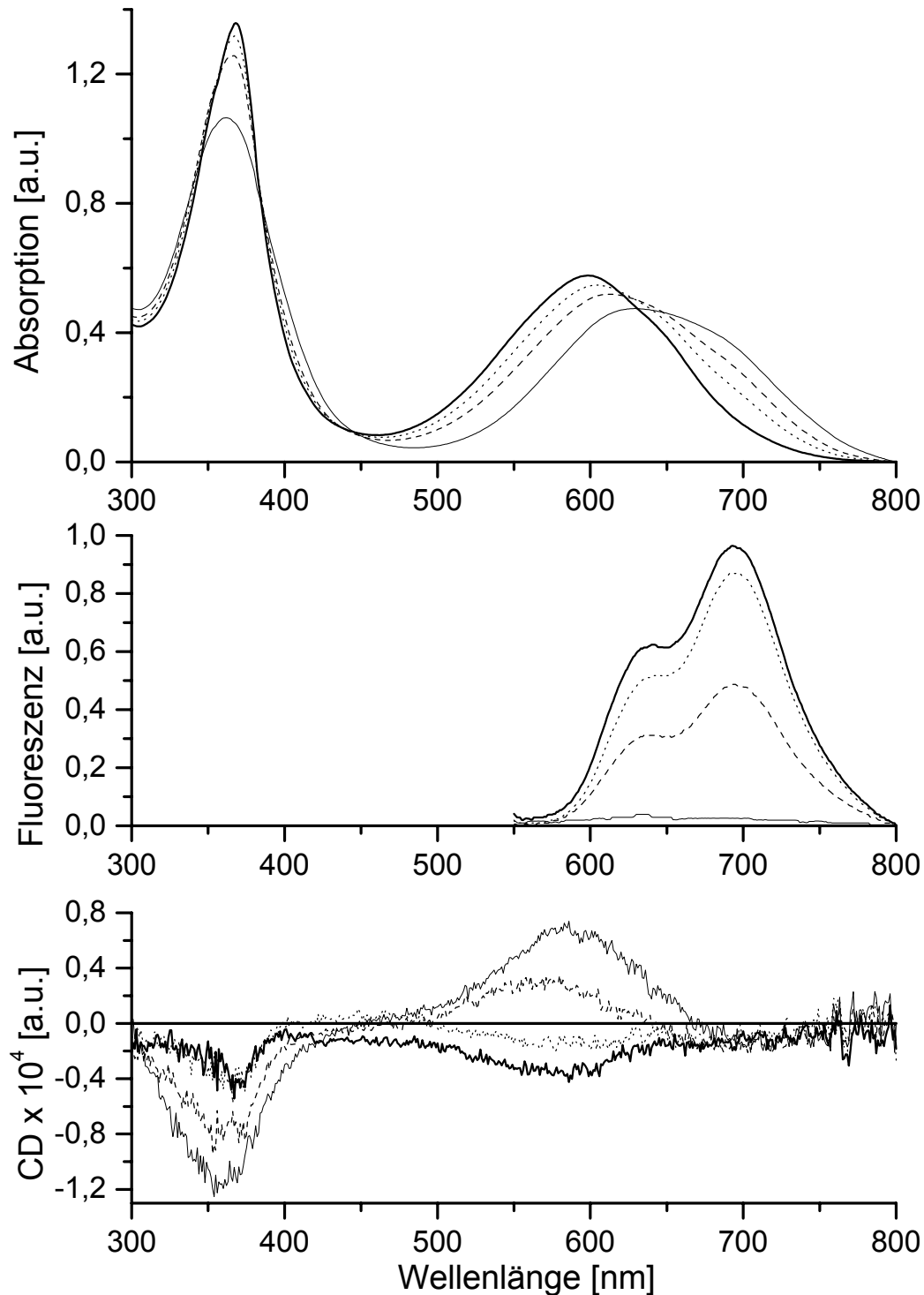


Abbildung 3-8:

Interaktion von PCB mit Triton X-100. PCB in H₂O / 1 % DMSO gelöst (—), nach Zugabe von 0,10 % (---), 0,25 % (·····) und 1,0 % (— · —) Triton X-100.

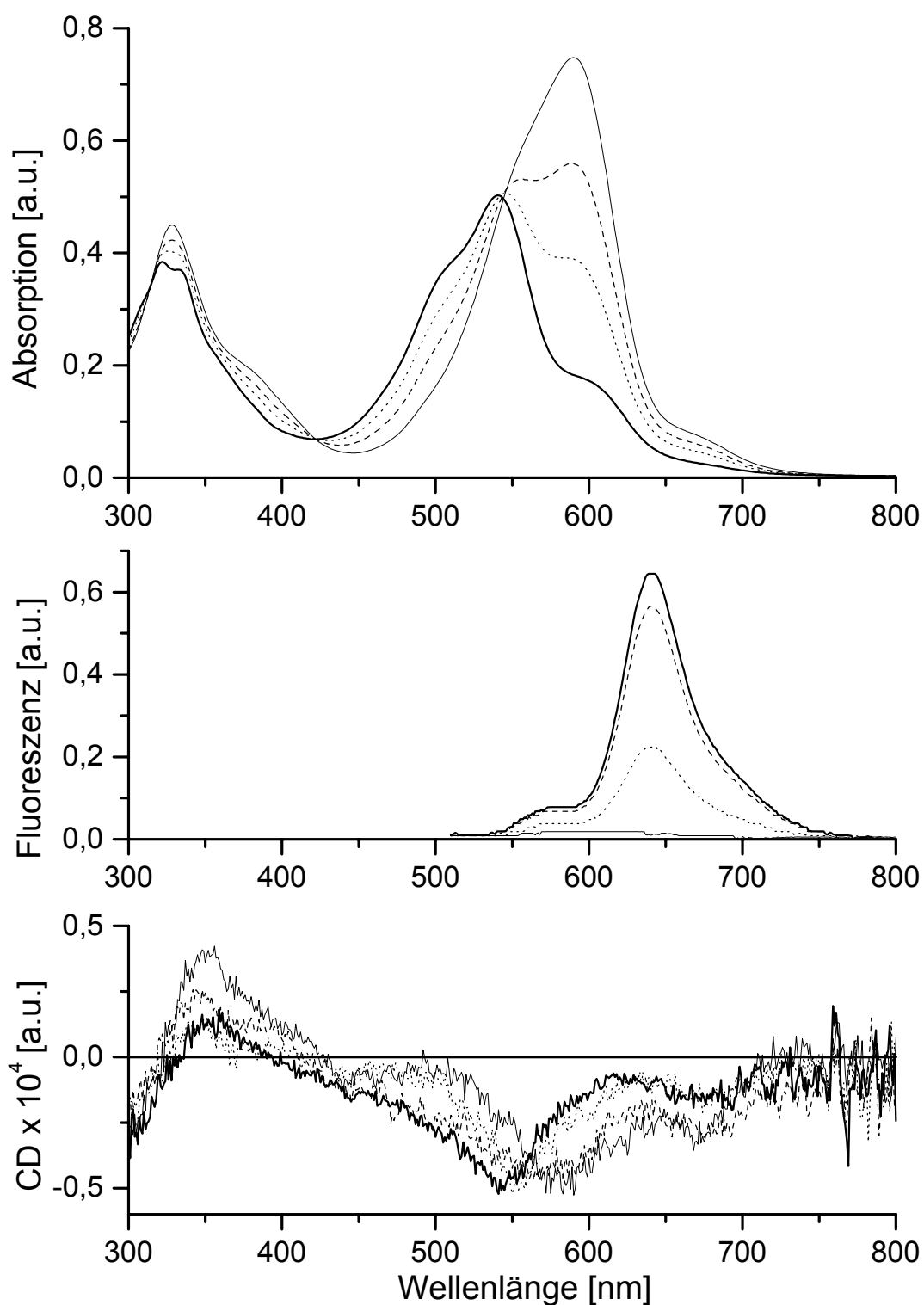
oben: Absorptionsspektren; mitte: Fluoreszenzanregungsspektren ($\lambda = 520$ nm); unten: CD-Spektren

Bei Zugabe von mehr als 1 % Triton X-100 kam es zu keinen weiteren nennenswerten spektralen Verschiebungen. Die selben spektralen Veränderungen waren auch bei Zugabe des Detergens LDAO (N-Dodecyl-N,N-dimethylaminoxid) zu beobachten. Allerdings reichte dafür eine Zugabe von 0,04 % LDAO. Die Gallenfarbstoffe waren jedoch in Anwesenheit von LDAO, im Gegensatz zu Triton X-100, nicht stabil, innerhalb von 48 h kam es zu einem weitgehend vollständigen Abbau des PCB, vermutlich durch Oxidation durch die Aminoxid-Gruppe des Detergens.

Die Zugabe von Triton X-100 bewirkt eine deutlichen Änderungen des Absorptionsspektrums von PCB. Es kommt zu einer Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums von 629 nm auf 599 nm und zu einer leichten Intensivierung des langwelligen und des kurzwelligen Maximums, die auf die Verschmälerung der Absorptionsbanden zurückgeführt werden kann. Dies weist auf eine Konformationsänderung des Chromophors hin. Allerdings dürfte es sich dabei nicht um eine Streckung des Chromophors handeln, denn dies würde mit einer starken Intensivierung des langwelligen Maximums und einer deutlichen Abnahme des Verhältnisses von kurzwelligem zu langwelligem Maximum einhergehen (Scheer & Kufer 1977, Scheer *et al.* 1982, Falk 1989). Die Verschmälerung der Absorptionsbanden zeigt eine Einengung der Konformationsvielfalt an. Durch das Detergens wird also die Flexibilität des Chromophors verringert.

Auch das Auftreten von Fluoreszenz zeigt an, dass der Chromophor durch die Wechselwirkung mit dem Detergens an Flexibilität verliert, wodurch absorbiertes Licht nicht mehr strahlungslos sondern als Fluoreszenz abgegeben wird. Das Fluoreszenzspektrum weist zwei Maxima bei 641 nm und 693 nm auf. Da jedoch die Fluoreszenz-emissionsspektren mit Anregungen bei 640 nm, 660 nm und 695 nm übereinstimmen, stammen die beiden Maxima nicht von verschiedenen Konformationen des PCB sondern ergeben sich durch zwei Schwingungsübergänge bei der Fluoreszenz. Die CD-Spektren, bei denen es zu einer Änderung in der Intensität und zu einer Umkehrung der Absorption kommt, weisen auf Änderungen der helikalen Struktur des PCB hin (Siebzehnrübl 1990), so könnte es zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen rechts- und linkshelikaler Konformation kommen. Durch das Detergens kam es zu keiner Aggregation der Chromophore, die sich durch Auftreten von S-förmigen Banden im CD-Spektrum äußern würde. Solche Banden sind im Spektrum jedoch nicht zu erkennen.

Ähnliche spektrale Veränderungen und damit eine Konformationsänderung eines Gallenfarbstoffes (Biliverdin-Dimethylester) konnten durch Einlagerung der Chromophore in Liposomen erreicht werden (Tegmo-Larsson *et al.* 1981). Auch hier blieb die helikale Struktur des Chromophors erhalten.

**Abbildung 3-9:**

Interaktion von PEB mit Triton X-100. PEB in H₂O / 1 % DMSO gelöst (—), nach Zugabe von 0,10 % (---), 0,25 % (····) und 1,0 % (— · —) Triton X-100.

oben: Absorptionsspektren; mitte: Fluoreszenzanregungsspektren ($\lambda = 490$ nm); unten: CD-Spektren

Die Veränderungen des Spektrums von PEB durch Zugabe von Triton X-100 sind ähnlich deutlich wie beim PCB. Das langwellige Absorptionsmaximum verschiebt sich von 590 nm auf 540 nm, wobei die Intensität der Absorption abnimmt. Das CD-Spektrum verschiebt sich analog zum Absorptionsspektrum, im Gegensatz zum PCB kommt es jedoch hier zu keiner Umkehrung des negativen langwelligen Maximums. Die Form des Absorptions- und CD-Spektrums lässt darauf schließen, dass die helikale Konformation des PEB zwar insgesamt beibehalten blieb, sich jedoch die Konformation, wie z.B. die Lage konjugierten Ringe zueinander, verändert hat. Auch beim PEB wird durch die Zugabe des Detergens eine starke Fluoreszenz induziert, wobei wiederum zwei Schwingungszustände anhand der Schulter bei 575 nm und des Maximums bei 640 nm zu erkennen sind.

Der Einfluss von Triton X-100 wurde auch für die Dimethylester von PCB und PEB getestet. Die spektralen Veränderungen sind in Abbildung 3-10 dargestellt.

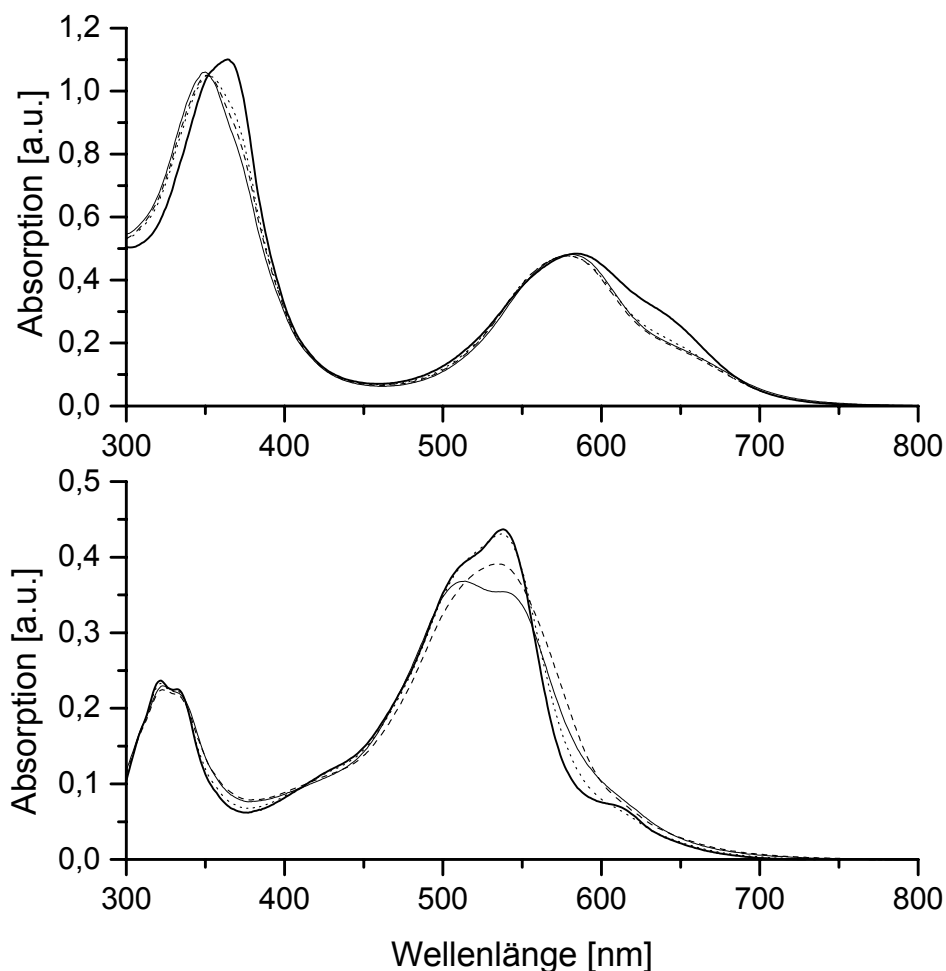


Abbildung 3-10:

Interaktion von PCB-DME (oben) und PEB-DME (unten) mit Triton X-100. Die Dimethylester wurden in H_2O / 1 % DMSO gelöst und die Absorptionsspektren vor (—), nach Zugabe von 0,10 % (-----), 0,25 % (.....) und 1,0 % (——) Triton X-100 aufgenommen.

Die Absorptionsspektren des PCB-Dimethylester (PCB-DME) und des PEB-Dimethylester (PEB-DME) in H₂O/ 1 % DMSO unterschieden sich von den Spektren der freien Säuren. Sie sind deutlich kurzwellig verschoben. Die schlechter wasserlöslichen PCB- und PEB-DME dürften eine deutlich andere Konformation einnehmen als PCB und PEB. Die Zugabe von Triton X-100 bewirkt nun, dass sich die Absorptionsspektren der Dimethylester und der freien Säuren in ihren Maxima und ihrer Form angleichen, was darauf schließen lässt, dass beide in 1 % Triton X-100 ähnliche Konformationen annehmen.

3.2 Darstellung der Proteine durch Expression in *E. coli*:

Die für die Rekonstitutionen notwendigen Proteine konnten durch Expression in *E. coli* gewonnen werden. Neben dem Apoprotein PecA wurden auch die Proteine PecE und PecF durch Überexpression erhalten. Die Gene für diese drei Proteine liegen im *pec*-Operon (Kufer *et al.* 1991, Jung *et al.* 1995; siehe Abbildung 1-6). Die Funktion von PecE und PecF war bei Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, aber es wurde vermutet, dass sie, wie CpcE und CpcF, eine Rolle bei der Chromophorbinding spielen (Fairchild *et al.* 1992, Fairchild & Glazer 1994b, Zhou *et al.* 1992). Es stellte sich im Laufe dieser Arbeit heraus, dass PecE und PecF die zwei Untereinheiten einer neuartigen Lyase-Isomerase sind, welche die Bindung und eine Isomerisierung des Chromophors katalysieren.

3.2.1 Konstruktion und Mutagenese der Expressionsvektoren:

Konstruktion der Expressionsvektoren für PecA und His₆-PecA

Das vollständige *pec*-Operon, das auch das *pecA* Gen enthält, welches für das Apoprotein der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins codiert, stand als genomisches 16 kBp *Sau3A* Fragment in einem EMBL 3 Phagen Vektor (Frischauf *et al.* 1983) zur Verfügung. Für die Klonierung von *pecA* wurde mit einem pUC19 Subklon gearbeitet, der das Gen enthielt. Aus diesem Subklon wurde *pecA* durch PCR amplifiziert. Die Primer für die PCR wurden so gewählt, dass das amplifizierte Genstück mit dem Startcodon ATG begann und am Ende durch PCR-Mutagenese hinter dem Stopcodon eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *HindIII* entstand. Nach der PCR wurde die DNA mit T4 Polynukleotid-Kinase behandelt und mit der Restriktionsendonuklease *HindIII* geschnitten. So entstand ein Fragment (493 Bp),

das am N-Terminus ein „blunt end“ und am C-Terminus ein „sticky end“ besitzt und somit gerichtet in den entsprechend geschnittenen Expressionsvektor kloniert werden konnte.

Um das Apoprotein PecA zu erhalten, sollten nun zwei verschiedene Expressionsvektoren konstruiert werden, nämlich ein Vektor für die Expression von *pecA*, das für das native α -PEC-Apoproteins (PecA) codiert, und ein Vektor für die Expression eines Gens (*his₆-pecA*), das für ein Fusionsproteins aus PecA und der N-terminalen Tag-Region von pET30a (His₆-PecA) codiert. Diese Tag-Region codiert für 47 Aminosäuren und enthält ein His₆-Tag, eine Thrombin-Schnittstelle, ein S-Tag und eine Enterokinase-Schnittstelle. Diese Tag-Region wird aufgrund ihres für diese Arbeit wichtigsten Bestandteils, dem His₆-Tag, im Folgenden mit His₆ abgekürzt.

Expressionsvektor für PecA

Für die Klonierung des Expressionsvektors zur Darstellung des nativen Apo- α -PEC wurde der Vektor pET30a zunächst mit *NdeI* geschnitten, einem Restriktionsenzym, das ein 5'-überhängendes Ende erzeugt. Anschließend wurde Mung Bean Nuklease eingesetzt, um den 5'-Überhang abzubauen, wodurch ein „blunt end“ entsteht, das für die Ligation mit dem *pecA*-PCR-Fragment notwendig ist. Die Ligation mit dem zusätzlich mit *HindIII* geschnittenen Vektor wurde mit der T4-Ligase bei 4 °C über Nacht durchgeführt.

Expressionsvektor für His₆-PecA

Für die Konstruktion des Expressionsvektors für His₆-PecA wurde nach der Restriktion von pET-30a mit *EcoRV*, einem Restriktionsenzym, das ein „blunt end“ erzeugt, und *HindIII* eine Ligation mit dem *HindIII* geschnittenen *pecA*-PCR-Fragment durchgeführt.

Beide Konstrukte wurden durch Restriktions- und Sequenzanalyse überprüft.

3.2.2 Expressionsvektoren für die Mutanten von His₆-PecA

Es wurden Expressionsvektoren für verschiedene Mutanten von His₆-PecA kloniert, bei denen ein oder zwei Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden. Die Mutagenesen wurden mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, NL) durchgeführt.

Folgende Mutanten wurden hergestellt:

His₆-PecA-C84S (Cystein 84 ausgetauscht gegen Serin),

His₆-PecA-C98S (Cystein 98 ausgetauscht gegen Serin),

His₆-PecA-C99S (Cystein 99 ausgetauscht gegen Serin),

His₆-PecA-C98S-C99S (Cystein 98 und 99 ausgetauscht gegen Serin).

Die Mutationen wurden durch Sequenzierung nachgewiesen.

3.2.3 Expressionsvektoren für PecE, PecF, His₆-PecE, His₆-PecF

Die Expressionsplasmide für PecE und PecF, den beiden Untereinheiten der Lyase-Isomerase, wurden von Prof. Kai-Hong Zhao und seinen Mitarbeitern vom College of Life Sciences and Technology in Wuhan (China) konstruiert (Zhao *et al.* 2000, Storf *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2002). Als Expressionsplasmide für die ungetaggtten Apoproteine PecE und PecF dienten pGEMEX-Plasmide. Allerdings codierten diese beiden Vektoren für am N-Terminus um 8 Aminosäuren (MEQNPQSQ) verlängerte Apoproteine der beiden Untereinheiten der Lyase-Isomerase.

Die Vektoren für His₆-PecE und His₆-PecF wurden konstruiert indem *pecE* und *pecF* in den pET30a-Vektor kloniert wurden. Diese Expressionsplasmide codierten dann für Fusionsproteine aus der N-terminalen Tag-Region (47 AS, enthält His₆-Tag, Thrombin-Schnittstelle, S-Tag und Enterokinase-Schnittstelle) und des Proteins für die jeweilige Untereinheit der Lyase-Isomerase.

3.3 Genexpression und Aufreinigung der Proteine:

Um die Proteine durch Genexpression zu erhalten, wurde der *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) mit den Expressionsvektoren transformiert.

3.3.1 Darstellung der Apoproteine durch Expression in *E. coli*

Das Apoprotein wurde zum einen als Fusionsprotein (His₆-PecA), bestehend aus einer Tag-Region und PecA, und zum anderen mit der nativen Sequenz (PecA) durch Expression in *E. coli* gewonnen. Nach der Induktion der Expression mit IPTG wurden die Expressionskulturen für His₆-PecA und PecA nach 3 h geerntet. Für das getaggte Fusionsprotein His₆-PecA, das etwas besser löslich war als PecA, zeigte sich eine etwas bessere Expressionsrate. Pro Liter Expressionsansatz konnte so 60 -100 mg His₆-PecA und für 40 - 80 mg PecA gewonnen werden. Die Ausbeute an Expressionsprodukt wurde für His₆-PecA, nach der Aufreinigung, mit Hilfe eines Proteinassays ermittelt. Für PecA, das nicht aufgereinigt werden konnte, wurde die Ausbeute aufgrund des Coomassie-gefärbten SDS-Gels ermittelt.

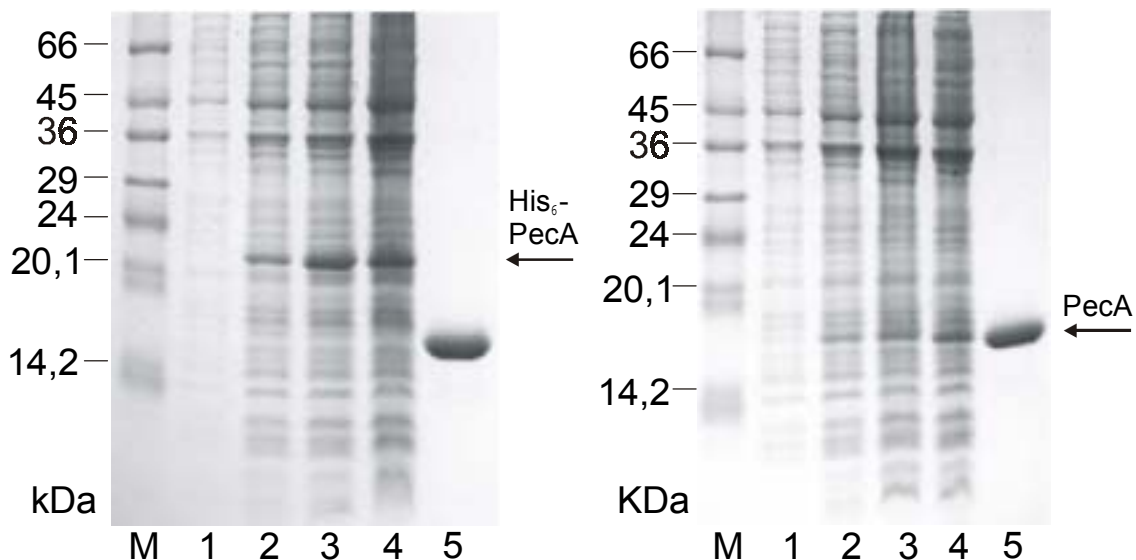


Abbildung 3-11:

SDS-PAGE der Expressionsverläufe für His₆-PecA (links) und PecA (rechts).

Spuren 1 - 4: Expressionen vor und 1 h, 2 h, 3 h nach Induktion

Spuren 5: natives α -PEC aus *M. laminosus*

Spuren M: Proteinmarker SDS 7

Im SDS-Gel ist deutlich die Induktion der Expression und die Akkumulierung der exprimierten Proteine über 3 h hinweg zu erkennen. Anhand der Expressionsbanden ist gut zu erkennen, dass bei der Expression in *E. coli* mehr getaggtetes Protein His₆-PecA als natives PecA gewonnen werden konnte. Die aus der SDS-PAGE ermittelten Werte von His₆-PecA (ca. 22 kDa) und PecA (ca. 17 kDa) stimmen mit den errechneten Werten für His₆-PecA (22783 Da) und PecA (17564 Da) überein.

3.3.2 Darstellung der Lyase-Isomerase-Untereinheiten durch Expression in *E. coli*

Die Genexpressionen zur Darstellung der getaggtten (His₆-PecE, His₆-PecF) und der ungetaggtten Lyase-Isomerase-Untereinheiten (PecE, PecF) wurden über einen Zeitraum von 5 h durchgeführt. Die Ausbeute pro 1 Liter Expressionsansatz lag für His₆-PecE und PecE bei 25 - 50 mg und für His₆-PecF bei 15 - 30 mg. Die Ausbeuten wurden für die getaggtten Proteine durch einen Protein-Assay nach der Aufreinigung, für das ungetaggte PecE anhand der gefärbten Bande im SDS-Gel ermittelt. Die Ausbeute für PecF war nicht zu ermitteln, da die Expression sehr gering und die Bande im SDS-Gel nicht deutlich zu erkennen war.

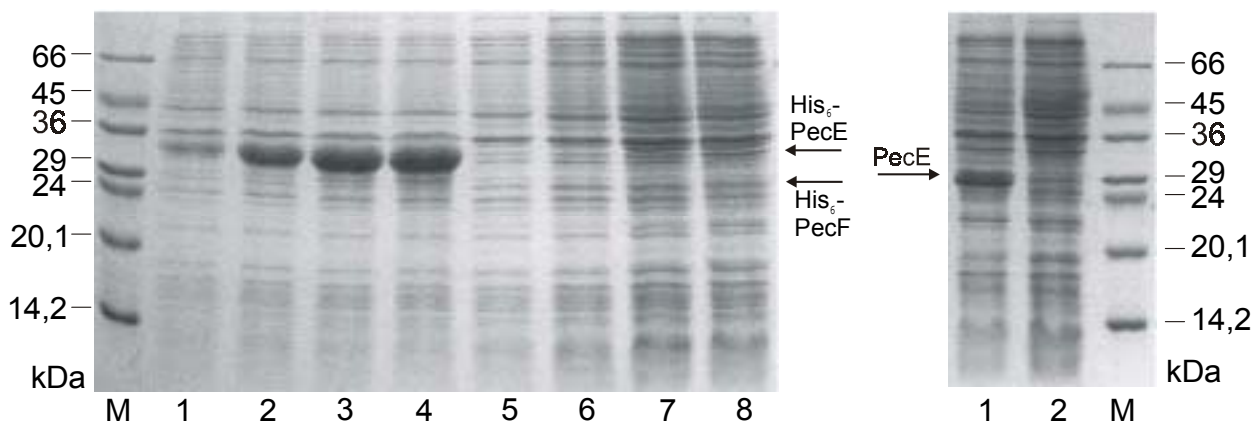


Abbildung 3-12:

SDS-PAGE der Expression der Lyase-Isomerase-Untereinheiten. In den Spuren wurde jeweils Protein aus 100 µl Expressionskultur aufgetragen.

links: Spuren 1 - 4: Expression von His₆-PecE vor und 1 h, 3 h, 5 h nach Induktion

Spuren 5 - 8: Expression von His₆-PecF vor und 1 h, 3 h, 5 h nach Induktion

rechts: Spur 1: Expression von PecE nach 5 h

Spur 2: Expression von PecF nach 5 h

Spuren M: Proteinmarker SDS 7

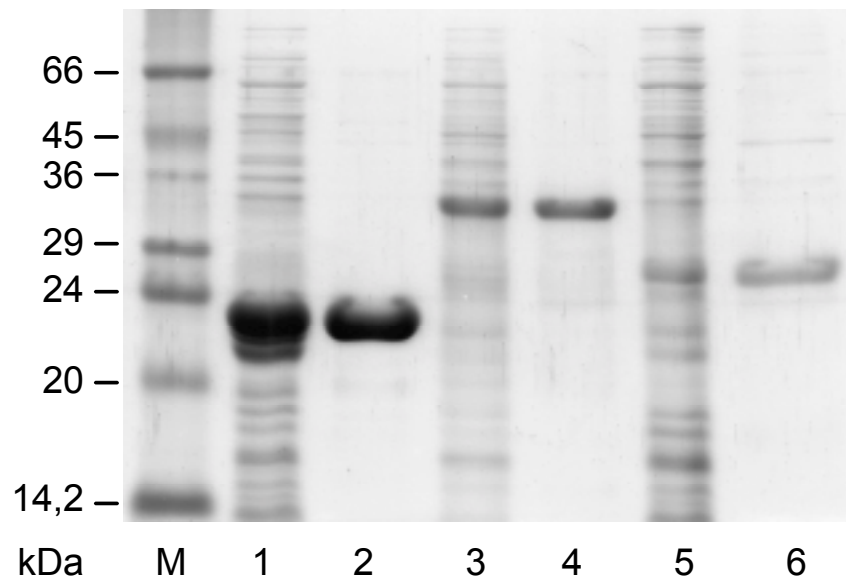
His₆-PecE und PecE sind nach 5 h Expression gut als Bande im SDS-Gel zu erkennen. Auch hier sind die Ausbeuten für die getaggtten Proteinen etwas höher. His₆-PecF ist im SDS-Gel nur schlecht zu erkennen, zum einen da weniger exprimiert wird, zum anderen läuft es auf der selben Höhe mit einer prominenten *E. coli*-Bande. PecF ist im SDS-Gel nicht zu erkennen, es kann lediglich aufgrund seiner Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die *his₆-pecF*- bzw. *pecF*-exprimierenden *E. coli*-Kulturen wuchsen jedoch deutlich besser als die anderen *E. coli*-Expressionskulturen. Das hatte die Folge, dass auch für die F-Untereinheit der Lyase-Isomerase die Ausbeuten mit über 15 mg/l relativ gut waren.

Die aus dem SDS-PAGE ermittelten Größen der Proteine von His₆-PecE (ca. 34 kDa), PecE (ca. 30 kDa) und His₆-PecF (ca. 28 kDa) stimmten in etwa mit den aus der Sequenz errechneten Molekulargewichten von 35197 Da (His₆-PecE), 30947 Da (PecE) und 27754 Da (His₆-PecF) überein.

3.3.3 Affinitätschromatographische Reinigung der getaggtten Proteine

Die ungetaggtten Proteine PecA, PecE und PecF wurden nach dem Aufschluss der Zellen im Sonifier und nach Zentrifugation als Lysate in den Rekonstitutionen eingesetzt. Die getaggtten Proteine dagegen wurden vor der Rekonstitution affinitätschromatographisch aufgereinigt.

Für die Aufreinigung von His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF wurden die *E. coli*-Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Ein 30-minütiger Zellaufschluß im Sonifier reichte aus, um ca. 95 % des Fusionsproteins in Lösung zu bringen. Da sich in der Tag-Region der Fusionsproteine ein His₆-Tag befindet, wurde zur Reinigung des Proteins eine Affinitätschromatographie mit einer mit Ni²⁺ beladenen HiTrapTM-Chelat-Säule durchgeführt. Nachdem unspezifisch an das Säulenmaterial gebundene Proteine durch His-Startpuffer und His-Waschpuffer entfernt wurden, wurde das Protein mit His-Elutionspuffer (EDTA) von der Säule eluiert. His-Elutionspuffer mit EDTA wurde verwendet, da hier die Proteine zusammen mit dem blaugrün gefärbten Ni²⁺ von der Säule eluiert wurden und so leicht fraktioniert werden konnten. Abbildung 3-13 zeigt ein SDS-Gel, auf dem His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF nach dem Zellaufschluss (Spuren 1, 3, 5) und nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung (Spuren 2, 4, 6) aufgetragen wurden. Man erkennt deutlich die Abtrennung des Großteils der *E. coli*-Proteine vom Apoprotein und von den Lyase-Isomerase-Untereinheiten. Mit diesen aufgereinigten Proteinen wurden Rekonstitutionen durchgeführt.

**Abbildung 3-13:**

SDS-PAGE von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF, nach Zellaufschluss und affinitätschromatographischer Aufreinigung

Spur 1: Lysat der His₆-PecA-exprimierenden Zellen; Spur 2: aufgereinigtes His₆-PecA

Spur 3: Lysat der His₆-PecE-exprimierenden Zellen; Spur 4: aufgereinigtes His₆-PecE

Spur 5: Lysat der His₆-PecF-exprimierenden Zellen; Spur 6: aufgereinigtes His₆-PecF

Spur M: Proteinmarker SDS 7

Dialyse

Nach der Affinitätschromatographie erhielt man die Proteine in einer Reinheit von ca. 90 %. Bevor sie jedoch in den Rekonstitutionen eingesetzt werden konnten, mußten sie dialysiert werden, um EDTA und Ni²⁺ zu entfernen, da diese die Rekonstitution störten. Die Proteine haben eine große Neigung zu präzipitieren. So ist die Löslichkeit von His₆-PecA in Tris/HCl-Puffern (50 mM) mit 40 ng/ml sehr gering. Eine relativ hohe NaCl-Konzentration (0,5 - 1 M) und die Verwendung von Kaliumphosphatpuffer hielt die Proteine dagegen gut in Lösung. In diesen Puffern waren die Fusionsproteine bis zu einer Konzentration von 15 mg/ml gut löslich. Daher wurden die aufgereinigten Proteine zweimal gegen Rekonstitutionspuffer (50 mM Kaliumphosphat, 500 mM NaCl, pH 7,2) dialysiert.

3.3.4 Darstellung und Aufreinigung der Mutanten von His₆-PecA

Es wurden vier verschiedene Mutanten von His₆-PecA hergestellt, bei denen ein oder zwei Cysteine gegen Serin ausgetauscht wurden. Ebenso wie bei His₆-PecA und PecA wurden die Expressionen über einen Zeitraum von 3 h durchgeführt. Die Mutanten zeigten ähnlich gute oder bessere Expressionsraten als His₆-PecA und PecA.

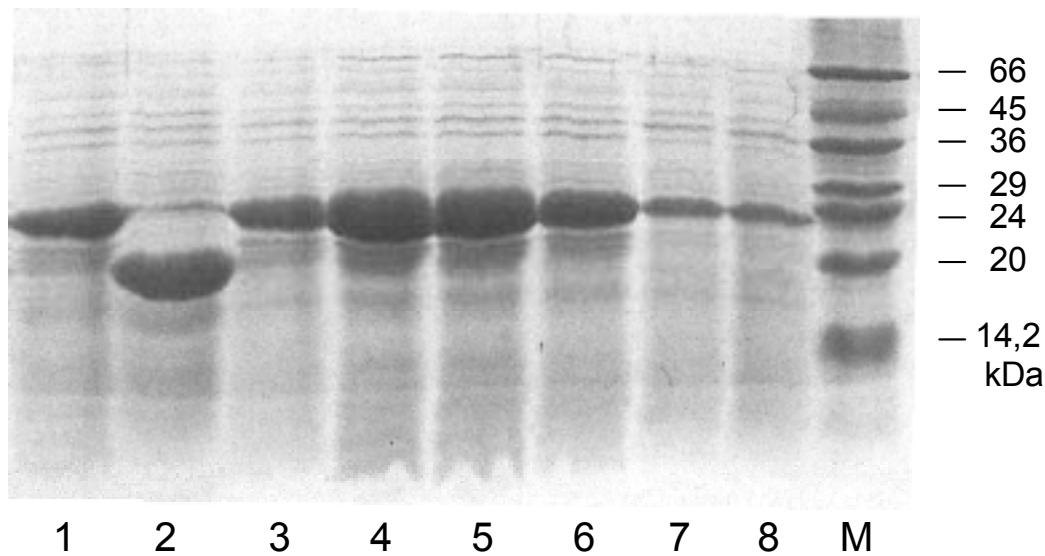


Abbildung 3-14:

SDS-PAGE der Expressionen von His₆-PecA, PecA und den Mutanten von His₆-PecA, 3 h nach Induktion der Expression

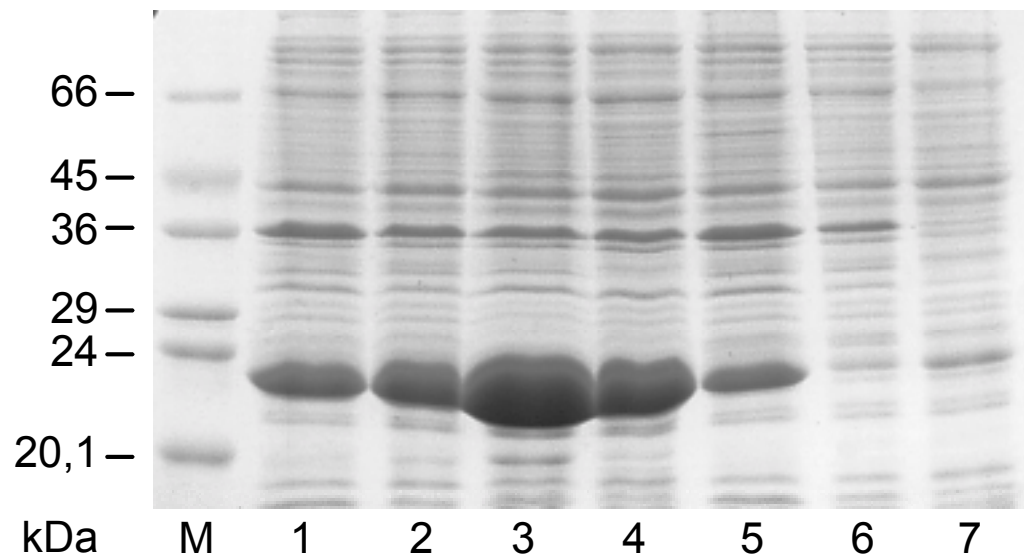
Spur 1: His₆-PecA; Spur 2: PecA;

Spur 3: His₆-PecA-C98S; Spur 4: His₆-PecA-C99S; Spur 5: His₆-PecA-C98S-C99S;

Spuren 6 - 8: His₆-PecA-C84S, 3 verschiedene Expressionsklone;

Spuren M: Proteinmarker SDS 7

Die Expressionsraten der Mutanten waren ähnlich gut wie Expressionsrate von His₆-PecA. Die Güte der Expression hing jedoch auch von der Wahl des Expressionsklons ab, wie anhand der unterschiedlichen Expressionsraten der drei verschiedenen Expressionsklone von His₆-PecA-C84S (Spuren 6 - 8) zu erkennen ist.

**Abbildung 3-15:**

SDS-PAGE des Zellaufschlusses von His₆-PecA und den Mutanten His₆-PecA-C84S und His₆-PecA-C98S.

Spur 1: His₆-PecA - vor Zellaufschluss; Spur 2: nach Zellaufschluss

Spur 3: His₆-PecA-C84S - vor Zellaufschluss; Spur 4: nach Zellaufschluss

Spur 5: His₆-PecA-C98S - vor Zellaufschluss; Spur 6: nach Zellaufschluss

Spur 7: nach Zellaufschluss mit 1 % Triton X-100

Spur M: Proteinmarker SDS 7

Das Protein His₆-PecA-C84S (Spuren 3 und 4), bei dem das chromophorbundene Cystein-84 gegen ein Serin ausgetauscht wurde, konnte, wie His₆-PecA (Spuren 1 und 2), sehr gut während des Zellaufschlusses durch Ultraschall in Lösung gebracht werden. Dieses modifizierte Protein konnte anschließend gut aufgereinigt und in Rekonstitutionen eingesetzt werden.

Die Mutanten His₆-PecA-C98S, His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S-C99S konnten dagegen auch durch intensive Behandlung mit Ultraschall nicht in Lösung gebracht werden. Spur 6 in Abbildung 3-15 zeigt für die Mutante His₆-PecA-C98S, dass nach 30 min Ultraschall kaum Protein in Lösung ging. Erst durch Zugabe von 1 % Triton X-100, dem Detergens, das auch in den Rekonstitutionen eingesetzt wurde, lösten sich etwa 10 % - 20 % der modifizierten Proteine, wie in Spur 7 zu erkennen ist. His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S-C99S zeigten das gleiche Lösungsverhalten. Nach dem Aufschluss mit Triton X-100 konnten Rekonstitutionen mit den Lysaten durchgeführt werden, wobei die Ausbeuten an Rekonstitutionsprodukten für die Aufnahme von UV/Vis-Spektren ausreichten. Die Unterschiede in der Löslichkeit von PecA und den Cystein 98, 99-Mutanten zeigen, dass diese beiden Cysteine wichtig für die Struktur des Proteins sein dürften.

3.4 Rekonstitutionen:

Das erste wichtige Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Rekonstitutionssystem für die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins (α -PEC) aus *M. laminosus*. Dazu waren das Apoprotein und eine Lyase-Isomerase notwendig, die, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, in *E. coli* exprimiert werden konnten. Als Chromophore standen verschiedene Phycobiline, wie das Phycocyano- und Phycoerythrobin, zur Verfügung. Sie konnten aus Algen isoliert oder durch Modifikation isolierter Phycobiline gewonnen werden (Kapitel 3.1). Rekonstitutionen erfolgten sowohl autokatalytisch, nur mit dem Apoprotein (PecA bzw. His₆-PecA) und einem Chromophor, als auch enzymatisch unter Zugabe der Lyase-Isomerase PecE/PecF bzw. His₆-PecE/His₆-PecF. Abbildung 3-16 zeigt schematisch, wie die Rekonstitutionen durchgeführt wurden.

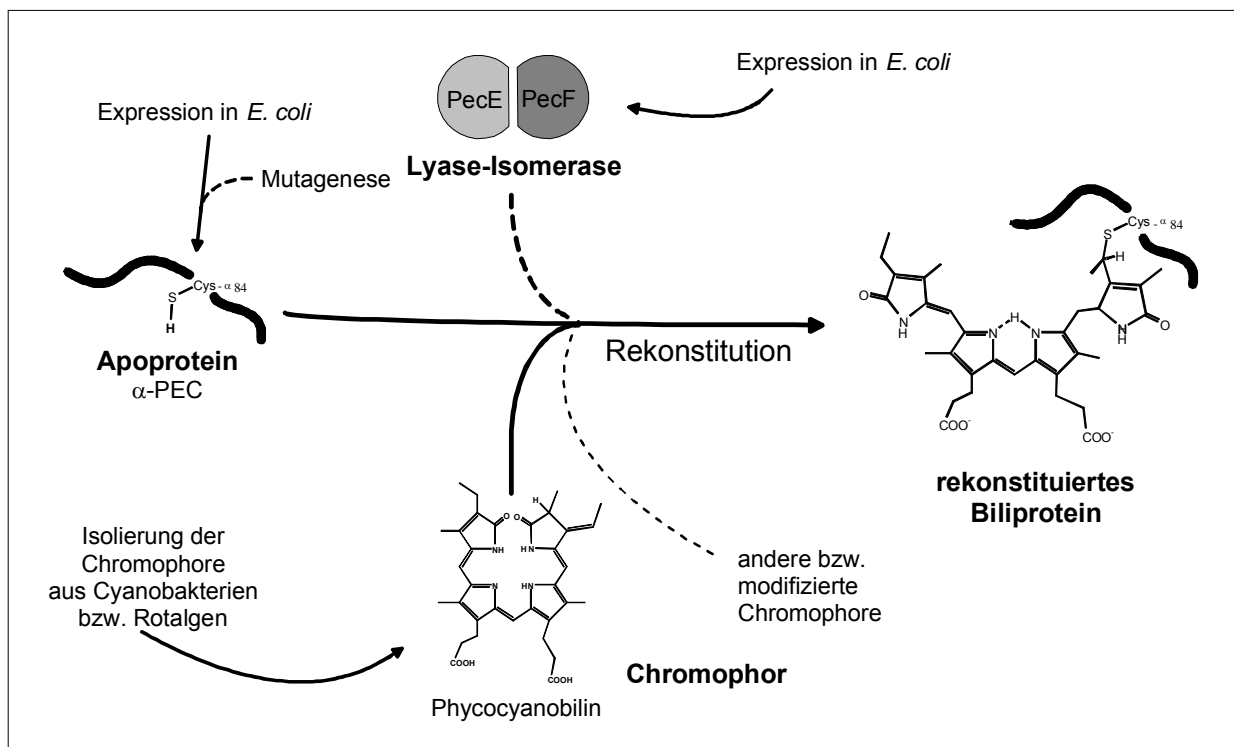


Abbildung 3-16:
Schema der Rekonstitution des α -PEC-Apoproteins.

Mit Hilfe dieses Systems konnten Rekonstitutionen mit verschiedenen Chromophoren, aber auch mit modifizierten Apoproteinen durchgeführt werden. Dadurch konnten die Chromophorbindung und die Photochemie des α -PEC studiert werden und modifizierte Biliproteine für biophysikalische Untersuchungen hergestellt werden.

3.4.1 Autokatalytische Rekonstitution mit dem Chromophor Phycocyanobilin

Rekonstitutionsverlauf

Die Rekonstitution des Apoproteins des α -PEC gelang zuerst mit den rohen *E. coli*-Lysaten, die durch Ultraschallbehandlung und Zentrifugation von *E. coli*-Kulturen gewonnen wurden. Diese Lysate enthielten ca. 60 - 100 mg His₆-PecA bzw. 40 - 80 mg PecA pro 1 l *E. coli*-Expressionskultur. Für die Rekonstitutionen wurden die Lysate, welche die Apoproteine enthielten, mit dem Chromophor Phycocyanobilin (PCB), der gelöst in DMSO zugegeben wurde, bei Raumtemperatur inkubiert. Über Stunden hinweg konnten deutliche Änderungen der Absorption der Ansätze beobachtet werden. Nach ca. 20 - 24 h kam es zu keinen weiteren spektralen Veränderungen mehr.

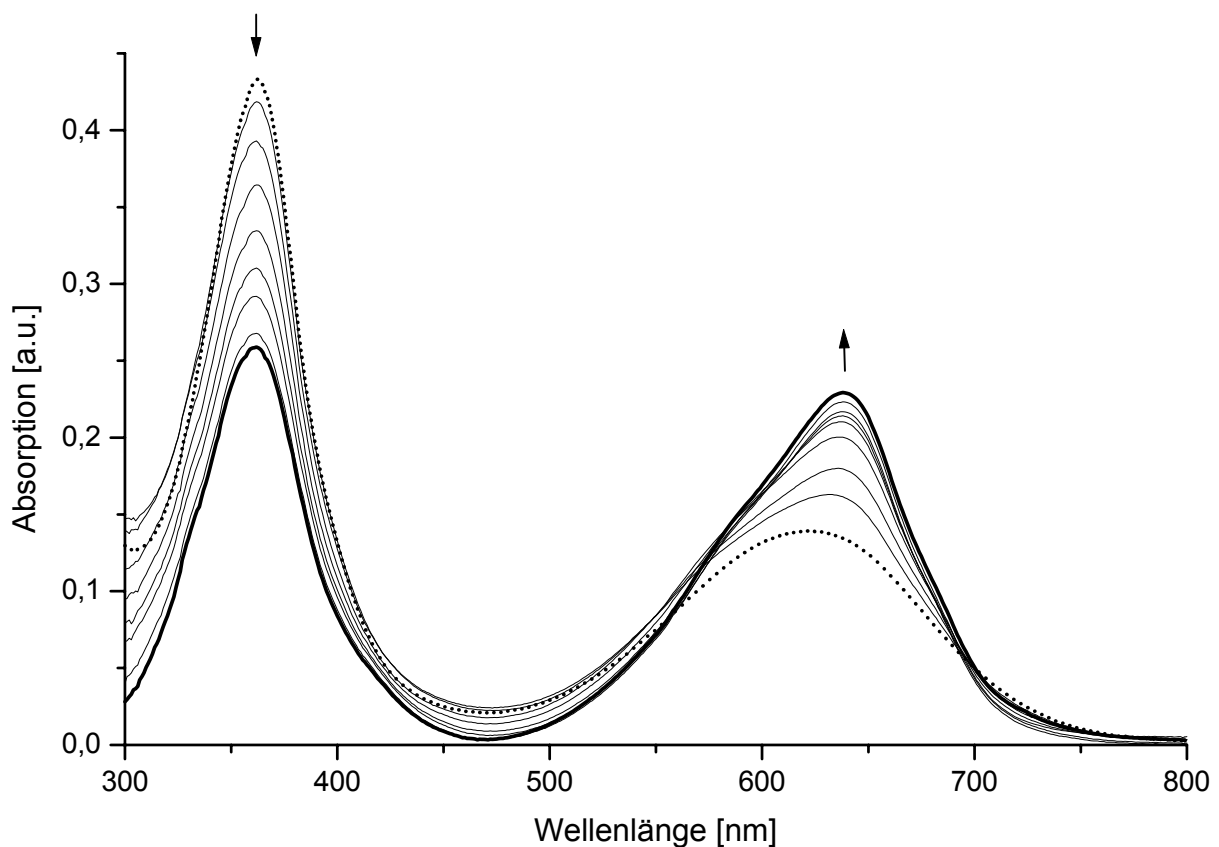


Abbildung 3-17:

Spektrale Veränderungen des Rekonstitutionsansatzes mit His₆-PecA und PCB über einen Zeitraum von 24 h. Das Anfangsspektrum (.....) direkt nach Zugabe des PCB und das Endspektrum (——) nach 24 h sind fett gedruckt dargestellt. Die dazwischenliegenden Spektren (——), die alle 3 h aufgenommen wurden, sind dünn gedruckt. Die Absorptionsänderungen sind mit Pfeilen markiert.

Der PCB-Chromophor zeigte direkt nach Zugabe zum Lysat ein langwelliges Absorptionsmaximum bei 618 nm. Dieses Maximum verschob sich während der Rekonstitution auf 641 nm und wurde deutlich intensiver. Dagegen nahm das kurzwellige Absorptionsmaximum bei 354 nm deutlich ab. Zusätzlich trat eine starke rote Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 659 \text{ nm}$) auf. Diese spektralen Veränderungen zeigten an, dass es zu einer Interaktion des Chromophors mit dem Apoprotein gekommen ist. Die selben spektralen Veränderung wurden sowohl bei der Rekonstitution mit dem getaggtten Protein His₆-PecA als auch mit dem nativen Apoprotein PecA beobachtet.

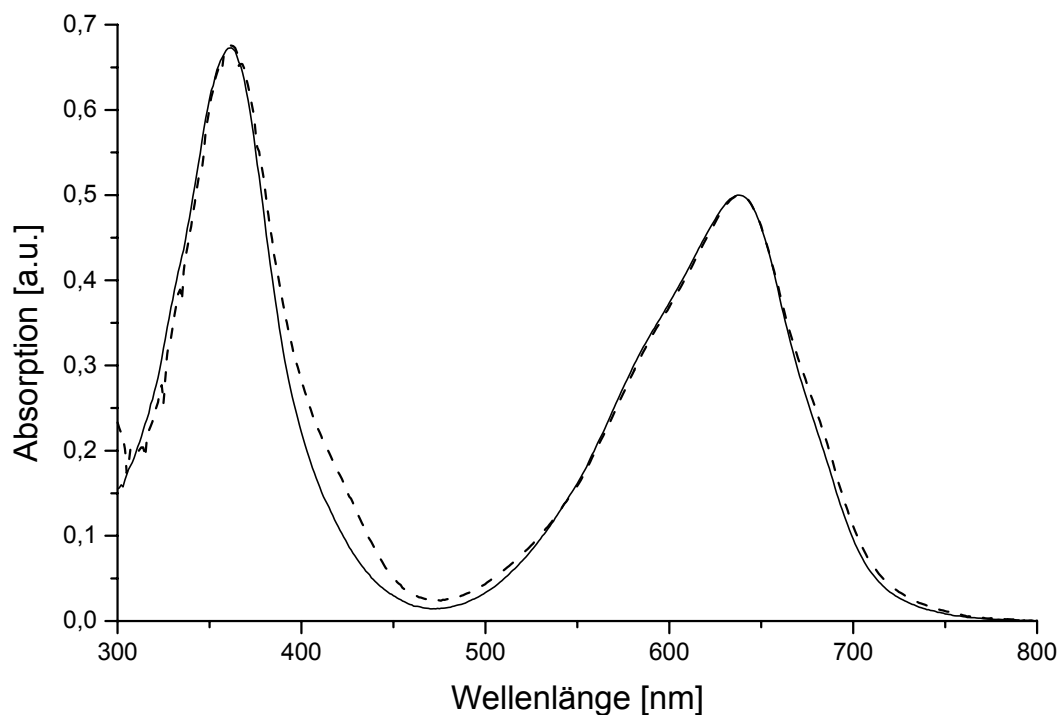


Abbildung 3-18:

Absorptionsspektren der Produkte der Rekonstitution mit den Lysaten von His₆-PecA bzw. PecA und dem Chromophor PCB.

Die Spektren der Rekonstitutionsansätze von His₆-PecA (Lysat) + PCB (—) und PecA (Lysat) + PCB (-----) wurden nach einer Inkubationszeit von 22 h bei Raumtemperatur aufgenommen und auf 0,5 im langwelligem Maximum normiert.

Wie Abbildung 3-18 zeigt, gab es zwischen dem Rekonstitutionsprodukten von His₆-PecA und PecA keine deutlichen spektralen Unterschiede. Die folgenden Rekonstitutionen wurden daher mit His₆-PecA durchgeführt, wobei die Arbeit mit His₆-PecA einige Vorteile hatte. So war die Ausbeute der Expression und die Löslichkeit von His₆-PecA im Vergleich zum ungetaggtten Apoprotein PecA besser. Von großem Vorteil war zudem, dass die getaggtten rekonstituierten Proteine sich sehr leicht durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufreinigen ließen und so reine Proben für die nachfolgenden spektroskopischen Messungen erhalten werden konnten.

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts

Zur besseren Charakterisierung des tiefblau gefärbten Rekonstitutionsprodukt wurden nach der Aufreinigung durch Affinitätschromatographie neben dem Absorptionsspektrum auch die Fluoreszenz- und CD-Spektren aufgenommen.

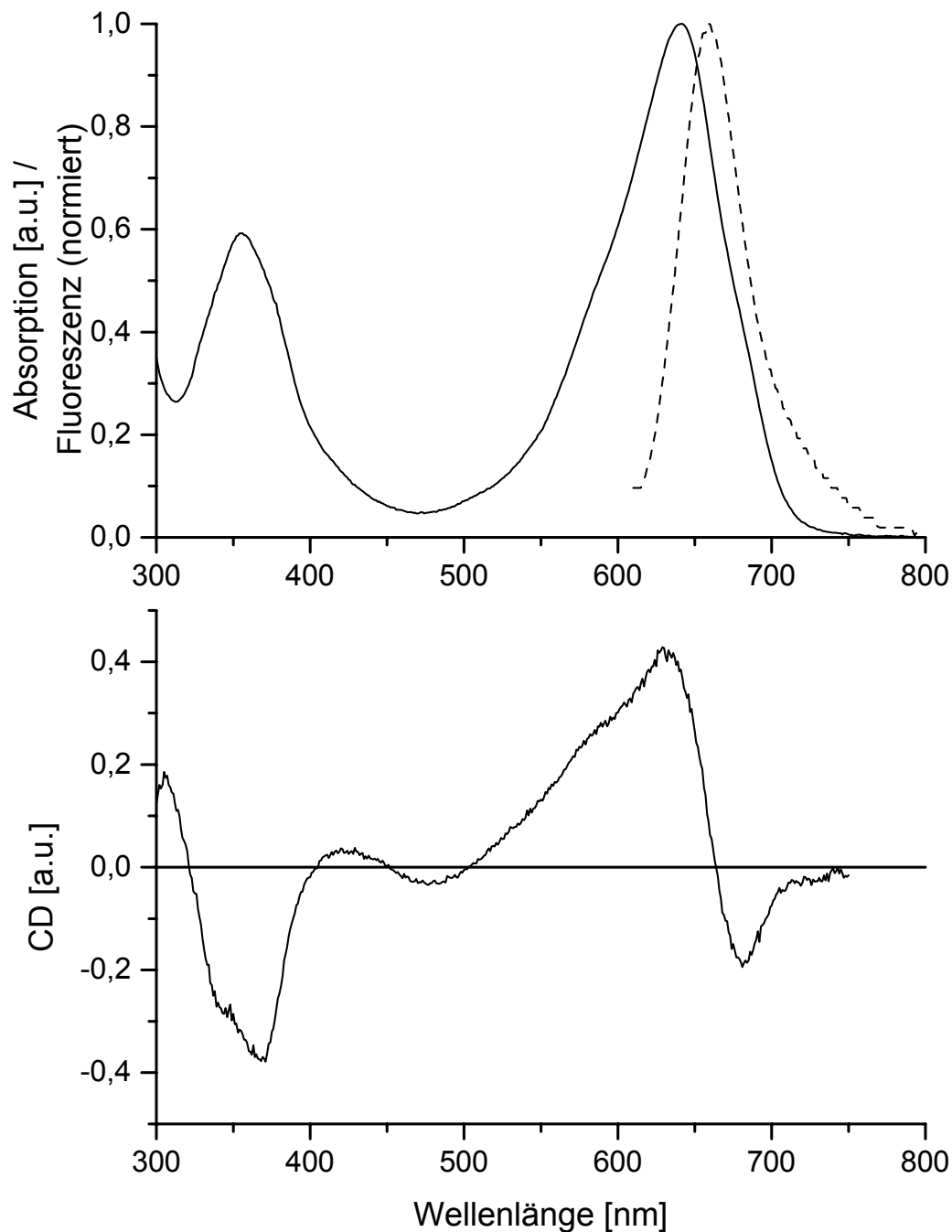


Abbildung 3-19:

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PCB nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.

oben: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (Excitation 590 nm) (-----)
unten: CD-Spektrum

Das Absorptionsspektrum stimmt in seiner Form mit den Spektren nativer Biliproteine, insbesondere mit den Phycocyaninen, überein, also Proteinen mit einem kovalent gebundenen offenkettigen Tetrapyrrol-Chromophor. Dabei ist das langwellige Absorptionsmaximum größer als das kurzwellige Maximum (Scheer & Kufer 1977). Allerdings ist das Verhältnis des langwelligen zum kurzwelligen Absorptionsmaximum mit 1,7 deutlich geringer als bei nativen Biliproteinen, wie z.B. der α -Untereinheit des Phycocyanins (α -PC) aus *S. platensis*, mit einem Absorptionsverhältnis von etwa 5 (Scheer 1982). Dennoch weist die Form des Spektrums darauf hin, dass der Chromophor in der Chromophorbindungstasche des Apoproteins eingelagert und eventuell kovalent gebunden wurde. Es ist also ein His₆-PecA-PCB-Addukt mit einem Absorptionsmaximum bei 641 nm entstanden. Ein Maximum mit 641 nm ist allerdings für ein PCB tragendes Biliprotein sehr langwellig. In der Regel liegen die Absorptionsmaxima von Biliprotein-Untereinheiten, die nur ein PCB gebunden haben, um 620 nm. So absorbiert das α -PC aus *M. laminosus* bei einem Maximum von 616 nm und das α -PC aus *S. platensis* bei 622 nm (John 1986). Die α -Untereinheit des Allophycocyanin B aus *Synechococcus* sp. PCC 6301, das ebenfalls nur ein PCB gebunden hat, absorbiert jedoch mit einem Maximum von 645 nm ähnlich langwellig wie das His₆-PecA-PCB-Addukt (Lundell & Glazer 1981).

Im Absorptionsspektrum sind neben dem Maximum bei 641 nm deutlich zwei Schultern bei etwa 570 nm und 670 nm zu erkennen. Dies weist daraufhin, dass neben dem His₆-PecA-PCB-Addukt zwei weitere Produkte entstanden sein könnten. Eine starke Fluoreszenz, die allen Biliproteinen zu eigen ist, tritt auch beim Rekonstitutionsprodukt auf und lässt ebenfalls auf eine Bindung des Chromophors schließen (Scheer 1981). Durch die Bindung und Einlagerung des PCB in die Bindungstasche des Proteins wird die Flexibilität des Chromophors eingeschränkt und die strahlungslose Deaktivierung des absorbierten Lichts unterdrückt. Auch das CD-Spektrum stimmt in seiner Form, mit dem negativen Maximum bei 371 nm und dem positiven Maximum bei 633 nm nahe des Absorptionsmaximums, mit den CD-Spektren anderer PCB-tragender Biliproteinuntereinheiten überein, wie z.B. mit dem CD-Spektrum des α -PC aus *M. laminosus* (John 1986). Das CD-Spektrum besitzt daneben eine Schulter bei 575 nm und ein negatives Maximum bei 681 nm. Dabei könnte es sich um die CD-Signale der beiden weiteren Rekonstitutionsprodukte handeln.

Um zu überprüfen, ob das PCB während der Rekonstitution kovalent gebunden oder nur in die Bindungstasche eingelagert wurde, wurden weitere Versuche durchgeführt.

Denaturierende Gelelektrophorese

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird das Protein weitgehend entfaltet. Wenn der Chromophor nicht kovalent gebunden ist, wird er während der Elektrophorese vom Protein getrennt. Ein kovalent gebundener Chromophor dagegen ist auf dem Gel in der Proteinbande detektierbar. Biline können auf SDS-Gelen mit Hilfe von Zn^{2+} -Ionen, die mit den Bilinen einen stark fluoreszierenden Komplex bilden, unter UV-Licht detektiert werden (O'hEocha 1958, Berkelman & Lagarias 1986, Falk 1989). Die Proteinbanden können anschließend durch Färbung mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden.

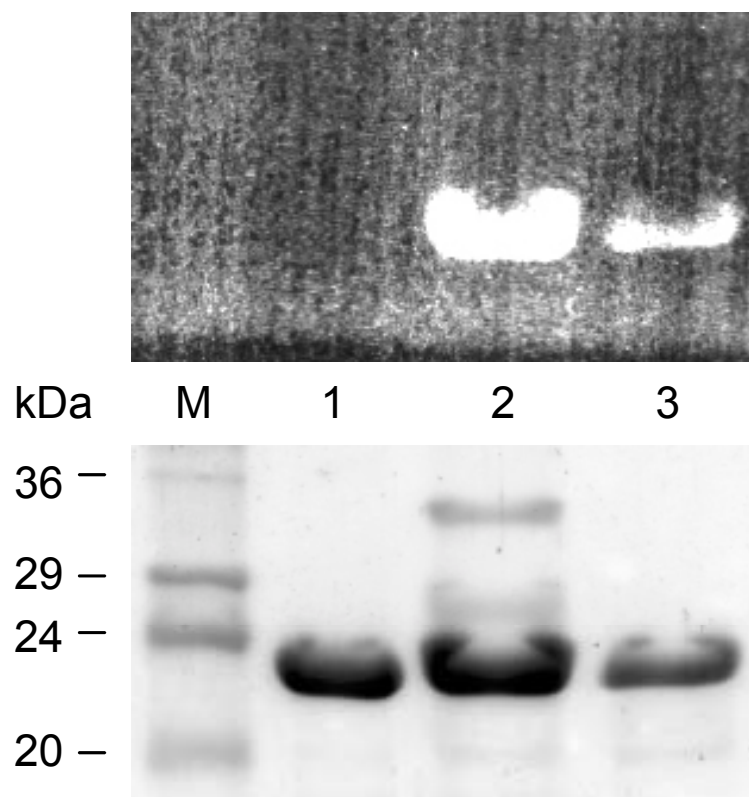


Abbildung 3-20:

SDS-PAGE von Apo-His₆-PecA und rekonstituiertem His₆-PecA, Chromophore gefärbt mit Zinkacetat (oben), Proteine gefärbt mit Coomassie (unten).

