
α -Phycoerythrocyanin

Dynamik des reversiblen Photochromismus und
Lyase-katalysierte Holoproteinassamblierung

Stephan Joachim Böhm



München 2006

- meinen Eltern -

α -Phycoerythrocyanin

**Dynamik des reversiblen Photochromismus und
Lyase-katalysierte Holoproteinassemblierung**

Stephan Joachim Böhm

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

vorgelegt von
Stephan Joachim Böhm
aus Anzing

München 2006

Erstgutachter:

Prof. Dr. H Scheer

Zweitgutachter:

Prof. Dr. L. A. Eichacker

Tag der mündlichen Prüfung:

26. September 2006

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Zhao, K. H., Ran, Y., Li, M., Sun, Y.-N., Zhou, M., Storf, M., Kupka, M., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2004) Photochromic Biliproteins from the Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120: Lyase Activities, Chromophore Exchange, and Photochromism in Phytochrome AphA. *Biochemistry* **43**: 11576-11588.
- Zhao, K. H., Zhu, J. P., Song, B., Zhou, M., Storf, M., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2004) Non-enzymatic chromophore attachment in biliproteins: Conformational control by the detergent Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**: 131-145.
- Zhao, K. H., Wu, D., Zhou, M., Zhang, L., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2005) Amino acid residues associated with enzymatic activity of the isomerizing phycoviolobilin-lyase PecE/F. *Biochemistry* **44**: 8126-8137.
- Zhao, K. H., Su, P., Böhm, S., Song, B., Zhou, M., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2005) Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, L_{cm}, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**: 81-87.
- Zhao, K. H., Wu, D., Zhang, L., Zhou, M., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2006) Chromophore attachment in phycocyanin. Functional amino acids of phycocyanobilin- α -phycocyanin lyase and evidence for chromophore binding. *FEBS J.* **273**: 1262-1274.
- Böhm S., Endres S., Zhao K. H., Scheer H. Towards the mechanism of chromophore attachment in biliproteins: the α -subunit of phycoviolobilin: α -phycoerythrocyanin lyase. (in Vorbereitung)

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl III des Departments Biologie I – Bereich Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Scheer angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. Hugo Scheer, für die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Sein großes Interesse an dieser Arbeit sowie seine fortlaufende Unterstützung, seine stete Diskussionsbereitschaft, die vielen Anregungen und die mir gewährte große Freiheit bei der Arbeit haben zu einer sehr angenehmen und kreativen Arbeitsatmosphäre beigetragen.

Prof. Dr. K. H. Zhao (College of Life Sciences and Technology, China) möchte ich für die gute und ergiebige Zusammenarbeit sowie für interessante Diskussionen danken.

M. Krajewski und Dr. T. A. Holak (MPI für Biochemie, Martinsried) danke ich für die gelungene Kooperation im Rahmen des α -PEC-Projekts.

Bei PD Dr. M. Schmidt, Dr. A. Krasselt, Anamika Patel (Department für Physik, TU München) bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des α -PEC-Projekts sowie für interessante Einblicke in die Kristallographie.

Ganz besonders möchte ich mich bei Steffi Endres, Thomas Kling und Georg Kronhuber für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Zulassungsarbeiten bedanken. Spannende Experimente und anregende Diskussionen bereicherten unseren Laboralltag.

Ein großes Dankeschön geht an Claudia Bubenzer und Brigitte Wilhelm für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Protein- und Pigmentisolierung.

Matthias Plöscher und Bernhard Granvogel (Arbeitsgruppe Prof. L. A. Eichacker) danke ich für die Aufnahmen von Massenspektren.

Für die tolle Atmosphäre im Labor, für die Unterstützung sowie Erlebnisse in- und außerhalb des Labors möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanken: Steffi Pröll, Leegyan Kwa, Adela Garcia, Max Storf, Ines Haame, Jörg Dandler, Paula Braun, Siegfried Siebzehnrübel, Alexander Parzur, Hildrun Niemeier, Shinta Limantara, Tatas Brotosudarmo, Brigitte Strohmann, Claudia Bubenzer, Brigitte Wilhelm, Michaela Kupka, Günther Gabriel, Sebastian Kotlarski sowie beim Lutz'schen Arbeitskreis, insbesondere bei Sandra Vengadasalm und Uli Noller.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester mit Familie und meinem Bruder Michael für ihre großartige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Beate und Doris danke ich ganz herzlich für ihre Liebe und Freundschaft.

Abkürzungen

α -PC	α -Untereinheit von Phycocyanin
α -PEC	α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin
APC	Allophycocyanin
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
CCA	komplementäre chromatische Adaptation
CpcE, CpcF	Untereinheiten der Phycocyanobilin: α -Phycocyanin-Lyase
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DBV	15,16-Dihydrobiliverdin
dq	Dublett eines Quartetts
GPC	Gelpermeationschromatographie
His ₆ -PecA	Apoprotein der α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin mit N-terminalen His ₆ -Tag
His ₆ -PecE, His ₆ -PecF	Untereinheiten der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase mit N-terminalen His ₆ -Tag
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
IES	Iodessigsäure
m	Multiplett
MBV	Mesobiliverdin
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
OD	Optische Dichte, bezogen auf 1 cm Lichtstrecke
PecA	Apoprotein der α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin
PecE, PecF	Untereinheiten der Phycoviolobilin-Phycoerythrocyanin- α 84-Cystein-Lyase- Isomerase
PecX ^{IES}	mit IES modifizierte Proteine PecA, PecE bzw. PecF
PCB	Phycocyanobilin
PCB-DME	Phycocyanobilin-Dimethylester
PE	Phycoerythrin
PEB	Phycoerythrobilin
PEB-DME	Phycoerythrobilin-Dimethylester
PEC	Phycoerythrocyanin
PUB	Phycourobilin
PVB	Phycoviolobilin

PΦB	Phytochromobilin
q	Quartett
s	Singulett
t	Triplett
TOSCY	Total Correlation Spectroscopy
v/v, w/v	Volumen/Volumen, Gewicht/Volumen

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Gallenfarbstoffe und Biliproteide	1
1.1.1 Historisches	1
1.1.2 Biosynthese	1
1.1.3 Vorkommen	2
1.2 Phycobilisomen	7
1.2.1 Aufbau und Funktion der Phycobilisomen	7
1.2.2 Aufbau der Phycobiliproteine	8
1.3 Phycoerythrocyanin	11
1.4 Chromophorbinding an Apo-Biliproteine.....	13
1.5 Phycoviolobilin-PEC- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase (PecE/F).....	16
1.6 Aufgabenstellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Geräte.....	19
2.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien.....	21
2.3 Organismen	25
2.4 Plasmide.....	25
2.5 Molekularbiologische Arbeiten.....	26
2.5.1 Plasmid-DNA-Gewinnung.....	26
2.5.2 Agarosegelelektrophorese.....	26
2.5.3 Klonierung (Restriktion, Ligation).....	26
2.5.4 Transformation.....	27
2.6 Proteinchemische Arbeiten.....	28
2.6.1 Anzucht von <i>E. coli</i>	28
2.6.2 Expression der Proteine in <i>E. coli</i>	28
2.6.3 Darstellung von isotopenmarkiertem α -PEC	28
2.6.4 Zellaufschluss	29
2.6.5 Proteinreinigung.....	29
2.6.6 Dialyse und Konzentrierung von Proteinen	30
2.6.7 Tryptischer Verdau von Biliproteinen	30
2.7 Chromophorisolierung und –reinigung	31
2.7.1 Isolierung von Phycocyanobilin (PCB).....	31
2.7.2 Isolierung von Phycoerythrobilin (PEB)	32
2.8 Chromatographische Methoden	32
2.8.1 Chromatographie von Bilinen	32
2.8.2 Proteinanalytische Arbeiten	33
2.8.3 Gel-Permeationschromatographie (GPC).....	36

2.8.4 Semipräparative HPLC	36
2.9 Spektroskopie	37
2.9.1 UV/VIS-Spektroskopie	37
2.9.2 Fluoreszenzspektroskopie	37
2.9.3 Zeitaufgelöste Spektroskopie	38
2.9.4 Massenspektroskopie	38
2.9.5 CD-Spektroskopie.....	38
2.9.6 NMR-Spektroskopie.....	38
2.10 Rekonstitutionen von Biliproteinen	39
2.10.1 Darstellung von mini- α -PEC für NMR- und Kristallisationsexperimente	40
2.10.2 Kristallisation von mini- α -PEC	41
2.10.3 Rekonstitutionsexperimente	41
2.11 Bioinformatische Methoden	42
2.11.1 Datenbanken	42
2.11.2 Sequenzanalysen	42
2.11.3 Software.....	43
3 Ergebnisse und Diskussion	44
3.1 Vergleich der Rekonstitutionssysteme zur <i>in vitro</i> -Rekonstitution der α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin	45
3.1.1 <i>E. coli</i> -Lysatsystem.....	45
3.1.2 Phosphatpuffersystem	46
3.1.3 Tris/HCl-System.....	47
3.2 Mini- α -PEC: Darstellung, Charakterisierung und Dynamik	48
3.2.1 Rekonstitution und Reinigung von α -PEC	49
3.2.2 Strategien zur Darstellung von mini- α -PEC.....	54
3.2.3 Charakterisierung von mini- α -PEC	59
3.2.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen von mini- α -PEC.....	63
3.2.5 Kristallisation von mini- α -PEC	66
3.3 Bilinaddukte mit apo- α -Phycoerythrocyanin (PecA)	67
3.3.1 Rekonstitution von PecA mit Phycocyanobilin (PCB)	69
3.3.1.1 Autokatalytische Bindung von PCB an PecA.....	72
3.3.1.2 PecE-katalysierte Bindung von PCB an PecA.....	76
3.3.1.3 PecE/F-katalysierte Bindung von PCB an PecA.....	87
3.3.1.4 Spektroskopische Untersuchungen zur Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte	92
3.3.2 Rekonstitution von PecA mit Phycocyanobilin-Dimethylester (PCB-DME).....	100
3.3.2.1 Autokatalytische Bindung von PCB-DME an PecA.....	106
3.3.2.2 PecE-katalysierte Bindung von PCB-DME an PecA.....	108
3.3.2.3 PecE/F-katalysierte Bindung von PCB-DME an PecA.....	110

3.3.3	Rekonstitution von PecA mit Phycoerythrobilin (PEB).....	112
3.3.3.1	Autokatalytische Bindung von PEB an PecA.....	114
3.3.3.2	PecE-katalysierte Bindung von PEB an PecA.....	116
3.3.3.3	PecE/F-katalysierte Bindung von PEB an PecA.....	119
3.3.4	Rekonstitution von PecA mit Thia-Phycocyanobilin (S-PCB).....	123
3.3.4.1	Autokatalytische Bindung von S-PCB an PecA.....	125
3.3.4.2	PecE-katalysierte Bindung von S-PCB an PecA.....	127
3.3.4.3	PecE/F-katalysierte Bindung von S-PCB an PecA.....	130
3.3.5	Proteingebundene Biline - Substrate zur Rekonstitution von PecA.....	136
3.4	Die Bedeutung von Cysteinen bei der Chromophorbinding.....	140
3.5	Chromophorbinding an die Lyase-Untereinheiten PecE und PecF.....	144
3.5.1	Aminosäuresequenz der Lyase- α -Untereinheit PecE.....	145
3.5.2	Aminosäuresequenz der Lyase- β -Untereinheit PecF.....	148
3.5.3	Interaktion von PCB mit der Lyase- α -Untereinheit PecE.....	150
3.5.4	Interaktion von PCB mit der Lyase- β -Untereinheit PecF.....	154
3.5.5	Übertragung des lyasegebunden Chromophors auf das Apoprotein PecA.....	158
3.6	Protein-Protein-Interaktionen.....	163
3.6.1	Homo-Proteinkomplexe.....	163
3.6.1.1	Apoprotein PecA.....	164
3.6.1.2	Lyase- α -Untereinheit PecE.....	165
3.6.1.3	Lyase- β -Untereinheit PecF.....	166
3.6.2	Hetero-Proteinkomplexe.....	167
3.6.2.1	Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Lyase-Untereinheiten PecE und PecF.....	167
3.6.2.2	Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Lyase-Untereinheiten und dem Apoprotein PecA.....	168
3.6.2.3	Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase- β -Untereinheit und dem Apoprotein PecA.....	170
3.6.2.4	Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase- α -Untereinheit und dem Apoprotein PecA.....	172
3.6.2.5	Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase- α -Untereinheit, dem Apoprotein und PCB.....	175
3.6.2.6	Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase, dem Apoprotein PecA und PCB.....	177
4	Abschließende Diskussion.....	181
4.1	Photochemie von α -PEC.....	181
4.2	Chromophorbinding.....	183
5	Zusammenfassung.....	194
6	Literaturverzeichnis.....	197

1 Einleitung

1.1 Gallenfarbstoffe und Biliproteide

1.1.1 Historisches

Die Bezeichnung Gallenfarbstoffe oder Biline für lineare Tetrapyrrole leitet sich vom Hauptfarbstoff der Galle bei Säugetieren, dem Bilirubin, ab. Thenard (Thenard 1807) und Berzelius (Berzelius 1808) extrahierten gelbe und grüne Farbstoffe aus Gallensteinen. Diese Farbstoffe wurden später von Virchow als Abbauprodukte des roten Blutfarbstoffs, dem Hämoglobin, erkannt (Virchow 1847). Der grüne Farbstoff wurde von Heintz als Biliverdin (Heintz 1851) und der gelbe Farbstoff von Städeler als Bilirubin bezeichnet (Städeler 1864). Im ersten Drittel des vergangenen Jahrhunderts wurde die Molekülstruktur des Bilirubins als offenkettiges Tetrapyrrol durch Siedel und Fischer aufgeklärt (Siedel *et al.* 1933). Die ungewöhnliche dreidimensionale Struktur von Bilirubin wurde 1976 von Bonnett *et al.* (Bonnett *et al.* 1976) durch Röntgenkristallographie gelöst.

1.1.2 Biosynthese

Die Biosynthese von Phytobilinen und Chlorophyllen beginnt mit der Bildung des Porphobilinogens (PBG) aus acht Molekülen 5-Aminolävulinsäure (ALA) (Abbildung 1-1). Vier PBG werden zum zyklischen Uroporphyrinogen III verknüpft (Leeper 1991). Das Uroporphyrinogen III wird durch mehrere enzymatische Schritte zum Protoporphyrin IX, das als Vorstufe zur Bildung von Häm und Chlorophyllen dient. Mit der Öffnung des Häm-Porphyrinrings durch die Häm-Oxygenase (Cornejo *et al.* 1998) erfolgt der erste Schritt zur Bildung der Phytobiline. Das dabei entstehende Produkt Biliverdin IX α wird durch ferredoxinabhängige Bilinreduktasen (FDBRs) zu Phytobilinen reduziert (Beale 1993). FDBRs finden sich in allen Organismen, die oxygene Photosynthese betreiben (Frankenberg *et al.* 2001).

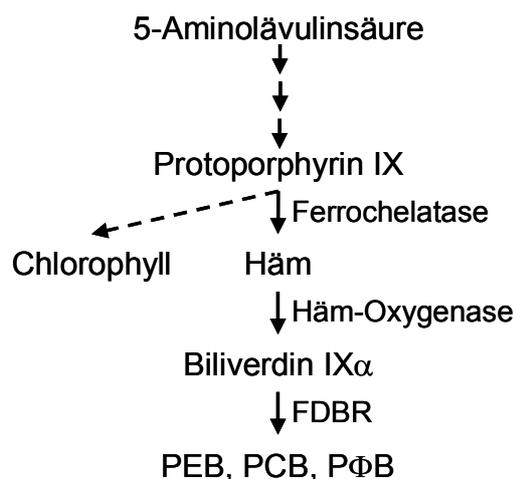


Abbildung 1-1: Schema der Synthese der Biline Phycoerythrobilin (PEB), Phycocyanobilin (PCB) und Phytochromobilin (PΦB).

1.1.3 Vorkommen

Biline bei Säugetieren entstehen durch den Abbau des roten Blutfarbstoffs Hämoglobin. Dabei wird durch oxidative Ringöffnung an C5 des Fe-Protoporphyrins-IX unter Verlust des Eisenatoms Biliverdin gebildet. Während das Eisen im Körper verbleibt, wird Biliverdin durch die Biliverdin-Reduktase zum Bilirubin reduziert (Petryka *et al.* 1979, Schmid *et al.* 1979). Das im wässrigen Medium schwer lösliche Bilirubin wird direkt oder als Konjugat nichtkovalent an Serumalbumin gebunden und so über den Blutkreislauf abtransportiert (Blauer 1974, Emerson 1989). Wirbellose Tiere verwenden Biline häufig als Farbstoff (Arthropoda, (Choussy *et al.* 1975, Bois-Choussy *et al.* 1978)) oder als Abwehrstoff (*Aplysia* [marine Opisthobranchier] (Rüdiger 1970)). Sie kommen auch in Eierschalen bei Coelenterata, Vögeln und Echsen vor (Rüdiger 1970). Gegenüber Chlorophyllen besitzen die linearen Tetrapyrrole als Farbstoff den Vorteil, dass sie nicht phototoxisch sind.

Die Gallenfarbstoffe bei Pflanzen und photosynthetischen Bakterien sind, bis auf wenige Ausnahmen, stets kovalent an Proteine gebunden. Biliproteine kommen in Cyanobakterien, Rotalgen und Cryptophyten vor und können dort bis zu 40% des Gesamtproteingehalts der Zelle erreichen (Bogorad 1975). Dadurch prägen die Biliproteine, je nach Pigmentzusammensetzung, oftmals das farbliche Erscheinungsbild dieser Algen. Die bläuliche Färbung mancher Cyanobakterien geht

auf Phycocyanin zurück, während das rote Phycoerythrin das Hauptpigment der Rotalgen darstellt.

In Pflanzen und photosynthetisch aktiven Bakterien übernehmen die Biline wichtige Aufgaben der Lichtwahrnehmung (Phytochrome) sowie der Lichtsammlung (Phycobiliproteide). Die Chromophore der Phycobiliproteide (Tabelle 1-1 und Abbildung 1-2) sind offenkettige Tetrapyrrole, die sich durch Lage und Anzahl ihre Doppelbindungen und somit in ihren Absorptionsmaxima voneinander unterscheiden. Phycobiline sind kovalent als Thioether an Cysteine von Proteinen gebunden (Kylin 1910, 1912, Rüdiger 1971, Glazer 1980, Scheer 1981, Bishop *et al.* 1987, MacColl 1987). Neben der Ausdehnung des konjugierten π -Elektronensystems spielt die Interaktion zwischen dem Chromophor und dem Protein eine wichtige Rolle beim Absorptions- und Fluoreszenzverhalten der Phycobiliproteide (Scheer *et al.* 1977, Zickendraht-Wendelstadt *et al.* 1980, Scheer 1981).

Tabelle 1-1:Phycobiline

	konjugierte Doppelbindungen als 3¹-Cys-Phycobilin
Phytochromobilin (PΦB)	9
Phycocyanobilin (PCB)	8
Phycoviolobilin (PVB)	7
Phycoerythrobilin (PEB)	6
Phycourobilin (PUB)	5

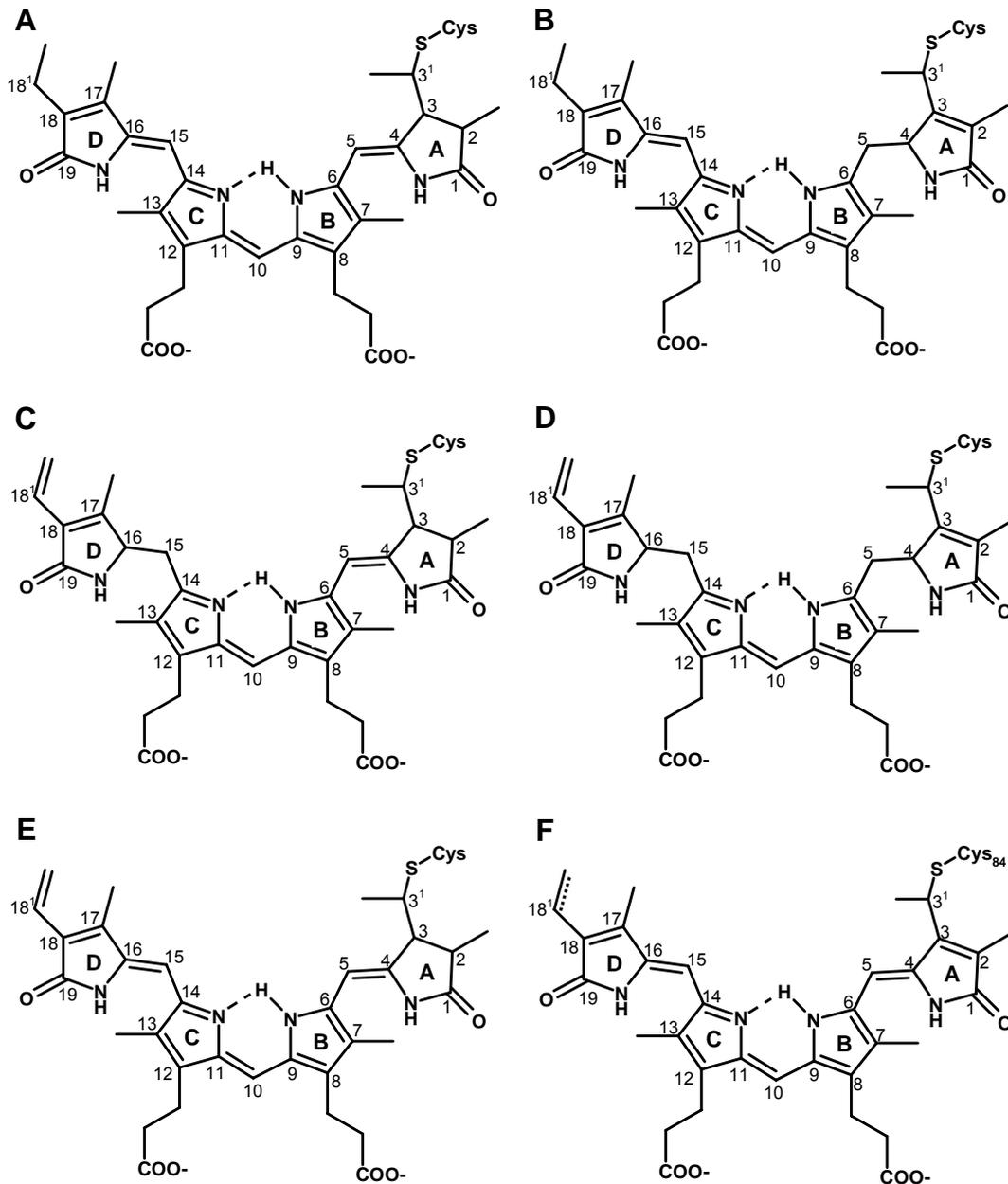


Abbildung 1-2: Strukturformeln der gebundenen Chromophore in Phycobiliproteinen. Die gestreckte Konformation der Phycobiline entspricht der Konformation, die in den Röntgenstrukturen der Biliproteine am meisten gefunden wurde. Dabei findet meist eine Drehung des Chromophors aus der Ebene statt. Die Nomenklatur erfolgte nach Scheer (Scheer 2003). A: 3¹-Cys-Phycocyanobilin, B: 3¹-Cys-Phycoviolobilin, C: 3¹-Cys-Phycoerythrobilin, D: 3¹-Cys-Phycourobilin, E: 3¹-Cys-Phytochromobilin, F: 3¹-Cys-Mesobiliverdin, die angedeutete Doppelbindung an C18¹ steht für Biliverdin.

Phytochrom, das in grünen Pflanzen, Cyanobakterien, einigen photosynthetischen, aber auch in nicht photosynthetisch aktiven Bakterien (Parker *et al.* 1945, Hughes *et*

al. 1997, Davis *et al.* 1999) als Photorezeptorsystem vorkommt, trägt als Chromophor Phytochromobilin, Phycocyanobilin oder Biliverdin (Rüdiger *et al.* 1994, Wu *et al.* 1997, Lamparter *et al.* 2004). Das Phytochromsystem dient bei Pflanzen zur Steuerung von Entwicklungs- und Bewegungsvorgängen (z. B. Chloroplastenentwicklung, Samenkeimung, Blütenbildung), während die Funktion des Phytochroms bei Bakterien noch weitgehend ungeklärt ist (Davis *et al.* 1999). Das Phytochrom kann in zwei unterschiedlich absorbierenden Formen vorliegen: P_{fr} (Absorption von dunkelrotem Licht bei $\lambda \approx 730$ nm) und P_r (Absorption von hellrotem Licht bei $\lambda \approx 660$ nm). Die beiden unterschiedlichen Absorptionsformen entstehen durch eine reversible Photochemie ($\Delta 15,16$ -Z/E-Isomerisierung des Chromophors) (Briggs *et al.* 1972, Rüdiger *et al.* 1991), die zu unterschiedlichen Proteinkonformationen führt. Diese unterschiedlichen Proteinkonformationen bedingen eine physiologische Antwort innerhalb der Pflanze (Yatsushashi *et al.* 1993, Gärtner 1997, Smith 2000). 2005 gelang die Kristallisation und Röntgenstrukturbestimmung der Chromophordomäne des Phytochroms in der P_r -Form aus *Deinococcus radiodurans* mit einer Auflösung von 2.5 Å (Wagner *et al.* 2005).

In *Synechocystis sp.* wurde ein phytochromähnliches System (PixJ1) mit einer ungewöhnlichen reversiblen Photochemie entdeckt (Yoshihara *et al.* 2004). Dabei kommt es nicht zu einem Wechsel der Absorption zwischen Hellrot und Dunkelrot, sondern zu einem Blau-Grün-Wechsel. Das Tetrapyrrol in diesem, durch Licht schaltbaren System, ist möglicherweise ein vom PCB abgeleiteter Chromophor (Yoshihara *et al.* 2006).

Manche Cyanobakterien können die Zusammensetzung der Phycobilisomen verändern, um sich an variierende Lichtverhältnisse anzupassen. Bei dieser komplementären chromatischen Adaptation (CCA) werden die zum eingestrahnten Licht komplementären Antennenpigmente vermehrt gebildet (Bennett *et al.* 1973, Bryant *et al.* 1981). Neben der Umstrukturierung der Antennenkomplexe (Füglister *et al.* 1981, Parbel 1997) wird bei der CCA auch die Linkersynthese stark beeinflusst (Tandeau de Marsac *et al.* 1977, MacColl 1998). Um eine Veränderung der Lichtverhältnisse registrieren zu können, sind Lichtrezeptoren notwendig. In Anlehnung an das Phytochrom wurden diese hypothetischen Rezeptoren Phycochrome genannt (Björn *et al.* 1976). Bislang konnte noch kein Phycochrom

isoliert werden, ihre Verwandtschaft zu den Phycobiliproteiden lässt sich aufgrund ihrer Aktionsspektren vermuten. Yoshihara *et al.* (Yoshihara *et al.* 2004) isolierten aus *Synechocystis sp.* (PCC6803) einen phytochromähnlichen Lichtrezeptor, PixJ1, der möglicherweise einen Blaulichtrezeptor darstellt und für die Phototaxis somit ein sensorisches Chromoprotein darstellt (Choi *et al.* 1999, Ng *et al.* 2003, Yoshihara *et al.* 2006).

Phycobiliproteide als Lichtsammler kommen hauptsächlich in Cyanobakterien, Rhodophyta (Rotalgen) und Cryptophyta vor und machen bei diesen Organismen bis zu 40% des Gesamtproteingehalts aus (Haxo *et al.* 1959, Bogorad 1975). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Chromophorzusammensetzung und somit ihrer Absorptionseigenschaften lassen sie sich in vier große Klassen einteilen:

Tabelle 1-2: Hauptklassen der Phycobiliproteine

	Absorption im sichtbaren Bereich (nm)
Phycoerythrin (PE)	500-575
Phycoerythrocyanin (PEC)	500-575
Phycocyanin (PC)	590-640
Allophycocyanin (APC)	620-670

Native Phycobiliproteide besitzen im Gegensatz zu den freien Bilinen hervorragende Absorptionseigenschaften (Steigerung der Absorption gegenüber freien Bilinen um mehr als das Fünffache) und eine lange Lebensdauer des angeregten Zustands (Erhöhung um fast vier Größenordnungen) und dienen in der Grünlücke der Chlorophylle als Antennenpigmente für die Photosynthese (Scheer *et al.* 1977, Scheer 1982, 2003). Diese Absorptionseigenschaften entstehen durch die gestreckte Einlagerung der Tetrapyrrole in die Bindungstasche des Proteins, wodurch die Beweglichkeit des Tetrapyrrols im Vergleich zum freien Bilin stark eingeschränkt wird. Dadurch zeigen isolierte Biliproteinuntereinheiten eine starke Fluoreszenz (Scheer 1999).

1.2 Phycobilisomen

1.2.1 Aufbau und Funktion der Phycobilisomen

Phycobilisomen wurden von Gantt *et al.* (Gantt *et al.* 1965, 1966a, Gantt *et al.* 1966b) elektronenmikroskopisch erstmals bei der Rotalge *Porphyridium cruentum* erfasst und als Lichtsammlerkomplexe von Cyanobakterien und Rotalgen erkannt (Wehrmeyer 1983, Gantt 1986). Dabei sitzen die Phycobilisomen als große, hoch organisierte Antennenkomplexe der Thylakoidmembran bei Cyanobakterien und Rotalgen auf (Glazer 1987, Zuber 1987, Gantt 1988, Bryant 1991, Sidler 1994, Bald *et al.* 1996). Die vom Phycobilisom absorbierte Energie wird in der Regel auf Photosystem II übertragen (Chereskin *et al.* 1985, Clement-Metral *et al.* 1985), wobei unter bestimmten Lichtbedingungen auch eine Übertragung der Energie auf Photosystem I stattfinden kann (Sidler 1994, Bald *et al.* 1996). Abbildung 1-3 zeigt die schematische Darstellung der Thylakoidmembran mit hemidiscoidalem Phycobilisomtyp.

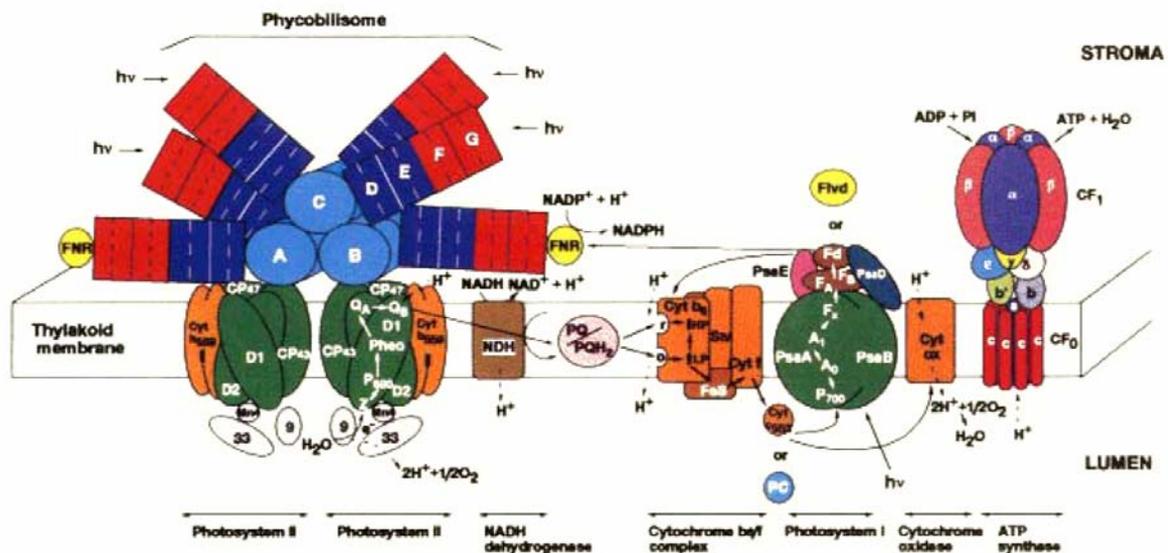


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der cyanobakteriellen Thylakoidmembran mit hemidiscoidalem Phycobilisomtyp (Bryant 1994). Der Kern des Phycobilisoms besteht aus Allophycocyanin (A, B, C). Die orthogonal dazu ausgerichteten Stäbchen sind aus Phycocyanin (D, E) sowie Phycoerythrin bzw. Phycoerythrocyanin (F, G) aufgebaut.

Morphologisch können fünf unterschiedliche Phycobilisomfamilien unterschieden werden. Dabei ist der hemidiscoidale Typ am weitesten verbreitet und am besten untersucht (Mörschel *et al.* 1977, Gantt 1980, Nies *et al.* 1980, Sidler 1994, Ducret *et al.* 1996, Ducret *et al.* 1998, MacColl 1998). Er besteht aus einem Kern, der aus zwei, drei oder fünf parallel zur Thylakoidmembran liegenden kurzen Stäbchen besteht, und aus zwei bis acht peripheren Stäbchen, die senkrecht auf den Stäbchen des Kerns stehen. Kern und Stäbchen sind aus Doppelscheiben aufgebaut, die aus jeweils zwei trimeren Phycobiliproteinen bestehen und durch Aggregation einen hexameren Komplex bilden (Ficner *et al.* 1992, MacColl 1998). Der Kernbereich enthält Allophycocyanine (APC) und die APC-assoziierten Linkerproteine (kleiner Linker L_C und großer Kernmembranlinker L_{CM}). Die Linkerproteine tragen zur Assemblierung und Stabilisierung des Phycobilisoms, zur Verankerung in der Thylakoidmembran und zum Energietransfer bei (Glazer 1989, Sidler 1994). Die peripheren Stäbchen bestehen aus zwei bis vier scheibchenförmigen (6 nm x 11 nm) Phycobiliproteinhexameren (Glick *et al.* 1982), die so angeordnet sind, dass ein Energietransfer in Richtung abnehmender Energie die Excitonen zum Kern „lenkt“. Deshalb sind in den peripheren Stäbchen die energetisch höher absorbierenden Phycobiliproteine Phycoerythrin (PE) bzw. Phycoerythrocyanin (PEC) ganz außen und die etwas längerwellig absorbierenden Phycocyanine (PC) zum Kern des Phycobilisoms hin orientiert. Das Allophycocyanin (APC) im Kern, das die langwelligste Absorption aufweist, kann die Energie schließlich auf das Chlorophyll *a*, vorrangig im Photosystem II, übertragen (Gantt 1975, Sidler 1994, Bald *et al.* 1996). Die Morphologie und die Bioenergetik des Phycobilisoms sind so kombiniert, dass ein absorbiertes Photon mit hoher Wahrscheinlichkeit (>95%) und in sehr kurzer Zeit (≈ 100 ps) zum Reaktionszentrum der Photosynthese gelangt (Glazer 1989, MacColl 1998).

1.2.2 Aufbau der Phycobiliproteine

Phycobilisomen dissoziieren in Puffern geringer Ionenstärke in ihre Bestandteile, die Bili- und Linkerproteine, und können somit spektroskopisch analysiert werden. (Füglister *et al.* 1981, Glazer 1988). Die grundlegende Einheit der Phycobiliproteine ist ein trimeres Aggregat aus zwei Untereinheiten, α und β , die in äquimolarem Verhältnis vorkommen $(\alpha\beta)_3$ (Glazer *et al.* 1971) und

Molekulargewichte zwischen 15 und 20 kDa besitzen. Dabei dimerisieren die α - und β -Untereinheit, indem die jeweiligen N-terminalen X- und Y-Helices aggregieren und so das $\alpha\beta$ -Monomer bilden. Während die α -Untereinheit meist nur ein bis zwei Phycobiline trägt, kann die β -Untereinheit bis zu vier Chromophore besitzen (Rüdiger 1994). Die scheibenförmigen Trimere mit einem Durchmesser von 11 nm und einer Dicke von 3 nm besitzen ein zentrales Loch mit einem Durchmesser von 3 nm (Schirmer *et al.* 1985, Schirmer *et al.* 1987, Dürring *et al.* 1990, Dürring *et al.* 1991, Ficner *et al.* 1992) (Abbildung 1-4).

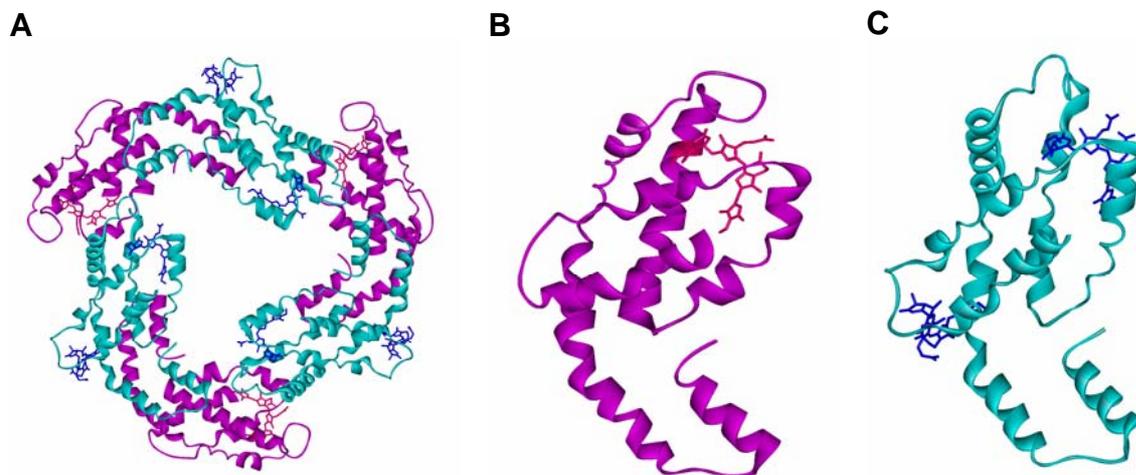


Abbildung 1-4: Röntgenkristallstruktur des Phycoerythrocyanin-Trimers (A), der α -Untereinheit (B) und der β -Untereinheit (C) aus *Mastigocladus laminosus* (Dürring *et al.* 1990). Die kovalent gebundenen Chromophore sind farbig hervorgehoben: dunkelrot (PVB), blau (PCB).

Die Trimere lagern sich mit Hilfe von Linkerproteinen zu Hexameren zusammen. Neben unpigmentierten Linkerproteinen tragen die chromophorbesitzenden Linkerproteine zur effizienten Energieweiterleitung innerhalb des Phycobilisoms bei. Die Linkerproteine sind für die strukturelle Organisation des Phycobilisoms notwendig, damit ein effizientes Antennensystem entsteht (Bryant *et al.* 1991, Sidler 1994, Six *et al.* 2005). Reuter *et al.* (Reuter *et al.* 1999) konnten für den Allophycoyanin-Linkerkomplex (AP.LC7.8) aus *M. laminosus* zeigen, dass dieser sich im zentralen Loch des scheibenförmigen Trimers befindet. Die Phycobiliproteine (PE, PEC, APC, PC) der Cyanobakterien und Rotalgen zeigen eine deutliche Homologie sowohl in ihrer Aminosäuresequenz (Apt *et al.* 1995, MacColl 1998) als auch in ihrer dreidimensionalen Struktur (Schirmer *et al.* 1985, Schirmer *et al.* 1987,

Düring *et al.* 1990, Düring *et al.* 1991, Ficner *et al.* 1992, Brejc *et al.* 1995, Liu *et al.* 1999, Stec *et al.* 1999, Padyana *et al.* 2001).

Allophycocyanine besitzen als Chromophor ausschließlich PCB (Glazer *et al.* 1973b), während die Phycocyanine, Phycoerythrocyanine und CU-Phycoerythrine unterschiedliche Chromophortypen tragen. So besitzt die α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins einen PVB-Chromophor, während die β -Untereinheit zwei PCB-Chromophore trägt. Tabelle 1-3 gibt einen Überblick über den Phycobilingehalt und die Bindungsstellen in verschiedenen Biliproteinen. Aus dieser Tabelle ist zudem ersichtlich, dass die Cysteine der Chromophorbindingstellen stark konserviert sind (MacColl 1998).

Tabelle 1-3: Phycobilingehalt und Chromophorbindingstellen diverser Biliproteine.

Biliprotein ¹	Bindungsstelle 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

(Frank *et al.* 1978, Sidler *et al.* 1981, Füglistaller *et al.* 1983, Klotz *et al.* 1985, Sidler *et al.* 1986, Ong *et al.* 1987, Swanson *et al.* 1991)

* Konsensussequenz; ^a *Synechococcus sp.* (WH8103) PE(I); ^b *Synechococcus sp.* (WH8020) PE(II) ¹ Bei der Nomenklatur der Biliproteine gibt der vorangestellte Buchstabe die Organismengruppe, aus dem das Biliprotein stammt, an. C: Cyanobakterien, R: Rotalgen, B: Bangiophycidae (Unterklasse der Rotalgen), CU: bei Phycoerythrinen zur Kennzeichnung der beiden Chromophore PEB und PUB.

1.3 Phycoerythrocyanin

Phycoerythrocyanin (PEC) wurde 1976 erstmals in den Cyanobakterien *Anabaena sp.* (PCC6411) und *Anabaena variabilis* entdeckt und ersetzt dort das Phycoerythrin (Bryant *et al.* 1976). 1981 konnte es aus *Mastigocladus laminosus* (*Fischerella sp.*) ebenfalls isoliert werden (Füglistaller *et al.* 1981, Nies *et al.* 1981). 1990 gelang die Kristallisation und Bestimmung der dreidimensionalen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 2,7 Å (Düring *et al.* 1990). Phycoerythrocyanin besteht aus der rosafarbenen α -Untereinheit, die einen Phycoviolobilin-Chromophor am Cystein84 trägt und aus der blauen β -Untereinheit, die zwei Phycocyanobilin-Chromophore an Cystein84 und Cystein155 besitzt.

Tabelle 1-4: Phycoerythrocyanin - Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften

PEC	Chromophor (Anzahl) Bindungsstelle	λ_{\max} (nm)	Fluoreszenz- Emissionsmaximum (nm) ^a
PEC		574, 540 ^s , 590 ^s	625
α -Untereinheit	PVB (1) α -Cys-84	505/568 ^a	-*/584 ^a
β -Untereinheit	PCB (2)	602 ^a	617 ^a
	β -Cys-84	606 ^b	636 ^b
	β -Cys-155	590 ^b	619 ^b

^a Tris- (1 M, pH 6.0) bzw. Phosphat-Puffer (50 mM K₂HPO₄, 0,5 M NaCl, pH 7.0); ^b (Zehetmayer 2003); ^s Schulter; * keine Fluoreszenz der bei 505 nm absorbierenden Form

PEC wurde spektroskopisch intensiv untersucht, insbesondere die α -Untereinheit, da diese eine reversible Photochemie aufweist, die der des Phytochroms ähnlich, aber blauverschoben ist (MacColl *et al.* 1981, Kufer *et al.* 1989, Siebzehnrübl *et al.* 1989, Maruthi Sai *et al.* 1992). Diese reversible Photochemie (Typ I, Abbildung 1-5) wurde mit verschiedenen spektroskopischen Methoden untersucht, um den zugrundeliegenden Mechanismus und mögliche Intermediate aufzuklären (Siebzehnrübl *et al.* 1989, Hong *et al.* 1993, Foerstendorf *et al.* 1997, Kneip *et al.* 1998, Zhao *et al.* 1999).

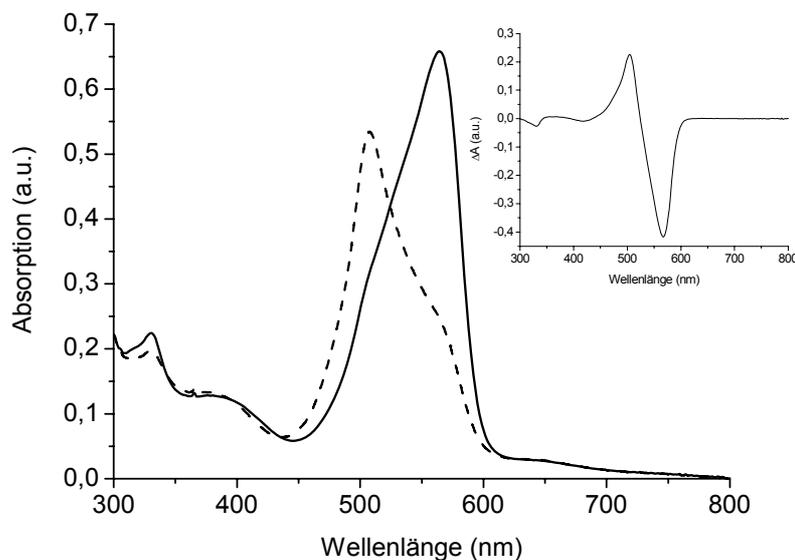


Abbildung 1-5: Absorptionsspektren und Differenzspektrum (Inset) der reversiblen Photochemie von α -PEC. Nach Belichtung mit 500 nm (—) und 570 nm (- - -); Inset: Differenzspektrum der Belichtung.

Die Photochemie beruht auf einer $\Delta 15,16$ -*Z/E*-Isomerisierung des PVB-Chromophors. Dabei besitzt das *E*-Isomer ein Absorptionsmaximum bei 505 nm und kann durch Belichtung mit blaugrünem Licht in das *Z*-Isomer mit einem Absorptionsmaximum bei 568 nm überführt werden. Die Rückbelichtung in das *E*-Isomer erfolgt mit gelbgrünem Licht. Die Absorptionsspektren der beiden Isomere zeigen jeweils Schultern in den Bereichen des entsprechenden Gegenisomers. Dies deutet auf eine nicht vollständige Isomerisierung des Chromophors hin. Durch Belichtung in die *E*-Form wird der Ring D nicht ganz in die Ebene des π -Elektronensystems gedreht, sodass es zu einer partiellen Entkopplung des π -Elektronensystems vom Ring D kommt (Storf 2003).

Eine zweite Photochemie (Typ II) lässt sich bei der α -Untereinheit durch Modulation der Redoxzustände der Cysteine 98/99, die ca. 17 Å vom PVB-Chromophor entfernt liegen, induzieren. Diese beinhaltet ebenfalls eine *E/Z*-Isomerisierung des PVB-Chromophors, jedoch kommt es durch die modifizierten Cysteine 98/99 zu anderen Chromophor-Proteininteraktionen und somit zu anderen Absorptionsspektren. Liegen die beiden Cysteine im reduzierten Zustand vor, lässt sich die Typ I-Photochemie induzieren, liegen die Cysteine oxidiert vor, kommt es zur Typ II-Photochemie (Zhao *et al.* 1995a, Zhao *et al.* 1995b).

Eine reversible Photochemie erfolgt bei der *in vitro*-rekonstituierten α -Untereinheit nur mit den kovalent gebundenen PVB- und P Φ B-Chromophoren. Diese besitzen im proteingebundenen Zustand beide eine Δ 2,3- und Δ 15,16-Doppelbindung, die notwendige Voraussetzungen für die Photochemie sind (Storf *et al.* 2001, Storf 2003).

1.4 Chromophorbindung an Apo-Biliproteine

Die Phycobiline der Phycobiliproteine sind kovalent über eine Thioetherbindung an die entsprechenden Apoproteine gebunden. In einigen Fällen kommen auch doppelt gebundene Chromophore vor, bei denen es neben der Thioetherbindung an C³ zusätzlich zu einer Bindung über C18¹ an das Apoprotein kommt (Nagy *et al.* 1985, Bishop *et al.* 1986, Bishop *et al.* 1987). Über den Mechanismus der regio- und stereospezifischen Bindung ist bislang wenig bekannt. Generell können drei Mechanismen die Bindung ermöglichen:

➤ Autokatalytische Bindung

Bei der autokatalytischen Bindung kommt es zur spontanen Chromophorylierung des Apoproteins, möglicherweise schon während des Faltungsprozesses. Diese Art der Bilin-Addition wird beim Phytochrom und beim ApcE, dem Kernmembranlinker, beobachtet (Quail *et al.* 1995, Borucki *et al.* 2003, Zhao *et al.* 2005a). Im Gegensatz dazu entstehen bei der autokatalytischen Addition von Phycobilinen an Apo-Phycoerythrin- und Apo-Phycocyanin-Untereinheiten *in vitro* hauptsächlich Additionsprodukte, die nicht den nativen Biliproteinen entsprechen. Die Reaktion von PEB mit Apo- α -Phycoerythrin führt hauptsächlich zu Cys-82-15,16-Dihydrobiliverdin- und Cys-139-Urobilin-Addukten, während PCB zu Cys-82-Phycocyanobilin- und Cys-82-Mesobiliverdin-Addukten reagiert (Fairchild *et al.* 1994). Ein ähnliches Rekonstitutionsverhalten zeigt sich bei der Addition von PEB und PCB an Apo-Phycocyanin. Die Addition von PEB und PCB an Apo-Phycocyanin führten bei der Bindung an α -Cys-84 und β -Cys-84 teilweise zur Oxidation und damit zu einer zusätzlichen Doppelbindung im PEB- bzw. PCB-Chromophor zwischen C2 und C3 im Ring A (Arciero *et al.* 1988b, 1988c). Bei der spontanen Addition von PCB und PEB *in vitro* kommt es zu keiner Selektivität zwischen den beiden Chromophoren, die auf eine Spezifität

der Apoproteine bei der Bindung hindeutet. Die autokatalytische Chromophoraddition an Cys-84 der β -Untereinheiten von CpcB und PecB soll durch das Detergenz Triton X-100 inhibiert werden, während dadurch gleichzeitig Cys-155 selektiv mit PCB chromophoryliert werden kann (Zhao *et al.* 2004). Eine autokatalytische, regio- und stereospezifische Bindung der Biline an Apo-Phycobiliproteine scheint, bis auf ApcE *in vivo*, unwahrscheinlich.

➤ Unspezifische Lyasen

Eine weitere Möglichkeit der Chromophorbindung an die Apoproteine besteht darin, dass eine kleine Familie von Lyasen existiert, die, in Analogie zu anderen posttranslational-modifizierenden Enzymen (Phosphatasen, Glykosylasen), multiple Phycobilin-Bindungsstellen erkennt. Jedoch ist die Stereochemie von PCB an den Bindungsstellen von C-Phycocyanin unterschiedlich. So wird PCB an α -Cys-84 und β -Cys-82 in 3^1 -R-Konfiguration gebunden, während die Bindung von PCB an β -Cys-153 in der 3^1 -S-Konfiguration erfolgt (Schirmer *et al.* 1985, Schirmer *et al.* 1986, Schirmer *et al.* 1987, Schluchter *et al.* 1999).

➤ Spezifische Lyasen

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass spezifische Lyasen für die Chromophorbindung existieren. Eine spezifische Lyase erkennt jeweils eine Phycobilin-Bindungsstelle und bindet selektiv einen bestimmten Chromophor regio- und stereospezifisch an ein bestimmtes Apoprotein. Erste Hinweise auf eine spezifische Lyase wurden 1992 entdeckt. Das Cyanobakterium *Synechococcus sp.* (PCC7001) besitzt acht Bilinbindungsstellen auf sieben Apoproteinen, die alle den gleichen Chromophor, PCB, tragen. Werden zwei Gene im Phycocyanin-Operon, *cpcE* und *cpcF* gemeinsam oder getrennt voneinander durch Insertionen inaktiviert, zeigt nur die PC- β -Untereinheit eine korrekte Chromophorbindung. Die Chromopeptide der PC- α -Untereinheit zeigen als Hauptprodukt ein Mesobiliverdin-Addukt (Fairchild *et al.* 1992, Swanson *et al.* 1992, Zhou *et al.* 1992). Weitere *cpcE* und *cpcF*-Mutanten wurden auch für andere Organismen beschrieben (Tandeau de Marsac *et al.* 1990, Bhalerao *et al.* 1994). Jung *et al.* fanden im *pec*-Operon von *Anabaena sp.* (PCC7120) zwei Gene, *pecE* und *pecF*, die eine ausgeprägte Homologie zu den *cpcE*- und *cpcF*-Gensequenzen aufweisen. Den Phycobilisomen von *pecE*- und *pecF*-Insertions-Mutanten fehlte Holo-Phycoerythrocyanin, während ca. 30% vom Wildtyp-Gehalt

der β -Untereinheit vorhanden waren. In einer *pecEF*-Deletionsmutante lag die α -Untereinheit als PCB-Addukt und nicht als PVB-Addukt mit der β -Untereinheit in einem Verhältnis von 1:1 vor (Jung *et al.* 1995). Das zeigt, dass sowohl PecE als auch PecF für eine korrekte Chromophorylierung von Apo- α -PEC (PecA) erforderlich sind. Mögliche weitere Gene für Bilin-Lyasen wurden in Operons gefunden, die Phycobiliproteingene enthalten. Diese Gensequenzen weisen eine weit geringere Homologie zu CpcEF und PecEF auf, besitzen aber eine konservierte Region von zehn Aminosäuren (Wilbanks *et al.* 1993). Die *mpeUV*, *cpeYZ* und *rpcEF* Gene befinden sich zusammen mit den Strukturgenen für R-Phycoerythrin I, R-Phycoerythrin II und R-Phycocyanin II in einer Region des Genoms von *Synechococcus sp.* (WH8020) (Wilbanks *et al.* 1993).

Eine weitere Gruppe von vier Genen (*cpcS*, *cpcT*, *cpcU*, *cpcV*) wurde im Genom von *Synechococcus sp.* (PCC7002) gefunden. Sie codieren für Lyasen, welche PCB an Cys-84 von C-Phycocyanin und Allophycocyanin addieren (Shen *et al.* 2004). Homologe Gensequenzen wurden in anderen Cyanobakterien gefunden (Kaneko *et al.* 2001, Cobley *et al.* 2002, Nakamura *et al.* 2003). Die Gensequenz *alr0617* aus *Anabaena sp.* (PCC7120) ist homolog zu *cpeS* aus *Gloeobacter violaceus* (PCC7412), *Fremyella diplosiphon* (PCC7601), *Synechococcus sp.* (WH8102) und zu *cpcS* aus *Synechococcus sp.* PCC7002. Das Genprodukt von *alr0617* (CpeS) zeigte bei der *in vitro*-Rekonstitution der β -Untereinheiten von C-Phycocyanin und Phycoerythrocyanin eine Spezifität für die PCB-Bindung an β -Cys-84 (Zhao *et al.* 2006a).

Die Sequenzierung ganzer Genome liefert Gensequenzen, die Homologien zu den bereits bekannten Biliprotein-Lyasegenen aufzeigen. So wurde im marinen Cyanobakterium *Synechococcus sp.* (WH8102) eine Gensequenz gefunden, die zu den Sequenzen von PecE und PecF große Homologie aufweist (Palenik *et al.* 2003). Die Gensequenz codiert für das Protein SYNW2025, das als Fusionsprotein eine mögliche Lyase-Isomerase darstellt. Weitere mögliche Biliproteinlyasen, die als Fusionsprotein vorliegen, wurden in *Synechococcus sp.* (CC9605) (Copeland *et al.* 2005b) und in *Crocospaera watsonii* (WH8501) (Copeland *et al.* 2005a) gefunden.

Thioetherbildende Lyasen gibt es auch bei der Bindung des Häms an Apo-Cytochrom. Die Cytochrom-c-Lyasen (CCHLs) binden sowohl das Apo-Cytochrom

wie auch das Häm-Molekül, jedoch ist über den Mechanismus der Bindung des Häms an Apo-Cytochrom, der zu den beiden Thioetherbindungen führt, wenig bekannt (Dumont *et al.* 1987, Nargang *et al.* 1988, Drygas *et al.* 1989, Stuart *et al.* 1990, Tong *et al.* 1998). Obwohl die Cytochrom-*c*-Lyasen wie auch die Biliprotein-Lyase die Bindung des Chromophors an das Apoprotein über eine Thioetherbrücke katalysieren, gibt es keine Sequenzhomologien zwischen den beiden Lyase-Typen.