Spur 1: aufgereinigtes Apo-His₆-PecA

Spur 2: aufgereinigtes Rekonstitutionsprodukt von His₆-PecA mit PCB und His₆-PecE/ His₆-PecF

Spur 3: aufgereinigtes Rekonstitutionsprodukt von His₆-PecA mit PCB

Spur M: Proteinmarker SDS 7

In Abbildung 3-20 ist in Spur 3 das Rekonstitutionsprodukt His₆-PecA-PCB-Addukt aufgetragen. Die Bande war sowohl mit Zinkacetat, das den Chromophor färbt, als auch mit Coomassie, welches das Protein färbt, bei einer Größe von etwa 23 kDa detektierbar, was zeigt, dass der Chromophor kovalent an das Protein gebunden wurde.

Reversible Denaturierung durch 8 M Harnstoff

Globuläre Proteine können durch Zugabe von Harnstoff denaturiert werden. So liegen Biliproteine in 8 M Harnstoff vollständig entfaltet vor. Durch Entfernung bzw. Verdünnung des Harnstoffs kann diese Denaturierung rückgängig gemacht werden (Murphy & O'Carra 1970, Siebzehnrübl *et al.* 1989). Bei der vollständigen Entfaltung eines Biliproteins durch 8 M Harnstoff wird der Proteineinfluss auf den Chromophor völlig aufgehoben. Denaturierte Biliproteine besitzen Absorptionsspektren die dem der freien Chromophore entsprechen, mit einem großen kurzwelligen und einem deutlich kleineren langwelligen Maximum (Scheer & Kufer 1977, Scheer 1982). Da diese Entfaltung reversibel ist, entsteht durch Verdünnung des Harnstoffes auf 0,8 M innerhalb weniger Sekunden wieder das typische Absorptionsspektrum des nativen gefalteten Biliproteins. Voraussetzung dafür ist, dass der Chromophor kovalent gebunden ist.

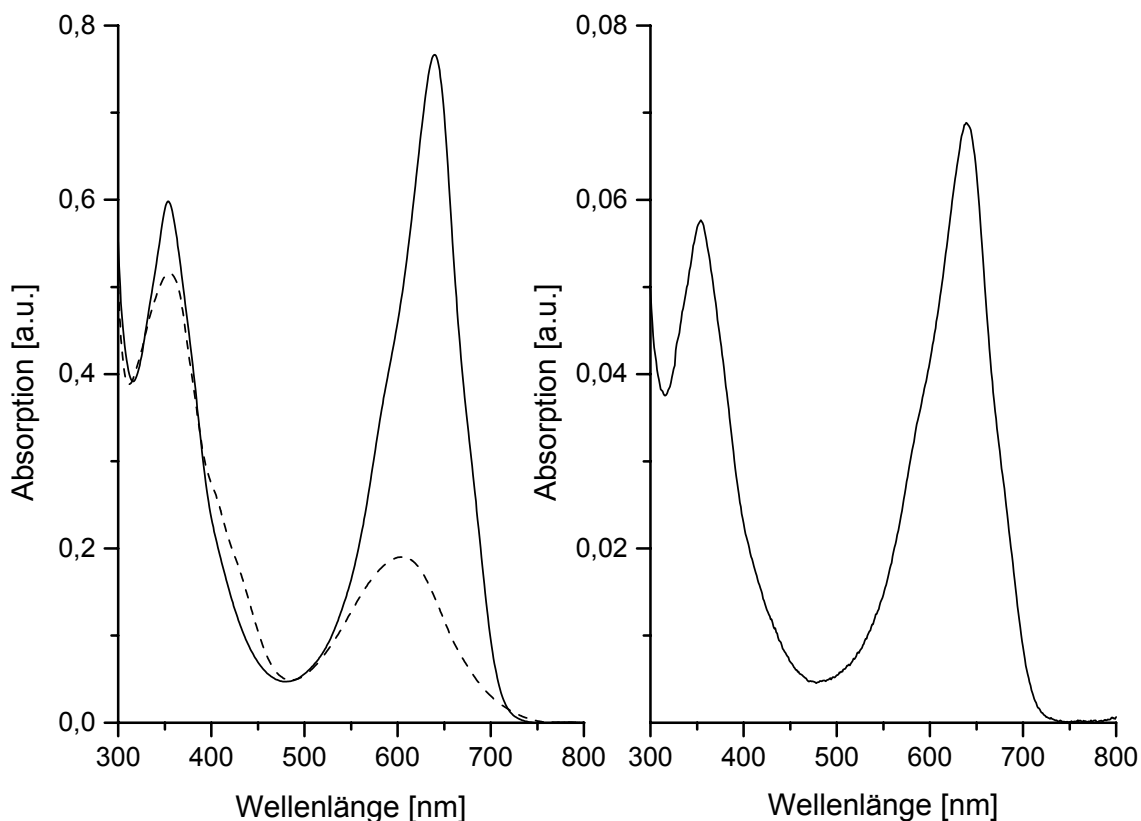


Abbildung 3-21:

Reversible Denaturierung des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PCB.

Links: Absorptionsspektren des Rekonstitutionsprodukts in 150 mM KPP, pH 7,0 (—) bzw. in 8 M Harnstoff (-----); die Konzentration an Rekonstitutionsprodukt ist in beiden Proben gleich.

Rechts: Absorptionsspektrum des in 8 M Harnstoff denaturierten Rekonstitutionsprodukts nach Verdünnung 1:10 mit 150 mM KPP, pH 7,0.

Die Zugabe von 8 M Harnstoff zum His₆-PecA-PCB-Addukt zeigte das erwartete Ergebnis. Es ergaben sich die spektralen Veränderungen, die für die vollständige Denaturierung von Biliproteinen typisch sind: Die langwellige Extinktion nahm stark ab und war nun deutlich geringer als die kurzwellige Extinktion. Die Absorptionsmaxima des denaturierten PCB-Addukts von 355 nm und 603 nm stimmen mit den Maxima von denaturiertem C-Phycocyanin (C-PC) und Allophycocyanin (APC) aus *S. platensis* (355 nm und 602 nm), die beide PCB als Chromophor tragen, überein (Kufer 1980). Wenige Minuten nachdem das in 8 M Harnstoff denaturierte His₆-PecA-PCB-Addukt mit Puffer auf 0,8 M Harnstoff verdünnt wurde, entstand wieder das Spektrum des nativen His₆-PecA-PCB-Addukt. Das Addukt konnte also renaturiert werden. Berücksichtigt man den Verdünnungsfaktor von 10, so ergibt sich eine Ausbeute der Renaturierung von 89 %. Ausbeuten in derselben Größenordnung (83 %) werden auch bei der De- und Renaturierung von C-PC erreicht (Kufer 1980).

Diese Übereinstimmungen bei der De- und Renaturierung des His₆-PecA-PCB-Addukts und von C-PC und APC zeigten, dass das PCB im Rekonstitutionsprodukt und in C-PC und APC in gleicher Weise gebunden sein müsste. Demnach liegt der Chromophor im rekonstituierten Protein hauptsächlich als 3¹-Cys-PCB vor, wobei über die Stereochemie der beiden neuen Asymmetriezentren (C-3, C-3¹) keine Aussage gemacht werden kann. Das CD-Signal ist jedoch zumindest ein Hinweis auf die „natürliche“ Stereochemie.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten

Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten von His₆-PecA-PCB-Addukt wurde das rekonstituierte Protein nach Denaturierung mit 8 M Harnstoff mit HCl auf einen pH von 1,9 eingestellt. Mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten von Kationen denaturierter Biliproteinen, die 3¹-Cys-PCB gebunden haben (siehe Tabelle 3-1), konnte ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{641} = 61000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das (His₆-)PecA-PCB-Addukt errechnet werden. Dieser Koeffizient liegt damit deutlich unter dem von nativen Biliproteinuntereinheiten, die ein PCB gebunden haben. So beträgt z.B. der Extinktionskoeffizient der α -Untereinheit des PC aus *M. lamosus* $\epsilon_{616} = 122000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Sauer *et al.* 1987).

Ausbeute der Rekonstitution

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten konnte die Ausbeute an His₆-PecA-PCB-Addukt berechnet werden, die für die Rekonstitution mit den Lysaten bei 20 - 40 mg pro Liter *E. coli*-Expressionskultur lagen. Bei der Rekonstitution in den Lysaten konnte so ca. die Hälfte des Apoproteins rekonstituiert werden. Wurde eine Rekonstitution mit aufgereinigtem His₆-PecA durchgeführt, so war die Ausbeute sehr viel geringer, sie lag nur bei 4 - 8 mg His₆-PecA-PCB-Addukt pro Liter Expressionskultur, d.h. nur etwa 10 % des Apoproteins wurden rekonstituiert. Möglicherweise ist ein unbekannter Faktor aus *E. coli* an der Rekonstitution beteiligt, der zu einer deutlichen Steigerung der Rekonstitutionsrate im Lysat führt.

Abspaltung des Chromophors mit HBr/Trifluoressigsäure

Eine weitere Möglichkeit nachzuweisen, dass es sich bei dem Hauptprodukt der Rekonstitution um das His₆-PecA-PCB-Addukt handelt, ist die Abspaltung des Chromophors. Für diesen Nachweis wurde eine Abspaltung des PCB mit Hilfe von in Trifluoressigsäure gelöstem HBr durchgeführt, einer Methode, die für kleine Mengen an Biliproteinen von Vorteil ist, da hier der Chromophor mit einer höheren Ausbeute (bis zu 90 %) abgespalten werden kann (Schram & Kroes 1971). Für die Abspaltungsreaktion wurde das aufgereinigte Rekonstitutionsprodukt gefriergetrocknet.

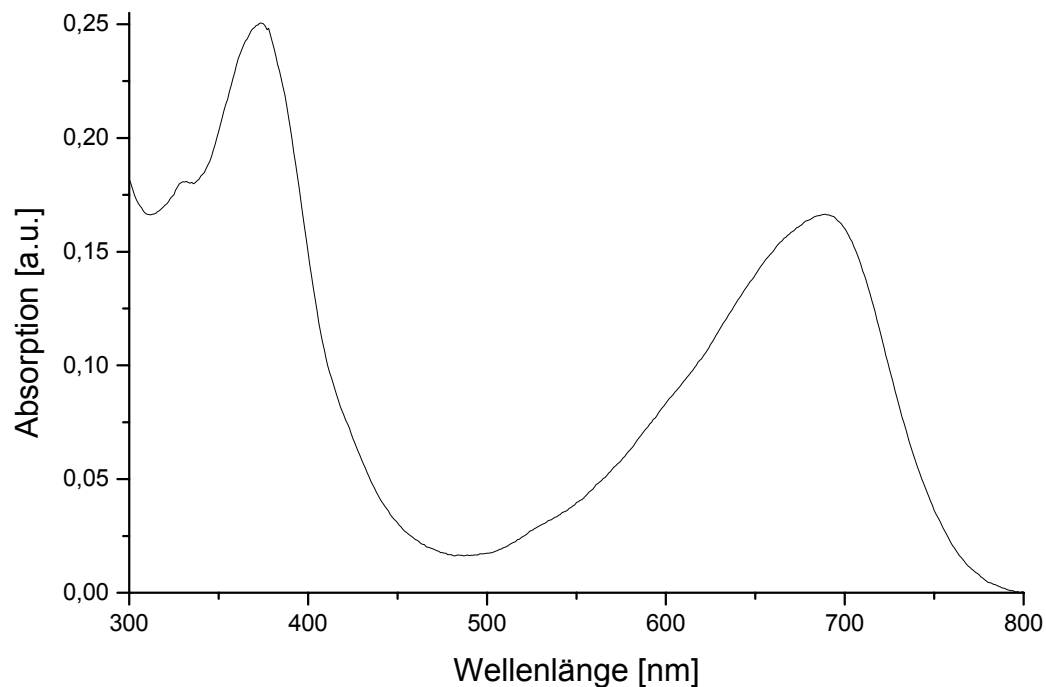


Abbildung 3-22:

Absorptionsspektrum des mit Hilfe von HBr/TFA abgespaltenen Chromophors des His₆-PecA-PCB-Addukt in MeOH / 2 % HCl.

Das Spektrum des abgespaltenen Chromophors mit den Maxima bei 374 nm und 689 nm stimmt mit dem Spektrum von PCB in MeOH / 2 % HCl überein. Die Schulter bei 330 nm könnte von einem der Nebenprodukte stammen, die bei der Abspaltung entstehen. Legt man den Extinktionskoeffizient von $61000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das Rekonstitutionsprodukt zugrunde, so ergibt sich, dass 65 % des Chromophors als PCB abgespalten werden konnten. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Großteil des rekonstituierten Proteins 3¹-Cys-PCB gebunden haben muß. So zeigt auch die Chromophorabspaltung, dass bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit PCB hauptsächlich das His₆-PecA-PCB-Addukt entstanden ist.

Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC

Ob bei der Rekonstitution noch Addukte mit anderen Chromophoren entstanden sind, konnte mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden. Der tryptische Verdau von Biliproteinen zu Chromopeptiden und deren anschließende Trennung durch HPLC ist eine geeignete Methode, um Biliproteine und deren gebundene Chromophore zu identifizieren (Arciero *et al.* 1988a, Arciero *et al.* 1988b, Fairchild & Glazer 1994a, Schluchter & Bryant 2002).

Die Absorptionsspektren der Chromopeptide, die während der Trennung durch HPLC aufgenommen wurden, dienen dazu, die Bilin-Addukte zu identifizieren. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Absorptionseigenschaften von Chromopeptiden in wässrigen sauren Lösungsmitteln (z.B. 10 mM Trifluoressigsäure oder 80 % 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ 20 % Acetonitril pH 2,1) und von protonierten, denaturierten Biliproteinen (z.B. in 8 M Harnstoff pH 1,9) weitgehend übereinstimmen (Bishop *et al.* 1987, Wemmer *et al.* 1993).

Ein vollständiger tryptischer Verdau der Rekonstitutionsprodukte ergab Chromotripeptide mit der Sequenz Cystein-Valin-Arginin, wobei der Chromophor kovalent an das Cystein gebunden war. Mittels HPLC konnten die Peptide aufgetrennt werden und drei verschiedenen Absorptionsspektren zugeordnet werden (siehe Abbildung 3-23).

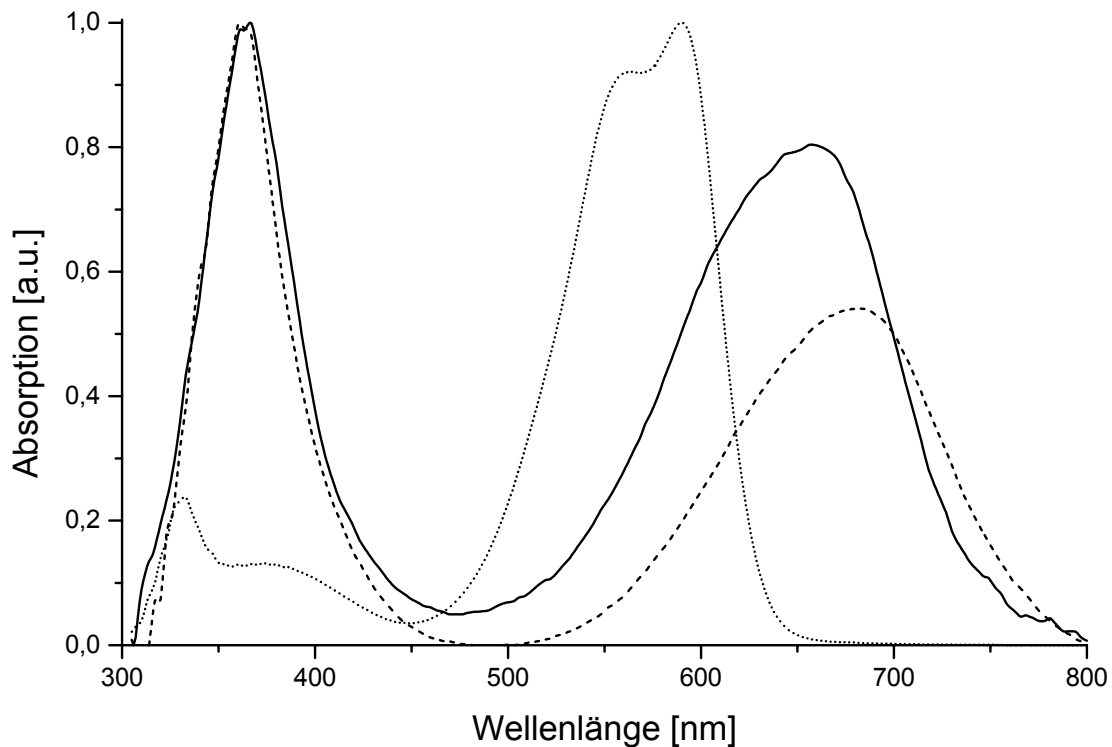


Abbildung 3-23:

Absorptionsspektren der Chromopeptide nach Trypsinverdau der Produkte der Rekonstitution von His₆-PecA und PCB.

Die Spektren der PCB-Peptide (—), PVB-Peptide (·····) und MBV-Peptide (-----) wurden im HPLC-Laufmittel 0,1 M KPP pH 2,1 : Acetonitril (80 : 20 bis 60 : 40) aufgenommen und auf das Maximum normiert.

Die gebunden Chromophore konnten anhand der Absorptionsspektren ihrer Chromopeptide identifiziert werden. Die Kriterien für die Identifikation der Chromopeptide waren folgende:

- a) Das 3¹-Cys-PCB-Peptid besitzt Maxima zwischen 350 - 360 nm und 650 - 660 nm, wobei das Verhältnis von kurzwelligem Maximum zu langwelligem Maximum kleiner als 1,5 ist (Arciero *et al.* 1988a).
- b) Das 3¹-Cys-Mesobiliverdin (MBV)-Peptid weist Maxima bei 355 - 365 nm und 680 - 690 nm auf und das Verhältnis von kurzwelligem zu langwelligem Maximum ist größer als 1,5 (Arciero *et al.* 1988a).
- c) Das 3¹-Cys-PVB-Peptid schließlich hat eine Schulter bzw. ein Maximum bei 560 - 570 nm und 590 - 600 nm (Bishop *et al.* 1987, Zhao *et al.* 1995).

Auf diese Weise konnte den einzelnen Peaks des Chromatogramms der jeweilige an das Peptid gebundene Chromophor zugeordnet werden (siehe Abbildung 3-24).

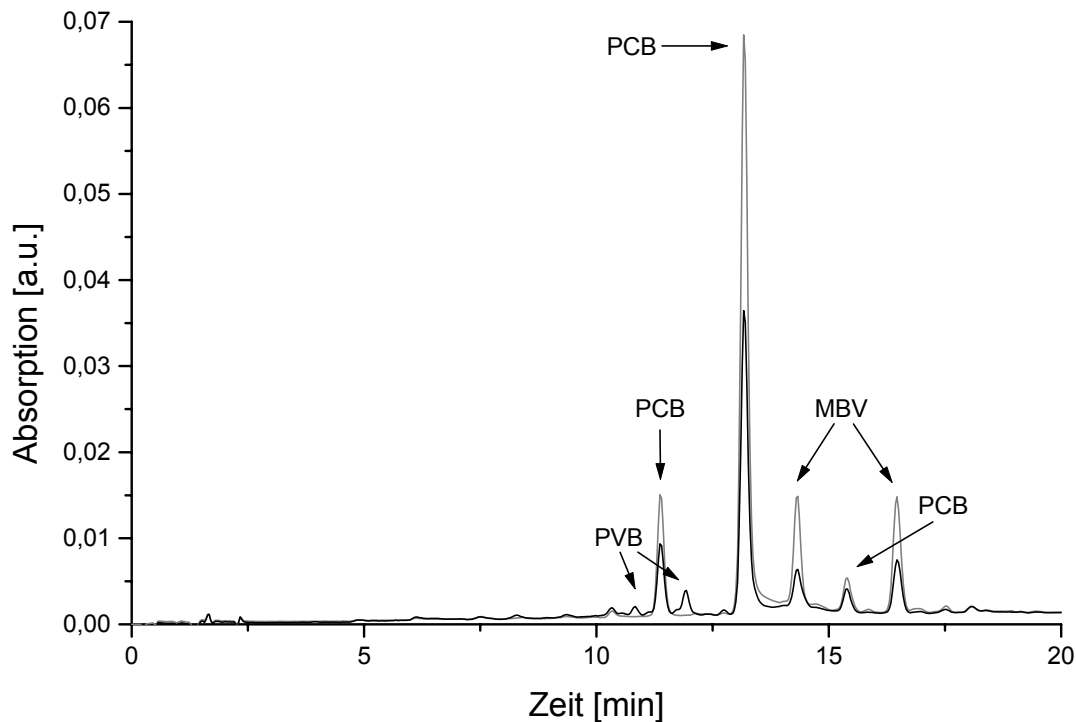


Abbildung 3-24:

Produkte der Rekonstitution von $(\text{His}_6)\text{-PecA}$ mit PCB: HPLC-Lauf der Chromopeptide nach dem tryptischen Verdau. Der Lauf wurde mit einem linearen Gradienten von 20 % - 40 % Acetonitril (0,1 M KPP pH 2,1 ad 100 %) durchgeführt. Im Chromatogramm sind die Absorptionen bei 650 nm (— — —) und 590 nm (—) dargestellt. Bei den Chromophoren handelt es sich jeweils um die 3^1-Cys-Biline .

Die Auswertung des Chromatogramms zeigt, dass drei verschiedene Chromophore während der autokatalytischen Chromophorbinding bei der Rekonstitution von $\text{His}_6\text{-PecA}$ mit PCB entstanden sind. Hauptsächlich wurde das PCB als 3^1-Cys-PCB gebunden. Daneben ist jedoch auch ein MBV-Addukt und in geringen Mengen auch ein PVB-Addukt, das dem nativen $\alpha\text{-PEC}$ entspricht, entstanden.

Auffällig ist, dass mehrere Peaks für das gleiche Chromopeptid existieren. Dies wurde jedoch auch bei der Auftrennung von tryptischen Chromopeptiden aus nativen Biliproteinen beobachtet (Arciero *et al.* 1988a, Wedemayer *et al.* 1992). Gründe dafür, dass einem bestimmten Chromopeptid mehrere Peaks zugeordnet werden können, könnten sein, dass der Chromophor in verschiedenen Isomeren auftritt, die ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Auch ein unvollständiger tryptischer Abbau, bei dem Peptide unterschiedlicher Länge entstehen, könnte zu mehreren Peaks für Peptide mit gleichem Chromophor führen.

Die Photochemie

Die α -Untereinheit des PEC zeigt eine ausgeprägte reversible Photochemie. Dabei liegen die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie bei 507 nm und 566 nm, also ca. 60 nm auseinander (Zhao & Scheer 1995). Es wurde nun untersucht, ob auch die Rekonstitutionsprodukte eine Photochemie aufweisen. Dazu wurden die Rekonstitutionsansätze nach Aufreinigung und Dialyse verschiedenen Belichtungszyklen unterzogen.

Tatsächlich konnte durch Belichtungen des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA mit PCB eine deutliche, wenn auch geringe reversible Photochemie induziert werden.

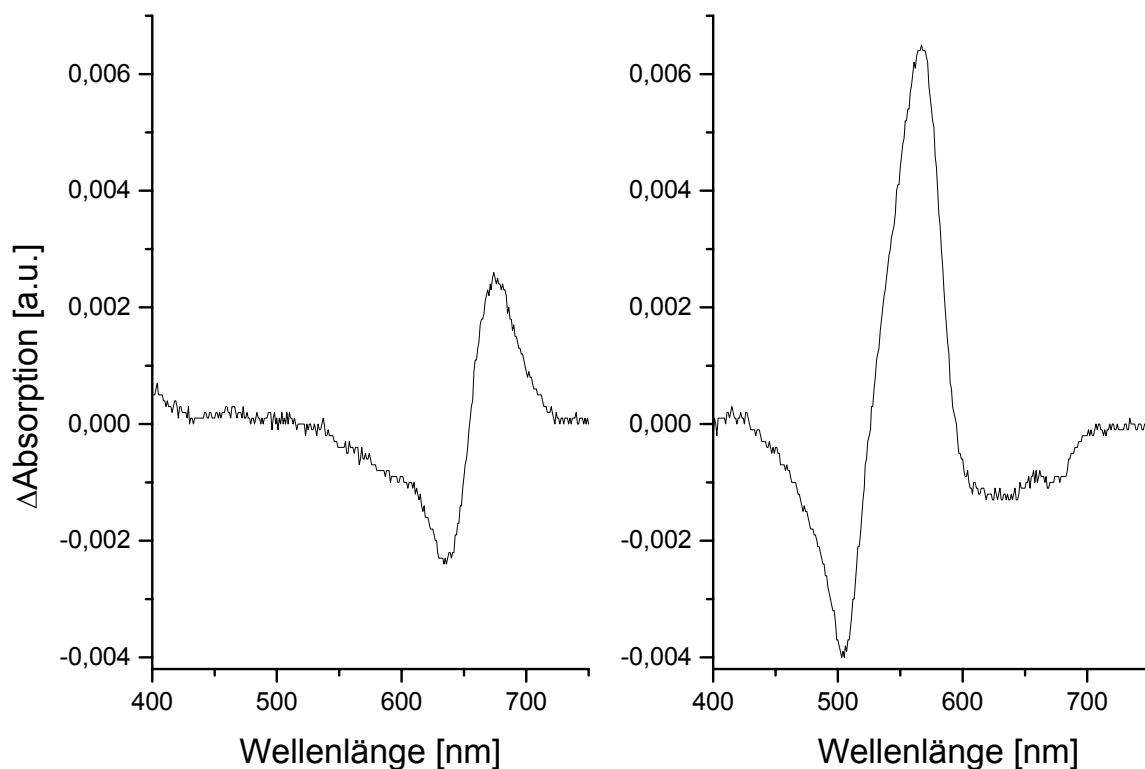


Abbildung 3-25:

Die reversible Photochemie des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA mit PCB.

Es sind folgende Differenzspektren dargestellt:

links: Absorptionsspektrum nach Belichtung bei 639 nm *minus* Absorptionsspektrum nach Belichtung bei 700 nm;

rechts: Absorptionsspektrum nach Belichtung bei 500 nm *minus* Absorptionsspektrum nach Belichtung bei 577 nm.

Die Belichtung bei 639 nm bewirkte hauptsächlich ein irreversibles Ausbleichen im Maximum bei 641 nm, allerdings wurde auch eine geringe Absorptionzunahme bei 680 nm beobachtet. Durch Belichtung bei 700 nm kam es zu einer Absorptionsabnahme bei 680 nm und einer Zunahme bei 635 nm. Diese Photochemie mit den Maxima bei 635 nm und 680 nm konnte über mehrere Belichtungszyklen hinweg beobachtet werden, war also reversibel.

Durch Belichtungszyklen mit 577 nm und 500 nm war noch eine zweite reversible Photochemie mit den Maxima bei 505 nm und 567 nm induzierbar. In beiden Fällen war die Photochemie allerdings nicht sehr ausgeprägt. Der $\Delta\Delta A$ -Wert, der als Maß für die photochemische Aktivität eingeführt wurde und für die α -Untereinheit des PEC über 100 % liegt (siehe Abschnitt 2.7.3; Hong *et al.* 1993, Zhao & Scheer 1995), beträgt für die 635/680nm-Photochemie 1,5 - 2 % und für die 505/567nm-Photochemie 2 - 3 % (bezogen auf das Maximum bei 641 nm).

Die Photochemie mit den Maxima bei 505 und 567 nm entspricht der Photochemie des α -PEC, also des PVB-Addukts. Auch die Form des Differenzspektrums stimmt genau mit dem Differenzspektrum der Photochemie des α -PEC überein (Zhao & Scheer 1995). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass während der Rekonstitution von His₆-PecA mit PCB der native Chromophor, das 3¹-Cys-PVB, gebildet wird. Während der autokatalytischen Bindung kommt es also zumindest teilweise zu einer Isomerisierung des Chromophors.

Die zweite beobachtete Photochemie, mit den Maxima bei 635 nm und 680 nm, könnte möglicherweise die Photochemie des MBV-Addukts sein. Das MBV besitzt eine konjugierte Doppelbindung mehr als das PCB. Daher müsste das MBV-Addukt längerwelliger absorbieren als das PCB-Addukt. Das MBV-Addukt z.B., das bei der Rekonstitution von C-PC aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 entsteht, absorbiert etwa 25 nm längerwelliger als das native C-PC, ein PCB-Addukt (Arciero *et al.* 1988a). Ein Absorptionsmaximum des MBV-Addukts bei 680 nm, der langwelligen Form der Photochemie, wäre daher möglich. Die Photochemie des MBV-Addukts könnte ähnlich wie die des α -PEC ablaufen: Durch eine Isomerisierung des Chromophors kommt es während der Belichtung zu einer Änderung der Absorption.

Diese Photochemie könnte jedoch auch vom PCB-Addukt stammen. Biliproteine zeigen, wenn sie teilweise entfaltet sind, eine deutliche, wenn auch geringe Photochemie (Dekok 1982, John *et al.* 1985). Das C-PC aus *M. laminosus* zeigt z.B. in 4 M Harnstoff eine Photochemie mit Extrema bei 622 nm und 672 nm und einem $\Delta\Delta A$ -Wert von 3,4 % (Siebzehrnühl 1990). Es wäre nun vorstellbar, dass das PCB-Addukt auch unter nicht denaturierenden Bedingungen eine solche Photochemie zeigt, da sich der nicht native Chromophor, das 3¹-Cys-PCB, in der für das 3¹-Cys-PVB optimierten Bindungstasche befindet. Dies könnte zu Störungen der Struktur des Proteins und/oder des Chromophors führen, die einer teilweisen Denaturierung ähnlich sind und eine Photochemie möglich machen könnten.

Behandlung mit PCMS

Die Photochemie des α -PEC kann durch Zugabe von PCMS modifiziert werden. Bei dieser sog. Photochemie Typ II liegen die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie nah zusammen bei 563 nm und 555 nm, wobei die Extinktion der kurzwelligen Form deutlich geringer ist. Diese Modifikation wird dadurch verursacht, dass PCMS an ein oder beide Cysteine 98 und 99 bindet. Der Einfluss des PCMS auf die Photochemie kann dadurch erklärt werden, dass es durch die Bindung des großen Quecksilbersalzmoleküls zu einer Änderung der Konformation und Flexibilität des Proteins und seiner Bindungstasche kommt und sich dadurch das Absorptions- und photochemische Verhalten des Chromophors ändert. Durch Zugabe von PCMS zum Rekonstitutionsprodukt sollte untersucht werden, ob es auch beim PCB-Addukt zu Änderungen in der Absorption kommt.

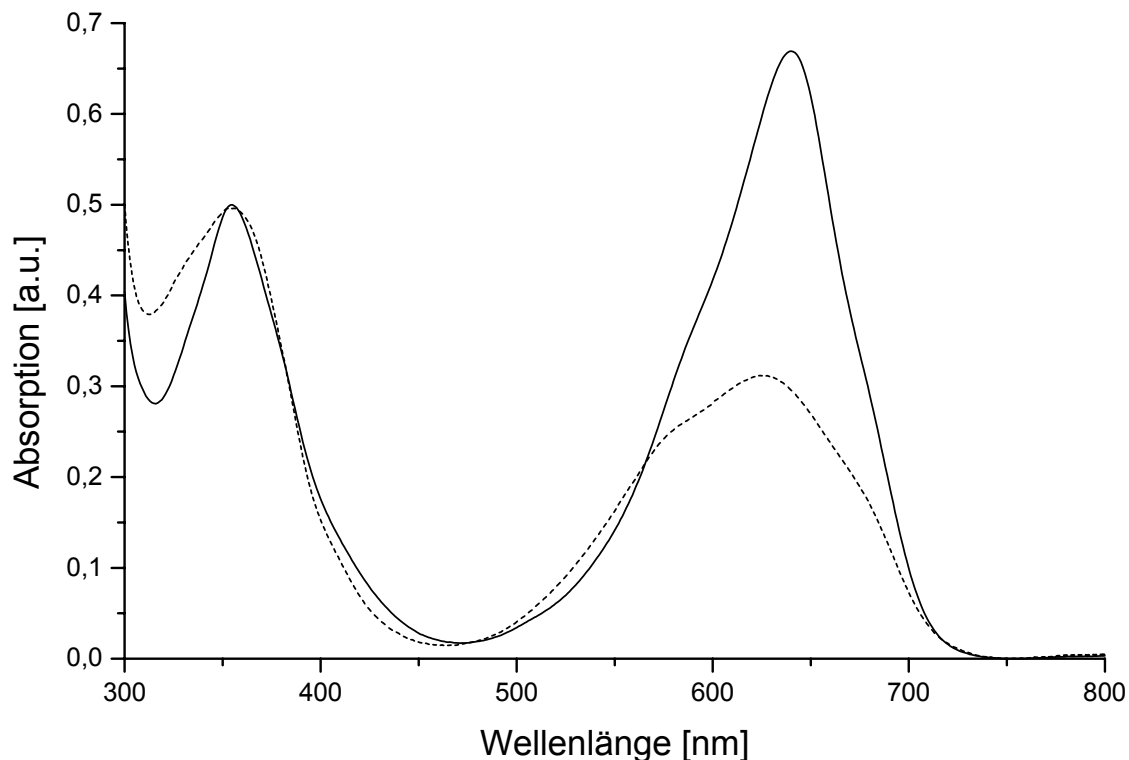


Abbildung 3-26:

Absorptionsspektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PCB vor (—) und nach (-----) Zugabe von PCMS. Die Spektren wurden im kurzwelligen Maximum auf 0,5 normiert.

Im Gegensatz zum nativen α -PEC, bei dem ein 2-molarer Überschuss an PCMS zum Protein gegeben wird, wurde hier ein 10-molarer Überschuss zugegeben. Der Grund dafür war, dass neben dem rekonstituierten Protein auch noch mindestens 50 % nicht rekonstituiertes Apoprotein und ein geringerer Anteil an *E. coli*-Proteinen im Ansatz vorhanden waren, die ebenfalls PCMS binden konnten.

Nach Zugabe des PCMS kam es zur Präzipitation eines Teils des Proteins. Durch Zentrifugation konnten diese denaturierten Proteine abgetrennt werden. Das Pellet war blau gefärbt, was darauf hinweist, dass neben dem nicht rekonstituierten Apoprotein auch rekonstituiertes Protein ausgefallen ist.

Die Absorptionsspektren vor und nach PCMS-Zugabe unterschieden sich deutlich. So ist zum einen die Absorption im langwelligen Maximum nach PCMS-Zugabe und Zentrifugation auf ein Viertel der Absorption vor PCMS-Zugabe zurückgegangen. Dies ist sicher zu einem erheblichen Teil auf die Präzipitation der Proteine zurückzuführen. Zum anderen hat sich das Absorptionsmaximum deutlich von 641 nm auf 624 nm verschoben. Auch das Verhältnis von langwelligem zu kurzwelligem Maximum hat sich mit 0,62 der PCMS-behandelten Probe im Vergleich zu 1,34 der unbehandelten Probe nicht nur verringert sondern sogar umgekehrt. Um dies zu verdeutlichen wurden die Spektren in Abbildung 3-26 auf das kurzwellige Maximum normiert. Die Verschiebung und der Rückgang der Absorption des langwelligen Maximums deuten darauf hin, dass der Chromophor, das 3¹-Cys-PCB, durch die PCMS-Bindung an das Protein und die damit strukturellen Veränderungen eine Konformation einnimmt, die mehr dem freien Chromophor ähnelt. Das frei PCB weist in Puffer ein Absorptionsmaximum bei 618 nm und ein Verhältnis von langwelligem zu kurzwelligem Maximum von 0,30 auf. Somit liegt das PCMS-behandelte PCB-Addukt spektral zwischen dem in einer Bindungstasche gebundenen und freiem PCB. Durch die Behandlung mit PCMS könnte also beim PCB-Addukt das Protein und somit die Bindungstasche strukturell so verändert werden, dass sich die Bindungstasche öffnet und der Chromophor eine mehr zyklische Form einnehmen kann. Die strukturellen Veränderungen durch das PCMS scheinen zum Teil so groß zu sein, dass es zu einer Präzipitation des Proteins, also zu einer Denaturierung, kommt.

Im Spektrum des mit PCMS behandelten Rekonstitutionsprodukts fällt noch auf, dass die Schulter bei 570 nm deutlicher ausgeprägt ist. Diese Schulter könnte von der Absorption des PVB-Addukts, d.h. des rekonstituierten α -PEC herrühren. Dieses PVB-Addukt müsste nach Zugabe von PCMS die Photochemie Typ II zeigen. Daher wurde der Ansatz bei 500 nm und 577 nm belichtet.

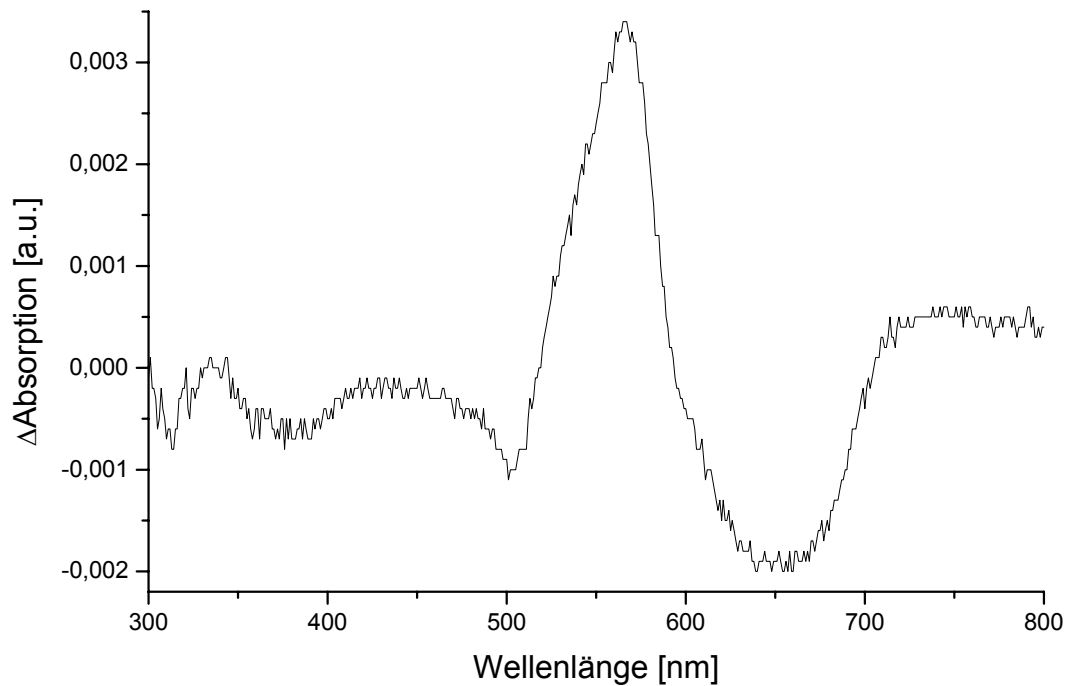


Abbildung 3-27:

Differenzspektrum der Absorptionen des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PCB nach Zugabe von PCMS und nach Belichtung bei 500 nm *minus* Belichtung bei 577 nm.

Das Differenzspektrum mit dem Maximum bei 565 nm und den kleineren Minima bei 501 nm und > 600 nm gleicht dem Differenzspektrum der Photochemie Typ II des α -PEC. Allerdings besitzt das Differenzspektrum der Photochemie Typ II des α -PEC kein so deutliches Minimum im Bereich von 645 nm. Dies dürfte durch ein Ausbleichen des PCB-Addukts während der Belichtung entstanden sein.

Das Auftreten der Photochemie Typ II ist ein weiterer Hinweis darauf, dass bei der autokatalytischen Bindung von PCB an His₆-PecA das PVB-Addukt, also α -PEC entstanden ist.

Zusammenfassende Diskussion der autokatalytischen Bindung von Phycocyanobilin

Die Rekonstitutionsversuche zeigten, dass PCB autokatalytisch sowohl vom Apoprotein PecA als auch vom Fusionsprotein His₆-PecA gebunden wird.

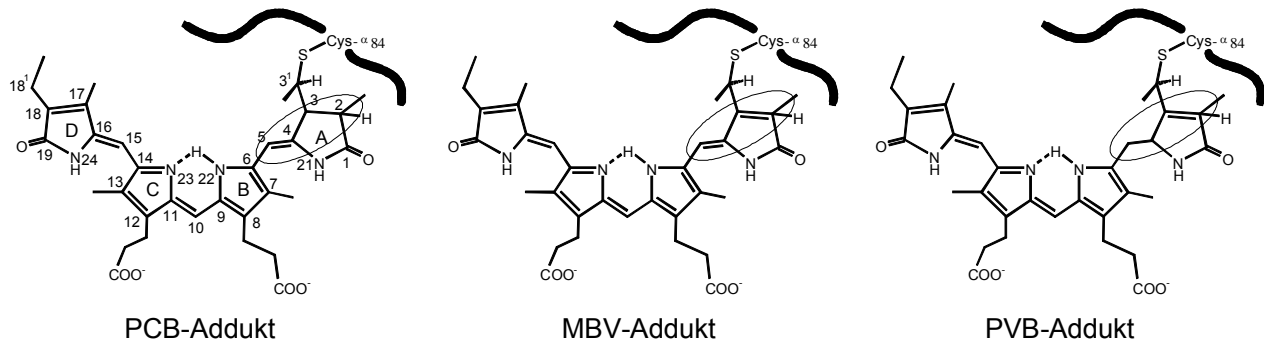


Abbildung 3-28:

Strukturformeln der drei Addukte, die bei der Rekonstitution von PCB mit (His₆)-PecA entstehen. Die Bereiche, in denen sich die Chromophore unterscheiden, sind markiert.

Es entstand dabei hauptsächlich das (His₆)-PecA-PCB-Addukt. Dabei kam es während der autokatalytischen Bindung des PCB zur Öffnung der $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung und der Ausbildung einer Thioetherbrücke zum Cystein 84 des Apoproteins und somit zur Bildung des Chromophors 3^1 -Cys-PCB. Das Absorptionsspektrum des (His₆)-PecA-PCB-Addukts gleicht den Spektren PCB-tragender Biliproteinuntereinheiten. Während der Rekonstitution kommt es somit zu einer Einlagerung und Streckung des Chromophors in der Bindungstasche des Proteins. Allerdings spiegelt der im Vergleich zu nativen Biliproteinen deutlich geringere Wert des Verhältnisses von langwelligem zu kurzwelligem Maximum wider, dass die Bindungstasche nicht für das 3^1 -Cys-PCB sondern für einen anderen Chromophor, das 3^1 -Cys-PVB, optimiert ist. Die vergleichsweise langwellige Absorption des PCB-Addukts mit einem Maximum bei 641 nm könnte auf intensive Interaktionen mit dem Protein hinweisen. Die langwellige Absorption könnte jedoch auch ihre Ursache in der Struktur des gebundenen Chromophors, dem 3^1 -Cys-PCB haben, wie z.B. einer geringen Torsion der Methinbrücken (siehe Abschnitt 1.1.3).

Das PCB-Addukt ist im Gegensatz zum α -PEC photochemisch inaktiv, obwohl 3^1 -Cys-PCB an $\Delta 15,16$ eine Doppelbindung besitzt, also zu einer Z/E-Isomerisierung, auf der die Photochemie beruht, fähig wäre. Die Photochemie des α -PEC ist demnach deutlich von der Struktur des Chromophors abhängig und nicht eine generelle Eigenschaft des Proteins.

Die Reaktion des PCB-Addukts auf PCMS, das an die Cysteine 98 und 99 bindet, mit starken spektralen Veränderungen und einer teilweisen Präzipitation des Proteins, könnte auf Unterschiede in der Struktur des PCB-Addukts im Vergleich zum nativen α -PEC hinweisen. Die Bindung von PCMS an das α -PEC bewirkt bei der langwellig absorbierenden Form (Δ 15,16-Z-Isomer des PVB) keine so deutlichen spektralen Veränderungen und auch keine Präzipitation des Proteins.

Neben der Bildung des PCB-Addukts kam es zum Teil auch noch zu einer Oxidation der Δ 2,3-Einfachbindung im Ring A des PCB, was zum Chromophor 3¹-Cys-MBV führte. Es entstand also ein (His₆-)PecA-MBV-Addukt, wie es auch bei der autokatalytischen Bindung von PCB an Phycocyanin aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 beobachtet wurde (Arciero *et al.* 1988b).

Zusätzlich kam es in geringem Umfang durch Umlagerung der Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 während der Chromophorbindung zu einer Isomerisierung des PCB zum Chromophor Cys-3¹-PVB, dem Chromophor des nativen α -PEC. Damit ist das Apoprotein PecA nicht nur zur autokatalytischen Bindung, sondern auch zur autokatalytischen Isomerisierung des Chromophors fähig, bei der es sich um eine neuartigen Aktivität eines Biliprotein handelt. Der Chromophor des α -PEC, das PVB, entsteht also erst während der Chromophorbindung. Dies erklärt auch, warum nie freies PVB in Organismen gefunden werden konnte, obwohl die Biosynthese von Phycobilinen intensiv untersucht worden ist (Beale 1993, Beale 2000). Der PVB-Chromophor ist demnach kein Produkt der Biosynthese, sondern entsteht erst während der Chromophorbindung aus PCB. Das entstandene (His₆-)PecA-PVB-Addukt ist bezüglich der Photochemie (Typ I und Typ II) und des Einflusses der Cysteine identisch mit dem α -PEC.

3.4.2 Enzymatische Rekonstitution mit dem Chromophor Phycocyanobilin und der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase

In Zusammenarbeit mit Prof. Kai-Hong Zhao wurde eine enzymatische Rekonstitution der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins, sowohl mit His₆-PecA als auch mit PecA, entwickelt. Dazu wurden die Gene *pecE* und *pecF*, die sich wie *pecA* im Phycoerythrocyanin-Operon befinden, überexprimiert und diese Proteine zusätzlich in der Rekonstitution eingesetzt. Es wurde vermutet, dass die Proteine PecE und PecF, wie für CpcE und CpcF aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 nachgewiesen (Swanson *et al.* 1992, Fairchild *et al.* 1992), an der Bindung des Chromophors an das Apoprotein beteiligt sind, also als Lyase arbeiten. Die Rekonstitutionen wurden sowohl mit den ungetaggtten Proteinen PecA, PecE und PecF als auch mit den getaggtten Proteinen His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF durchgeführt.

Rekonstitutionsverlauf

Die besten Ergebnisse brachten die Rekonstitutionen mit den aufgereinigten getaggtten Proteinen, deren Verlauf in Abbildung 3-29 gezeigt ist. Die enzymatische Rekonstitution mit den aufgereinigten Proteinen (Zhao *et al.* 2002, Storf *et al.* 2001) wurde in einem Gemisch aus Tris/HCl-Puffer und Kaliumphosphat-Puffer durchgeführt. Der Kaliumphosphat-Puffer war notwendig, um die Proteine in Lösung zu halten, denn in reinem Tris/HCl-Puffer sind die Proteine sehr schlecht löslich. Tris/HCl war jedoch nötig, da reiner Kaliumphosphat-Puffer die Aktivität eines für die Rekonstitution notwendigen Cofaktors, Mn²⁺ oder Mg²⁺, deutlich reduzierte. Neben den Proteinen His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF, die in äquimolaren Mengen eingesetzt wurden und eine Konzentration zwischen 0,4 und 0,6 mg/ml aufwiesen, wurden noch in DMSO gelöster Chromophor, 2-Mercaptoethanol, MnCl₂ oder MgCl₂, Triton X-100 und NaCl zugegeben. 5 mM 2-Mercaptoethanol und 3 mM Mn²⁺ bzw. 5 mM Mg²⁺ im Rekonstitutionsansatz waren für eine optimale Aktivität von PecE/PecF notwendig. Die Zugabe von 1 % Triton X-100, einem Detergens, und 100 mM NaCl erhöhte die Löslichkeit der Proteine und beschleunigte die Rekonstitution, die bei einer Temperatur von 37 °C nach 3 h abgeschlossen war. Triton X-100 hatte wahrscheinlich zusätzlich noch Einfluss auf die Struktur der Chromophore (siehe 3.1.3) und beeinflusste dadurch die Chromophorbindung.

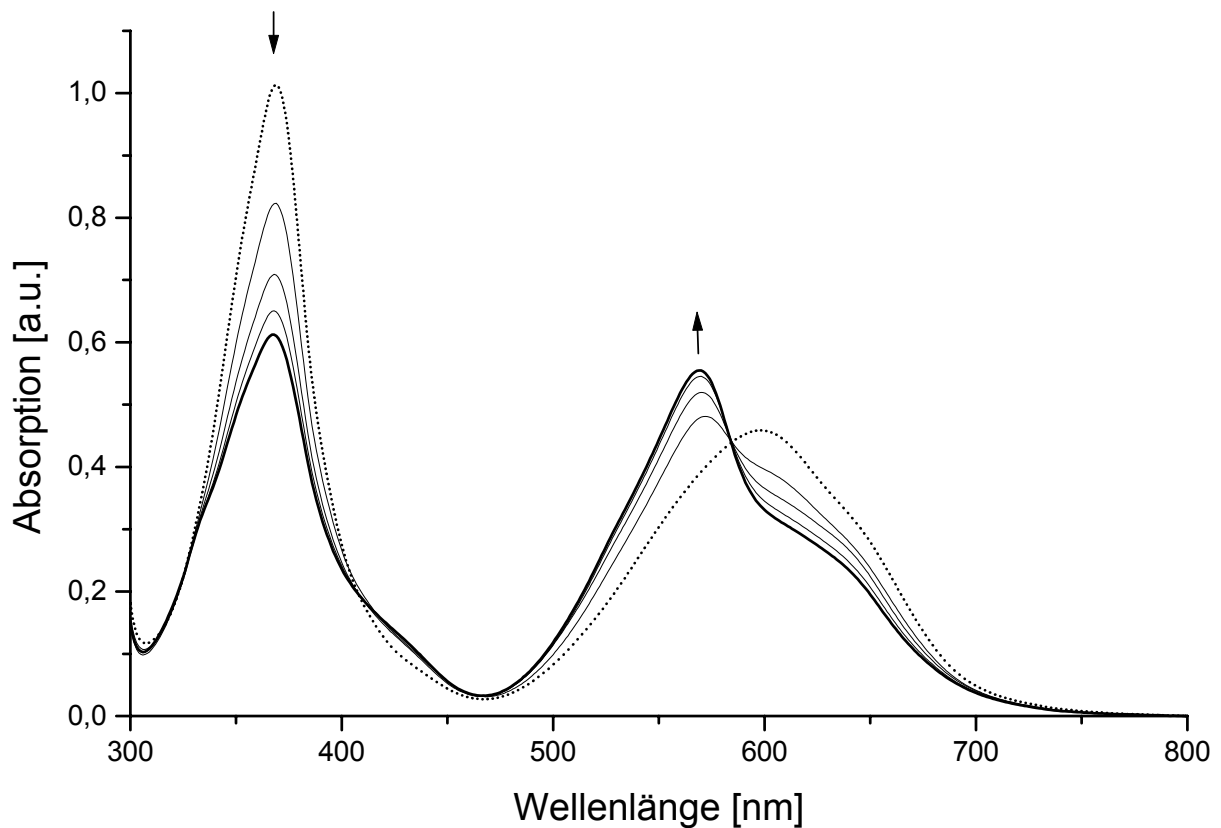
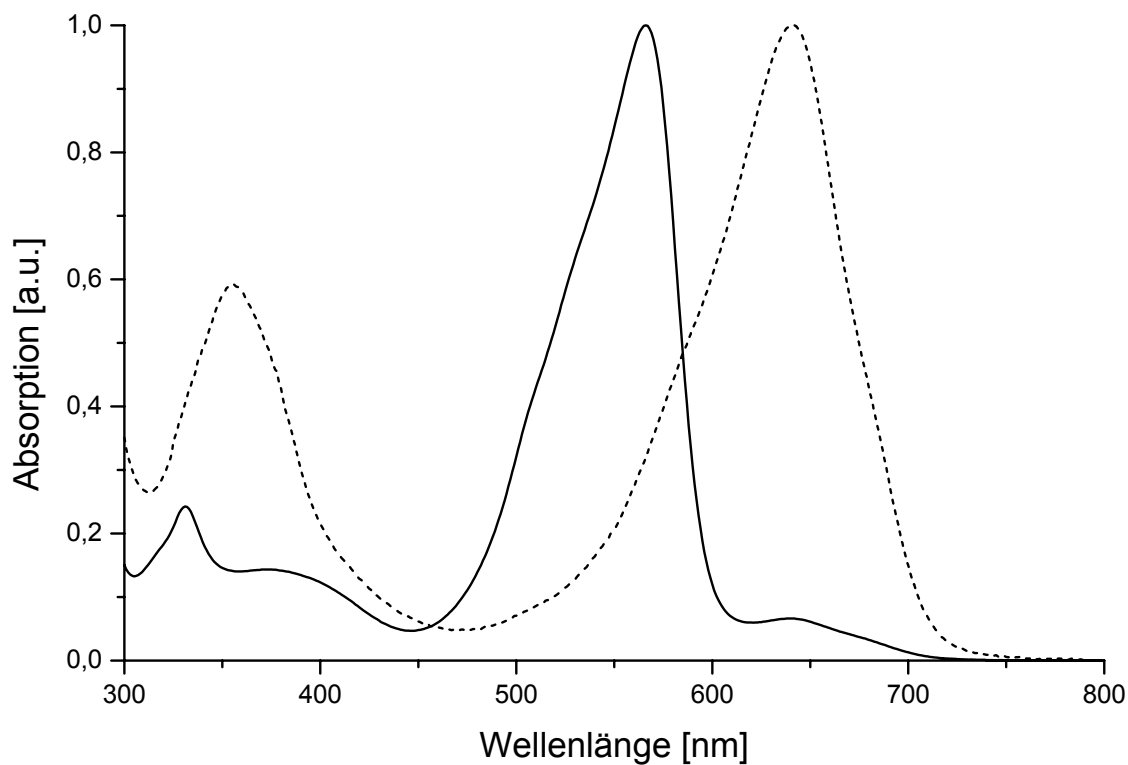


Abbildung 3-29:

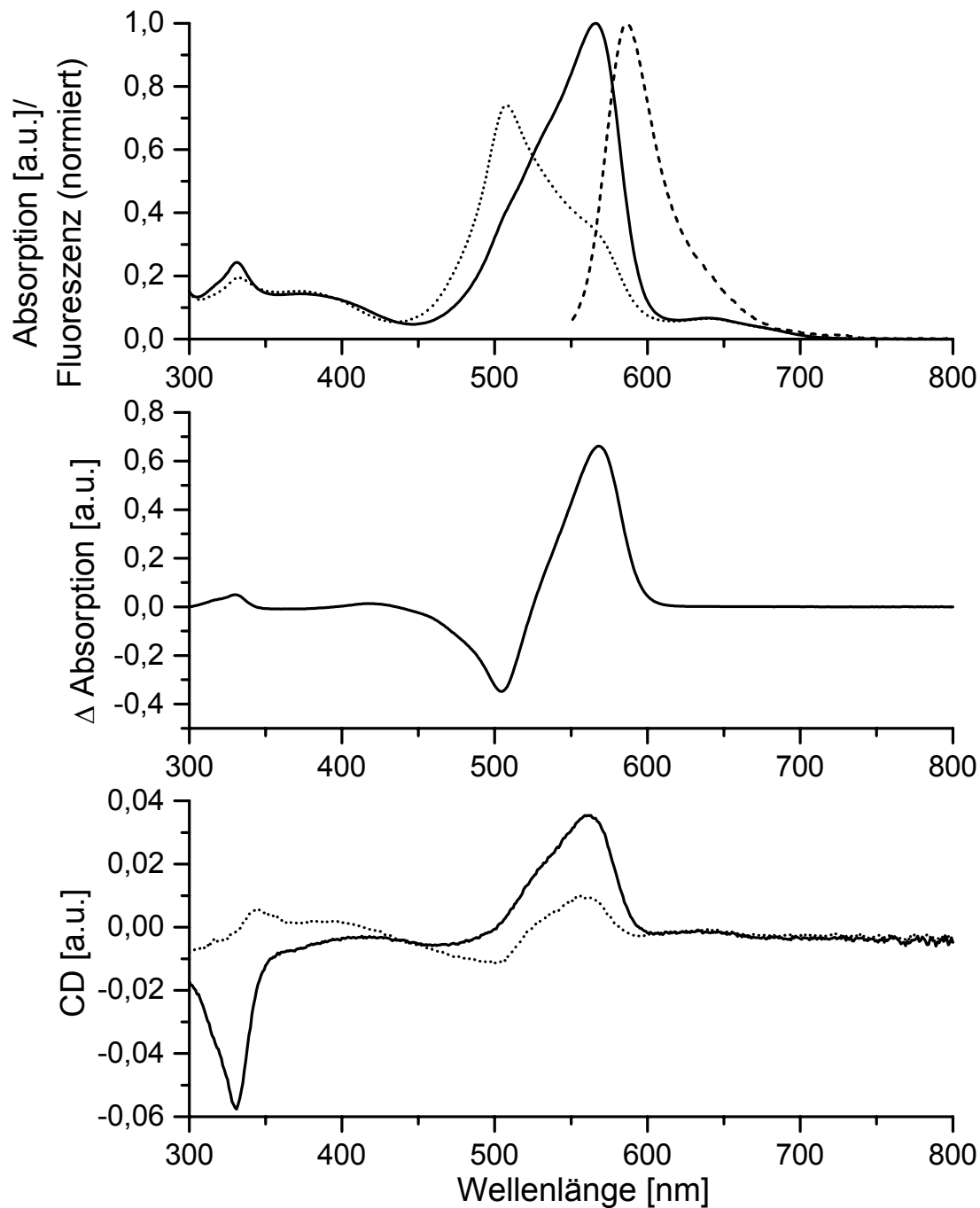
Spektrale Veränderungen während der Rekonstitution mit den aufgereinigten Proteinen His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF und dem Chromophor PCB bei 37 °C über einen Zeitraum von 3 h. Das Anfangsspektrum (·····) direkt nach Zugabe des PCB und das Endspektrum (—) nach 3 h sind fett gedruckt dargestellt. Die dazwischenliegenden Spektren (—), die alle 45 min aufgenommen wurden, sind dünn gedruckt. Die Absorptionsänderungen sind mit Pfeilen markiert.

Bei der Rekonstitution des Apoproteins His₆-PecA mit dem Chromophor PCB unter Zugabe der Proteine His₆-PecE und His₆-PecF ergaben sich andere spektrale Veränderungen als bei der Rekonstitution nur mit dem Apoprotein und PCB. Die Absorption bei ca. 600 nm, bei der der freie Chromophor im Rekonstitutionsansatz ein Absorptionsmaximum besitzt, nahm ab und ein neues deutliches Maximum entstand blauverschoben bei 569 nm. Das kurzwellige Absorptionsmaximum bei 368 nm nahm deutlich ab und das Auftreten einer orangefarbenen Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 587 \text{ nm}$) war zu beobachten. Diese spektralen Verschiebungen während der Rekonstitution und die Fluoreszenz des Rekonstitutionsprodukts lassen, wie auch bei der autokatalytischen Rekonstitution von Apoprotein und PCB, auf eine Bindung des Chromophors an das Apoprotein schließen. Allerdings entstand durch die Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF ein anderes Hauptprodukt als bei der Rekonstitution ohne diese beiden Proteine. Deutlich ist dies durch Vergleich der Spektren der aufgereinigten Produkte aus den Rekonstitutionen mit und ohne His₆-PecE/His₆-PecF zu erkennen (Abbildung 3-30).

**Abbildung 3-30:**

Absorptionsspektren der Produkte aus den Rekonstitutionen von His₆-PecA und dem Chromophor PCB mit (—) und ohne (-----) Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF. Die Spektren wurden auf das langwellige Maximum normiert.

Das blaue PCB-Addukt, das hauptsächlich bei der autokatalytischen Rekonstitution des Apoproteins His₆-PecA mit PCB entstand, hat ein Absorptionsmaximum bei 641 nm. Das Spektrum des aufgereinigten violett gefärbten Rekonstitutionsansatzes von His₆-PecA und PCB unter Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF zeigt zwar auch ein kleines Maximum bei 641 nm, hauptsächlich aber ist ein Maximum bei 566 nm zu erkennen. Und damit gleicht das entstandene Hauptprodukt spektral dem nativen α -PEC, das ein Absorptionsmaximum bei der selben Wellenlänge besitzt (Zhao & Scheer 1995). Dieses Hauptprodukt mit $\lambda_{\max} = 566$ nm entstand jedoch nur dann, wenn sowohl (His₆-)PecE als auch (His₆-)PecF zugegeben wurde. Wurde nur eines der Proteine zugesetzt, so verlief die Rekonstitution wie bei der autokatalytischen Rekonstitution. Wurde die Rekonstitution mit der anderen Methode, mit den *E. coli*-Lysaten von PecA, PecE und PecF mit PCB durchgeführt, so entstand das gleiche Hauptprodukt mit einem Maximum bei 566 nm. Bei dieser Rekonstitutionsmethode konnte eine Beschleunigung der Chromophorbinding durch PecE und PecF beobachtet werden. Hier war nach 12 h die Rekonstitution abgeschlossen, wohingegen die autokatalytische Rekonstitution von PecA und PCB in den Lysaten erst nach 18 - 24 h abgeschlossen war. Genaue spektrale Untersuchungen sollten nun klären, ob bei dieser Rekonstitution tatsächlich ein dem nativen α -PEC identisches Addukt entstanden ist.

Absorptions-, Fluoreszenz-, CD-Spektren und Photochemie**Abbildung 3-31:**

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF und PCB nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Lagerpuffer. Oben: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····). Daneben ist das Fluoreszenzspektrum (Excitation 520 nm) der langwellig absorbierenden Form (-----) dargestellt.

Mitte: Absorptionsdifferenzspektrum (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm). Unten: CD-Spektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····).

Das Rekonstitutionsprodukt zeigte eine sehr ausgeprägte Photochemie. Die beiden Formen der Photochemie, die durch Belichtung reversibel ineinander umgewandelt werden konnten, besaßen Absorptionsmaxima bei 566 nm (nach Belichtung bei 500 nm) und 507 nm (nach Belichtung bei 577 nm). Die Absorptionsspektren während der Photochemie des Rekonstitutionsprodukts stimmten in ihren Maxima mit denen der Photochemie Typ I des nativen α -PEC überein (Zhao & Scheer 1995). Allerdings zeigten die Absorptionsspektren des rekonstituierten Proteins, im Gegensatz zum nativen α -PEC, nach Belichtung bei 500 nm bzw. 577 nm noch Schultern bei ca. 505 nm bzw. 570 nm, was bedeutet, dass die beiden Formen durch Belichtung nicht vollständig ineinander umgewandelt werden konnten. Anhand des Absorptionsdifferenzspektrums (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm) konnte der $\Delta\Delta A$ -Wert der Photochemie bestimmt werden. Beim Rekonstitutionsprodukt lag er zwischen 100 % und 110 % und damit etwas niedriger als der $\Delta\Delta A$ -Wert des nativen α -PEC mit 127 % (Zhao & Scheer 1995). Dies zeigte, ebenso wie die Schultern in den Absorptionsspektren, dass die Umwandlung der beiden Formen der Photochemie ineinander beim Rekonstitutionsprodukt weniger effizient war als beim nativen α -PEC.

Genau wie beim nativen α -PEC (Maruthi Sai *et al.* 1992) war eine Fluoreszenz des rekonstituierten α -PEC nur bei der langwellig absorbierenden Form mit einem Maximum bei 587 nm zu beobachten. Wurde versucht, bei der kurzwellig absorbierenden Form der Photochemie eine Fluoreszenz zu induzieren, so kam es zu einer Photoumwandlung in die langwellig absorbierende Form und eine Fluoreszenz trat wiederum nur bei 587 nm auf. Das CD-Spektrum der langwellig absorbierenden Form des Rekonstitutionsprodukts stimmte mit dem negativen Extremum bei 331 nm und dem positiven Extremum bei 563 nm mit CD-Spektren der α -Untereinheit des PEC überein (Zhao & Scheer 1995). Das CD-Spektrum der kurzwellig absorbierenden Form zeigte ein positives Extremum bei 345 nm und ein negatives bei 501 nm, wie es auch bei CD-Spektren des α -PEC zu beobachten ist (Zhao & Scheer 1995). Im Gegensatz zum nativen α -PEC war allerdings beim rekonstituierten α -PEC noch ein deutliches positives Extremum bei 556 nm zu erkennen, was durch eine nicht vollständige photochemische Umwandlung erklärt werden kann. Die kleinen Maxima in Absorptions- und CD-Spektren bei 640 nm stammten vom His₆-PecA-PCB-Addukt, das in geringem Umfang auch bei der enzymatische Rekonstitution entstand.

Die Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren der beiden Formen der Photochemie des Hauptprodukts aus der Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PCB stimmten mit den Spektren des nativen α -PEC weitgehend überein. Dies lässt darauf schließen, dass es bei der Rekonstitution durch Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF nicht nur zu einer Bindung des Chromophors PCB kam, sondern auch zu einer Isomerisierung des Chromophors zum 3¹-Cys-PVB, dem Chromophor des nativen α -PEC. Die ausgeprägte Photochemie des rekonstituierten Biliproteins beruhte demnach, wie beim nativen α -PEC, auf einer Z/E-Isomerisierung dieses durch die Katalyse von His₆-PecE und His₆-PecF entstandenen 3¹-Cys-PVB.

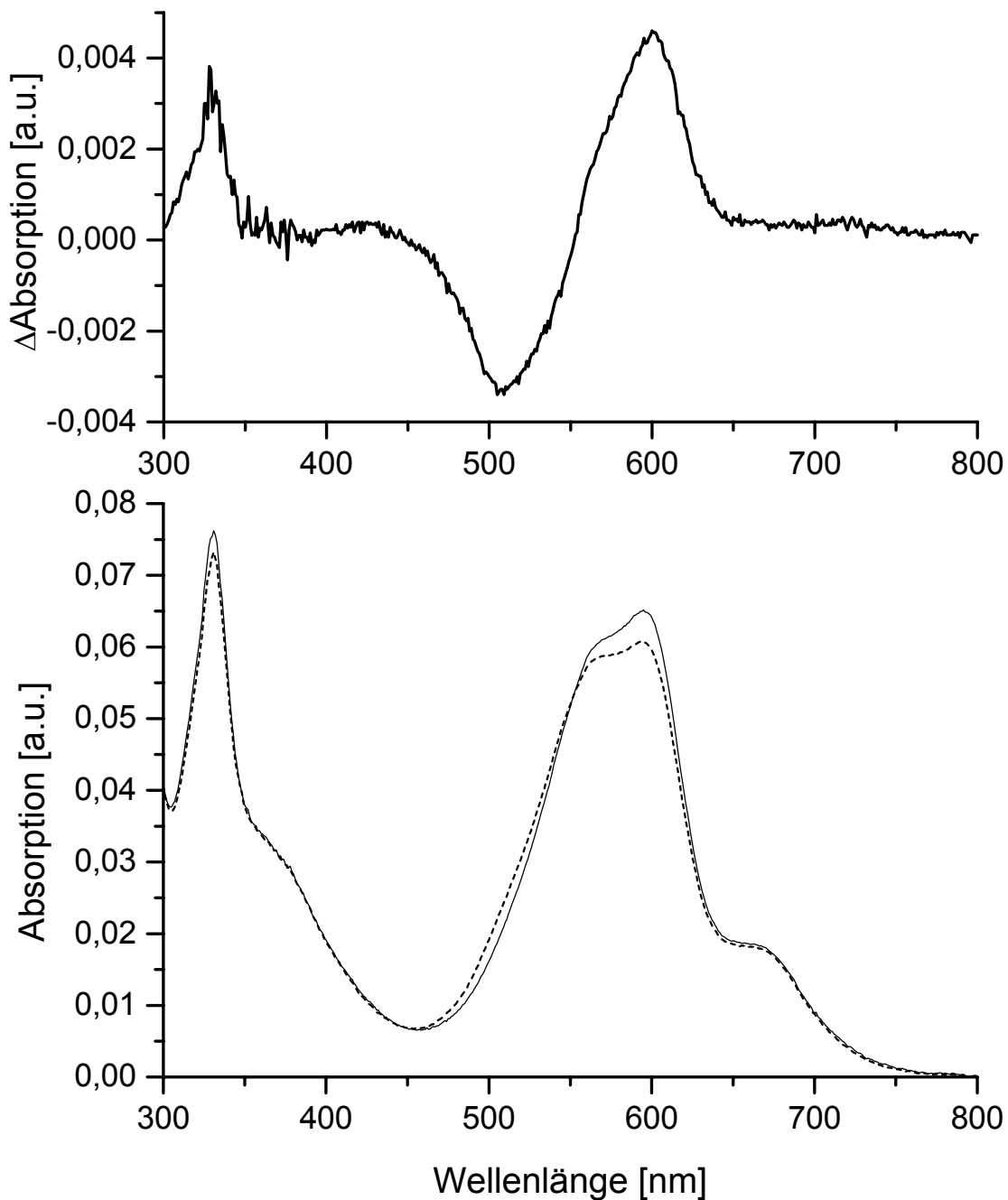
Der einzige Unterschied zwischen nativem und rekonstituiertem α -PEC schien zu sein, dass die reversible Photochemie beim rekonstituierten α -PEC etwas weniger ausgeprägt ist. Möglicherweise hat das His₆-Tag dazu führt, dass ein Teil der rekonstituierten Proteine nicht vollständig korrekt gefaltet ist.

Denaturierende Elektrophorese

Die denaturierende SDS-PAGE des rekonstituierten α -PEC (Abbildung 3-20, Spur 2) zeigt, dass die Bande von His₆-PecA bei 23 kDa sowohl mit Zinkacetat, das an den Chromophor bindet, als auch mit Coomassie-Blau, das an das Protein bindet, anfärbbar war, was bedeutete, dass das PVB ebenso wie das PCB im PecA-PCB-Addukt (Spur 3) kovalent an das Protein gebunden ist. Daneben sind im mit Coomassie-Blau gefärbten Gel die Banden von His₆-PecE bei 35 kDa und His₆-PecF bei 28 kDa zu erkennen.

Denaturierung durch 8 M Harnstoff

Die Zugabe von 8 M Harnstoff sollte zu der vollständigen Entfaltung des rekonstituierten α -PEC führen, wodurch der Proteineinfluss auf den Chromophor, dem 3¹-Cys-PVB, völlig aufgehoben wird und dieser sich wie ein freier Chromophor verhält (Scheer & Kufer 1977, Scheer 1982).

**Abbildung 3-32:**

Reversible Denaturierung des rekonstituierten α -PEC, dem His₆-PecA-PVB-Addukt.

Unten: Absorptionsspektren des rekonstituierten α -PEC in 8 M Harnstoff, pH 1,9 nach Belichtung bei 500 nm (——) und 577 nm (-----).

Oben: Absorptionsdifferenzspektrum des rekonstituierten α -PEC in 8 M Harnstoff, pH 1,9 (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Die Zugabe von 8 M Harnstoff, pH 1,9 zum rekonstituierten α -PEC ergab spektrale Veränderungen, die dem vollständig denaturierten nativen α -PEC entsprechen (Siebzehnrübl *et al.* 1989, Zhao & Scheer 1995): Die langwellige Extinktion nahm stark ab und war nun

geringer als die kurzwellige Extinktion. Es entstand ein Maximum bei 595 nm mit einer deutlichen Schulter bei ca. 570 nm. Das kurzwellige Maximum lag bei 331 nm.

Beim in 8 M Harnstoff denaturierten nativen α -PEC kann durch Belichtung mit 500 nm und 577 nm eine geringe, aber deutliche reversible Photochemie induziert werden (Siebzehnrübl *et al.* 1989, Siebzehnrübl 1990). Dies konnte auch beim denaturierten rekonstituierten α -PEC beobachtet werden. Gut ist diese Photochemie anhand des Absorptionsdifferenzspektrums mit Extrema bei 507 nm und 599 nm zu sehen. Der $\Delta\Delta A$ -Wert liegt beim rekonstituierten, wie beim nativen α -PEC bei 13 % (Siebzehnrübl *et al.* 1989). Die spektralen und photochemischen Übereinstimmungen des denaturierten nativen und rekonstituierten α -PEC waren ein weiterer Beweis dafür, dass bei der Rekonstitution der native Chromophor, das 3¹-Cys-PVB gebunden wurde. Daneben zeigt die reversible Photochemie des denaturierten α -PEC, dass das quasi freie 3¹-Cys-PVB auch ohne Einfluss des Proteins zu einer Photoisomerisierung in der Lage ist.

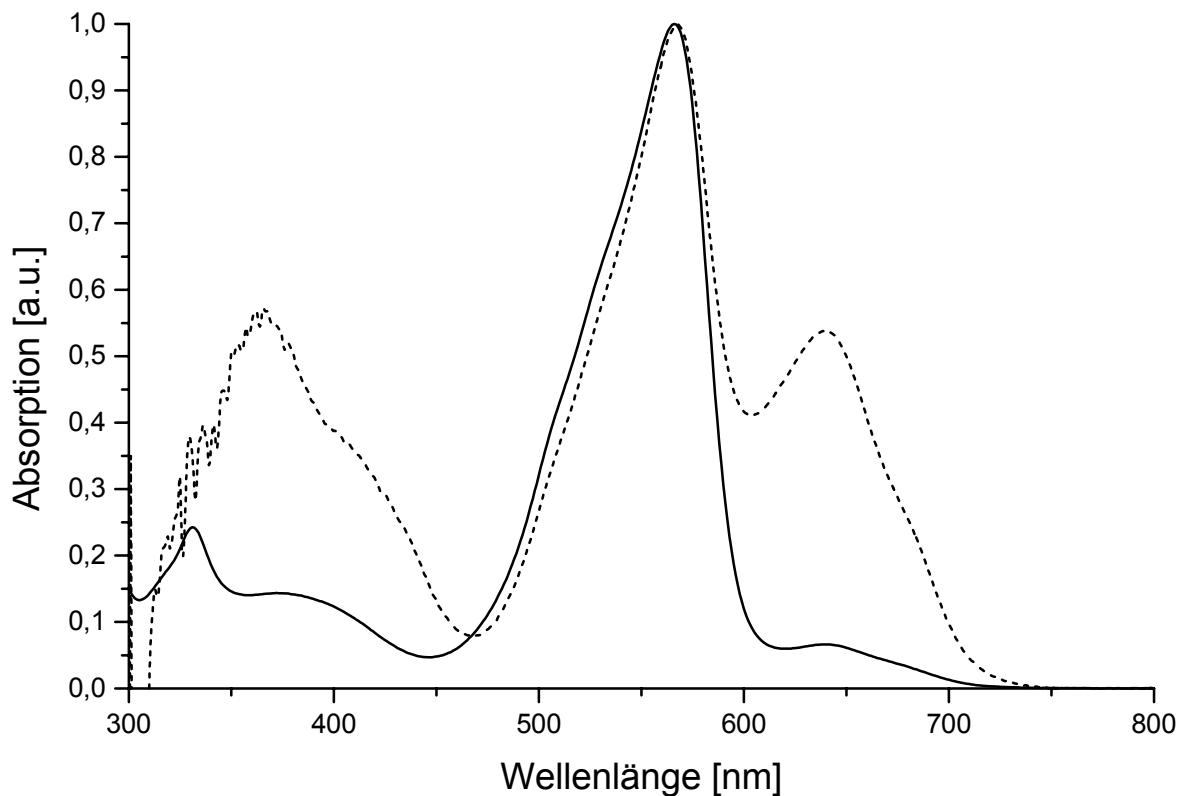
Die Schulter bei 660 nm in den Absorptionsspektren stammte vom PCB-Addukt, das bei der Rekonstitution mit His₆-PecE und His₆-PecF als Nebenprodukt gebildet wurde.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten

Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten wurde das mit 8 M Harnstoff denaturierte rekonstituierte α -PEC mit HCl auf einen pH von 1,9 eingestellt. Mit Hilfe des bekannten Extinktionskoeffizienten von denaturiertem α -PEC (siehe Tabelle 3-1), konnte ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{566} = 77000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für die langwellig absorbierende Form des rekonstituierten α -PEC (nach Belichtung bei 500 nm) errechnet werden. Dieser Koeffizient ist damit etwas geringer als der des nativen α -PEC aus *M. laminosus* mit $\epsilon_{562} = 96000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Siebzehnrübl 1990), was durch die nicht vollständige Photoisomerisierung des rekonstituierten α -PEC erklärbar ist.

Ausbeute der Rekonstitution

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten konnten nun die Ausbeuten berechnet werden. Die Ausbeuten an rekonstituiertem α -PEC waren bei der Rekonstitution mit den aufgereinigten Proteinen und der Rekonstitution mit den *E. coli*-Lysaten etwa gleich und lagen zwischen 30 mg und 50 mg pro Liter *E. coli*-Expressionskultur für PecA bzw. His₆-PecA. Es konnte also ca. die Hälfte des Apoproteins zum α -PEC rekonstituiert werden.

**Abbildung 3-33:**

Absorptionsspektren der Produkte der Rekonstitution mit His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF und dem Chromophor PCB. Die Spektren der Rekonstitutionsansätze mit den aufgereinigten Proteinen + PCB nach 3 h Inkubation (—) und den Lysaten + PCB nach 16 h Inkubation (-----) wurden nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer aufgenommen und auf das langwellige Maximum normiert.

Obwohl die Ausbeuten an rekonstituiertem α -PEC, dem PVB-Addukt, bei den beiden verschiedenen Rekonstitutionsmethoden übereinstimmten, gab es hinsichtlich des PCB-Addukts einen deutlichen Unterschied. Bei der Rekonstitution mit den Lysaten entstand die 10 – 20 fache Menge an PCB-Addukt, wie an der unterschiedlichen Absorption bei 640 nm in Abbildung 3-33 zu erkennen ist. Bei der Rekonstitution mit den aufgereinigten Proteinen wurde also die Bildung des PCB-Produkts weitgehend unterdrückt, was für die nachfolgenden spektroskopischen Charakterisierungen des rekonstituierten α -PEC von großem Vorteil war.

Bei der Aufbereitung der Proben für die spektralen Untersuchungen zeigte sich, dass das PCB-Addukt im Gegensatz zum rekonstituierten α -PEC die Neigung hatte zu präzipitieren. So ging der Anteil an PCB-Addukt nach Dialyse, Einfrieren/Auftauen und Aufreinigung durch native PAGE in den Proben deutlich zurück.

Abspaltung des Chromophors mit Ag_2SO_4

Zu Beginn dieser Arbeit war es nicht möglich, den Chromophor, das PVB, vom α -PEC abzuspalten (Storf *et al.* 2001). Methoden, mit denen PCB oder Phycoerythrobilin (PEB) abgespalten werden können, wie durch Kochen in MeOH (O'Carra & O'hEocha 1966) oder durch HBr/TFA (Schram & Kroes 1971), waren für die Abspaltung von PVB nicht geeignet. Dies liegt an der abweichenden Struktur des Ring A des 3^1 -Cys-PVB an dem der Chromophor an das Protein gebunden ist. Bei 3^1 -Cys-PCB und 3^1 -Cys-PEB befindet sich keine Doppelbindung im Ring A, wodurch sich bei der Abspaltung eine $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung, also eine Ethylidengruppe ausbilden kann. Das 3^1 -Cys-PVB besitzt dagegen ein $\Delta 2,3$ -Doppelbindung im Ring A. Eine $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung kann sich daher nicht ausbilden und der Chromophor kann mit den Methoden, die für PCB und PEB geeignet sind, nicht abgespalten werden.

Die Abspaltung des PVB vom α -PEC wurde mit einer Methode versucht, mit der das Häm vom Cytochrom c abgespalten werden kann (Fisher *et al.* 1973). Das Häm besitzt mit einer der Bindungsstelle benachbarten Doppelbindung in den Ringen A und D eine identische Struktur wie das 3^1 -Cys-PVB im Ring A.

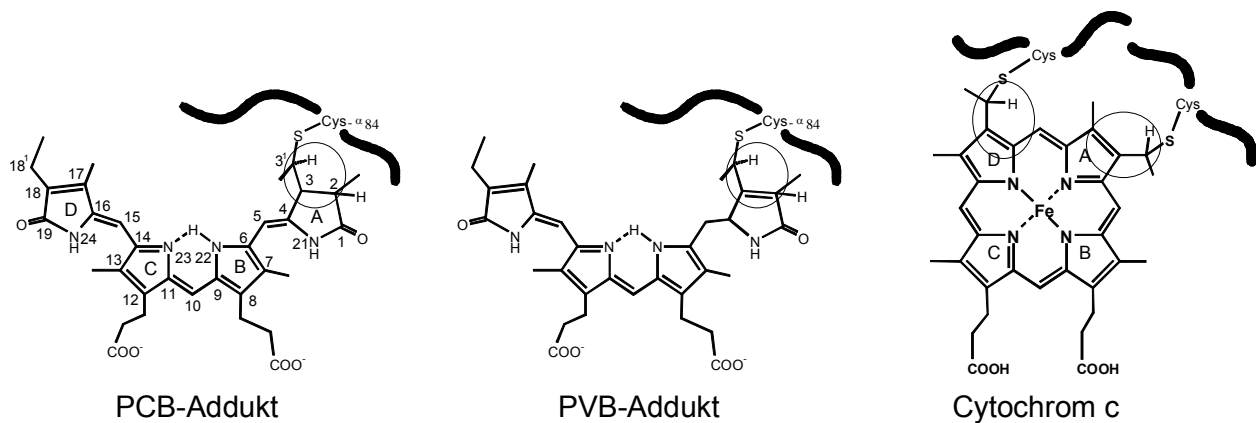


Abbildung 3-34:

3^1 -Cys-PCB, 3^1 -Cys-PVB und an Cytochrom c doppelt gebundenes Häm. Die Strukturen der bindenden Ringe sind hervorgehoben.

Für die Abspaltungsreaktion wurde das aufgereinigte rekonstituierte α -PEC gefriergetrocknet. Nach Zugabe von Ag_2SO_4 und Essigsäure konnten nach 2 h Inkubation bei 40 °C freie Chromophore detektiert werden. Abbildung 3-35 zeigt Absorptionsspektren des Abspaltungsprodukts in MeOH / 2 % HCl.

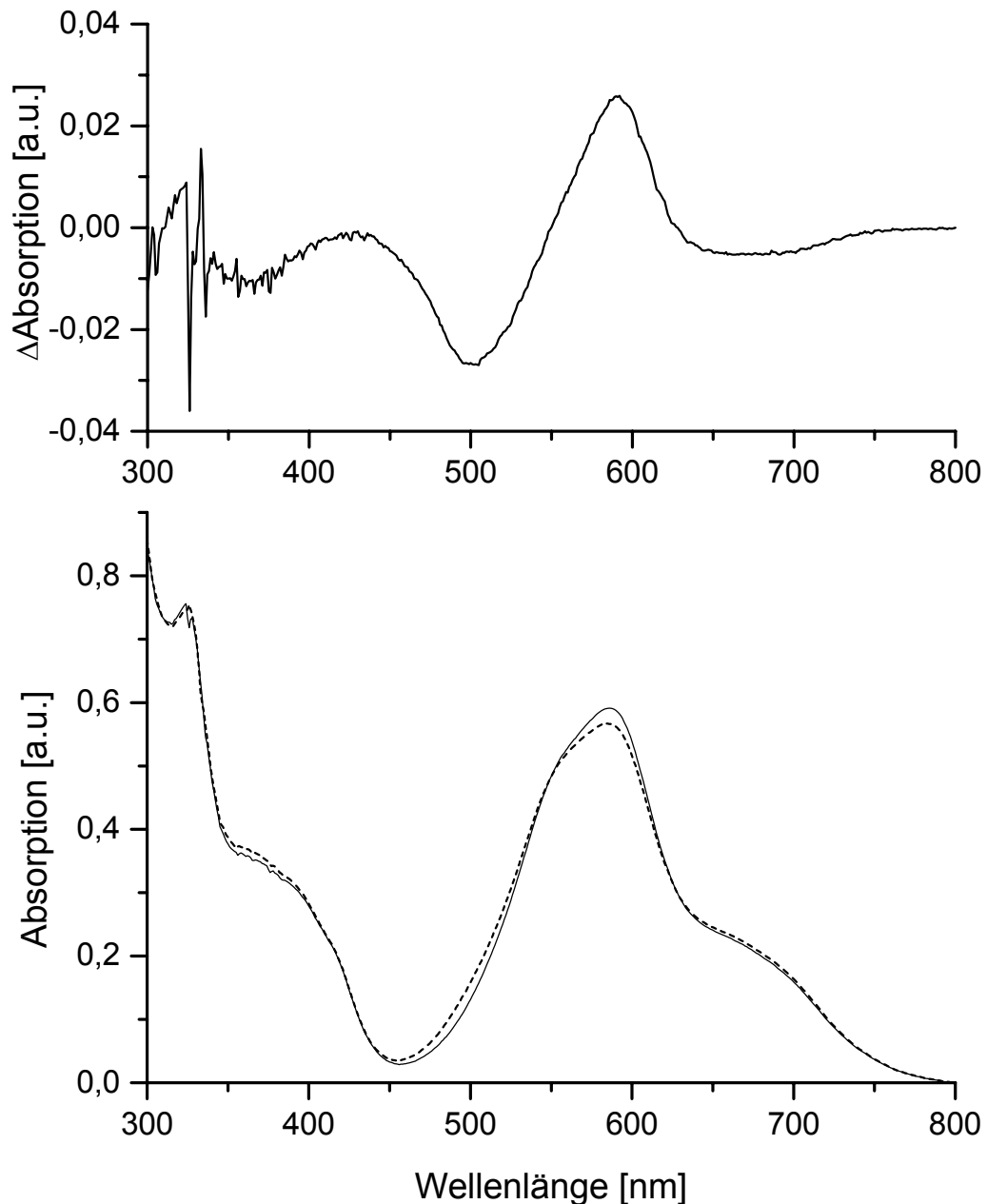


Abbildung 3-35:

Absorptionsspektren des mit Hilfe von Ag_2SO_4 von rekonstituiertem α -PEC abgespaltenen Chromophors.

Unten: Die Absorptionsspektren wurden nach Belichtung mit 500 nm (—) und 577 nm (-----) in MeOH / 2 % HCl aufgenommen.

Oben: Absorptionsdifferenzspektrum (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Das Laufverhalten des abgespaltenen Chromophors auf Dünnschichtchromatographie (RP-8) zeigte, dass der Chromophor keine Aminosäure(n) mehr gebunden hatte. Denn der R_f -Wert des abgespaltenen Chromophors von 0,24 lag im Bereich der freien Phycobiline, wie des PCB mit einem R_f -Wert von 0,26. Der abgespaltenen Chromophor zeigte mit einem Maximum bei 589 nm und einer Schulter bei 560 nm ein ähnliches Absorptionsspektrum wie das 3¹-Cys-PVB im Peptid bzw. im denaturierten α -PEC (Bishop *et al.* 1987, Zhao & Scheer 1995, Zhao *et al.* 1995). Auch zeigte dieser freie Chromophor eine reversible Photochemie, ähnlich der des denaturierten α -PEC. Deutlich ist diese Photochemie am Absorptionsdifferenzspektrum mit den Extrema bei 505 nm und 594 nm zu erkennen. Der $\Delta\Delta A$ -Wert betrug 10 % und war ähnlich groß wie beim denaturierten α -PEC mit 13 %.

Die spektralen Ähnlichkeiten zwischen 3¹-Cys-PVB im denaturierten Protein und dem Abspaltungsprodukt lässt den Schluss zu, dass es sich bei dem abgespaltenen Chromophor um freies PVB handelt. Wahrscheinlich entsteht bei der Abspaltung eine Vinylgruppe an Ring A wie in den Gallenfarbstoffen Biliverdin und Bilirubin. Ein Nachweis der Struktur durch Massen- und NMR-Spektroskopie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Zum einen war die Aufreinigung des PVB erschwert, da bei der Abspaltung eine Vielzahl von Nebenprodukten entstanden, die im Absorptionsspektrum u.a. an den Schultern bei 380 nm und 670 nm zu erkennen sind. Auch die Dünnschichtchromatographie zeigte neben der rosa gefärbten Hauptbande des PVB weitere unterschiedlich gefärbte Banden. Diese Nebenprodukte hatten zum Teil ähnliche R_f -Werte wie das Hauptprodukt. Zum anderen waren die Ausbeuten der Abspaltung sehr gering. Es existiert zwar kein Extinktionskoeffizient für das PVB, da es noch nie isoliert oder synthetisiert wurde. Wird jedoch der Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{590} = 38600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) für das 3¹-Cys-PVB im Chromotripeptid des α -PEC zugrunde gelegt (Bishop *et al.* 1987), der dem Extinktionskoeffizienten des freien PVB ähnlich sein dürfte, so ergab sich eine Ausbeute von ca. 7 %. Gallenfarbstoffe können in Anwesenheit von Schwermetallen leicht oxidiert und dadurch zerstört oder modifiziert werden (Scheer *et al.* 1977). Dies könnte der Grund für die schlechte Ausbeute an PVB und dem Auftreten vieler Nebenprodukte nach der Abspaltung mit Ag_2SO_4 sein.

Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC

Durch tryptischen Verdau der Produkte aus der Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PCB und deren anschließende Trennung durch HPLC konnte untersucht werden, welche Addukte neben dem PVB-Addukt entstanden sind.

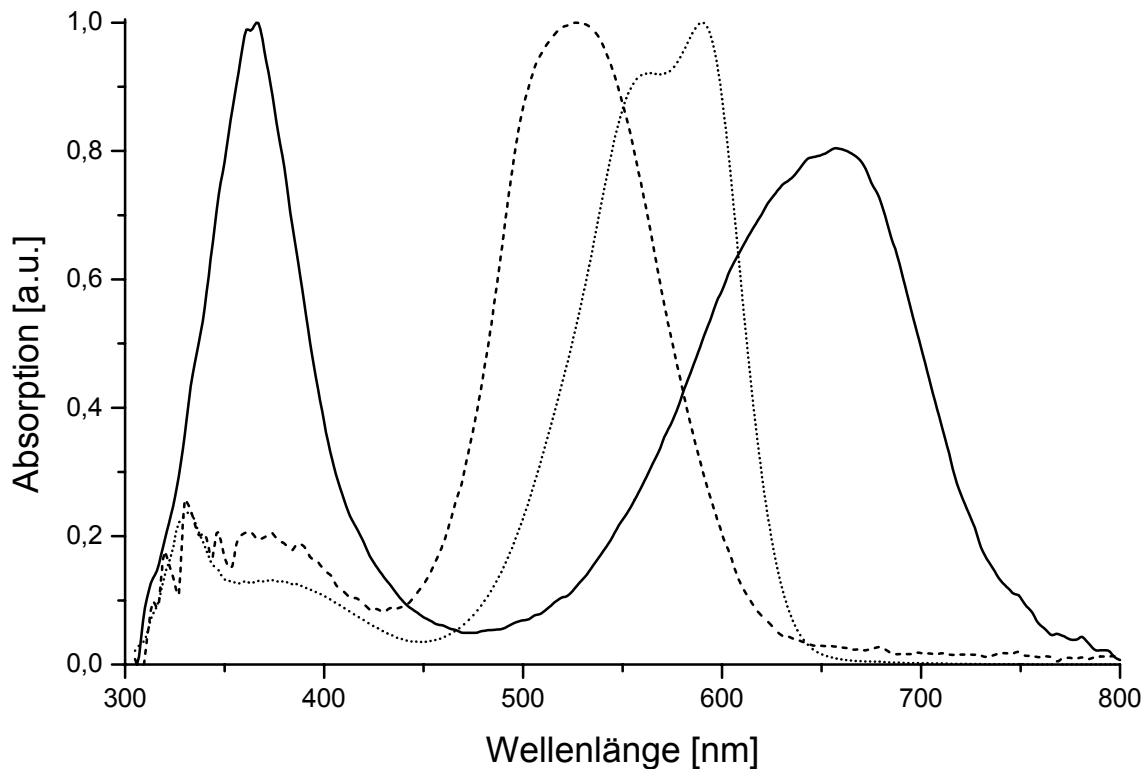


Abbildung 3-36:

Absorptionsspektren der Chromopeptide nach Trypsinverdau der Produkte der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PCB.

Die Spektren des PCB-Peptids (—), des Δ 15,16-Z-PVB-Peptids (·····) und des Δ 15,16-E-PVB-Peptids (-----) wurden im HPLC-Laufmittel 0,1 M KPP pH 2,1 : Acetonitril (80 : 20 bis 60 : 40) aufgenommen und auf das Maximum normiert.

Anhand der Absorptionsspektren der Chromopeptide konnten die gebundenen Chromophore identifiziert werden.

Das 3¹-Cys-PCB-Peptid wurde von (Arciero *et al.* 1988a) beschrieben und besitzt Maxima zwischen 350 - 360 nm und 650 - 660 nm, wobei das Verhältnis von kurzwelligem Maximum zu langwelligem Maximum kleiner als 1,5 ist.

Das 3¹-Cys-PVB-Peptid besitzt nach (Bishop *et al.* 1987) eine Schulter bzw. ein Maximum bei 560 - 570 nm und 590 - 600 nm. Dabei handelt es sich um das Δ 15,16-Z-Isomer des Chromophors (Zhao *et al.* 1995).

Das Spektrum des Chromopeptids mit dem Maximum bei 528 nm stimmt genau mit dem Spektrum des Δ 15,16-E-PVB-Peptids, nach tryptischen Verdau des α -PEC aus

M. laminosus, überein (Zhao *et al.* 1995). So konnten den einzelnen Peaks des Chromatogramms mit Hilfe der Absorptionsspektren der jeweilige an das Peptid gebundene Chromophor zugeordnet werden.

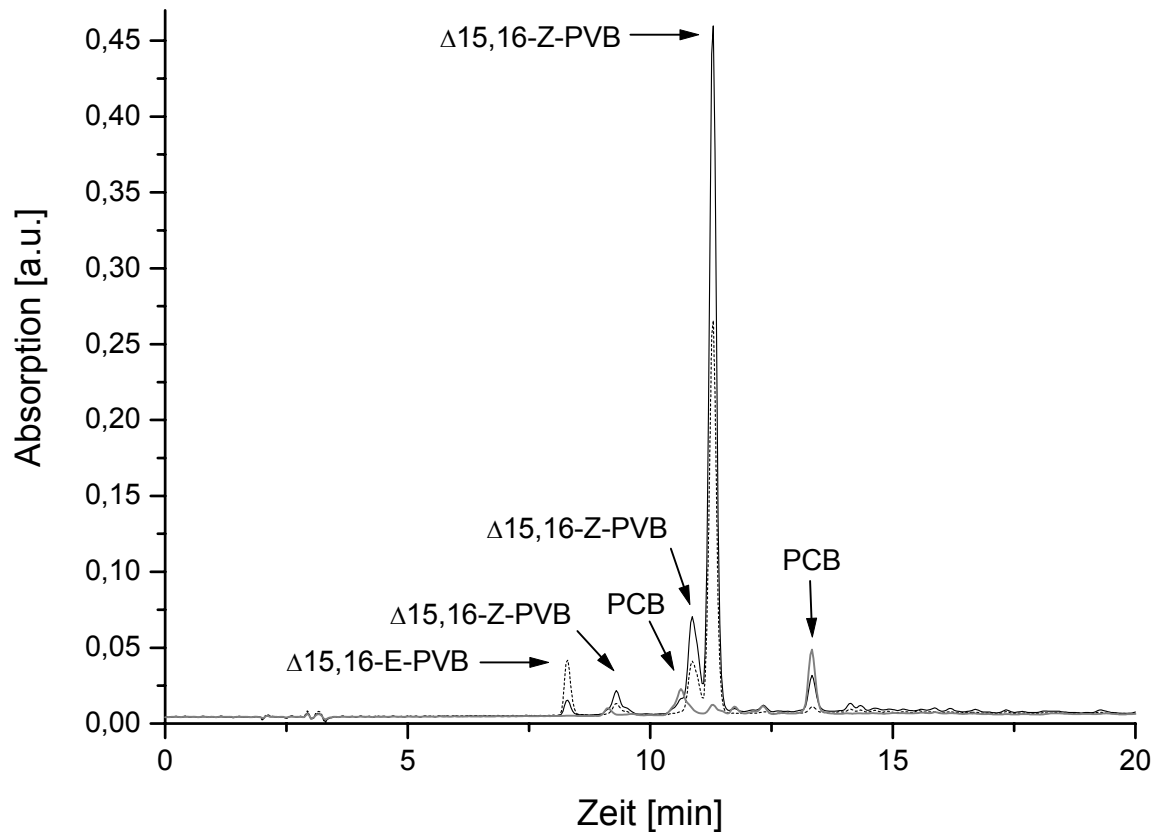


Abbildung 3-37:

Enzymatische Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PCB: HPLC-Lauf der Chromopeptide nach dem tryptischen Verdau. Der Lauf wurde mit einem linearen Gradienten von 20 % - 40 % Acetonitril (0,1 M KPP pH 2,1 ad 100 %) durchgeführt. Im Chromatogramm sind die Absorptionen bei 560 nm (·····), 590 nm (—) und 650 nm (—) dargestellt. Bei den Chromophoren handelt es sich jeweils um die 3¹-Cys-Biline.

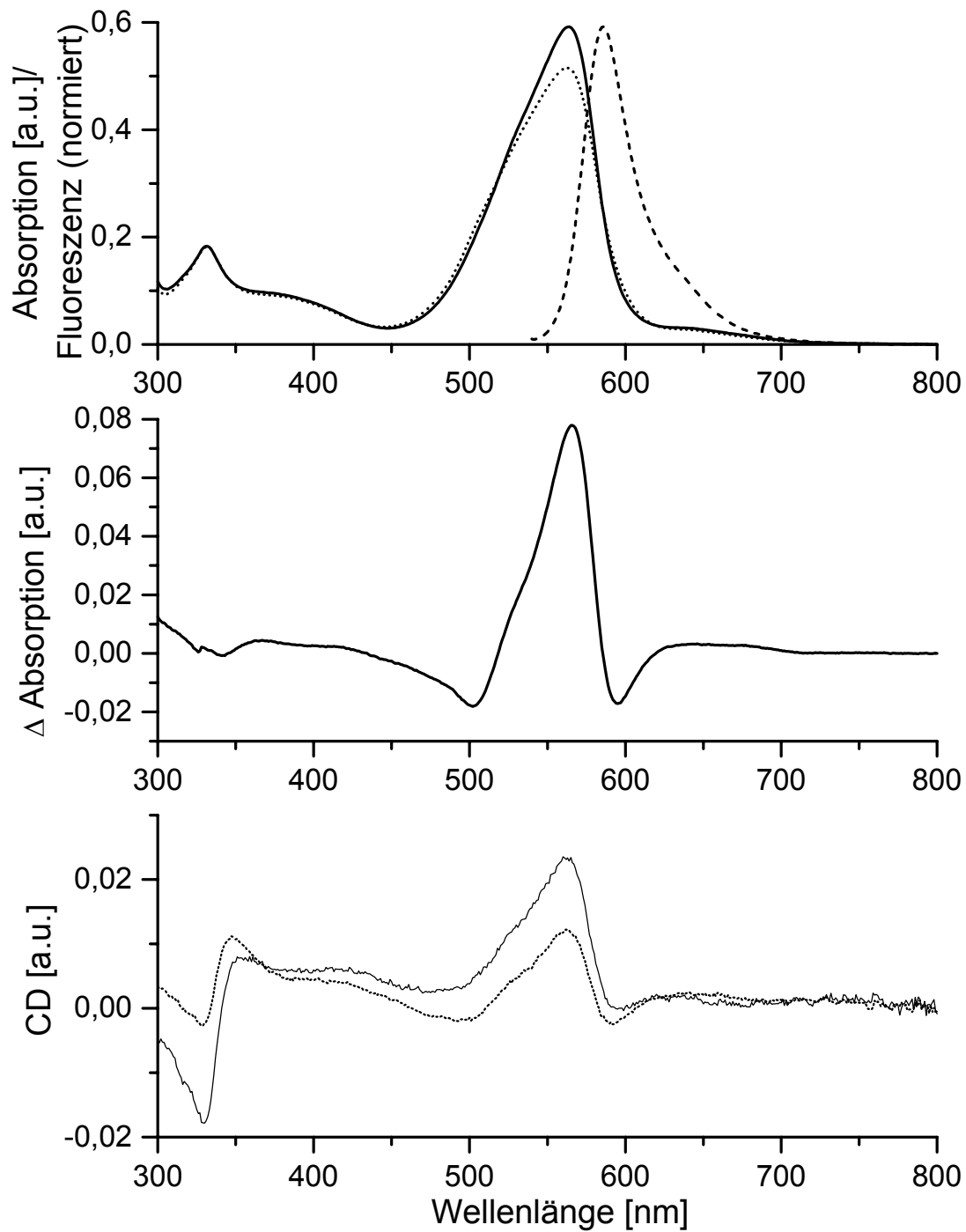
Mit Hilfe der HPLC der tryptischen Peptide der Rekonstitutionsprodukte konnten zwei verschiedene Chromophore nachgewiesen werden, das 3¹-Cys-PVB und das 3¹-Cys-PCB. Hauptsächlich ist bei der Rekonstitution mit His₆-PecE und His₆-PecF das PVB-Addukt entstanden, das dem α-PEC entspricht und eine ausgeprägte Photochemie zeigt. Da der Trypsinverdau, die anschließende Aufbereitung der Probe und der HPLC-Lauf im Dunkeln und unter Dämmerlicht durchgeführt wurden und die Probe keinem monochromatischem Licht ausgesetzt wurde, konnten beide für die Photochemie verantwortlichen Isomere, das Δ15,16-Z-3¹-Cys-PVB und das Δ15,16-E-3¹-Cys-PVB detektiert werden.

Der Anteil an Peptiden mit dem $\Delta_{15,16}$ -E-Isomer war jedoch gering, da die Umwandlung des E-Isomers in das Z-Isomer im Peptid schnell und quantitativ von statten geht, jedoch kaum reversibel ist (Zhao *et al.* 1995). Daher verschob sich das Gleichgewicht unter Schwachlicht deutlich zugunsten des $\Delta_{15,16}$ -Z-Isomers. Das 3^1 -Cys-MBV, das bei der autokatalytischen Bindung von PCB an His₆-PecA entstanden ist, konnte hier nicht nachgewiesen werden. Es existierten wiederum mehrere Peaks für dasselbe Chromopeptid, was jedoch häufig bei Auftrennung von tryptischen Chromopeptiden aus Biliproteinen beobachtet wurde (Arciero *et al.* 1988a, Wedemayer *et al.* 1992; Diskussion hierzu siehe Abschnitt 3.4.1).

Behandlung mit PCMS

Rekonstituiertes α -PEC zeigt eine ausgeprägte reversible Photoreaktion, die der Photochemie Typ I des nativen α -PEC entspricht. Natives α -PEC kann durch Zugabe von PCMS so modifiziert werden, dass es die Photochemie Typ II zeigt. Dabei liegen die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie nah zusammen bei 563 nm und 555 nm, wobei die Extinktion der kurzwelligen Form deutlich geringer ist (Zhao & Scheer 1995). Diese Modifikation wird dadurch verursacht, dass das PCMS an eines oder beide Cysteine 98 und 99 bindet. Durch Zugabe von PCMS zum rekonstituierten α -PEC sollte untersucht werden, ob auch hier die Photochemie Typ II auftritt. Die Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren nach Zugabe von PCMS sind in Abbildung 3-38 dargestellt.

Im Gegensatz zum nativen α -PEC, bei dem ein 2-molarer Überschuss an PCMS zum Protein gegeben wird, musste hier zum rekonstituierten α -PEC ein 40-molarer Überschuss gegeben werden, bis keine Photochemie Typ I, sondern nur noch Typ II zu detektieren war. Der Grund dafür war wahrscheinlich, dass neben dem rekonstituierten Protein auch nicht rekonstituiertes Apoprotein mit 3 freien Cysteinen, His₆-PecE mit 7 Cysteinen und His₆-PecF mit 5 Cysteinen in der Probe vorhanden waren, die ebenfalls PCMS binden konnten.

**Abbildung 3-38:**

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Produkts der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF und PCB nach Zugabe von PCMS.

Oben: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····). Daneben ist das Fluoreszenzspektrum (Excitation 520 nm) der langwellig absorbierenden Form (-----) dargestellt.

Mitte: Absorptionsdifferenzspektrum (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Unten: CD-Spektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····).

Anders als beim His₆-PecA-PCB-Addukt, bei dem es nach Zugabe des PCMS zu einer Präzipitation eines großen Teils des Proteins kam, wurde beim rekonstituierten α -PEC keine Präzipitation beobachtet. Dies weist darauf hin, dass sich das His₆-PecA-PVB-Addukt (rekonstituiertes α -PEC) und das His₆-PecA-PCB-Addukt in ihrer Struktur unterscheiden, was bedeutet, dass der Chromophor die Faltung des Proteins beeinflusst.

Das Rekonstitutionsprodukt zeigte nach Zugabe von PCMS Photochemie Typ II. Die beiden Formen der Photochemie, die durch Belichtung bei 500 nm und 577 nm ineinander reversibel umgewandelt werden konnten, besaßen Absorptionsmaxima bei 563 nm (nach Belichtung bei 500 nm) und 558 nm (nach Belichtung bei 577 nm). Die Absorptionsspektren während der Photochemie des Rekonstitutionsprodukts stimmten mit denen der Photochemie Typ II des nativen α -PEC überein (Zhao & Scheer 1995). Allerdings fielen die Absorptionsänderungen während der Photochemie Typ II des rekonstituierten α -PEC deutlich geringer aus als beim nativen α -PEC. So ist beim nativen α -PEC die Absorption der kurzwellig absorbierenden Form der Photochemie Typ II im Maximum nur etwa halb so groß wie die der langwellig absorbierenden Form. Beim rekonstituierten α -PEC ging die Absorption der kurzwellig absorbierenden Form nur um ca. 15 % zurück. Auch der $\Delta\Delta A_{507/566}$ -Wert der Photochemie Typ II des rekonstituierten α -PEC war mit 16 % nur halb so groß wie der $\Delta\Delta A_{507/566}$ -Wert des nativen α -PEC mit 32 % (Zhao & Scheer 1995). Die Absorptionsdifferenzspektren der beiden Formen der Photochemie Typ II des rekonstituierten und des nativen α -PEC stimmen jedoch in ihrer Form überein. Sie zeigen beide ein Maximum bei 565 nm und zwei Minima bei 502 nm und 595 nm (Zhao & Scheer 1995).

Die langwellig absorbierende Form des rekonstituierten α -PEC zeigte eine Fluoreszenz mit einem Maximum bei 586 nm. Das Auftreten dieser Fluoreszenz ist ein Hinweis darauf, dass es durch die Zugabe von PCMS beim rekonstituierten α -PEC zu keiner gravierenden Denaturierung kam. Eine Denaturierung von Biliproteinen kann mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden, denn die Fluoreszenz reagiert viel empfindlicher auf eine teilweise Denaturierung. Bei einer Denaturierung mit Harnstoff geht die Fluoreszenz um vier Größenordnungen, die Absorption dagegen nur um eine Größenordnung zurück (Scheer 1982). Das CD-Spektrum der langwellig absorbierenden Form, die bei der Photochemie Typ II des Rekonstitutionsprodukts auftrat, stimmte mit einem negativen Extremum bei 329 nm und einem positiven Extremum bei 565 nm mit dem CD-Spektrum des nativen α -PEC überein (Zhao & Scheer 1995). Das CD-Spektrum der kurzwellig absorbierenden Form nach Belichtung bei 577 nm zeigte keine Umkehrung der Extrema wie bei den CD-Spektren des nativen α -PEC, sondern nur einen Abnahme des CD-Signals. Zusammen mit den geringen Änderungen der Absorption während der Belichtung weist dies darauf hin,

dass nur ein kleiner Teil des mit PCMS behandelten rekonstituierten α -PEC durch Belichtung bei 577 nm in die kurzzeitig absorbierende Form umgewandelt werden konnte.

Die kleinen Maxima in Absorptions- und CD-Spektren bei 640 nm stammten vom PCB-Addukt, das bei der Rekonstitution unter Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF als Nebenprodukt entstand. Allerdings war das Maximum deutlich geringer als beim Rekonstitutionsprodukt ohne PCMS, da durch die Zugabe von PCMS ein erheblicher Teil des PCB-Addukts ausgefallen ist.

Zusammenfassende Diskussion der enzymatischen Bindung von Phycocyanobilin

Durch die Zugabe der Proteine (His₆-)PecE und (His₆-)PecF zum Rekonstitutionsansatz von (His₆-)PecA und PCB wurde zum einen die Bindung des Chromophors beschleunigt und zum anderen der Chromophor, das PCB, größtenteils als 3¹-Cys-PVB, dem nativen Chromophor des α -PEC, gebunden.

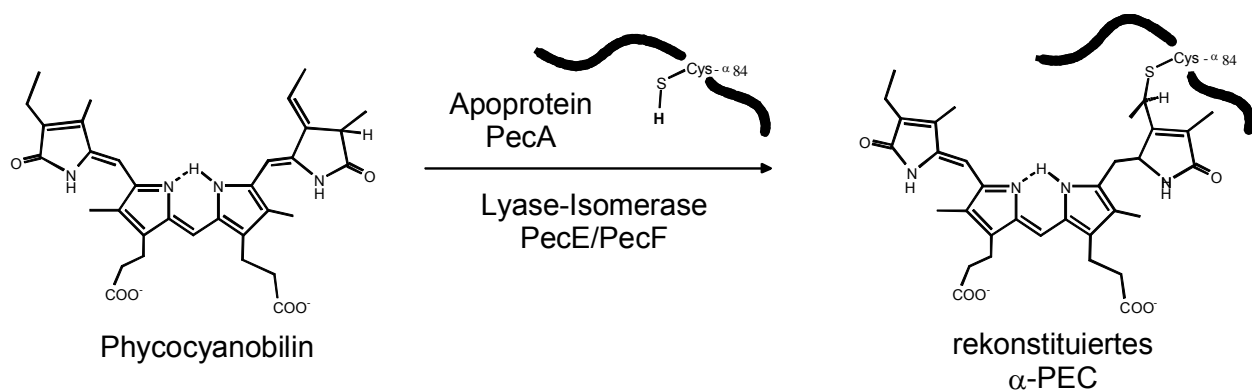


Abbildung 3-39:

Schema der enzymatischen Bindung von PCB

PecE und PecF beschleunigen die Bindung des Chromophors an das α 84-Cystein des Apo- α -PEC und katalysieren daneben auch die Isomerisierung des PCB zum PVB, indem die Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 verlagert wird. PecE und PecF dürften somit eine enzymatische Funktion als Lyase und Isomerase haben. Um diese Reaktion zu katalysieren sind beide Proteine nötig. PecE und PecF können als Untereinheiten der Phycocyanobilin-Phycocerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase (PVB-PEC-Lyase-Isomerase) bezeichnet werden.

Für die Enzymdatenbank ENZYMES (<http://us.expasy.org/enzyme/>) wurde eine Eintragung in die Subklasse 4.4.1 (Carbon-sulfur lyases) unter folgenden Namen vorgeschlagen:

phycocyanobilin phycocerythrocyanin- α 84-cystein-lyase (isomerizing)

oder alternativ: holo- α -phycocerythrocyanin synthase

Die Bindung und Isomerisierung des Chromophors wird auch, jedoch nur in geringem Umfang, vom Apoprotein allein katalysiert. Es wäre daher auch möglich, dass die eigentliche katalytische Aktivität als Lyase-Isomerase vom Apoprotein übernommen wird und PecE/PecF als Chaperone die Lyase-Isomerase-Funktion des Apoprotein unterstützen und verstärken.

Das bei der enzymatischen Rekonstitution entstandene α -PEC zeigte spektrale Übereinstimmung mit dem nativen α -PEC. Auch die Photochemie von rekonstituiertem und nativem α -PEC war identisch, wobei jedoch der $\Delta\Delta A$ -Wert des rekonstituierten α -PEC mit 110 % etwas geringer war, als der des nativen α -PEC mit 127 %, was bedeutet, dass ein kleiner Teil des rekonstituierten α -PEC nicht photoisomerisieren konnte. Der deutlichste Unterschied zum nativen α -PEC zeigte sich bei der Photochemie Typ II. Durch Zugabe von PCMS zum rekonstituierten α -PEC, das an die Cysteine 98, 99 bindet, wurde zwar nur Photochemie Typ II beobachtet, allerdings war die Umwandlung der beiden photo-chemischen Formen ineinander beim rekonstituierten α -PEC um ca. 75 % reduziert. Die Unterschiede im photo-chemischen Verhalten von rekonstituiertem und nativem α -PEC könnte durch das His-Tag erklärt werden, das, vor allem nach Behandlung mit PCMS, einen Einfluss auf die Struktur des rekonstituierten Proteins haben könnte.

Nach unseren ersten Veröffentlichungen zu dieser Lyase-Isomerase wurde die Funktionalität des Rekonstitutionssystems und die enzymatische Wirkung von PecE und PecF als Lyase-Isomerase durch Tooley und Glazer bestätigt, die eine Rekonstitution des α -PEC in einem heterologen Wirt entwickelt haben (Tooley & Glazer 2002). Dabei wurde *E. coli* so transformiert, dass die Gene für His₆-PecA, PecE, PecF (aus *Anabaena* sp. PCC 7120) und für Proteine, welche für eine Synthese von PCB aus Häm nötig sind (Hämoxygenase 1 und 3Z-Phycocyanobilin-Ferredoxin Oxidoreduktase, beide aus *Synechocystis* sp. PCC 6803), gleichzeitig exprimiert wurden. Aus diesen *E. coli*-Kulturen konnte nach achtstündiger Expression bei 30 °C rekonstituiertes getaggttes α -PEC isoliert werden. Im Gegensatz zur enzymatischen Rekonstitution *in vitro*, bei der immer ein geringer Anteil an PCB-Addukt entstand, konnte bei der Rekonstitution im heterologen Wirt kein PCB-Addukt nachgewiesen werden. Die Bildung des PCB-Addukts wird also unter physiologischen Bedingungen unterdrückt.

3.4.3 Rekonstitutionen mit den Chromophoren Phycoerythrobilin und Phycoerythrobilin-Dimethylester

Das rote Phycoerythrobilin (PEB) ist ebenso wie das blaue Phycocyanobilin (PCB) ein weit verbreitetes Phycobilin. PEB ist der Chromophor der Phycoerythrine, die im Bereich von 560 nm bis 575 nm absorbieren und hauptsächlich in Rotalgen aber auch in Cyanobakterien vorkommen. PEB kann leicht in großen Mengen aus Rotalgen isoliert werden, wie z. B. aus *Porphyra yezoensis*. PEB und PCB sind Isomeren. Dem PEB fehlt die Doppelbindung an $\Delta 15,16$, dafür besitzt es eine Doppelbindung an $\Delta 18^1,18^2$ (siehe Abbildung 3-1). Das PEB wurde, ebenso wie das PCB, bereits häufig in Rekonstitutionen von Apo-Phycobiliproteinen, wie dem Apo-Phycoerythrin (Fairchild & Glazer 1994a), dem Apo-Phycocyanin (Arciero *et al.* 1988c) und dem Apo-Phytochrom (Li & Lagarias 1992, Park *et al.* 2000, Lamparter *et al.* 1997) eingesetzt, wobei es in der Regel zu einer Bindung dieses Chromophors an die Apoproteine kam.

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde das Apo- α -PEC mit PEB rekonstituiert. Da auch der Phycoerythrobilin-Dimethylester (PEB-DME), bei dem die beiden Propionsäureketten mit Methanol verestert vorliegen, zur Verfügung stand, wurden zusätzlich Rekonstitutionen mit PEB-DME durchgeführt. Der PEB-DME stammt von Prof. A. Gossauer (Fribourg, CH). Die Strukturen der beiden Chromophore sind in Abbildung 3-1 dargestellt.

Die Rekonstitutionen wurden in der Regel mit den *E. coli*-Lysaten durchgeführt. Als Kontrolle wurden Rekonstitutionen auch mit den aufgereinigten Proteinen durchgeführt. Die Produkte beider Rekonstitutionsmethoden unterschieden sich qualitativ nicht, jedoch waren die Ausbeuten bei der Rekonstitution mit den Lysaten deutlich besser. Es wurden Rekonstitutionen mit Apo- α -PEC und PEB bzw. PEB-DME durchgeführt. Beide Chromophore banden autokatalytisch an das Apoprotein. Die Bindung von PEB war nach ca. 1 h abgeschlossen, die Bindung von PEB-DME nach ca. 4 h. Damit war die Chromophorbindung von PEB und PEB-DME deutlich schneller als die Bindung von PCB, die bei der autokatalytischen Rekonstitution erst nach 18 h und bei der enzymatischen Rekonstitution nach 12 h abgeschlossen war.

Autokatalytische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin - Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren

Vom tiefrot gefärbten Rekonstitutionsprodukt, das eine selbst bei Tageslicht sichtbare Fluoreszenz aufwies, wurde nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren aufgenommen.

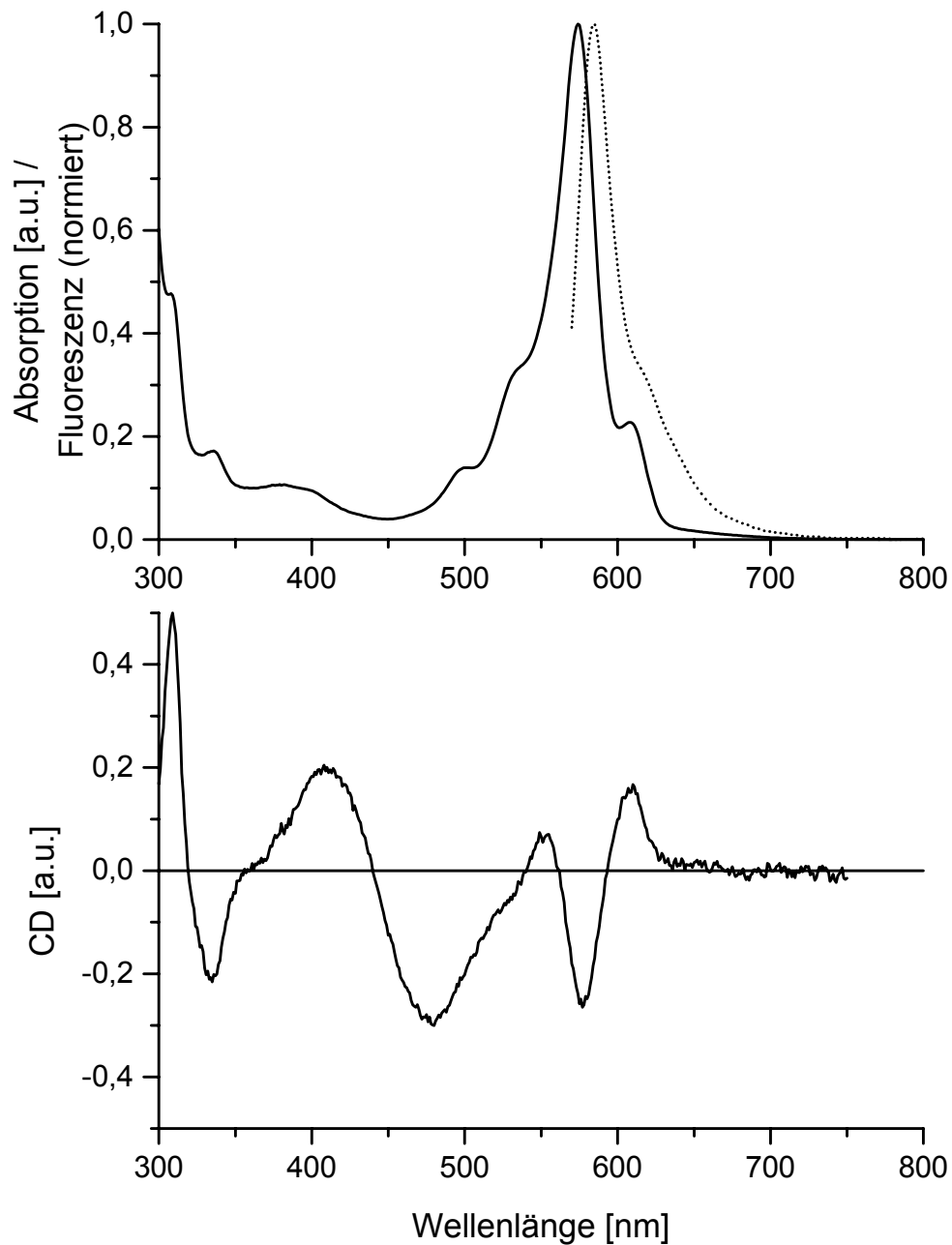


Abbildung 3-40:

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PEB nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.
oben: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (Excitation 550 nm) (-----)
unten: CD-Spektrum

Das Absorptionsspektrum des Produktes aus der Rekonstitution von His₆-PecA und PEB zeigt ein Absorptionsmaximum bei 574 nm. Daneben sind drei Schultern bei 496 nm, 540 nm und 608 nm zu erkennen. Bei der Rekonstitution von α -PE aus *Calothrix* sp. PCC 7601 mit PEB ergaben sich Produkte mit ähnlichen Absorptionseigenschaften (Fairchild & Glazer 1994a). Die Maxima bzw. Schultern lagen hier bei 492 nm, 550 nm, 572 nm und 606 nm. Die Analyse der tryptischen Peptide ergab, dass neben einem Urobilin- und dem PEB-Addukt hauptsächlich das 15,16-Dihydrobiliverdin- (DBV-) Addukt entstanden ist. Der Absorption bei 492 nm wurde das Urobilin-Addukt und der Absorption bei 550 nm das PEB-Addukt zugeordnet. Dem DBV-Addukt wurden die Absorptionen bei 572 nm und 606 nm zugeordnet. Die Rekonstitution von α -PC aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 mit PEB ergab ebenfalls hauptsächlich das DBV-Addukt. Das Absorptionsspektrum zeigte hier ein Maximum bei 575 nm und einen Nebenpeak bei 605 nm. Hier wurde mittels NMR-Spektroskopie nachgewiesen, dass es sich dabei um das DBV-Addukt handelte (Arciero *et al.* 1988c). Analog zu den Ergebnissen dieser beiden Rekonstitutionen könnte bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB der Absorption bei 496 nm das Phycourobilin-(PUB-)Addukt und der Absorption bei 540 nm das PEB-Addukt zugeordnet werden. Unterstützt wird diese Zuordnung durch die Tatsache, dass Biliproteine mit gebundenem PUB bei 498 nm und PEB-tragende Biliproteine zwischen 535 nm und 568 nm absorbieren (Apt *et al.* 1995). Das Maximum bei 574 nm und die Schulter bei 608 nm im Absorptionsspektrum müssten demnach vom DBV-Addukt stammen.

Das CD-Spektrum zeigt allerdings bei 576 nm ein negatives Extremum und bei 610 nm ein positives Extremum. Sollten diese beiden Signale vom DBV-Addukt stammen, so ist dies nur durch eine Bindung von zwei verschiedenen Isomeren des 3¹-Cys-DBV zu erklären. Es könnte sich jedoch auch um zwei verschiedene Addukte mit unterschiedlichen Chromophoren handeln. Klarheit hierüber sollte die HPLC-Analyse der tryptischen Peptide bringen. Das CD-Spektrum zeigt daneben noch ein positives Extremum bei 552 nm, das dem PEB-Addukt zugeordnet werden kann. In der α -Untereinheit des C-PE aus *Pseudanabaena* W1173 zeigen die gebundenen PEB-Chromophore ebenfalls positive CD-Signale (Langer *et al.* 1980). Das negative Extremum bei 480 nm im CD-Spektrum kann schließlich einem PUB-Addukt zugeordnet werden. Die Mischung der Rekonstitutionsprodukte zeigt eine für Biliproteine typische starke Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 585$ nm). Die Fluoreszenz von Phycoerythrin aus *Pseudanabaena* W 1173 liegt, sowohl für die α - als auch für die β -Untereinheit, ebenfalls bei 585 nm. Für die Fluoreszenz ist bei diesen Biliproteinen ein PEB-Chromophor für die Fluoreszenz verantwortlich (Zickendraht-Wendelstadt 1980, Langer *et al.* 1980). Für die Fluoreszenz bei 585 nm der Rekonstitutionsprodukte sollte daher ein PEB-Addukt verantwortlich sein.

Die Rekonstitutionsprodukte wurden verschiedenen Belichtungszyklen mit Licht von 500 nm, 577 nm und 600 nm unterzogen. Es war keinerlei Photochemie zu erkennen, es kam nur zu einem Ausbleichen während der Belichtung. Eine Photochemie war auch nicht zu erwarten, da dem PEB die $\Delta 15,16$ -Doppelbindung fehlt. Die Isomerisierung an dieser Doppelbindung beim 3^1 -Cys-PVB im nativen α -PEC ist hauptsächlich für die Photochemie verantwortlich. Auch das 3^1 -Cys-PUB und 3^1 -Cys-DBV besitzen keine $\Delta 15,16$ -Doppelbindung.

Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC

Durch die HPLC-Analyse der Tripeptide, die durch tryptischen Verdau der Rekonstitutionsprodukte entstanden sind, konnten die gebundenen Chromophore anhand der Absorptionsspektren identifiziert werden.

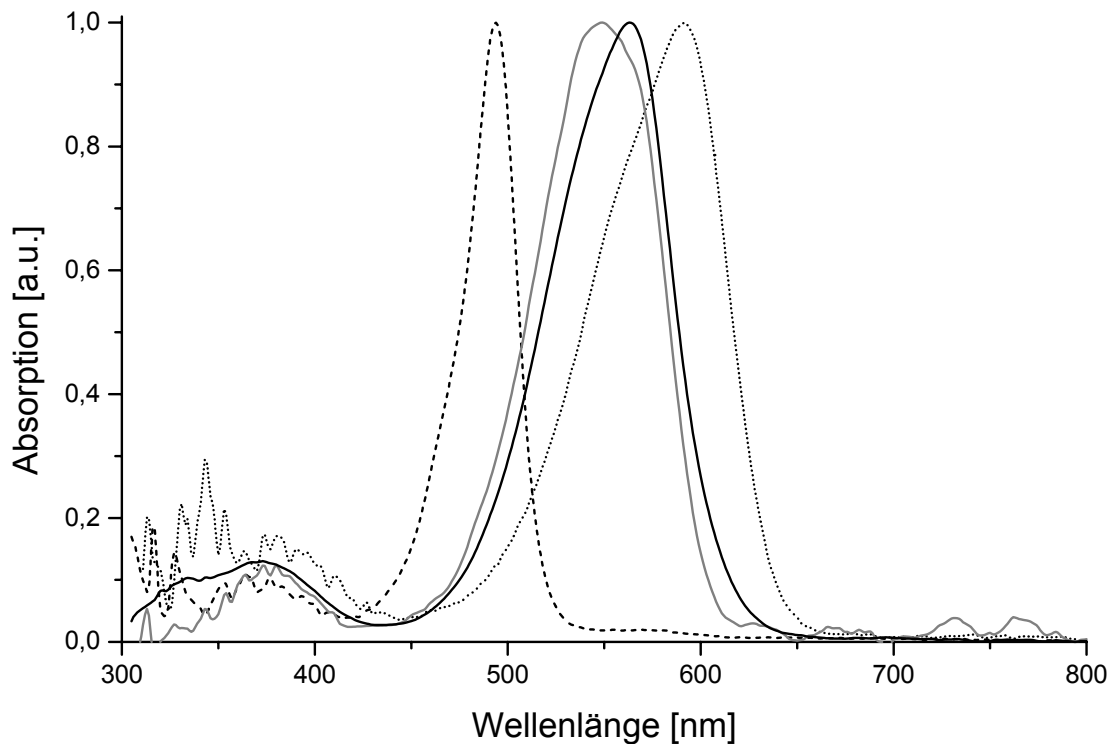


Abbildung 3-41:

Absorptionsspektren der Chromopeptide nach Trypsinverdau der Produkte der Rekonstitution von His₆-PecA und PEB. Die Spektren des PUB-DME-Peptids (-----), PEB-DME-Peptids (———), DBV-DME-Peptids (———) und des Bilin 592-Peptids (· · · · ·) wurden im HPLC-Laufmittel 0,1 M KPP pH 2,1 : Acetonitril (80 : 20 bis 60 : 40) aufgenommen und auf das Maximum normiert.

3^1 -Cys-PEB-Peptide besitzen ein Absorptionsmaximum bei 550 nm (Schoenleber *et al.* 1983, Schoenleber *et al.* 1984, Arciero *et al.* 1988c), das 3^1 -Cys-DBV-Peptid zeigt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm (Arciero *et al.* 1988c, Wemmer *et al.* 1993). 3^1 -Cys-PUB-Peptide schließlich weisen ein Absorptionsmaximum bei 492 nm auf (Klotz & Glazer 1985, Nagy *et al.* 1985).

Neben den Spektren dieser drei aus der Literatur bekannten Chromopeptide trat während der HPLC das Spektrum eines weiteren Chromopeptids auf. Dieses Peptid besitzt ein Absorptionsmaximum bei 592 nm und absorbiert damit ähnlich wie das 3¹-Cys-PVB-Peptid mit einem Maximum bei ca. 590 nm. Allerdings besitzt das Spektrum des 3¹-Cys-PVB-Peptids eine zusätzliche Schulter bei etwa 570 nm (Bishop *et al.* 1987). Falls während der Rekonstitution von Apo- α -PEC und PEB ein PVB-Addukt entstanden ist, so müsste dieses Addukt eine Photochemie zeigen. Eine solche Photochemie konnte jedoch beim Rekonstitutionsprodukt nicht induziert werden. Somit kann es sich bei dem unbekanntem Chromopeptid nicht um das 3¹-Cys-PVB-Peptid handeln. Es kam demnach nicht zu einer Oxidation der Δ 15,16-Einfachbindung.

Es gibt jedoch einen seltenen Phycobilinchromophor bei Cryptophyceen, das sog. Bilin 584 (Wedemayer *et al.* 1991, Wedemayer *et al.* 1996). Das Chromopeptid des Bilin 584 zeigt ein in der Form dem unbekanntem Chromopeptid ähnliches Absorptionsspektrum. Allerdings liegt das Absorptionsmaximum bei 584 nm und nicht bei 592 nm. Das Bilin 584 unterscheidet sich vom PEB durch eine Acrylsäureseitenkette anstelle der Propionsäureseitenkette an C-12, also durch eine Δ 12¹,12²-Doppelbindung (siehe Abbildung 3-42 links). Bei der Bindung von PEB an das Apoprotein könnte es nun ebenfalls zu einer Oxidation an der Propionsäureseitenkette gekommen sein. Allerdings nicht an der C-12- sondern an der C-8-Seitenkette, also an der Δ 8¹,8²-Bindung, die in der Nähe der Proteinbindungsstelle an C-3¹ liegt (siehe Abbildung 3-42 rechts). Dies würde auch die etwas unterschiedliche Absorption im Vergleich zum Bilin 584 erklären. Da diese Addukt nur in sehr geringen Mengen gebildet wurde, konnte eine Strukturaufklärung mittels NMR nicht durchgeführt werden. Daher wird der unbekanntem Chromophor analog zum Bilin 584 im weiteren Bilin 592 genannt.