1.5 Phycoviolobilin-PEC- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase (PecE/F)

Die enzymatische Chromophorbindung an die α -Untereinheit von PEC erfolgt durch die Phycoviolobilin-PEC- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase (PecE/F), deren Gene auf dem *pec*-Operon zusammen mit den Genen für PecA (α -Untereinheit), PecB (β -Untereinheit) und PecC (Linker) liegen (Eberlein *et al.* 1990, Jung *et al.* 1995). Da die α -Untereinheit einen PVB-Chromophor trägt und dieser Chromophor bislang nicht als frei vorliegender PVB-Chromophor isoliert werden konnte, ist es möglich, dass der PVB-Chromophor erst während der Chromophorbindung an das Apoprotein entsteht. Erste Hinweise auf eine Beteiligung der *pecE*- und *pecF*-Gene lieferten *pecE/F*-Mutanten, bei denen kein α -PEC in der Phycobilisomstruktur mehr vorhanden war (Jung *et al.* 1995). In vitro-Rekonstitutionen von PecA mit PCB und den Genprodukten von *pecE* und *pecF* führte zur α -PEC-Bildung, das die gleichen spektroskopischen Eigenschaften aufweist, wie natives α -PEC (Zhao *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2002). Neben der Notwendigkeit der Phycoviolobilin-PEC- α 84-Cystein-Lyase-Isomerase für eine korrekte regiospezifische Chromophorbindung an α -Cys-84, bedarf es bestimmter struktureller Eigenschaften des Chromophors. Eine Bindung des Chromophors findet nur statt, wenn dieser eine 3-Ethyliden-Gruppe besitzt (PCB, PEB, P Φ B). Für eine reversible Photochemie des gebundenen Chromophors ist sowohl eine Δ 15,16-Doppelbindung als auch eine Isomerisierung des Chromophors (Δ 4,5 \rightarrow Δ 2,3) notwendig. Dies geschieht aber nur im Falle von PCB und P Φ B, nicht aber bei PEB, das zwar über eine Δ 4,5- nicht aber über Δ 15,16-Doppelbindung verfügt (Storf *et al.* 2001, Storf 2003).

Durch Deletions- und Austauschmutanten von *pecE* und *pecF* wurden mögliche, bei der Chromophorbindung und -isomerisierung beteiligte Aminosäureabschnitte bzw. einzelne Aminosäuren vorgeschlagen (Zhao *et al.* 2005b).

Tooley *et al.* (Tooley *et al.* 2002) rekonstituierten α -PEC in einem heterologen Wirt, indem sie die Gene der PCB-Synthese (*hox1*, *pcyA*), der Chromophorbindung (*pecE*, *pecF*) und des Apoproteins (*pecA*) in *E. coli* gleichzeitig exprimierten. Dieses heterologe System zur gleichzeitigen Expressierung der Gene zur PCB-Synthese und Chromophorbindung in *E. coli* wurde auf die α -Untereinheit von C-Phycocyanin übertragen (Tooley *et al.* 2001).

1.6 Aufgabenstellung

Seit mehr als eineinhalb Jahrhunderten faszinieren die brillanten Farben der Phycobiliproteine die Wissenschaftler. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet ist über die molekularen Mechanismen der Chromophorbindung der Phycobiliproteine und über die reversible Photochemie des α -PEC wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei große Abschnitte. Der erste Abschnitt beschäftigt sich mit der Photochemie des α -PEC, während der zweite Abschnitt die Chromophorbindung an PecA näher beleuchtet.

Für die Arbeiten, die sich mit der Photochemie beschäftigen, war es zunächst notwendig das *in vitro*-Rekonstitutionssystem zu optimieren, um eine möglichst hohe α -PEC-Ausbeute zu erreichen. Mit Hilfe des Rekonstitutionssystems soll isotopenmarkiertes α -PEC hergestellt werden, das zur Aufklärung a) der dreidimensionalen Struktur in Lösung und b) der Dynamik der Chromophor-Proteinwechselwirkung während der Photochemie mittels NMR dient. Zudem soll nicht isotopenmarkiertes α -PEC für Kristallisationszwecke dargestellt werden. Die Vorgänge während der Photochemie (Zeitskala: ps bis ms) von α -PEC sollen mit zeitaufgelöster Röntgenstrukturanalyse an diesen α -PEC-Kristallen untersucht werden.

Die Bindung des Chromophors an die α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin soll mittels verschiedener spektroskopischer und chromatographischer Methoden näher charakterisiert werden. Dabei sollen die Funktionen und Wechselwirkungen zwischen der Heterolyase, den Cofaktoren, des Chromophors und des Apoproteins ausführlicher untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Kühlzentrifugen:

Centricon H-401 (Kontron, Eching)
Sorvall RC-5B (Thermo, Waltham, MA, USA)
Rotor: F9S (Piramoon, Santa Clara, CA, USA)

Tischzentrifugen:

Sigma 3K18 C (Braun, Melsungen), Rotoren: 12154, 12155
Biofuge fresco (Kendro, Hanau)

Elektrophorese:

Mini Protean III Dual Slab Cell (Bio-Rad, München)
Constant Voltage Power Supply 1000/500 (Bio-Rad, München)

UV/VIS-Spektroskopie:

UV-2401 PC Spectrometer (Shimadzu, Japan)
Lambda 25 Spektrometer (Perkin Elmer, USA)

Fluoreszenzspektroskopie:

LS 55 Luminescence Spektrometer (Perkin Elmer, USA)

Kurzzeitspektroskopie:

Stopped flow: SFM-300 (Bio-Logic Science Instruments, Frankreich)
Software: Bio-Kine 32 V. 4.21a
Detektion: TIDAS UV/Vis Spectrometer 19", type MMS 100-1
Software: TIDASAQ V. 2.15 (J&M, Aalen)

CD-Spektrometer:

J-810 Spectropolarimeter (Jasco Corp., Tokyo, Japan)

NMR-Spektrometer:

DRX 600 Spectrometer (Bruker, Karlsruhe)

Massenspektrometer:

Q-TOF-I hybrid Massenspektrometer mit Nanoflow-ESI-Quelle (Micromass, Manchester, GB)

Affinitätschromatographie zur Proteinreinigung:

HiTrapTM-Chelat-Säule (Bio-Rad, München)

Säulenmaterial: Chelating SepharoseTM (Amersham Biosciences, USA)

Chromatographie zur Peptidreinigung:

PD-10 (Sephadex G-25)-Säule (Amersham Biosciences, USA)

Sep-Pak C18 (Waters, USA)

Gel-Permeationschromatographie (GPC):

Pumpen: Pump P-50 (Pharmacia, USA)

Kontrolleinheit: Series controller LKB GP-10 (Pharmacia, USA)

Säule: Superdex 200 prep grade 16/60 (Amersham Biosciences, USA)

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

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC):

Pumpen- und Kontrolleinheit: 600 E multisolvent delivery system (Waters, USA)

Degasser: in-line degasser (Waters, USA)

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

Kaltlichtquelle:

Intralux 150 H universal (Volpi, Denzlingen)

Ultraschallgerät:

Sonifier W-450 (Branson Ultraschall, Dietzenbach)

Brutschrank:

B5028 (Heraeus, Hanau)

Thermoschüttler:

Orbit Environ Shaker (Lab-Line, Metrose Park, IL, USA)

Rotationsverdampfer:

Rotavapor-R (Büchi, Essen)

Schüttelwasserbad:

SW-20C (Julabo, Seelbach)

Sterilbank:

„laminar flow“ (Büttner Schilde Haas, Bad Hersfeld)

Analysenwaage:

SPB 62, Scaltec (Analytical Standard, Ohaus, USA)

Speed-Vac:

Eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)

Weitere Geräte und Hersteller werden bei den entsprechenden Methoden erwähnt.

Chemikalien:

Alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien waren von p.A.-Qualität oder höher. Zum Ansetzen von wässrigen Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.2 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Tabelle 2-1 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer (Maniatis <i>et al.</i> 1989)	Bromphenolblau 0,25% (w/v) Saccharose 40% (w/v)
FSB (Frozen Storage Buffer) (Hanahan 1983)	KCl 100 mM MnCl ₂ 45 mM CaCl ₂ 10 mM HACoCl ₂ 3 mM K-Acetat 10 mM Glycerin 10% (v/v) pH 6.2
SOB-Medium	Trypton 2% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl 10 mM KCl 2,5 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM Glucose 20 mM pH 6.8-7.5

Bezeichnung	Zusammensetzung
Startpuffer für Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	Na ₂ HPO ₄ 20 mM
	NaCl 1 M
	pH 7.0
Waschpuffer für Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	Na ₂ HPO ₄ 20 mM
	NaCl 1 M
	Imidazol 50 bzw. 100 mM
	pH 7.0
Elutionspuffer für Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie	Na ₂ HPO ₄ 20 mM
	NaCl 1 M
	Imidazol 1 M
	pH 7.0
Rekonstitutionspuffer (Phosphatpuffer-System)	K ₂ HPO ₄ 50 mM
	NaCl 500 mM
	MnCl ₂ 3 mM
	2-Mercaptoethanol 1 mM
	Triton X-100 0,85% (v/v)
	Glycerin 10% (v/v)
	pH 7.0
Rekonstitutionspuffer (Tris/HCl-Puffersystem)	Tris 1 M
	MnCl ₂ 3 mM
	pH 6.0
SDS-PAGE Auftragspuffer	Tris/HCl, pH 6.8 625 mM
	SDS 2% (w/v)
	Glycerin 10% (v/v)
	Bromphenolblau 0,003% (w/v)
	2-Mercaptoethanol 5% (v/v)
TAE-Puffer	Tris/Acetat, pH 8.0 40 mM
	EDTA 1 mM
FPLC-Laufpuffer	K ₂ HPO ₄ 50 mM
	NaCl 150 mM
	pH 7.0

Bezeichnung	Zusammensetzung
bzw.	Tris/HCl pH 6.0
	1 M

Tabelle 2-2: Nährmedien zur Bakterienanzucht

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	Trypton 1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) pH 7.5
R-Medium	Trypton 1% (w/v) Hefeextrakt 0,5% (w/v) NaCl 0,5% (w/v) Glucose 0,2% (w/v) pH 7.5
¹⁵ N (¹³ C)-Minimalmedium	¹⁵ NH ₄ Cl 10 mM K ₂ HPO ₄ 57,5 mM (¹³ C)-Glucose 0,5% (w/v) Citronensäure-Monohydrat 0,1% (w/v) NaCl 0,05% (w/v) MgSO ₄ 2 mM Thiamin 0,17 mM EDTA 0,17 mM Fe(II)-citrat 0,15 mM Zn-Acetat 0,05 mM MnCl ₂ 0,08 mM Borsäure 0,05 mM CoCl ₂ 0,05 mM CuCl ₂ 0,05 mM Na ₂ MoO ₄ 0,01 mM pH 7.5

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Medium zur selektiven ¹⁵ N-Markierung von Aminosäuren (die zu markierende Aminosäure wird als ¹⁵ N-Aminosäure zugesetzt)	Alanin	4,5 mM
	Arginin	2,3 mM
	Asparagin	0,7 mM
	Asparaginsäure	1,9 mM
	Cystein	0,4 mM
	Glutamin	2,7 mM
	Glutaminsäure	2,7 mM
	Glycin	5,3 mM
	Histidin	0,7 mM
	Isoleucin	3,0 mM
	Leucin	0,8 mM
	Lysin	0,7 mM
	Methionin	1,7 mM
	Phenylalanin	0,3 mM
	Prolin	0,9 mM
	Serin	15,0 mM
	Threonin	0,9 mM
	Tryptophan	1,5 mM
	Tyrosin	0,6 mM
	Valin	3,4 mM
	Uracil	1,1 mM
	Cytosin	1,1 mM
	Guanosin	0,4 mM
	Thymidin	0,2 mM
	Thymin	0,4 mM
	Na-Acetat	24,4 mM
	K ₂ HPO ₄	57,5 mM
	Citronensäure Monohydrat	4,8 mM
	NH ₄ Cl	18,0 mM
	Fe(II)citrat	0,14 mM
	Zn(II)acetat	0,05 mM
	EDTA	0,17 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,06 mM	
Thiamin	0,17 mM	
MnCl ₂	0,08 mM	
Borsäure	0,05 mM	
CoCl ₂	0,01 mM	
CuCl ₂	0,01 mM	
Na ₂ MoO ₄	0,01 mM	

Bezeichnung	Zusammensetzung
	Nicotinsäure 0,4 mM
	Biotin 0,4 µM
	NaCl 0,05%(w/v)
	Glucose 0,5% (w/v)
	pH 7.0

2.3 Organismen

Zu Klonierungszwecken wurde der Stamm DH5α (Hanahan 1983) verwendet. Dabei handelt es sich 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.

Die Expression von Proteinen erfolgte mit dem Stamm BL21(DE3) (Studier *et al.* 1986), der folgenden Genotyp besitzt:

B , F^- , *ompT*, *hsdSB*($r_B^- m_B^-$) *dcm gal* (DE3).

Natives α -PEC wurde aus *Fischerella* sp. (PCC7603) (*Mastigocladus laminosus*) gewonnen (Flüglstaller *et al.* 1981, Bryant 1982, Siebzehnrübl *et al.* 1989).

2.4 Plasmide

Als Expressionsvektor wurde pET30a (Novagen, Schwalbach) verwendet, der zwei Tag-Regionen (His- und S-Tag) und zwei Protease-Schnittstellen (Enterokinase, Thrombin) besitzt.

2.5 Molekularbiologische Arbeiten

2.5.1 Plasmid-DNA-Gewinnung

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstelleranleitung.

2.5.2 Agarosegelelektrophorese

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige (21 kbp bis 0,5 kbp) bzw. 2%ige (1 000 bp bis 80 bp) Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer, der mit Ethidiumbromid (1 µg/ml Gelvolumen) versetzt wurde. Die DNA-haltige Lösung (Restriktionsverdau) wurde mit DNA-Auftragspuffer (1 µl/5 µl DNA-Lösung) vermengt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei 50 V elektrophoretisch aufgetrennt.

DNA-Fragmente, die für die Ligation benötigt wurden, wurden unter UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangabe aufgereinigt. Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung wurden folgende Marker eingesetzt:

1%ige Agarosegele: Lambda-DNA/*EcoRI*+*Hind* III

2%ige Agarosegele: GeneRuler 100bp DNA Ladder

2.5.3 Klonierung (Restriktion, Ligation)

Zur Klonierung von Gensequenzen in den Expressionsvektor pET30a wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) verdaut. Dabei wurden 1-3 Units Restriktionsenzym pro µg DNA zum Reaktionsansatz gegeben und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Zielvektor pET30a (Novagen, Schwalbach) wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, anschließend wurde pro pmol freiem DNA-Ende 0,2 Units Phosphatase (CIP) (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) direkt in den Restriktionsansatz

gegeben und für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt, die DNA-Inserts und der geschnittene Vektor wurden isoliert, aufgereinigt und in der nachfolgenden Ligation eingesetzt.

Die Ligation des geschnittenen Vektors mit den DNA-Fragmenten erfolgte mit 1 Unit der T4-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a. M.) im Ligase-Puffer bei 4 °C über Nacht. Dabei wurden Vektor-DNA und Insert-DNA im Molverhältnis von 1:3 eingesetzt. Die Ligrationsansätze wurden anschließend direkt zur Transformation in *E. coli* (DH5 α) verwendet.

2.5.4 Transformation

Die Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurde in Anlehnung nach Hanahan (Hanahan 1983, 1985) durchgeführt. Eine Einzelkolonie eines *E. coli*-Stammes wurde in 4 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium überimpft und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wurde der Ansatz 15 min in ein Eiswasserbad gestellt. Nach Zentrifugation (5 min, 2 540 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 30 ml einer sterilen und gekühlten 0,1 M MgCl₂-Lösung vorsichtig resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 915 x g, 4 °C) wurde das Pellet in 30 ml einer sterilen und gekühlten CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (10 min, 915 x g, 4 °C) und das Pellet in 5 ml einer gekühlten und sterilen CaCl₂-Lösung (0,1 M CaCl₂, 15% Glycerin) gelöst. Abschließend wurden die Bakterienzellen portioniert (à 100 μ l), in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 50 μ l kompetente Zellen mit 5–10 μ l DNA-haltiger Lösung versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz für 90 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach Zugabe von 200 μ l SOC-Medium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Selektion von Transformanden erfolgte auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum (Kanamycin, 30 μ g/ml) nach Inkubation bei 37 °C über Nacht.

2.6 Proteinchemische Arbeiten

2.6.1 Anzucht von *E. coli*

Für molekularbiologische Arbeiten wurde *E. coli* (DH5 α) in LB-Medium (Agarplatten bzw. Flüssigmedium) bei 37 °C in Gegenwart geeigneter Antibiotika angezogen. Zur Expression der Proteine in *E. coli* (BL21 [DE3]) wurde R-Medium verwendet. Glycerinkulturen zur längerfristigen Lagerung der Proteine wurden aus Übernachtskulturen durch Zugabe von 20% Glycerin hergestellt, bei -196 °C schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

2.6.2 Expression der Proteine in *E. coli*

Die Proteinexpression im Expressionssystem aus dem Vektor pET30a und dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. Zum selektiven Wachstum pET30a-vektortragender Bakterienzellen wurde dem R-Medium, bzw. den entsprechenden Minimalmedien, Antibiotika (30 μ g/ml bzw. 15 μ g/ml) zugesetzt. 50 μ l einer Glycerinkultur wurden in 50 ml R-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5-0,7 wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und für weitere 4 bis 6 Stunden inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend bei 8 000 x g für 15 min abzentrifugiert, das Pellet in 30 ml Startpuffer resuspendiert und nochmals bei 5 000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet konnte zum späteren Zellaufschluss bei -20 °C gelagert werden. Die Ausbeute an Protein/1 l-Kultur betrug für His₆-PecA 50-80 mg, für His₆-PecE 40-60 mg und für His₆-PecF 30-50 mg.

2.6.3 Darstellung von isotopenmarkiertem α -PEC

Die Isotopenmarkierung mit ¹³C und ¹⁵N erfolgt nach den Techniken von Muchmore *et al.* (Muchmore *et al.* 1989) und Riesenberg *et al.* (Riesenberg *et al.* 1990) für die uniforme Markierung von Proteinproben, bzw. nach Senn *et al.* (Senn *et al.* 1987) für die selektive Markierung. Zur Darstellung von ¹⁵N- α -PEC, ¹⁵N/¹³C- α -PEC bzw.

selektiv ^{15}N -aminosäuremarkiertes Protein wurde aus einer His₆-PecA-Glycerinkultur 5 μl in 5 ml LB-Medium überimpft und für 8-10 Stunden in Gegenwart von Kanamycin (30 $\mu\text{g/ml}$) bei 37 °C geschüttelt. Diese Kultur wurde 1:100 in das entsprechende Minimalmedium (25 ml) überimpft und über Nacht bei 37 °C unter Zusatz von Kanamycin (15 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Hauptkultur (1 l) wurde mit dieser Übernachtkultur 1:50 angeimpft und unter gleichen Bedingungen bis zu einer OD von 0,7-0,8 angezogen. Durch Zugabe einer IPTG-Lösung (1 mM Endkonzentration) wurde die Expression von His₆-PecA induziert. Zur Expression von selektiv mit ^{15}N -Aminosäuren markiertem His₆-PecA wurde die entsprechende ^{15}N -Aminosäure (selbe Konzentration) nochmals zusätzlich zum Zeitpunkt der Induktion zum Medium zugegeben.

Zur Darstellung von ^{15}N -invers-markiertem His₆-PecA wurden die Bakterien, wie oben beschrieben, auf ^{15}N -Minimalmedium angezogen und zum Zeitpunkt der Induktion wurde die entsprechende Menge der unmarkierten Aminosäure zum Minimalmedium gegeben.

2.6.4 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde das gefrorene Pellet aus einer 1 l-Expressionskultur in 30 ml Startpuffer mit einem Spatel zerkleinert und homogenisiert. Der Aufschluss erfolgte mit dem Sonifier für 30 min bei 45 W im Eisbad. Das Bakterienlysat wurde anschließend bei 15 000 $\times g$ für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand konnte direkt zur Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet werden.

2.6.5 Proteinreinigung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine tragen am N-terminalen Ende einen His₆-Tag (bzw. besitzen wie im Falle von PecF eine interne His₄-Sequenz) und können so mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und angereichert werden. Der Überstand aus dem Zellaufschluss wurde auf eine mit NiSO₄ beladenen und mit Startpuffer äquilibrierten Chelating SepharoseTM Fast Flow-Säule (Bio Rad, München) aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit drei Säulenvolumina Startpuffer und drei Säulenvolumina Waschpuffer gespült, um unspezifisch

gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der His-Tag-Proteine erfolgte mit Elutionspuffer, dabei wurden 10-15 ml aufgefangen.

2.6.6 Dialyse und Konzentrierung von Proteinen

Für die Dialysen wurden Dialyseschläuche SERVAPOR® dialysis tubing (MWCO 10 000, 16 mm, Serva, Heidelberg) verwendet. Die Eluate aus der Affinitätschromatographie wurden je nach Verwendungszweck zweimal gegen das 500-fache Volumen entsprechender Puffer (Phosphatpuffer oder Tris-Puffer) bei 4 °C dialysiert. Für die Rekonstitution von α -PEC für NMR-Experimente und Kristallisation wurden His₆-PecA und His₆-PecF gegen Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 1 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.2) und His₆-PecE gegen Tris/HCl-Puffer (1 M Tris, pH 6.0) dialysiert. Für alle anderen Arbeiten erfolgte die Dialyse der Proteine gegen Tris/HCl-Puffer.

Die Konzentrierung von Proteinen erfolgte durch Ultrazentrifugation bei 4 °C und 5 000 x g mit Ultrafree 15 Biomax 10K (Millipore, Bedford, MA, USA); das Ausschlussvolumen lag bei 10 kDa.

2.6.7 Tryptischer Verdau von Biliproteinen

Der tryptische Verdau von nativem α -PEC sowie von Rekonstitutionsprodukten diente der Gewinnung von Chromopeptiden, die mittels HPLC getrennt und anschließend mit absorptions-, fluoreszenz-, massen- und NMR-spektroskopischen Methoden weiter untersucht wurden. Dazu wurde chromatographisch gereinigtes α -PEC bzw. Rekonstitutionsprodukt gegen Phosphatpuffer (50 mM K₂HPO₄, 100 mM NaCl, pH 7.2) dialysiert, anschließend wurden insgesamt siebenmal im Abstand von jeweils einer Stunde 2 000 Units Trypsin pro mg Protein zugegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert und über Nacht wurden nochmals einmalig 20 000 Units Trypsin zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz auf eine mit Phosphatpuffer äquilibrierte Sephadex G-25-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgetragen. Die farbigen Fraktionen wurden aufgefangen und mit einer SepPak C18-Säule (Waters, Milford, USA) entsalzt und konzentriert. Zur Entsalzung diente H₂O dest., das mit 0,1% Ameisensäure (v/v) angesäuert war, um die Chromophore zu

stabilisieren. Die Elution der Chromopeptide erfolgte entweder mit einem Lösungsmittelgradient aus H₂O dest./2-Propanol/0,1% Ameisensäure mit unterschiedlichem Wasseranteil (80-10% H₂O-Anteil, v/v) oder mit 2-Propanol/0,1% Ameisensäure. Das Eluat wurde mit Hilfe der Speed Vac (30 °C) zur Trockene gebracht und unter Argonatmosphäre bei -20 °C gelagert.

2.7 Chromophorisolierung und –reinigung

Grundsätzlich erfolgten alle Arbeiten mit Gallenfarbstoffen sowie mit chromophortragenden Proteinen und Peptiden in abgedunkelten Räumen unter Schutzlicht. Gallenfarbstoffe und deren Derivate wurden zur Aufbewahrung stets zur Trockene eingeengt oder in DMSO gelöst unter Argonatmosphäre bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

2.7.1 Isolierung von Phycocyanobilin (PCB)

Die Gewinnung von PCB erfolgte nach der Methode von O'Carra *et al.* (O'Carra *et al.* 1966). Zur Isolierung von PCB aus sprühgetrockneter *Spirulina platensis* (Behr, Bonn, Germany) wurden 40 g dreimal in 500 ml heißem Methanol aufgeschwemmt, für 30 min gerührt und anschließend abgenutscht. Dadurch wurden Chlorophyll *a* und Carotinoide größtenteils entfernt. Der Algenrückstand wurde in 400 ml Methanol/1% Na-Ascorbat (w/v) unter Rühren und Rückfluss bei 70-80 °C über Nacht unter Argonatmosphäre gekocht. Hierbei wird Phycocyanobilin vom Apoprotein abgespalten und geht in Lösung (Gossauer *et al.* 1978). Der Algenrückstand wurde von der blaugrünen Lösung abgenutscht und verworfen. Die Lösung wurde in einen Scheidetrichter überführt, mit 400 ml 0,1 M HCl versetzt und mehrmals mit 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Im Diethylether lösen sich Chlorophyll *a*, Pheophytin *a* und Carotine. Die wässrige Phase, die PCB, enthält wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, über NaCl getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Abschließend erfolgte die säulenchromatographische Reinigung des Rohextrakts von PCB (s. Kapitel 2.8.1).

2.7.2 Isolierung von Phycoerythrobilin (PEB)

PEB wurde aus der Rotalge *Porphyra yezoensis* gewonnen (Cheng *et al.* 1990, Cornejo *et al.* 1992). Dazu wurden 50 g der getrockneten Alge grob zerkleinert, 30 min in 1 000 ml Wasser aufgeschwemmt und durch Auspressen der Algen wurde anschließend das Wasser weitgehend entfernt. Die Algen wurden dreimal für 30 min in heißem Methanol gerührt, um Chlorophylle und Carotinoide größtenteils zu entfernen. Die extrahierten Algen wurden abgenutscht und in 1 600 ml Methanol/1% Na-Ascorbat (w/v) unter Rühren und Rückfluss bei 70-80 °C über Nacht unter Argonatmosphäre gekocht. Der Algenrückstand wurde von der tiefrot gefärbten Lösung abgenutscht und die Lösung am Rotationsverdampfer auf ca 400 ml eingengt. Nach Überführung in einen Scheidetrichter wurde die Lösung mit 400 ml 0,1 M HCl versetzt und mehrmals mit 150 ml Diethylether ausgeschüttelt, um Chlorophylle und Pheophytine abzutrennen. Die wässrige Phase, die PEB und PCB enthält, wurde mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, über NaCl getrocknet und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. PEB konnte säulenchromatographisch von PCB abgetrennt werden (s. Kapitel 2.8.1).

2.8 Chromatographische Methoden

2.8.1 Chromatographie von Bilinen

Um PCB und PEB in Rekonstitutionsexperimenten einsetzen zu können, wurden diese über Säulenchromatographie in Anlehnung an Arciero *et al.* (Arciero *et al.* 1988a) gereinigt.

PCB:

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

mobile Phase: 40% 2-Propanol, 60% Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄, pH 2,1), (v/v)

PEB:

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

mobile Phase: 30% 2-Propanol, 70% Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄, pH 2,1), (v/v)

Zur qualitativen Analyse des gereinigten PCB und PEB wurden Absorptionsspektren in Methanol/2% HCl (v/v) aufgenommen und mit Literaturwerten verglichen (Cole *et al.* 1967). Des Weiteren erfolgte eine Analyse mittels Dünnschichtchromatographie mit Referenzsubstanzen, um die Reinheit zu überprüfen und um Veresterungs- und Oxidationsprodukte auszuschließen:

stationäre Phase: Kieselgel RP-8 F_{254S}, HPTLC-Platten 10 x 10 cm (Merck, Darmstadt)
 mobile Phase: 40% 2-Propanol, 60% Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄, pH 2,1), (v/v)

2.8.2 Proteinanalytische Arbeiten

Zur qualitativen Analyse von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit Minigelen (10 x 10 cm) der Dicke 0,75 mm durchgeführt. Es wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet, abhängig von der Molekularmasse der Proteine, die analysiert werden sollen. Für Proteine mit einer Molekularmasse zwischen 70 und 10 kDa kam das Tris/Glycin-System zum Einsatz. Für Proteine <10 kDa wurde das Tris/Tricin-System verwendet. In beiden Fällen wurden die Proben mit den entsprechenden Auftragspuffern im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 min gekocht.

Tris/Glycin-System:

Trenngel (15%)		Sammelgel (5%)	
4 ml	rotiphorese® Gel 30 (29,2:0,8% (w/w) Acrylamid:Bisacrylamid) (Roth, Karlsruhe)	0,65 ml	rotiphorese® Gel 30 (29,2:0,8% (w/w) Acrylamid:Bisacrylamid) (Roth, Karlsruhe)
2,8 ml	H ₂ O	2,9 ml	H ₂ O
1 ml	Tris/HCl, pH 8.8	0,5 ml	Tris/HCl, pH 6.8
80 µl	SDS (10%)	40 µl	SDS (10%)
40 µl	APS (10%)	20 µl	APS (10%)
4 µl	TEMED (Roth, Karlsruhe)	4 µl	TEMED (Roth, Karlsruhe)

SDS-PAGE-Laufpuffer für Tris/Glycin-System:

Tris	8,325 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1% (w/v)

Die Elektrophorese wurde 30 min bei 50 V im Sammelgel und anschließend 70 min bei 150 V im Trenngel durchgeführt.