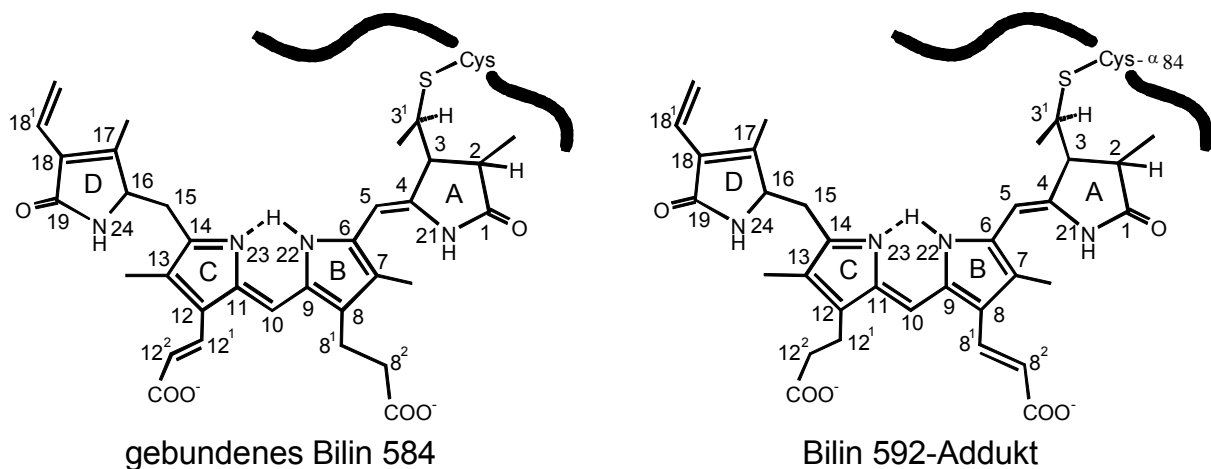


Abbildung 3-42:

Strukturformeln von gebundenem Bilin 584 (nach Wedemayer *et al.* 1991) und eines hypothetischen Bilin 592-Addukts, das bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB entstehen könnte.

Anhand der Spektren konnte den einzelnen Peaks des HPLC-Chromatogramms der jeweilige an das Chromopeptid gebundene Chromophor zugeordnet werden.

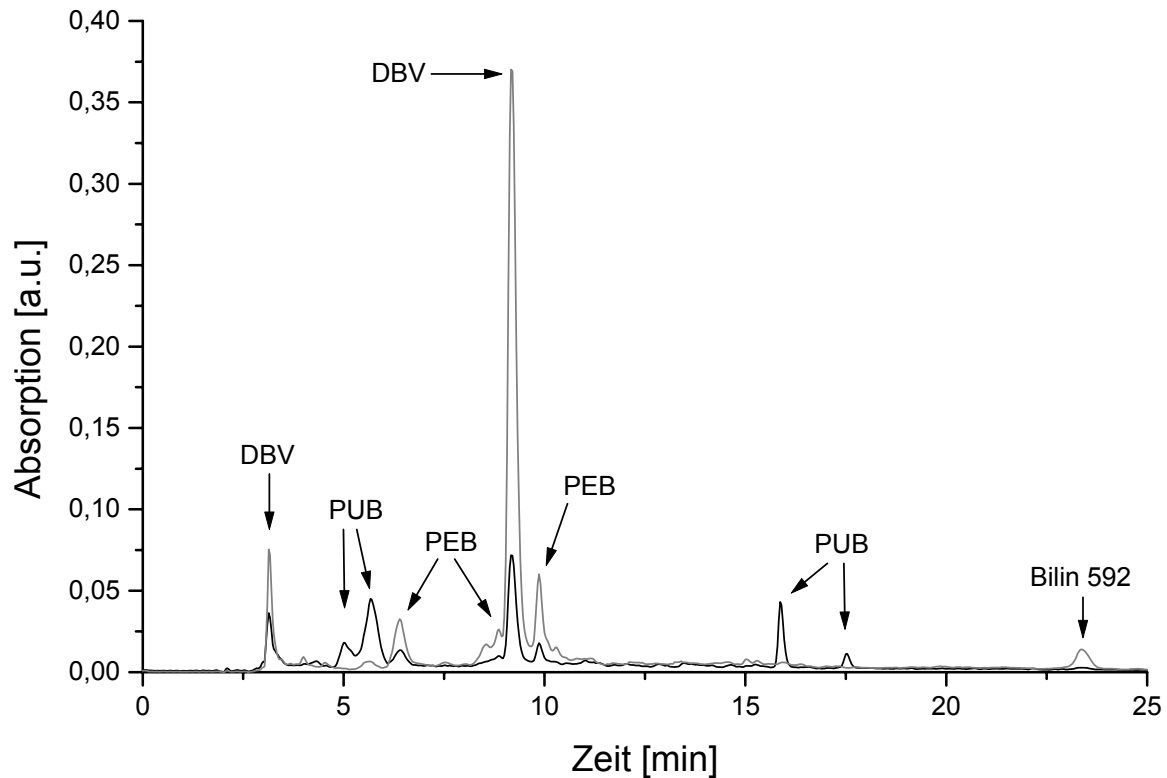


Abbildung 3-43:

Produkte der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB: HPLC-Lauf der Chromopeptide nach dem tryptischen Verdau. Der Lauf wurde mit einem linearen Gradienten von 20 % - 40 % Acetonitril (0,1 M KPP pH 2,1 ad 100 %) auf einer RP-18-Säule durchgeführt. Im Chromatogramm sind die Absorptionen bei 490 nm (—) und 560 nm (---) dargestellt. Bei den Chromophoren handelt es sich jeweils um die 3¹-Cys-Biline.

Die Auswertung des Chromatogramms zeigte, dass während der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB Addukte mit vier verschiedenen Chromophoren entstanden. Hauptsächlich wurde das PEB als 3¹-Cys-DBV gebunden, wie es auch bei den Rekonstitutionen von α -PE (Fairchild & Glazer 1994a) und α -PC mit PEB (Arciero *et al.* 1988c). Das PecA-DBV-Addukt absorbiert demnach mit einem Maximum bei 574 nm. Daneben entstanden das PecA-PUB-Addukt und das PEB-Addukt, die im Absorptionsspektrum anhand der Schultern bei 496 nm bzw. 540 nm zu erkennen sind. Als vierter Chromophor wurde das Bilin 592 gebunden, bei dem es sich um ein PEB-Derivat mit einer Acrylsäureseitenkette an C-8 handeln könnte. Von diesem Addukt dürften die Maxima bei 336 nm und 608 nm im Absorptionsspektrum stammen.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten

Zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten des Hauptprodukts der Rekonstitution, dem His₆-PecA-DBV-Addukt, wurde das Protein in 8 M Harnstoff denaturiert und auf einen pH von 1,9 eingestellt. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{562} = 35000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ eines 3¹-Cys-DBV-haltigen Peptids in 10 mM TFA (siehe Tabelle 3-1), konnte ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{574} = 53500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das gefaltete (His₆-)PecA-DBV-Addukt errechnet werden.

Ausbeute der Rekonstitution

Die Ausbeuten der Rekonstitutionen des Apoproteins mit PEB konnten mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten berechnet werden. Die Ausbeuten an DBV-Addukt lagen zwischen 10 mg und 20 mg pro Liter *E. coli*-Expressionskultur für His₆-PecA. Diese Ausbeuten lagen damit deutlich unter den Ausbeuten bei den Rekonstitutionen mit dem Chromophor PCB, bei denen ca. 30 mg bis 50 mg Protein pro Liter *E. coli*-Expressionskultur rekonstituiert werden konnten.

Enzymatische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin

Die Rekonstitution des Apoproteins His₆-PecA mit PEB unter der Zugabe der Lyase-Isomerase PecE/PecF war nach etwa 1 h abgeschlossen und dauerte damit ähnlich lang wie die autokatalytische Rekonstitution. Es waren einige Unterschiede zwischen den Absorptionsspektren der Produkte aus der enzymatischen Rekonstitution und der autokatalytischen Rekonstitution zu erkennen (siehe Abbildung 3-44). Die Peaks bei 336 nm und 608 nm, bei denen es sich um die kurzwelligen und langwelligen Absorptionsmaxima des Bilin 592-Addukts handeln dürfte, waren bei der enzymatischen Rekonstitution nicht vorhanden. Die Absorption bei 496 nm war leicht erhöht, bei 540 nm ging die Absorption dagegen leicht zurück.

Würde die Lyase-Isomerase während der Bindung des Chromophors PEB dieselbe Reaktion wie bei der enzymatischen Bindung von PCB katalysieren, also die Isomerisierung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung in den Ring A nach $\Delta 2,3$, so müsste hauptsächlich ein PUB-Addukt entstehen (siehe Abbildung 1-4). Der Anteil des PUB-Addukts, das bei 498 nm absorbiert, ist bei der enzymatischen Rekonstitution jedoch nur leicht erhöht. Eine signifikante Isomerisierung des PEB zum PUB durch PecE/PecF findet nicht statt. PEB ist demnach nur ein schlechtes Substrat für die Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- $\alpha 84$ -Cystein-Lyase-Isomerase PecE/PecF. Die einzige deutlich erkennbare Wirkung von PecE/PecF ist, dass die Bildung des Bilin 592-Addukts, das bei 608 nm absorbiert, unterdrückt wird.

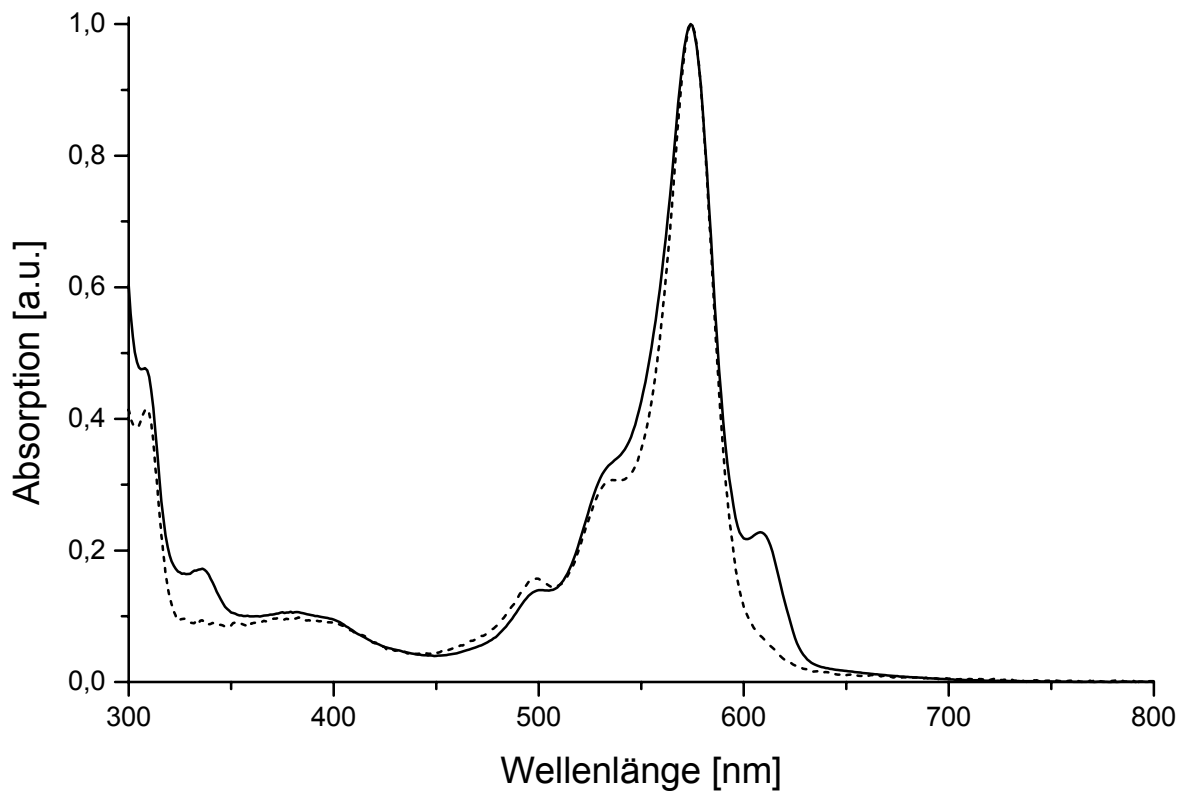


Abbildung 3-44:

Absorptionsspektren der Produkte aus den Rekonstitutionen von His₆-PecA und dem Chromophor PEB ohne (—) und mit (-----) Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF. Die Spektren wurden auf ihr Maximum normiert.

Autokatalytische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin-Dimethylester

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren

Vom Produkt, das bei der autokatalytischen Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB-DME entstanden ist, wurden nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer Absorptions-, Fluoreszenz und CD-Spektren aufgenommen, die in Abbildung 3-45 dargestellt sind.

Das Absorptionsspektrum des Produkts aus der Rekonstitution von Apo- α -PEC und PEB-DME weist ein Absorptionsmaximum bei 578 nm auf. Daneben sind zwei Schultern bei 500 nm und 545 nm zu erkennen. Analog zu den Ergebnissen der Rekonstitutionen mit PEB könnte bei der Rekonstitution von Apo- α -PEC mit PEB-DME der Absorption bei 500 nm das Phycourobilin-Dimethylester-(PUB-DME-)Addukt und der Absorption bei 545 nm das PEB-DME-Addukt zugeordnet werden. Das Maximum bei 578 nm im Absorptionsspektrum müsste demnach vom 15,16-Dihydrobiliverdin-Dimethylester-(DBV-DME-)Addukt stammen.

Die Intensität der CD-Signale relativ zur Absorption ist bei den Produkten aus der Rekonstitution mit PEB-DME deutlich geringer als bei den PEB-Rekonstitutionsprodukten. Lediglich bei 580 nm ist ein deutliches Signal vorhanden. Dieses deutliche negative Extremum dürfte vom Hauptprodukt, dem DBV-DME-Addukt stammen. Daneben ist nur noch eine Schulter bei ca. 540 nm zu erkennen, die dem PEB-DME-Addukt zugeordnet werden kann. Ein CD-Signal des PUB-DME-Addukts ist nicht zu erkennen. Die Rekonstitutionsprodukte zeigen auch bei der Rekonstitution mit PEB-DME eine für Biliproteine typische starke Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 590 \text{ nm}$).

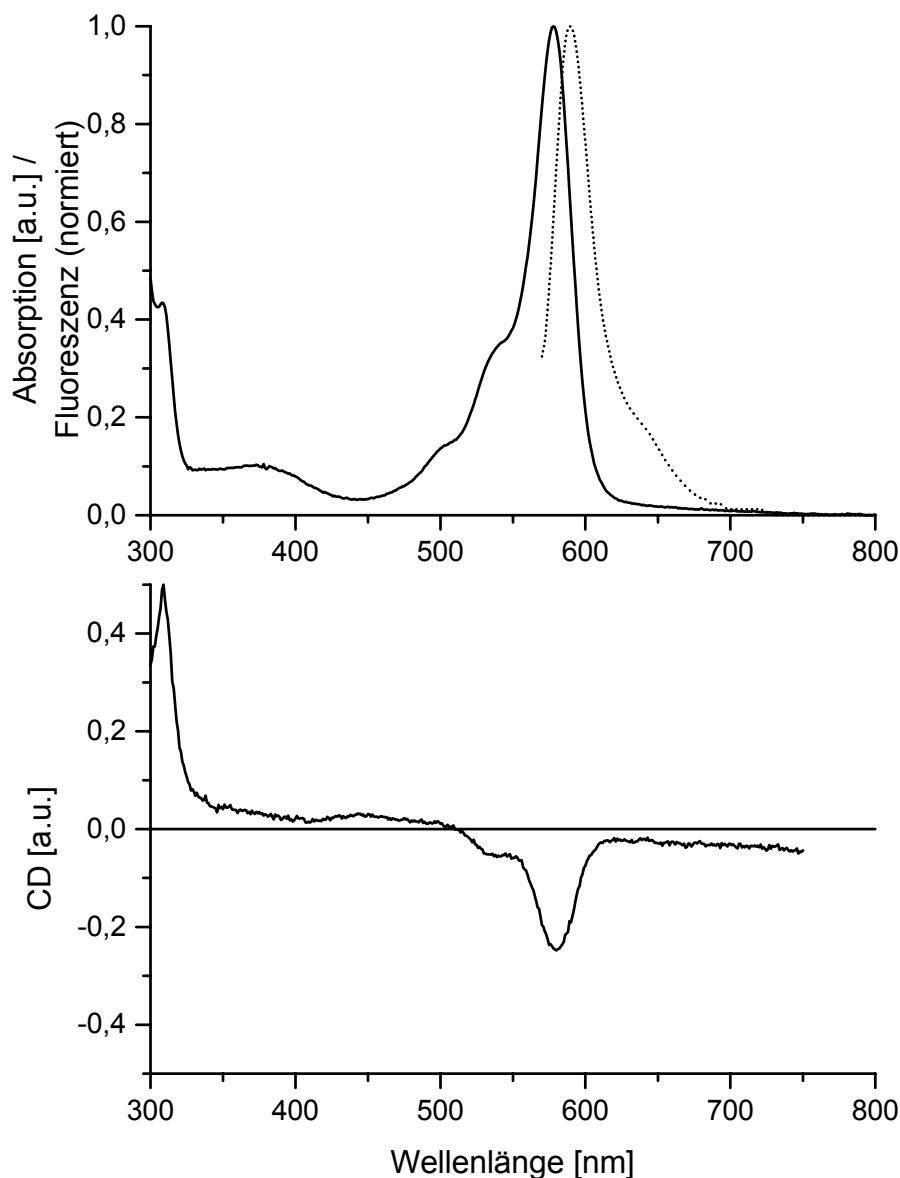


Abbildung 3-45:

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PEB-DME nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer. oben: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (Excitation 550 nm) (-----) unten: CD-Spektrum

Wie bei der Rekonstitution mit PEB konnte auch bei den Rekonstitutionsprodukten mit PEB-DME keine Photochemie induziert werden. Bei der Bindung von PEB-DME an His₆-PecA entsteht folglich kein Produkt, das photochemisch aktiv ist.

Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC

Auch bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit dem PEB-DME wurden die tryptischen Chromopeptide mittels HPLC analysiert.

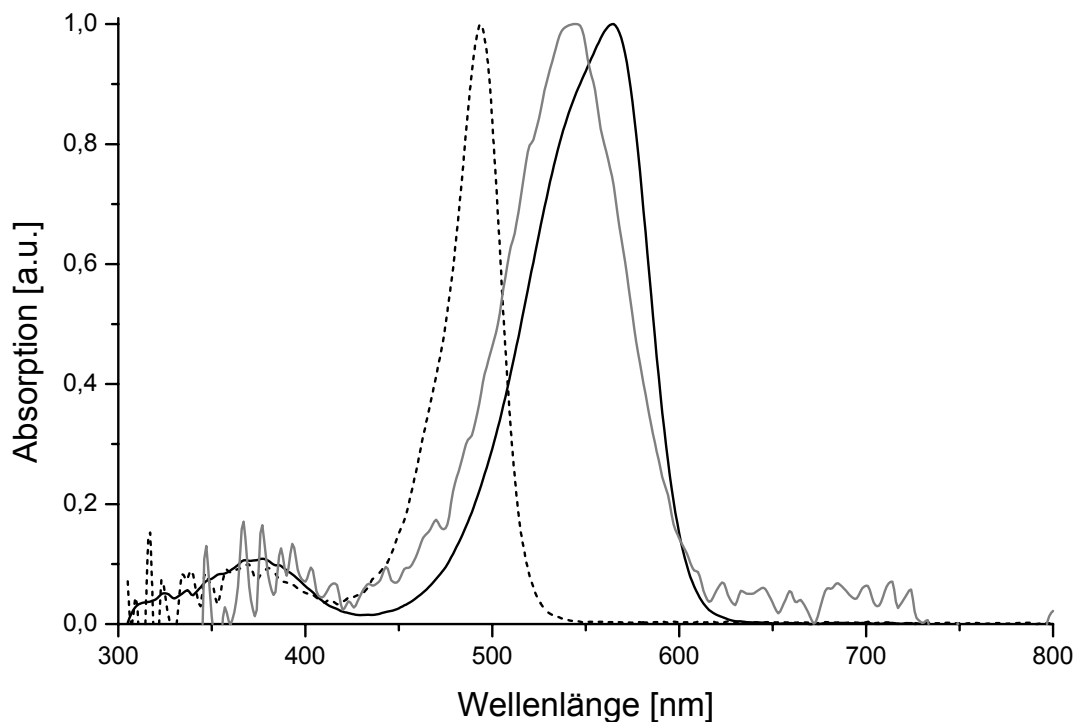


Abbildung 3-46:

Absorptionsspektren der Chromopeptide nach Trypsinverdau der Rekonstitutionsprodukte von His₆-PecA und PEB-DME. Die Spektren des PUB-DME-Peptids (-----), PEB-DME-Peptids (——) und DBV-DME-Peptids (——) wurden im HPLC-Laufmittel 0,1 M KPP pH 2,1 : Acetonitril (80 : 20 bis 60 : 40) aufgenommen und auf ihre Maxima normiert.

Die gebundenen Chromophore wurden anhand der Absorptionsspektren ihrer Chromopeptide identifiziert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Absorption der freien Säuren und der Dimethylester der an die Chromopeptide gebundenen Phycobiline weitgehend übereinstimmen, wie es bei den freien Phycobilinen der Fall ist (Brandlmeier *et al.* 1981). Tatsächlich stimmen die Spektren der mittels HPLC aufgetrennten Chromopeptide aus den Rekonstitutionen mit PEB (Abbildung 3-41) und mit PEB-DME (Abbildung 3-46) in ihren Maxima genau überein. Demnach besitzt das 3¹-Cys-PEB-DME-Peptid wie das 3¹-Cys-PEB-Peptid ein Absorptionsmaximum bei 550 nm (Schoenleber *et al.* 1983, Schoenleber *et al.* 1984, Arciero *et al.* 1988c). Das 3¹-Cys-DBV-DME-Peptid zeigt ein Absorptionsmaximum

bei 562 nm (Arciero *et al.* 1988c, Wemmer *et al.* 199) und das 3¹-Cys-PUB-Peptid ein Absorptionsmaximum bei 492 nm (Klotz & Glazer 1985, Nagy *et al.* 1985). Den einzelnen Peaks des Chromatogramms konnte anhand ihrer Absorptionsspektren der jeweilige an das Chromopeptid gebundene Dimethylester zugeordnet werden.

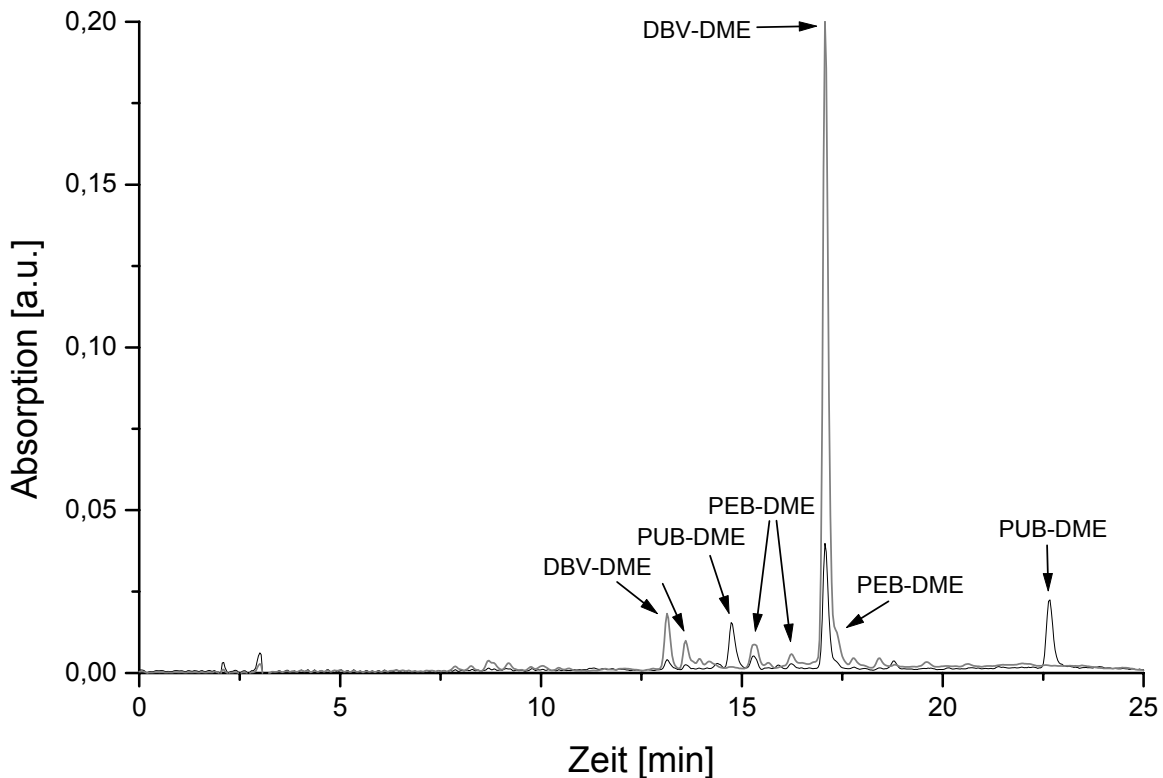


Abbildung 3-47:

Produkte der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB-DME: HPLC-Lauf der Chromopeptide nach dem tryptischen Verdau. Der Lauf wurde mit einem linearen Gradienten von 20 % - 40 % Acetonitril (0,1 M KPP pH 2,1 ad 100 %) auf einer RP-18-Säule durchgeführt. Im Chromatogramm sind die Absorptionen bei 490 nm (—) und 560 nm (---) dargestellt. Bei den Chromophoren handelt es sich jeweils um die 3¹-Cys-Biline.

Die Auswertung des Chromatogramms zeigte, dass bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB-DME drei verschiedene Addukte entstanden sind. Hauptsächlich wurde das DBV-DME-Addukt gebildet. Daneben entstanden das PUB-DME- und das PEB-DME-Addukt. Die Chromopeptide mit den Phycobilin-Dimethylestern besitzen im verwendeten HPLC-System auf reverser Phase deutlich längere Retentionszeiten als die Chromopeptide mit den unveresterten Phycobilinen (siehe Abbildung 3-43). Der Großteil des DBV-DME-Peptids konnte nach 16,5 min, das DBV-Peptid dagegen bereits nach 9 min detektiert werden. Dies ist ein Bestätigung dafür, dass während der Rekonstitution mit PEB-DME die Chromophore auch als DME gebunden werden, denn auf dem für die Chromatographie verwendeten RP-8-Material laufen unpolare Moleküle, wie die Phycobilin-Dimethylester langsamer als die polareren Phycobiline mit ihren Propionsäureseitenketten.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten

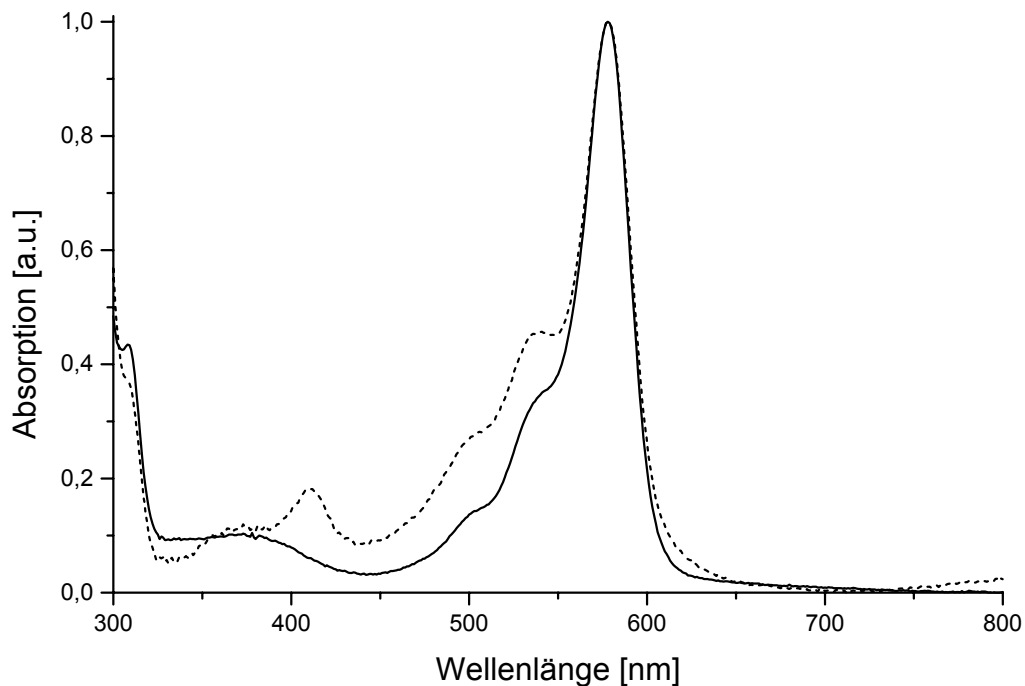
Das Hauptprodukt der Rekonstitution, das His₆-PecA-DBV-DME-Addukt, wurde in 8 M Harnstoff denaturiert und auf einen pH von 1,9 eingestellt. Die Berechnung des Extinktionskoeffizienten erfolgte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten eines 3¹-Cys-DBV-haltigen Peptids in 10 mM TFA (siehe Tabelle 3-1). Die Absorption und damit die Extinktionskoeffizienten der freien Säuren und der Dimethylester von Phycobilinen stimmen weitgehend überein, wenn die Chromophore frei in Lösung bzw. an denaturierte Proteine gebunden vorliegen (Brandlmeier *et al.* 1981). Für das gefaltete His₆-PecA-DBV-DME-Addukt konnte ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{578} = 60500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ errechnet werden. Der Extinktionskoeffizient ist damit höher als der des His₆-PecA-DBV-Addukts mit $\epsilon_{574} = 53500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Dieser Unterschied ist jedoch an der Grenze der Genauigkeit. Er könnte darauf hinweisen, dass es im rekonstituierten Protein zwischen 3¹-Cys-PEB und 3¹-Cys-PEB-DME Unterschiede in der Struktur und/oder bei der Chromophor-Protein-Interaktion gibt.

Ausbeute der Rekonstitution

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten konnte die Ausbeuten der Rekonstitutionen des Apoproteins mit PEB berechnet werden. Die Ausbeuten an DBV-Addukt lagen zwischen 15 mg und 22 mg pro Liter *E. coli*-Expressionskultur für His₆-PecA. Damit lagen diese Ausbeuten etwas höher als die der Rekonstitution mit PEB und deutlich unter denen der Rekonstitutionen mit PCB.

Enzymatische Rekonstitution mit Phycoerythrobilin-Dimethylester

Auch mit dem PEB-DME wurde eine enzymatische Rekonstitution von His₆-PecA unter Zugabe der Lyase/Isomerase PecE/PecF durchgeführt. Es sind dabei geringe Unterschiede zwischen den Absorptionsspektren der Produkte aus der enzymatischen und der autokatalytischen Rekonstitution von His₆-PecA und PEB-DME zu erkennen. Der Anteil an PUB-DME-Addukt mit einer Absorption um 500 nm und des PEB-DME-Addukts mit einer Absorption um 550 nm steigt im Vergleich zum Hauptprodukt, dem DBV-DME-Addukt, etwas an. Die Zunahme an PUB-DME-Addukt, das durch Katalyse der Lyase-Isomerase entstanden sein könnte, ist jedoch nicht sehr ausgeprägt. Der PEB-DME ist demnach nur ein schlechtes Substrat für die Lyase-Isomerase.

**Abbildung 3-48:**

Absorptionsspektren der Produkte aus den Rekonstitutionen von His₆-PecA und dem Chromophor PEB-DME ohne (—) und mit (-----) Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF. Die Spektren wurden auf ihre Maxima normiert.

Bei der enzymatischen Rekonstitution mit PEB-DME entsteht im Absorptionsspektrum ein zusätzliches Maximum bei 420 nm. Dies könnte von einem Bilirubin-Addukt stammen. Proteingebundenes Bilirubin absorbiert im Bereich um 400 nm (Lightner *et al.* 1986). Eine genauere Identifizierung dieses Addukts wurde jedoch nicht unternommen.

Vergleich zwischen den Rekonstitutionen mit Phycoerythrobilin und Phycoerythrobilin-Dimethylester

Sowohl PEB als auch PEB-DME wurden autokatalytisch vom Apoprotein PecA gebunden. Die Rekonstitutionen mit PEB waren nach 1 h und mit PEB-DME nach 4 h abgeschlossen. Diese beiden Chromophore banden damit deutlich schneller an das Apoprotein als das PCB.

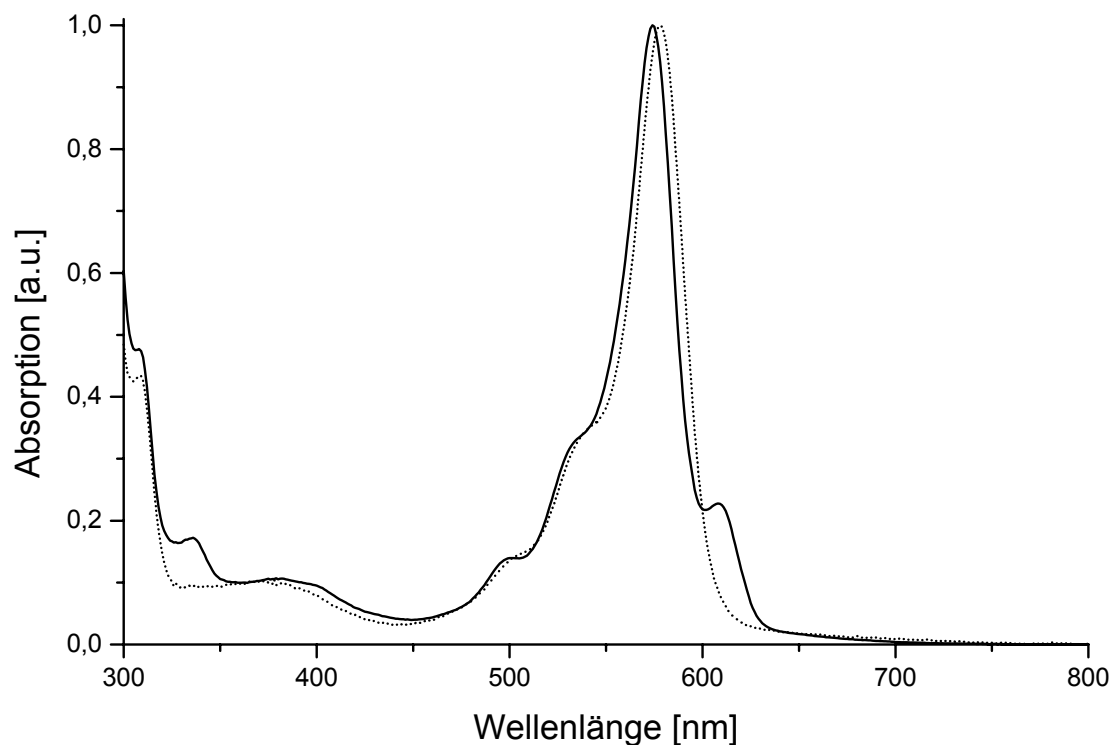


Abbildung 3-49:

Absorptionsspektren der Rekonstitutionsprodukte von His₆-PecA und PEB (—) bzw. PEB-DME (·····) nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer. Die Spektren wurden auf ihre Maxima normiert.

Die Absorptionsspektren der Produkte aus der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB bzw. PEB-DME waren ähnlich. Sie unterschieden sich nur in ihren Absorptionsmaxima, das beim Produkt der Rekonstitution mit PEB bei 574 nm und beim Produkt der Rekonstitution mit PEB-DME um 4 nm blauverschoben bei 578 nm lagen. Diese Verschiebung beruht wahrscheinlich auf den chemischen Unterschieden an den C-8- und C-12-Seitenketten. Der im Vergleich zum PEB etwas größere und unpolare PEB-DME dürfte in der Bindungstasche etwas mehr Raum beanspruchen, was zu Unterschieden in der Struktur der gebundenen Chromophore und der Proteinumgebung in der Bindungstasche führen müsste. Dadurch sind die Absorptionsunterschiede und auch die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten zu erklären.

Ein zweiter Unterschied zwischen den Spektren der Rekonstitutionen mit PEB und PEB-DME war, dass das PEB-Rekonstitutionsprodukt eine zusätzliche Schulter auf der langwelligeren Flanke des Spektrums bei 608 nm besaß. Während der Bindung des PEB entstand demnach ein Rekonstitutionsprodukt mehr als bei der Bindung des PEB-DME. Insgesamt waren bei der Rekonstitution von PecA mit PEB vier Rekonstitutionsprodukte, mit PEB-DME drei Rekonstitutionsprodukte nachweisbar, die in Abbildung 3-50 dargestellt sind.

Zusammenfassende Diskussion der Bindung von Phycoerythrobilin und Phycoerythrobilin-Dimethylester

Die Rekonstitutionsversuche zeigten, dass PEB und PEB-DME autokatalytisch vom Fusionsprotein His₆-PecA gebunden werden. Wie bei der Rekonstitution mit PCB wurde dabei das PEB bzw. der PEB-DME zum einen unverändert, als 3¹-Cys-PEB bzw. 3¹-Cys-PEB-DME, gebunden. Zum anderen entstanden durch Isomerisierung der Δ4,5-Doppelbindung in den Ring A nach Δ2,3 das PUB- bzw. PUB-DME-Addukt und durch die Oxidation der Δ2,3-Einfachbindung das DBV- bzw. DBV-DME-Addukt. Letztere Addukte waren dabei die Hauptprodukte der Rekonstitutionen. Das zusätzliche Produkt, das nur bei der autokatalytischen Bindung von PEB entstand, wurde als Bilin 592-Addukt bezeichnet. Bei diesem Chromophor könnte es sich um ein 3¹-Cys-PEB handeln, bei der die Δ8¹,8²-Einfachbindung zu einer Doppelbindung, also die Propionsäureseitenkette an C-8 zu einer Acrylsäureseitenkette oxidiert wurde. Ähnliche Bilin-Chromophore sind aus Cryptophyceen bekannt (Wedemayer *et al.* 1991, Wedemayer *et al.* 1996). Die verschiedenen Addukte sind in Abbildung 3-50 dargestellt.

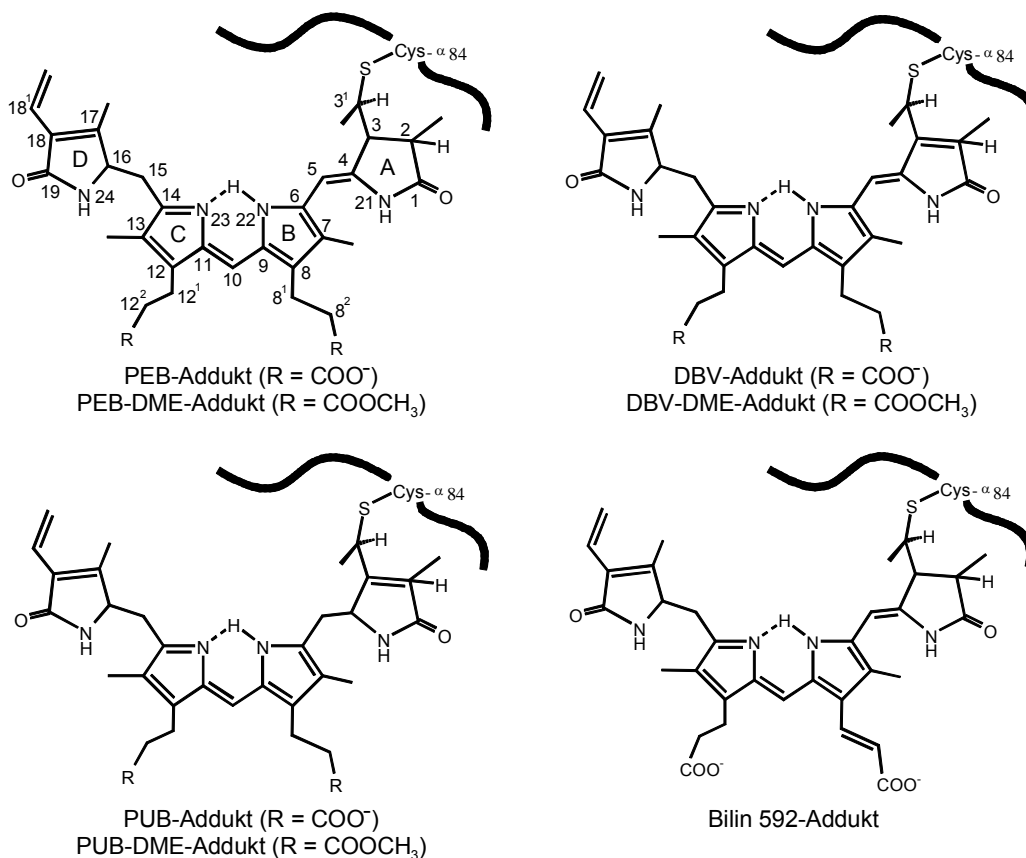


Abbildung 3-50:

Strukturformeln der Addukte, die bei der Rekonstitution von PEB bzw. PEB-DME mit His₆-PecA entstanden. Die Struktur des Bilin 592-Addukt ist hypothetisch.

Bei der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA mit PCB katalysiert die Lyase-Isomerase PecE/PecF die Umlagerung der Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 und somit die Isomerisierung des PCB zum PVB. Hätte die Lyase-Isomerase bei der Bindung von PEB bzw. PEB-DME die gleiche Reaktion katalysiert, so wäre bei der enzymatischen Rekonstitution hauptsächlich das PUB- bzw. das PUB-DME-Addukt entstanden. Das war nicht der Fall, denn der Anteil an PUB- bzw. PUB-DME-Addukt nach der enzymatischen Rekonstitution war nur unwesentlich erhöht. PEB und PEB-DME sind demnach kein oder nur ein schlechtes Substrat für die Lyase-Isomerase. Die einzige deutliche Wirkung der Lyase-Isomerase bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB ist, dass die Bildung des Bilin 592-Addukts unterdrückt wird. Dies könnte bedeuten, dass die Lyase-Isomerase oder eine der Untereinheiten während der Rekonstitution an das PEB bindet und die Entstehung des Bilin 592 verhindert.

Es wird vermutet, dass den Propionsäureseitenketten der Phycobiline wichtige strukturelle Aufgaben bei der Fixierung der Chromophore in den Bindungstaschen zukommen (Scheer 1986). Es ist daher etwas überraschend, dass der spektrale Unterschied zwischen den PEB- und PEB-DME-Addukten bzw. den DBV- bzw. DBV-DME-Addukten mit einer Verschiebung von nur 4 nm sehr gering ausfällt. Dies könnte bedeuten, dass der Einfluss der Propionsäureseitenketten auf die Struktur des Chromophors in der Bindungstasche nur gering ist.

3.4.4 Rekonstitutionsversuche mit Phycocyanobilin-Dimethylester

Da der Phycoerythrobilin-Dimethylester autokatalytisch von PecA gebunden wurde, wurden auch mit dem Phycocyanobilin-Dimethylester (PCB-DME, siehe Abbildung 3-1) Rekonstitutionen versucht. Der PCB-DME zeigte nach Zugabe zum Rekonstitutionsansatz ein Absorptionsmaximum bei 589 nm. Im Laufe der Rekonstitution kam es zu keinen spektralen Veränderungen, sondern lediglich zu einem Ausbleichen des Chromophors. Auch eine Fluoreszenz trat nicht auf. Nach der Aufreinigung des Proteins über Ni²⁺-Affinitätschromatographie konnte kein farbiges Chromophor-Protein-Addukt detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der PCB-DME nicht kovalent an das Apoprotein His₆-PecA bindet. Dabei machte es keinen Unterschied, ob die Rekonstitutionen mit den Lysaten oder den aufgereinigten Proteinen durchgeführt wurden. Auch die Zugabe der Lyase-Isomerase PecE/PecF hatte keinen Einfluss auf die Bindung von PCB-DME. Der Chromophor PCB-DME unterscheidet sich von PCB durch die veresterten Propionsäureseitenketten und von PEB-DME durch die Doppelbindung an Δ 15,16. PCB und PEB-DME werden vom Apoprotein kovalent gebunden. Die Bindung des PCB-DME dürfte also durch die etwas voluminöseren veresterten Propionsäureseitenketten und zusätzlich durch die C15-Methinbrücke, welche

die Flexibilität des Ring D des PCB-DME einschränkt, verhindert werden. Es sind demnach wahrscheinlich sterische Gründe, warum es zu keiner Rekonstitution mit diesem Chromophor kommt.

3.4.5 Rekonstitutionsversuche mit den Chromophoren Biliverdin und Bilirubin

Biliverdin (IX α) und Bilirubin (IX α)² sind Gallenfarbstoffe, die z.B. in der Galle von Säugetieren vorkommen. Ebenso wie die Phycobiline sind sie offenkettige Tetrapyrrole. Vom Phycocyanobilin unterscheiden sie sich durch Anzahl und Lage der Doppelbindungen. Der wichtigste Unterschied zum PCB ist, dass sich an C-3 anstelle einer Ethylidengruppe eine Vinylgruppe befindet. Die Seitenkette an C-3 ist wichtig für die Chromophorbindung an Biliproteine, denn an C-3¹ des Bilins findet die Ausbildung der Thioetherbrücke zum Cystein des Apobiliproteins statt.

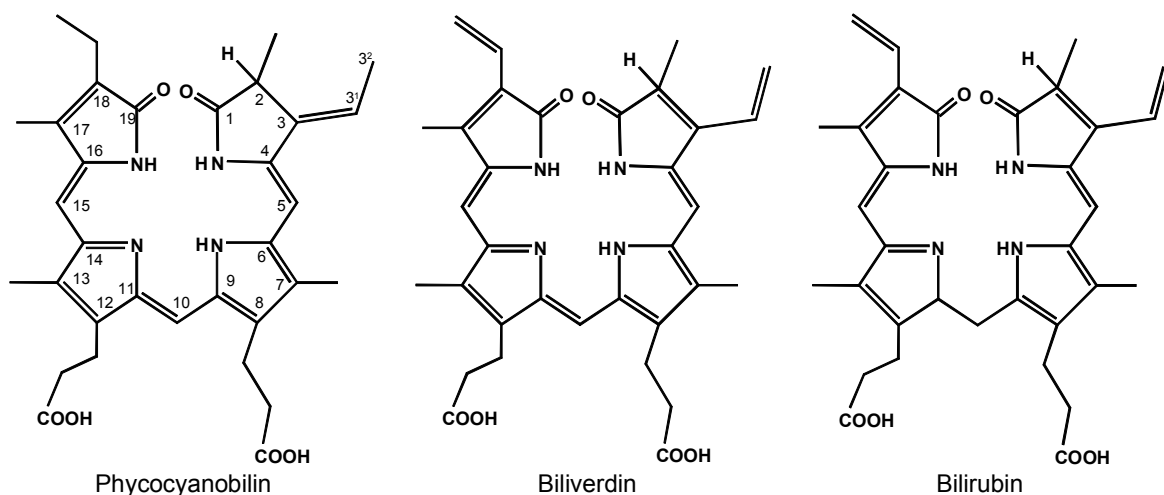


Abbildung 3-51:

Strukturen von Phycocyanobilin, Biliverdin und Bilirubin in ihrer zyklischen Konformation

Rekonstitutionen von Apo-Biliproteinen wie Apo-Phycocyanin (Arciero *et al.* 1988c) oder Apo-Phycoerythrin (Fairchild & Glazer 1994a) mit Biliverdin und Bilirubin ergaben Pigment-Protein-Komplexe. Diese Komplexe zeigten jedoch keine Fluoreszenz und die Chromophore wurden während der SDS-PAGE oder während eines tryptischen Verdauens vom Protein getrennt. Dies bedeutet, dass die Chromophore nicht kovalent gebunden waren. Das Apo-

² Die Isomerenspezifikation kann bei Biliverdin IX α und Bilirubin IX α , bei denen es sich um die natürlich vorkommenden Gallenfarbstoffe handelt, die als Abbauprodukt des Häm entstehen, weggelassen werden (Falk 1989).

Phytochrom konnte weder mit Biliverdin noch mit Bilirubin rekonstituiert werden (Elich & Lagarias 1989, Li & Lagarias 1992, Lamparter *et al.* 2001). Bei nativen Biliproteinen können jedoch Phycobiline an der Vinylgruppe kovalent an ein Apoprotein gebunden werden. So kommt es bei der doppelten Bindung von PEB, das an C-18 eine Vinylgruppe besitzt, zur Ausbildung einer Thioetherbrücke zwischen C-18¹ und dem Apoprotein (Nagy *et al.* 1985, Sidler 1994; siehe Abbildung 3-1 für freies PEB und Abbildung 1-4 für doppelt gebundenes PEB).

Mit dem Apoprotein His₆-PecA wurden Rekonstitutionen mit Biliverdin und Bilirubin ohne und mit der Lyase-Isomerase PecE/PecF durchgeführt.

Das grüne Biliverdin zeigte direkt nach Zugabe zum Rekonstitutionsansatz ein Absorptionsmaximum bei 670 nm. Dieses Absorptionsmaximum verschob sich während der Inkubation des Rekonstitutionsansatzes nach 409 nm. Nachdem der Rekonstitutionsansatz über Ni²⁺-Affinitätschromatographie aufgereinigt worden war, konnte kein farbiges Protein detektiert werden, d.h. es kam während der Rekonstitution mit Biliverdin zu keiner kovalenten Bindung des Chromophors. Während der Rekonstitution wurde das Biliverdin lediglich zu einem gelben Chromophor abgebaut, wahrscheinlich zu einem Bilirubin. Allerdings handelt es sich dabei nicht um das Bilirubin IX α , sondern um ein anderes Bilirubin-Isomer. Denn das entstandene Pigment und Bilirubin IX α unterschieden sich in ihren Absorptionsspektren und im Laufverhalten auf Dünnschichtchromatographie.

Bei Rekonstitutionsversuchen mit Bilirubin kam es zu keinen spektralen Verschiebungen während der Inkubation. Das Bilirubin absorbierte nach Zugabe zum Ansatz mit einem Maximum bei 483 nm und im Laufe des Versuchs kam es lediglich zu einem leichten Ausbleichen des Chromophors. Auch hier konnte nach der Aufreinigung des Proteins über Ni²⁺-Affinitätschromatographie kein farbiges Chromophor-Protein-Addukt detektiert werden.

Es konnten also weder Biliverdin noch Bilirubin vom Apoprotein His₆-PecA gebunden werden. Dabei gab es keinen Unterschied, ob die Rekonstitution mit den Lysaten oder den aufgereinigten Proteinen durchgeführt wurden. Auch die Zugabe der Lyase-Isomerase PecE/PecF hatte keinen Einfluss auf die Bindung von Bilirubin oder Biliverdin. Wahrscheinlich verhindert die Vinylgruppe an C-3 eine Bindung des Chromophors. Für die Ausbildung der Thioetherbrücke zum Apoprotein scheint eine Ethylidengruppe notwendig zu sein, wie sie PEC und PEB besitzen.

3.4.6 Autokatalytische Rekonstitution mit dem Chromophor Phytochromobilin

Das Phytochromobilin (PΦB) ist der Chromophor des Phytochroms und unterscheidet sich vom PCB nur durch eine zusätzliche Doppelbindung an $\Delta 18^1,18^2$ (siehe Abbildung 3-1). Apophytochrom kann sowohl mit PΦB als auch mit PCB rekonstituiert werden, wobei beide Chromophore autokatalytisch gebunden werden. Bei der Rekonstitution mit PCB entsteht ein PCB-Apophytochrom-Addukt mit ähnlichen Eigenschaften wie das Phytochrom, d.h. es ist wie das Phytochrom photochemisch aktiv. Dabei absorbiert das Apo-Phytochrom-PCB-Addukt ca. 10 - 15 nm rotverschoben zum Phytochrom (Elich & Lagarias 1989, Li & Lagarias 1992, Lamparter *et al.* 2001, McDowell & Lagarias 2002). Aufgrund der Ergebnisse der Rekonstitutionen von Apophytochrom schien es möglich, dass sich auch bei der Rekonstitution von PecA das PΦB ähnlich wie das PCB verhalten würde, d.h. ein photochemisch aktives Biliprotein entstehen könnte. Es wurden zunächst autokatalytische und später auch enzymatische Rekonstitutionen mit dem Chromophor PΦB durchgeführt.

Das PΦB wurde durch Oxidation mit FeCl_3 aus Phycoerythrobilin (PEB) gewonnen (siehe Abschnitt 3.1.2). Das PΦB ist im Gegensatz zu PCB oder PEB sehr instabil. Bereits nach wenigen Tagen ist selbst bei Lagerung unter Argon bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ ein deutlicher Abbau des Chromophors zu beobachten. Daher wurde das PΦB sofort nach seiner Darstellung und Aufreinigung in den Rekonstitutionen eingesetzt. Bei der Umsetzung mit FeCl_3 entstand das $\Delta 3,3^1$ -E-Isomer des PΦB. Dies dürfte jedoch keinen Einfluss auf die Chromophorbindung haben, denn an Apo-Phytochrom binden sowohl das $\Delta 3,3^1$ -E-Isomer als auch das $\Delta 3,3^1$ -Z-Isomer des PΦB (Terry *et al.* 1995).

Die autokatalytische Rekonstitution des Apoproteins His₆-PecA mit PΦB wurde mit dem *E. coli*-Lysat durchgeführt. Die Rekonstitution, bei welcher der Chromophor autokatalytisch gebunden wurde, war nach ca. 18 h abgeschlossen. Damit dauert die autokatalytische Bindung von PΦB so lange wie die Bindung von PCB. Die Spektren der Produkte der Rekonstitutionen mit PΦB und PCB ähneln sich in ihrer Form. Das Spektrum der PΦB-Rekonstitution ist mit Maxima bei 378 nm und 652 nm im Vergleich zur PCB-Rekonstitution mit Maxima bei 355 nm und 641 nm dabei jedoch langwellig verschoben.

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts

Von dem blaugrünen Rekonstitutionsprodukt wurden nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren aufgenommen.

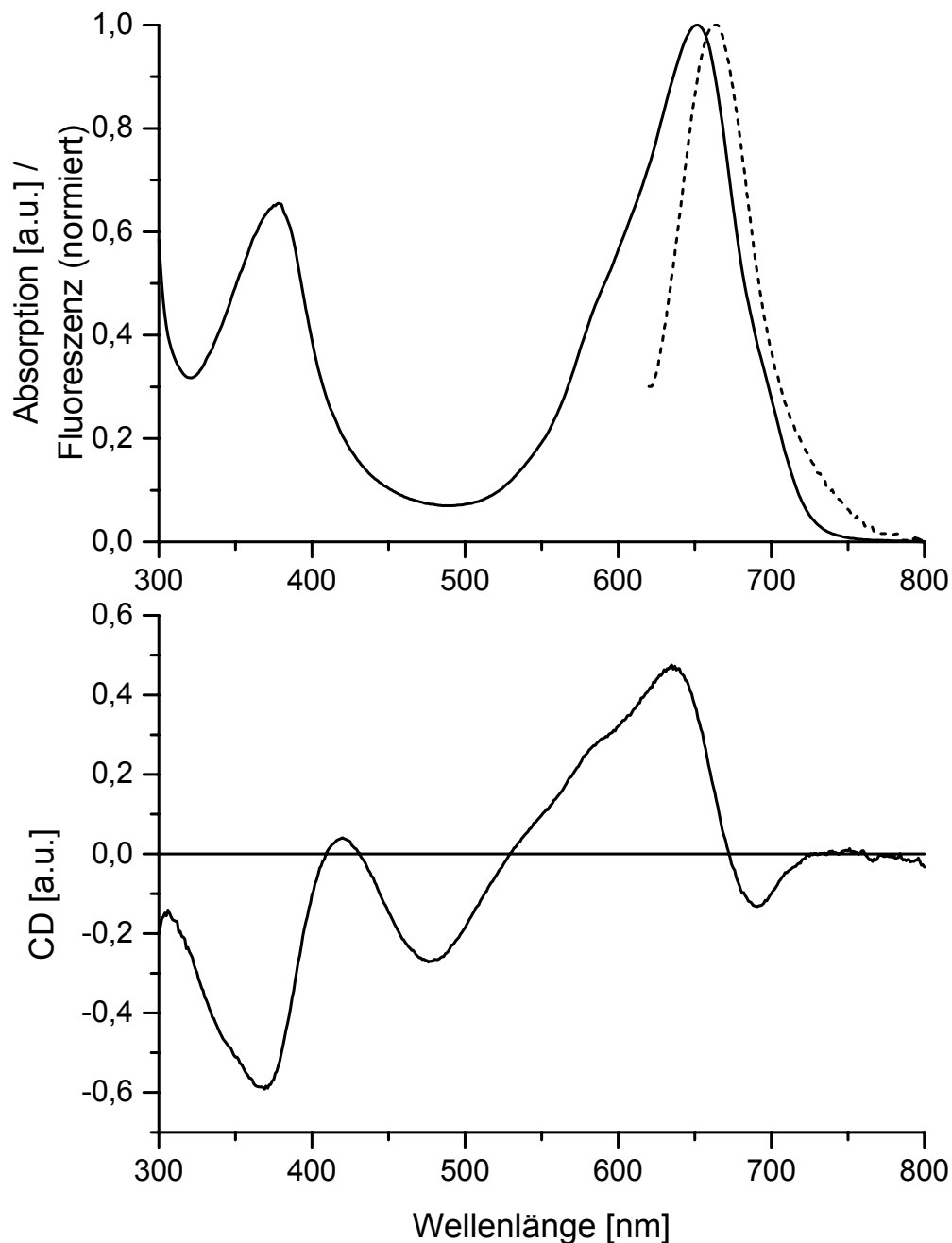


Abbildung 3-52:

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PΦB nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.
oben: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (Excitation 600 nm) (-----)
unten: CD-Spektrum

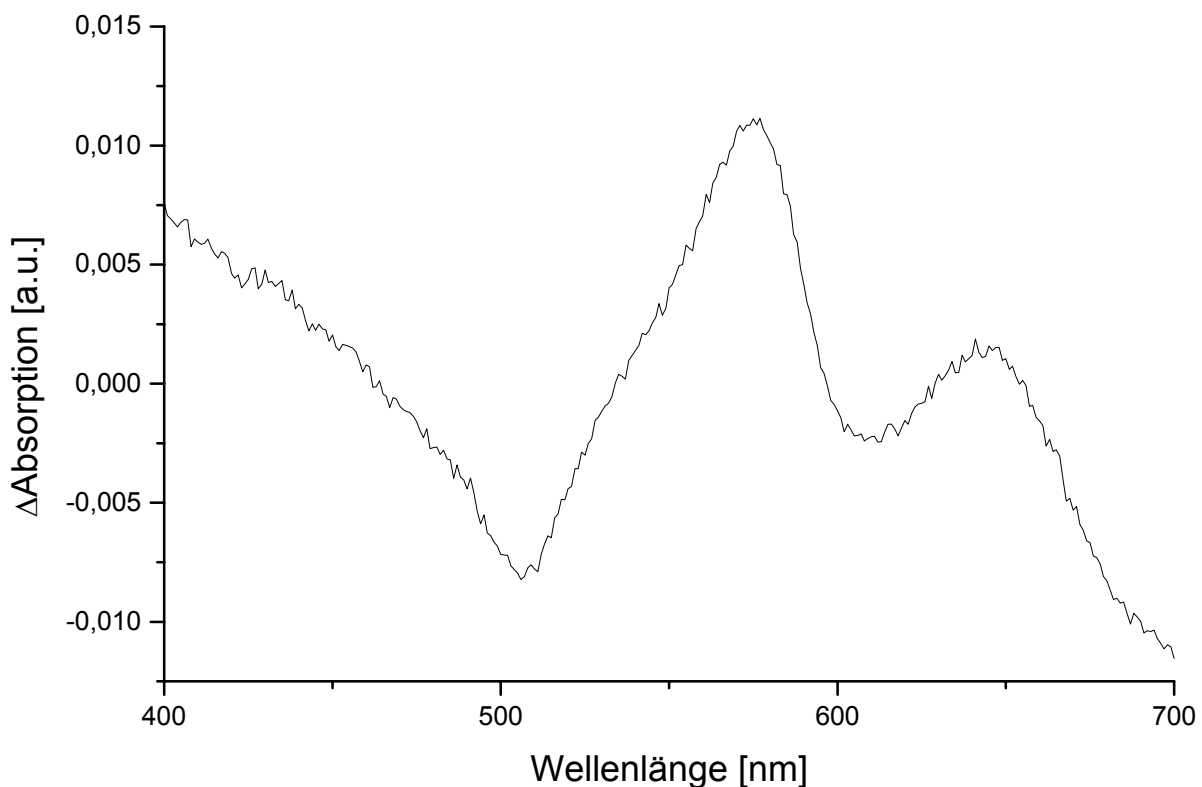
Im Absorptionsspektrum sind neben dem Maximum bei 652 nm zwei Schultern bei etwa 580 nm und 670 nm zu erkennen. Das Maximum ist damit im Vergleich zum Absorptionsmaximum der Rekonstitution mit PCB, bei dem hauptsächlich das His₆-PecA-PCB-Addukt entstanden ist, um 11 nm rotverschoben. Bei der Rekonstitution von Phytochrom fällt der Unterschied zwischen den Maxima des rekonstituierten Phytochroms mit PΦB als Chromophor und des PCB-Apophytochrom-Addukt mit 10 - 16 nm ähnlich aus (Wahleithner *et al.* 1991, Li & Lagarias 1992, Murphy & Lagarias 1997). Es dürfte demnach bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit PΦB hauptsächlich das His₆-PecA-PΦB-Addukt entstanden sein. Die beiden Schultern weisen daraufhin, dass neben dem His₆-PecA-PΦB-Addukt zwei weitere Produkte entstanden sein dürften.

Eine starke Fluoreszenz ($\lambda_{\text{max}} = 666 \text{ nm}$), die allen Biliproteinen zu eigen ist, tritt auch bei diesem Rekonstitutionsprodukt auf und ist ein Hinweis auf eine Streckung und kovalente Bindung des Chromophors (Scheer 1981). Das CD-Spektrum besitzt im langwelligen Bereich ein Maximum bei 633 nm nahe des Absorptionsmaximums, bei dem es sich um das CD-Signal des His₆-PecA-PΦB-Addukts handeln dürfte. Daneben zeigt das CD-Spektrum eine Schulter bei 585 nm und ein negatives Extremum bei 691 nm. Diese zwei CD-Signale dürften von zwei weiteren Rekonstitutionsprodukten stammen. Allerdings könnten solche CD-Spektren auch auf einer heterogenen Bindungssituation eines einzigen Chromophors beruhen, wie es bei Phycocyanin-Untereinheiten der Fall ist (Scharnagl & Schneider 1989).

Es zeigte sich, dass das Produkt der Rekonstitution von His₆-PecA mit PΦB im Gegensatz zu den PCB-Rekonstitutionsprodukten instabil ist. Während der Lagerung der PΦB-Rekonstitutionsprodukte bei Raumtemperatur oder bei ca. 8 °C im Kühlschrank konnte im Laufe weniger Tage eine deutliche Abnahme und hypsochrome Verschiebung der Absorption beobachtet werden.

Die Photochemie

Das Phytochrom mit dem Chromophor Phytochromobilin zeigt eine intensive Photochemie, wobei die beiden Formen der Photochemie bei 660 nm und 730 nm absorbieren (Rüdiger & Thümmler 1991). Es wurde nun untersucht, ob auch das Rekonstitutionsprodukt von His₆-PecA mit PΦB eine Photochemie aufweist. Dazu wurden die Rekonstitutionsansätze nach Aufreinigung und Dialyse verschiedenen Belichtungszyklen unterzogen.

**Abbildung 3-53:**

Die reversible Photochemie des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA mit PΦB. Absorptionsdifferenzspektrum nach Belichtung bei 500 nm *minus* Absorptionsspektrum nach Belichtung bei 577 nm.

Durch Belichtung bei 639 nm, also im Wellenlängenbereich bei dem das His₆-PecA-PΦB-Addukt sein Absorptionsmaximum mit 651 nm besitzt, kam es lediglich zu einem irreversiblen Ausbleichen. Das His₆-PecA-PΦB-Addukt ist also ebenso wie das His₆-PecA-PCB-Addukt photochemisch inaktiv.

Jedoch konnte durch Belichtungszyklen mit 577 nm und 500 nm eine reversible Photochemie mit den Maxima bei 506 nm und 574 nm induziert werden. Die Photochemie war allerdings nicht sehr ausgeprägt. Der $\Delta\Delta A_{506/574}$ -Wert (siehe 2.7.3) für diese Photochemie lag bei 1,5 - 2 % (bezogen auf das Maximum bei 651 nm). Diese Photochemie mit den Maxima bei 506 nm und 574 nm ähnelt der Photochemie des nativen bzw. rekonstituierten α -PEC, also dem PVB-Addukt, mit Maxima bei 505 nm und 567 nm. Es scheint also, dass es bei der autokatalytischen Rekonstitution mit PΦB, analog zur autokatalytischen Rekonstitution mit PCB, in geringem Umfang zu einer Isomerisierung des PΦB zu einem dem PVB ähnlichen Chromophor kommt. Da sich das PΦB vom PCB durch eine 18-Vinylgruppe unterscheidet, dürfte es sich beim neu entstandenen Chromophor um das 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB handeln (siehe Abbildung 3-56).

Denaturierung durch 8 M Harnstoff

Durch Zugabe von 8 M Harnstoff kommt es zu einer vollständigen Entfaltung des rekonstituierten Proteins, wodurch der Proteineinfluss auf den Chromophor völlig aufgehoben wird und dieser sich wie ein freier Chromophor verhält (Scheer & Kufer 1977, Scheer 1982).