Tris/Tricin-System:

Trenngel (14%)		Sammelgel (5%)	
4,5 ml	Wasser, dest.	3,75 ml	Wasser, dest.
2,8 ml	ProSieve® Gel Solution (Cambrex, USA)	0,5 ml	ProSieve® Gel Solution (Cambrex, USA)
2,5 ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8	0,65 ml	1 M Tris/HCl, pH 6.8
0,1 ml	10% SDS-Lösung	0,05 ml	10% SDS-Lösung
0,1 ml	10% APS-Lösung	0,05 ml	10% APS-Lösung
4 µl	TEMED	5 µl	TEMED

SDS-PAGE-Laufpuffer für Tris/Tricine-System:

Tris	0,1 M
Tricine	0,1 M
SDS	1% (w/v)

Die Trennung der Proteine erfolgte bei 130 V für 1 Stunde.

Als Molekulargewichtsmarker wurden SDS-7 (Sigma, Deisenhofen) und Polypeptide SDS-PAGE Molekular Weight Standards (Bio Rad, München) verwendet:

Tabelle 2-3: Molekulargewichtsmarker für die SDS-PAGE

SDS-7	Molekulargewicht (kDa)
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
GAP-Dehydrogenase (Kaninchen)	36
Carboanhydrase (Rind)	29
Trypsinogen (Rind)	24
Trypsin-Inhibitor	20,1

SDS-7	Molekulargewicht (kDa)
(Sojabohne) α -Lactalbumin (Rind)	14,2

Polypeptide SDS-PAGE Molekular Weight Standards	Molekulargewicht (kDa)
Triosephosphat-Isomerase	26,625
Myoglobin	16,950
α -Lactalbumin	14,437
Aprotinin	6,512
Insulin β -Kette, oxidiert	3,496
Bacitracin	1,423

Färbung der Proteine:

Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden zwei Methoden angewendet: Chromophortragende Proteine wurden in einem ersten Schritt in einer 1 M Zinkacetatlösung für 10-15 min inkubiert (Berkelman *et al.* 1986), um anschließend die orangefarbende Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht (365 nm) mit einer Kamera dokumentieren zu können.

Im zweiten Schritt wurden die Gele mit Coomassie-Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele aus der Zinkacetatlösung dreimal mit Wasser gewaschen, um einen Großteil des Zinkacetats auszuwaschen. Für die Coomassie-Färbung wurde Roti-Blue (Roth, Karlsruhe) gemäß Herstellerangabe verwendet.

Quantitative Proteinbestimmung:

Die quantitative Bestimmung von Proteinmengen wurde mit Hilfe des Proteinbestimmungstests Advanced Protein Assay (Fluka, Buchs, Schweiz) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.8.3 Gel-Permeationschromatographie (GPC)

Zur weiteren Reinigung von Proteinen, zur Abtrennung der Lyase-Untereinheiten von rekonstituierten Biliproteinen sowie zur Untersuchung und Größenbestimmung von Proteinkomplexen wurde die Methode der Gel-Permeationschromatographie (GPC) verwendet. Es kam eine Superdex200 prep grade (60/16)-Säule (Amersham Biosciences, USA) zum Einsatz. Als Laufmittel wurden, je nach Anwendung und Zweck, Phosphatpuffer (50 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 6.8-7,2) oder Tris/HCl (1 M Tris, pH 6.0) verwendet. Die Flussrate betrug 0,75 ml/min. Alle Laufmittel wurden stets kurz vor Gebrauch frisch angesetzt, steril filtriert und im Vakuum entgast. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit drei Säulenvolumina Laufmittel. Das Auftragsvolumen der Proben betrug zwischen 0,2 und 1 ml. Es wurden Fraktionen zu je 2 ml aufgefangen. Zur Detektion kam ein Dioden-Array-Detektor (Tidas, J&M, Aalen, Germany) zum Einsatz. Ausschlussvolumen und Molekulargewichtsbestimmungen wurden mit Hilfe von Größenstandards (Amersham Biosciences, USA) durchgeführt:

Tabelle 2-4: Molekulargewichtsstandards zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels Gel-Permeationschromatographie.

	Molekulargewicht (kDa)
Thyroglobin	669
Ferritin	440
Catalase	232
Aldolase	158
Albumin	67
Ovalbumin	43
Chymotrypsinogen	25
Ribonuclease A	13,7

2.8.4 Semipräparative HPLC

Um natives α -PEC sowie Rekonstitutionsprodukte mittels HPLC zu analysieren, wurden die Chromoproteine tryptisch verdaut (s. Kapitel 2.6.7). Die Chromopeptide wurden in wenig Laufmittel aufgenommen und in die HPLC-Anlage injiziert. Zur

Trennung der Peptide aus tryptisch verdauten Proben wurde folgendes System verwendet:

Säule: Grom Sil 100 ODS-2 HE, 300 mm x 4 mm, 10 μ m (Alltech Grom, Rottenburg-Hailfingen)

Laufmittel: A = H₂O/0,1% HCO₂H
B = 2-Propanol/0,1% HCO₂H

Gradient:

Zeit (min)	0	5	60	70
A:B	85:15	85:15	0:100	0:100

Flussrate: 1,0 ml/min

Der Gradient wurde variiert, um bessere Trennergebnisse zu erzielen.

2.9 Spektroskopie

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur sowie unter grünem Sicherheitslicht bzw. in abgedunkelten Räumen durchgeführt. Die Aufnahme der Spektren der Rekonstitutionsexperimente erfolgte in den entsprechenden Puffern, die der freien Biline in MeOH/HCl (98/2%, v/v).

2.9.1 UV/VIS-Spektroskopie

Es standen zwei Photometer zur Aufnahme von UV/VIS-Spektren zur Verfügung. Grundsätzlich wurden die freien Biline mit einem Lambda 25 (Perkin Elmer, USA) und der mitgelieferten Software UV Winlab (Vers. 2.85.04) vermessen. Die Rekonstitutionen wurden an einem Spektrophotometer UV-2401 PC (Shimadzu, Japan) mit der Software Spectacle (Vers. 1.82) aufgenommen. Mit diesem Gerät konnten auch trübe Lösungen mit Hilfe der Ulbricht-Kugel gemessen werden.

2.9.2 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden bei Raumtemperatur an einem LS 55 Luminescence Spektrometer (Perkin Elmer, USA) mit der firmeneigenen Software aufgenommen.

2.9.3 Zeitaufgelöste Spektroskopie

Für Stopped-flow-Experimente wurden affinitätschromatographisch gereinigte Proteinfractionen von His₆-PecA und His₆-PecE verwendet, die in Tris-Puffer (1 M Tris/HCl, pH 6.0) vorlagen. Die Proteine wurden im Verhältnis 1:1 zusammengegeben und mit einer MnCl₂-Lösung (1,5 mM Endkonzentration) versetzt. PCB (5-20 µM) wurde in DMSO gelöst und im benötigten Volumen Tris-Puffer aufgenommen. Die Protein- und Chromophorlösungen wurden in getrennte Vorratskammern der Stopped-flow-Anlage appliziert. Die Stopped-flow-Versuche wurden im Temperaturbereich von 15-25° C durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit SpecFit/32 (Spectrum Software Associates, MA, USA), beschrieben bei Endres (Endres 2005), Kupka (Kupka 2006) und Gampp *et al.* (Gampp *et al.* 1985).

2.9.4 Massenspektroskopie

Die Massenspektren von freien Bilinen, Proteinen und Peptiden zur Bestimmung der Molekülmassen, Aminosäuresequenzen sowie Identifizierung von Proteinen wurden von B. Granvogel und M. Plöscher in der Arbeitsgruppe von L. A. Eichacker aufgenommen. Dabei kam das Massenspektrometer Q-ToF I (Mikromass, Manchester, GB) zum Einsatz.

2.9.5 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden bei 22 °C an einem J-810 Spectropolarimeter (Jasco Corp., Tokyo, Japan) in 1 nm-Schritten aufgenommen. Dazu wurden Quarzglasküvetten 110-QS 1 mm/10 mm (Hellma, Mühlheim) verwendet.

2.9.6 NMR-Spektroskopie

NMR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit M. Krajewski (Arbeitsgruppe Holak, MPI Martinsried) an einem Bruker DRX 600-Spektrometer bei 25 °C aufgenommen.

2.10 Rekonstitutionen von Biliproteinen

Die Rekonstitution von Biliproteinen erfolgte in zwei unterschiedlichen Puffersystemen. Zur Herstellung großer Mengen α -PEC für NMR- und Kristallisationsexperimente wurde das von Storf (Storf 2003) entwickelte Rekonstitutionssystem, basierend auf Phosphatpuffer, weiterentwickelt, um eine möglichst hohe Ausbeute an α -PEC zu erreichen. Für alle anderen Experimente in dieser Arbeit wurde ein Rekonstitutionssystem basierend auf Tris-Puffer entwickelt, das gegenüber dem Phosphatpuffersystem einige Vorteile bietet (s. Kapitel 3.1).

Die Berechnung der Ausbeuten von α -PEC und PCB-Addukt erfolgte mit den aufgereinigten Rekonstitutionsprodukten. Dabei wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

Tabelle 2-5: Absorptionseigenschaften von Phycobiliproteinen und Phycobilinen.

	Lösungs- mittel	λ_{\max} VIS (nm) $\epsilon \times 10^3$ (mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Referenz
Z- α -PEC, nativ	Phosphat- puffer	568 (96,0)	(Siebzehnrübl 1990)
Z- α -PEC, rekonstituiert	Phosphat- puffer	568 (77,0)	(Storf 2003)
PCB-Addukt	Phosphat- puffer	641 (61,0)	(Storf 2003)
Δ 3,3 ¹ -E-PCB	MeOH/2% HCl	690 (37,9)	(Gossauer <i>et al.</i> 1974)
Δ 3,3 ¹ -Z-PCB	MeOH/2% HCl	685 (37,2)	(Weller <i>et al.</i> 1980)
PCB	Tris/HCl pH 6.0	625 (17,0)	(Endres 2005)
3 ¹ -Cys-PVB-Peptid, tryptisch verdaut	10 mM TFA	590 (38,6)	(Bishop <i>et al.</i> 1987)
Δ 15,16-E-3 ¹ -Cys-PVB, gebunden an denaturiertes α -PEC aus <i>M. laminosus</i>	6,4 M Harnstoff pH 2,8	532 (nicht bestimmt)	(Zhao <i>et al.</i> 1995a)
Δ 15,16-Z-3 ¹ -Cys-PVB, gebunden an denaturiertes α -PEC aus <i>M. laminosus</i>	6,4 M Harnstoff pH 2,8	594 (nicht bestimmt)	(Zhao <i>et al.</i> 1995a)

Um die Menge an α -PEC ohne Aufreinigung direkt aus den Rekonstitutionsansätzen zu bestimmen, wurden die Ansätze einem Belichtungszyklus (500 nm, 577 nm, 500 nm) unterzogen. Durch Bildung der Differenzspektren aus den gewonnenen Absorptionsspektren wurde der ΔA -Wert (Belichtung 577 nm *minus* Belichtung 500 nm) berechnet (Siebzehnrübl 1990), der als relatives Maß für die gebildete α -PEC-Menge verwendet wurde. Als relatives Maß für die gebildete PCB-Adduktmenge wurde die Fläche unter dem rotwelligen Absorptionsmaximum herangezogen. Dafür wurde das Endspektrum der Rekonstitution vom Ausgangsspektrum abgezogen und die Fläche unter dem rotwelligen Absorptionsmaximum des Differenzspektrums bestimmt.

2.10.1 Darstellung von mini- α -PEC für NMR- und Kristallisationsexperimente

Die Rekonstitution von His₆- α -PEC erfolgte in einer weiterentwickelten Variante des Rekonstitutionsystems von Storf (Storf 2003). Ein Rekonstitutionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

50 mM K₂HPO₄
100 mM Tris
2,5 μ mol His₆-PecA bzw. ¹⁵N/(¹³C)-His₆-PecA, bzw. ¹⁵N-AS-His₆-PecA
2,5 μ mol His₆-PecE
8 μ mol His₆-PecF
3 mM MnCl₂
5 mM 2-Mercaptoethanol
0,85% Triton X-100
5% Glycerin
3 μ mol PCB, gelöst in 0,5 ml DMSO
pH 7.0

Der Ansatz wurde für 3 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und spektroskopisch verfolgt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz abzentrifugiert (15 000 x g, 30 min, 4 °C) und der Überstand in der Affinitätschromatographie eingesetzt. Nach Dialyse gegen Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 6.8-7.2) erfolgte die Abtrennung der Lyase-Untereinheiten (His₆-PecE/ His₆-PecF) mittels Gelfiltration.

Rekonstituiertes α -PEC zeigt eine starke Tendenz zu degradieren. Dieses Phänomen wurde genutzt, um stabiles mini- α -PEC zu erzeugen. Dazu wurde rekonstituiertes und säulenchromatographisch gereinigtes α -PEC auf 15-25 mg/ml aufkonzentriert und bei 4-12 °C für mehrere Tage bis Wochen im Dunkeln aufbewahrt. Mini- α -PEC wurde anschließend durch GPC gereinigt, wenn die SDS-PAGE der Abbaureaktion nur noch eine fluoreszierende Bande bei ca. 14 kDa zeigte, die dem Molekulargewicht des mini- α -PEC entspricht.

2.10.2 Kristallisation von mini- α -PEC

Die Kristallisationsexperimente wurden in Zusammenarbeit mit M. Schmidt (TU München, Department für Physik) durchgeführt. Das Screening für optimale Kristallisationsbedingungen erfolgte mit dem Crystal Screen Kit (Hampton Research, Aliso Viejo, USA). Die durch Screening gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden optimiert. Dabei zeigte das Kristallwachstum in folgender Pufferzusammensetzung die besten Resultate:

20% - 25% Isopropanol

0,1 M - 0,2 M MgSO₄

0.1 M Kaliumphosphat pH 6.6-7.0

Die Kristallisation von mini- α -PEC erfolgte nach ausreichender Belichtung mit Licht der Wellenlänge 570 nm bei 4 °C im Dunkeln im Hanging-Drop-Verfahren. Die eingesetzte Proteinkonzentration lag bei ca. 11 mg/ml Protein.

2.10.3 Rekonstitutionsexperimente

Für alle anderen Experimente wurde ein neu entwickeltes Rekonstitutionssystem verwendet. Dieses hat zum einen den Vorteil, dass der Einfluss verschiedener Cofaktoren besser untersuchbar ist, und zum anderen die Proteine eine höhere Löslichkeit aufweisen. In seiner Zusammensetzung wurde dieses Rekonstitutionssystem gegenüber dem Phosphatpuffersystem vereinfacht und enthielt typischerweise (je nach Bedarf unter Weglassung einzelner Komponenten):

Darstellung von α -PEC:

1 M Tris/HCl, pH 6.0
5-20 μ M His₆-PecA, 5-20 μ M His₆-PecE, 15-30 μ M His₆-PecF
1,5 mM MnCl₂
0-4% Triton X-100
5-20 μ M PCB

Darstellung von PCB-Addukt:

1 M Tris/HCl, pH 6.0
5-20 μ M His₆-PecA, 5-20 μ M His₆-PecE
1,5 mM MnCl₂
5-20 μ M PCB

Um den Einfluss von Cofaktoren zu untersuchen, wurden die beiden Standardansätze zu verschiedenen Varianten abgeändert (s. Kapitel 3.3). Stets erfolgte eine spektroskopische Untersuchung der Reaktionsansätze, teilweise eine Affinitätschromatographische Aufreinigung oder Gelfiltration.

2.11 Bioinformatische Methoden

2.11.1 Datenbanken

Proteinsequenzen und die Identifizierung unbekannter Proteine aus MS/MS-Messungen wurden in den Datenbanken Swiss-Prot, TrEMBL (<http://www.expasy.org>) und National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) recherchiert.

3D-Strukturen von Proteinen wurden aus der Datenbank RCSB PDB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) entnommen.

2.11.2 Sequenzanalysen

Zum Vergleich homologer Proteinsequenzen aus Datenbanken wurden die Programme BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast/>) oder PSI-BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verwendet, die den Suchalgorithmis nach Altschul *et al.* (BLOSUM62-Matrix) (Altschul *et al.* 1990, Altschul *et al.* 1997) gebrauchen.

Alignments von Proteinsequenzen wurden unter Verwendung folgender Programmen durchgeführt:

ALION (<http://fold.stanford.edu/alion>), geeignet zum globalen Alignment von zwei Sequenzen, die nahe miteinander verwandt sind (Needleman *et al.* 1970, Nevill-Manning *et al.* 1997).

SIM (<http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>), geeignet zum lokalen Alignment von zwei Sequenzen, die divergent sind (Smith *et al.* 1981).

CLUSTAL W: (<http://www.ebi.ac.uk./clustalw>), geeignet zum multiplen Alignment mehrerer Sequenzen (Feng *et al.* 1987).

2.11.3 Software

Die 3D-Visualisierung von Proteinen erfolgte mit dem Programm WebLab ViewerPro 3.7 (Molecular Simulations Inc.).

Zur graphischen Auswertung und Darstellung von Spektren und Chromatogrammen stand das Programm Origin 7.0 (OriginLab Corporation, MA, USA) zur Verfügung.

Zur Auswertung und Berechnung der Daten aus den Experimenten der Kurzzeitspektroskopie stand das Programm SPECFIT/32 (Spectrum Software Associates , MA, USA) zur Verfügung.

3 Ergebnisse und Diskussion

Das in dieser Arbeit verwendete Rekonstitutionssystem zur *in vitro*-Darstellung von Biliproteinen basiert auf dem Rekonstitutionssystem, das für die Rekonstitution von α -PEC von Storf und Zhao entwickelt wurde (Zhao *et al.* 2000, Storf *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2002, Storf 2003). Abbildung 3-1 zeigt das Schema zur *in vitro*-Rekonstitution mit möglichen Reaktionswegen.

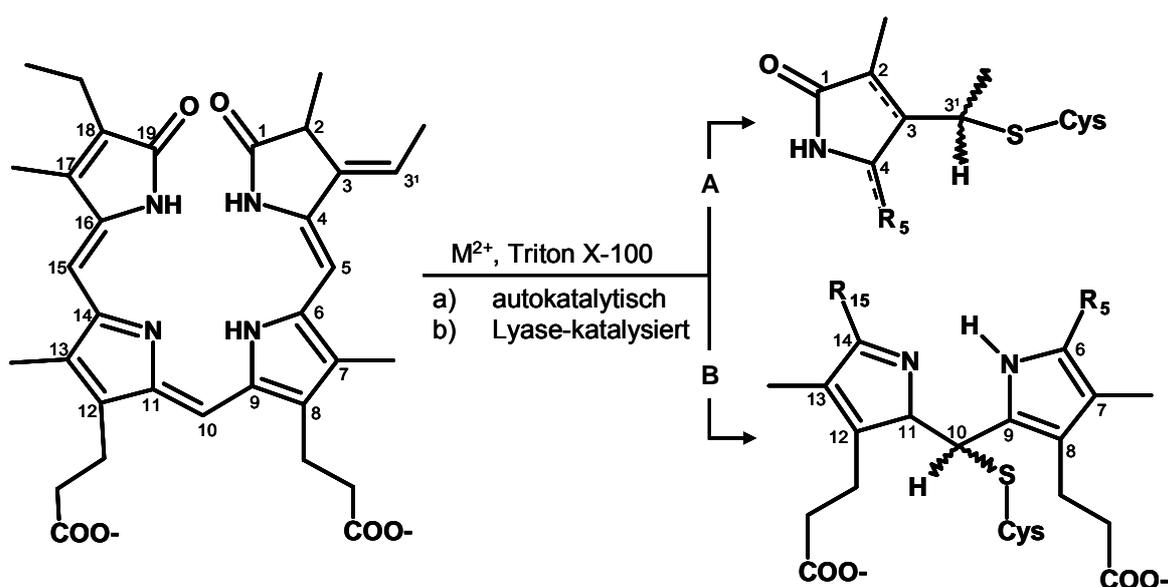


Abbildung 3-1: Schema zur *in vitro*-Rekonstitution von Biliproteinen am Beispiel mit PCB. M^{2+} : zweiwertige Metallionen, gestrichelte Bindungen deuten je nach Reaktion Doppelbindungen an; R_x : Bindung zum restlichen Chromophor mit Angabe des nächsten C-Atoms; für weitere Erläuterungen: s. Text.

Der freie Bilinchromophor wird über die C3-Ethylidenfunktion an die Apoproteine gebunden (Reaktionsweg A). Die dabei durch Lyase-Katalyse entstehende Thioetherbindung zwischen dem Chromophor und dem Protein verläuft stereospezifisch (Schluchter *et al.* 1999). Dabei entsteht ein kovalent gebundener 3¹-Cys-PCB-Chromophor, so wird formal die Ethylidenfunktion aufgehoben und die Δ 4,5-Doppelbindung bleibt bestehen (Additionsreaktion). Wird hingegen ein 3¹-Cys-PVB-Chromophor gebildet, wird formal die Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3 umgelagert (Additions-/Isomerisierungsreaktion). Biline mit einer Δ 10,11-Doppelbindung weisen am C10-Atom ein Elektronendefizit auf. Dort ist der Angriff durch ein Nucleophil (z. B. HS-R) leicht möglich (Reaktionsweg B) (Klein *et al.* 1979,

Kufer 1980, Falk 1989). Dabei entsteht ein rubinähnlicher Chromophor, der durch die Unterbrechung des konjugierten π -Systems eine hypsochrom verschobene Absorption aufweist (Kufer 1980). Um die unterschiedlichen Reaktionswege zu untersuchen, wurden die Versuchsansätze, wie in Abbildung 3-1 angedeutet, durch die Zugabe von Proteinkomponenten oder Cofaktoren variiert. Prinzipiell kann zwischen einer autokatalytischen (a) und einer lyase-katalysierten Addition bzw. Additions-Isomerisierungsreaktion (b) unterschieden werden. Die lyase-katalysierte Reaktion kann im Falle von PecE/F für die beiden Lyase-Untereinheiten getrennt voneinander beobachtet werden.

3.1 Vergleich der Rekonstitutionssysteme zur *in vitro*-Rekonstitution der α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin

In dieser Arbeit kamen drei Rekonstitutionssysteme zur *in vitro*-Rekonstitution von Biliproteinen zum Einsatz:

- *E. coli*-Lysatsystem (Storf 2003)
- Phosphatpuffersystem mit gereinigten Proteinen (Storf 2003)
- Tris/HCl-System mit gereinigten Proteinen

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Vergleich der unterschiedlichen Rekonstitutionssysteme, zeigt grundlegende Unterschiede zwischen dem Phosphatpuffer- und dem Tris/HCl-System auf und erläutert deren Verwendung für verschiedene Aufgaben und Fragestellungen.

3.1.1 *E. coli*-Lysatsystem

Im *E. coli*-Lysatsystem wurde auf eine Reinigung der Proteine verzichtet. Die in *E. coli* exprimierten Lyase-Untereinheiten und das Apoprotein wurden direkt nach Zellaufschluss und Zentrifugation als Lysat in den Rekonstitutionen eingesetzt. Zum Verdünnen wurde Phosphatpuffer (50 mM K_2HPO_4 , 0,5 M NaCl, pH 7.2) verwendet. Dabei wurden je nach Ansatz, Cofaktoren wie $MnCl_2$, 2-Mercaptoethanol und

Triton X-100 zugegeben.

Das *E. coli*-Lysatsystem wurde nur im Vergleich mit den beiden anderen Rekonstitutionssystemen verwendet, um z. B. die Aktivität der Enzyme in einem Schnelltest während der affinitätschromatographischen Reinigung zu überprüfen. Es eignet sich nicht zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen oder zwischen Proteinen und Chromophor, da bakterielle Proteine und Cofaktoren diese Wechselwirkungen beeinflussen können.

3.1.2 Phosphatpuffersystem

Bei diesem System wurden die Proteine His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF bzw. PecF nach der affinitätschromatographischen Reinigung gegen Phosphatpuffer (50 mM K₂HPO₄, 0,5 M NaCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol, pH 7.2) dialysiert. Die Proteine wurden anschließend entweder direkt in den Rekonstitutionen eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

Für dieses Rekonstitutionssystem wurde eine optimale MnCl₂-Konzentration von 3 mM ermittelt (Zhao *et al.* 2002). Nach Zugabe von MnCl₂ trat eine starke, milchig-weiße Trübung auf, die auf die Bildung von schwerlöslichem MnHPO₄ zurückzuführen ist (Holleman 1995, Jander 1995). Da das molare Verhältnis (PO₄)³⁻ : Mn²⁺ mehr als 5 : 1 beträgt, liegt in Abhängigkeit des Löslichkeitsproduktes wahrscheinlich kein freies Mn²⁺ in der Lösung vor. Inwieweit Mn²⁺ für die Rekonstitution von Biliproteinen notwendig ist, wurde deshalb mit dem Tris/HCl-System untersucht.

2-Mercaptoethanol dient zum einen der Reduktion von intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken in Proteinen, kann aber auch mit PCB durch einen nukleophilen Angriff auf das C10-Atom reagieren (s. Kapitel 3.3). Ohne Zugabe von 2-Mercaptoethanol zeigt sich in diesem Rekonstitutionssystem keine Chromophorbindung an PecA (Zhao *et al.* 2002). Die Rolle von 2-Mercaptoethanol bei der Rekonstitution wurde im Tris/HCl-System näher untersucht.

Das nicht-ionische Detergenz Triton X-100 ist für die Bildung von α-PEC notwendig. Triton X-100 scheint Einfluss auf die Konformationsvielfalt und die Flexibilität des freien Chromophors zu haben und verleiht dem Chromophor eine Konformation, die für die Bildung von α-PEC günstig ist (Storf 2003, Zhao *et al.* 2004).

Im Phosphatpuffer zeigten die Proteine eine starke Neigung zur Präzipitation. Vor

allein die gegen Phosphatpuffer dialysierte Lösung von His₆-PecE zeigte starke Ausfällungen des Proteins, hingegen waren die Lösungen von His₆-PecA und His₆-PecF nur leicht getrübt. In die Rekonstitution wurde auch der präzipitierte Anteil der Proteinlösungen gegeben, der nach Zugabe aller Cofaktoren und guter Durchmischung z. T. wieder in Lösung ging.

Generell wurde das Phosphatpuffersystem zur Präparation von größeren Mengen an His₆- α -PEC (μ M-Bereich) verwendet. Das daraus gewonnene His₆- α -PEC wurde für die Darstellung von mini- α -PEC für NMR-spektroskopische Experimente und zur Kristallisation eingesetzt. Das Phosphatpuffersystem wurde für die Präparation von α -PEC optimiert (s. Kapitel 3.2.1).

3.1.3 Tris/HCl-System

In diesem Rekonstitutionssystem wurden die affinitätschromatographisch gereinigten Proteine gegen Tris/HCl (1 M Tris/HCl, pH 6.0) dialysiert. Da der pH-Wert des Tris-Puffers temperaturabhängig ist, wurde der pH-Wert bei verschiedenen Temperaturen gemessen, um zu große pH-Wert-Schwankungen ausschließen zu können:

Tabelle 3-1: Temperaturabhängigkeit des pH-Werts einer 1 M Tris-Lösung.

Temperatur (°C)	pH-Wert
37	5.93
34	6.00
24	6.28
17	6.45
14	6.51
5	6.73

Es zeigte sich, dass der pH-Wert in dem Temperaturbereich, dem die Proteine ausgesetzt sind, nicht dramatisch schwankt. Da die Rekonstitutionen bei 37 °C erfolgten und der pH-Wert bei dieser Temperatur einen Wert von 5,93 aufweist, haben diese Bedingungen einen stabilisierenden Einfluss auf den Chromophor, da dieser in saurer Umgebung stabilisiert vorliegt. Nach der Dialyse zeigte keine der Proteinlösungen Präzipitationserscheinungen. Demnach ist die Löslichkeit der

Proteine in Tris/HCl wesentlich höher als im Phosphatpuffer. Die hohe Tris-Konzentration von 1 M wurde gewählt, da die Löslichkeit von His₆-PecE mit steigender Tris-Konzentration zunahm. Die dialysierten Proteine wurden direkt nach der Dialyse in Rekonstitutionsexperimenten eingesetzt, da His₆-PecE nach dem Einfrieren und Auftauen auch im Tris/HCl-Puffer präzipitierte, jedoch in geringerem Ausmaß als im Phosphatpuffer. Die Präzipitation konnte gänzlich vermieden werden, wenn His₆-PecE bei Raumtemperatur gelagert wurde. Ein Aktivitätsverlust konnte erst nach drei bis vier Tagen festgestellt werden. Bei einer Lagerung bei -20 °C konnte durch Zusatz von 2-Mercaptoethanol (3 mM) eine Präzipitation beim Auftauvorgang ebenfalls verhindert werden.

Der Rekonstitutionsansatz im Tris/HCl-System wurde wesentlich vereinfacht. Auf die Zugabe von 2-Mercaptoethanol konnte gänzlich verzichtet werden, ohne dass es zu wesentlich geringeren Produktausbeuten im Vergleich mit dem Phosphatpuffersystem kam. Auf die Bedeutung von 2-Mercaptoethanol für die Rekonstitution wird im Kapitel 3.3 näher eingegangen.

Das Phosphatpuffersystem enthält 10% Glycerin (Zhao *et al.* 2002). Ein Einfluss von Glycerin konnte im Tris/HCl-System durch Vergleichsrekonstitutionen nicht festgestellt werden, darum wurde auf die Beimischung von Glycerin verzichtet.

MnCl₂ führte im Gegensatz zum Phosphatpuffersystem im Tris/HCl-Puffer zu keinem Niederschlag. Dies ermöglicht zeitaufgelöste spektroskopische Untersuchungen (s. Kapitel 3.3.1.2), die mit dem Phosphatpuffersystem aufgrund der Reaktion von Mn²⁺ mit PO₄³⁻ nicht durchführbar sind.

Für Experimente, die die Untersuchung der Chromophorbindung, die Bildung von Proteinkomplexen oder die Wechselwirkung der Cofaktoren mit Proteinen zum Ziel hatten, wurde das Tris/HCl-System verwendet.

3.2 Mini- α -PEC: Darstellung, Charakterisierung und Dynamik

Die 3D-Struktur von PEC wurde von Düring *et al.* (Düring *et al.* 1990) mit einer Auflösung von 2,7 Å bestimmt. Damit ist die Geometrie des 10Z,15Z-PVB-Chromophors der α -Untereinheit im Protein bekannt. Die Kristallstruktur liefert

jedoch keine Informationen darüber, wie sich die lichtinduzierte *E/Z*-Isomerisierung der $\Delta^{15,16}$ -Doppelbindung des Chromophors mit der damit verbundenen Konformationsänderung auf die Proteinumgebung auswirkt. Darum soll ergänzend zur Kristallstruktur die Strukturen der beiden $\Delta^{15,16}$ -*E/Z*-Isomeren von α -PEC mittels NMR in Lösung ermittelt werden. Für diese NMR-spektroskopischen Untersuchungen ist ein α -PEC notwendig, das eine ausgeprägte Photochemie (hoher $\Delta\Delta A$ -Wert) mit thermisch stabilen $\Delta^{15,16}$ -*E/Z*-Isomeren aufweist und dessen räumliche Struktur (Faltungszustand) unter den Messbedingungen des NMR stabil bleibt. Desweiteren soll α -PEC kristallisiert werden, um durch zeitaufgelöste Röntgenstrukturanalyse die Dynamik des Proteins zu erfassen.

3.2.1 Rekonstitution und Reinigung von α -PEC

Die bei der Bildung von α -PEC ablaufenden Reaktionsschritte und deren Charakterisierung werden im Kapitel 3.3.1.3 detaillierter beschrieben. Dieses Kapitel beschränkt sich auf die biotechnologische Darstellung von α -PEC und deren Optimierung, um eine möglichst hohe α -PEC-Ausbeute zu erreichen.

Bei der lyase-katalysierten Rekonstitution von α -PEC trat neben dem gewünschten PVB-Addukt (α -PEC) als Nebenprodukt stets das PCB-Addukt auf (Storf 2003). Dabei kann die Menge des gebildeten PCB-Addukts bis zu 40% der Gesamtausbeute betragen. Die Abtrennung des gebildeten PCB-Addukts gestaltete sich aufgrund der selben Molekularmassen der beiden Addukte als schwierig. Deshalb wurde das Rekonstitutionssystem, basierend auf dem Phosphatpuffersystem optimiert, um eine möglichst hohe PVB-Adduktbildung zu erzielen. Es stellte sich heraus, dass zwei Faktoren entscheidenden Einfluss auf das Verhältnis von PVB-Addukt zu PCB-Addukt haben: Triton X-100 und das Verhältnis der eingesetzten Lyase-Untereinheiten His₆-PecE und His₆-PecF zueinander.

In Abbildung 3-2 ist die PVB- und PCB-Adduktbildung in Abhängigkeit der Triton X-100-Konzentration dargestellt.

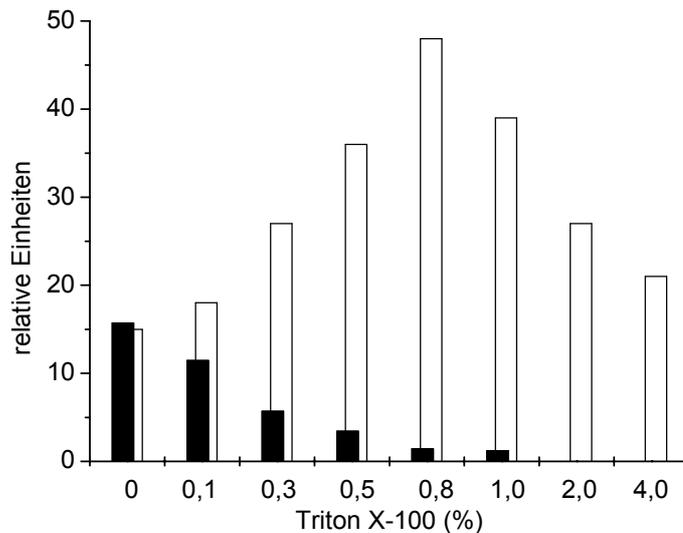


Abbildung 3-2: Abhängigkeit der PVB- und PCB-Adduktbildung von der Triton X-100-Konzentration.

Schwarze Säulen: PCB-Addukt, weiße Säulen: PVB-Addukt; PCB-Addukt berechnet aus dem Differenzspektrum 3 h Inkubation *minus* 0 h Inkubation, PVB-Addukt berechnet als ΔA nach Belichtungszyklus 500 nm - 570 nm.

In Abwesenheit des Detergens ist die Bildung von PCB-Addukt gegenüber der α -PEC-Bildung bevorzugt. Mit steigender Detergenzkonzentration wird die PVB-Adduktbildung bevorzugt. Eine zu hohe Detergenzkonzentration führt zu einer geringeren α -PEC-Ausbeute. Als optimale Detergenzkonzentration (Triton X-100) wurde ein Wert von 0,85% ermittelt.

Neben der optimalen Detergenz-Konzentration ist die Konzentration der eingesetzten Lyase-Untereinheiten His₆-PecE und His₆-PecF im Verhältnis zueinander ein entscheidender Faktor, um die α -PEC-Ausbeute gegenüber der PCB-Adduktbildung zu erhöhen.

Tabelle 3-2: α -PEC- und PCB-Addukt-Bildung in Abhängigkeit des Verhältnisses der Lyase-Untereinheiten-Konzentrationen His₆-PecE und His₆-PecF. His₆-PecA (10 μ M), PCB (8 μ M), MnCl₂ (1,5 mM), Triton-X100 (0,1% v/v).

a) relatives Verhältnis His₆-PecA/His₆-PecF konstant, His₆-PecE-Konzentration ansteigend.

b) relatives Verhältnis His₆-PecA/His₆-PecE konstant, His₆-PecF-Konzentration ansteigend.

a)	A : E : F	PVB-Addukt	PCB-Addukt	b)	A : E : F	PVB-Addukt	PCB-Addukt
	1 : 0,0 : 0,7	0	0,1		1 : 0,7 : 0,0	0	1,3
	1 : 0,05 : 0,7	1,4	0,1		1 : 0,7 : 0,04	0,6	0,7
	1 : 0,1 : 0,7	1,8	0,1		1 : 0,7 : 0,08	1,7	0,6
	1 : 0,2 : 0,7	2,7	0,1		1 : 0,7 : 0,2	2,8	0,4
	1 : 0,5 : 0,7	3,3	0,3		1 : 0,7 : 0,4	3,3	0,5
	1 : 0,8 : 0,7	3,5	0,5		1 : 0,7 : 0,7	3,3	0,5
	1 : 1,0 : 0,7	3,6	0,6		1 : 0,7 : 1,4	3,6	0,4
	1 : 2,0 : 0,7	3,8	0,7		1 : 0,7 : 2,2	3,8	0,4

Die Berechnung der relativen Ausbeuten an gebildeten PVB- und PCB-Addukt erfolgte durch Bildung des Differenzspektrums 4 h/500 nm belichtet *minus* 0 h. Anschließend wurden die Flächen unter dem Maximum bei 568 nm für das PVB-Addukt bzw. 641 nm für das PCB-Addukt berechnet. Eine Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten fand nicht statt.

Aus Tabelle 3-2 lassen sich mehrere Schlussfolgerungen für eine optimale α -PEC-Ausbeute ableiten:

- fehlt eine der beiden Lyase-Untereinheiten im Rekonstitutionsansatz, kommt es zu keiner α -PEC-Bildung.
- eine zu niedrige Konzentration von His₆-PecF im Verhältnis zu His₆-PecE führt zu relativ hohen PCB-Addukt-Ausbeuten.
- steigt die His₆-PecF-Konzentration über die His₆-PecE-Konzentration, so erhöht sich die α -PEC-Ausbeute deutlich, bei relativ geringer PCB-Adduktbildung.

Um stets eine hohe His₆- α -PEC-Ausbeute zu ermöglichen, wurde in den Rekonstitutionen ein molares Verhältnis His₆-PecE : His₆-PecF von mindestens 1 : 3 eingesetzt.

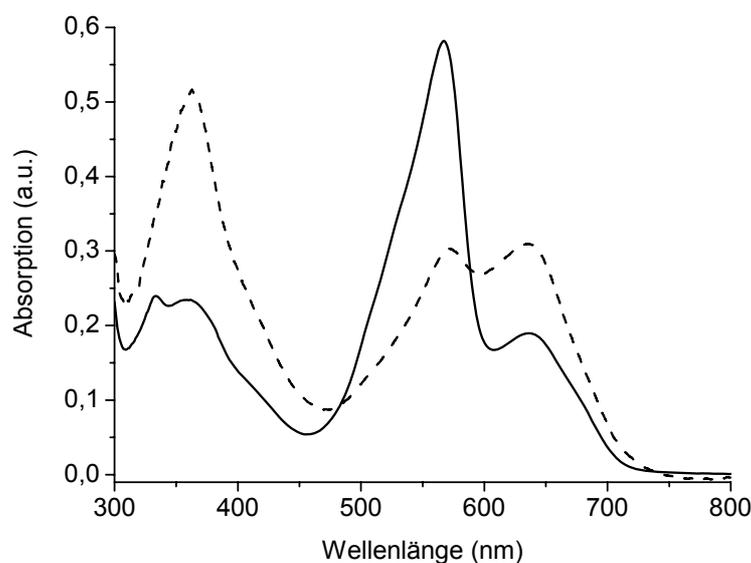


Abbildung 3-3: Optimierung der Rekonstitution von His₆-α-PEC.

Qualitative Absorptionsspektren der affinitätschromatographisch gereinigten Produkte vor (- -) und nach (—) der Optimierung des Rekonstitutionssystems. Die Proben wurden vor der Aufnahme mit Licht der Wellenlänge 500 nm belichtet, um die Spektren miteinander vergleichen zu können.

Abbildung 3-3 zeigt die Absorptionsspektren der Rekonstitutionsprodukte vor und nach der Optimierung des Rekonstitutionssystems. Daraus ist klar ersichtlich, dass durch die Optimierung eine Steigerung der α-PEC-Ausbeute (α-PEC, λ_{\max} 568 nm) und Verringerung des Nebenprodukts (PCB-Addukt, λ_{\max} 641 nm) erreicht werden konnte.

Die Rekonstitution wurde absorptionsspektroskopisch verfolgt und war nach ca. drei Stunden Inkubation bei 37 °C abgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der violett gefärbte, klare Überstand in einem ersten Schritt mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt, um freies PCB und Triton X-100 zu entfernen. Nach Dialyse gegen Phosphatpuffer zeigte der gereinigte Ansatz, der neben dem rekonstituierten α-PEC noch die beiden Lyase-Untereinheiten enthält, starke Ausfällungen. Diese Präzipitationen konnten durch Zentrifugation abgetrennt werden und bestehen vorwiegend aus den beiden Lyase-Untereinheiten sowie unvollständig rekonstituiertem Apoprotein. In einem zweiten Reinigungsschritt mittels Gel-Permeationschromatographie (GPC) erfolgte die Abtrennung der verbleibenden Lyase-Untereinheiten (Abbildung 3-4).

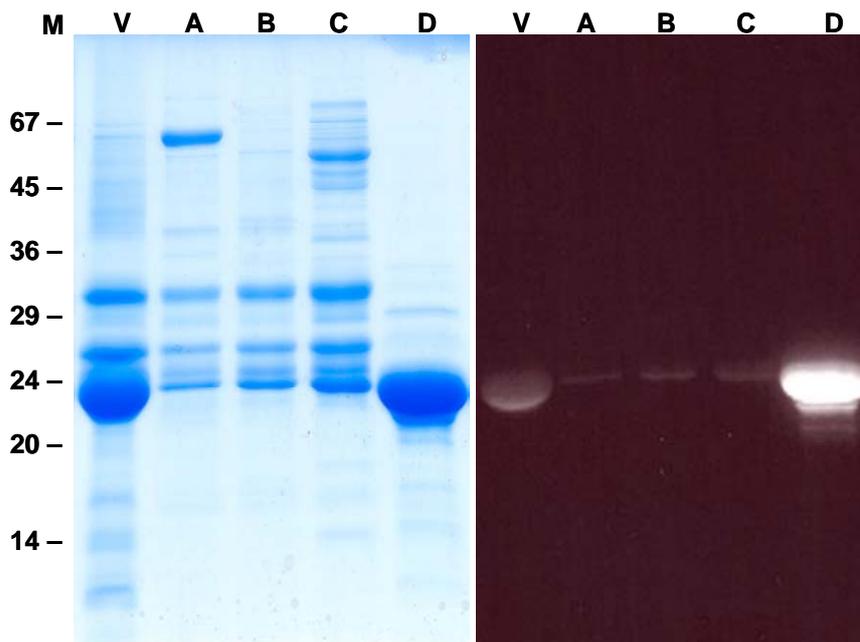
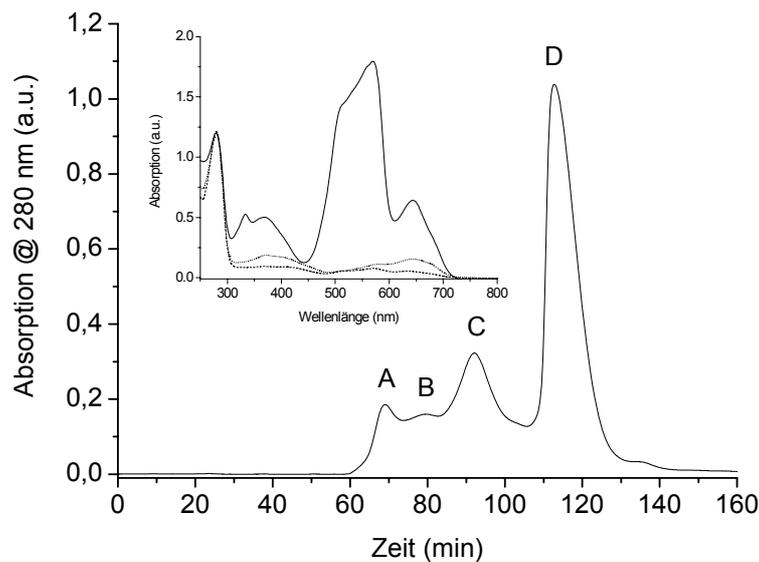


Abbildung 3-4: Abtrennung der Lyase-Untereinheiten PecE/PecF von rekonstituiertem α -PEC durch Gel-Permeationschromatographie (GPC).

Oben: Chromatogramm der Gelfiltration bei 280 nm; Inset: Spektren aus dem Chromatogramm der Gelfiltration, A (····), C (---), D (—); die Spektren wurden bei 280 nm normiert; **unten:** SDS-PAGE, Coomassie-Färbung (links) und Zn^{2+} -induzierte Fluoreszenz (rechts) von Proben der Peaks A, B, C, D aus der Gelfiltration, sowie einer Probe vor Gelfiltration (V), Marker (M).

Das Chromatogramm der GPC bei 280 nm zeigt vier Peaks, die sich in ihren Molekulargewichten und ihren Proteinzusammensetzungen unterscheiden. Die

Peaks A, B, C enthalten die Lyase-Untereinheiten PecE und PecF sowie nicht bzw. unvollständig rekonstituiertes Apoprotein. Dies zeigt sich in der SDS-PAGE (Spuren A, B und C) sowie in den Absorptionsspektren der Peaks A und C. Die Absorptionsspektren der Peaks A und C zeigen im Verhältnis zur Proteinabsorption bei 280 nm im Chromophorbereich nur eine geringe Absorption. Dabei weist das Absorptionsspektrum für den Peak A Maxima bei 570 und 643 nm auf, während das Spektrum für den Peak C Maxima bei 570 und 634 nm besitzt. Peak D enthält das rekonstituierte α -PEC ohne Lyase-Untereinheiten. Somit konnte eine vollständige Abtrennung der Lyase-Untereinheiten vom Rekonstitutionsprodukt erreicht werden. Das Absorptionsspektrum für den Peak D weist Maxima bei 505, 568 und 641 nm auf. Die beiden kürzerwellig absorbierende Maxima entsprechen den *E*- und *Z*-Isomeren des α -PEC, während das Maximum bei 641 nm dem PCB-Addukt zugeordnet wird. Die Bildung des PCB-Addukts kann nicht vollständig vermieden werden. Das Verhältnis α -PEC zu PCB-Addukt lag bei verschiedenen Präparationen zwischen 85:15 bis 95:5.

Das rekonstituierte α -PEC zeigte ein instabiles Verhalten. Bereits während der GPC kam es teilweise zu einer leichten Auftrennung der α -PEC-Bande auf der GPC-Säule. Die Analyse dieser Banden mittels SDS-PAGE zeigte unterschiedliche Molekulargewichte für das rekonstituierte α -PEC. Um stabiles und einheitliches α -PEC zu erhalten, wurden verschiedene Strategien verfolgt, die im nachfolgenden Kapitel erläutert werden.

3.2.2 Strategien zur Darstellung von mini- α -PEC

Da für NMR-Untersuchungen und für die Kristallisation ein stabiles und einheitliches α -PEC-Peptid notwendig ist, wurden verschiedene Strategien verfolgt, um dieses Ziel zu erreichen:

- Um den (proteolytischen) Abbau von rekonstituierten α -PEC zu verhindern, wurden in verschiedenen Stadien der Proteingewinnung und -reinigung sowie zum rekonstituierten und gereinigten α -PEC Proteaseinhibitoren zugesetzt.

- Um den proteolytischen Abbau zu beschleunigen und dadurch ein verkürztes α -PEC-Konstrukt (mini- α -PEC) zu erhalten, wurde ein tryptischer Verdau durchgeführt.
- In Zusammenarbeit mit dem Labor von Zhao (College of Life Sciences and Technology, Wuhan, China) wurde ein N-terminal um 33 Aminosäuren verkürztes PecA-Apoprotein (PecA-N-33) konstruiert (Zhao *et al.* 2003), um dieses mit PCB zu rekonstituieren und damit das Problem des Abbaus zu umgehen.
- Die Inkubation von Albumin mit rekonstituierten α -PEC wurde als Test herangezogen, um einen möglichen Einfluss von Proteasen, die während der Proteinreinigung nicht entfernt wurden, zu untersuchen.

Aus diesen Versuchen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Proteaseinhibitoren hatten nur einen geringen Einfluss auf die Abbaureaktion von α -PEC. Der Abbauprozess wurde dadurch verlangsamt, konnte aber nicht gestoppt werden (Abbildung 3-5).

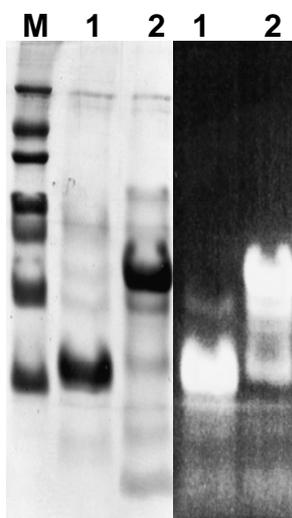


Abbildung 3-5: SDS-PAGE zum Einfluss von Proteaseinhibitoren auf die Abbaureaktion von rekonstituiertem α -PEC.

Comassie-Färbung (links) und Zn^{2+} -induzierte Fluoreszenz (rechts) der in Abwesenheit (1) und in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren (2) gebildeten Produkte, jeweils nach 5 Tagen Inkubation bei 12 °C; Marker (M): 67, 45, 35, 29, 24, 20, 14 kDa.

Die SDS-PAGE zeigt, dass der Abbau von His₆- α -PEC durch den Zusatz von Proteaseinhibitoren deutlich verlangsamt wurde. Dennoch treten mehrere fluoreszierende Banden und somit chromophortragende Peptide auf. Für NMR-Untersuchungen ist jedoch eine definierte Probenzusammensetzung Voraussetzung, da unterschiedlich großen Peptide die Zuordnung der NMR-Signale zu einzelnen Aminosäuren unmöglich machen. Darum wurde auf den weiteren Einsatz der Inhibitoren verzichtet.

Abbildung 3-6 zeigt die Analyse des tryptischen Verdaus von His₆- α -PEC mittels SDS-PAGE. Die Zugabe von Trypsin zum rekonstituierten α -PEC führte nicht zu einem stabilen Abbauprodukt, sondern zu einem fast vollständigen Verdau. Es zeigte sich, dass bereits nach ca. drei Stunden fast das gesamte His₆- α -PEC-Protein in Form kurzkettiger Peptide vorlag. Eine prominente, chromophortragende Bande ist auch nach 22 Stunden Inkubationszeit bei ca 14 kDa detektierbar. Des Weiteren ist ein stark fluoreszierender Bereich am Ende des PAA-Gels zu erkennen, der auf eine Vielzahl chromophortragender Peptide unterschiedlicher Größe schließen lässt.

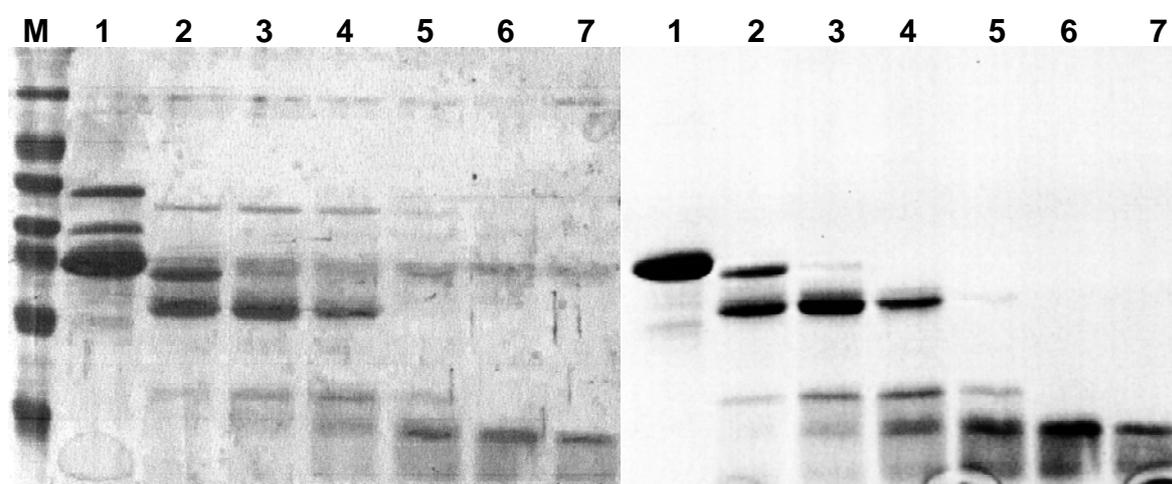


Abbildung 3-6: SDS-PAGE des zeitlichen Verlaufs des tryptischen Verdaus von rekonstituiertem α -PEC.

Coomassie-Färbung (links) und Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz (rechts), 1: 0 h, 2: 0,5 h, 3: 1 h, 4: 2 h, 5: 3 h, 6: 6 h, 7: 22 h, M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa)

Der tryptische Verdau von His₆- α -PEC erfolgt schrittweise. Dabei entsteht zunächst ein Abbauprodukt mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa (Spur 3), das im nächsten Schritt über ein weiteres Zwischenprodukt mit einer Größe von ca. 16 kDa auf ein ca. 14 kDa großes Peptid abgebaut wird (Spur 6). Dieses Peptid ist relativ stabil, da selbst nach längerer Inkubationszeit nur noch ein geringfügiger Abbau

erfolgt (Spur 7).

Der tryptische Verdau erfolgt nur bis zu einer bestimmten Stelle im Protein. Dabei wird das Protein spezifisch vom N-terminalen Ende verdaut. Dies kann aus dem einheitlichen Muster der SDS-PAGE-Analyse geschlossen werden, die distinkte Banden aufweist. Der weitere Abbau wird durch die Tertiärstruktur des 14 kDa großen Peptids verhindert.

Die Absorptionsspektren des tryptischen Verdaus in Abbildung 3-7 zeigen eine starke Abnahme der Absorption im roten Maximum, hingegen nimmt die Absorption im blauen Wellenlängenbereich kaum zu. Somit ändert sich das Verhältnis der lang- zu kurzwelligen Absorption (Q_{UV}^{VIS} -Wert) von 2,8 auf 2,1; jedoch kommt es nicht zu einem Q_{UV}^{VIS} -Wert < 1 , wie es für einen freien Chromophor zu erwarten gewesen wäre (Scheer 1982). Es kommt lediglich zu einer hypsochromen Verschiebung des Maximums von 566 nm auf 560 m. Die Photochemie des trypsinverdauten α -PEC ist intakt und zeigt Maxima bei 504 und 568 nm, wie sie auch beim unverdauten α -PEC zu erkennen sind. Lediglich der $\Delta\Delta A$ -Wert, der bei His₆- α -PEC Werte von 100% erreichen kann (Storf 2003), liegt beim trypsinverdauten α -PEC nur noch bei ca. 70%.