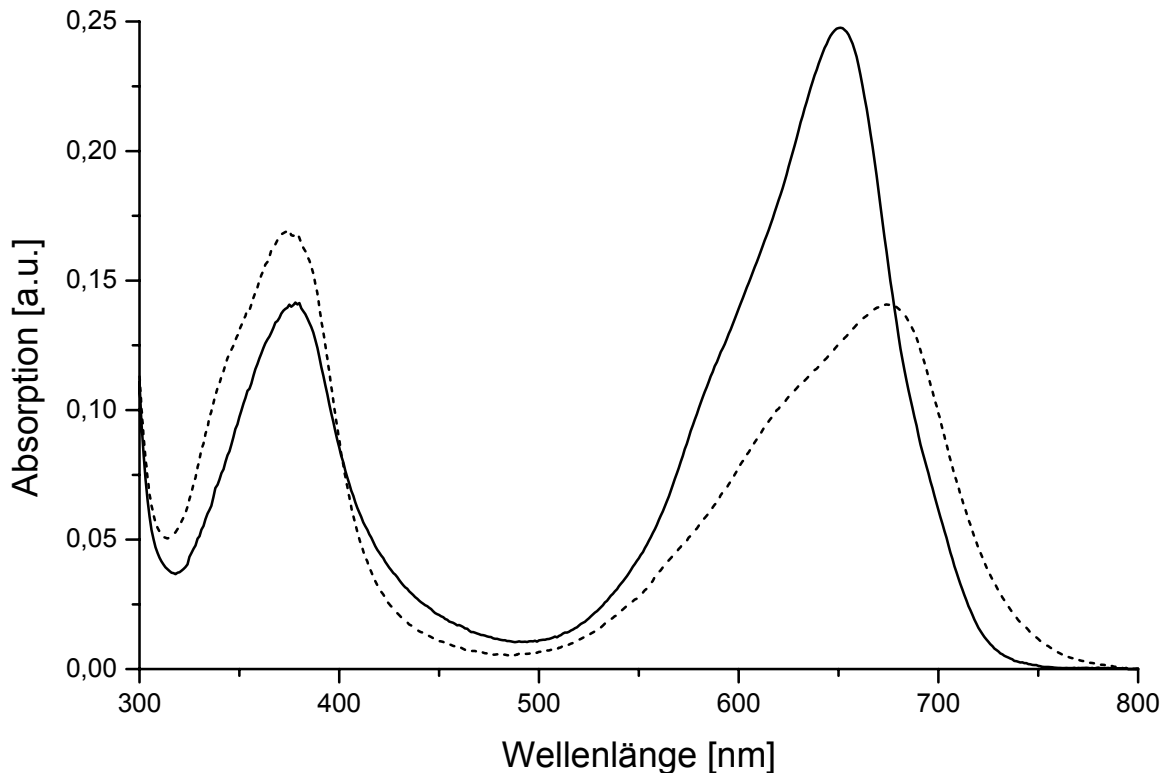


Abbildung 3-54:

Denaturierung des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und PΦB. Absorptionsspektren des Rekonstitutionsprodukts in 150 mM KPP, pH 7,0 (—) bzw. in 8 M Harnstoff, pH 1,9 (-----); die Konzentrationen an Rekonstitutionsprodukt stimmen in beiden Proben überein.

Das Rekonstitutionsprodukt in 8 M Harnstoff bei pH 1,9 zeigte ein Spektrum, das mit einem langwelligen Maximum bei 678 nm weitgehend dem Spektrum von vollständig denaturiertem Phytochrom mit einem Maximum bei 680 nm entspricht (Brandlmeier *et al.* 1981). Dies weist darauf hin, dass während der autokatalytischen Rekonstitution das PΦB hauptsächlich, wie beim Phytochromobilin, das 3¹-Cys-PΦB als Chromophor gebunden wurde, also das His₆-PecA-PΦB-Addukt entstanden ist.

Berechnung des Extinktionskoeffizienten

Anhand der Denaturierung des His₆-PecA-PΦB-Addukts durch 8 M Harnstoff (pH 1,9) und des bekannten Extinktionskoeffizienten für denaturiertes Phytochromobilin, das 3¹-Cys-PΦB gebunden hat (siehe Tabelle 3-1), konnte ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{651} = 56000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für das gefaltete His₆-PecA-PΦB-Addukt errechnet werden. Dieser Koeffizient liegt damit deutlich unter dem von Phytochrom mit $\epsilon_{665} = 109000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Brandlmeier *et al.* 1981).

Ausbeute der Rekonstitution

Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten konnte die Ausbeute an His₆-PecA-PΦB-Addukt berechnet werden. Sie lag für die Rekonstitution bei 20 - 40 mg pro Liter *E. coli*-Expressionskultur. Es konnte also ca. die Hälfte des Apoproteins mit PΦB rekonstituiert werden.

Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC

Das Rekonstitutionsprodukt mit PΦB ist bei Lagerung bei Raumtemperatur sehr instabil, was sich durch die Abnahme und bathochrome Verschiebung der Absorption zeigte. Besonders deutlich wurde diese Instabilität während des tryptischen Verdaus, bei dem es zu einem massiven Abbau der Chromophore kam. Nach der 24-stündigen Inkubation mit Trypsin bei Raumtemperatur konnten Chromopeptide nur noch in geringen Mengen nachgewiesen werden.

Dabei konnten zwei spektral unterschiedliche Peptide detektiert werden, deren Absorptionsspektren in Abbildung 3-55 dargestellt sind. Bei dem Peptid, mit einem Absorptionsmaximum bei 597 nm und einer Schulter bei 570 nm dürfte es sich um das [18-Vinyl]-PVB-Peptid handeln. Die Form des Spektrums ähnelt stark der des Spektrums des PVB-Peptids (Abbildung 3-36). Das Maximum ist lediglich um 7 nm bathochrom verschoben, was auf die zusätzliche Vinylgruppe zurückzuführen ist. Das andere Peptid besitzt ein Absorptionsmaximum von 663 nm und absorbiert damit wesentlich kurzwelliger als für ein 3¹-Cys-PΦB-Peptid zu erwarten wäre. Ein solches 3¹-Cys-PΦB-Peptid im sauren HPLC-Laufmittel müsste wie protoniertes denaturiertes Phytochrom absorbieren, also mit einem Maximum bei etwa 680 nm (Brandlmeier *et al.* 1981, Bishop *et al.* 1987, Wemmer *et al.* 1993).

Mittels der HPLC kann also das 3^1 -Cys-P Φ B-Peptid nicht nachgewiesen werden. Der Abbau des 3^1 -Cys-P Φ B-Chromophors während des Trypsinverdaus, der sich in der kurzwelligen Verschiebung des Chromopeptidspektrums aber vor allem auch im massiven Verlust von nachweisbarem Chromopeptiden zeigt, war zu stark.

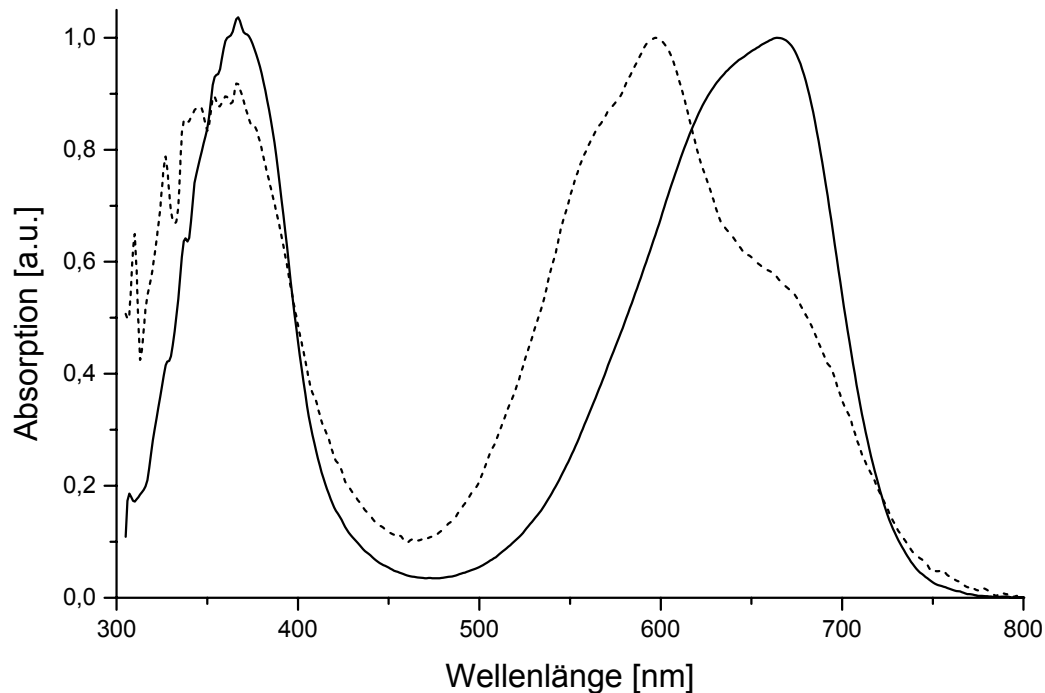


Abbildung 3-55:

Absorptionsspektren der Chromopeptide nach Trypsinverdau der Produkte der Rekonstitution von His₆-PecA und P Φ B. Die Spektren der P Φ B-Peptide (—), welche jedoch einem Abbau unterworfen waren, und der [18-Vinyl]-PVB-Peptide (-----) wurden im HPLC-Laufmittel 0,1 M KPP pH 2,1: Acetonitril (80 : 20 bis 60 : 40) aufgenommen und auf das Maximum normiert.

Ein drittes Peptid, wie bei der HPLC-Analyse des Produkts der autokatalytischen Rekonstitution mit PCB, konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Rekonstitution mit PCB ist neben dem PCB- und dem PVB-Addukt noch das MBV-Addukt entstanden. Ob bei der Rekonstitution mit P Φ B analog dazu ein [18-Vinyl]-MBV-Addukt entstanden ist, konnte durch Trypsinverdau und HPLC nicht gezeigt werden.

Zusammenfassende Diskussion der autokatalytischen Bindung von Phytochromobilin

Die Rekonstitutionsversuche zeigten, dass das PΦB autokatalytisch vom Apoprotein His₆-PecA gebunden wurde. Es entstand dabei hauptsächlich das His₆-PecA-PΦB-Addukt. Dabei kam es während der autokatalytischen Bindung zur Öffnung der Δ^{3,3'}-Doppelbindung des PΦB und der Ausbildung einer Thioetherbrücke zum Cystein 84 des Apoproteins und somit zur Bildung des Chromophors 3¹-Cys-PΦB. Dieses His₆-PecA-PΦB-Addukt ist photochemisch inaktiv und wesentlich instabiler als beispielsweise das His₆-PecA-PCB- oder das His₆-PecA-PEB-Addukt.

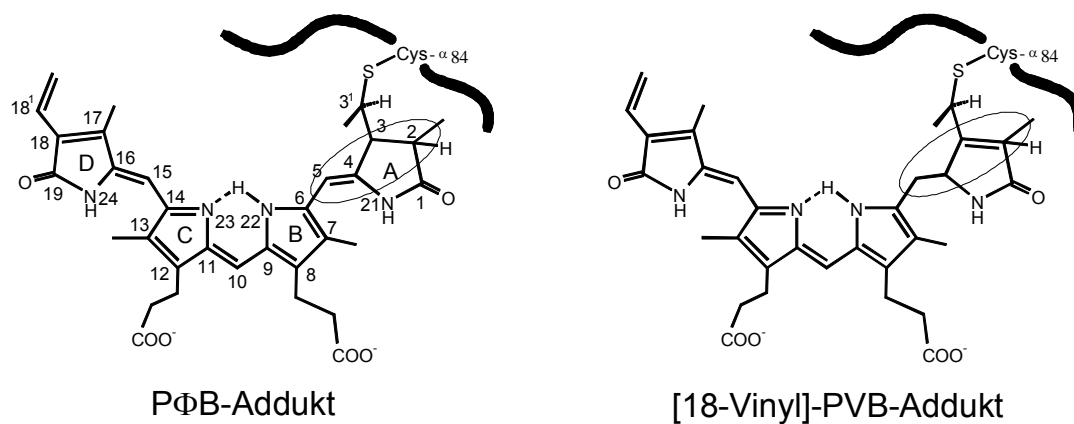


Abbildung 3-56:

Strukturformeln der zwei Addukte, die bei der Rekonstitution von PΦB mit His₆-PecA entstehen. Die Bereiche, in denen sich die Chromophore unterscheiden, sind markiert.

Bei der autokatalytischen Rekonstitution konnte noch ein zweites Addukt nachgewiesen werden, bei dem es sich um das His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt handeln dürfte. Durch eine Isomerisierung des Chromophors während der Bindung, wie sie auch bei der autokatalytischen Bindung des PCB beobachtet werden konnte, wurde das PΦB in geringem Umfang als Chromophor 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB an das Apoprotein gebunden. Dieses Addukt besitzt eine reversible Photochemie, die der des α-PEC ähnelt.

3.4.7 Enzymatische Rekonstitution mit dem Chromophor Phytochromobilin und der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase

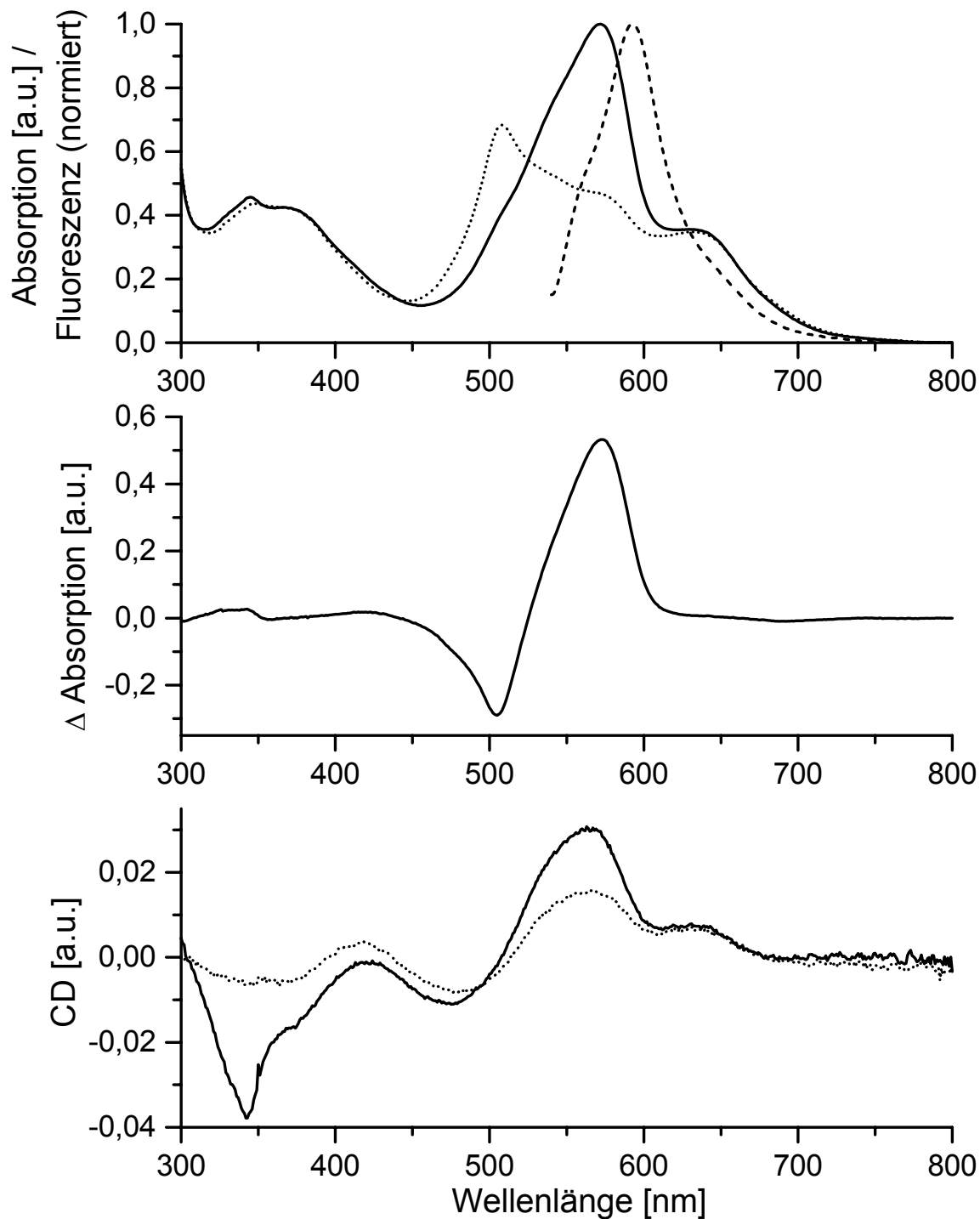
Durch die Lyase-Isomerase, bestehend aus den beiden Untereinheiten PecE und PecF, wurde bei der Rekonstitution mit PCB die Isomerisierung des Chromophors katalysiert. Bei der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PCB wurde überwiegend das PVB-Addukt gebildet, das dem nativen α -PEC entspricht. Es wurde nun auch eine enzymatische Rekonstitution von His₆-PecA mit P Φ B unter Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF durchgeführt. Bei dieser Rekonstitution entstand überwiegend ein blauviolett gefärbtes photochemisch aktives Biliprotein, das ähnliche Eigenschaften wie das rekonstituierte bzw. native α -PEC besaß.

Absorptions-, Fluoreszenz-, CD-Spektren und Photochemie

Zur Charakterisierung wurden von dem Produkt die Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren (siehe Abbildung 3-57) aufgenommen.

Das Rekonstitutionsprodukt zeigte eine ausgeprägte reversible Photochemie. Die beiden Formen der Photochemie besaßen Absorptionsmaxima bei 572 nm (nach Belichtung bei 500 nm) und 505 nm (nach Belichtung bei 577 nm) und ähneln damit der Photochemie Typ I des α -PEC mit Maxima bei 566 nm und 507 nm (Zhao & Scheer 1995). Auch bei der autokatalytischen Rekonstitution ist dieses Produkt in geringem Umfang entstanden und es wurde als [18-Vinyl]-PVB-Addukt identifiziert. Allerdings zeigten die Absorptionsspektren des rekonstituierten Proteins, im Gegensatz zum nativen α -PEC, nach Belichtung bei 500 nm bzw. 577 nm noch Schultern bei ca. 505 nm bzw. 575 nm, was bedeutet, dass die beiden Formen durch die Belichtung nicht vollständig ineinander umgewandelt werden konnten. Daneben ist eine deutliche Schulter bei 650 nm zu erkennen, die vom P Φ B-Addukt stammt.

Anhand des Absorptionsdifferenzspektrums (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm) konnte der $\Delta\Delta_{505/572}$ -Wert der Photochemie bestimmt werden. Beim Rekonstitutionsprodukt lag er zwischen 80 % und 90 % und damit niedriger als der $\Delta\Delta_{505/566}$ -Wert des nativen α -PEC mit 127 % (Zhao & Scheer 1995) und des rekonstituierten α -PEC mit 100 % - 110 %. Dies und die Schultern in den Absorptionsspektren zeigten, dass das [18-Vinyl]-PVB-Addukt eine geringere photochemische Aktivität besitzt, als das α -PEC, das PVB-Addukt.

**Abbildung 3-57:**

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF mit PΦB nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.

Oben: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····). Daneben ist das Fluoreszenzspektrum (Excitation 520 nm) der langwellig absorbierenden Form der Photochemie (-----) dargestellt.

Mitte: Absorptionsdifferenzspektrum (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Unten: CD-Spektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····).

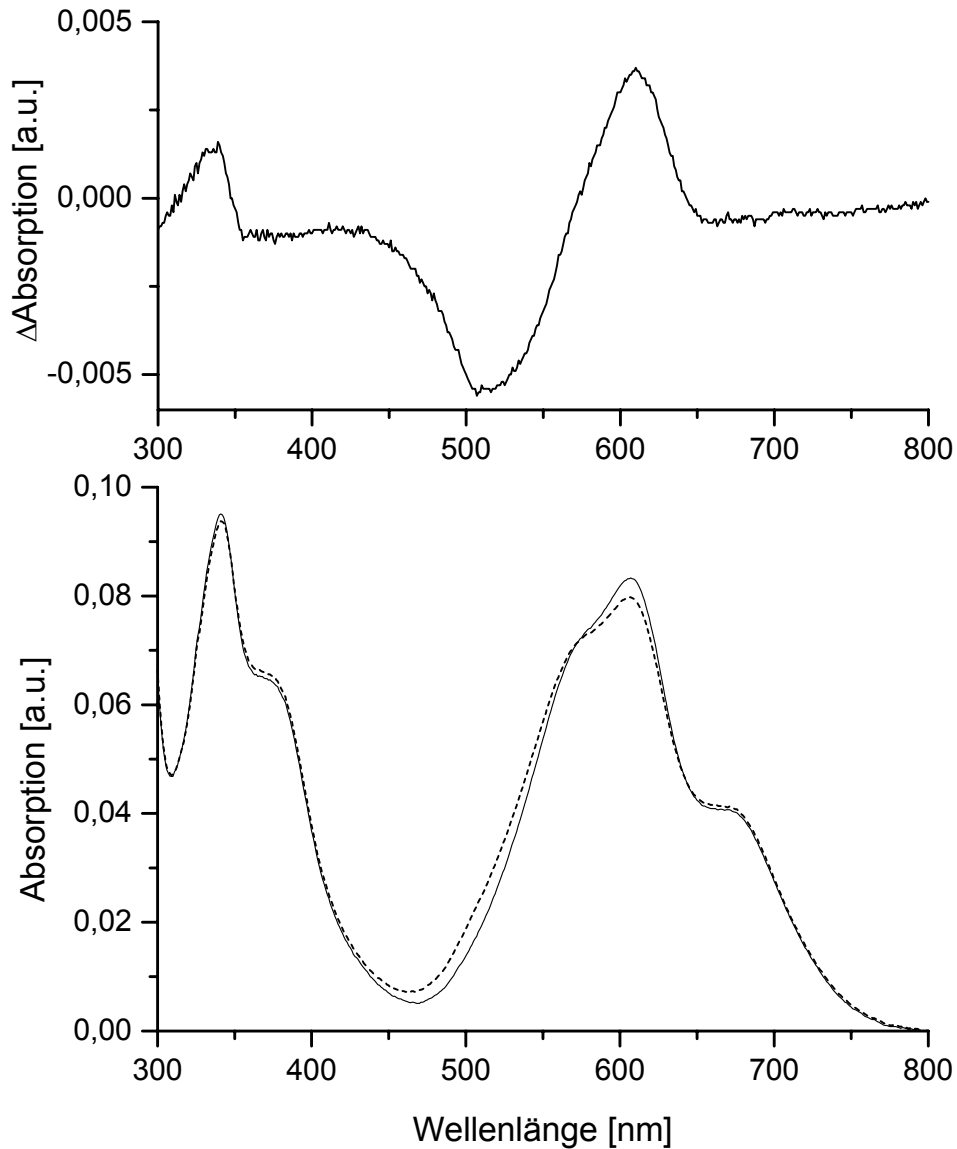
Wie beim α -PEC (Maruthi Sai *et al.* 1992) konnte eine Fluoreszenz des [18-Vinyl]-PVB-Addukts nur bei der langwellig absorbierenden Form mit einem Maximum bei 593 nm beobachtet werden. Wurde versucht, bei der kurzwellig absorbierenden Form der Photochemie eine Fluoreszenz zu induzieren, so kam es zu einer Photoumwandlung in die langwellig absorbierende Form und eine Fluoreszenz trat nur bei 593 nm auf.

Das CD-Spektrum der langwellig absorbierenden Form des Rekonstitutionsprodukts stimmt in seiner Form mit dem CD-Spektrum des α -PEC überein. Im CD-Spektrum zeigt sie ein negatives Extremum bei 342 nm und ein positives Extremum bei 569 nm. Aufgrund der nicht vollständigen photochemischen Umwandlung kommt es bei der kurzwellig absorbierenden Form der Photochemie jedoch nicht zu einer Umkehrung der CD-Signale wie beim nativen α -PEC, sondern lediglich zu einer Abschwächung der Signale. Die kleinen Maxima in Absorptions- und CD-Spektren bei 650 nm stammten vom PecA-P Φ B-Addukt, das auch bei der enzymatischen Rekonstitution entstand.

Die Absorptions-, Fluoreszenz-, CD-Spektren und das photochemische Verhalten des Produkts aus der Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit P Φ B ähneln denen des α -PEC stark. Dies lässt darauf schließen, dass die Chromophore im α -PEC und dem Rekonstitutionshauptprodukt ähnliche Struktur aufweisen müssten, wie es beim 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB der Fall ist. Bei der enzymatischen Rekonstitution entsteht demnach als Hauptprodukt das His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt. Die spektralen Unterschiede zum rekonstituierten bzw. nativen α -PEC lassen sich auf die Vinyl-Gruppe des 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB zurückführen.

Bei der Rekonstitution mit P Φ B durch Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF kam es also, wie bei der enzymatischen Rekonstitution mit PCB, nicht nur zu einer Bindung des Chromophors, sondern auch zu einer Isomerisierung des P Φ B zum 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB. Dieser dem PVB ähnliche Chromophor ist für die ausgeprägte Photochemie des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts verantwortlich.

Durch Vergleich des photochemischen des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts mit dem von α -PEC und anderen Rekonstitutionsprodukten konnten Erkenntnisse über mögliche Mechanismen der Photochemie dieser Chromoproteine gewonnen werden. Dies wird im Abschnitt 4.2 ausführlich diskutiert.

Denaturierung durch 8 M Harnstoff**Abbildung 3-58:**

Denaturierung des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PΦB.

Unten: Absorptionsspektren des Rekonstitutionsprodukts in 8 M Harnstoff (pH 1,9) nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (-----).

Oben: Absorptionsdifferenzspektrum des Rekonstitutionsprodukts in 8 M Harnstoff (pH 1,9) (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Die Zugabe von 8 M Harnstoff zum Rekonstitutionsprodukt, dem His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt, und anschließendes Ansäuern (pH 1,9) ergab die typischen spektralen Veränderungen für denaturierte Biliproteine: Die Extinktion, der langwelligen Bande nahm stark ab und war nun geringer als die Extinktion der kurzwelligen Bande. Es entstand ein Maximum

bei 606 nm mit einer deutlichen Schulter bei ca. 575 nm. Das kurzwellige Maximum lag bei 341 nm. Wie bei denaturiertem aus *M. laminosus* isoliertem (Siebzehnrübl *et al.* 1989, Siebzehnrübl 1990) und denaturiertem rekonstituierten α -PEC konnte auch hier durch Belichtung bei 500 nm und 577 nm eine geringe, aber deutliche, reversible Photochemie induziert werden. Gut ist diese Photochemie anhand des Absorptionsdifferenzspektrums mit Extrema bei 507 nm und 610 nm zu erkennen. Der $\Delta\Delta A_{507/610}$ -Wert lag bei 11 % und damit ähnlich hoch wie beim denaturierten α -PEC mit 13 % (Siebzehnrübl *et al.* 1989).

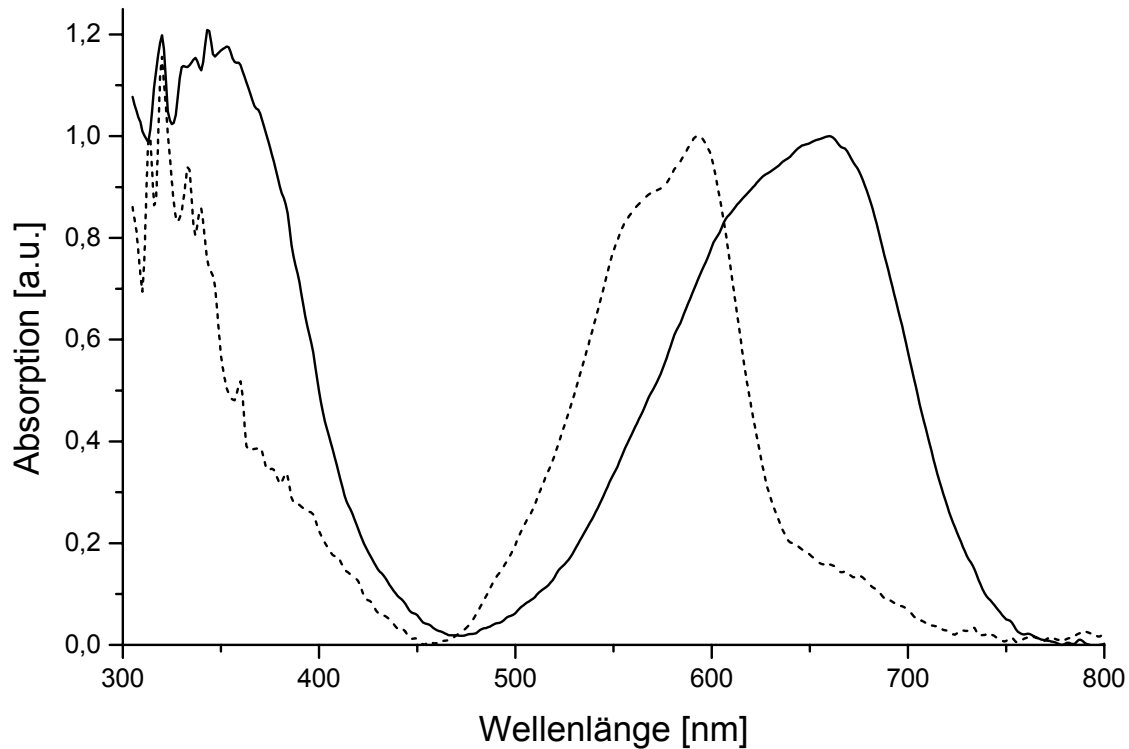
Die Schulter bei 675 nm in den Absorptionsspektren stammte vom P Φ B-Addukt, das bei der enzymatischen Rekonstitution als Nebenprodukt gebildet wurde.

Ausbeute der Rekonstitution

Da es sich beim 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB um einen neuen Chromophor handelt, der in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, existiert kein Extinktionskoeffizient. Es konnte daher auch kein Extinktionskoeffizient für das His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt errechnet werden und somit auch die Ausbeute der Rekonstitution nicht bestimmt werden. Ausgehend davon, dass die Extinktionskoeffizienten für das His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt und für das rekonstituierte α -PEC ähnlich sind, so ergäben sich auch ähnliche Ausbeuten, d.h. etwa die Hälfte des Apoproteins konnte rekonstituiert werden, was 30 - 50 mg Rekonstitutionsprodukt pro Liter *E. coli*-Expressionskultur für PecA entsprechen würde.

Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte durch HPLC

Das Produkt der enzymatischen Rekonstitution mit P Φ B, bei der hauptsächlich das PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt entstanden ist, war bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank deutlich instabiler als das α -PEC, jedoch etwas stabiler als das P Φ B-Addukt. Dennoch kam es während des tryptischen Verdaus, der 24 h dauerte, zu einem massiven Abbau. Der Großteil der Chromophore der Peptide ging dabei verloren und es konnten Chromopeptide nur noch in geringen Mengen detektiert werden. Dabei konnten zwei spektral unterschiedliche Peptide nachgewiesen werden.

**Abbildung 3-59:**

Absorptionsspektren der Chromopeptide nach Trypsinverdau der Produkte der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit PΦB.

Die Spektren der PΦB-Peptide (—) und der [18-Vinyl]-PVB-Peptide (-----), welche jedoch einem Abbau unterworfen waren, wurden im HPLC-Laufmittel 0,1 M KPP pH 2,1 : Acetonitril (80 : 20 bis 60 : 40) aufgenommen und auf das Maximum normiert.

Das [18-Vinyl]-PVB-Peptid müsste ähnlich wie das denaturierte, protonierte [18-Vinyl]-PVB-Addukt absorbieren (Bishop *et al.* 1987, Wemmer *et al.* 1993), also mit einem Maximum bei 606 nm und einer Schulter bei 575 nm (siehe Abbildung 3-58). Hauptsächlich konnte jedoch ein Chromopeptid mit einem Absorptionsmaximum bei 594 nm und einer Schulter bei 570 nm detektiert werden. Dabei müsste es sich um ein Abbauprodukt handeln, das während des tryptischen Verdau aus dem PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt entstanden ist. Auch das zweite Chromopeptid, das nachgewiesen werden konnte, absorbierte mit einem Maximum bei 660 nm deutlich kürzerwelliger als das erwartete PΦB-Peptid, das bei 680 nm absorbiert (Brandlmeier *et al.* 1981).

Aufgrund dieses massiven Abbaus der Chromophore ist, wie sich auch schon bei der autokatalytischen Rekonstitution mit PΦB zeigte, die Analyse durch tryptischen Verdau und HPLC nicht geeignet um die Chromophore nachzuweisen, die bei der enzymatischen Rekonstitution mit PΦB gebunden wurden.

Behandlung mit PCMS

Die Photochemie des α -PEC kann durch Zugabe von PCMS modifiziert werden. Bei dieser sog. Photochemie Typ II liegen die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie nah zusammen bei 563 nm und 555 nm, wobei die Extinktion der kurzwelligen Form deutlich geringer ist (Zhao & Scheer 1995). Diese Modifikation wird dadurch verursacht, dass das PCMS an eines oder an beide Cysteine 98 und 99 bindet, wodurch es zu einer Änderung der Konformation und Flexibilität des Proteins kommt und sich dadurch das Absorptions- und photochemische Verhalten des Chromophors ändert.

Durch Zugabe von PCMS zum photochemisch aktiven His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt sollte untersucht werden, ob es auch hier zu einer Änderung der Photochemie kommt, die der Photochemie Typ II des α -PEC entspricht. Im Gegensatz zum nativen α -PEC, bei dem ein 2-molarer Überschuss an PCMS zum Protein gegeben wird, musste hier, wie auch beim rekonstituierten α -PEC ein 40-molarer Überschuss gegeben werden, bis keine Photochemie Typ I, sondern nur noch Typ II zu detektieren war. Der Grund dafür war, dass neben dem rekonstituierten Protein auch nicht rekonstituiertes Apoprotein, His₆-PecE und His₆-PecF in der Probe vorhanden waren, die ebenfalls PCMS binden konnten.

Die Absorptionsspektren nach Zugabe des PCMS sind in Abbildung 3-60 dargestellt. Das Rekonstitutionsprodukt zeigte nach Zugabe von PCMS eine deutlich Änderung der Photochemie. Die beiden Formen der Photochemie, die durch Belichtung bei 500 nm und 577 nm ineinander reversibel umgewandelt werden konnten, besaßen Absorptionsmaxima bei 567 nm (nach Belichtung bei 500 nm) und 563 nm (nach Belichtung bei 577 nm). Die Absorptionsspektren während der Photochemie des Rekonstitutionsprodukts ähneln damit der Photochemie Typ II des nativen α -PEC. Allerdings fielen die Absorptionsänderungen während der Photochemie Typ II des His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts, wie auch beim rekonstituierten α -PEC, deutlich geringer aus als beim nativen α -PEC. So ist beim nativen α -PEC die Absorption der kurzwellig absorbierenden Form der Photochemie Typ II im Maximum nur etwa halb so groß wie die der langwellig absorbierenden Form. Beim His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt ging die Absorption der kurzwellig absorbierenden Form nur um ca. 15 % zurück. Auch der $\Delta\Delta A_{507/566}$ -Wert der Photochemie Typ II des His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts war mit 16 % zwar so hoch wie beim rekonstituierten α -PEC, aber nur halb so groß wie der $\Delta\Delta A_{507/566}$ -Wert der Photochemie Typ II beim nativen α -PEC mit 32 % (Zhao & Scheer 1995).

Das Differenzspektrum der Absorptionen beider Formen der Photochemie Typ II des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt mit dem Maximum bei 568 nm stimmt in der Form mit dem des nativen α -PEC überein. Das kleine Maximum bei 650 nm stammte vom P Φ B-Addukt, das bei der Rekonstitution unter Zugabe von PecE und PecF als Nebenprodukt entstand.

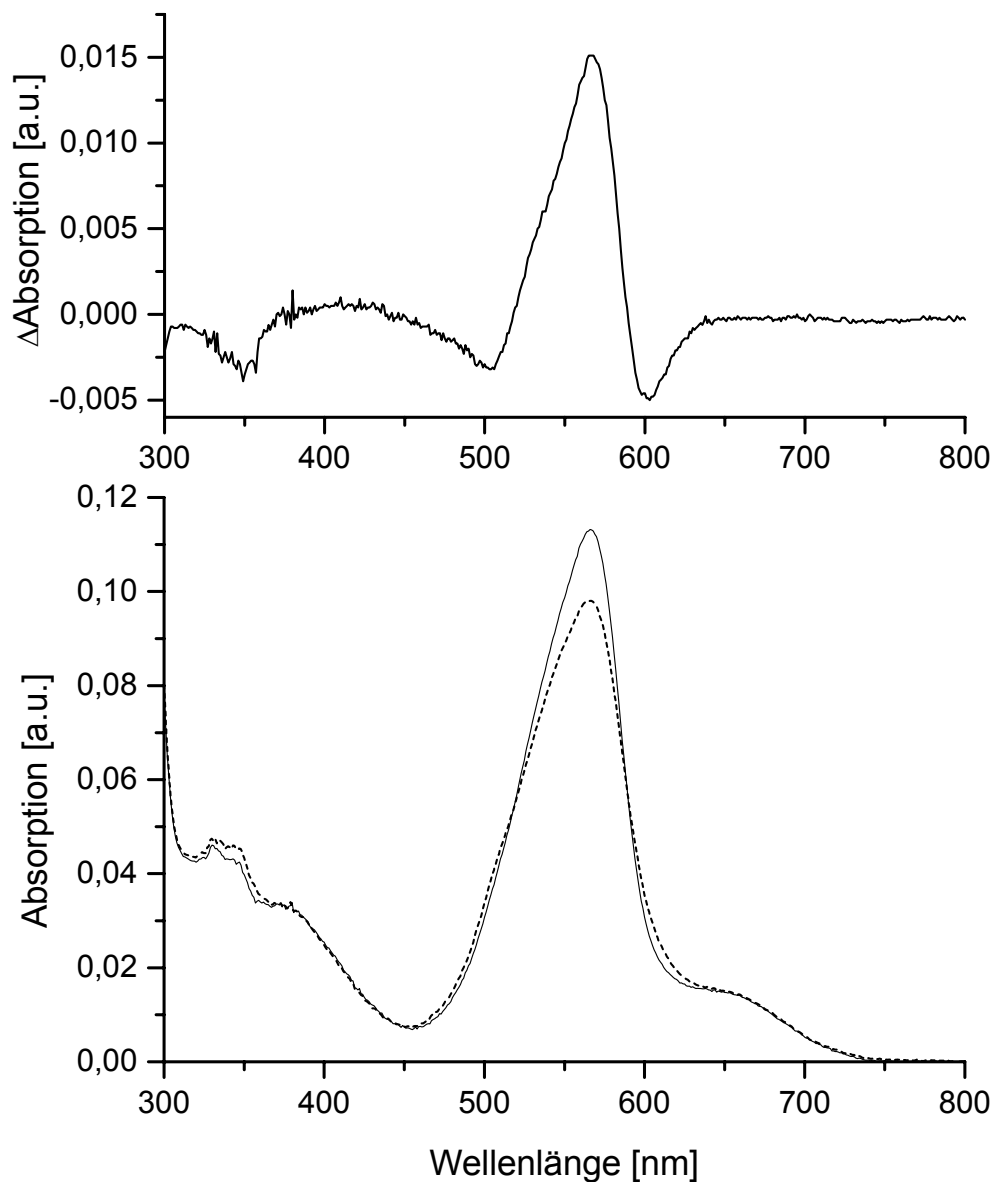


Abbildung 3-60:

Absorptionsspektren des Produkts der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF mit P Φ B nach Zugabe von PCMS.

Oben: Absorptionsdifferenzspektrum (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).
Unten: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (-----).

Zusammenfassende Diskussion der enzymatischen Bindung von Phytochromobilin

Durch die Zugabe der Proteine His₆-PecE und His₆-PecF, den Untereinheiten der Lyase-Isomerase, zum Rekonstitutionsansatz von His₆-PecA und PΦB kam es während der Bindung zu einer Isomerisierung des Chromophors. Dadurch entstand bei der enzymatischen Rekonstitution hauptsächlich das photochemisch aktive His₆-PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt.

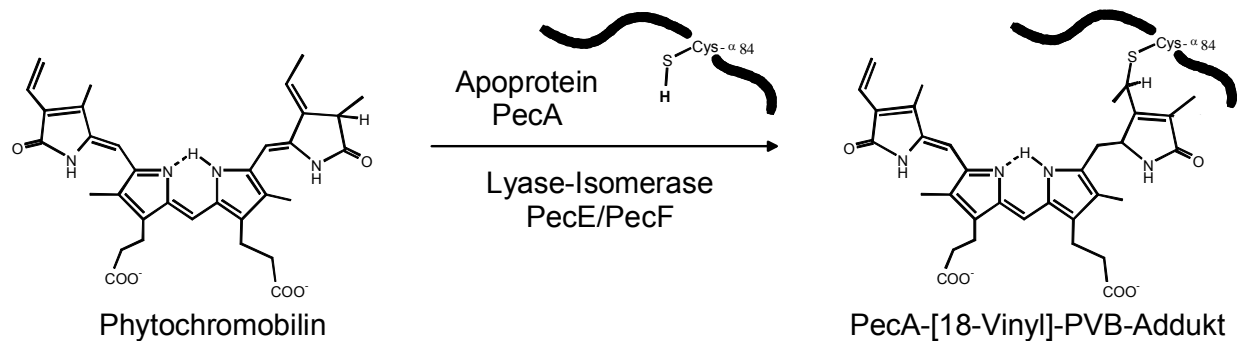


Abbildung 3-61:

Schema der enzymatischen Bindung von PΦB

Die Lyase-Isomerase PecE/PecF katalysiert während der Bindung von PCB die Isomerisierung dieses Chromophors zum PVB, dem nativen Chromophor des α-PEC. Neben dem PCB akzeptiert die Lyase-Isomerase auch das PΦB, das formal auch als [18-Vinyl]-PCB bezeichnet werden kann, als Substrat, und isomerisiert dieses zu einem dem 3¹-Cys-PVB ähnlichen Chromophor, dem 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB. Dabei wird die Doppelbindung von Δ4,5 nach Δ2,3 verlagert. Das bei der enzymatischen Rekonstitution entstandene PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt zeigte mit dem α-PEC große spektrale Ähnlichkeit. Es wies eine ausgeprägte reversible Photochemie Typ I auf und durch Zugabe von PCMS konnte die Photochemie Typ II induziert werden.

Durch Vergleich des photochemischen Verhaltens des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts und des α-PEC ergaben sich Hinweise auf einen möglichen Mechanismen der Photochemie dieser Biliproteine. Dies wird im Abschnitt 4.2 ausführlich diskutiert.

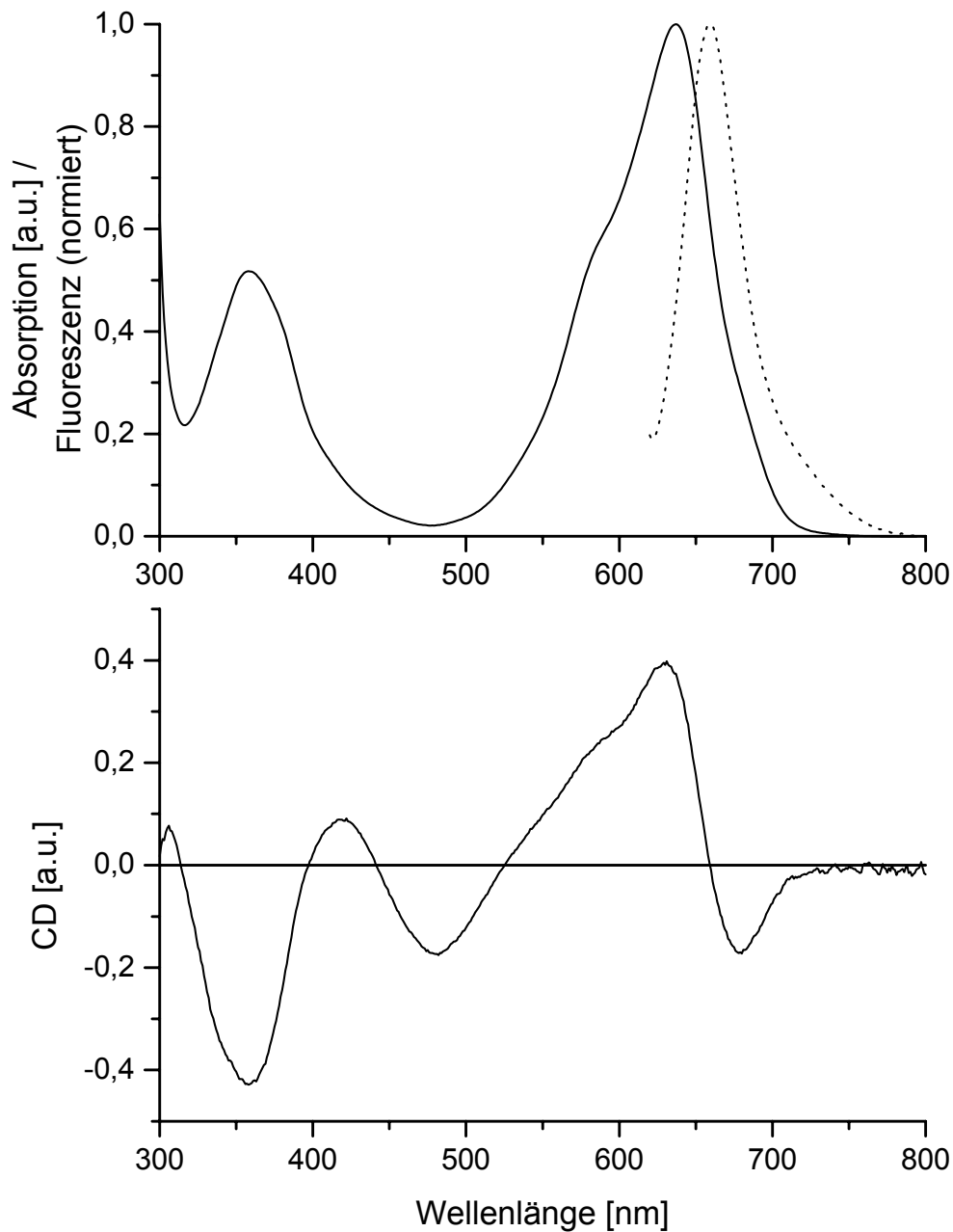
3.4.8 Rekonstitutionen mit den Nebenprodukten der Phytochromobilin-darstellung

Bei der Darstellung von PΦB aus PEB durch Oxidation mit FeCl₃ entstanden zwei Nebenprodukte. Absorptions-, Massen- und NMR-spektroskopische Untersuchungen dieser beiden Biline, die zunächst 1_{PΦB} und 2_{PΦB} genannt wurden, ergaben, dass sie sich vom PΦB (bzw. PCB) lediglich durch Seitengruppen am Ring D, an den Positionen 17 und 18 unterscheiden. Die exakten Strukturen von 1_{PΦB} und 2_{PΦB} konnten nicht definitiv bestimmt werden, jedoch konnten für beide Biline Strukturen ermittelt werden, die am wahrscheinlichsten erschienen. So könnte es sich bei 1_{PΦB} um das [17,18-Propano]-Phycocyanobilin ([17,18-Propano]-PCB; Abbildung 3-6) und bei 2_{PΦB} um das 18¹,18²-Epoxy-Phycocyanobilin (18¹,18²-Epoxy-PCB; Abbildung 3-7) handeln. Beide Biline wurden in Rekonstitutionen von His₆-PecA eingesetzt.

Autokatalytische Rekonstitution mit 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-Phycocyanobilin)

Die autokatalytische Rekonstitution des Apoproteins His₆-PecA mit 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-PCB) wurde mit dem Lysat durchgeführt. Der Chromophor band autokatalytisch, wobei die Rekonstitution nach etwa 18 h abgeschlossen war. Somit dauerte die autokatalytische Bindung von 1_{PΦB} etwa so lange wie die Bindung von PCB und PΦB.

Von dem blaugrün gefärbten Rekonstitutionsprodukt wurden nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren aufgenommen (Abbildung 3-62). Das Absorptionsspektrum der Rekonstitution weist Maxima bei 358 nm und 638 nm auf, daneben sind zwei Schultern bei etwa 570 nm und 675 nm zu erkennen. Damit ähnelt es stark dem Absorptionsspektrum der Produkte aus der autokatalytischen Rekonstitution mit PCB mit Maxima bei 355 nm und 641 nm und Schultern bei 570 nm und 675 nm. Wie bei der Rekonstitution mit PCB dürfte daher hauptsächlich das His₆-PecA-[17,18-Propano]-PCB-Addukt (Abbildung 3-64) entstanden sein. Das [17,18-Propano]-PCB und das PCB weisen ein gleich langes konjugiertes System auf, die leichten Absorptionsunterschiede können auf die unterschiedlichen Seitenketten an Ring D und deren Einfluss auf die Δ17,18-Doppelbindung zurückgeführt werden.

**Abbildung 3-62:**

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA und 1_{PFB} [17,18-Propano]-PCB nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.

oben: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektrum (Excitation 600 nm) (-----)

unten: CD-Spektrum

Die beiden Schultern bei 570 nm und 675 nm im Absorptionsspektrum weisen daraufhin, dass neben dem His₆-PecA-[17,18-Propano]-PCB-Addukt zwei weitere Produkte entstanden sein dürften. Analog zur autokatalytischen Rekonstitution mit PCB könnte es sich dabei um His₆-PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukt und das His₆-PecA-[17,18-Propano]-MBV-Addukt handeln.

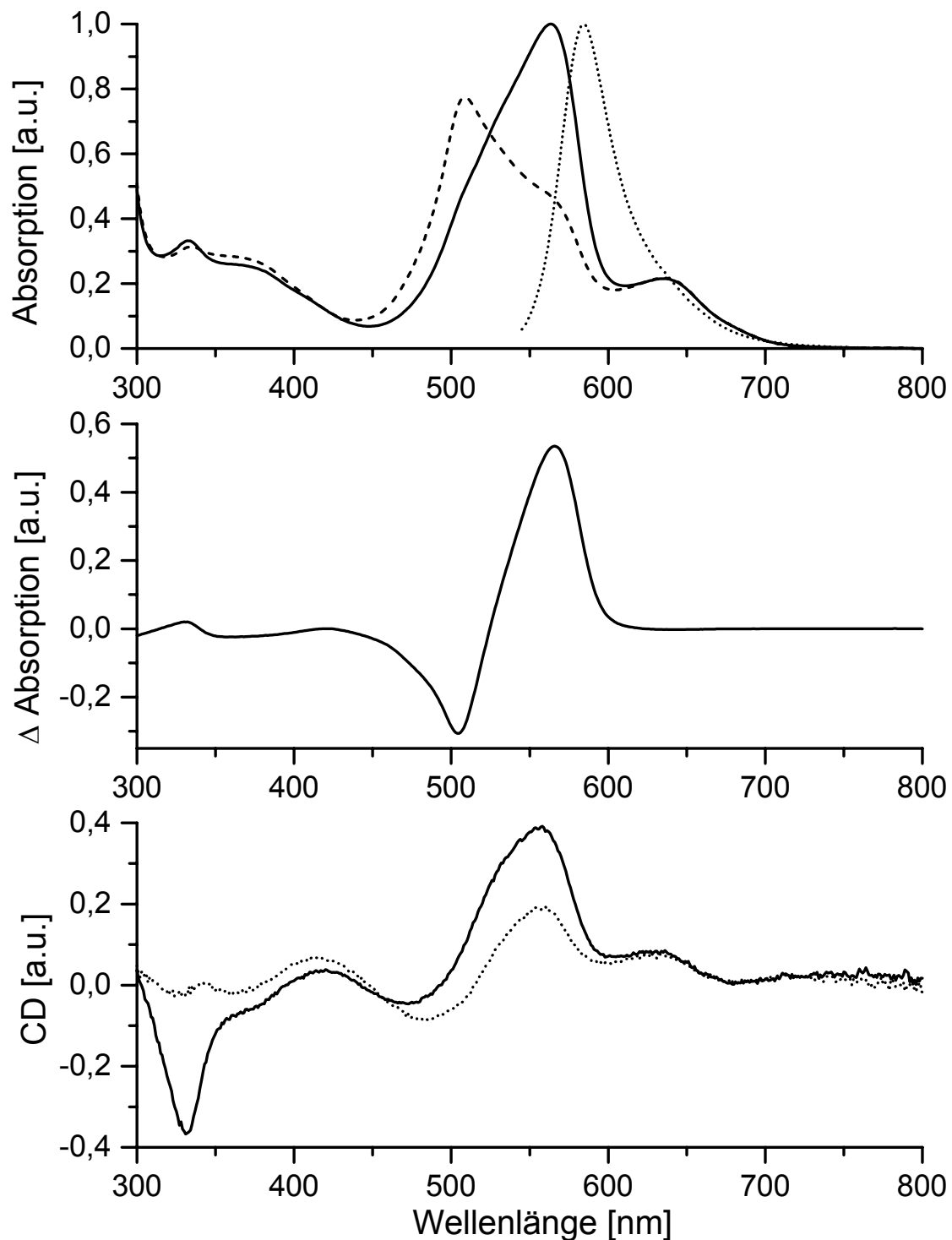
Eine starke Fluoreszenz ($\lambda_{\max} = 666 \text{ nm}$), die allen Biliproteinen zu eigen ist, tritt auch bei diesem Rekonstitutionsprodukt auf und weist auf die Streckung und kovalente Bindung des Chromophors hin (Scheer 1981). Das CD-Spektrum besitzt im langwelligen Bereich ein Maximum bei 631 nm nahe des Absorptionsmaximums, bei dem es sich um das CD-Signal des His₆-PecA-[17,18-Propano]-PCB-Addukts handeln dürfte. Daneben zeigt das CD-Spektrum eine Schulter bei 575 nm und ein negatives Extremum bei 679 nm. Diese zwei CD-Signale dürften von den beiden weiteren Rekonstitutionsprodukten stammen.

Es zeigte sich, dass das Produkt der Rekonstitution von His₆-PecA mit [17,18-Propano]-PCB im Gegensatz zu den PCB-Rekonstitutionsprodukten sehr instabil ist. Während der Lagerung der [17,18-Propano]-PCB-Rekonstitutionsprodukte bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank konnte nach wenigen Tagen eine deutliche Abnahme und hypsochrome Verschiebung der Absorption beobachtet werden.

Enzymatische Rekonstitution mit 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-Phycocyanobilin) und der Phycoviolobilin-Phycocerythrocyanin-α84-Cystein-Lyase-Isomerase

Es wurde auch eine enzymatische Rekonstitution von His₆-PecA mit 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-PCB) unter Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF durchgeführt. Bei dieser Rekonstitution entstand überwiegend ein violette, photochemisch aktives Biliprotein, das sehr ähnliche spektrale Eigenschaften wie das rekonstituierte bzw. native α-PEC besaß.

Zur Charakterisierung wurden von dem Produkt die Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren (siehe Abbildung 3-63) aufgenommen. Das Rekonstitutionsprodukt zeigte eine ausgeprägte reversible Photochemie. Die beiden Formen der Photochemie besaßen Absorptionsmaxima bei 564 nm (nach Belichtung bei 500 nm) und 505 nm (nach Belichtung bei 577 nm) und ähneln damit der Photochemie Typ I des α-PEC mit Maxima bei 566 nm und 507 nm (Zhao & Scheer 1995). Die Absorptionsspektren des rekonstituierten Proteins zeigten, im Gegensatz zum nativen α-PEC, nach Belichtung bei 500 nm bzw. 577 nm noch Schultern bei ca. 505 nm bzw. 565 nm. Das bedeutet, dass die beiden Formen durch die Belichtung weniger vollständig ineinander umgewandelt werden konnten als beim α-PEC.

**Abbildung 3-63:**

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA, His₆-PecE, His₆-PecF und 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-PCB) nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.

Oben: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····). Daneben ist das Fluoreszenzspektrum (Excitation 520 nm) der langwellig absorbierenden Form (-----) dargestellt.

Mitte: Absorptionsdifferenzspektrum (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Unten: CD-Spektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (·····).

Die Absorptionseigenschaften und die Photochemie des Rekonstitutionsprodukts lassen darauf schließen, dass die Lyase-Isomerase, wie auch bei der enzymatischen Rekonstitutionen mit PCB und PΦB, während der Chromophorbindung die Isomerisierung des Chromophors, dem [17,18-Propano]-PCB, katalysiert. Es entsteht dabei ein gebundener photochemisch aktiver Chromophor, der dem PVB ähnelt und bei dem es sich um das 3¹-Cys-[17,18-Propano]-PVB (Abbildung 3-64) handeln dürfte. Im Absorptionsspektrum ist zusätzlich eine deutliche Schulter bei ca. 635 nm zu erkennen, die vom spontan gebildeten [17,18-Propano]-PCB-Addukt stammen müsste. Anhand des Absorptionsdifferenzspektrums (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm) konnte der $\Delta\Delta A_{505/564}$ -Wert der Photochemie bestimmt werden. Beim Rekonstitutionsprodukt lag er zwischen 80 % und 90 % und damit niedriger als der $\Delta\Delta A_{505/566}$ -Wert des nativen α -PEC mit 127 % (Zhao & Scheer 1995) und des rekonstituierten α -PEC mit 100 % - 110 %. Dies bedeutet, dass das His₆-PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukt eine geringere photochemische Aktivität besitzt, als das α -PEC.

Wie beim α -PEC (Maruthi Sai *et al.* 1992) konnte eine Fluoreszenz des [17,18-Propano]-PVB-Addukts nur bei der langwellig absorbierenden Form mit einem Maximum bei 584 nm beobachtet werden. Das CD-Spektrum der langwellig absorbierenden Form der Photochemie des Rekonstitutionsprodukts stimmt in seiner Form mit dem CD-Spektrum des α -PEC überein. Die langwellig absorbierende Form des Photogleichgewichts-Gemischs besitzt ein negatives Extremum bei 331 nm und ein positives Extremum bei 558 nm. Aufgrund der nicht vollständigen photochemischen Umwandlung kommt es bei der kurzwellig absorbierenden Form des Photogleichgewichts-Gemischs jedoch nicht zu einer Umkehrung der CD-Signale wie beim nativen α -PEC, sondern lediglich zu einer Abschwächung. Die kleinen Maxima in Absorptions- und CD-Spektren bei 635 nm stammten vom His₆-PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukt, das in geringem Umfang auch bei der enzymatischen Rekonstitution entstand.

Die Absorptions-, Fluoreszenz-, CD-Spektren und das photochemische Verhalten des Produkts aus der Rekonstitution von His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF mit [17,18-Propano]-PCB ähneln dem α -PEC stark. Dies lässt darauf schließen, dass die Chromophore im α -PEC und im Rekonstitutionshauptprodukt ähnliche Konformationen aufweisen müssten. Bei der enzymatischen Rekonstitution sollte demnach als Hauptprodukt das His₆-PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukt entstehen. Die spektralen Unterschiede zum rekonstituierten bzw. nativen α -PEC lassen sich auf den isocyclischen Ring (Propano-Gruppe) am Ring D des 3¹-Cys-[17,18-Propano]-PVB zurückführen.

Bei der Rekonstitution mit [17,18-Propano]-PCB durch Zugabe von His₆-PecE und His₆-PecF kam es also nicht nur zu einer Bindung des Chromophors, sondern, wie bei der enzymatischen Rekonstitution mit PCB und PΦB, auch zu einer Isomerisierung des [17,18-Propano]-PCB zum 3¹-Cys-[17,18-Propano]-PVB. Dieser dem PVB ähnliche Chromophor ist für die ausgeprägte Photochemie des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts verantwortlich.

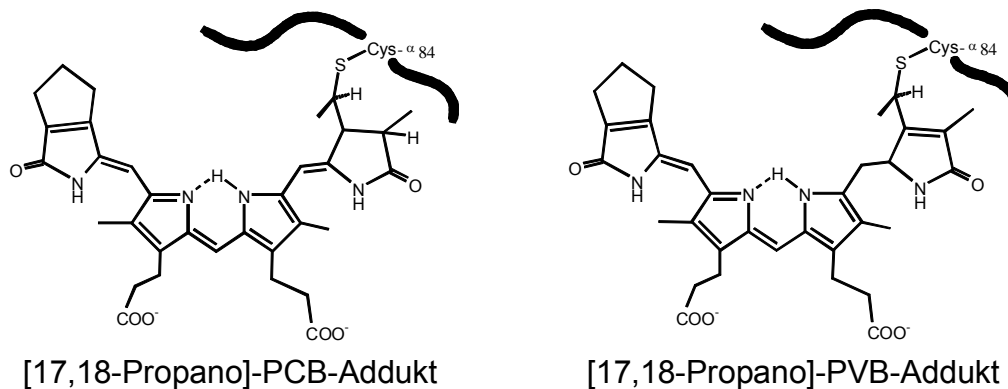


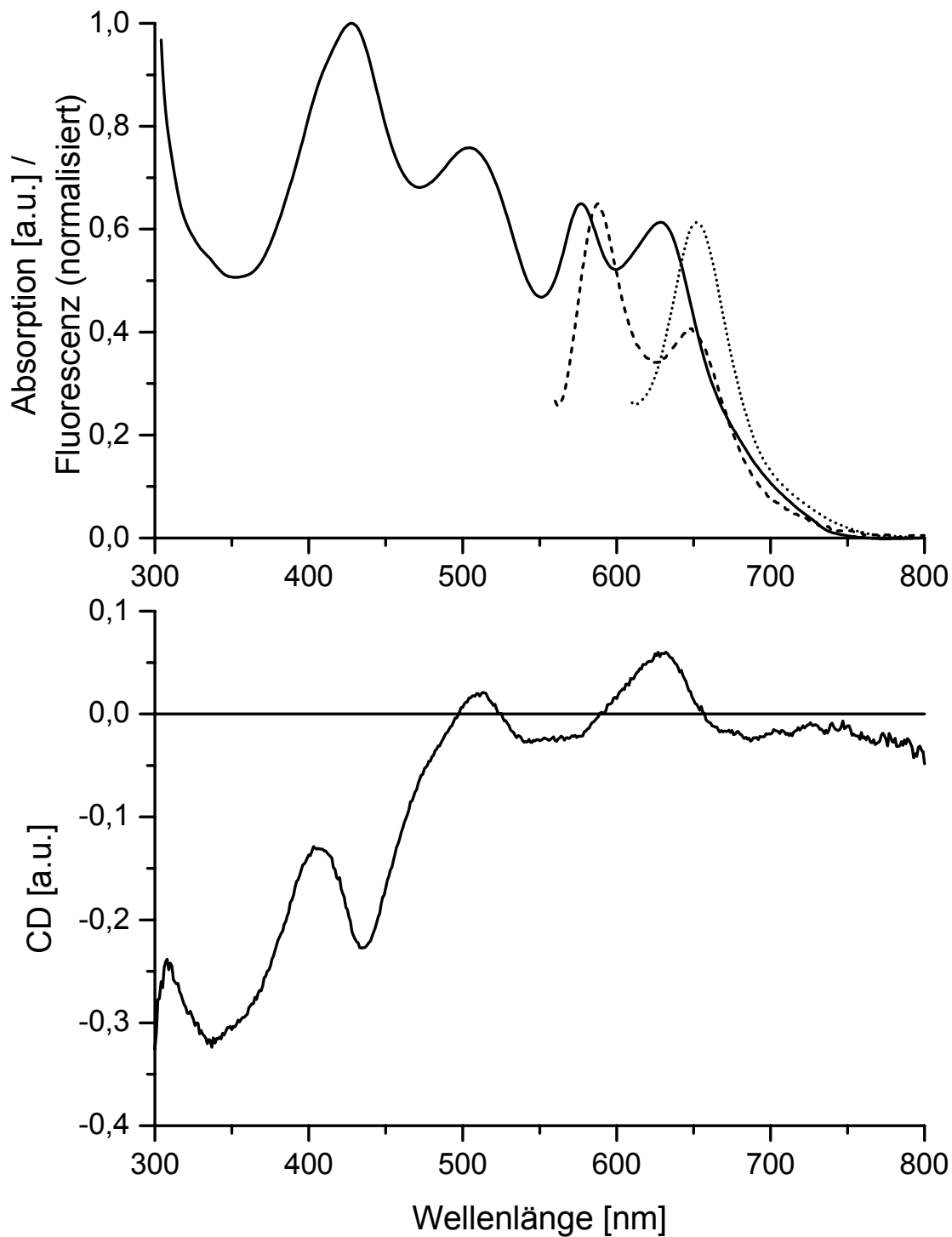
Abbildung 3-64:

Strukturformeln der Addukte, die während der autokatalytischen bzw. enzymatische Rekonstitution von 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-PCB) mit His₆-PecA als Hauptprodukte entstehen.

Durch Vergleich des photochemischen Verhaltens des PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukts mit dem des α-PEC und des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts konnten Erkenntnisse über mögliche Mechanismen der Photochemie dieser Chromoproteine gewonnen werden, was im Abschnitt 4.2 ausführlich diskutiert wird.