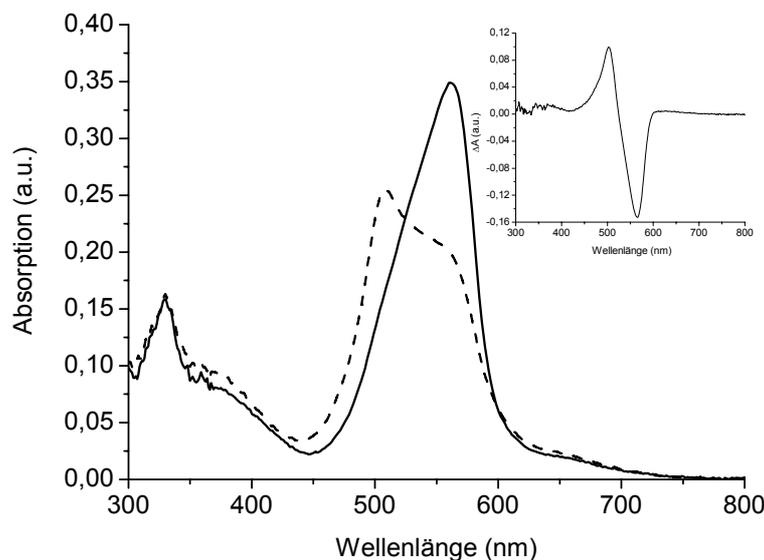
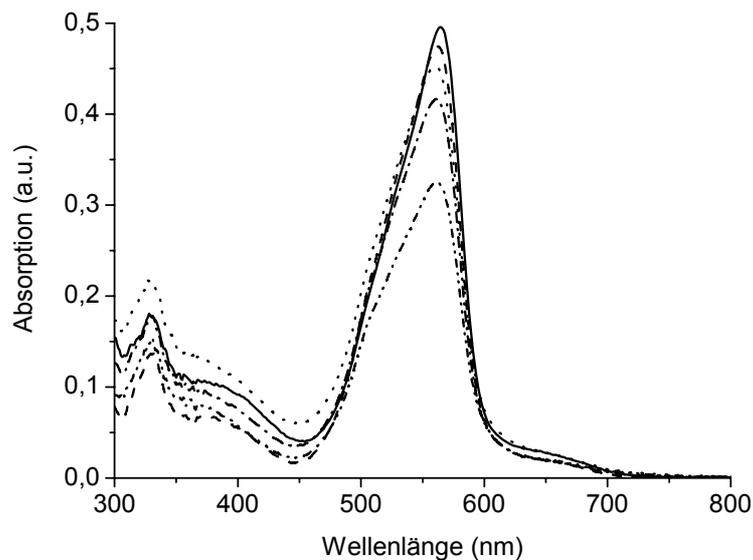


Abbildung 3-7: Absorptionsspektren des tryptischen Verdau von His₆-α-PEC.

Oben: Zeitlicher Verlauf 0 h (—), 2 h (---), 3 h (····), 6 h (----), 22 h (— · —); **unten:** reversible Photochemie Z-Form (—, nach 500 nm-Belichtung), E-Form (---, nach 570 nm Belichtung). Inset: Differenzspektrum der Z-Form *minus* E-Form

Der Trypsinverdau scheint eine geeignete Methode zur Darstellung eines stabilen α-PEC-Konstrukts mit der für α-PEC typischen Photochemie zu sein, da es nur zu einem partiellen Verdau durch Trypsin kommt. Die Ausbeute an verkürztem α-PEC-Konstrukt (mini-α-PEC) liegt aber bei maximal 10% (Abschätzung aus der SDS-PAGE, Abbildung 3-6). Zudem scheint es zwischen α-PEC und Trypsin zu einer

Komplexbildung zu kommen (Zhao *et al.* 2003), die eine weitere Verwendung des durch Trypsinverdauung gewonnenen mini- α -PEC für Kristallisations- und NMR-Experimente erschwert.

Die Rekonstitutionen von His₆-PecA-N-33 und PecA(N-33) führten zu keiner ausreichenden Ausbeute von His₆- α -PEC(N-33) bzw. α -PEC(N-33). Die Ausbeute lag bei weniger als 10%, verglichen mit dem Vollängenkonstrukt. Zudem ließ sich das Verhältnis α -PEC/PCB-Addukt durch Variation der Pufferbedingungen nicht beeinflussen. Weder die Zugabe von Triton X-100, noch der Zusatz von Glycerin oder 2-Mercaptoethanol konnten die Ausbeute an rekonstituiertem Produkt erhöhen. ¹H-NMR-Untersuchungen des Apoproteins zeigten, dass das N-terminal verkürzte Apoprotein in einem ungefalteten Zustand vorliegt und somit kein geeignetes Substrat für die Lyase PecE/PecF darstellt.

Die Inkubation von rekonstituiertem α -PEC mit Albumin führte zu einem Abbau von α -PEC, jedoch nicht von Albumin. Dies lässt darauf schließen, dass der Abbau von α -PEC autoproteolytisch erfolgt und nicht durch Proteasen, die bei der Proteinreinigung mitgeschleppt wurden.

Aus den Erkenntnissen der vorangegangenen Versuche wurde ein Verfahren entwickelt, das eine Präparation von mini- α -PEC mit ausreichenden Ausbeuten ermöglicht. Dazu wurde das durch Gelfiltration gereinigte His₆- α -PEC auf ein Volumen von 1 ml aufkonzentriert und bei 4-12 °C im Dunkeln gelagert. Innerhalb von 4-30 Tagen kam es zu einem Abbau des rekonstituierten α -PEC um 8,8 kDa. Diese Differenz entspricht dem Verlust des His-Tags (5,2 kDa) und der beiden N-terminalen X-, Y-Helices (3,6 kDa). Massenspektroskopische Untersuchungen des so gewonnenen mini- α -PEC ergaben, dass relativ zum ungetaggten Vollängenprotein N-terminal 33 Aminosäuren verloren gegangen sind.

3.2.3 Charakterisierung von mini- α -PEC

Das durch die limitierende (Auto)proteolyse erhaltene mini- α -PEC wurde mittels Absorptions-, Fluoreszenz- und Massenspektroskopie sowie SDS-PAGE charakterisiert (Abbildung 3-8).

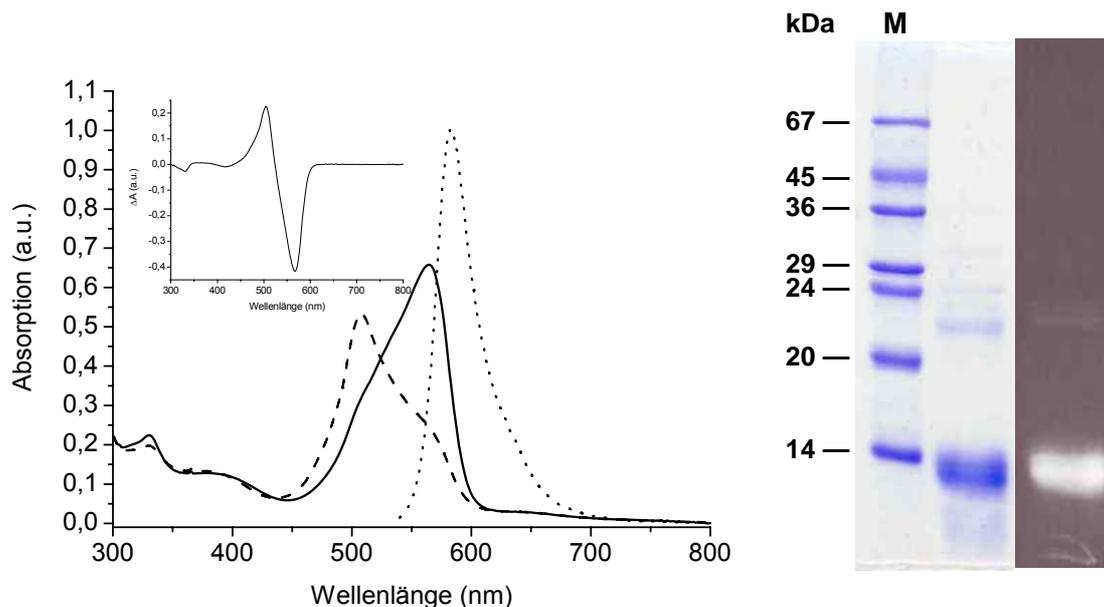


Abbildung 3-8: Eigenschaften von mini- α -PEC.

Links: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von mini- α -PEC. Z-Form nach Belichtung mit Licht der Wellenlänge 505 nm (—), E-Form nach Belichtung mit Licht der Wellenlänge 570 nm (- - -), Fluoreszenzspektrum nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 525 nm (· · ·); Inset: Differenzspektrum 505 nm-Belichtung *minus* 570 nm-Belichtung; **rechts:** SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz von mini- α -PEC.

Die Absorptionsmaxima der E- und Z-Isomere liegen bei 505 und 568 nm und unterscheiden sich somit nicht vom nativen bzw. rekonstituierten Volllänge- α -PEC. Die für das isolierte α -PEC charakteristische Photochemie bleibt erhalten und äußert sich in einem hohen $\Delta\Delta A$ -Wert, der im Bereich von 85-95% liegt. Auch die Fluoreszenzeigenschaft von mini- α -PEC mit einer Emission bei 584 nm nach Anregung bei 525 nm unterscheidet sich nicht von dem des nativen α -PEC. Im Absorptionsspektrum des mini- α -PEC ist keine Absorption bei 641 nm, wie sie noch beim GPC-gereinigten Rekonstitutionsprodukt erkennbar war, feststellbar. Das bedeutet, dass während des proteolytischen Abbaus die P641-Form vollständig eliminiert wurde. Das SDS-Gel zeigt eine fluoreszierende Bande auf der Höhe mini- α -PEC-Bande bei 14 kDa. Dies belegt die kovalente Bindung des PVB-Chromophors.

Mittels Massenspektroskopie wurde für das mini- α -PEC eine Molekularmasse von 14,525 kDa ermittelt. Dies entspricht dem Verlust des His₆-Tags sowie von 33 N-terminalen Aminosäuren. Ein weiterer Abbau des Chromoproteins unter NMR-

Messbedingungen konnte nicht festgestellt werden. Mini- α -PEC kann bei 4 °C im Dunkeln über mehrere Monate (>18) ohne wesentlichen Verlust der Photochemie aufbewahrt werden. Somit stellt mini- α -PEC ein globuläres, durch Licht schaltbares und stabiles Chromoprotein dar, das für NMR-Untersuchungen sowie für Kristallisationszwecke geeignet ist. Für die Kristallisation von mini- α -PEC wurden mehrere Präparationen zur Verfügung gestellt. Für NMR-Untersuchungen wurden verschiedene isotoopenmarkierte mini- α -PEC-Proben präpariert:

- uniform ^{15}N -markiert,
- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiert,
- selektiv ^{15}N -Alanin-, ^{15}N -Glycin-, ^{15}N -Leucin-, ^{15}N -Lysin-, ^{15}N -Phenylalanin-, ^{15}N -Serin- und ^{15}N -Valin-markiert,
- ^{15}N -inverse Markierung von Asparagin, Threonin und Tyrosin.

Zusammenfassende Diskussion der Darstellung und Charakterisierung von mini- α -PEC:

His₆- α -PEC zeigt einen (auto?)proteolytischen Abbau der beiden N-terminalen X- und Y-Helices, die im Phycoerythrocyanin für die Aggregation der Untereinheiten verantwortlich sind. Der Einsatz von Proteaseinhibitoren, um den proteolytischen Abbau zu verhindern, blieb ohne Erfolg, der Abbau konnte dadurch lediglich verzögert werden. Die Zugabe von Trypsin zur Gewinnung von mini- α -PEC führte zu einem ca. 14 kDa großen Chromopeptid, dessen spektroskopische Eigenschaften mit denen des nativen α -PEC übereinstimmen. Die Ausbeute liegt jedoch bei nur ca. 10% und es kommt zu einer Komplexbildung zwischen dem Chromopeptid und der Protease (Zhao *et al.* 2003), die eine weitere Verwendung des Chromopeptids somit verhindert. Versuche zur Rekonstitution eines N-terminal verkürzten PecA-Apoproteins führten zu schlechten Produktausbeuten, da das verkürzte Apoprotein in einem ungefalteten Zustand vorliegt oder ein schlechtes Substrat ist. Die Gewinnung eines stabilen mini- α -PEC in größeren Mengen erfolgte durch Optimierung des *in vitro*-Rekonstitutionssystems mit anschließender Inkubation des His₆- α -PEC bei 4-12 °C im Dunkeln. Dadurch kommt es zu einem wahrscheinlich autokatalytischen Abbau der N-terminalen Helices. Im Gegensatz zum tryptischen Verdau führt diese Methode nur zu einem geringen Verlust an Protein. Die

spektroskopischen Eigenschaften des mini- α -PEC stimmen mit denen des nativen α -PEC überein. Lediglich ein leicht verminderter $\Delta\Delta A$ -Wert wurde festgestellt. Die massenspektroskopische Analyse von mini- α -PEC zeigt einen Verlust von 33 Aminosäuren. Ähnliche Resultate erhielten Wiegand *et al.* (Wiegand *et al.* 2002), wenn sie isoliertes α -PEC aus *Mastigocladus laminosus* für mehrere Monate in 0,3% (v/v) Ameisensäure bei 4 °C aufbewahrten. Mittels ‚nativer‘ PAGE (Reuter *et al.* 1988) und Massenspektroskopie analysierten sie das Produktgemisch und identifizierten fünf Chromopeptide mit Molekulargewichten zwischen 16 und 14 kDa, die N-terminal verkürzt sind. Dabei zeigte sich, dass die verkürzten α -PEC-Moleküle photochemisch aktiv sind, sich jedoch in ihrer Löslichkeit unterscheiden. Erst ab einem N-terminalen Verlust von 30 Aminosäuren waren die Chromopeptide löslich (pH 7.0).

Abbildung 3-9 zeigt den Bereich der Schnittstelle, durch die α -PEC in seine zwei funktionellen Domänen (Aggregations-, Chromophordomäne) geteilt wird.

X- Y- Helices

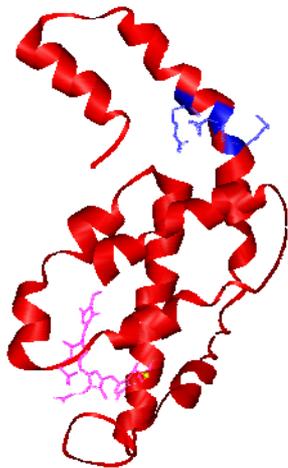


Abbildung 3-9: Röntgenkristallstruktur von α -PEC (2,7 Å) (Düring *et al.* 1990) mit Darstellung der Arginine 30, 33 und 35 (blau).

Arginin 33 ist eine konservierte Aminosäure und taucht in fast allen α -Untereinheiten von PC, PE und PEC in Position 33 bzw. 32 auf. In Position 30 findet sich ebenfalls ein konserviertes Arginin. Zusätzlich findet sich in der Aminosäuresequenz der α -Untereinheit von *Mastigocladus laminosus* ein weiteres Arginin in Position 35. Das gehäufte Auftreten dieser polaren Aminosäure legt eine gewisse Labilität dieses Aminosäureabschnittes nahe. *In situ* werden die X- und Y-Helices durch Interaktion

mit der β -Untereinheit stabilisiert. Die fehlenden Wechselwirkungen *in vitro* und die dadurch verursachte Dynamik der beiden N-terminalen Helices können eine mögliche Ursache des Abbaus sein. Durch die fehlende Interaktion kann es auch zu einer Entfaltung der X- und Y-Helices kommen, wodurch eine säurekatalysierte Hydrolyse zum Verlust der Helices führt (Jauregui-Adell *et al.* 1975, Wiegand *et al.* 2002). Ein weiterer (auto)proteolytischer Abbau scheint durch die Globinstruktur des chromophortragenden Teil des Peptids verhindert zu werden, obwohl in der verbleibenden Aminosäuresequenz weitere Trypsinschnittstellen vorhanden sind. Ein Hinweis auf eine stabilisierende Wirkung des Chromophors auf die Globinstruktur ist die Tatsache, dass eine Inkubation des Apoproteins unter den selben Bedingungen zu einem vollständigen Abbau führt. Einen ähnlichen Effekt beobachteten Park *et al.* (Park *et al.* 2000) beim tryptischen Verdau von Phytochrom Cph1 aus *Synechocystis sp.* (PCC6803). Während das Apoprotein durch Trypsin vollständig verdaut wurde, kam es beim Holoprotein nur zu einem partiellen Verdau.

3.2.4 NMR-spektroskopische Untersuchungen von mini- α -PEC

Auf die Grundlagen der NMR-Spektroskopie wird hier nicht näher eingegangen. Eine Einführung in die NMR-Spektroskopie zur Untersuchung von Makromolekülen findet sich bei Wider (Wider 2000). Die NMR-Spektroskopie eignet sich zur Strukturbestimmung von Makromolekülen in Lösung bis zu einer Größe von ca. 30 kDa (Montelione *et al.* 2000, Prestegard *et al.* 2001). Mit Hilfe verschiedener Experimente können dadurch Struktur-Funktionsbeziehungen, Informationen über die Dynamik sowie über unterschiedliche Konformationen des Proteins und von Cofaktoren gewonnen werden (Shuker *et al.* 1996, Muhlhahn *et al.* 1998).

Mittels NMR-Spektroskopie sollen die Strukturen der *E/Z*-Isomere von mini- α -PEC in Lösung ermittelt werden. Darauf aufbauend soll die Dynamik der *E/Z*-Isomere sowie die Chromophor-Protein-Interaktionen mit ihren Auswirkungen auf das Proteinrückgrat untersucht werden. Die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Aminosäuren erfolgt durch Aufnahme von NOESY-, TOCSY- und HSQC-Spektren. Dabei dienen die NOESY-Spektren der Zuordnung von sequentiellen Beziehungen zwischen den Aminosäureresten und die TOCSY-Spektren werden zur Identifizierung von Signalen aus interresidualen

Wechselwirkungen verwendet. Mittels HSQC-Experimenten lassen sich Protonen, die direkt an einen Heterokern (^{15}N , ^{13}C) gekoppelt sind, identifizieren. Erste Ergebnisse aus den NMR-Messungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Es konnte bei den NMR-Messungen niemals eine reine *E*- bzw. *Z*-Form gemessen werden, stets lagen beide isomere Formen in der Lösung vor (Abbildung 3-10, Inset). Einige Signale der uniform ^{15}N -markierten Probe zeigen in heteronuclear NOE-Experimenten zwischen den beiden isomeren Formen starke Intensitätsschwankungen, die auf flexible Bereiche des Proteinrückgrats zurückzuführen sind (Pfeile in Abbildung 3-10 sowie Abbildung 3-11).

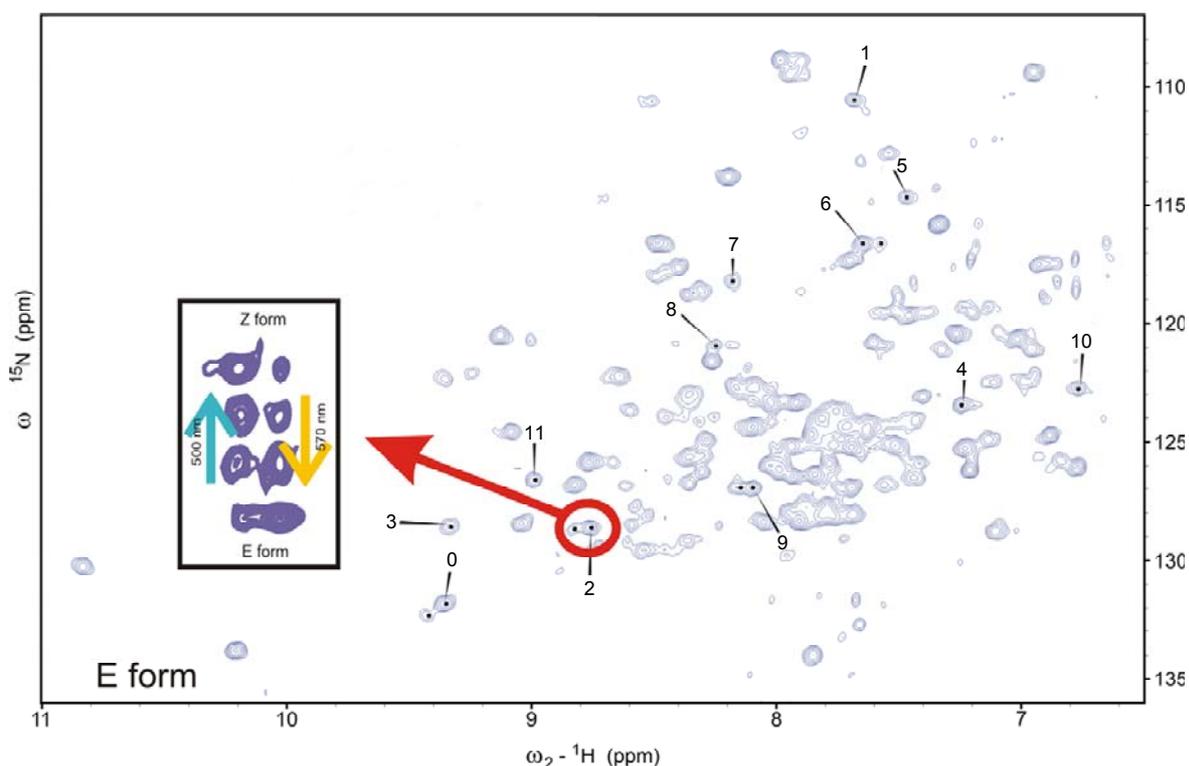


Abbildung 3-10: Auswirkungen der reversiblen Photochemie von mini- α -PEC auf das Proteinrückgrat.

2D- ^{15}N -HSQC-Spektrum einer uniform ^{15}N -markierten Probe nach Belichtung mit Licht der Wellenlänge 570 nm. Pfeile mit Nummern geben Peaks an, deren Signalintensitäten sich zwischen der *E*- und *Z*-Form stark unterscheiden (s. Abbildung 3-11). Das Inset zeigt den graduellen Übergang des Verhältnisses zwischen den beiden isomeren Formen an.

Die Flexibilität des Proteinrückgrats kann durch heteronucleare NOE-Experimenten gemessen werden (Abbildung 3-11).

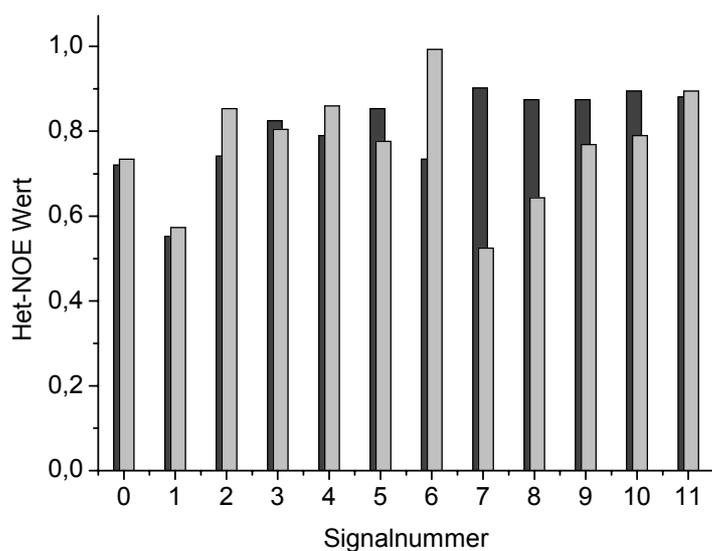


Abbildung 3-11: Flexibilität des Proteinrückgrats von mini- α -PEC in *E*- und *Z*-Form. Signalintensitäten der in Abbildung 3-10 mit Pfeilen markierten Signale aus heteronuclearen NOE-Experimenten; graue Balken: *Z*-Form, schwarze Balken: *E*-Form.

Das dabei entstehende Spektrum ähnelt dem HSQC-Spektrum, jedoch werden die Signalintensitäten durch flexible lokale Bereiche des Proteinrückgrats moduliert. Aminosäuren, die sich in einem starren Bereich des Proteins befinden, geben Signalintensitäten im Bereich zwischen 0,6-0,85, hingegen liefern Aminosäuren, die sich in flexiblen Proteinbereichen befinden, Signalintensitäten, die darunter liegen (relativ zu einem Referenzspektrum). Im Falle von mini- α -PEC finden sich Proteinbereiche, die in Abhängigkeit der Belichtungsform starrer bzw. flexibler vorliegen. Dies zeigt sich bei den in Abbildung 3-10 durch Pfeile markierten nummerierten Peaks sehr deutlich.

Abbildung 3-12 zeigt übereinandergelegte HSQC-Spektren spezifisch ^{15}N -markierter Proben sowie einer uniform ^{15}N -markierten Probe von mini- α -PEC in der *E*-Form. Mit Hilfe der spezifisch ^{15}N -markierten Proben können die Peaks der uniform ^{15}N -markierten Probe einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden.

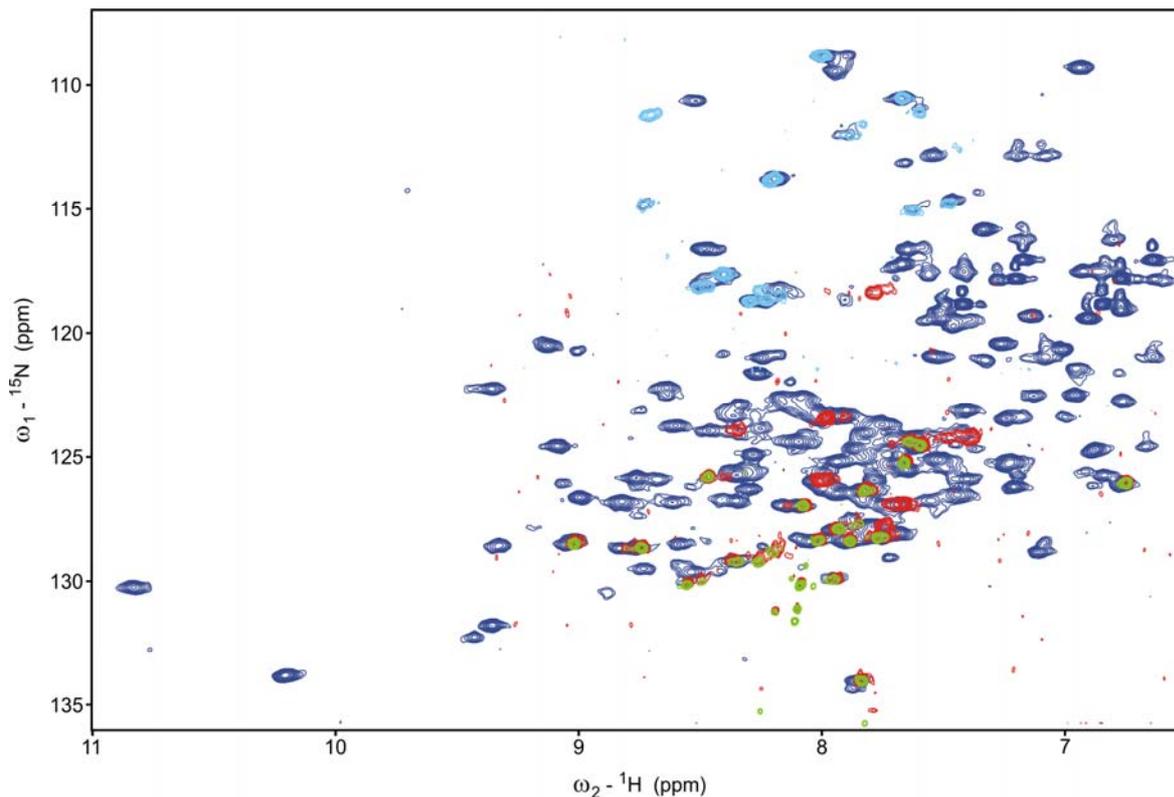


Abbildung 3-12: 2D-¹⁵N-HSQC-Spektren von mini- α -PEC in der E-Form.

Uniform ¹⁵N-markiert (dunkelblau), selektiv ¹⁵N-Val-markiert (rot), selektiv ¹⁵N-Ala-markiert (grün), selektiv ¹⁵N-Gly-markiert (hellblau).

Im entsprechenden Minimalmedium synthetisierte, aminosäurespezifisch markierte Proteine sollten im NMR nur Signale für die jeweilige Aminosäure liefern. Dies gelingt jedoch oftmals nicht, so dass es zu Kreuzmarkierungen kommt. Abbildung 3-12 zeigt diese Kreuzmarkierungen am Beispiel von ¹⁵N-Alanin, ¹⁵N-Valin und ¹⁵N-Glycin. Während es zu keinen Kreuzmarkierungen mit ¹⁵N-Glycin kommt, zeigen die Peaks von ¹⁵N-Alanin und ¹⁵N-Valin Überlappungen auf. Dies erschwert eine eindeutige Zuordnung der Signale. Eine vollständige Zuordnung der Signale war zum Abschluß der vorliegenden Arbeit noch nicht gänzlich erfolgt.

3.2.5 Kristallisation von mini- α -PEC

Die Kristallisation von mini- α -PEC erfolgte in der Z-Form im Dunkeln nach ausreichender Belichtung mit Licht der Wellenlänge 500 nm. Eine mögliche thermische Umwandlung der Z-Form in die E-Form im Dunkeln wurde durch

begleitende Absorptionsmessungen von mini- α -PEC in Lösung nach Belichtung mit Licht der Wellenlängen 500 nm bzw. 570 nm untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl die *E*-Form wie auch die *Z*-Form über einen Messzeitraum von 30 Tagen bei 12 °C nicht in die entsprechende isomere Form umgewandelt wurden. Lediglich ein Rückgang des jeweiligen Absorptionsmaximums bei 568 nm bzw. 505 nm von ca. 10% konnte beobachtet werden. Abbildung 3-13 zeigt einen Kristall von mini- α -PEC.

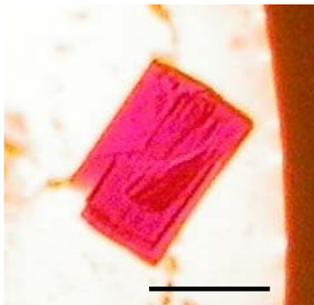


Abbildung 3-13: Kristall von mini- α -PEC. Der schwarze Balken entspricht einer Länge von ca. 200 μ m.

Erste Messungen um die Qualität und Streufähigkeit des Kristalls zu überprüfen zeigten, dass die Kristallgröße noch nicht ausreichend ist, um damit die Struktur von mini- α -PEC zu lösen.

3.3 Bilinaddukte mit apo- α -Phycoerythrocyanin (PecA)

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Bindung von offenkettigen Tetrapyrrolen, die sich in ihrer Molekülstruktur und –geometrie unterscheiden, an das Apoprotein PecA. Durch die spektroskopischen Untersuchungen der dabei ablaufenden Reaktionen sowie der Endprodukte sollen mechanistische Vorgänge bei der Chromophorbindung untersucht werden. Die Funktionen, der bei der Bindung beteiligten Lyase-Untereinheiten PecE und PecF, sollen dadurch näher charakterisiert werden.

Offenkettige Tetrapyrrol-Chromophore, die eine 3-Ethylidengruppe besitzen, können unter Ausbildung eines Thioethers an Cysteine von Proteinen binden (Li *et al.* 1992, Storf *et al.* 2001). Eine weitere Reaktionsmöglichkeit besteht in der Bindung von Cystein an die zentrale Methinbrücke (C10) des Chromophors, wobei das

konjugierte π -System unterbrochen wird (Falk 1989). Hierdurch kommt es zu einer Zunahme der Absorption bei 420 nm, da ein Bilirubin-ähnlicher Chromophor entsteht (Beltrame 1985). Die gleiche Reaktion findet statt, wenn PCB mit freiem Cystein oder anderen Thiolen inkubiert wird (Klein *et al.* 1979). Eine Veränderung des Absorptionsspektrums von PCB bei Inkubation mit anderen Aminosäuren findet nicht statt (Abbildung 3-14).

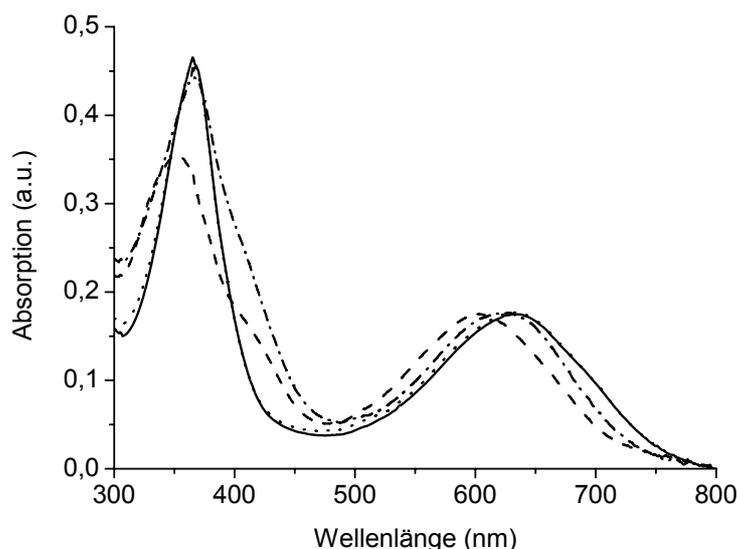


Abbildung 3-14: Reaktion von PCB mit Cystein, Alanin und 2-Mercaptoethanol im Trispuffer. Absorptionsspektren von PCB mit Cystein (- - -), PCB mit Alanin (·····), PCB mit 2-Mercaptoethanol (- · - ·), PCB in Tris-Puffer als Kontrolle (—), jeweils nach 75 min bei 37 °C. Die Spektren wurden im roten Maximum normiert.

Bei den Inkubationen von PCB mit Cystein und 2-Mercaptoethanol kommt es neben der Bildung der Schulter bei 420 nm zu einer hypsochromen Verschiebung der langwelligeren Absorption. Die Inkubation von Alanin mit PCB zeigt gegenüber PCB im Tris/HCl-Puffer keine spektralen Veränderungen. Um mögliche unerwünschte Nebenreaktionen zwischen 2-Mercaptoethanol und dem Chromophor zu vermeiden, wurde bei den Rekonstitutionen auf die Zugabe von 2-Mercaptoethanol verzichtet. Somit können die in den Experimenten auftretenden Veränderungen in den Absorptionsspektren im Bereich von 420 nm auf eine (unspezifische) Bindung des Tetrapyrrols an das Protein zurückgeführt werden.

PCB ist das natürliche Substrat für die Lyase PecE/F, die die Addition des Chromophors an PecA und dessen Isomerisierung zum PVB katalysiert (Zhao *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2002). Zusätzlich zu dem natürlichen Substrat PCB kamen bei der

Rekonstitution der α -Untereinheit von Phycoerythrocyanin drei weitere Chromophore zum Einsatz, um die Substratspezifität der Lyase-Untereinheiten und des Apoproteins zu untersuchen:

- Phycocyanobilin-Dimethylester, bei dem die Propionsäureseitenketten als Methylester vorliegen (s. Kapitel 3.3.2).
- Phycoerythrobilin (PEB), das sich vom PCB durch die fehlende Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen C und D und durch eine zusätzliche Doppelbindung an C18¹,18² unterscheidet (s. Kapitel 3.3.3).
- Thia-Phycocyanobilin, bei dem der Pyrrolstickstoff im Ring D durch Schwefel ersetzt wurde und die Ethangruppe an C18 durch eine Methylgruppe substituiert worden ist (s. Kapitel 3.3.4).

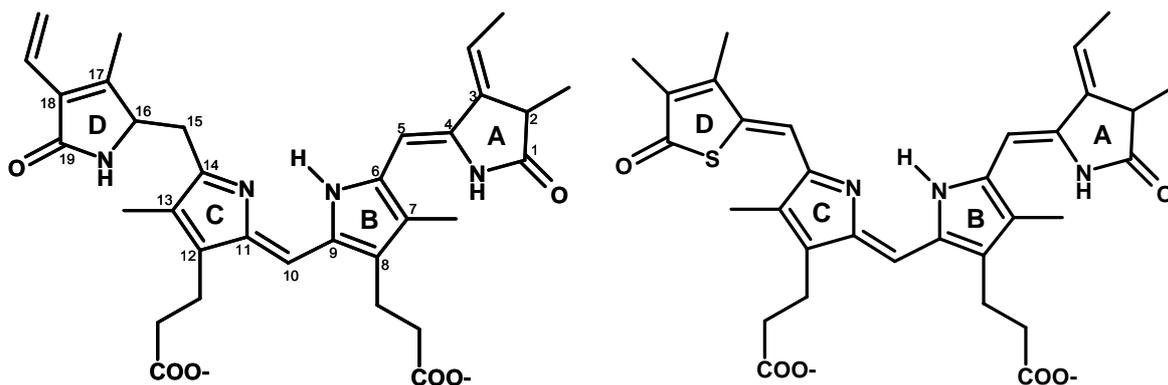


Abbildung 3-15: Strukturformeln von Phycoerythrobilin (PEB, links) und Thia-Phycocyanobilin (S-PCB, rechts).

3.3.1 Rekonstitution von PecA mit Phycocyanobilin (PCB)

Der Verlauf der Addition von PCB an PecA wurde spektral verfolgt. Um eventuelle Nebenreaktionen des Chromophors von Chromophor-Protein-Wechselwirkungen unterscheiden zu können, wurde das Verhalten von PCB in den verwendeten Reaktionspuffern untersucht (Abbildung 3-16).

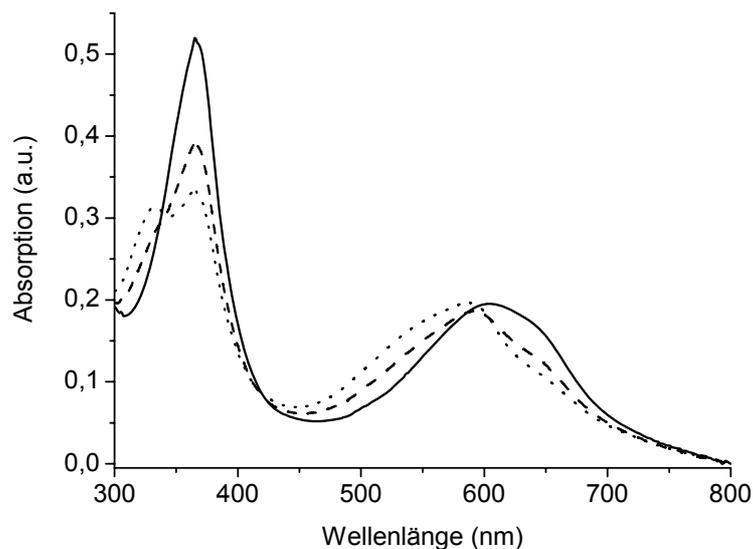
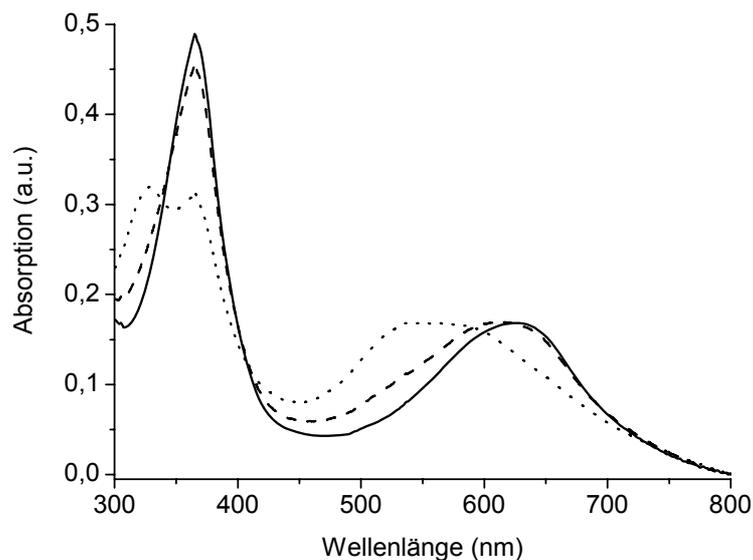


Abbildung 3-16: Absorptionsspektren von PCB in verschiedenen Pufferbedingungen.

Oben: PCB in Tris-Puffer (1 M, pH 6.0); **unten:** PCB in Triton X-100-haltigem Tris-Puffer (1 M, pH 6.0, 0,7% Triton X-100, v/v); PCB, t = 0 min (—); PCB, t = 180 min (- - -); PCB mit MnCl_2 (1,5 mM), t = 180 min (····). Die Spektren wurden im roten Maximum normiert.

Die Inkubation von PCB im Trispuffer führt über einen Zeitraum von drei Stunden zu geringen spektralen Veränderungen. Neben dem leichten Rückgang der Absorption im blauen Wellenlängenbereich, ist eine Verbreiterung der Absorption in der kurzwelligen Flanke des roten Absorptionsbereichs zu erkennen. Trispuffer gilt als

inertes Puffersystem und zeigt keine destruktive Wirkung auf den Chromophor. PCB liegt in Lösung in meist helicaler Struktur vor. Dabei kann der Ring A oberhalb (P-Form) oder unterhalb (M-Form) des Ringes D zum Liegen kommen. Die Energiedifferenz zwischen diesen beiden Formen liegt bei 0,6 kcal/mol und resultiert aus den unterschiedlichen sterischen Wechselwirkungen zwischen der 2-Methylfunktion des Ringes A und der 18-CH₂-Gruppe des Ringes D (Knipp *et al.* 1998, Marai *et al.* 2004). Neben der helicalen all-Z-Struktur sind 10-E/Z-Isomere möglich (Fu *et al.* 1979, Braslavsky *et al.* 1991) sowie 5,10,15-E,Z,Z- und 5,10,15-Z,Z,E-Isomere (Falk *et al.* 1977, Falk *et al.* 1978, Kufer *et al.* 1982). Zusätzlich können Lactam-Lactim-Tautomere auftreten (Falk 1989). Das Absorptionsverhalten der unterschiedlichen Isomere in Lösung unterscheidet sich dabei nicht wesentlich, bzw. können mehrere Isomere zu einer Absorptionsbande beitragen und die Absorptionsbande dadurch verbreitern.

Der Zusatz von MnCl₂ führt über einen Zeitraum von drei Stunden zu einer drastischen Veränderung des Absorptionsspektrums. Neben dem Absorptionsmaximum des PCB bei 365 nm entsteht ein neues Maximum bei 328 nm und das rote Maximum wird hypsochrom verschoben, verbunden mit einer Verbreiterung. Dies deutet auf eine Reaktion zwischen Mn²⁺ und PCB hin, bei der das PCB oxidiert wird. Eine Komplexbildung (Chelatkomplex) zwischen Mn²⁺ und PCB konnte nicht festgestellt werden, da es zu keiner bathochromen Verschiebung der Absorption kam. Ursache für diese hypsochrome Verschiebung kann der Verlust des Pyrrolrings A sein. Dies wird häufig bei M²⁺-Bilinkomplexen beobachtet.

Ein ähnliches Bild zeigt PCB im Triton X-100-haltigen Trispuffer. In Abwesenheit von Mn²⁺ kommt es nach drei Stunden Inkubation neben dem leichten Absorptionsrückgang zu einer Verschmälerung des roten Absorptionsbereichs mit einer leichten hypsochromen Verschiebung. Der Zusatz von Mn²⁺ bewirkt wiederum ein neues Maximum bei 328 nm, jedoch ist die hypsochrome Verschiebung des roten Absorptionsbereichs nicht so ausgeprägt wie im Trispuffer ohne Triton X-100.

Durch diese Voruntersuchungen kann bei der Inkubation der Reaktionsansätze über längere Zeiträume besser zwischen Chromophor-Protein-Wechselwirkungen und Nebenreaktionen des PCB mit anderen Pufferkomponenten unterschieden werden.

3.3.1.1 Autokatalytische Bindung von PCB an PecA

PecA kann in Abwesenheit der Lyase-Untereinheiten in einer langsamen, autokatalytischen Reaktion PCB binden. Die Reaktion ist nach ca. drei Stunden abgeschlossen (Abbildung 3-17).

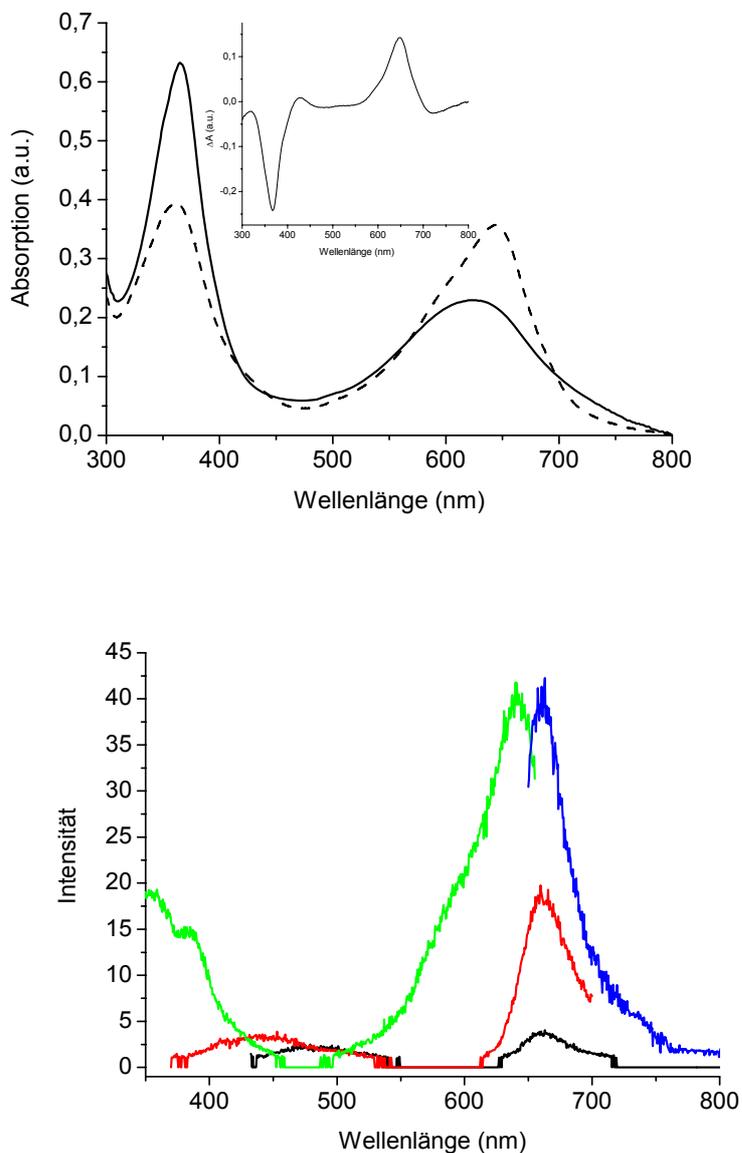


Abbildung 3-17: Autokatalytische Additionsreaktion von PCB an PecA.

Oben: Absorptionsspektren des Reaktionsverlaufs der autokatalytischen PCB-Addition an His₆-PecA, 0 min (—), 180 min (- - -) bei 37 °C; His₆-PecA (10 μM), PCB (9 μM), MnCl₂ (1,5 mM). Inset: Differenzspektrum der Reaktion von PecA mit PCB (180 min *minus* 0 min); **unten:** Fluoreszenzspektren des affinitätschromatographisch gereinigten Produkts, Emissionsspektren nach Excitation bei 425 nm (—), 360 nm (—), 645 nm (—), Excitationsspektrum mit Emission bei 660 nm (—).

Das Produkt der Additionsreaktion von PCB an PecA zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 361 und 645 nm. Im Differenzspektrum (180 min *minus* 0 min) liegt das rote Maximum bei 648 nm, während bei 366 nm ein negatives Extremum vorliegt. Die Zunahme der Absorption im roten Spektralbereich mit gleichzeitiger Absorptionsabnahme im kurzwelligen Bereich ist ein Beleg für die durch Interaktion mit dem Protein mehr gestreckte Konformation des Chromophors. Als weiterer Beleg für eine enge Interaktion des Chromophors mit dem Apoprotein ist die Verschmälerung der Absorptionsbande im roten Spektralbereich und die Zunahme des Q_{UV}^{VIS} -Werts im Vergleich mit dem freien Chromophor. Für den freien Chromophor beträgt $Q_{UV}^{VIS} = 0,36$, während dieses Verhältnis für den gebundenen Chromophor einen Wert von 1,11 aufweist. Dieser Anstieg des Q_{UV}^{VIS} -Werts deutet auf einen Übergang des Chromophors aus der helicalen Form in eine gestreckte Form hin. Dennoch liegt der Q_{UV}^{VIS} -Wert des gebundenen Chromophors weit unterhalb der Q_{UV}^{VIS} -Werte von nativen Biliproteinen, die Q_{UV}^{VIS} -Werte von drei bis fünf erreichen (Scheer 1982). Die Analyse der SDS-PAGE zeigt nach Inkubation in Zinkacetatlösung und Anregung mit UV-Licht ein Fluoreszenzsignal für die Bande des PecA-PCB-Chromoproteins. Demnach liegt der Chromophor nach der autokatalytischen Addition an PecA kovalent gebunden vor, seine Konformation entspricht aber nicht einer vollständig gestreckten Form. Möglicherweise sind die Chromophor-Protein-Interaktionen nicht wie im α -PEC ausgebildet, da PCB nicht der natürliche Chromophor von α -PEC ist. Die α -Untereinheit von Allophycocyanin B aus *Synechococcus sp.* (PCC6301), die einen PCB-Chromophor gebunden hat, absorbiert im Bereich von 645 nm (Lundell *et al.* 1981) und weist somit eine ähnliche Absorption auf, wie das autokatalytisch rekonstituierte PCB-Addukt. Jedoch zeigt der hohe Q_{UV}^{VIS} -Wert bei diesem Allophycocyanin, dass die Chromophorgeometrie und die Protein-Chromophor-Interaktionen im Vergleich mit dem autokatalytisch rekonstituierten PCB-Addukt unterschiedlich sind.

Die auftretende Fluoreszenz ist ein weiterer Beleg für eine Chromophor-Proteininteraktion. Nach Anregung bei verschiedenen Wellenlängen im Bereich von 300–650 nm kam es stets zu einer Emission bei 660 nm, weitere fluoreszierende Spezies traten nicht auf. Eine Bindung des Chromophors über dessen C10-Atom an das Protein konnte nicht nachgewiesen werden, da nach Anregung bei 425 nm

keine Emission bei 475 nm auftritt, die für bilirubin-ähnliche Chromophore typisch ist. Demnach führt die autokatalytische PCB-Adduktbildung nicht zu einem Gemisch aus verschiedenen gebundenen Chromophoren (PVB, PCB, MBV), wie es Storf (Storf 2003) beschreibt. Eine Erklärung hierfür könnte das unterschiedliche Puffersystem sein. Storf arbeitete mit einem Phosphatpuffersystem (pH 7.5), bei dem die Stabilität der Chromophore geringer ist, als im Trispuffersystem (pH 6.0), welches hier verwendet wurde. Dadurch zeigen die freien Chromophore im Phosphatpuffer bereits nach kurzen Inkubationszeiten spektrale Verschiebungen, die im Trispuffer nicht so ausgeprägt auftreten.

Nach Denaturierung in 8 M Harnstoff und Ansäuerung zeigt sich ein Absorptionsmaximum bei 662 nm. Dies entspricht einem gebundenen PCB-Chromophor (Glazer *et al.* 1973a, Storf 2003). In verschiedenen Experimenten wurde der Einfluss von Cofaktoren auf das autokatalytische Rekonstitutionsverhalten von PecA untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Einfluss von Cofaktoren auf die Rekonstitution von His₆-PecA mit PCB.

His₆-PecA (10 µM), His₆-PecF (10 µM), PCB (8 µM), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,1% v/v).

	PCB-Adduktausbeute (%)
PecA	100
PecA, Mn ²⁺	98
PecA, Mn ²⁺ , TX	5
PecA, TX	5
PecA, PecF	61
PecA, PecF, TX	0

Die relativen PCB-Addukt-Ausbeuten wurden durch Berechnung der Fläche unter dem roten Maximum des Differenzspektrums (180 min *minus* 0 min) ermittelt.

In Gegenwart von Mn²⁺ kommt es nicht zu einer Zunahme der PCB-Adduktausbeute. Mn²⁺ ist kein Cofaktor für die autokatalytische Addition von PCB an PecA. Hingegen zeigt die Zugabe des Detergenz Triton X-100 einen starken Rückgang der PCB-Adduktausbeute. Durch die Zugabe von Triton X-100 verschiebt sich das Absorptionsspektrum von PCB im Tris-Puffer von 625 nm auf 600 nm. Diese starke Blauverschiebung geht eventuell mit einer Konformationsänderung des flexiblen Chromophors einher (Scheer 1982, Falk 1989), da es in Gegenwart des Detergenz

auch zu einer Zunahme der Fluoreszenz-Emission kommt (Zhao *et al.* 2004). Diese Konformationsänderung des Chromophors verhindert möglicherweise eine effektive Bindung an das Apoprotein. Der Einfluss von Triton X-100 auf das Apoprotein ist dagegen gering. CD-spektroskopische Untersuchungen der Sekundärstrukturen von PecB und CpcB in Ab- und Anwesenheit von Triton X-100 zeigten nur einen geringen Einfluss auf die Lage und Intensität der CD-Signale, die eine α -helicale Sekundärstruktur der Proteine belegen. Lediglich das Verhältnis der 222 nm/208 nm-Bande nahm etwas ab (Zhao *et al.* 2004). Das Detergenz beeinflusst offensichtlich die Struktur und die Konformationsfreiheit des Chromophors deutlich, während der Einfluss auf das Apoprotein eher gering bleibt. Zhao *et al.* (Zhao *et al.* 2004) zeigten eine dirigierende Wirkung von Triton X-100 auf das autokatalytische Bindungsverhalten der β -Untereinheit von PEC. Dabei wird die autokatalytische Bindung an Cys-84 in Gegenwart von Triton X-100 unterdrückt, während es zur korrekten Bindung an Cys-155 kommt. Diese dirigierende Wirkung des Detergens konnte in eigenen Experimenten mit der apo- β -Untereinheit von PEC nicht bestätigt werden. Die Inkubation von apo- β -PEC mit PCB führte zur Ausbildung eines Absorptionsmaximums bei 638 nm, das mit steigenden Triton X-100-Konzentrationen an Intensität verlor. Eine autokatalytische PCB-Adduktbildung mit apo- α -PEC in Gegenwart von Triton X-100 fand kaum noch statt, die Ausbeute lag bei 5%.

In Gegenwart von PecF sinkt die Ausbeute von PCB-Addukt auf 61%. Im Absorptionsspektrum und im Differenzspektrum des Belichtungszykluses (500 nm – 570 nm – 500 nm) konnte bei diesem Ansatz keine α -PEC-Bildung beobachtet werden. Der Rückgang der PCB-Adduktausbeute ist auf eine mögliche, nichtkovalente Interaktion des Chromophors mit der Lyase-Untereinheit PecF zurückzuführen. Da PecF für die Isomerisierung des PCB zu PVB notwendig ist, ist eine kovalente (und temporäre) Bindung des Chromophors an PecF möglich. Eine Wechselwirkung zwischen PCB und PecF könnte ausreichen, um den Chromophor nicht mehr in die Bindungstasche von PecA gelangen zu lassen. Andererseits kann es auch zu Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen PecF und PecA kommen, die eine effektive, autokatalytische Bindung des Chromophors verhindern. Eine weitere Erklärung wäre, dass sich ein PecA/PecF-PCB-Komplex bildet, der zwar den Chromophor adsorbiert hat, aber nicht in der Lage ist, den Chromophor an PecA zu binden, da dafür die Lyase- α -Untereinheit (PecE) notwendig ist. Eine α -PEC-Bildung

in Abwesenheit von PecE wurde im Gegensatz zu Zhao *et al.* und Storf (Storf 2003, Zhao *et al.* 2005b), die in Abwesenheit von PecE bis zu 6% α -PEC rekonstituieren konnten, nicht detektiert.

3.3.1.2 PecE-katalysierte Bindung von PCB an PecA

Die Inkubation von PCB mit dem Apoprotein His₆-PecA und der Lyase-Untereinheit His₆-PecE führt zu einer sehr raschen Bindung des Chromophors an das Apoprotein. Die Reaktion ist nach ca. 20 min abgeschlossen (Abbildung 3-18). Damit liegt die Dauer der PecE-katalysierten Reaktion im gleichen Zeitrahmen wie die autokatalytische Rekonstitution von Phytochrom (Li *et al.* 1995, Borucki *et al.* 2003). Das Produkt der PecE-katalysierten Additionsreaktion besitzt zwei Absorptionsmaxima bei 355 und 641 nm. Im Differenzspektrum der Reaktion liegt das rotwellige Maximum bei 640 nm und das Minimum im blauen Spektralbereich bei 369 nm. Der Q_{UV}^{VIS} -Wert liegt bei 2,72 und damit wesentlich höher als bei der autokatalytischen Addition von PCB an PecA. Dies deutet auf eine mehr gestreckte Geometrie des gebundenen Chromophors hin, verglichen mit dem Produkt aus der autokatalytischen Chromophoraddition.

Die Denaturierung und Ansäuerung des PCB-Addukts in 8 M Harnstoff/2% HCl zeigt ein Absorptionsmaximum bei 662 nm, das auf einen gebundenen PCB-Chromophor hinweist (Glazer *et al.* 1973a).