Rekonstitutionen mit 2_{PΦB} (18¹,18²-Epoxy-Phycocyanobilin)

Auch mit dem zweiten Nebenprodukt der Phytochromobilindarstellung, dem 2_{PΦB}, wurden Rekonstitutionsversuche unternommen. Für 2_{PΦB} wurde die Struktur 18¹,18²-Epoxy-Phycocyanobilin (18¹,18²-Epoxy-PCB; Abbildung 3-7) angenommen, die aufgrund der NMR- und Absorptionsspektren als die wahrscheinlichste Struktur erschien. Der Chromophor 2_{PΦB} wurde in autokatalytischen und enzymatischen Rekonstitutionen eingesetzt. Es kam zu einer Chromophorbindung, wobei keine deutlichen spektralen Unterschiede zwischen autokatalytischer und enzymatischer Rekonstitution zu erkennen waren. Im Gegensatz zu 1_{PΦB} ([17,18-Propano]-PCB) ist 2_{PΦB} (18¹,18²-Epoxy-PCB) demnach kein Substrat der Lyase-Isomerase PecE/PecF.

**Abbildung 3-65:**

Absorptions-, Fluoreszenz- und CD-Spektren der Produkte aus der autokatalytischen Rekonstitution von His₆-PecA mit 2_PΦB nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer.

Oben: Absorptionsspektrum (—) und Fluoreszenzspektren mit Excitation bei 540 nm (-----) und 590 nm (·····). Die Fluoreszenzmaxima sind auf die korrespondierenden Absorptionsmaxima normiert.

Unten: CD-Spektrum

Das Absorptionsspektrum (Abbildung 3-65) der Produkte der Rekonstitutionen mit $2_{P\Phi B}$ unterschied sich deutlich von den Spektren aller vorhergegangenen Rekonstitutionen. Es sind vier deutliche Maxima zu erkennen, die bei 428 nm, 504 nm, 577 nm und 629 nm liegen. Das Maximum bei 428 nm weist zusätzlich eine Schulter bei ca. 405 nm auf. Die Intensitätsunterschiede der einzelnen Maxima sind dabei nicht sehr ausgeprägt, die Absorptionen liegen zwischen 0,6 und 1,0. Die Rekonstitutionsprodukte wurden verschiedenen Belichtungszyklen unterworfen. Es wurde bei 430 nm, 500 nm, 577 nm und 639 nm belichtet. Dabei konnte keine reversible Photochemie, sondern lediglich ein Ausbleichen der Rekonstitutionsprodukte beobachtet werden. Die vier Absorptionsmaxima dürften daher von vier verschiedenen Addukten stammen. Die Schulter bei 405 nm könnte von einem fünften Addukt oder aber vom kurzwelligen Maximum des Addukts mit $\lambda_{max} = 629$ nm stammen.

Die Rekonstitutionsprodukte zeigen eine ausgeprägte Fluoreszenz, was darauf hinweist, dass die Chromophore gestreckt in die Bindungstasche eingelagert sind. Die Fluoreszenz wurde nur im langwelligen Bereich gemessen, wobei Fluoreszenzmaxima bei 588 nm und 652 nm auftraten. Diese beiden Fluoreszenzen stammen von den zwei verschiedenen Addukten mit den Maxima bei 577 nm und 629 nm. Im CD-Spektrum sind Maxima bzw. Minima bei 403 nm, 435 nm, 509 nm und 630 nm zu erkennen. Damit zeigen alle Absorptionsmaxima (bis auf $\lambda_{max} = 577$ nm) und die Schulter bei 405 nm ein Signal im CD-Spektrum.

Bei der Rekonstitution von His₆-PecA mit $2_{P\Phi B}$ (18¹,18²-Epoxy-PCB) wurde der Chromophor autokatalytisch gebunden. Die Lyase-Isomerase hatte dabei keinen Einfluss auf die Chromophorbindung. Es entstanden mindestens vier verschiedene Addukte, die über einen weiten Wellenlängenbereich (400 nm - 650 nm) absorbierten. Beim Addukt mit dem Absorptionsmaximum von 629 nm dürfte es sich um das His₆-PecA- $2_{P\Phi B}$ -Addukt (18¹,18²-Epoxy-PCB-Addukt) handeln, da es im selben Wellenlängenbereich wie das PCB-Addukt absorbiert. Die anderen Addukte müssten durch Isomerisierung bzw. Oxidierung des Chromophors während der Bindung entstanden sein, wodurch sich das konjugierte π -System des Chromophors verkleinert hat.

Die Rekonstitutionsprodukte waren, ebenso wie die Produkte aus den Rekonstitutionen mit P Φ B, sehr instabil. Eine intensive Untersuchung der Addukte wäre schwierig gewesen. Da die Addukte keine Photochemie zeigten, die Lyase-Isomerase keinen Einfluss auf die Chromophorbindung hatte und die Struktur des Chromophors $2_{P\Phi B}$ nicht eindeutig geklärt war, wurde auf eine eingehende Untersuchung der Rekonstitutionsprodukte verzichtet.

3.4.9 Rekonstitutionen der Apoprotein-Mutante His₆-PecA-C84S

Die Mutante His₆-PecA-C84S, bei der das Cystein 84, an das der Chromophor kovalent gebunden ist, gegen ein Serin ausgetauscht ist, wurde aus mehreren Gründen hergestellt. Zum einen sollte untersucht werden, ob sich ein Chromophor auch ohne kovalente Bindung in die Bindungstasche einlagern kann. Es sind zwar keine Biliproteine aus Phycobilisomen bekannt, die nicht-kovalent gebundene Chromophore besitzen, jedoch wurde vor kurzem ein Phytochrom aus dem Cyanobakterium *Calothrix* sp. PCC 7601 beschrieben, das anstatt eines Cysteins ein Leucin an der Chromophorbindungsstelle besitzt. Dieses Phytochrom CphB, das PΦB und PCB nicht-kovalent bindet, zeigt die selbe Photochemie wie Phytochrome mit kovalent gebundenen Chromophoren (Jorissen *et al.* 2002b). Es wurde auch eine Mutante eines Apo-Phytochroms aus Hafer hergestellt, bei der das chromophorbundene Cystein gegen Leucin ausgetauscht wurde. Dieses rekombinante Apo-Phytochrom konnte PCB und Biliverdin nicht-kovalent binden und zeigte eine dem nativen Phytochrom vergleichbare Photochemie (Jorissen *et al.* 2002a). Zum anderen sollte anhand der Mutanten His₆-PecA-C84S getestet werden, ob die Lyase-Isomerase PecE/PecF die Isomerisierung des PCB zum PVB unabhängig von einer kovalenten Bindung des Chromophors katalysieren kann. Dazu sollte die Mutante His₆-PecA-C84S zusammen mit PecE/PecF und PCB inkubiert werden.

Das rekombinante Protein His₆-PecA-C84S hatte ähnlich gute Expressionsraten in *E. coli* wie His₆-PecA und konnte durch Zellaufschluss mittels Ultraschall zu 90 % in Lösung gebracht werden. Es wurden autokatalytische Rekonstitutionen mit His₆-PecA-C84S und PCB sowie enzymatische Rekonstitutionen mit His₆-PecA-C84S, His₆-PecE, His₆-PecF und PCB durchgeführt. Es zeigte sich dabei immer das selbe Ergebnis: Während der Inkubation der Rekonstitutionsansätze kam es zu keinen spektralen Verschiebungen. Es trat lediglich ein Ausbleichen des Chromophors auf und nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung konnten keine farbigen Proteine detektiert werden. Wurden die freien Chromophore nach der Inkubation aus dem Rekonstitutionsansatz isoliert, so konnte nur PCB in größeren Mengen nachgewiesen werden. Daneben gab es einige andere Chromophore, die jedoch nur in Spuren vorkamen und bei denen es sich um Oxidationsprodukte handeln müsste. Ein Chromophor, bei dem es sich um PVB handeln könnte, konnte nicht nachgewiesen werden.

Es kam also zu keiner Einlagerung des PCB in die Bindungstasche des rekombinanten Apoproteins His₆-PecA-C84S, die aufgrund der Konformationsänderung des Chromophors mit deutlichen spektralen Veränderungen einhergehen müsste. Eine kovalente Bindung des Chromophors und somit das Cystein 84 ist also für die Funktion des α-PEC als

Chromoprotein essentiell. Eine Mutation des Cystein 84, das in den Biliproteinen der Phycobilisomen hochkonserviert ist (Bryant 1994, Apt *et al.* 1995), führt zu einem nicht funktionellen Biliprotein.

Bei der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA-C84S konnte daneben kein Einfluss der Lyase-Isomerase auf den freien Chromophor festgestellt werden. Die Isomerisierung des PCB zum 3¹-Cys-PVB kann also von der Lyase-Isomerase nur während der kovalenten Bindung des Chromophors katalysiert werden. Auch für die Funktion der Lyase-Isomerase ist daher das Cystein 84 des Apoproteins notwendig.

3.4.10 Rekonstitutionen der Apoprotein-Mutanten His₆-PecA-C98S, His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S-C99S

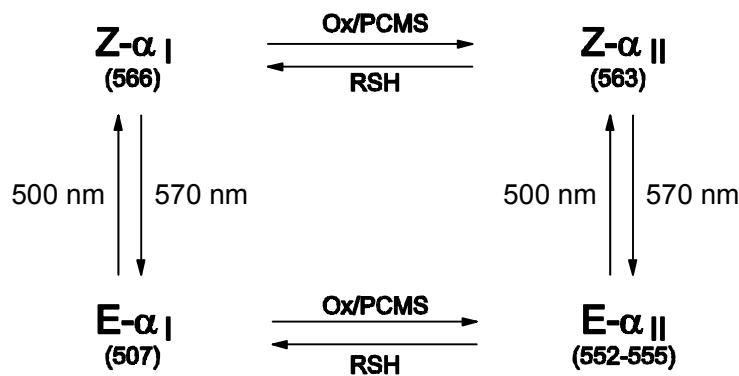
Das α -PEC weist eine ausgeprägte Photochemie auf. Diese Photochemie beruht hauptsächlich auf der Isomerisierung des Chromophors. Zusätzlich wird die Photochemie durch den Redoxzustand von zwei Cysteinen (Cys- α -98, Cys- α -99), die 1,7 nm vom chromophorbindenden Cys- α -84 entfernt liegen, moduliert. Es existieren demnach vier verschiedenen absorbierende photochemische Zustände des α -PEC, die zum einen von der Konfiguration (Z- oder E- Konfiguration) des Chromophors, zum anderen vom Redoxzustand der SH-Gruppen von Cys-98 und Cys-99 abhängen (Zhao & Scheer 1995, Zhao *et al.* 1995). Liegen diese SH-Gruppen reduziert vor, wie im nativen α -PEC, so wird die Photochemie als Typ I bezeichnet. Dabei absorbieren die beiden Formen der Photochemie Z- α _I³ mit einem Maximum bei 566 nm und E- α _I mit einem Maximum bei 507 nm deutlich unterschiedlich. Sind die SH-Gruppen dagegen oxidiert oder wurde PCMS, ein Quecksilbersalz, an die SH-Gruppen gebunden, so spricht man von Photochemie Typ II. Dabei liegen die Absorptionsmaxima der beiden Formen Z- α _{II} mit 563 nm und E- α _{II} mit 553-555 nm nahe zusammen, wobei die Extinktion von E- α _{II} deutlich geringer ist. Die Photochemie des α -PEC ist schematisch in Abbildung 3-66 dargestellt.

³ Die Bezeichnungen der 4 verschiedenen Formen der Photochemie setzen sich folgendermaßen zusammen:

Z bzw. E: Δ 15,16-Z- bzw. Δ 15,16-E-Konfiguration des Chromophors 3¹-Cys-PVB;

α _I: reduzierte SH-Gruppen von Cys- α -98, Cys- α -99 (Photochemie Typ I)

α _{II}: oxidierte bzw. PCMS-bindende SH-Gruppen von Cys- α -98, Cys- α -99 (Photochemie Typ II).

**Abbildung 3-66:**

Die vier stabilen Zustände des α -PEC, die sich paarweise durch Photoisomerisierung des Chromophors und durch Modifikation von Cys- α -98 und Cys- α -99 unterscheiden (Zhao & Scheer 1995).

Die spektralen Unterschiede der Photochemie Typ II, bei der PCMS an ein oder beide Cysteine 98, 99 gebunden ist, zur Photochemie Typ I, könnten darauf zurückzuführen sein, dass durch die Bindung des großen PCMS-Moleküls die Konformation und Beweglichkeit des Proteins verändert wird. Dadurch könnte es zu Veränderungen in der Proteinumgebung des Chromophors und/oder zu einer Änderung der Beweglichkeit des Chromophors kommen, was zu einer Absorptionsänderung führt.

Es wurden im Apoprotein His₆-PecA eines bzw. beide Cysteine 98, 99 gegen Serin ausgetauscht. Dabei wurde bei His₆-PecA-C98S das Cystein 98, bei His₆-PecA-C99S das Cystein 99 und bei His₆-PecA-C98S-C99S beide Cysteine gegen Serin ausgetauscht. Durch die Rekonstitution dieser Apoprotein-Mutanten und deren photochemisches Verhalten sollten weitere Einblicke in die Mechanismen der Photochemie des α -PEC gewonnen werden.

Die Expression der Mutanten in *E. coli* war ähnlich gut wie die Expression von His₆-PecA. Allerdings konnten, wie in Abschnitt 3.3.4 bereits angesprochen, die Proteine durch Behandlung mit Ultraschall allein nicht in Lösung gebracht werden. Erst durch Zugabe des Detergens Triton X-100 vor Aufschluss der *E. coli*-Zellen löste sich ein Teil der Proteine. Diese Lysate wurden dann mit PCB rekonstituiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Ausbeuten an rekonstituierten Proteinen waren dabei gerade ausreichend, um UV/Vis-Spektren aufzunehmen.

Autokatalytische Rekonstitutionen

Zunächst wurden autokatalytische Rekonstitutionen mit den Apoprotein-Mutanten und dem Chromophor PCB durchgeführt. Dafür wurden die Lysate aus dem Aufschluss eines Liters Expressionskultur mit 750 µg PCB, gelöst in DMSO, versetzt. An alle drei Mutanten band der Chromophor autokatalytisch. Nach der Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer wurden Absorptionsspektren der Rekonstitutionsprodukte aufgenommen. Dabei waren die Rekonstitutionsprodukte aus jeweils einem Liter Expressionskultur der drei verschiedenen Mutanten in der selben Menge Puffer gelöst.

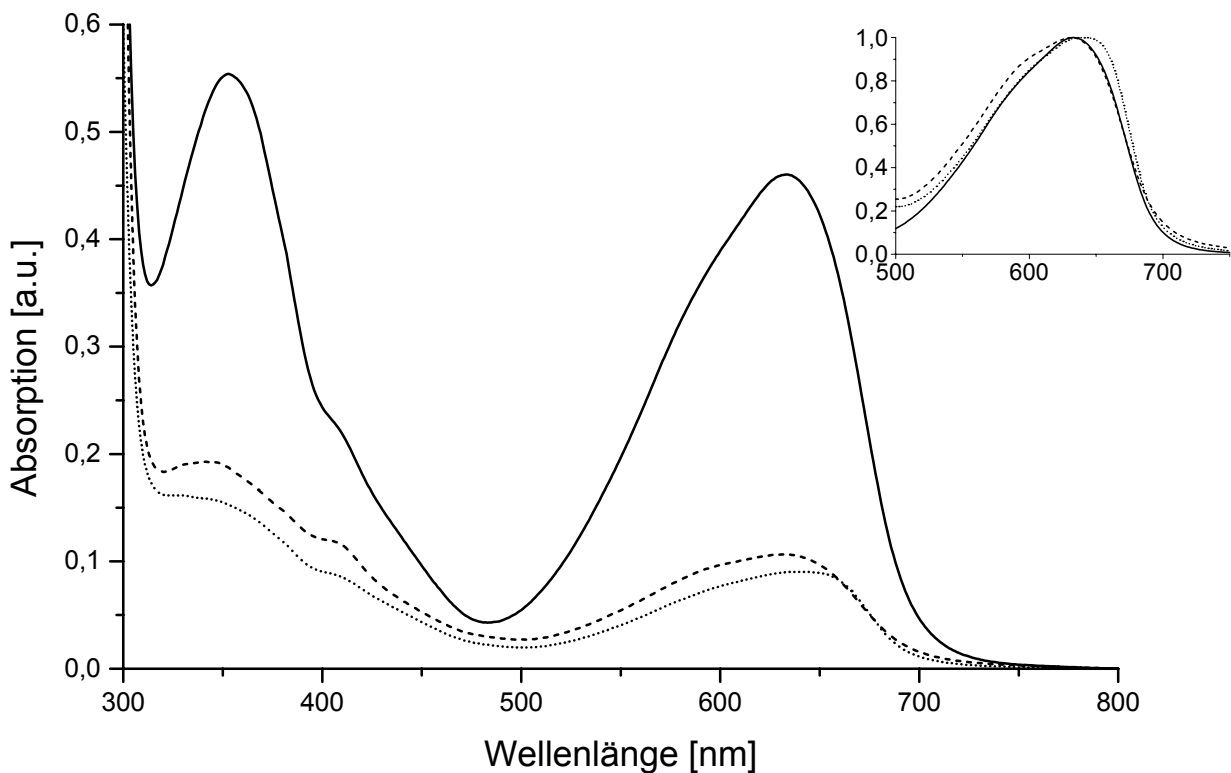


Abbildung 3-67:

Absorptionsspektren der autokatalytisch mit PCB rekonstituierten Apoprotein-Mutanten His₆-PecA-C98S (—), His₆-PecA-C99S (-----) und His₆-PecA-C98S-C99S (·····). Rechts oben sind die Spektren auf ihre langwelligen Maxima normiert dargestellt. Die Spektren wurden nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer aufgenommen.

Die Ausbeute an Rekonstitutionsprodukt war bei der Mutante His₆-PecA-C98S etwa 3 mal besser als bei His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S-C99S. Ob dies auf ein unterschiedliches Verhalten der Proteine bei der Chromophorbinding oder auf eine unterschiedliche Löslichkeit der Proteine zurückzuführen ist, kann nicht beurteilt werden. Auch die Form der Absorptionsspektren der drei rekonstituierten Mutanten sind unterschiedlich.

Die Mutanten His₆-PecA-C98S und His₆-PecA-C99S weisen ein Absorptionsmaximum bei 632 nm auf, das vom PCB-Addukt stammt und das demnach ca. 10 nm kurzwelliger als das PCB-PecA-Addukt absorbiert. Daneben ist bei beiden Mutanten eine Schulter bei 570 nm zu erkennen, die vom PVB-Addukt stammen dürfte. Bei den Spektren der beiden Mutanten ist das Verhältnis von kurzwelligem zu langwelligem Maximum kleiner als 1. Dieser geringe Wert für das Verhältnis der Maxima und die kurzwellige Verschiebung der Absorption des PCB-Addukts der Mutanten im Vergleich zum PCB-PecA-Addukt zeigen, dass der Chromophor in den Mutanten eine andere, wahrscheinlich eine weniger gestreckte Konformation einnimmt als im PCB-PecA-Addukt. Dies wiederum bedeutet, dass der Austausch eines der Cysteine die Konformation der Mutanten deutlich beeinflusst hat.

Auch bei der Mutante His₆-PecA-C98S-C99S weist das Verhältnis von kurzwelligem zu langwelligem Maximum einen Wert unter 1 auf. Auch hier dürfte es zu einer Änderung der Konformation des Proteins durch den Austausch der beiden Cysteine gekommen sein. Jedoch besitzt das Absorptionsspektrum neben dem Maximum bei 638 nm und einer kleinen Schulter bei 570 nm eine deutliche Schulter bei 660 nm, die von einem MBV-Addukt stammen müsste, das bei dieser Doppelmutante neben dem PCB-Addukt und dem PVB-Addukt in größeren Mengen entstanden ist. Bei den beiden anderen Mutanten ist keine Schulter bei 660 nm zu erkennen. Es sind also bei His₆-PecA-C98S und His₆-PecA-C99S im Gegensatz zur Doppelmutante His₆-PecA-C98S-C99S keine MBV-Addukte in nennenswerten Mengen entstanden. Dies bedeutet, dass es zwischen den Mutanten mit nur einem ausgetauschten Cystein und der Doppelmutanten Unterschiede in der Proteinkonformation geben muss, die Unterschiede bei der Chromophorbindung mit sich bringen.

Die Photochemie

Die Schultern bei 570 nm in den Absorptionsspektren der rekonstituierten Mutanten weisen darauf hin, dass PVB-Addukte entstanden sind, die photochemisch aktiv sein könnten. Um zu überprüfen, ob eine Photochemie induziert werden kann, wurden die Rekonstitutionsansätze bei 500 nm und 577 nm belichtet.

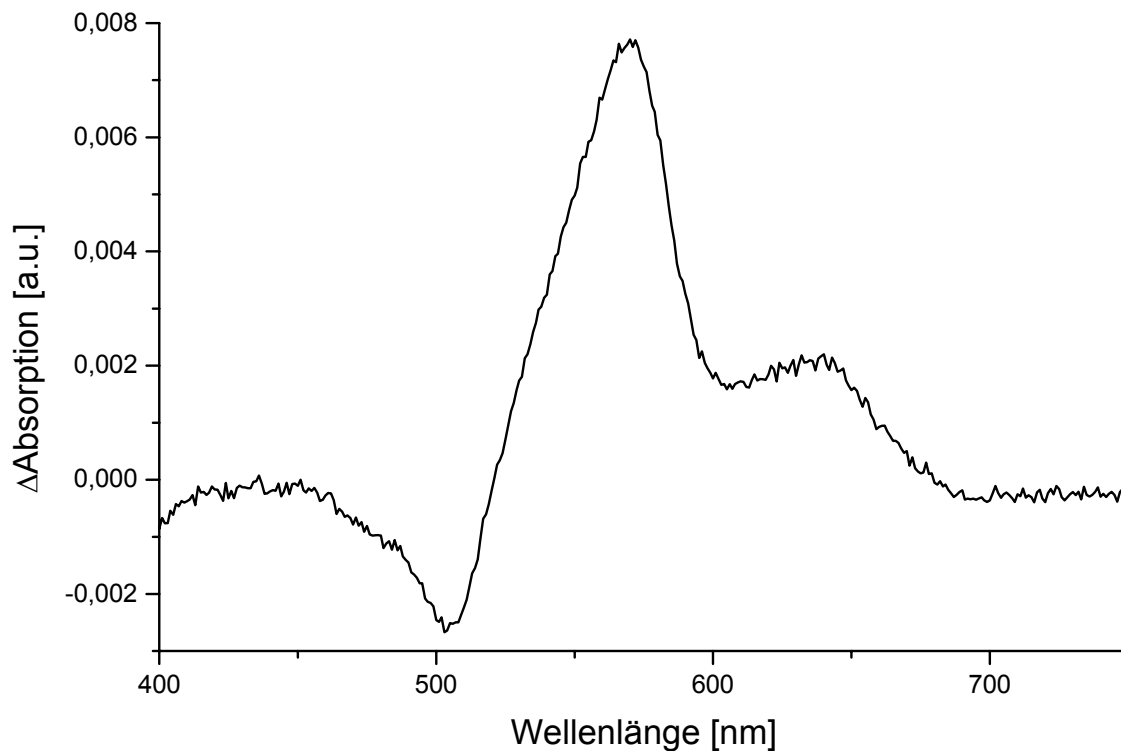


Abbildung 3-68:

Differenzspektrum der Absorptionen des Rekonstitutionsprodukts von His₆-PecA-C98S und PCB nach Belichtung bei 500 nm *minus* Belichtung bei 577 nm.

Bei den Rekonstitutionsprodukten aller drei Mutanten konnte eine Photochemie induziert werden, die jeweils ähnliche Absorptionsdifferenzspektren aufwies. In Abbildung 3-68 ist exemplarisch das Differenzspektrum der Photochemie von autokatalytisch mit PCB rekonstituiertem His₆-PecA-C98S dargestellt. Die Differenzspektren wiesen Minima bei 505 nm und Maxima bei ca. 570 nm auf und waren damit den Absorptionsdifferenzspektren aus der Photochemie von rekonstituiertem und nativem α -PEC sehr ähnlich. Die $\Delta\Delta A$ -Werte lagen dabei zwischen 2 und 3 % (bezogen auf das Maximum bei 632 nm bzw. 638 nm) und waren damit vergleichbar hoch wie bei der autokatalytischen Rekonstitution von His₆-PecA mit PCB. Die Maxima bei ca. 635 nm können auf ein Ausbleichen des PCB-Addukts während der Belichtung zurückgeführt werden. Die Tatsache, dass bei den rekonstituierten Mutanten eine Photochemie induziert werden konnte, die dem des PVB-PecA-Addukts gleicht, zeigt, dass es auch bei den Mutanten während der Bindung des PCB zu einer Isomerisierung des Chromophors zum 3¹-Cys-PVB kommt. Diese PVB-Addukte sind trotz Austausch eines oder beider Cysteine 98, 99 zu einer Photochemie fähig.

Enzymatische Rekonstitution von His₆-PecA-C98S, His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S-C99S

Für die enzymatische Rekonstitution wurden die Lysate, die durch Aufschluss mit Triton X-100 eines Liters *E. coli*-Expressionskultur der Apoprotein-Mutanten gewonnen wurden, mit den Lysaten von 0,66 Liter PecE- und 1 Liter PecF-Expressionskultur versetzt. Es wurden 750 µg in DMSO gelöstes PCB zum Ansatz gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer wurden Absorptionsspektren aufgenommen.

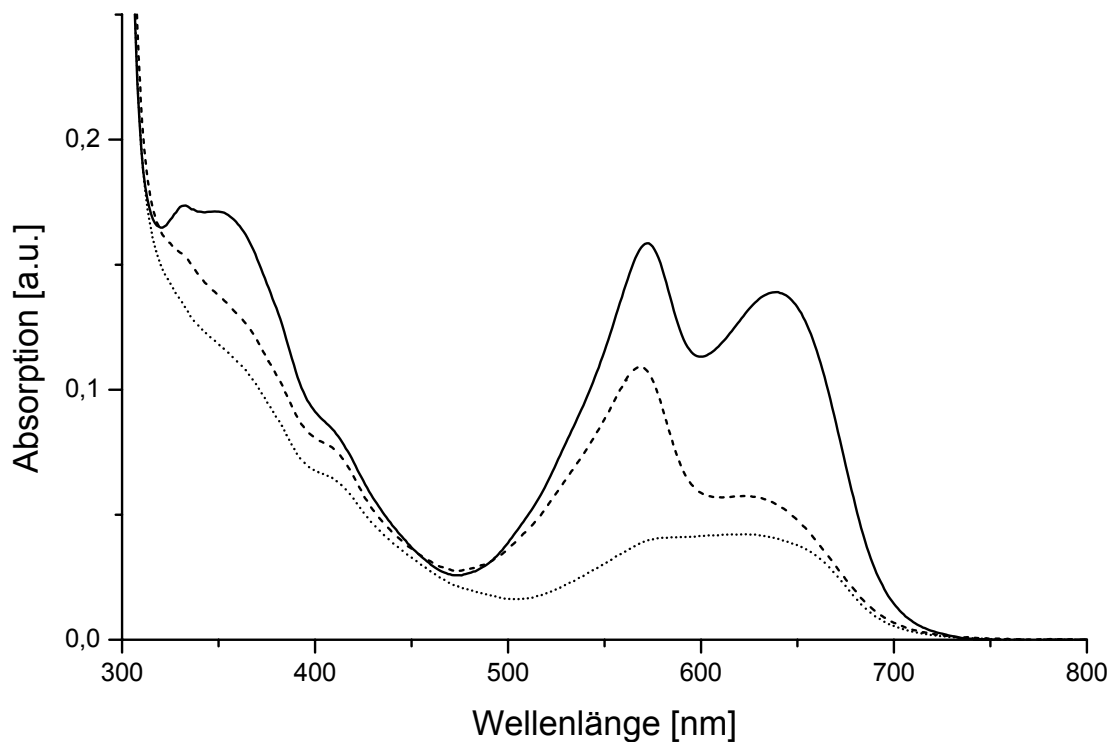


Abbildung 3-69:

Absorptionsspektren der enzymatisch mit PCB rekonstituierten Apoprotein-Mutanten His₆-PecA-C98S (—), His₆-PecA-C99S (-----) und His₆-PecA-C98S-C99S (.....). Die Spektren wurden nach affinitätschromatographischer Aufreinigung und Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer aufgenommen.

Bei allen drei Mutanten wurde durch die Lyase-Isomerase die Bildung des PVB-Addukts katalysiert. Allerdings war diese Katalyse unterschiedlich deutlich ausgeprägt.

Bei der enzymatischen Rekonstitution der drei Mutanten entstand bei His₆-PecA-C98S, wie auch bei der autokatalytischen Rekonstitution, die größte Menge an Rekonstitutionsprodukt. Dabei wurde nur etwas mehr PVB-Addukt mit einem Absorptionsmaximum bei 572 nm als PCB-Addukt mit einem Absorptionsmaximum bei 635 nm gebildet. Bei der enzymatischen Rekonstitution der Mutante His₆-PecA-C99S wurde ähnlich viel PVB-Addukt ($\lambda_{\max} = 569$ nm) wie bei His₆-PecA-C98S gebildet, PCB-Addukt ($\lambda_{\max} = 632$ nm) dagegen deutlich weniger. Das Absorptionsspektrum der Rekonstitutionsprodukte der Doppelmutante His₆-PecA-C98S-C99S dagegen zeigt kein deutliches Maximum, die Absorptionen bei 570 nm und 640 nm sind in etwa gleich ausgeprägt. Bei 660 nm ist eine deutliche Schulter zu erkennen. Das lässt darauf schließen, dass etwa gleich viel PVB-Addukt und PCB-Addukt gebildet wird. Daneben scheinen, wie bei der autokatalytischen Rekonstitution von His₆-PecA-C98S-C99S, deutliche Mengen an MBV-Addukt entstanden zu sein. Im Vergleich zu den beiden anderen Mutanten wird jedoch deutlich weniger PVB-Addukt gebildet.

Es wurde das photochemische Verhalten dieser Rekonstitutionsprodukte getestet, indem sie dem Belichtungszyklus 500 nm - 577 nm - 500 nm ausgesetzt wurden. Zunächst wurden die Produkte direkt nach der Dialyse gegen Rekonstitutionspuffer belichtet, was zur Photochemie Typ I führte. Anschließend wurde nach Zugabe eines zum PVB-Addukt 40fachen molaren Überschusses an PCMS belichtet, um zu testen, ob bei den Cystein-Mutanten eine Photochemie Typ II, wie beim rekonstituierten und nativen α -PEC, induziert werden kann.

In den Abbildungen 3-70 bis 3-72 stimmen die Skalen der Spektren überein, um diese gut vergleichen zu können. Die Spektren der beiden Formen der Photochemie, aus denen auch die Absorptionsdifferenzspektren ermittelt wurden, wurden nach folgenden Belichtungszyklen aufgenommen:

kurzwellige Form: 10 min bei 500 nm - 10 min bei 577 nm

langwellige Form: 10 min bei 500 nm - 10 min bei 577 nm -10 min bei 500 nm

Photochemie von enzymatisch rekonstituiertem His₆-PecA-C98S

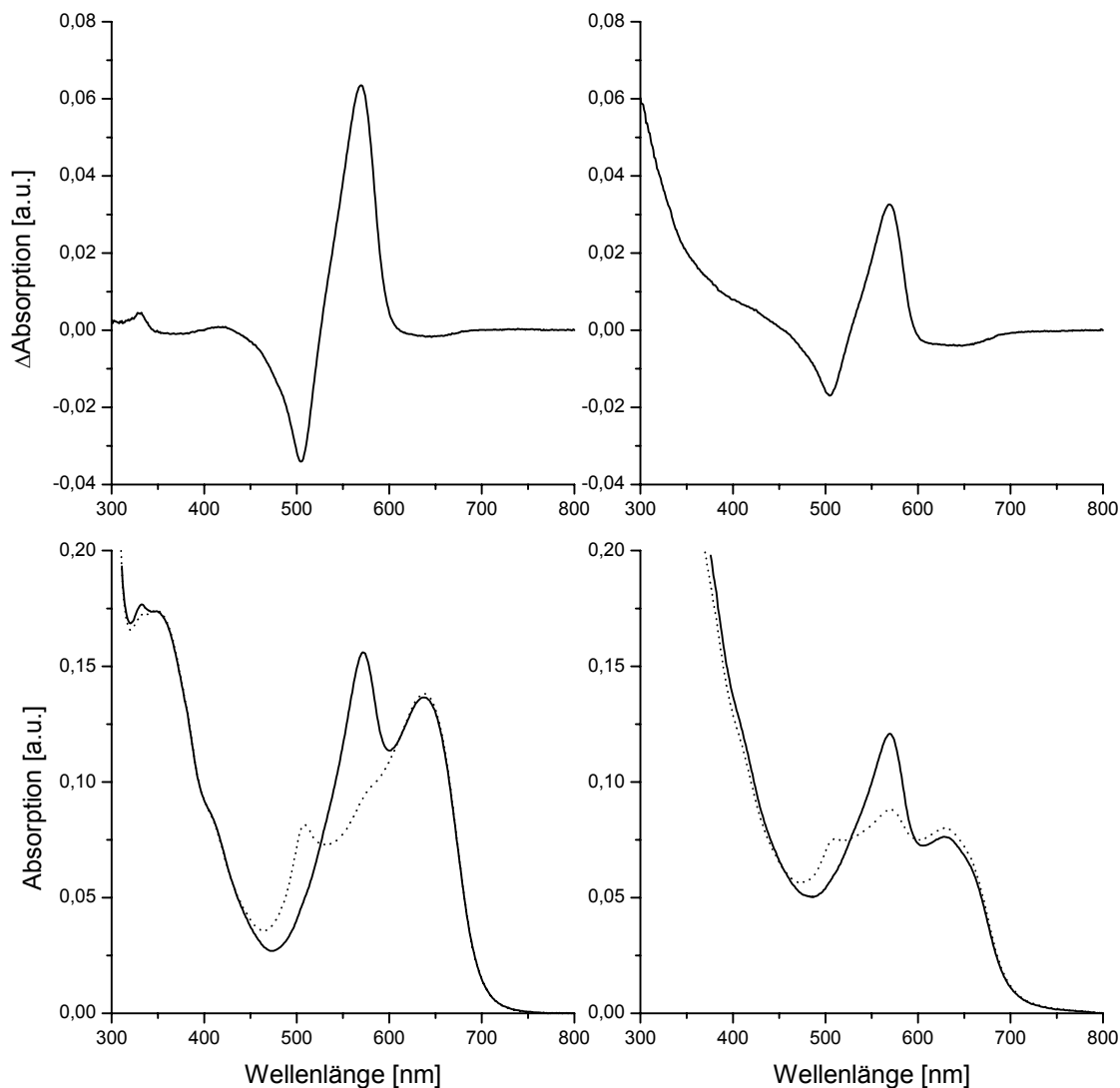


Abbildung 3-70:

Absorptionsspektren des Produkts der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA-C98S, His₆-PecE, His₆-PecF und PCB vor (links) und nach (rechts) Zugabe von PCMS.

Oben: Absorptionsdifferenzspektren (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Unten: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (-----).

Das His₆-PecA-C98S-PVB-Addukt zeigte eine ausgeprägte Photochemie Typ I, die allerdings mit einem $\Delta\Delta A_{506/570}$ -Wert von 63 % etwas geringer ausfällt, als die Photochemie von rekonstituiertem α -PEC mit einem $\Delta\Delta A_{507/566}$ -Wert von etwa 100 %. Die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie, die aus dem Differenzabsorptionsspektrum ermittelt wurden, liegen bei 506 nm und 570 nm. Damit absorbiert die langwellige Form des His₆-PecA-C98S-PVB-Addukts um 4 nm rotverschoben im Vergleich zum nativen und

rekonstituierten α -PEC. Dies bedeutet, dass beim His₆-PecA-C98S-PVB-Addukt durch den Austausch des Cysteins 98 die Struktur soweit verändert wurde, dass zum einen der Chromophor, wie bei einer partiellen Denaturierung, etwas langwelliger absorbiert, zum anderen zeigt der geringe $\Delta\Delta A$ -Wert auch, dass die photochemische Aktivität durch die Mutation schwächer wurde.

Nach Zugabe von PCMS kam es zunächst zu einer starken Trübung des Ansatzes, die hauptsächlich auf einer Präzipitation der Lyase-Isomerase-Untereinheiten PecE und PecF zurückgeführt werden konnte. Jedoch wurde auch ein geringer Teil des His₆-PecA-C98S-PVB-Addukts und etwa die Hälfte des His₆-PecA-C98S-PCB-Addukts ausgefällt. Eine starke Präzipitation des PCB-Addukts konnte auch schon bei der PCMS-Behandlung des His₆-PecA-PCB-Addukts beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.4.1). Vor der Belichtung und der Aufnahme der Spektren wurde der Ansatz zentrifugiert, wodurch die Trübung weitgehend entfernt werden konnte.

Das His₆-PecA-C98S-PVB-Addukt zeigt auch nach PCMS-Zugabe immer noch Photochemie Typ I, wobei die Maxima der beiden Formen der Photochemie nach wie vor bei 506 nm und 570 nm liegen. Allerdings ist der $\Delta\Delta A_{506/570}$ -Wert von 63 % auf 40 % zurückgegangen. Dies bedeutet, dass sich die Bindung des PCMS an das nicht ausgetauschte Cystein 99 nicht auf die Absorption des Proteins auswirkt, sich jedoch dadurch die Konformation des Proteins soweit ändert, dass die photochemische Aktivität von His₆-PecA-C98S-PVB-Addukt weiter abgeschwächt wird. Eventuell könnte durch die PCMS-Zugabe auch eine Photochemie entstanden sein, die eine Mischform aus Photochemie Typ I und Typ II darstellt. Auch dadurch würde die Bildung der 506 nm-Form der Photochemie verringert werden, was ebenfalls zu einem Rückgang des $\Delta\Delta A$ -Werts führen würde.

Photochemie von enzymatisch rekonstituiertem His₆-PecA-C99S

Die Photochemie des His₆-PecA-C99S-PVB-Addukts vor PCMS-Zugabe ist der Photochemie des His₆-PecA-C98S-PVB-Addukts sehr ähnlich. Die Maxima der beiden Formen der Photochemie liegen bei 506 nm und 569 nm. Die langwellige Form absorbiert also auch etwas langwelliger als beim nativen α -PEC. Auch der $\Delta\Delta A_{506/569}$ -Wert ist mit 66 % ähnlich hoch wie beim His₆-PecA-C98S-PVB-Addukt. Daraus könnte man schließen, dass die Konformation der PVB-Addukte der beiden Cystein-Mutanten ähnlich sein sollte.

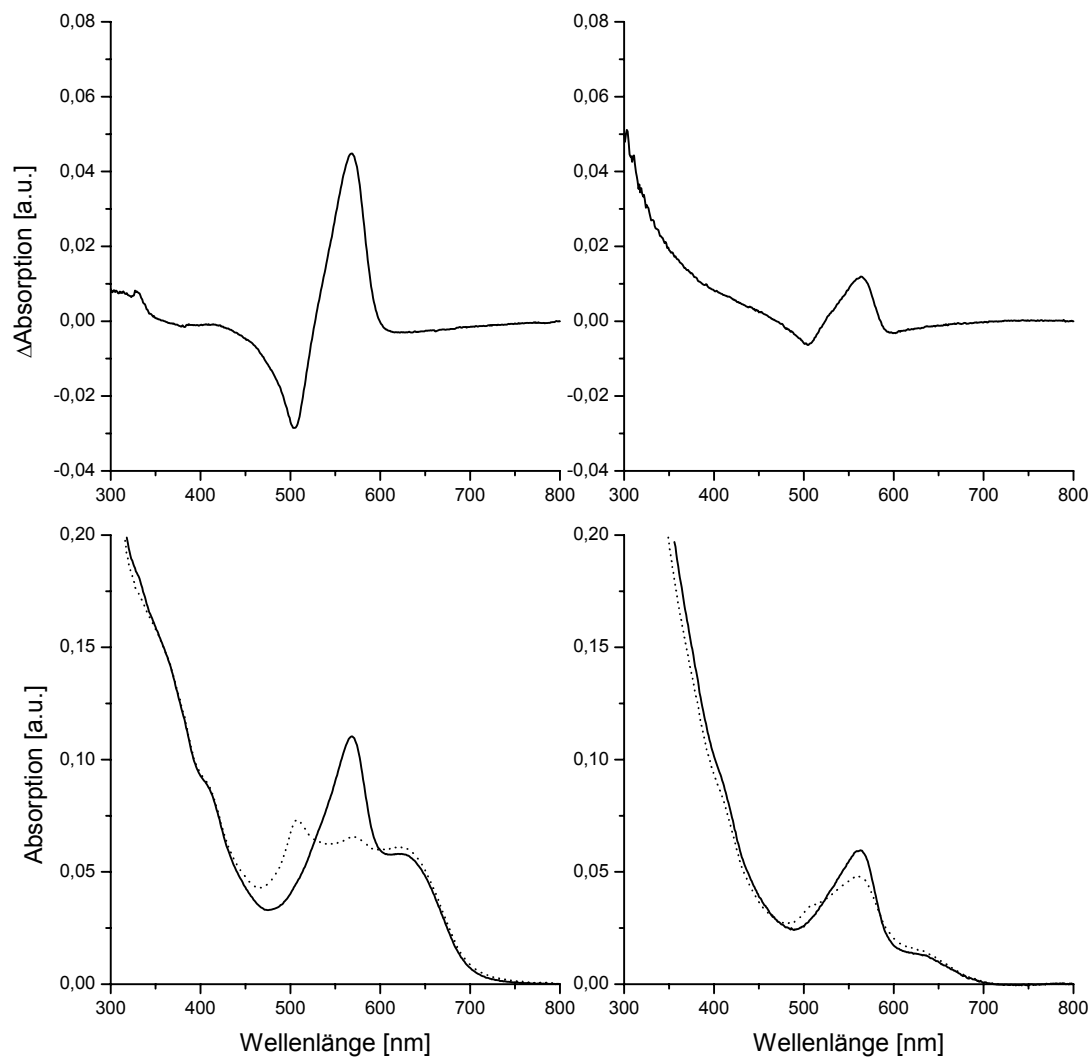


Abbildung 3-71:

Absorptionsspektren des Produkts der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA-C99S, His₆-PecE, His₆-PecF und PCB vor (links) und nach (rechts) Zugabe von PCMS.

Oben: Absorptionsdifferenzspektren (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm). Unten: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (-----).

Nach der Zugabe von PCMS kam es auch im Ansatz des rekonstituierten His₆-PecA-C99S zu einer starken Trübung, der daher ebenfalls vor Belichtung und Spektroskopie zentrifugiert wurde. Es zeigten sich nach der Zugabe von PCMS größere Unterschiede in den Spektren zwischen den PVB-Addukten von His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S. So ging die Absorption durch die Zugabe des Quecksilbersalzes um annähernd die Hälfte zurück. Zwar zeigte sich auch hier nach wie vor eine Photochemie Typ I, jedoch haben sich die Maxima der beiden Formen der Photochemie durch die PCMS-Zugabe von 506 nm auf 504 nm und deutlicher von 569 nm auf 563 nm verschoben. Der $\Delta\Delta A_{504/563}$ -Wert sank um die Hälfte auf 31 %. Auch ist die Photochemie Typ I bei His₆-PecA-C99S nach PCMS-Zugabe deutlich schwächer ausgeprägt als bei His₆-PecA-C98S. Die Form des Absorptionsdifferenz-

spektrums weist darauf hin, dass His₆-PecA-C99S nach PCMS-Zugabe neben der Photochemie Typ I zum Teil auch eine Photochemie Typ II zeigt.

Das His₆-PecA-C99S-PVB-Addukt und das His₆-PecA-C98S-PVB-Addukt reagieren auf PCMS-Zugabe unterschiedlich. Beide zeigen zwar noch eine, wenn auch abgeschwächte, Photochemie Typ I. Allerdings kommt es beim His₆-PecA-C99S-PVB-Addukt durch die PCMS-Zugabe zu einer deutlichen Verschiebung der Absorptionsmaxima und zu einer verstärkten Denaturierung des Proteins. Vor der PCMS-Zugabe weisen beide Mutanten eine ähnliche Absorption auf und sollten damit eine ähnliche Konformation besitzen. Nach PCMS-Zugabe unterscheiden sich dagegen die Eigenschaften der beiden Mutanten.

Photochemie von enzymatisch rekonstituiertem His₆-PecA-C98S-C99S

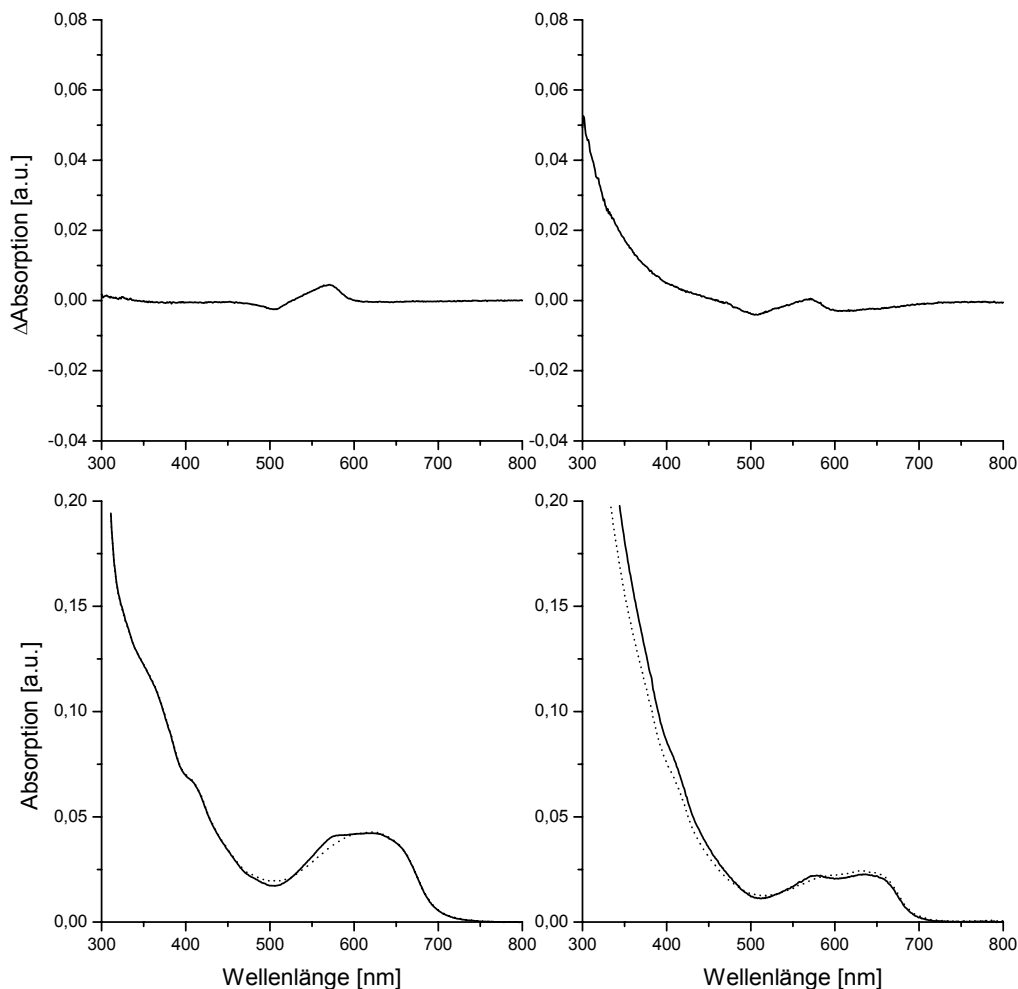


Abbildung 3-72:

Absorptionsspektren des Produkts der enzymatischen Rekonstitution von His₆-PecA-C98S-C99S, His₆-PecE, His₆-PecF und PCB vor (links) und nach (rechts) Zugabe von PCMS.

Oben: Absorptionsdifferenzspektren (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm).

Unten: Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und 577 nm (-----).

Auch die rekonstituierte Doppelmutante His₆-PecA-C98S-C99S zeigt eine Photochemie Typ I. Die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie liegen bei 506 nm und 573 nm. Damit absorbiert die langwellige Form der Photochemie deutlich rotverschoben im Vergleich zum nativen α -PEC ($\lambda_{\text{max}} = 566 \text{ nm}$). Der $\Delta\Delta A_{506/573}$ -Wert ist mit 18 % sehr gering. Nach der Zugabe von PCMS präzipitiert etwa die Hälfte des His₆-PecA-C98S-C99S-PVB-Addukts, was auf die schlechte Löslichkeit des Proteins zurückgeführt werden kann. Eine Bindung des PCMS an das Protein kann für die Präzipitation nicht verantwortlich sein, denn PCMS kann an diese Mutante, die kein freies Cystein mehr besitzt, nicht mehr binden. Daher ist auch kein Einfluss des PCMS auf die Photochemie selbst zu erkennen. Die Absorptionsmaxima liegen nach PCMS-Zugabe nach wie vor bei 506 nm und 573 nm und auch der $\Delta\Delta A_{506/573}$ -Wert mit 21 % sinkt, im Gegensatz zu den beiden anderen Mutanten, nicht. Das PCMS hat also nur Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins, indem sich durch das Quecksilbersalz die Ionenzusammensetzung des Puffers ändert. Einen Einfluss auf die geringe Photochemie des His₆-PecA-C98S-C99S-PVB-Addukts hat PCMS erwartungsgemäß nicht, da die Cysteine 98 und 99, an die es binden kann, nicht mehr vorhanden sind.

Zusammenfassende Diskussion der Rekonstitutionen von His₆-PecA-C98S, His₆-PecA-C99S und His₆-PecA-C98S-C99S

Durch den Austausch eines oder beider Cystein in den Apoprotein-Mutanten ist die Löslichkeit stark erniedrigt. Nur durch Zugabe eines Detergens sind die modifizierten Proteine teilweise in Lösung zu bringen.

Bei der Chromophorbindung gibt es nicht nur zwischen den Apoprotein-Mutanten an sich His₆-PecA deutliche Unterschiede, sondern auch zwischen den Apoprotein-Mutanten und dem unmodifizierten Apoprotein. Die verschiedenen Rekonstitutionsprodukte PVB-Addukt, PCB-Addukt und MBV-Addukt entstehen in deutlich unterschiedlichen Mengen und Verhältnissen sowohl bei den autokatalytischen als auch bei den enzymatischen Rekonstitutionen. Die Lyase-Isomerase katalysiert zwar bei allen drei Apoprotein-Mutanten die Bildung des PVB-Addukts, jedoch in deutlich geringerem Umfang als beim nicht modifizierten Apoprotein His₆-PecA. Durch die Mutationen sind die Apoproteine demnach kein optimales Substrat für die Lyase-Isomerase mehr.

Die Absorptionen der Rekonstitutionsprodukte der Apoprotein-Mutanten und von His₆-PecA weichen zum Teil deutlich voneinander ab. Es kommt sowohl zu hypso- als auch zu bathochromen Verschiebungen um bis zu 10 nm. Die Photochemie der PVB-Addukte der Mutanten ist zwar der Photochemie des nativen und rekonstituierten α -PEC ähnlich, allerdings ist sie bei den Mutanten deutlich weniger ausgeprägt, vor allem bei der Doppelmutante. Eine Photochemie Typ II kann durch Zugabe von PCMS bei His₆-PecA-C98S und His₆-PecA-C99S, bei denen jeweils ein Cystein ausgetauscht wurde, nicht vollständig und bei His₆-PecA-C98S -C99S, die kein freies Cystein mehr besitzen, überhaupt nicht induziert werden. Die Ergebnisse der Expression, der Rekonstitution der Apoprotein-Mutanten und deren photochemisches Verhalten zeigen, dass der Austausch der Cysteine 98 und 99 einen bedeutenden Einfluss auf die Struktur des α -PEC und damit auch auf die Löslichkeit, die Chromophorbindung und die Photochemie hat.

In Biliprotein-Untereinheiten ist das Motiv Cystein 98 - Cystein 99 nicht konserviert, es kommt lediglich beim α -PEC aus *Mastigocladus laminosus* und *Anabaena* sp. PCC 7120 und dem α -PC von *Pseudanabaena* sp. PCC 7409 vor. Interessant ist dagegen, dass in der Nähe der beiden Cysteine bei Biliproteinen hochkonservierte Aminosäuren liegen, wie das unmittelbar benachbarte Tyrosin 97, das Arginin 93 und das Glycin 102. Die beiden Cysteine liegen also in einem Bereich, der für die Struktur und damit für die Funktion von Biliproteinen wichtig zu sein scheint. Es ist daher nicht überraschend, dass eine Veränderung in diesem Bereich, wie der Austausch eines oder beider Cysteine 98, 99 oder die PCMS-Bindung deutliche strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf das Biliprotein hat.

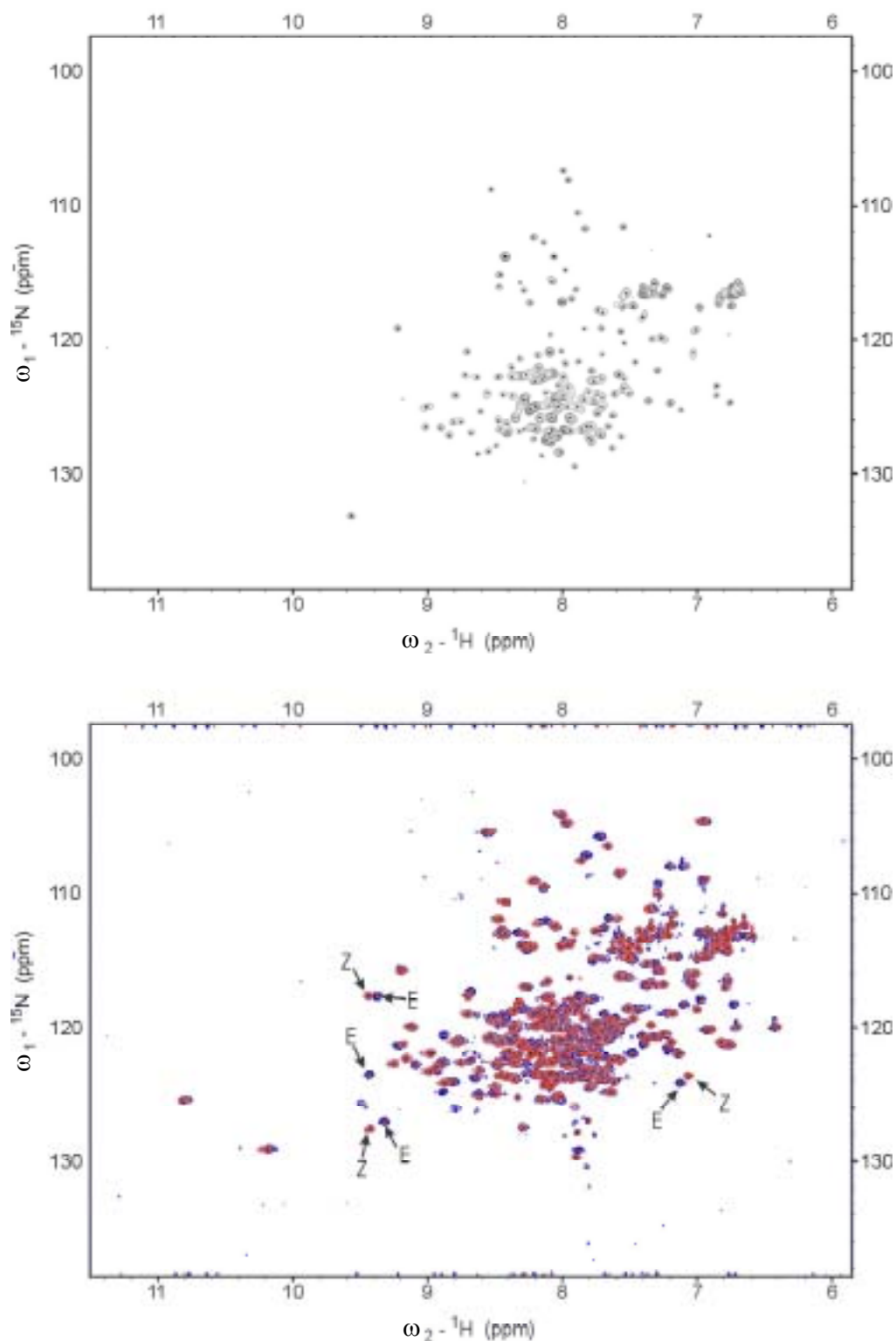
3.5 NMR-Spektroskopie der Proteine

Neben der Röntgenstrukturanalyse ist die NMR-Spektroskopie die wichtigste Methode zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen. Anders als die Röntgenstrukturanalyse, bei der Proteinkristalle verwendet werden, untersucht die NMR-Spektroskopie die Proteine in Lösung und zeichnet damit möglicherweise ein realistischeres Bild. Daneben ist es durch Aufnahme zeitaufgelöster NMR-Spektren möglich, dynamische Prozesse in Proteinen zu beobachten (Neubauer 2002). Mit klassischen Techniken, wie der eindimensionalen ¹H-NMR-Spektroskopie lassen sich Proteine allerdings nicht analysieren. Zu viele Kerne ergeben zu viele NMR-Signale, die sich überlappen und die Auswertung eines Spektrums unmöglich machen. Mit Hilfe von zweidimensionalen NMR-Techniken ist es jedoch möglich, die Struktur von Proteinen bis zu einer Größen von 50 kDa aufzuklären.

Zwei- und mehrdimensionale NMR-Experimente bestehen aus einer Serie von unterschiedlichen eindimensionalen Experimenten mit komplexen Pulssequenzen. Die Signale aus den eindimensionalen Experimenten werden durch doppelte Fourier-Transformation analysiert. Dabei kommt es zur Korrelation der Signale unterschiedlicher Kerne, was zu zweidimensionalen Spektren führt. Homonukleare Spektren korrelieren dabei die Signale von gleichen Atomkernen (z.B. nur ^1H), heteronukleare Spektren dagegen korrelieren die Signale verschiedener Atomkerne (z.B. ^1H und ^{15}N) (1986, Neubauer 2002). Für diese Arbeit wurden HSQC-Spektren (heteronuclear single-quantum coherence) aufgenommen. Dabei handelt es sich um zweidimensionale Spektren, bei denen nur die Signale der Amidstickstoffe und den daran gebundenen Amidwasserstoffen der Peptidbindung eines Proteins gemessen werden. Für die Aufnahme eines HSQC-Spektrums ist eine Isotopenmarkierung des Proteins mit ^{15}N notwendig, die durch Expression des Proteins in einem ^{15}N -haltigen Medium erreicht wird.

Vom PEC-Hexamer, und somit auch vom α -PEC (größere Umordnungen ausgeschlossen), existiert bereits eine Röntgenkristallstruktur (Düring *et al.* 1990). Die NMR-Spektroskopie des α -PEC diente nun dazu, seine Struktur in Lösung aufzuklären. Dabei sollte hauptsächlich die Dynamik des Proteins bei der Chromophorbinding und während der Photochemie untersucht werden. Zunächst wurde am nicht rekonstituierten Apoprotein His₆-PecA untersucht, ob das Protein für die Aufnahme von NMR-Spektren geeignet ist, d.h. ob es eine genügend hohe Löslichkeit aufweist, ausreichend rein präpariert werden kann und es zu keiner Denaturierung des Proteins bei der Probenvorbereitung und NMR-Spektroskopie kommt.

Durch Expression in einem Minimalmedium, das $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als einzige Stickstoffquelle enthielt, konnte ^{15}N -His-PecA in ausreichender Menge gewonnen werden. Die Löslichkeit des isotopenmarkierten Apoproteins war mit 15 - 20 mg/ml ausreichend hoch. Abbildung 3-73 (oben) zeigt das HSQC-Spektrum des Apoproteins ^{15}N -His-PecA, das von Pawel Smialowski (Arbeitsgruppe Dr. Ted Holak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) aufgenommen wurde. Es handelt sich dabei um ein gut aufgelöstes Spektrum, dessen Signalverteilung darauf schließen lässt, dass das Protein vollständig gefaltet und in ausreichender Reinheit in der Probe vorliegt, also für die NMR-Spektroskopie geeignet ist.

**Abbildung 3-73:**

HSQC-Spektren von ${}^{15}\text{N}$ -His₆-PecA (oben) und ${}^{15}\text{N}$ -His₆- α -PEC (unten). Die Spektren wurden an einem 600 MHz Gerät der Firma Bruker von Pawel Smialowski (Arbeitsgruppe Dr. Ted Holak, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) aufgenommen.

In der unteren Abbildung sind die HSQC-Spektren der beiden photochemischen Formen von ${}^{15}\text{N}$ -His₆- α -PEC überlagert dargestellt. Die kurzwellig absorbierende Form des ${}^{15}\text{N}$ -His₆- α -PEC, die das Δ 15,16-E-Isomer des PVB enthält, ist blau, die langwellig absorbierende Form mit Δ 15,16-Z-PVB ist rot dargestellt. Die ${}^{15}\text{N}$ -His₆- α -PEC-Proben wurden von Matthias Plöscher im Rahmen seiner Diplomarbeit hergestellt.

Auch vom rekonstituierten α -PEC wurden HSQC-Spektren aufgenommen. Die enzymatischen Rekonstitutionen von ^{15}N -His₆-PecA mit unmarkiertem PCB und die Aufreinigung der Proben für die NMR-Spektroskopie wurden von Matthias Plöscher im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt (Plöscher 2003). Die HSQC-Spektren beider Formen der Photochemie des ^{15}N -His₆- α -PEC wurden wiederum von Pawel Smialowski durchgeführt (Abbildung 3-73 unten). Eine genaue Zuordnung der Signale zu den Aminosäuren wird zur Zeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Ted Holak durchgeführt. Diese Zuordnung ist jedoch aufwendig und war während dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

Jedoch können durch Vergleich der HSQC-Spektren des Apoproteins ^{15}N -His₆-PecA mit den beiden Formen der Photochemie des rekonstituierten Apoproteins ^{15}N -His₆- α -PEC erste Aussagen über die Dynamik der Proteine bei der Chromophorbindung und während der Photochemie gemacht werden. Zwischen dem Apoprotein und dem rekonstituierten Protein gibt es deutliche Unterschiede bei der Lage vieler Signale. Es kann daraus gefolgert werden, dass es während der Chromophorbindung zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen im Protein kommt.

Der Vergleich der Spektren der beiden Formen der Photochemie des ^{15}N -His₆- α -PEC, die im Spektrum nach der Isomerisierung des Chromophors als Z (langwellig absorbierende Form) und E (kurzwellig absorbierende Form) bezeichnet werden, zeigt dagegen ausgeprägte Unterschiede nur bei einzelnen Signalen. Einige solcher Signale, die von der gleichen Amidgruppe stammen und auffällige chemische Verschiebungen aufweisen, sind gekennzeichnet. Dies bedeutet, dass es während der Photochemie zu deutlichen Strukturänderungen im Protein kommt, die jedoch bei weitem nicht so weitreichend sind wie bei der Chromophorbindung. Auffällig ist, dass die deutlichsten chemischen Verschiebungen zwischen den beiden Formen der Photochemie in einem Bereich liegen ($\omega_2\text{-}^1\text{H} = 9 - 9,5$), in dem auch die Unterschiede zwischen nichtrekonstituiertem und rekonstituiertem Protein am auffälligsten sind. In diesem Bereich dürften sich daher Signale von Aminosäuren befinden, die am stärksten mit dem Chromophor interagieren, was eventuell auf Ringstromeffekten der aromatischen Ringe des Chromophors beruht.

4 Abschließende Diskussion

4.1 Die Chromophorbindung der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins

4.1.1 Autokatalytische Chromophorbindung

Wurde das Apoprotein der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins (PecA) mit dem Chromophor Phycocyanobilin (PCB; Struktur siehe Abbildung 3-1) inkubiert, so kam es zu einer kovalenten Bindung des Chromophors. Es entstand dabei ein Produkt mit dem Absorptionsmaximum bei 641 nm, das die Charakteristika eines Biliproteins aufwies (Scheer 1982). Der Chromophor war kovalent gebunden, was durch De- und Renaturierungsexperimente und SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte.

Das Hauptprodukt der autokatalytischen Rekonstitution von PecA mit PCB konnte als PecA-PCB-Addukt identifiziert werden. Während der autokatalytischen Bindung kam es zur Öffnung der $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung des Chromophors und zur Ausbildung einer Thioetherbrücke zum Cystein 84 des Apoproteins, wodurch der Chromophor als 3^1 -Cys-PCB gebunden wurde. Dieses PCB-Addukt zeigte im Gegensatz zum nativen α -PEC keine Photochemie. Bei der Rekonstitution von PecA mit PCB konnte auch ein Mesobiliverdin(MBV)-Addukt nachgewiesen werden, das jedoch in deutlich geringeren Mengen entstand als das PCB-Addukt. Der Chromophor 3^1 -Cys-MBV entstand während der Chromophorbindung durch Oxidation des PCB an $\Delta 2,3$.

Am interessantesten war jedoch ein drittes Produkt, das in geringem Umfang entstand und bei dem es sich um das PecA-Phycoviolobilin(PVB)-Addukt handelte. Es trägt als Chromophor das 3^1 -Cys-PVB, den Chromophor des nativen α -PEC. Dieses Addukt zeigte eine Photochemie mit Maxima bei 505 nm und 566 nm, die mit der Photochemie des nativen α -PEC identisch war (Zhao & Scheer 1995). Der Chromophor des α -PEC, das 3^1 -Cys-PVB, entsteht demnach erst während der Chromophorbindung. Das PCB wird dabei zum PVB isomerisiert, in dem die $\Delta 4,5$ -Doppelbindung in den Ring A nach $\Delta 2,3$ verlagert wird. Dies erklärt nun auch, warum nie freies PVB in Organismen gefunden werden konnte, obwohl die Biosynthese von Phycobilinen intensiv untersucht worden ist (Beale 1993, Beale 2000). Der PVB-Chromophor ist kein Biosyntheseprodukt, sondern entsteht erst während der Chromophorbindung aus PCB, wobei das Apoprotein allein die Isomerisierung, wenn auch nur in geringem Umfang, katalysieren kann.

Neben dem PCB wurden noch weitere Phycobiline autokatalytisch vom Apoprotein PecA gebunden (siehe Tabelle 4-1). Das Phytochromobilin (PΦB; Abbildung 3-1), der Chromophor des Phytochroms, der sich vom PCB nur durch die 18-Vinyl-Gruppe unterscheidet, verhielt sich bei der Bindung an das Apoprotein weitgehend wie das PCB: es entstand überwiegend das PΦB-Addukt mit einem Absorptionsmaximum bei 652 nm. Daneben kam es in geringem Umfang zu einer Isomerisierung des PΦB während der Bindung und es entstand ein PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt. Dieses Addukt besitzt eine Photochemie, die der Photochemie des PVB-Addukts bzw. dem nativen α -PEC ähnelt und Maxima bei 505 nm und 572 nm aufweist. Das PΦB wird also zum Teil in der gleichen Weise wie das PCB während der autokatalytischen Bindung isomerisiert, wodurch ein Chromoprotein entsteht, das photochemisch aktiv ist. Beim Chromophor 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB (Abbildung 3-58) handelt es sich um einen neuartigen Chromophor, der nicht in der Natur vorkommt bzw. bis heute nicht beschrieben wurde.

Das Apoprotein PecA konnte auch mit Phycoerythrobilin (PEB) und dessen Derivat, dem Phycoerythrobilin-Dimethylester (PEB-DME), rekonstituiert werden. Dabei entstanden jedoch das PEB- bzw. das PEB-DME-Addukt nur als Nebenprodukte. Hauptsächlich entstanden das 15,16-Dihydrobiliverdin(DBV)- bzw. das 15,16-Dihydrobiliverdin-Dimethylester(DBV-DME)-Addukt durch Oxidation der Δ 2,3-Bindung der Chromophore während der Addition. Daneben war noch ein Phycourobilin(PUB)-Addukt nachweisbar, das durch eine Isomerisierung entstand, die analog der Isomerisierung von PCB zum PVB abläuft. Bei der Bindung des PEB entstand noch ein viertes Addukt mit einem Chromophor, der Bilin 592 genannt wurde und der, ähnlich dem Bilin 584 (Wedemayer *et al.* 1991), durch Oxidation einer der Propionsäureseitenketten entstanden sein könnte.

Der Dimethylester des PCB (PCB-DME) wurde im Gegensatz zum PEB-DME nicht gebunden, was vermutlich sterische Gründe hat. Auch Biliverdin (BV) und Bilirubin (BR) konnten nicht binden. Dafür dürfte die 3-Vinyl-Gruppe verantwortlich sein, die nicht geeignet scheint, eine Thioetherbrücke zum Apoprotein PecA auszubilden. Die Chromophore, die gebunden wurden, besaßen alle ausnahmslos eine 3-Ethyliden-Gruppe. Diese drei Chromophore, PCB-DME, BV und BR konnten auch von Apo-Phycocyanin nicht gebunden werden (Arciero *et al.* 1988b).

Ein Übersicht über die autokatalytischen Rekonstitutionen von PecA mit verschiedenen Chromophoren stellt Abbildung 4-1 dar. Das Apoprotein PecA war, wie auch Apo-Phycocyanin (Arciero *et al.* 1988a, Arciero *et al.* 1988c) und Apo-Phycoerythrin (Fairchild & Glazer 1994a), in der Lage Phycobiline autokatalytisch zu binden. Voraussetzung für die

Bindung war, dass der Chromophor eine Ethylidengruppe an C-3 aufweist. Während der Chromophorbindung wurde die $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung der Phycobiline geöffnet und es bildete sich eine Thioetherbrücke zum Cystein 84 des Apoproteins aus. Neben der Ausbildung der Thioetherbrücke kam es zum Teil zu einer Modifikation der Phycobiline während der Chromophorbindung.

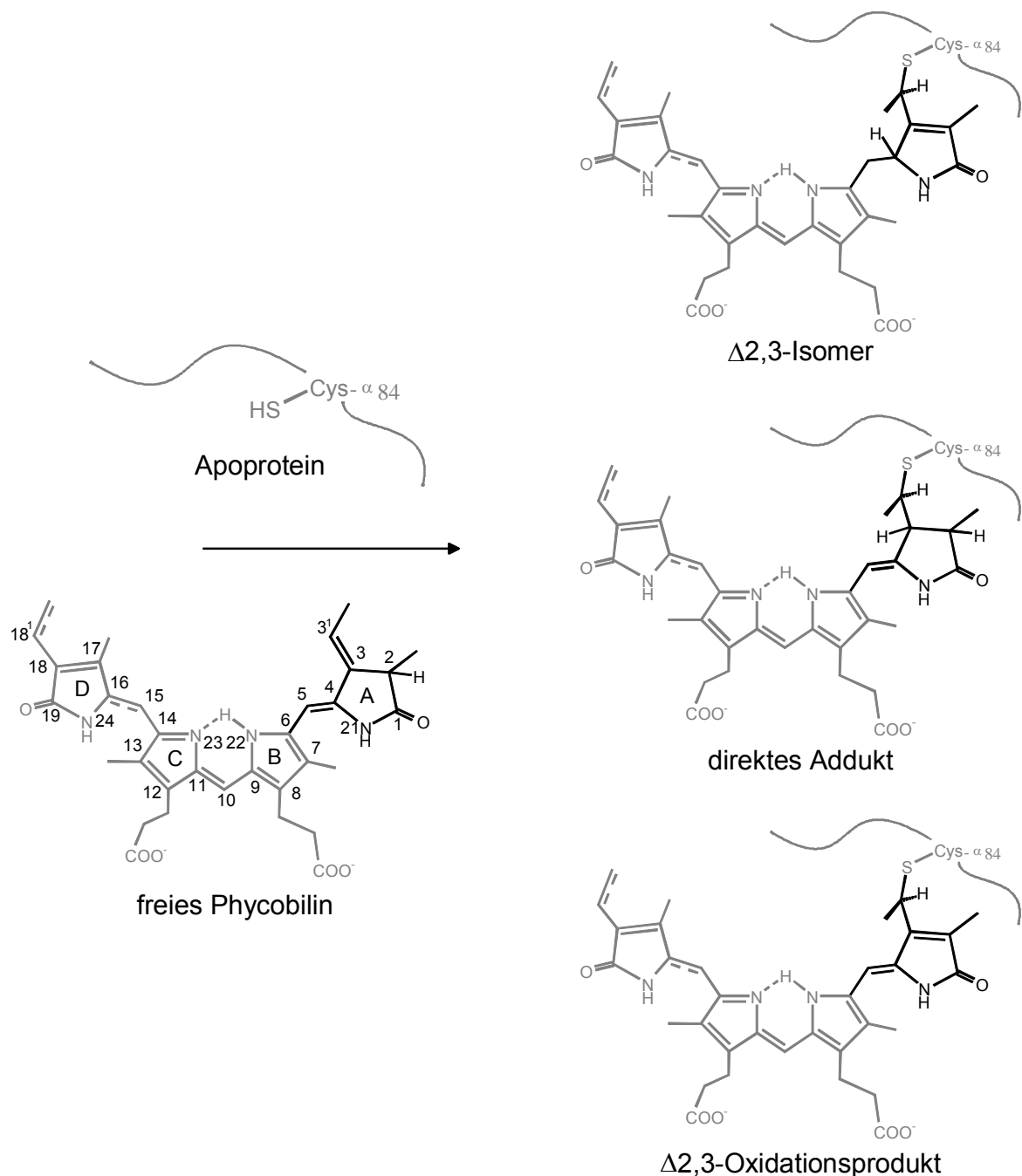


Abbildung 4-1:

Struktur der verschiedenen Additionsprodukte (rechts), die während der autokatalytischen Bindung von freien Phycobilinen (links) an das Apoprotein PecA entstehen. Die Bereiche, in denen es zu Strukturänderungen während der Chromophorbindung kommt, sind hervorgehoben.

Bei der autokatalytischen Bindung entstanden in der Regel drei verschiedene Addukte. Zunächst kam es immer zur Ausbildung des Addukts mit dem in der Rekonstitution eingesetzten Phycobilin, bei dem sich lediglich die Thioetherbrücke ausbildete (z.B. PecA-PCB-, PecA-PEB-, PecA-P Φ B-Addukt; Abbildung 4-1 - direktes Addukt). Daneben kam es zu einer Oxidation der Δ 2,3-Bindung des Chromophors, wodurch sich das konjugierte System des Chromophors im Addukt vergrößerte (z.B. PecA-MBV-, PecA-DBV-Addukt; Abbildung 4-1 - Δ 2,3-Oxidationsprodukt). Schließlich entstand jeweils in geringen Mengen durch Isomerisierung der Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 ein dritte Gruppe von Phycobilin-Addukten. Bei der autokatalytischen Bindung von PCB entstand so als Chromophor ein 3¹-Cys-PVB, bei der Bindung von PEB ein 3¹-Cys-PUB (Abbildung 4-1 - Δ 2,3-Isomer). Beide sind typische Chromophore von Phycobiliproteinen, die jedoch in Organismen nie in freier Form nachgewiesen werden konnten. Die Rekonstitutionsexperimente zeigten nun, dass diese Chromophore wahrscheinlich erst während der Bindung entstehen. Bei der Bindung von P Φ B entstand ein PecA-[18-Vinyl-PVB]-Addukt, das ebenso wie das PecA-PVB-Addukt, das dem nativen α -PEC entspricht, eine reversible Photochemie aufwies. Der Chromophor, das 3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB, ist ein neuartiger Chromophor, der noch nicht beschrieben wurde. Bei der autokatalytischen Bindung von PEB kam es zur Ausbildung eines als PecA-Bilin 592-Addukt bezeichneten vierten Addukts, bei dem es zu einer Oxidation in der Propionsäureseitenkette an Δ 8^{1,8} gekommen sein könnte (Abbildung 3-39).

Alle Chromophore (außer Bilin 592 und [18-Vinyl]-PVB), die bei der autokatalytischen Bindung von PCB, PEB und P Φ B entstanden sind, kommen auch in der Natur gebunden an Phycobiliproteinen vor (Scheer 2003). Es ist möglich, dass neben dem PVB auch einige weitere Chromophore durch Isomerisierung während der Bindung entstehen. Wichtige Kandidaten dafür sind das Phycourobilin und die Phycobiline von Crypto-Biliproteinen mit ihren Acrylsäureseitenketten. Um jedoch zu erreichen, dass bei der Chromophorbindung ausschließlich die für das jeweilige Biliprotein spezifischen Chromophore entstehen, dürften bei der Bindung von Phycobilinen Enzyme, sogenannte Lyasen, eine wichtige Rolle spielen.

Tabelle 4-1:

Rekonstitution von PecA mit freien Bilinen ohne (–) und mit (+) der Lyase-Isomerase (PecE/PecF)

Komponenten der Rekonstitution			Eigenschaften der rekonstituierten Proteine		
Apo- α -PEC (PecA)	Lyase-Isomerase (PecE/PecF)	Chromophor	Struktur des gebundenen Chromophors	Absorption λ_{\max} ($\epsilon \times 10^{-3} [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$)	Photochemie $\Delta\Delta A$ -Wert
+	–	PCB	3¹-Cys-PCB 3 ¹ -Cys-PVB 3 ¹ -Cys-MBV	641 nm (61)	— $\Delta\Delta A_{505/566} = 2-3 \%$ $\Delta\Delta A_{635/680} = 1-2 \%$
+	+	PCB	3¹-Cys-PVB 3 ¹ -Cys-PCB	566 nm (77)	$\Delta\Delta A_{505/566} = 110 \%$ —
+	+ / –	PCB-DME	—	—	—
+	–	P Φ B	3¹-Cys-PΦB 3 ¹ -Cys-[18-Vinyl]-PVB	651 nm (56)	— $\Delta\Delta A_{505/572} = 1-2 \%$
+	+	P Φ B	3¹-Cys-[18-Vinyl]-PVB 3 ¹ -Cys-P Φ B	572 nm (n.b.)	$\Delta\Delta A_{505/572} = 90 \%$ —
+	–	[17,18-Propano]-PCB*	3¹-Cys-[17,18-Propano]-PCB 3 ¹ -Cys-[17,18-Propano]-PVB 3 ¹ -Cys-[17,18-Propano]-MBV	638 nm (n.b.)	— n.b. n.b.
+	+	[17,18-Propano]-PCB*	3¹-Cys-[17,18-Propano]-PVB 3 ¹ -Cys-[17,18-Propano]-PCB	564 nm (n.b.)	$\Delta\Delta A_{505/564} = 85 \%$ —
+	+ / –	18 ¹ ,18 ² -Epoxy-PCB*	4 Addukte**	428 nm / 504 nm 577 nm / 629 nm	—
+	+ / –	PEB	3¹-Cys-DBV 3 ¹ -Cys-PEB 3 ¹ -Cys-PUB 3 ¹ -Cys-Bilin 592***	574 nm (53,5)	—
+	+ / –	PEB-DME	3¹-Cys-DBV-DME 3 ¹ -Cys-PEB-DME 3 ¹ -Cys-PUB-DME	578 nm (60,5)	—
+	+ / –	BV / BR	—	—	—

* Es handelt sich um Strukturvorschläge (siehe Abschnitt 3.1.2).

** Die Addukte wurden nicht näher charakterisiert (siehe Abschnitt 3.4.8).

*** 3¹-Cys-Bilin 592 entstand nur bei der autokatalytischen Rekonstitution mit PEB.

— = keine Chromophorbinding, bzw. keine Photochemie.

n.b. = nicht bestimmt

Die gebundenen Chromophore der Hauptprodukte sind groß und fett, die der Nebenprodukte klein gedruckt.

4.1.2 Enzymatische Chromophorbindung

Lyasen katalysieren entweder die Verknüpfung zweier Substrate an einer Doppelbindung oder die Spaltung eines Moleküls unter Bildung einer Doppelbindung. Bei Phycobiliproteinen katalysieren Lyasen die Bindung der Ethylidengruppe des Phycobilins an die SH-Gruppe eines Cysteins im Apoprotein. Es entsteht dabei ein Thioether. Als erste Lyase wurde die Phycocyanobilin- α -Phycocyanin-Lyase (PCB-PC-Lyase) aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 beschrieben (Fairchild *et al.* 1992, Swanson *et al.* 1992). Die PCB-PC-Lyase besteht aus zwei Untereinheiten, CpcE und CpcF, und katalysiert eine stereospezifisch korrekte Bindung des PCB an das Cystein 84 der α -Untereinheit des Phycocyanins. In Cyanobakterien wurden homologe Gene von *cpcE* und *cpcF* gefunden (Kahn *et al.* 1997, Schluchter & Glazer 1999), wie *pecE* und *pecF* im Phycoerythrocyanin-Operon von *Mastigocladus laminosus* (Jung *et al.* 1995). Die beiden Proteine PecE und PecF, die durch Expression in *E. coli* gewonnen wurden, wurden im Rahmen dieser Arbeit in Rekonstitutionen von PecA eingesetzt.

Die katalytische Aktivität der PVB-PEC-Lyase-Isomerase

Für die Rekonstitutionen wurde das Apoprotein PecA zusammen mit PecE, PecF und zunächst mit dem Chromophor PCB inkubiert. Es ergaben sich dabei starke Unterschiede zur autokatalytischen Rekonstitution. Durch die Zugabe von PecE und PecF kam es zu einer deutlichen Beschleunigung der Chromophorbindung. PecE und PecF katalysieren demnach die Bindung des Chromophors. Daneben entstand während der enzymatischen Bindung von PCB hauptsächlich (ca. 80 - 90 %) das PecA-PVB-Addukt. Der Chromophor dieses Addukts, das 3¹-Cys-PVB, entsteht aus PCB durch Isomerisierung der Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 (siehe Abbildung 3-39). Dieses PVB-Addukt war spektral und photochemisch mit dem nativen α -PEC identisch. Durch PecE und PecF wird folglich die Isomerisierung des PCB zum 3¹-Cys-PVB während der Bindung katalysiert. PecE/PecF arbeiten demnach nicht nur als Lyase sondern auch als Isomerase. Für eine gute Katalyse sind beide Proteine, PecE und PecF nötig. PecE und PecF können somit als Untereinheiten der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase (PVB-PEC-Lyase-Isomerase) bezeichnet werden.

Für die Enzymdatenbank ENZYMES (<http://us.expasy.org/enzyme/>) wurde eine Eintragung in die Subklasse 4.4.1 (Carbon-sulfur lyases) unter folgenden Namen vorgeschlagen: phycoviolobilin phycoerythrocyanin- α 84-cystein-lyase (isomerizing) oder alternativ: holo- α -phycoerythrocyanin synthase.

Bestätigt wurde die enzymatische Wirkung von PecE und PecF als Lyase-Isomerase und die Funktionalität des Rekonstitutionssystems durch Tooley und Glazer, die eine Rekonstitution des α -PEC in einem heterologen Wirt (*E. coli*) durchgeführt haben (Tooley & Glazer 2002). Im Gegensatz zur enzymatischen Rekonstitution *in vitro*, bei der immer ein geringer Anteil an PCB-Addukt entstand, wurde bei der Rekonstitution im heterologen Wirt unter physiologischen Bedingungen ausschließlich das PVB-Addukt gebildet.

Wurde nur eine der Untereinheiten, also PecE oder PecF, zum Rekonstitutionsansatz gegeben, ergaben sich nur geringe Unterschiede im Vergleich zur autokatalytischen Rekonstitution: PecE allein führte zu einer Erhöhung der Ausbeute an PecA-PCB-Addukt um 25 %. PecF allein führte dagegen zu einer Verminderung der Ausbeute an PecA-PCB-Addukt und zu einer geringfügigen Erhöhung des Isomeren PecA-PVB-Addukts (Zhao *et al.* 2002). Diese Ergebnisse zeigen, dass für eine vollständige Isomerisierung des Chromophors während der Bindung beide Untereinheiten notwendig sind, die Untereinheiten jedoch unterschiedliche Funktionen im Enzymkomplex haben. So scheint PecE hauptsächlich für die Bindung des Chromophors an das Apoprotein, PecF für die Isomerisierung des Chromophors verantwortlich zu sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch Sequenzvergleiche zwischen isomerisierenden und nicht-isomerisierenden Lyasen, d.h. zwischen PecE und CpcE bzw. PecF und CpcF aus *Mastigocladus laminosus* und *Anabaena* sp. PCC 7120. Die Homologien sind zwischen PecE und CpcE signifikant höher als zwischen PecF und CpcF (siehe Tabelle 4-2). CpcE/F, die PCB-PC-Lyase, katalysiert nur die stereochemisch korrekte Bindung des Chromophors. Daher müssten beide Untereinheiten für die Chromophorbinding optimiert sein. Die größeren Sequenzunterschiede bei den α -Untereinheiten sind ein weiterer Hinweis darauf, dass PecF weniger für die Bindung und eher für die Isomerisierung des Chromophors verantwortlich sein könnte.

Tabelle 4-2:

Sequenzhomologien zwischen den Untereinheiten der PCB-PC-Lyase und der PVB-PEC-Lyase-Isomerase aus *Mastigocladus laminosus* (Kufer *et al.* 1991, Wu *et al.* 2002) und *Anabaena* sp. PCC 7120 (Swanson *et al.* 1992, Kaneko *et al.* 2001)

Organismus	Sequenzhomologien zwischen	
	PecE/CpcE	PecF/CpcF
<i>Mastigocladus laminosus</i>	47 %	27 %
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	48 %	29 %

Auch bei der autokatalytischen Bindung von Phycocyanobilin erfolgt in geringem Umfang die Isomerisierung des Chromophors zum Phycoviolobilin. Es wäre daher auch denkbar, dass

die eigentliche katalytische Aktivität als Lyase-Isomerase vom Apoprotein übernommen wird und PecE/PecF als Chaperone die Lyase-Isomerase-Funktion des Apoprotein unterstützen und verstärken.

Die PVB-PEC-Lyase-Isomerase PecE/F konnte im Gegensatz zur PCB-PC-Lyase (Fairchild *et al.* 1992, Zhao *et al.* in Vorbereitung) nur die Bindung des Chromophors, nicht jedoch dessen Abspaltung katalysieren. Dies dürfte an der Struktur des Rings A des PVB liegen. Auch mit chemischen Methoden ist die Abspaltung des PVB äußerst schwierig und gelang nur mit Hilfe von AgSO₄ in Essigsäure und mit nur geringer Ausbeute.

Der Mechanismus der Katalyse

Der Chromophor des PecA-PCB-Addukts, das als Hauptprodukt bei der autokatalytischen Rekonstitution entsteht, kann nachträglich durch Zugabe der Lyase-Isomerase PecE/F nicht zum 3¹-Cys-PVB isomerisiert werden. Auch kann freies PCB nicht durch die Lyase-Isomerase isomerisiert werden (Zhao *et al.* 2000). Bei der Rekonstitution der Apoprotein-Mutante, bei der das chromophorbundene Cystein 84 gegen ein Serin ausgetauscht wurde, kam es durch die Lyase-Isomerase ebenfalls nicht zu einer Isomerisierung des PCB zum PVB. Dies bedeutet, dass die Isomerisierung des Chromophors gleichzeitig oder koordiniert mit der Bindung an das Cystein stattfinden muss. Möglicherweise wird ein Intermediat, das während der Chromophorbinding entsteht, isomerisiert. Auf ein solches Intermediat könnte eine Schulter bei 420 nm, die während den Rekonstitutionen mit PCB transient auftritt, hinweisen (siehe Abbildung 3-29). In diesem Bereich absorbieren Bilirubine, welche z.B. durch Addition von Cystein an C-10 entstehen können (Kufer 1980).

Es gibt Anhaltspunkte, dass das Apoprotein PecA und die beiden Lyase-Isomerase-Untereinheiten PecE und PecF einen ternären Komplex bilden. So konnten durch Versuche mit getaggtten und ungetaggtten Proteinen spezifische Interaktionen zwischen PecA, PecE und PecF nachgewiesen werden (Zhao *et al.* 2002). Im Rahmen seiner Diplomarbeit konnte Matthias Plöscher ternäre Komplexe aus den beiden Lyase-Isomerase-Untereinheiten und dem Apoprotein mit einem Verhältnis von 1:1:1 nachweisen (Plöscher 2003). Dieser ternäre Komplex könnte den Chromophor binden, wodurch vorübergehend ein quaternärer Komplex entsteht. Der Komplex zerfällt wahrscheinlich erst wieder, wenn die Chromophorbinding abgeschlossen ist, denn es konnten keine freien Intermediate (z.B. modifizierte Phycobiline) nachgewiesen werden (Storf *et al.* 2001). Auch bei der PCB-PC-Lyase konnte ein 1:1-Komplex der beiden Untereinheiten CpcE und CpcF nachgewiesen werden (Fairchild & Glazer 1994b).

Die Kinetik der enzymatischen Chromophorbindung

Die Kinetik der Bildung von rekonstituiertem α -PEC (PecA-PVB-Addukt) aus PecA und PCB unter der Katalyse von PecE und PecF folgt der Michaelis-Menten-Gleichung. Die kinetischen Konstanten betragen bei PecE/F für das Apoprotein als Substrat $k_{\text{cat}} = 0,8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und für den Chromophor als Substrat $k_{\text{cat}} = 1,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Zhao *et al.* 2002). Damit ist die PVB-PEC-Lyase-Isomerase (PecE/F), wie auch die PCB-PC-Lyase (CpcE/F) (Fairchild & Glazer 1994b), ein langsam arbeitendes Enzym mit einer mäßigen Affinität zu den Substraten. Im Vergleich dazu hat das Phytochrom, das seinen Chromophor, das Phytochromobilin, autokatalytisch bindet, eine kinetische Konstante $k_{\text{cat}} = 2,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Das Phytochrom ist bezüglich der Chromophorbindung demnach um mehr als zwei Größenordnungen schneller als die PVB-PEC-Lyase-Isomerase. Allerdings ist die Konzentration des Phytochrom im Organismus im Vergleich zum α -PEC deutlich geringer. Die Kinetik der PVB-PEC-Lyase-Isomerase zeigt auch, dass die Enzymreaktion aus einer Abfolge mehrerer Reaktionen besteht, bei der die zwei Substrate, PecA und PCB, nacheinander gebunden werden (Zhao *et al.* 2002).

Die Substratspezifität der PVB-PEC-Lyase-Isomerase

Neben dem PCB stellten noch zwei weitere Phycobiline gute Substrate für die Lyase-Isomerase dar und wurden während der Bindung an das Apoprotein isomerisiert. Es handelt sich dabei um das Phytochromobilin (P Φ B; Abbildung 3-5) und $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$, ein Nebenprodukt der Phytochromobilindarstellung. Bei $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ handelt es sich möglicherweise um das [17,18-Propano]-Phycocyanobilin ([17,18-Propano]-PCB; Abbildung 3-6). Fest steht jedoch, dass sich $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ lediglich durch die Seitenketten an C-17 und C-18 von PCB und P Φ B unterscheidet. Die Chromophore P Φ B und $1_{\text{P}\Phi\text{B}}$ wurden in der gleichen Weise wie das PCB während der Chromophorbindung, katalysiert durch die Lyase-Isomerase, isomerisiert, indem die Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 verlagert wird. Es entstanden dabei photochemisch aktive Addukte, im Falle des P Φ B das PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt (Abbildung 3-61).

Würde die Lyase-Isomerase während der Bindung von Phycoerythrobilin (PEB) die Isomerisierung in gleicher Weise wie PCB und P Φ B katalysieren, so müsste hauptsächlich das PecA-PUB-Addukt (Abbildung 3-50) entstehen. Bei der enzymatischen Rekonstitution mit PEB entstand jedoch nur geringfügig mehr PUB-Addukt als bei der autokatalytischen Rekonstitution ohne Lyase-Isomerase. PEB stellt demnach ein schlechtes Substrat für die hier untersuchte PVB-PEC-Lyase-Isomerase dar.

In Abbildung 4-2 ist eine Strukturformel für Phycobiline dargestellt. Dabei sind die Strukturen hervorgehoben, die für die (autokatalytische bzw. enzymatische) Bindung des Chromophors (grau unterlegt) und für die Isomerisierung durch die PVB-PEC-Lyase-Isomerase (schwarz gedruckt) notwendig sind. Für die Chromophorbindung ist dabei eine Ethylidengruppe an C-3 erforderlich. Gute Substrate für die Lyase-Isomerase sind nur Phycobiline mit einer 15-Methinbrücke.

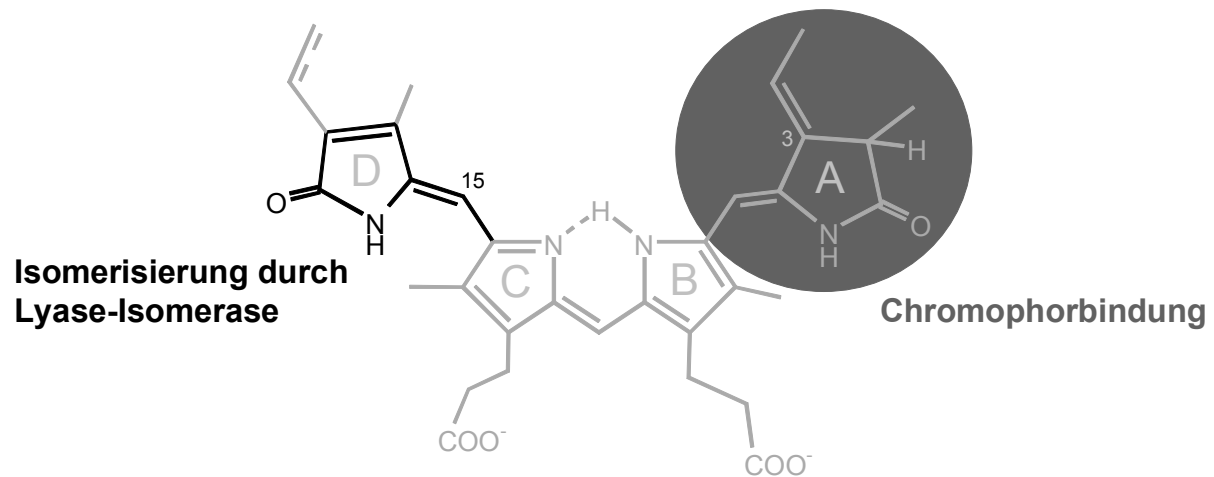


Abbildung 4-2:

Strukturformel von Phycobilinen. Strukturen, die für die Chromophorbindung notwendig sind, sind grau unterlegt. Strukturen, die für die Isomerisierung durch die PVB-PEC-Lyase-Isomerase erforderlich sind, sind schwarz gedruckt.

Enzymatische Rekonstitutionen wurden nicht nur mit dem Apo- α -PEC durchgeführt, sondern auch mit dem Apoprotein der α -Untereinheit des Phycocyanins (α -PC) aus *Mastigocladus laminosus* (in Zusammenarbeit mit Kai-Hong Zhao, College of Life Sciences and Technology, Wuhan, China) und mit Apo-Phytochrom (PhyA) aus Hafer (in Zusammenarbeit mit Benjamin Quest, Arbeitsgruppe Wolfgang Gärtner, MPI, Mühlheim/Ruhr). Die Apoproteine wurden dabei mit der Lyase-Isomerase PecE/F und dem Chromophor PCB inkubiert. In beiden Fällen kam es zur Bindung des Chromophors, eine Isomerisierung des PCB konnte jedoch nicht beobachtet werden. Apo- α -PC und Apo-PhyA sind somit keine Substrate für die Lyase-Isomerase.

Andere Biliprotein-Lyasen

Die bekannten Lyasen, wie die PVB-PEC-Lyase-Isomerase, weisen eine hohe Substratspezifität auf. Es ist deshalb nicht wahrscheinlich, dass eine Lyase die Chromophorbindung an verschiedene Bindungsstellen katalysiert. Daher wurde in Cyanobakterien nach homologen Genen gesucht, die für andere Phycobiliprotein-Lyasen codieren. In

Mastigocladus laminosus, das allerdings nicht vollständig sequenziert ist, wurden nur die Gene für die Untereinheiten der PVB-PEC-Lyase-Isomerase PecE/F und der PCB-PC-Lyase CpcE/F gefunden. Auch in *Synechocystis* sp. PCC 6803, das vollständig sequenziert ist (Kaneko *et al.* 2001), konnten nur 5 homologe Gene von Lyase-Untereinheiten gefunden werden. Dabei könnten einige dieser homologen Gene auch für Proteine codieren, die am Abbau von Biliproteinen beteiligt sind, wie es für das Cyanobakterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 nachgewiesen werden konnte (Dolganov & Grossman 1999). In Cyanobakterien existieren jedoch mindestens acht verschiedene Chromophorbindungsstellen in Phycobiliproteinen (Schlucher & Glazer 1999). Auch wenn einige Chromophore stereochemisch korrekt autokatalytisch gebunden werden können, wie z.B. PCB von der β -Untereinheit des Phycocyanins aus *Synechococcus* sp. PCC 7002 (Arciero *et al.* 1988a), sind für die Bindung der Chromophore an die meisten Biliproteine Lyasen notwendig. Es stellt sich daher die Frage nach den „fehlenden“ Lyasen.

So ist für die α -Untereinheit des Phycoerythrins (α -PE), bei deren autokatalytischer Rekonstitution das PEB nicht korrekt als DBV gebunden wurde, sicherlich eine Lyase notwendig (Fairchild & Glazer 1994a). Der in marinen Cyanobakterien sehr häufige Chromophor Phycourobilin (PUB) entsteht möglicherweise ebenfalls, wie das PVB beim α -PEC, durch Isomerisierung von PEB während der Bindung. Ein Hinweis darauf ergab sich aus den Rekonstitutionen mit PEB in dieser Arbeit, bei der zum Teil PUB entstand. Demnach sollte bei PUB-Biliproteinen ebenfalls eine Lyase-Isomerase notwendig sein. Einige der PUB- und PEB-Chromophore sind in Biliproteinen doppelt gebunden (Schoenleber *et al.* 1984, Killilea & O'Carra 1985, Nagy *et al.* 1985). Auch diese Chromophorbindung könnte katalytisch sein. Die meisten dieser „fehlenden“ Lyasen dürften, da sie bei der BLAST-Suche nicht gefunden wurden, keine nahe Verwandtschaft zu den bekannten Phycobiliprotein-Lyase-Familien aufweisen. Es ist daher wahrscheinlich, dass mindestens eine weitere Biliprotein-Lyase-Familie existiert. Eine Lyase, die keine Verwandtschaft mit PecE/F und CpcE/F aufweist, ist bereits bekannt. Es handelt sich dabei um die Lyase-Domäne des Phytochroms, das auch in Cyanobakterien vorkommt (Gärtner 1997, Hughes *et al.* 1997, Fankhauser 2001, Zhao *et al.* in Vorbereitung).

Es scheint also, dass die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften der Biliproteine nicht so sehr durch Unterschiede der Biliproteinuntereinheiten selbst, die alle eine sehr ähnliche Struktur aufweisen, erreicht wird. Vielmehr wird die Variabilität der Absorptionseigenschaften der Biliproteine mit Hilfe von Enzymen erreicht, die an der Chromophorsynthese und an der Chromophorbindung beteiligt sind. Bei diesen Enzymen ist die Diversität ungleich höher als bei den Biliproteinen selbst, was sich u.a. anhand der, bisher nur postulierten, unterschiedlichen Lyase-Familien zeigt.

4.2 Die Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins

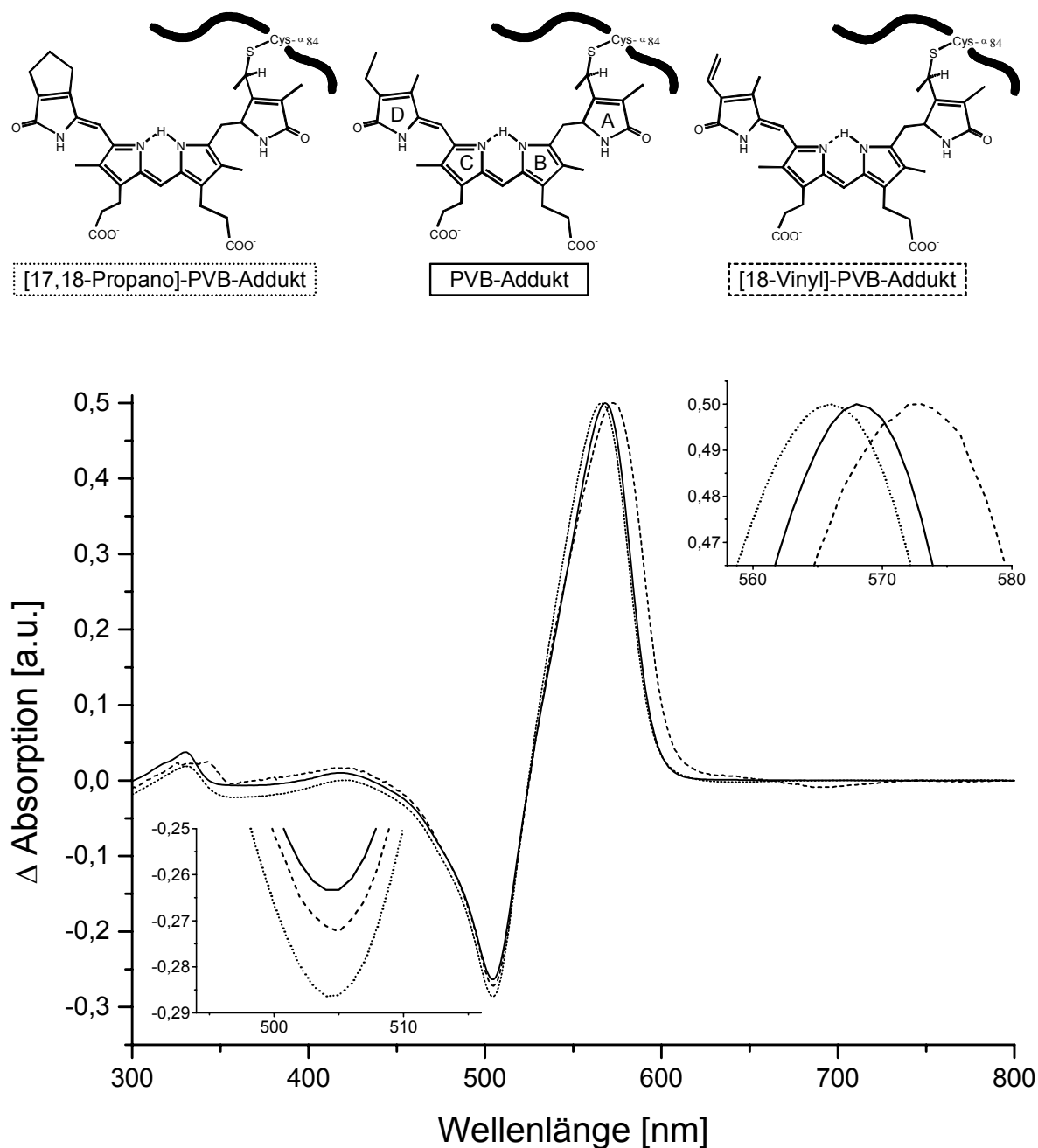
4.2.1 Möglicher Mechanismus der Photochemie

Die Photochemie Typ I

Das α -PEC weist eine ausgeprägte Photochemie auf (Zhao & Scheer 1995). Als Typ I wird die Photochemie bezeichnet, welche die isolierte α -Untereinheit des PEC in Puffer zeigt. Das α -PEC besitzt dabei zwei unterschiedlich absorbierende Formen, die durch Belichtung ineinander umgewandelt werden können. Nach Belichtung bei 500 nm absorbiert das α -PEC bei 566 nm, nach Belichtung bei 577 nm absorbiert es bei 505 nm. Diese Photochemie beruht hauptsächlich auf einer Z/E-Isomerisierung des Chromophors an $\Delta 15,16$. In der langwellig absorbierenden Form der Photochemie Typ I liegt der PVB-Chromophor als 15Z-Isomer vor. Diese Form wird abgekürzt als Z- α_1 bezeichnet. Für die kurzwellig absorbierende Form, die als Chromophor das 15E-Isomer besitzt, wird die Abkürzung E- α_1 verwendet.

Die Ergebnisse der enzymatischen Rekonstitutionen mit den Chromophoren, die von der Lyase-Isomerase während der Bindung isomerisiert wurden, wobei photochemisch aktive Addukte entstanden, ließen auf einen möglichen Mechanismus der Photochemie des α -PEC schließen. In Abbildung 4-3 sind die Absorptionsdifferenzspektren (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm) des PecA-PVB-Addukts, das dem nativen α -PEC entspricht, des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts und des PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukts dargestellt. Die Chromophore der drei verschiedenen Addukte unterscheiden sich nur durch die Seitenketten am D-Ring (siehe Abbildung 4-3 oben).

Die langwellig absorbierenden Formen der Photochemie Typ I (Z- α_1) der drei Addukte, die anhand der Maxima der Absorptionsdifferenzspektren zugeordnet werden können, absorbieren deutlich unterschiedlich. Beim PecA-PVB-Addukt liegt das Absorptionsmaximum bei 566 nm, beim PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt bei 572 nm und beim PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukt bei 564 nm. Diese Absorptionsunterschiede können durch die strukturellen Unterschiede der Chromophore am D-Ring erklärt werden.

**Abbildung 4-3:**

Absorptionsdifferenzspektren (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm) des PecA-PVB-Addukts (α -PEC) (—), des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts (-----) und des PecA-[17,18-Propano]-PVB-Addukts (.....). Die Maxima der Differenzspektren wurden auf 0,5 normiert. Die Bereiche, in denen sich die Maxima bzw. Minima befinden, sind zusätzlich vergrößert dargestellt. Oberhalb des Graphen sind die Strukturen der 3¹-Cys-Chromophore dargestellt.

Die kurzweilig absorbierenden Formen der Photochemie Typ I ($E-\alpha_1$), die anhand der Minima der Absorptionsdifferenzspektren erkannt werden können, absorbieren dagegen annähernd gleich mit Maxima um 505 nm. Es scheint also, dass bei $E-\alpha_1$ der drei Addukte die Unterschiede am D-Ring keinen bzw. nur einen äußerst geringen Einfluss auf die Absorption haben.

Erklärbar wäre dies durch eine (partielle) Entkopplung des D-Rings vom absorbierenden π -Elektronensystem der Chromophore. Schematisch dargestellt ist diese partielle Entkopplung für die PVB- und [18-Vinyl]-PVB-Addukte in Abbildung 4-4. Bei der Entkopplung des D-Rings der Chromophore spielen die Torsionswinkel θ an der 15-Methinbrücke eine wichtige Rolle. Dieser Torsionswinkel θ ist ein Maß für die Verwindung der Ringe C und D zueinander. Der Torsionswinkel zwischen den Ringen C und D des 15Z-PVB-Chromophors im α -PEC aus *Mastigocladus laminosus* (in der Röntgenkristallstruktur des PEC-Hexamers; Düring *et al.* 1990) beträgt $23,5^\circ$, und liegt damit in einem ähnlichen Bereich wie die Torsionswinkel der Chromophore in den α -Untereinheiten des Phycocyanins aus *Spirulina platensis* mit $20,9^\circ$ (Brejc *et al.* 1995) und *Mastigocladus laminosus* mit $14,0^\circ$ (Siebzehnrübl 1990, Düring *et al.* 1991).

Die Auswirkungen der Torsionswinkel der Chromophore auf die Absorption ist im Abschnitt 1.3.3 IV der Einleitung erläutert (siehe auch Abbildung 1-5 und Falk 1989). Vereinfacht ausgedrückt bewirkt ein kleiner Torsionswinkel θ der 15-Methinbrücke nahe 0° beim PVB eine relativ langwellige Absorption, da das π -Elektronensystem des Rings D mit dem π -Elektronensystem der Ringe B und C koppelt. Je weiter sich der Torsionswinkel 90° nähert, um so mehr wird das π -Elektronensystem des D-Rings vom übrigen π -Elektronensystem entkoppelt, wodurch sich die Absorption kurzwellig verschiebt.

Mit einem Torsionswinkel von $11,8^\circ$ beim 15Z-PVB-Chromophor im α -PEC, kommt es zu gut wie keiner Entkopplung des D-Rings. Das Absorptionsmaximum mit 566 nm ist dementsprechend relativ langwellig. Bei Z- α_1 der beiden anderen Addukte, dem [18-Vinyl]-PVB-Addukt und dem [17,18-Propano]-PVB-Addukt, dürfte der Torsionswinkel der Chromophore ähnlich groß sein. So kommen bei der Absorption auch die Unterschiede am D-Ring der Chromophore zum Tragen, was sich in den Absorptionsunterschieden zwischen Z- α_1 der drei Addukte äußert.

Die kurzwellig absorbierenden Formen der Photochemie der drei Addukte absorbieren dagegen annähernd gleich. Die Unterschiede an den D-Ringen kommen kaum zu tragen. Dies ist folgendermaßen zu erklären: Während der Photochemie kommt es zu einer 15E-Isomerisierung. Dabei nehmen die Chromophore an der 15-Methinbrücke einen Torsionswinkel nahe 90° ein. Dies führt nun, durch eine weitgehende Entkopplung der π -Elektronensysteme der D-Ringe, zum einen zu einer deutlich kurzwelligen Verschiebung der Absorptionen. Zum anderen zeigen die unterschiedlichen Seitenketten am D-Ring nur noch sehr geringe Auswirkungen auf die Absorption der drei Addukte. Die Absorption beruht bei den Chromophoren in den E- α_1 -Formen der drei Addukte weitgehend nur noch auf dem π -Elektronensystem, das sich über die Ringe B und C erstreckt. Biliproteine, die als Chromophor das PUB besitzen, das ein solches π -Elektronensystem nur an den Ringen B

und C natürlicherweise aufweist, absorbieren ähnlich kurzwellig bei 498 nm (siehe Abschnitt 3.4.3 und Larkum *et al.* 1987). Die etwas längerwelligen Absorptionen der drei Addukte im Vergleich zum PUB-Addukt kann auf eine nicht ganz vollständige Entkopplung, die nur bei einem Torsionswinkel θ von 90° auftreten würde, zurückgeführt werden.

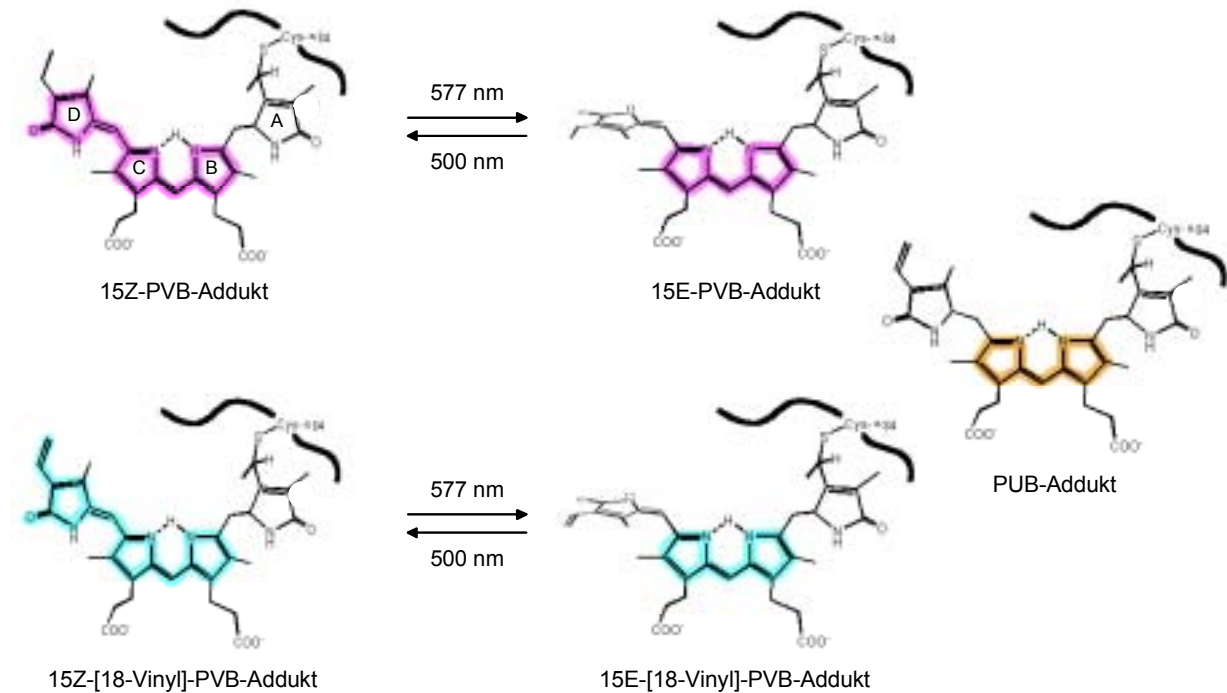


Abbildung 4-4:

Mögliche Isomerisierungsreaktionen während der Photochemie Typ I des PVB-Addukts und des [18-Vinyl]-PVB-Addukts. Die absorbierenden π -Elektronensysteme sind farblich hervorgehoben. Durch die Entkopplung der D-Ringe bei den 15E-Isomeren sind die absorbierenden π -Elektronensysteme der Chromophore beider Addukte annähernd gleich und ähneln dem des PUB-Chromophors.

Zusammenfassend kann die Photochemie Typ I des α -PEC folgendermaßen beschrieben werden:

Der PVB-Chromophor in der langwellig absorbierende Form der Photochemie (nach Belichtung bei 500 nm) liegt als 15Z-Isomer mit einem Torsionswinkel an der 15-Methinbrücke nahe 0° vor. Das absorbierende π -Elektronensystem am Chromophor erstreckt sich über die Ringe B, C und D. Diese Form absorbiert relativ langwellig bei 566 nm.

Während der Belichtung bei 577 nm kommt es zu einer Isomerisierung des Chromophors zum 15-E-Isomer. Dieses Isomer weist jedoch einen Torsionswinkel nahe 90° auf, wodurch es zu einer weitgehenden Entkopplung des π -Elektronensystems des D-Rings vom übrigen absorbierenden π -Elektronensystem kommt. Dadurch absorbiert diese Form der Photochemie deutlich kurzwelliger bei 505 nm.

Der Proteinanteil des α -PEC ist an der Photochemie insoweit beteiligt, als dass er den Chromophor in seiner jeweiligen der Form der Photochemie entsprechenden Struktur und

Torsion stabilisiert. Der Proteinanteil verändert während der Photochemie Typ I seine Struktur und damit auch die Struktur der Bindungstasche. Auf diese Weise ermöglicht und stabilisiert er die starke Torsion des Chromophors. Die NMR-Spektren der beiden Formen der Photochemie des PecA-PVB-Addukts zeigen eine solche Proteindynamik, die weitgehend auf einen kleinen Bereich des Proteins beschränkt bleibt.

Unterstützt wird dieses Modell der Photochemie mit dem ungewöhnlichen Isomerisierungsverhalten des 3^1 -Cys-PVB durch die Tatsache, dass der freie PVB-Chromophor bzw. der quasi freie PVB-Chromophor im denaturierten Protein (siehe 3.4.2) ebenfalls eine deutliche, wenn auch geringe, Photochemie zeigt. Diese Photochemie könnte auf einem ähnlichen Isomerisierungsverhalten, bei dem sich der Torsionswinkel an der 15-Methinbrücke stark verändert, zurückzuführen sein. Ein solches Isomer scheint also selbst beim freien Chromophor relativ stabil zu sein.

Die Photochemie Typ II

Die Photochemie Typ II des α -PEC tritt dann auf, wenn das Chromoprotein mit PCMS, einem Quecksilbersalz, behandelt wird. Dabei bindet das PCMS an die Cysteine 98 und 99. Die Photochemie Typ II unterscheidet sich deutlich vom Typ I. Die Absorptionsmaxima der beiden Formen der Photochemie liegen mit 563 nm (nach Belichtung bei 500 nm, bezeichnet mit Z- α_{II}) und 555 nm (nach Belichtung bei 577 nm, bezeichnet mit E- α_{II}) nahe zusammen, wobei die Extinktion der kurzwelligen Form geringer ist. Die Photochemie Typ II beruht wiederum auf einer Z/E-Isomerisierung an C15 des 3^1 -Cys-PVB-Chromophors (Zhao & Scheer 1995).

Mit PCMS wurden das PecA-PVB-Addukt, das dem nativen α -PEC entspricht, und das PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt behandelt. In Abbildung 4-5 sind die Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie Typ II des PecA-PVB-Addukts und des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts dargestellt.

Es ergibt sich ein anderes Bild als bei der Photochemie Typ I. Das Absorptionsmaximum für Z- α_{II} beträgt für das PecA-PVB-Addukt 563 nm und für das PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt 567 nm. E- α_{II} des PecA-PVB-Addukts weist ein Absorptionsmaximum von 558 nm, E- α_{II} des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts ein Absorptionsmaxima von 563 nm auf. Die langwellig und die kurzwellig absorbierenden Formen der Photochemie Typ II der beiden Addukte unterscheiden sich damit etwa um den selben Betrag. Bei beiden Formen der Photochemie Typ II scheinen also die Unterschiede am D-Ring der Chromophore 3^1 -Cys-PVB und 3^1 -Cys-[18-Vinyl]-PVB eine ähnliche Auswirkung auf die Absorption der Addukte zu haben. Eine Entkopplung des π -Elektronensystems des Rings D vom absorbierenden π -Elektronensystem des Chromophors tritt demnach nicht auf.

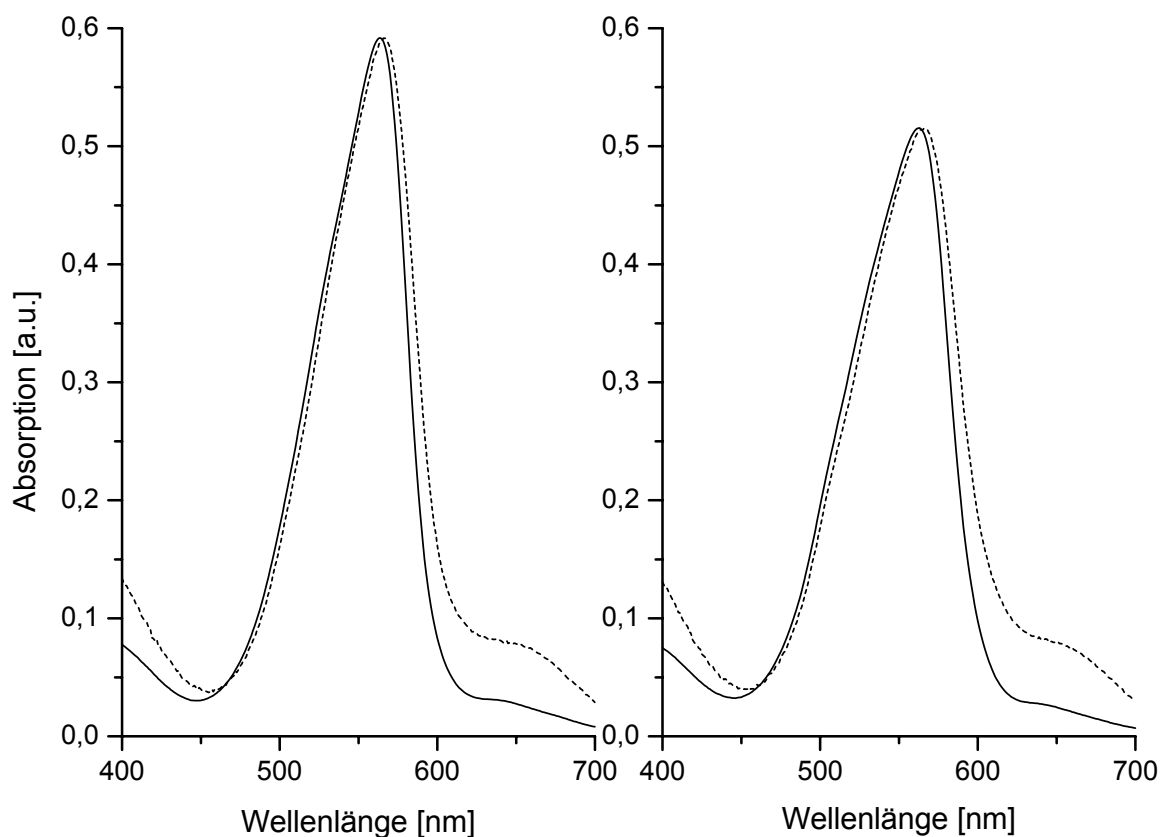
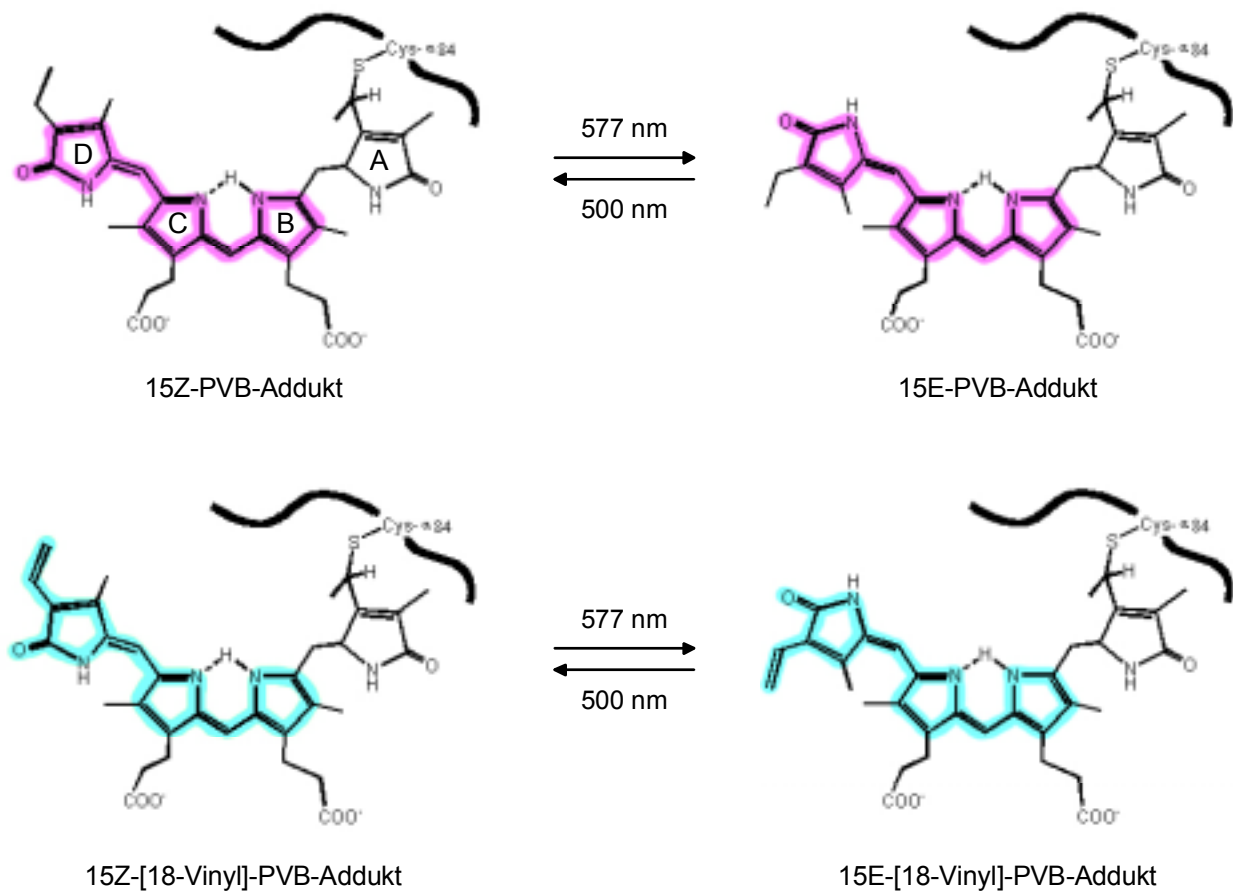


Abbildung 4-5:

Absorptionsspektren der beiden Formen der Photochemie Typ II nach Belichtung bei 500 nm (links) und 577 nm (rechts). Die Spektren wurden vom PecA-PVB-Addukt (—) und vom PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukt (-----) nach Zugabe von PCMS aufgenommen. Die Spektren sind auf das jeweilige Maximum des PecA-PVB-Addukts normiert.

Kommt es während der Photochemie Typ II zur Z/E-Isomerisierung des Chromophors, so dürften die Torsionswinkel in den Z- und E-Isomeren ähnlich, nämlich nahe 0° sein. Isomere von Bilinen, bei denen Z- und E-Isomere ähnliche Torsionswinkel aufweisen, absorbieren nur mit geringen Unterschieden. Es kommt dabei in der Regel nur zu geringen Verschiebungen um wenige Nanometer. Die Extinktionskoeffizienten können sich jedoch deutlich voneinander unterscheiden (Falk 1989). Die Absorptionsunterschiede der beiden Isomere beruhen dabei auf der Änderung der Form, nicht der Ausdehnung des absorbierenden π -Elektronensystems. Für die Photochemie Typ II des α -PEC bedeutet dies, dass es während der Photochemie zu einer vollständigen Z/E-Isomerisierung kommt. Die Torsionswinkel sind dabei in beiden Isomeren ähnlich. Dadurch kommt es nur zu geringen Absorptionsveränderungen, jedoch zu einer Änderung der Extinktionskoeffizienten. Schematisch ist die Photochemie Typ II von α -PEC und dem [18-Vinyl]-PVB-Addukt in Abbildung 4-6 dargestellt. Es ist dabei deutlich zu erkennen, dass sich lediglich die Form und nicht die Ausdehnung des absorbierenden π -Elektronensystems ändert.

**Abbildung 4-6:**

Mögliche Isomerisierungsreaktion während der Photochemie Typ II des PecA-PVB-Addukts und des PecA-[18-Vinyl]-PVB-Addukts. Die absorbierenden π -Elektronensysteme sind farblich hervorgehoben. Durch die vollständige Isomerisierung der D-Ringe während der Photochemie Typ II besitzen sowohl die 15Z- als auch die 15E-Isomere der Chromophore beider Addukte ein unterschiedlich großes absorbierendes π -Elektronensystem.

Nicht nur der Chromophor, sondern auch der Proteinanteil des α -PEC spielen bei der Photochemie Typ II eine wichtige Rolle. Durch die Bindung des PCMS an die Cysteine 98 und 99 kommt es zu einer Strukturänderung des Proteins. Dadurch wird das E-Isomer mit kleinem Torsionswinkel an C15 des Chromophors stabilisiert und nicht das E-Isomer mit dem Torsionswinkel nahe 90° wie bei der Photochemie Typ I.

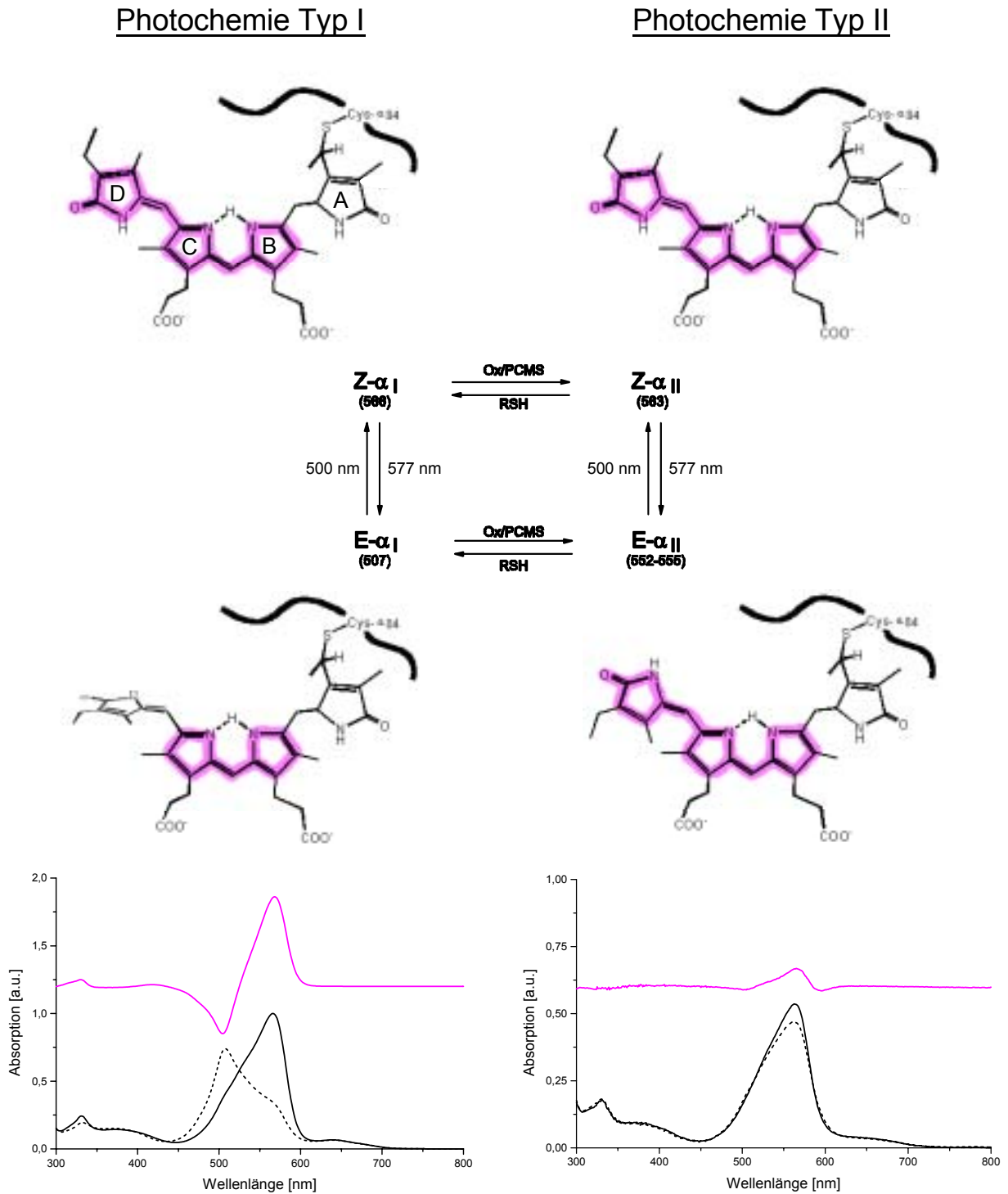
Die Bedeutung der Cysteine 98 und 99, die in einem stark konservierten Bereich der Biliproteine liegen, für die Struktur des Biliproteins zeigte sich auch bei den Versuchen mit den modifizierten Apoproteinen, bei denen eines oder beide Cysteine 98 und 99 gegen Serin ausgetauscht wurden. Diese modifizierten Apoproteine waren nahezu unlöslich. Erst durch Zugabe eines Detergens konnten sie zum Teil in Lösung gebracht und rekonstituiert werden.

Dabei war jedoch die autokatalytische und die enzymatische Chromophorbindung deutlich eingeschränkt. Auch die Photochemie des PVB-Addukts war deutlich schwächer ausgeprägt als beim α -PEC. Durch Zugabe von PCMS konnte bei den Mutanten, bei denen nur ein Cystein ausgetauscht war, die Photochemie Typ II nur noch zum Teil induziert werden. Bei der Doppelmutante kam es durch PCMS-Zugabe zu keiner Änderung der sehr schwachen Photochemie Typ I. Dies zeigt, dass durch die Mutation der Cysteine 98 und 99 die Struktur des α -PEC stark verändert wurde, wodurch sich die Eigenschaften, d.h. die Löslichkeit, die Chromophorbindung und die Photochemie stark verändert haben.

Überblick über die Photochemie Typ I und Typ II der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins

Die Photochemie des α -PEC ist in Abbildung 4-6 im Überblick dargestellt. Das α -PEC zeigt zwei verschiedene Typen der Photochemie, die vom Redoxzustand der Cysteine 98 und 99 abhängen, die etwa 1,7 nm vom Chromophor entfernt liegen. Photochemie Typ I tritt dann auf, wenn die SH-Gruppen der Cysteine reduziert vorliegen. Werden die Cysteine oxidiert, wodurch es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke kommt, oder wird an die Cysteine PCMS, ein Quecksilbersalz, gebunden, so tritt Photochemie Typ II auf (Zhao & Scheer 1995).

Beide Typen der Photochemie zeigen je zwei stabile Formen, die unterschiedlich absorbieren und sich durch Belichtung bei 500 nm bzw. 577 nm ineinander umwandeln lassen. Die Absorptionsänderungen während der Belichtung beruhen bei beiden Typen der Photochemie hauptsächlich auf einer Z/E-Isomerisierung des PVB-Chromophors an $\Delta 15,16$ zwischen Ring C und Ring D. Einen sehr großen Einfluss auf die Absorption dürften dabei die unterschiedlichen Torsionswinkel zwischen den Ringen C und D haben, welche die PVB-Isomere in den verschiedenen Zuständen der Photochemie einnehmen. In den langwellig absorbierenden Formen beider Photochemie-Typen ($Z-\alpha_I$ und $Z-\alpha_{II}$) liegt der PVB-Chromophor als 15Z-Isomer vor. Der Torsionswinkel zwischen Ring C und D ist dabei gering, wodurch sich das π -Elektronensystem über die Ringe B, C und D erstreckt (in Abbildung 4-6 farblich hervorgehoben). $Z-\alpha_I$ und $Z-\alpha_{II}$ absorbieren daher ähnlich und relativ langwellig, $Z-\alpha_I$ bei 566 nm und $Z-\alpha_{II}$ bei 563 nm. Der geringen Unterschied in der Absorption kommt durch die Modifikation der Cysteine 98 und 99 zustande, wodurch sich die Struktur der Bindungstasche ändert. Dies könnte zu geringen strukturellen Unterschieden der Chromophore und dadurch zu Absorptionsunterschieden führen.

**Abbildung 4-6:**

oben: Überblick über die Photochemie des α -PEC mit den möglichen Isomerisierungsreaktionen während der Photochemie Typ I und Typ II. Die konjugierten π -Elektronensysteme sind farblich hervorgehoben.

unten: Photochemie Typ I (links) und Typ II (rechts) des PecA-PVB-Addukts. Es sind die Absorptionsspektren der verschiedenen Formen der Photochemie nach Belichtung bei 500 nm (—) und bei 577 nm (-----) und die Differenzspektren (nach Belichtung bei 500 nm *minus* nach Belichtung bei 577 nm) (—) dargestellt.

Die beiden kurzweilig absorbierenden Formen der Photochemie ($E-\alpha_I$ und $E-\alpha_{II}$) unterscheiden sich spektral deutlich voneinander. $E-\alpha_I$ absorbiert bei 507 nm, $E-\alpha_{II}$ bei 555 nm. In beiden Fällen liegt der PVB-Chromophor als 15E-Isomer vor. Allerdings sind dabei die Torsionswinkel zwischen den Ringen C und D deutlich verschieden. Bei $E-\alpha_I$ liegt der Torsionswinkel nahe 90° , wodurch das π -Elektronensystem des Ringes D entkoppelt wird. Das absorbierende π -Elektronensystem erstreckt sich nur noch über die Ringe B und C. Dadurch absorbiert $E-\alpha_I$ deutlich kurzweiliger bei 507 nm. $E-\alpha_{II}$ dagegen weist einen geringen Torsionswinkel auf, wodurch das π -Elektronensystem des D-Rings weiterhin koppelt. Das π -Elektronensystem erstreckt sich somit über die Ringe B, C und D. $E-\alpha_{II}$ absorbiert daher ähnlich wie die langwelligen Formen der Photochemie, bei denen sich das absorbierende π -Elektronensystem der Chromophore auch über die Ringe B bis D erstreckt. In $E-\alpha_I$ nimmt das Protein bzw. die Chromophorbindungstasche eine Struktur ein, die das E-Isomer des PVB-Chromophors mit der starken Torsion zwischen Ring C und D stabilisiert. Durch die Modifikation der Cysteine 98 und 99 in $E-\alpha_{II}$ ändert sich die Struktur der Bindungstasche insoweit, dass nun beim E-Isomer des Chromophors eine geringe Torsion zwischen Ring C und D stabilisiert wird.

Die Photochemie Typ I kommt also durch eine Z/E-Isomerisierung des PVB-Chromophors zustande, wobei das Z-Isomer eine geringe Torsion zwischen den Ringen C und D, das E-Isomer eine starke Torsion aufweist. Der Photochemie Typ II liegt ebenfalls eine Z/E-Isomerisierung des Chromophors zugrunde. Allerdings weisen hier beide Isomere eine geringe Torsion zwischen den Ringen C und D auf. Das Protein ist an der Photochemie beteiligt, indem es die jeweilige Struktur des Chromophors ermöglicht bzw. stabilisiert.

Vergleich der Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins und des Phytochroms

Neben der α -Untereinheit des PEC (α -PEC) existiert eine weitere Klasse photochemisch aktiver Biliproteine. Es handelt sich dabei um die Phytochrome, die bei Pflanzen, Cyanobakterien und auch bei einigen anderen Bakterien vorkommen und diesen Organismen als Lichtsensor dienen (siehe auch Abschnitt 1.8). Die Phytochrome sind jedoch komplexere Chromoproteine als das α -PEC. Das pflanzliche Phytochrom ist ein Homodimer, wobei jede Untereinheit 125 kDa groß ist und aus mehreren Domänen besteht, die unterschiedliche Funktion besitzen (z.B. chromophortragende Domäne, Lyase-Domäne, Phosphorylierungs-Domäne; Jones & Erickson 1989, Tokutomi *et al.* 1989).

Der mögliche Mechanismus der Photochemie der Phytochrome wird kontrovers diskutiert. Unter anderem wurde vorgeschlagen, dass es während der Photochemie zu einer Deprotonierung des Chromophors oder zur Ausbildung eines Iminoethers am Ring A kommt (Andel *et al.* 1996, Kneip *et al.* 1999, Stanek & Grubmayr 1998b, Stanek & Grubmayr 1998a). Fest steht lediglich, dass der Chromophor während der Photochemie, wie auch beim α -PEC, eine Z/E-Isomerisierung durchmacht (Rüdiger *et al.* 1983, Thümmeler *et al.* 1983). Wie die starke Absorptionsverschiebung während der Photochemie des Phytochroms um 70 nm zustande kommt, ist jedoch unklar.

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war deshalb, ob das α -PEC als Modellprotein für die chromophortragende, photochemisch aktive Domäne des Phytochroms dienen könnte. Das α -PEC besitzt gegenüber dem Phytochrom einige Vorteile und ist dadurch Untersuchungen leichter zugänglich. Das α -PEC ist ein kleines, einfach aufgebautes Protein, das gut löslich und leicht durch Expression in *E. coli* gewonnen werden kann. Vom α -PEC existiert im Gegensatz zum Phytochrom eine Röntgenstruktur (Düring *et al.* 1990). Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, kann das α -PEC durch Bindung verschiedener Chromophore bzw. durch Mutagenese des Proteins modifiziert werden und ist daneben gut geeignet für spektroskopische Untersuchungen verschiedenster Art (z.B. UV/Vis-, NMR- und Massenspektroskopie).

Die Frage, ob das α -PEC als Modellprotein für das Phytochrom dienen kann muss jedoch wahrscheinlich verneint werden. Die Proteine scheinen in ihrer Struktur und im photochemischen Verhalten zu unterschiedlich zu sein. Die einzigen Gemeinsamkeiten der beiden Proteine sind, dass beide einen Gallenfarbstoff als Chromophor tragen und eine ausgeprägte Photochemie aufweisen, die auf einer Z/E-Isomerisierung des Chromophors beruht. Hier beginnen jedoch bereits die Unterschiede. Während der Photochemie verschiebt sich beim Phytochrom das Absorptionsmaximum bei der Z/E-Isomerisierung langwellig von 660 nm auf 730 nm, beim α -PEC verschiebt sich das Maximum bei der Z/E-Isomerisierung des Chromophors jedoch kurzwellig von 566 nm auf 507 nm. Die gleiche Reaktion, die Z/E-Isomerisierung der Chromophore, führt also in den beiden Proteinen zu gegensätzlichen Absorptionsänderungen, was darauf hinweist, dass unterschiedliche Mechanismen zu diesen Absorptionsverschiebungen führen.

Auch die gebundenen Chromophore unterscheiden sich in ihren Eigenschaften voneinander. Das PVB des α -PEC zeigt auch im denaturierten Protein und als freier Chromophor noch eine deutliche Photochemie, das Phytochromobilin zeigt ein solches Verhalten nicht. Das Phytochromobilin, das im Phytochrom für die ausgeprägte Photochemie verantwortlich ist, zeigt an das Apoprotein des α -PEC gebunden keinerlei Photochemie. Dies weist darauf hin,

dass die Rollen, die der Chromophor und das Protein bei der Photochemie spielen, beim α -PEC und beim Phytochrom unterschiedlich sind.

Zwischen Apo- α -PEC und Apo-Phytochrom gibt es darüber hinaus keine erkennbaren Sequenzhomologien. Es besteht also wahrscheinlich keine Verwandtschaft zwischen diesen beiden Proteinen. Es ist daher auch unwahrscheinlich, dass sich die Proteinumgebungen der Chromophore in den Bindungstaschen ähneln. Somit dürfte sich der Einfluss der Proteine auf die Absorptionseigenschaften der Chromophore im α -PEC und im Phytochrom unterscheiden.

Auch die bei der Chromophorbindung an das Apo- α -PEC beteiligte Lyase-Isomerase und die Lyase-Domäne des Apo-Phytochroms weisen keine Homologien auf. Die Chromophorbindung selbst divergiert bei beiden Proteinen deutlich. So wird das Phytochromobilin vom Apo-Phytochrom *in vitro* innerhalb weniger Minuten autokatalytisch (durch eine Lyase-Domäne) gebunden (Elich & Lagarias 1989, McDowell & Lagarias 2002). Beim α -PEC muss Phycocyanobilin während der Bindung durch eine Lyase-Isomerase zum nativen Chromophor PVB isomerisiert werden. Diese Bindung dauert *in vitro* einige Stunden.

Auch die Aufgaben der beiden Proteine unterscheiden sich grundlegend. Das Phytochrom dient als Lichtsensor. Durch Belichtung mit dunkelrotem Licht wird eine Photochemie ausgelöst, die dazu führt, dass das Protein aktiviert wird. Diese Aktivierung und somit die Photochemie dürfte mit einer deutlichen Änderung der Proteinstruktur einhergehen. Für das Phytochrom ist die Photochemie die Voraussetzung für seine Funktionalität (Rüdiger & Thümmler 1991, Gärtner 1997, Quail 2002).

Das α -PEC hat als Teil von Lichtsammelkomplexen die Aufgabe Licht zu absorbieren und die Energie weiterzuleiten. Im Biliprotein muss dabei der Chromophor in optimaler Lage zu anderen Chromophoren gehalten werden, um eine optimale Energieübertragung zu gewährleisten. Daher muß die Photochemie des α -PEC im intakten Phycobilisom weitgehend unterdrückt werden. Über eine Funktion der Photochemie vor oder bei der Assemblierung der Phycobilisomen ist nichts bekannt.

Abschließend ist zu sagen, dass es keine Anhaltspunkte gibt, die auf eine Ähnlichkeit der Photochemie des α -PEC und des Phytochroms schließen lassen. Die Unterschiede scheinen vielmehr so groß, dass das α -PEC nicht als Modellprotein für das Phytochrom dienen kann. Dennoch ist nicht ganz auszuschließen, dass es bei den molekularen Vorgängen während der Photochemie des Phytochroms und des α -PEC Parallelen gibt. Auch kann eine Untersuchung der Interaktion des Proteins mit dem Chromophor während der Photochemie des α -PEC grundlegende Erkenntnisse zur Dynamik von Proteinen liefern, die auch zum Verständnis der Proteindynamik des Phytochroms beitragen könnten.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Rekonstitutionssystem für die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins aus *Mastigocladus laminosus*, einem photochemisch aktiven Bili-protein. Durch gezielte Modifikation des Chromophors und des Apoproteins sollte die Chromophorbindung und die Vorgänge während der Photochemie dieses Chromoproteins untersucht werden.

Rekonstitutionssystem

Es konnte ein Rekonstitutionssystem für die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins etabliert werden. Das Apoprotein für die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins PecA konnte sowohl autokatalytisch als auch enzymatisch rekonstituiert werden. Für die autokatalytischen Rekonstitution wurde das Apoprotein PecA mit einem Phycobilin-Chromophor inkubiert. Für die enzymatische Rekonstitution wurde zusätzlich eine Lyase-Isomerase, bestehend aus zwei Untereinheiten PecE und PecF, eingesetzt. In beiden Fällen kam es zu einer kovalenten Bindung von Chromophoren an das Apoprotein.

Das Apoprotein PecA und die Untereinheiten der Lyase-Isomerase wurden durch Expression in *E. coli* dargestellt. Durch die Einführung von His₆-Tags konnten die Proteine gut aufgereinigt werden und waren so gut löslich, dass NMR-Untersuchungen möglich waren. Die Phycobiline, die als Chromophore dienten, wurden aus Cyanobakterien bzw. Rotalgen isoliert und wurden gegebenenfalls durch chemische Modifikationen verändert.

Autokatalytische Rekonstitution

Das Apoprotein war in der Lage, Phycobiline autokatalytisch zu binden. Voraussetzung für eine Bindung war, dass der Chromophore eine Ethylidengruppe an C-3 aufweist. So wurde z.B. Phycocyanobilin, Phycoerythrobilin und Phytochromobilin gebunden, Biliverdin und Bilirubin dagegen nicht. Neben der Ausbildung der Thioetherbrücke zwischen C-3¹ des Chromophors und dem Cystein 84 des Apoproteins kam es zum Teil zu einer Modifikation der Phycobiline während der Bindung. So kam es zum einen zu einer Oxidation der Δ 2,3-Einfachbindung und zum anderen zu einer Isomerisierung der Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 des Chromophors. Bei der autokatalytischen Bindung des Phycocyanobilins entstand so neben dem Phycocyanobilin-Addukt auch das Mesobiliverdin- und das Phycoviolobilin-Addukt.

Enzymatische Rekonstitution

Auf dem Phycoerythrocyanin-Operon von *Mastigocladus laminosus* sind zwei Gene (*pecE/pecF*) lokalisiert, die den für die Phycocyanobilin-Phycocyanin-Lyase kodierenden Genen *cpcE* und *cpcF* homolog sind. Diese Gene wurden ebenfalls in *E. coli* exprimiert und die Proteine PecE und PecF wurden in der enzymatischen Rekonstitution zusätzlich zum Apoprotein und den Chromophoren eingesetzt. Das für die weiteren Arbeiten wichtige Ergebnis war, dass die Proteine PecE und PecF eine neuartige Reaktion katalysieren, bei der der Phycocyanobilin-Chromophor nicht nur kovalent an das Apoprotein gebunden wird, sondern gleichzeitig zum Phycoviolobilin isomerisiert wird. Die enzymatische Rekonstitution konnte so weit optimiert werden, dass der Anteil des PecA-Phycoviolobilin-Addukt, das eine ausgeprägte Photochemie zeigte und spektral identisch mit der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins war, mehr als 90 % der entstandenen Rekonstitutionsprodukte ausmachte. Für die katalytische Bindung des korrekten Chromophors der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins, dem Phycoviolobilin, sind beide Proteine PecE und PecF notwendig. Sie können daher als Untereinheiten der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase bezeichnet werden.

Während der enzymatischen Chromophorbindung bildet sich wahrscheinlich ein quarternärer Komplex aus den beiden Untereinheiten PecE und PecF, dem Apoprotein PecA und dem Chromophor. Dabei ist die Spezifität der Lyase-Isomerase hoch, sowohl bezüglich des Apoproteins als auch des Chromophors. Neben dem Phycocyanobilin sind lediglich noch das Phytochromobilin und ein weiterer Chromophore bisher ungesicherter Struktur ein gutes Substrat für dieses Enzym. Da auch bei der autokatalytischen Bindung von Phycocyanobilin in geringem Umfang die Isomerisierung des Chromophors zum Phycoviolobilin erfolgt, wäre es möglich, dass die Rolle der Lyase-Isomerase eher die eines Chaperons ist.

Die Photochemie

Sowohl die aus *Mastigocladus laminosus* isolierte als auch die rekonstituierte α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins weisen eine ausgeprägte Photochemie auf. Die Photochemie beruht dabei hauptsächlich auf einer Z/E-Isomerisierung des Phycoviolobilin-Chromophors. Zusätzlich hängt die Photochemie vom Redoxzustand des Proteins ab. Liegen die Cysteine 98 und 99 reduziert vor, wird die Photochemie Typ I beobachtet, wobei die Maxima der beiden Formen der Photochemie, die durch Belichtung bei 500 nm bzw. 577 nm ineinander umgewandelt werden können, 566 nm (Z-Isomer) und 505 nm (E-Isomer) betragen. Wird ein Quecksilbersalz an die Cysteine gebunden oder werden sie oxidiert, so kommt es zur Photochemie Typ II, bei der die Maxima bei 563 nm (Z-Isomer) und 555 nm (E-Isomer) liegen (Zhao & Scheer 1995).

Anhand von Rekonstitutionen mit verschiedenen Chromophoren konnte ein Modell für den Mechanismus der Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins entwickelt werden:

Die Absorptionsänderungen während der Belichtung beruhen bei beiden Typen der Photochemie hauptsächlich auf einer Z/E-Isomerisierung des Phycoviolobilin-Chromophors an der Methinbrücke zwischen den Ringen C und D. Die unterschiedlichen Absorptionen der vier photochemischen Zustände können durch unterschiedliche Torsionswinkel zwischen den Ringen C und D erklärt werden.

Bei der Photochemie Typ I nimmt der Phycoviolobilin-Chromophor nach Belichtung bei 500 nm die Z-Konfiguration mit einem Torsionswinkel zwischen den Ringen C und D von etwa 20° ein. Das absorbierende π -Elektronensystem am Chromophor erstreckt sich dabei über die Ringe B, C und D und das Absorptionsmaximum liegt bei 566 nm. Während der Belichtung bei 577 nm kommt es zu einer Isomerisierung des Chromophors zum E-Isomer. Dieses Isomer weist jedoch einen Torsionswinkel nahe 90° auf, wodurch es zu einer Entkopplung des π -Elektronensystems des D-Rings vom absorbierenden π -Elektronensystem kommt. Damit absorbiert diese Form der Photochemie Typ I deutlich kurzwelliger bei 505 nm.

Der Photochemie Typ II, die sich nach der Modifikation der Cysteine 98 und 99 zeigt, liegt ebenfalls eine Z/E-Isomerisierung des Chromophors zugrunde. Allerdings weisen hier beide Isomere eine geringe Torsion zwischen den Ringen C und D auf. Dadurch besitzen beide Formen der Photochemie Typ II ein ähnlich ausgedehntes π -Elektronensystem über die Ringe B bis D und zeigen auch ähnliche Absorptionsmaxima bei 563 nm bzw. 555 nm. Der Proteinanteil der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins ist an der Photochemie beteiligt, indem es die jeweilige Struktur und Torsion des Chromophors ermöglicht bzw. stabilisiert.

Die Bedeutung der Cystein 98 und 99 für die Struktur und Funktion der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins zeigte sich neben dem Auftreten der Photochemie Typ II nach Modifikation der Cysteine mit PCMS auch anhand der Rekonstitutionsversuche mit modifizierten Apoproteinen, bei denen eines oder beide Cysteine 98 und 99 gegen Serin ausgetauscht wurden. Diese modifizierten Apoproteine waren sehr schlecht löslich und die Chromophorbindung und Photochemie war stark eingeschränkt. Die Cysteine 98 und 99 liegen in einem hochkonservierten Bereich des Biliproteins. Durch deren Modifikation kommt es zu Störungen in diesem Bereich, die starke strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf das Biliprotein haben.

6 Literaturverzeichnis

- Alberte R.S., Wood A.M., Kursar T.A. & Guillard R.L. (1984) Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* sp. Characterization and evolutionary and ecological implications. *Plant Physiol.* 75, 732-739.
- Allen M.B., Dougherty E.C. & McLaughlin J.J. (1959) Chromoprotein pigments of some cryptomonad flagellates. *Nature* 184, 1047-1049.
- Andel F.I., Lagarias J.C. & Mathies R.A. (1996) Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct of phytochrome. *Biochemistry* 35, 15997-16008.
- Andel F.I., Murphy J.T., Haas J.A., McDowell M.T., van der Hoef I., Lugtenburg J., Lagarias J.C. & Mathies R.A. (2000) Probing the photoreaction mechanism of phytochrome through analysis of resonance raman vibrational spectra of recombinant analogues. *Biochemistry* 39, 2667-2676.
- Apt K.E., Collier J.L. & Grossman A.R. (1995) Evolution of the phycobiliproteins. *J. Mol. Biol.* 248, 79-96.
- Arciero D.M., Bryant D.A. & Glazer A.N. (1988a) *In vitro* attachment of bilins to apophycocyanin: I. Specific covalent adduct formation at cysteinyl residues involved in phycocyanobilin binding in C-phycocyanin. *J. Biol. Chem.* 263, 18343-18349.
- Arciero D.M., Dallas J.L. & Glazer A.N. (1988b) *In vitro* attachment of bilins to apophycocyanin: II. Determination of the structures of tryptic bilin peptides derived from the phycocyanobilin adduct. *J. Biol. Chem.* 263, 18350-18357.
- Arciero D.M., Dallas J.L. & Glazer A.N. (1988c) *In vitro* attachment of bilins to apophycocyanin: III. Properties of the phycoerythrobilin adduct. *J. Biol. Chem.* 263, 18358-18363.
- Bald D., Kruij J. & Rögner M. (1996) Supramolecular architecture of cyanobacterial thylakoid membranes: How is the phycobilisome connected with the photosystems? *Photosyn. Res.* 49, 103-118.
- Beale S.I. (1993) Biosynthesis of phycobilins. *Am. Chem. Rev.* 93, 785-802.
- Beale S.I. (2000) Tetrapyrrole biosynthesis in bacteria. In: Lederberg, J. (Hrsg.) *Encyclopedia of Microbiology* (2nd Edition). 558-570, Academic Press, San Diego.
- Berkelman T.R. & Lagarias J.C. (1986) Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 156, 194-201.
- Berzelius J.J. (1808) *Forelasningar Djurkemine* 2, 243.
- Beuhler R.J., Pierce R.C., Friedman L. & Siegelman H.W. (1976) Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. *J. Biol. Chem.* 251, 2405-2411.
- Birnboim C. & Doly J. (1979) Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids. Res.* 7, 1513-1523.
- Bishop J.E., Lagarias J.C., Nagy J.O., Schoenleber R.W. & Rapoport H. (1986) Phycobiliprotein-bilin linkage diversity: I. Structural studies on A- and D-ring-linked phycocyanobilins. *J. Biol. Chem.* 261, 6790-6796.
- Bishop J.E., Rapoport H., Klotz A.V., Chan C.F., Glazer A.N., Füglistaller P. & Zuber H. (1987) Chromopeptides from phycoerythrocyanin: Structure and linkage of the three bilin groups. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 857-881.
- Björn G.S. (1979) Action spectra for *in vivo* and *in vitro* conversions of phycochrome b, a reversibly photochromic pigment in a blue-green alga, and its separation from other pigments. *Physiol. Plant* 46, 281-286.
- Björn L.O. & Björn G.S. (1980) Photochromic pigments and photoregulation in blue-green algae. *Photochem. Photobiol.* 32, 849-852.
- Bonnett R., Davies J.E. & Hursthouse M.B. (1976) Structure of bilirubin. *Nature* 262, 326-328.

- Brandlmeier T., Scheer H. & Rüdiger W. (1981) Chromophore content and molar absorptivity of phytochrome in the P_r form. *Z. Naturforsch.* **36**, 431-439.
- Braslavsky S.E., Holzwarth A.R. & Schaffner K. (1983) Solution conformations, photophysics, and photochemistry of bili-pigments - bilirubin and biliverdin dimethylesters and related linear tetrapyrroles. *Angew. Chem.* **22**, 656-674.
- Braune W., Wilczok T. & Waclawek R. (1988) Indications for photoreversible reactions in the range of phycochrome b absorption obtained by automated microscopic image analysis of germinating *Anabaena* akinetes. *Cytobios.* **54**, 39-48.
- Brejč K., Ficner R., Huber R. & Steinbacher S. (1995) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *Spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **249**, 424-440.
- Briggs W.R. & Rice H.V. (1972) Phytochrome. Chemical and physical properties and mechanism of action. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23**, 293-334.
- Bryant D.A. (1991) Cyanobacterial phycobilisomes: Progress toward complete structural and functional analysis via molecular genetics. In: Bogorad, L. and Vasil, I. L. (Hrsg.) Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol 7B: The Photocynthetic Apparatus: Molecular biology and operation. 257-300, Academic Press, San Diego.
- Bryant D.A. (1982) Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: properties and occurrence in cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 835-844.
- Bryant D.A. (1994) Advances in photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Bryant D.A., Glazer A.N. & Eiserling F.A. (1976) Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Arch. Microbiol.* **110**, 61-75.
- Butler W.L., Norris K.H., Siegelman H.W. & Hendricks S.B. (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **45**, 1703.
- Canaani O., Lipschultz C.A. & Gantt E. (1980) Reassembly of phycobilisomes from allophycocyanin and a phycocyanin-phycoerythrin complex. *FEBS Lett.* **115**, 225-229.
- Chapman D.J., Cole W.J. & Siegelman H.W. (1967) Structure of phycoerythrobilin. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5976-5977.
- Chapman D.J., Cole W.J. & Siegelman H.W. (1968) A comparative study of the phycoerythrin chromophore. *Phytochemistry* **7**, 1831-1835.
- Cheng L., Ma J. & Chiang L. (1990) The complexes formed by biladiene a,b compounds with zinc ions and their application in determination of the chromophore composition of α - and β -subunits of R-phycoerythrin. *Photochem. Photobiol.* **52**, 1071-1076.
- Chereskin B.M., Clement-Metral J.D. & Gantt E. (1985) Characterization of a purified photosystem II-phycobilisome particle preparation from *Porphyridium cruentum*. *Plant Physiol.* **77**, 626-629.
- Clement-Metral J.D., Gantt E. & Redlinger T. (1985) A photosystem II-phycobilisome preparation from the red alga, *Porphyridium cruentum*: Oxygen evolution, ultrastructure, and polypeptide resolution. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 10-17.
- Cole W.J., Chapman D.J. & Siegelman H.W. (1967) Structure of phycocyanobilin. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3643-3645.
- Cornejo J., Beale S.I., Terry M.J. & Lagarias J.C. (1992) Phytochrome assembly. The structure and biological activity of 2(R),3(E)-phytochromobilin derived from phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 14790-14798.
- Davis S.J., Vener A.V. & Vierstra R.D. (1999) Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- Debreczeny M.P., Sauer K., Zhou J. & Bryant D.A. (1995) Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycocyanin. 2. Trimers. *J. Phys. Chem.* **99**, 8420-8431.

- Dekok J. (1982) Photoreactions of the chromophore cations of denatured species of C-Phycocyanin and Allophycocyanin. *Photochem. Photobiol.* 35, 849-851.
- Dolganov N. & Grossman A. (1999) A polypeptide with similarity to phycocyanin α -subunit phycocyanobilin lyase involved in degradation of phycobilisomes. *J. Bacteriol.* 181, 610-617.
- Ducret A., Müller S.A., Goldie K.N., Hefti A., Sidler W.A., Zuber H. & Engel A. (1998) Reconstitution, characterization and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Mol. Biol.* 278, 369-388.
- Ducret A., Sidler W., Wehrli E., Frank G. & Zuber H. (1996) Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidiscoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Eur. J. Biochem.* 236, 1010-1024.
- Düring M., Huber R., Bode W., Rübli R. & Zuber H. (1990) Refined three-dimensional structure of phycoerythrocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* at 2.7 Å. *J. Mol. Biol.* 211, 633-644.
- Düring M., Schmidt G.B. & Huber R. (1991) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 217, 577-592.
- Edington M.D., Riter R.E. & Beck W.F. (1995) Evidence for coherent energy transfer in allophycocyanin trimers. *J. Phys. Chem.* 99, 15699-15704.
- Edington M.D., Riter R.E. & Beck W.F. (1996) Interexciton-state relaxation and exciton localization in allophycocyanin trimers. *J. Phys. Chem.* 100, 14206-14217.
- Elich T.D. & Lagarias J.C. (1989) Formation of a photoreversible phycocyanobilin-apophytochrome adduct *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 264, 12902-12908.
- Engelmann T.W. (1884) *Bot. Z.* 42, 81.
- Fairchild C.D. & Glazer A.N. (1994a) Nonenzymatic bilin addition to the α -subunit of an apophycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 269, 28988-28996.
- Fairchild C.D. & Glazer A.N. (1994b) Oligomeric structure, enzyme kinetics, and substrate specificity of the phycocyanin α -subunit phycocyanobilin lyase. *J. Biol. Chem.* 269, 8686-8694.
- Fairchild C.D., Zhao J., Zhou J., Colson S.E., Bryant D.A., Fisher W.R. & Glazer A.N. (1992) Phycocyanin α -subunit phycocyanobilin lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7017-7021.
- Falk H. (1989) The chemistry of linear oligopyrrols and bile pigments. The chemistry of linear oligopyrrols and bile pigments. Springer Verlag, Wien.
- Fankhauser C. (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 276, 11453-11456.
- Ficner R. & Huber R. (1993) Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23 nm resolution and localization of the γ -subunit. *Eur. J. Biochem.* 218, 103-106.
- Ficner R., Lobeck K., Schmidt G. & Huber R. (1992) Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 228, 935-950.
- Fischer H. & Plieninger H. (1942) Synthese des Biliverdins (Uteroverdins) und Bilirubins, der Biliverdine XIII α und III α , sowie der Vinylneoxanthosäure. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 274, 231.
- Fischer R., Siebzehnrübl S. & Scheer H. (1988) C-phycocyanin from *Mastigocladus laminosus*: Chromophore assignment in higher aggregates by cystein modification. In: Scheer, H., Schneider, S. (Hrsg.) Photosynthetic Light-Harvesting Systems, Organization and Function. 71-76, W. de Gruyter & Co. Berlin.
- Fisher W.R., Taniuchi H. & Anfinsen C.B. (1973) On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 9.
- Foerstendorf H., Benda C., Gärtner W., Storf M., Scheer H. & Siebert F. (2001) FTIR studies of phytochrome photoreactions reveal the C=O bands of the chromophore: consequences for its protonation states, conformation, and protein interaction. *Biochemistry* 40, 14952-14959.
- Förster T. (1967) Mechanism of energy transfer. *Comprehensive Biochemistry.* 22, 61-80.

- Frank G., Sidler W., Widmer H. & Zuber H. (1978) The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 359, 1491-1507.
- Frischauf A.M., Lehrach H., Poustka A. & Murray N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.
- Fritsch F.E. (1952) The structure and reproduction of the algae. University Press, Cambridge.
- Füglister P., Mimuro M., Suter F. & Zuber H. (1987) Allophycoerythrin complexes of the phycobilisome from *Mastigocladus laminosus*. Influence of the linker polypeptide L_c^{8,9} on the spectral properties of the phycobiliprotein subunits. *Biol. Chem. Hoppe Seylers* 368, 353-367.
- Füglister P., Suter F. & Zuber H. (1983) The complete amino-acid sequence of both subunits of phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 364, 691-712.
- Füglister P., Widmer H., Sidler W., Frank G. & Zuber H. (1981) Isolation and characterisation of phycoerythrin and chromatic adaptation of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Arch. Microbiol.* 129, 268-274.
- Furuya M. (1993) Phytochromes: their molecular species, gene families, and functions. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 44, 617-645.
- Gantt E. (1975) Phycobilisomes: Light-harvesting pigment complexes. *BioScience* 25, 781-788.
- Gantt E. (1980) Structure and function of phycobilisomes: light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. *Int. Rev. Cyt.* 66, 45-80.
- Gantt E. (1986) Phycobilisomes. In: Staehelin L.A., Arntzen C.J. (Hrsg.) Photosynthesis III. 327-337, Springer-Verlag, Berlin.
- Gantt E. & Conti S.F. (1965) The ultrastructure of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* 26, 365-381.
- Gantt E. & Conti S.F. (1966a) Granule associate with the chloroplast lamellae of *Porphyridium cruentum*. *J. Cell Biol.* 29, 423-434.
- Gantt E. & Conti S.F. (1966b) Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symp. Biol.* 19, 393-405.
- Gantt E., Lipschultz C.A., Grabowski J. & Zimmerman B.K. (1979) Phycobilisomes from blue-green and red algae. *Plant Physiol.* 63, 615-620.
- Gärtner W. (1997) Das pflanzliche Photorezeptorsystem Phytochrom. *Biol. unserer Zeit* 27, 235-244.
- Glaser M., Sidler W.A. & Zuber H. (1993) Isolation, characterization, reconstitution of phycobiliprotein rod-core linker polypeptide complexes from the phycobilisome of *Mastigocladus laminosus*. *Photochem. Photobiol.* 57, 344-351.
- Glazer A.N. (1988) Phycobilisomes. *Meth. Enzymol.* 167, 304-312.
- Glazer A.N. (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.* 264, 1-4.
- Glazer A.N. & Cohen-Bazire G. (1971) Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 1398-1401.
- Glazer A.N. & Fang S. (1973) Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* 248, 659-662.
- Glazer A.N. & Hixson C.S. (1975) Characterization of R-phycoerythrin. Chromophore content of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 250, 5487-5495.
- Glazer A.N. & Hixson C.S. (1977) Subunit structure and chromophore composition of rhodophycean phycoerythrins. *J. Biol. Chem.* 252, 32-42.
- Gordon A.J. & Ford R.A. (1972) The chemist's companion. A handbook of practical data, techniques, and references. John Wiley & Sons, New York.
- Gossauer A. & Hirsch W. (1974) Bile pigments. IV. Total synthesis of racemic phycocyanobilin (phycobiliverdin) and of homophycobiliverdin. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 9, 1496-1513.

- Gossauer A. & Weller J.P. (1978) Synthesis of bile pigments. 9. Chemical total synthesis of (+)-(2R,16R)- and (+)-(2S,16R)-phycoerythrobilin dimethyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 5982-5933.
- Gottschalk L. (1993) Isolierung von Linker-Polypeptiden und Rekonstitution von Biliprotein-Linker-Komplexen aus *Mastigocladus laminosus*. Dissertation, LMU München.
- Gottschalk L., Fischer R., Lottspeich F. & Scheer H. (1991) Origin of the red-shifted absorption in phycocyanin 632 from *Mastigocladus laminosus*. *Photochem. Photobiol.* 54, 283-288.
- Grossman A.R. & Kehoe D.M. (1997) Phosphorelay control of phycobilisomes biogenesis during complementary chromatic adaptation. *Photosyn. Res.* 53, 95-108.
- Grossman A.R., Lemaux P.G., Conley P.B., Bruns B.U. & Anderson L.K. (1988) Characterization of phycobiliprotein and linker polypeptide genes in *Fremyella diplosiphon* and their regulated expression during complementary chromatic adaptation. *Photosyn. Res.* 17, 23-56.
- Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Hanahan D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover, D. M. (Hrsg.) DNA cloning, a practical approach, 109-135, IRL press, Oxford.
- Haxo F.T. & Fork D.C. (1959) Photosynthetically active accessory pigments of cryptomonads. *Nature* 184, 1051-1052.
- Heintz W. (1851) Über den in den Gallensteinen enthaltenen Farbstoff. *Poggendorffs Ann.* 84, 106.
- Hong Q., Zhao K.H. & Scheer H. (1993) Two different types of photochemistry in phycoerythrocyanin α -subunit. *Photochem. Anal.* 58, 745-747.
- Huber-Pestalozzi G. (1968) Das Phytoplankton des Süßwassers. Band E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- Hughes J. & Lamparter T. (1999) Prokaryotes and phytochrome. The connection to chromophores and signaling. *Plant Physiol.* 121, 1059-1068.
- Hughes J., Lamparter T., Mittmann F., Hartmann E., Gärtner W., Wilde A. & Börner T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* 386, 663.
- Iwakami S., Yoshizawa N., Hamaguchi H., Inoue Y. & Manabe K. (1996) Spectral properties and photoactivities of intermediates of photoconversion from the red light-absorbing to far-red light-absorbing form of pea phytochrome. *J. Photochem. Photobiol.* 33, 239-244.
- John W., Fischer R., Siebzehnrübl S. & Scheer H. (1985) C-phycoyanin from *Mastigocladus laminosus*. Isolation and properties of subunits and small aggregates. In: Michel-Beyerle, M. E. (Hrsg.) Antennas and Reaction Centers of Photosynthetic Bacteria. 17-25, Springer Verlag, Berlin.
- John W. (1986) Phycocyanine aus *Mastigocladus laminosus* und *Spirulina platensis*: Biochemische Charakterisierung, Spektroskopie und Energietransfer in Abhängigkeit vom Aggregationszustand. Dissertation, LMU München.
- Jones A.M. & Erickson H.P. (1989) Domain structure of phytochrome from *Avena sativa* visualized by electron microscopy. *Photochem. Photobiol.* 49, 479-483.
- Jorissen H.J.M.M., Quest B., Lindner I., Tandeau de Marsac N. & Gärtner W. (2002a) Phytochromes with noncovalently bound chromophores: the ability of apophytochromes to direct tetrapyrrole photoisomerization. *Photochem. Photobiol.* 75, 554-559.
- Jorissen H.J.M.M., Quest B., Remberg A., Coursin T., Braslavsky S.E., Schaffner K., Tandeau de Marsac N., Tandeau de Marsac N. & Gärtner W. (2002b) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.* 269, 2662-2671.
- Jung L.J., Chan C.F., Crystal F. & Glazer A.N. (1995) Candidate genes for the phycoerythrocyanin α -subunit lyase and biochemical analysis of pecE and pecF interposon mutants. *J. Biol. Chem.* 270, 12877-12884.
- Kahn K., Mazel D., Houmard J., Tandeau de Marsac N. & Schaeffer M.R. (1997) A role for cpeYZ in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179, 998-1006.

- Kaneko T., Nakamura Y., Wolk C.P., Kuritz T., Sasamoto S., Watanabe A., Iriguchi M., Ishikawa A., Kawashima K., Kimura T., Kishida Y., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Muraki A., Nakazaki N., Shimpo S., Sugimoto M., Takazawa M., Yamada M., Yasuda M. & Tabata S. (2001) Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8, 205-213.
- Kikuchi H., Sugimoto T. & Mimuro M. (1997) An electronic state of the chromophore, phycocyanobilin, and its interaction with the protein moiety in C-phycocyanin C. protonation of the chromophore. *Chem. Phys. Lett.* 274, 460-465.
- Killilea S.D. & O'Carra P. (1985) Structure and apoprotein linkages of phycourobilin. *Biochem. J.* 226, 723-731.
- Klotz A.V. & Glazer A.N. (1985) Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* 260, 4856-4863.
- Kneip C., Hildebrandt P., Schlamann P., Braslavsky S.E., Mark F. & Schaffner K. (1999) Protonation state and structural changes of the tetrapyrrole chromophore during the P_r-P_{fr} phototransformation of phytochrome: A resonance raman spectroscopic study. *Biochemistry* 38, 15185-15192.
- Kufer W. (1980) Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Wechselwirkung in Biliproteiden. Reversible Denaturierung und Darstellung und Charakterisierung von Biliproteiden mit chemisch modifizierten Chromophoren. Dissertation, LMU München.
- Kufer W. & Björn G.S. (1989) Photochromism of the cyanobacterial light-harvesting biliprotein phycoerythrocyanin. *Physiol. Plant* 75, 389-394.
- Kufer W., Hoegner A., Eberlein M., Mayer K., Buchner A. & Gottschalk L. (1991) *unpublished, gene bank M75599*.
- Kunkel T., Tomizawa K.I., Kern R., Furuya M., Chua N.H. & Schäfer E. (1993) *In vitro* formation of a photoreversible adduct of phycocyanobilin and tobacco apophytochrome B. *Eur. J. Biochem.* 215, 587-594.
- Kützing, W. (1843) *Phycolog. Gen.* 21.
- Kylin H. (1910) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 69, 169.
- Kylin H. (1912) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 76, 396.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamparter T., Esteban B. & Hughes J. (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur. J. Biochem.* 268, 4720-4730.
- Lamparter T., Mittmann F., Gärtner W., Börner T., Hartmann E. & Hughes J. (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11792-11797.
- Langer E., Lehner H., Rüdiger W. & Zickendraht-Wendelstadt B. (1980) Circular dichroism of C-phycoerythrin: A conformational analysis. *Z. Naturforsch.* 35c, 637-375.
- Larkum A.W.D., Cox G.C., Hiller R.G., Parry D.L. & Dibbayawan T.P. (1987) Filamentous cyanophytes containing phycourobilin and in symbiosis with sponges and an ascidian of coral reefs. *Marine Biology* 95, 1-13.
- Lemberg R. (1930) *Liebigs Ann. Chem.* 477, 195.
- Lemberg R. (1933) *Liebigs Ann. Chem.* 505, 151.
- Li L. & Lagarias J.C. (1992) Phytochrome assembly. Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J. Biol. Chem.* 267, 19204-19210.
- Lightner D.A., Reisinger M. & Landen G.L. (1986) On the structure of albumin-bound bilirubin. Selective binding of intramolecularly hydrogen-bonded conformational enantiomers. *J. Biol. Chem.* 261, 6034-6038.

- Lundell D.J. & Glazer A.N. (1981) Allophycocyanin B. A common beta subunit in *Synechococcus* allophycocyanin B (λ_{\max} 670 nm) and allophycocyanin (λ_{\max} 650 nm). *J. Biol. Chem.* 256, 12600-12606.
- Lundell D.J., Glazer A.N., DeLange R.J. & Brown D.M. (1984) Bilin attachment sites in the α - and β -subunits of B-phycoerythrin. Amino acid sequence studies. *J. Biol. Chem.* 259, 5472-5480.
- MacColl R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *Journal of Structural Biology* 124, 311-334.
- MacColl R., Guard-Friar D. & Williams E.C. (1992) Spectroscopic studies on phycoerythrin 545, its bilins, and its isoproteins. *J. Luminescence* 51, 21-28.
- Maniatis T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Maruthi Sai P.S., Siebzehrnühl S., Mahajan S. & Scheer H. (1992) Phycoerythrocyanins from *Westiellopsis prolifica* and *Nostoc rivulare*: Characterization of the phycoviolobilin chromophore in both states. *Photochem. Photobiol.* 55, 119-124.
- McDowell M.T. & Lagarias J.C. (2002) Analysis and reconstitution of phytochromes. In: Smith A.G., Witty M. (Hrsg.) Heme, Chlorophyll, and Bilins. 293-309, Humana Press Inc., Totowa, N.J.
- Mizutani Y., Tokutomi S. & Kitagawa T. (1994) Resonance raman spectra of the intermediates in phototransformation of large phytochrome: deprotonation of the chromophore in the bleached intermediate. *Biochemistry* 33, 153-158.
- Mörschel E. & Mühlethaler K. (1983) On the linkage of exoplasmatic freeze-fracture particles of phycobilisomes. *Planta* 158, 451-457.
- Mörschel E. & Rhiel E. (1987) Phycobilisomes and thylakoids: The light-harvesting system of cyanobacteria and red algae. In: Harris J.R., Horne R.W. (Hrsg.) Electron Microsc. Proteins. 6 209-254, Academic Press, London.
- Mullineaux C.W. (1992) Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 1100, 285-292.
- Mullineaux C.W. (1994) Excitation energy transfer from phycobilisomes to photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1184, 71-77.
- Murphy J.T. & Lagarias J.C. (1997) The phytofluors: a new class of fluorescent protein probes. *Curr. Biol.* 7, 870-876.
- Murphy R.F. & O'Carra P. (1970) Reversible denaturation of C-phycoerythrin. *Biochim. Biophys. Acta* 214, 371-373.
- Nagy J.O., Bishop J.E., Klotz A.V., Glazer A.N., Glazer A.N. & Rapoport H. (1985) Bilin attachment sites in the α , β , and γ subunits of R-phycoerythrin. Structural studies on singly and doubly linked phycocouobilins. *J. Biol. Chem.* 260, 4864-4868.
- Nees J. (1837) *Liebigs Ann. Chem.* 17, 75.
- Neubauer U. (2002) Den Proteinen auf der Spur. *Chemie in Labor und Biotechnik* 53, 288-293.
- Nies M. & Wehrmeyer W. (1980) Isolation and biliprotein characterization of phycobilisomes from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn. *Planta* 150, 330-337.
- Nies M. & Wehrmeyer W. (1981) Biliprotein assembly in the hemidiscoidal phycobilisomes of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* Cohn: Characterization of dissociation products with special reference to the peripheral phycoerythrocyanin-phycoerythrin complexes. *Arch. Microbiol.* 129, 374-379.
- O'Carra P. & O'hEocha C. (1966) Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. *Phytochemistry* 5, 993-997.
- O'hEocha C. (1958) Comparative biochemical studies of the phycobilins. *Arch. Biochem. Biophys.* 74, 207-219
- O'hEocha C., O'Carra P. & Carroll D.M. (1961) Phycoerythrocyanin, a prosthetic group of algal chromoproteins. *Biochem. J.* 80, 25-28.
- O'hEocha C. & Raftery M. (1959) Phycoerythrin and phycocyanin of cryptomonads. *Nature* 184, 1049-1051.

- Ong L.J. & Glazer A.N. (1987) R-phycoyanin II, a new phycoyanin occurring in marine *Synechococcus* species. Identification of the terminal energy acceptor bilin in phycoyanins. *J. Biol. Chem.* 262, 6323-6327.
- Parbel A. (1997) Charakterisierung von Phycobiliprotein-Linkerkomplexen aus dem Phycobilisom von *Mastigocladus laminosus*. Vergleich nativer und überexprimierter Linker. Dissertation, LMU München.
- Parbel A., Zhao K.H., Breton J. & Scheer H. (1997) Chromophore assignment in phycoerythrocyanin from *Mastigocladus laminosus*. *Photosynth. Res.* 54, 25-34.
- Park C.M., Shim J.Y., Yang S.S., Kang J.G., Kim J.I., Luka Z. & Song P.S. (2000) Chromophore-apoprotein interactions in *Synechocystis* sp. PCC 6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry* 39, 6349-6356.
- Parker M.W., Hendricks S.B., Borthwick H.A. & Scully N.J. (1945) *Science* 102, 152.
- Pizarro S.A. & Sauer K. (2001) Spectroscopic study of the light-harvesting protein C-phycoyanin associated with colorless linker peptides. *Photochem. Photobiol.* 73, 556-563.
- Plöscher M. (2003) ¹³C und ¹⁵C isotopenmarkiertes α -Phycoerythrocyanin: Rekonstitution und Aufreinigung für die NMR-Spektroskopie. Diplomarbeit, LMU München.
- Quail P.H. (1994) Phytochrome genes and their expression. In: Kendrick R.E., Kronenberg G.H.M. (Hrsg.) *Photomorphogenesis in plants*. 71-104, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Quail P.H. (2002) Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 85-93.
- Reuter W. & Nickel-Reuter C. (1993) Molecular assembly of the phycobilisomes from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. Photochem. Photobiol.* 18, 51-66.
- Rüdiger W. (1971) Gallenfarbstoffe und Biliproteide. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 29, 60-139.
- Rüdiger W. (1994) Phycobiliproteins and phycobilins. In: Round F.E., Chapman D.J. (Hrsg.) *Progress in phycological research*. 10, 97-135, Biopress, Bristol.
- Rüdiger W. & Correll D.L. (1969) Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Protein-Bindung. *Liebigs Ann. Chem.* 723, 208.
- Rüdiger W. & Thümmler F. (1991) Phytochrom, das Sehpigment der Pflanzen. *Angew. Chem.* 103, 1242-1254.
- Rüdiger W., Thümmler F., Cmiel E. & Schneider S. (1983) Chromophore structure of the physiologically active form (P_{fr}) of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6244-6248.
- Sauer K., Scheer H. & Sauer P. (1987) Förster transfer calculations based on crystal structure data from *Agmenellum quadruplicatum* C-phycoyanin. *Photochem. Photobiol.* 46, 427-440.
- Scharnagl C. & Schneider S. (1989) UV visible absorption and circular dichroism spectra of the subunits of C-phycoyanin. I: Quantitative assessment of the effect of chromophore-protein interaction in the α -subunit. *J. Photochem. Photobiol.* 3, 603-614.
- Scheer H. (1981) Biliproteine. *Angew. Chem.* 93, 230-250.
- Scheer H. (1982) Phycobiliproteins: Molecular aspects of photosynthetic antenna system. In: Fong F.K. (Hrsg.) *Light reaction path of photosynthesis*. 7-45, Springer Verlag, Berlin.
- Scheer H. (1984) Model compounds for the phytochrome chromophore. In: Smith H. (Hrsg.) *Techniques in photomorphogenesis*. 227-257, Academic Press, London.
- Scheer H. (1986) Excitation transfer in phycobiliproteins. In: Staehelin L.A., Arntzen C.J. (Hrsg.) *Photosynthesis III. Encyclopedia of plant physiology*, Vol. 19. 327-337, Springer-Verlag, Berlin.
- Scheer H. (1999) Pigmente und Antennenkomplexe. In: Häder D.P. (Hrsg.) *Photosynthese*. 65-90, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Scheer H. (2003) The pigments. In: Green B.R., Parson W.W. (Hrsg.) *Light-harvesting antennas in photosynthesis*. 29-81, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Scheer H., Formanek H. & Schneider S. (1982) Theoretical studies of biliprotein chromophores and related bile pigments by molecular orbital and ramachandran type calculation. *Photochem. Photobiol.* 36, 259-272.

- Scheer H. & Kufer W. (1977) Studies on plant bile pigments. IV. Conformational studies on C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Z. Naturforsch.* 32c, 513-519.
- Scheer H., Linsenmeier U. & Krauss C. (1977) Studies on plant bile pigments. II. Chemical and photochemical oxygenation of a phytochrome P_r chromophore model pigment to purpurins. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 358, 185-196.
- Schirmer T., Bode W., Huber R., Sidler W. & Zuber H. (1985) X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structure. *J. Mol. Biol.* 184, 257-277.
- Schluchter W.M. & Bryant D.A. (2002) Analysis and reconstitution of phycobiliproteins: methods for the characterization of bilin attachment reactions. In: Smith A.G., Witty M. (Hrsg.) Heme, Chlorophyll, and Bilins. 293-309, Humana Press Inc., Totowa, N. J.
- Schluchter W.M. & Glazer A.N. (1999) Biosynthesis of phycobiliproteins in cyanobacteria. In: Peschek G., Löffelhardt W., Schmetterer G. (Hrsg.) The phototrophic prokaryotes. 83-95, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York .
- Schmidt G., Siebzehnrübl S., Fischer R. & Scheer H. (1988) Photochromic properties of C-phycoerythrin. In: Scheer H., Schneider S. (Hrsg.) Photosynthetic light-harvesting systems. Organisation and function. 77-89, W. de Gruyter & Co, Berlin.
- Schmidt G., Siebzehnrübl S., Fischer R., Rüdiger W., Scheer H., Schirmer T., Bode W. & Huber R. (1987) ZZE-configuration of chromophore β -153 in C-phycoerythrin from *Mastigocladus laminosus*. *Z. Naturforsch.* 42, 845-848.
- Schneider S., Prenzel C.-J., Brehm G., Gottschalk L., Zhao K.H. & Scheer H. (1995) Resonance-enhanced CARS spectroscopy of biliproteins. Influence of aggregation and linker proteins on chromophore structure in allophycoerythrin (*Mastigocladus laminosus*). *Photochem. Photobiol.* 62, 847-854.
- Schoenleber R.W., Leung S.L., Lundell D.J., Glazer A.N. & Rapoport H. (1983) Chromopeptides from phycoerythrins. Structure and linkage of a phycoerythrin tryptic tripeptide derived from a B-phycoerythrin. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 4072-4076.
- Schoenleber R.W., Lundell D.J., Glazer A.N. & Rapoport H. (1984) Bilin attachment sites in the α - and β - subunits of B-phycoerythrin. Structural studies on the singly linked phycoerythrins. *J. Biol. Chem.* 259, 5485-5489.
- Schopfer P. & Brennicke A. (1999) Pflanzenphysiologie. Springer-Verlag, Berlin.
- Schram B.L. & Kroes H.H. (1971) Structure of phycocyanobilin. *Eur. J. Biochem.* 19, 581-594.
- Scurlock R.D., Evans C.H., Braslavsky S.E. & Schaffner K. (1993) A phytochrome phototransformation study using two-laser/two-color flash photolysis: I₇₀₀ is a mandatory intermediate in the P_r - P_{fr} phototransformation. *Photochem. Photobiol.* 58, 106-115.
- Sheldrick W.S. (1976) Crystal and molecular structure of biliverdin dimethyl ester. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 13, 1457-1462.
- Sidler W. (1994) Phycobilisomes und phycobiliprotein structures. In: Bryant D.A. (Hrsg.) Advances in photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria. 139-216, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Sidler W., Gysi J., Isker E. & Zuber H. (1981) The complete amino acid sequence of both subunits of allophycoerythrin, a light harvesting protein-pigment complex from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 362, 611-628.
- Sidler W., Kumpf B., Rüdiger W. & Zuber H. (1986) The complete amino-acid sequence of C-phycoerythrin from the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem* 367, 627-642.
- Siebert F., Grimm R., Rüdiger W., Schmidt G. & Scheer H. (1990) Infrared spectroscopy of phytochrome and model pigments. *Eur. J. Biochem.* 194, 921-928.
- Siebzehnrübl S. (1990) Chromophorzuordnung und reversible Photochemie von C-Phycocyaninen und Phycoerythrocyaninen. Dissertation, LMU München.

- Siebzehnrübl S., Fischer R., Kufer W. & Scheer H. (1989) Photochemistry of phycobiliproteins: reciprocity of reversible photochemistry and aggregation in phycoerythrocyanin from *Mastigocladus laminosus*. *Photochem. Photobiol.* 49, 753-761.
- Siedel W. & Fischer H. (1933) Über die Konstitution des Bilirubins, Synthese der Neo- und der Isonoxanthobilirubinsäure. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 214, 145.
- Singh B.R. & Song P.S. (1990) A differential molecular topography of P_r and P_{fr} forms of native oat phytochrome as probed by fluorescence quenching. *Planta* 181, 263-267.
- Singh B.R., Song P.S., Eilfeld P. & Rüdiger W. (1989) Differential exposure of aromatic amino acids in the red-light-absorbing and far-red-light-absorbing forms of 124-kDa oat phytochrome. *Eur. J. Biochem.* 184, 715-721.
- Smith H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature* 407, 585-591.
- Städeler G. (1864) Über die Farbstoffe der Galle. *Liebigs Ann. Chem.* 132, 323.
- Stanek M. & Grubmayr K. (1998a) Deprotonated 2,3-dihydrobilindiones - models for the chromophore of the far-red-absorbing form of phytochrome. *Chem. Eur. J.* 4, 1660-1666.
- Stanek M. & Grubmayr K. (1998b) Protonated 2,3-dihydrobilindiones - models for the chromophores of phycocyanin and the red-absorbing form of phytochrome. *Chem. Eur. J.* 9, 1653-1659.
- Stanek M. & Grubmayr K. (2000) Synthesis of a model for phycocyanin with respect to the acid-base chemistry between protein and chromophore. *Monatsh. Chem.* 131, 879-888.
- Storf M., Parbel A., Meyer M., Strohmann B., Scheer H., Deng M.G., Zheng M., Zhou M. & Zhao K.H. (2001) Chromophore attachment to biliproteins: specificity of PecE/PecF, a lyase-isomerase for the photoactive 3¹-Cys- α 84-phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin. *Biochemistry* 40, 12444-12456.
- Studier F.W. & Moffat B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Suter G.W. & Holzwarth A.R. (1987) A kinetic model for the energy transfer in phycobilisomes. *Biophys. J.* 52, 673-683.
- Swanson R.V., de Lorimier R. & Glazer A.N. (1992) Genes encoding the phycobilisome rod substructure are clustered on the *Anabaena* chromosome: Characterization of the phycoerythrocyanin operon. *J. Bacteriol.* 174, 2640-2647.
- Swanson R.V., Ong L.J., Wilbanks S.M. & Glazer A.N. (1991) Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria: II. Characterization of phycobiliproteins with unusually high phycourobilin content. *J. Biol. Chem.* 266, 9528-34.
- Swanson R.V., Zhou J., Leary J.A., Williams T., de Lorimier R., Bryant D.A. & Glazer A.N. (1992) Characterization of phycocyanin produced by *cpcE* and *cpcF* mutants and identification of an intergenic suppressor of the defect in bilin attachment. *J. Biol. Chem.* 267, 16146-16154.
- Tandeau de Marsac N. (1977) Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 130, 82-91.
- Tandeau de Marsac N. & Cohen-Bazire G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1635-1639.
- Tegmo-Larsson I.M., Braslavsky S.E., Culshaw S., Ellul R.M., Nicolau C. & Schaffner K. (1981) Phytochrome models. 6. Conformation control by membrane of biliverdin dimethyl ester incorporated into lipid vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7152-7158.
- Terry M.J., McDowell M.T. & Lagarias J.C. (1995) (3Z)- and (3E)-phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore. *J. Biol. Chem.* 270, 11111-11118.
- Thein S.L. & Wallace R.B. (1986) The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Davis K. E. (Hrsg.) Human genetic diseases: a practical approach. 33-50, IRL Press, Herndon, VA.
- Thenard L.J. (1807) *Mem. Phys. Chim. Arc.* 1, 23.

- Thümmler F., Rüdiger W., Cmiel E. & Schneider S. (1983) Chromopeptides from phytochrome and phycocyanin. NMR studies of the P_{fr} and P_r chromophore of phytochrome and E,Z isomeric chromophores of phycocyanin. *Z. Naturforsch.* **38c**, 359-368.
- Tokutomi S., Nakasako M., Sakai J., Kataoka M., Yamamoto K.T., Wada M., Tokunaga F. & Furuya M. (1989) A model for the dimeric molecular structure of phytochrome based on small-angle X-ray scattering. *FEBS Lett.* **247**, 139-142.
- Tooley A.J. & Glazer A.N. (2002) Biosynthesis of the cyanobacterial light-harvesting polypeptide phycoerythrocyanin holo- α -subunit in a heterologous host. *J. Bacteriol.* **184**, 4666-4671.
- Troxler R.F., Brown A.S. & Brown S.B. (1979) Bile pigment synthesis in plants. Mechanism of oxygen-18 incorporation into phycocyanobilin in the unicellular rhodophyte, *Cyanidium caldarium*. *J. Biol. Chem.* **254**, 3411-3418.
- Virchow R. (1847) Die pathologischen Pigmente. *Arch. Pathol. Anatom. Physiol. Klin. Med.* **1**, 378.
- Vogelmann T.C. & Scheibe J. (1978) Action spectra for chromatic adaptation in the blue-green alga *Fremyella diplosiphon*. *Planta* **143**, 233-239.
- Wahleithner J.A., Li L.M. & Lagarias J.C. (1991) Expression and assembly of spectrally active recombinant holophytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10387-10391.
- Wedemayer G.J., Kidd D.G. & Glazer A.N. (1996) Cryptomonad biliproteins: Bilin types and locations. *Photosyn. Res.* **48**, 163-170.
- Wedemayer G.J., Kidd D.G., Wemmer D.E. & Glazer A.N. (1992) Phycobilins of cryptophycean algae: Occurrence of dihydrobiliverdin and mesobiliverdin in cryptomonad biliproteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 7315-7331.
- Wedemayer G.J., Wemmer D.E. & Glazer A.N. (1991) Phycobilins of cryptophycean algae. Structures of novel bilins with acryloyl substituents from phycoerythrin 566. *J. Biol. Chem.* **266**, 4731-4741.
- Wehrmeyer W. (1983) Phycobiliproteins and phycobiliprotein organization in the photosynthetic apparatus of cyanobacteria, red algae, and cryptophytes. In: Jensen U., Fairbrothers D.E. (Hrsg.) *Proteins and nucleic acids in plant systematics*. 144-167, Springer Verlag, Berlin.
- Weller J.P. & Gossauer A. (1980) Synthesis of bile pigments. X. Synthesis and photoisomerization of racemic phytochromobilin dimethyl ester. *Chem. Ber.* **113**, 1603-1611.
- Wemmer D.E., Wedemayer G.J. & Glazer A.N. (1993) Phycobilins of cryptophycean algae: Novel linkage of dihydrobiliverdin in a phycoerythrin 555 and a phycocyanin 645. *J. Biol. Chem.* **268**, 1658-1669.
- Wendler J., John W., Scheer H. & Holzwarth A.R. (1986) Energy-transfer in trimeric C-phycoyanin studied by picosecond fluorescence kinetics. *Photochem. Photobiol.* **44**, 79-85.
- Wu D., Zhu J.P., Scheer H. & Zhao K.H. (2002) *unpublished, gene bank AF506031*.
- Wüthrich K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*. John Wiley & Sons, New York.
- Yanisch-Perron C., Viera J. & Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-109.
- Yatsuhashi H. & Kobayashi H. (1993) Bibliographic information dual involvement of phytochrome in light-oriented chloroplast movement in *Dryopteris sparsa* protonemata. *J. Photochem. Photobiol.* **19**, 25-31.
- Yu M.H., Glazer A.N. & Williams R.C. (1981) Cyanobacterial phycobilisomes. Phycocyanin assembly in the rod substructures of *Anabaena variabilis* phycobilisomes. *J. Biol. Chem.* **256**, 13130-13136.
- Zhao F., Zheng X., Zhang J., Wang H., Yu Z., Zhao J. & Jiang L. (1998) Energy transfer in allophycoyanin hexamer from *Anabaena variabilis* by time-resolved spectroscopy. *J. Photochem. Photobiol.* **45**, 144-149.
- Zhao K.H., Deng M.G., Zheng M., Parbel A., Storf M., Meyer M., Strohmam B. & Scheer H. (2000) Novel activity of a phycobiliprotein lyase: both the attachment of phycocyanobilin and the isomerization to phycoviolobilin are catalyzed by the proteins PecE and PecF encoded by the phycoerythrocyanin operon. *FEBS Lett.* **469**, 9-13.

- Zhao K.H., Haessner R., Cmiel E. & Scheer H. (1995) Type I reversible photochemistry of phycoerythrocyanin involves Z/E-isomerization of α -84 phycoviolobilin chromophore. *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 235-243.
- Zhao K.H., Hong Q., Siebzehnrübl S. & Scheer H. (1993) Phycoerythrocyanin: A photorezeptor pigment with two faces. In: Shima A., Ichihashi M., Fujiwara Y. & Takebe H. (Hrsg.) *Frontiers of Photobiology*. 31-36, Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam.
- Zhao K.H., Ran Y., Sun Y.N., Li M., Zhou M., Storf M., Bubenzer C. & Scheer H. (in Vorbereitung) The two photochromic biliproteins: α -subunit of phycoerythrocyanin and cyanobacterial phytochrome in the same cyanobacterium PCC 7120.
- Zhao K.H. & Scheer H. (1995) Type I and type II reversible photochemistry of phycoerythrocyanin α -subunit from *Mastigocladus laminosus* both involve Z,E isomerization of phycoviolobilin chromophore and are controlled by sulfhydryls in apoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1228, 244-253.
- Zhao K.H., Wu D., Wang L., Zhou M., Storf M., Bubenzer C., Strohmam B. & Scheer H. (2002) Characterization of phycoviolobilin phycoerythrocyanin- α 84-cystein-lyase-(isomerizing) from *Mastigocladus laminosus*. *Eur. J. Biochem.* 269, 4542-4550.
- Zhou J., Gasparich G.E., Stirewalt V.L., de Lorimier R. & Bryant D.A. (1992) The *cpcE* and *cpcF* genes of *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J. Biol. Chem.* 23, 16138-16145.
- Zickendraht-Wendelstadt B. (1980) Spektraluntersuchungen von nativem und denaturiertem C-Phycoerythrin und dessen Untereinheiten aus dem Cyanobakterium *Pseudanabaena* W 1173. Die Rolle der Chromophore bei der Energieübertragung. Dissertation, LMU München.

Lebenslauf

Name	Maximilian Storf
Geburtstag	05.11.1967
Geburtsort	Garmisch-Partenkirchen
1973 - 1978	Grundschule Wallgau
1978 - 1984	Werdenfels-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen Abschluss: Mittlere Reife
1984 - 1987	Ausbildung bei der AOK Garmisch-Partenkirchen Abschluss: Sozialversicherungsfachangestellter
1987 - 1988	Verwaltungsassistent bei der AOK Garmisch-Partenkirchen
1988 - 1991	Münchenkolleg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (2. Bildungsweg)
1991- 1992	Wehrdienst in Brannenburg
1992 - 1998	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilian-Universität, München
Jan. - Okt. 1998	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytochemie des botanischen Instituts der LMU München bei Prof. Dr. Hugo Scheer
Jan. 1999	Beginn der Promotion am gleichen Lehrstuhl unter der Leitung von Prof. Dr. Hugo Scheer