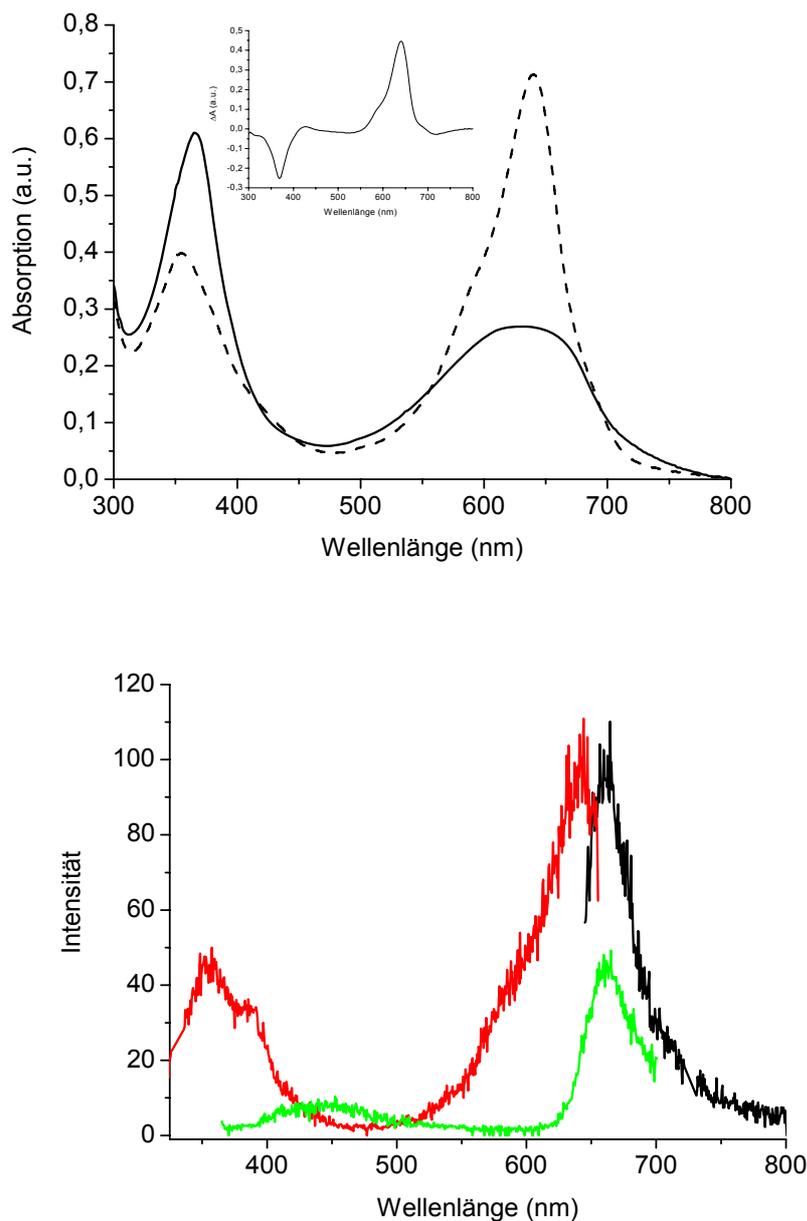


Abbildung 3-18: PecE-katalysierte Reaktion Addition von PCB an PecA.

Oben: Absorptionsspektren des Reaktionsverlaufs der PecE-katalysierten Chromophoraddition an His₆-PecA 0 min (—), 30 min (- -) bei 37 °C, PecA (10 μM), PecE (6 μM), PCB (10 μM), MnCl₂ (1,5 mM). Inset: Differenzspektrum 20 min *minus* 0 min; **unten:** Fluoreszenzspektren des affinitätschromatographisch gereinigten Produkts, Emissionsspektren nach Excitation bei 360 nm (—), 641 nm (—), Excitationsspektrum mit Emission bei 660 nm (—).

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen des gereinigten PCB-Addukts zeigen die selben Eigenschaften wie das PCB-Addukt aus der autokatalytischen Addition mit einer Emission bei 660 nm. Sie bestätigen zum einem die kovalente Bindung des Chromophors und zum anderen dessen spezifische Bindung an das Apoprotein über die Ethylidengruppe, da keine Fluoreszenz auftritt, die auf einen

bilirubin-ähnlichen Chromophor hindeutet. Wesentlicher Unterschied zwischen dem Chromoprotein aus der autokatalytischen und der lyasekatalysierten Addition ist die Emissionsintensität der Fluoreszenz. In beiden Fällen wurde die Fluoreszenzemission mit einer Chromoproteinlösung gemessen, die im rotwelligen Maximum eine OD von 0,1 aufwies. Dennoch ist die Intensität der Emission bei dem lyasekatalysierten PCB-Addukt mehr als doppelt so hoch. Die höhere Fluoreszenzquantenausbeute zeigt, dass durch die PecE-katalysierte Chromophoraddition das PCB nicht nur an das Protein gebunden, sondern auch besser in die Chromophortasche eingepasst wird. Dadurch entstehen spezifische Protein-Chromophorinteraktionen, die die spektralen Eigenschaften des Chromoproteins wesentlich beeinflussen.

Die PecE-katalysierte PCB-Addition wurde in Hinblick auf den Einfluss weiterer Cofaktoren untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

Tabelle 3-4: Einfluss von Cofaktoren auf die Rekonstitution von PecA mit PecE und PCB. His₆-PecA (10 µM), His₆-PecE (6 µM), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,1% v/v), 2-Mercaptoethanol (3 mM), EDTA (50 mM), PCB (8 µM).

	PCB-Addukt-Ausbeute (%)
PecA	100
PecA, PecE	779
PecA, PecE, Mn ²⁺	1355
PecA, PecE, Mn ²⁺ , TX	253
PecA, PecE, TX	3
PecA, PecE, ME	212
PecA, PecE, Mn ²⁺ , ME	1312
PecA, PecE, EDTA	178

Die relativen PCB-Addukt-Ausbeuten wurde durch Berechnung der Fläche unter dem roten Maximum des Differenzspektrums (180 min *minus* 0 min) ermittelt.

Es zeigte sich, dass die Ausbeute an PCB-Addukt durch Zugabe von PecE gegenüber der autokatalytischen Reaktion um mehr als das siebenfache gesteigert werden kann. In Gegenwart von Mn²⁺ kommt es sogar zu einer Erhöhung der Produktausbeute um mehr als das 13-fache. Verglichen mit der autokatalytischen Reaktion, bei der Mn²⁺ ohne Einfluss auf die Produktausbeute bleibt, zeigt Mn²⁺ bei

der PecE-katalysierten Reaktion einen deutlichen Einfluss. Die Rolle von zweiwertigen Metallen bei der Chromophorbinding an Biliproteine wurde bislang nur bei der PecE/F-Lyase beschrieben (Zhao *et al.* 2002), während die Assemblierung von Phytochrom (Li *et al.* 1992, Lamparter *et al.* 2001, Yoshihara *et al.* 2004) und die CpeS-katalysierte Rekonstitutionen der β -Untereinheiten (β -Cys-84) von PC (CpcB, *M. lamosus*) und PEC (PecB, *M. lamosus*) keine zweiwertigen Metallionen als Cofaktoren benötigen (Zhao *et al.* 2006a). Die Bedeutung von Mn^{2+} als Cofaktor ist schwer fassbar. Eine Komplexierung des Mn^{2+} durch Ausbildung eines Chelatkomplexes mit PCB konnte absorptionsspektroskopisch nicht festgestellt werden. Demnach kann Mn^{2+} möglicherweise als Cofaktor für die Lyase-Untereinheit PecE auftreten, da in Anwesenheit von Mn^{2+} eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit stattfindet. Folglich kann die Rolle von Mn^{2+} die eines Aktivators für die Lyase-Untereinheit PecE sein und es interagiert dabei nur mit PecE. Wird EDTA mit in den Reaktionsansatz, bestehend aus PecA und PecE, gegeben, so zeigt sich gegenüber der autokatalytischen Rekonstitution ein Anstieg der PCB-Adduktausbeute, jedoch liegt diese im Vergleich zur PecE-katalysierten Reaktion um den Faktor vier niedriger. Dies zeigt die Bedeutung von Mn^{2+} für die Aktivität von PecE.

Triton X-100 zeigt eine Hemmung der Additionsreaktion, die in Abwesenheit von Mn^{2+} fast vollständig zum Erliegen kommt. Auf den hemmenden Effekt von Triton X-100 wurde bereits im Kapitel 3.3.1.1 eingegangen. Ein positiver Einfluss von 2-Mercaptoethanol konnte nicht festgestellt werden, die PCB-Adduktausbeuten fielen in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol sogar etwas geringer aus. Der negative Effekt von 2-Mercaptoethanol kann zwei Ursachen haben. Zum einen kann 2-Mercaptoethanol mit PCB durch nukleophile Addition an C10 und C3¹ des PCB reagieren. Diese Addukte mit 2-Mercaptoethanol dienen somit nicht mehr als Substrate für die Chromophoraddition. Zum anderen reagiert 2-Mercaptoethanol mit Cystinen der beteiligten Proteine und könnte so intra- bzw. intermolekulare Sulfidbrücken reduzieren, die für die Aktivität der Proteine eventuell von Bedeutung sind. PecE zeigt in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol ein anderes Proteinkomplexbildungsverhalten als in dessen Abwesenheit (s. Kapitel 3.6.1.2). Dadurch ist es möglich, dass spezifische Protein-Proteinwechselwirkungen unterdrückt werden und es infolgedessen zu einer verminderten Produktausbeute kommt.

Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie

Die PecE-katalysierte PCB-Addukt-Bildung wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (Endres 2005) mittels Kurzzeitspektroskopie charakterisiert.

Für die Untersuchung der PecE katalysierten PCB-Adduktbildung wurde das Tris/HCl-Puffersystem verwendet, da die Löslichkeit von His₆-PecE in Tris/HCl wesentlich besser ist als im Phosphatpuffer. Um möglichst gleich bleibende Messbedingungen zu erhalten, wurden die Stopped-flow-Experimente stets mit frisch gereinigten Proteinen durchgeführt (s. Kapitel 3.1.3).

Die PCB-Addukt-Bildung unter PecE-Katalyse zeigt, abhängig von der Probenvorbereitung, unterschiedliche Reaktionsverläufe, die mittels Kurzzeitspektroskopie erfasst werden konnten. In Abbildung 3-19 sind die beiden Versuchsabläufe schematisch dargestellt. Bei der Reaktion nach Typ I wurden PecA und PecE gemeinsam vorinkubiert (t_1), anschließend wurde PCB zugegeben und die Änderungen der Absorption während der Zeit t_2 wurde verfolgt. Bei der PCB-Adduktbildung nach Typ II wurden alle Reaktionskomponenten ohne Vorinkubation der Proteine zusammengegeben und die Absorptionsänderungen wurden während der Zeit t_2 beobachtet.

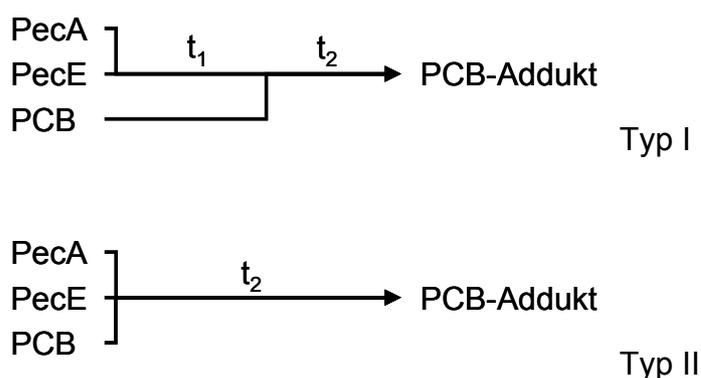


Abbildung 3-19: Schematischer Versuchsaufbau zur PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung nach Typ I (oben) und Typ II (unten).

t_1 : Zeit, in der PecA und PecE miteinander inkubiert wurden, t_2 : Reaktionszeit der Proteine mit PCB, die mittels Absorption verfolgt wurde.

PCB-Addukt-Bildung nach Typ I

Beim Typ I wurden das Apoprotein und die Lyase-Untereinheit gemeinsam mit MnCl_2 vorinkubiert (t_1 in Abbildung 3-19), anschließend in der Stopped-flow-Anlage mit der PCB-Lösung gemischt und die Reaktion während der Zeit t_2 absorptionsspektroskopisch verfolgt (Abbildung 3-19 und Abbildung 3-20).

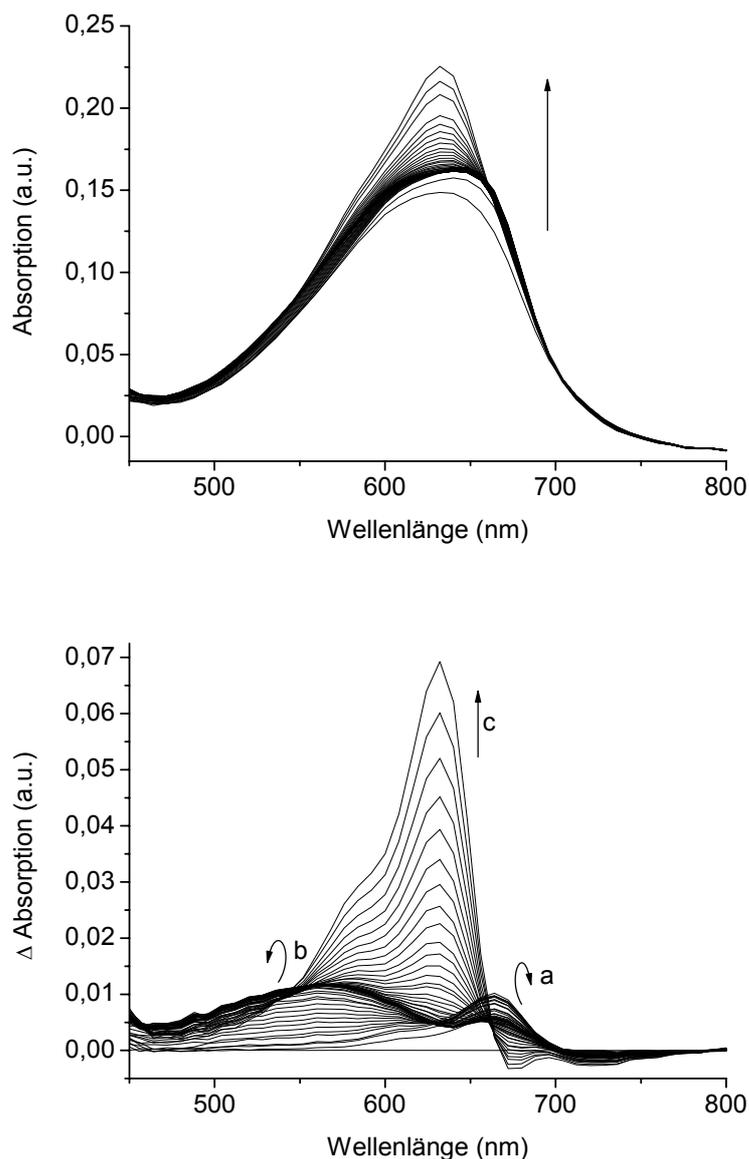


Abbildung 3-20: Kinetik der Typ I-Reaktion der PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung. Oben: spektraler Verlauf der Reaktion von 5,5 ms bis 150 s; His₆-PecA (30 μM), His₆-PecE (30 μM), PCB (30 μM), MnCl_2 (1,5 mM) in Trispuffer (1 M, pH 6.0) bei 20 °C. **Unten:** Differenzspektren aus der Reaktion (Spektrum zum Zeitpunkt t minus Spektrum zum Zeitpunkt 5,5 ms).

Der zeitliche, spektrale Verlauf der Typ I-Reaktion zeigt ausgehend vom Spektrum zum Zeitpunkt 5,5 ms mit einem Maximum bei 633 nm eine bathochrome

Verschiebung des Maximums auf 650 nm, das sich im weiteren Verlauf der Reaktion wieder hypsochrom nach 641 nm verschiebt. Dabei kommt es zu einem hyperchromen Effekt. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Reaktion durch Bildung von Differenzspektren zeigt, dass bereits kurz nach dem Beginn der Reaktion ein Signal bei 655 nm entsteht (a). Nach 0,1 s nimmt dieses Signal ab und es entsteht ein neues, breites Maximum bei 560 nm (b). Im weiteren Verlauf der Reaktion bildet sich ein scharfes Signal bei 635 nm, das stetig an Intensität zunimmt (c).

Die Daten der Typ I-Reaktion wurden mit einem globalen Fit auf der Basis eines multiexponentiellen, irreversiblen Reaktionsablaufs analysiert, da dieser lineare Reaktionsablauf die besten Fit-Ergebnisse brachte. Durch den globalen Fit wurden vier kinetische Prozesse im beobachteten Zeitfenster ermittelt, die mit einem linearen Modell aus vier Reaktionsschritten beschrieben werden können (Abbildung 3-21).

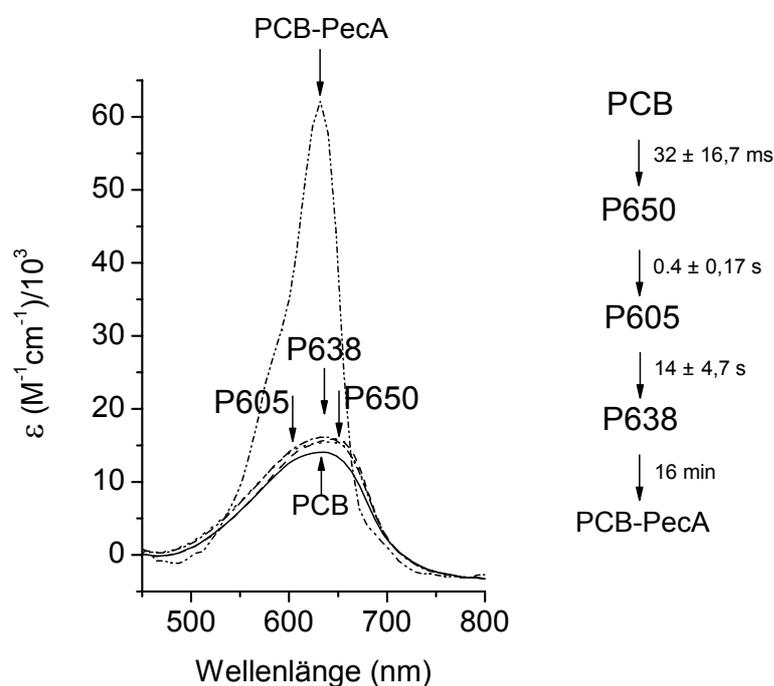


Abbildung 3-21: Schema des Reaktionsverlaufs der PCB-Addukt-Bildung nach Typ I.

Links: Ermittelte Absorptionsspektren aus dem globalen Fit; **rechts:** Reaktionsmodell mit Zeitkonstanten k (\pm Standardabweichung aus 16 Einzelmessungen).

Der erste Reaktionsschritt führt zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 625 nm (PCB) auf 650 nm (P650) mit einer leichten Zunahme der Oszillatorstärke. Im darauffolgenden Reaktionsschritt kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung auf 605 nm (P605), welche schließlich zum Reaktionsprodukt (PCB-Addukt) führt. Dabei kommt es zu einer bathochromen Verschiebung auf 641 nm und einem starken Hyperchromismus.

Die ersten vier Absorptionsspezies (PCB, P650, P606, P638) unterscheiden sich nur wenig und besitzen fast den gleichen Extinktionskoeffizienten ϵ . Diese geringen Unterschiede der Extinktionkoeffizienten kann auf geringfügige Änderungen in der Molekülgeometrie von PCB hindeuten, da der Extinktionskoeffizient stark von der Molekülstruktur abhängig ist (Scheer 1982, Kufer *et al.* 1989).

Die Absorptionen der Intermediate (P650, P605, P638) werden durch die Addition an die $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung und durch Protein-Chromophorwechselwirkungen bestimmt. Um den Chromophor an das Apoprotein zu binden, müssen Chromophor und Protein in Wechselwirkung treten. Demnach können diese Intermediate solchen Wechselwirkungen zugeschrieben werden. Ausgehend von der Beobachtung, dass der PCB-Dimethylester (Kapitel 3.3.2) um den Faktor 5 schlechter gebunden wird als PCB, ist die elektrostatische Interaktion zwischen den negativ geladenen Carboxylgruppen des PCB und positiv geladenen Funktionen des Proteins für die Chromophorbindung an das Apoprotein notwendig (Bhoo *et al.* 1997). Daraus kann in Anlehnung an Borucki *et al.* (Borucki *et al.* 2003), die die autokatalytische Chromophoraddition am Phytochrom (Cph1) von *Synechocystis* (PCC6803) *in vitro* untersucht haben, ein 4-Stufenmodell der Chromophorbindung vorgeschlagen werden:

- (1) diffusionskontrollierte, reversible Chromophor-Protein- und Protein-Proteinwechselwirkungen,
- (2) Protonentransfer von einem internen Donor zum Chromophor unter Ausbildung von Ionenpaarbindungen und Wasserstoffbrücken,
- (3) irreversible Bildung der kovalenten Verknüpfung des Chromophors mit dem Apoprotein,
- (4) Zerfall des Protein-Protein-Komplexes.

Die Intermediate P650 und P605 können den Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und den Protein(en) zugeordnet werden. Dabei ist die Geometrie des Chromophors ähnlich der Geometrie von PCB in Lösung. Dies führt nur zu geringen Änderungen in den Absorptionsspektren. Eine Protonierung des Chromophors findet zu diesem Zeitpunkt noch nicht statt. Die Natur des Intermediats P638 bleibt offen, eine Protonierung, die mit einer Zunahme des Extinktionskoeffizienten gekoppelt ist, ist nicht erkennbar, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Erst im letzten Schritt kommt es zu einer Zunahme des Extinktionskoeffizienten um mehr als den Faktor 3 sowie zur kurzwelligen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Diese Zunahme der Oszillatorstärke ist durch die Protonierung und die kurzwellige Verschiebung durch die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Chromophor und Apoprotein sowie der Streckung des Chromophors in der Bindungstasche erklärbar. Dadurch kommt es zu spezifischen Chromophor-Proteininteraktionen, die die spektralen Eigenschaften des PCB drastisch verändern. Eine Protonierung des Chromophors wurde an verschiedenen Modellkomponenten wie auch durch theoretische Berechnungen an Phycobiliproteinen und am Phytochrom untersucht. Stanek *et al.* (Stanek *et al.* 1998, 2000) synthetisierten Modellverbindungen mit PCB-DME und untersuchten daran das Protonierungsverhalten des Chromophors in Hinblick auf einen intramolekularen Protonendonator. Daraus leiteten sie ab, dass ein hoher Ordnungszustand aus streng konservierten Konsensussequenzen für eine Protonierungsreaktion notwendig ist. Scharnagl *et al.* (Scharnagl *et al.* 1989) zeigten, dass die Protonierung des PC-Chromophors über Aspartat 87 möglich ist, welches sich in der Nähe der Pyrrolstickstoffe der Ringe B und C befindet. Auch Kikuchi *et al.* (Kikuchi *et al.* 1997) konnten durch theoretische Berechnungen eine Protonierung des C-Phycocyanins durch Aspartat 87 stützen. FTIR-Untersuchungen der isolierten α -Untereinheit von PEC legen eine Protonierung des Chromophors nahe (Foerstendorf *et al.* 1997, Foerstendorf *et al.* 2001). Mittels NMR-Studien am Phytochrom (Cph1 aus *Synechocystis*) mit ^{15}N - und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -isotopenmarkiertem PCB konnten Strauss *et al.* (Strauss *et al.* 2005) eine vollständige Protonierung des Chromophors in beiden Absorptionsformen zeigen. Eine Protonierung des Chromophors durch einen Protonendonator des Apoproteins kann einen Schritt bei der Chromophor-Proteinerkennung zur Bindung des Chromophors darstellen. Die Protonierung des Chromophors konnte von Borucki *et al.* (Borucki *et al.* 2003) bei der Rekonstitution des Cph1-Phytochroms aus *Synechocystis* (PCC6803) detektiert

werden, da es zu einer Rotverschiebung der Absorption und einem Anstieg des Extinktionskoeffizienten ϵ kam, auch wenn das Bindungscystein blockiert worden ist (Borucki *et al.* 2003).

PCB-Addukt-Bildung nach Typ II

Beim Typ II wurden das Apoprotein, die Lyase-Untereinheit und PCB gleichzeitig in die Reaktionsküvette der Stopped-flow-Anlage injiziert (t_2 in Abbildung 3-19). Die Reaktion wurde während der Zeit t_2 absorptionspektroskopisch verfolgt (Abbildung 3-22).

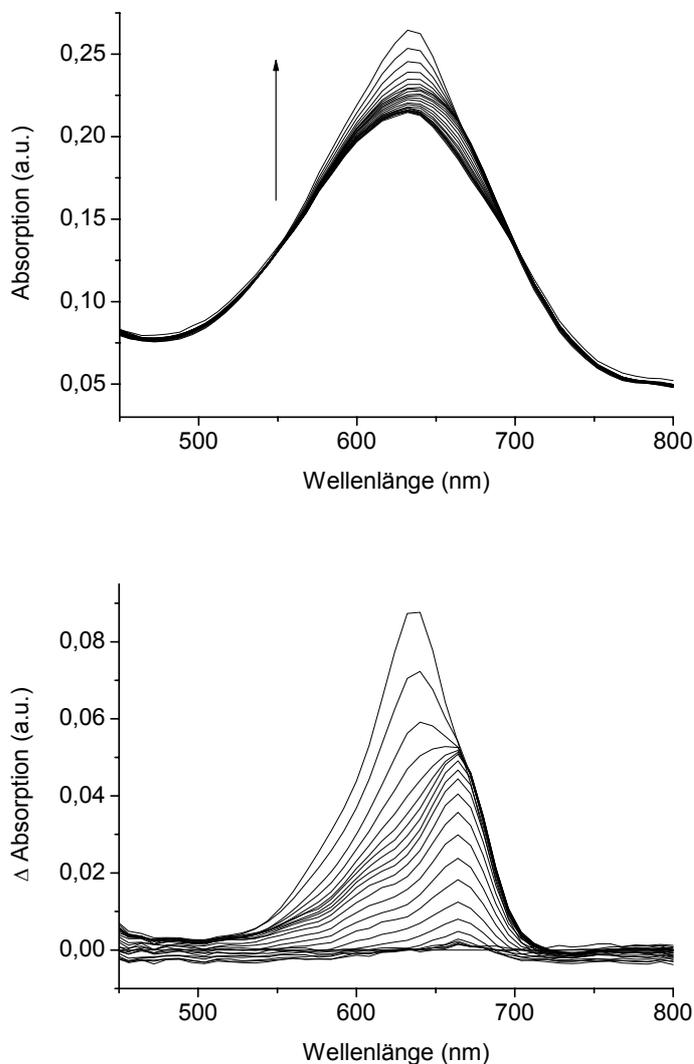


Abbildung 3-22: Kinetik der Typ II-Reaktion der PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung. **Oben:** spektraler Verlauf der Reaktion von 14,3 ms bis 234 s; His₆-PecA (30 μ M), His₆-PecE (30 μ M), PCB (30 μ M), MnCl₂ (1,5 mM) in Trispuffer (1 M, pH 6.0) bei 20 °C; **unten:** Differenzspektren der Reaktion (Spektrum zum Zeitpunkt t minus Spektrum zum Zeitpunkt 14,3 ms).

Die Reaktion nach Typ II verläuft im Vergleich mit der Reaktion nach Typ I langsamer ab. Ausgehend von einem Absorptionsmaximum von 633 nm kommt es zu einer bathochromen Verschiebung des Maximums auf ca. 660 nm. Dieses Signal wird anschließend hypsochrom verschoben und entwickelt ein Maximum bei 641 nm, verbunden mit einem hyperchromen Effekt. Die Analyse durch Bildung der Differenzspektren liefert ein abweichendes Bild des Reaktionsverlaufs, verglichen mit dem Typ I. Das erste beobachtbare Signal hat ein Maximum bei 665 nm mit einer Schulter bei 605 nm. Aus diesem Maximum entwickelt sich schließlich das PCB-Addukt signal bei 638 nm.

Die Daten der Typ II-Reaktion wurden wie bei der Typ I-Reaktion mit einem globalen Fit auf der Basis eines multiexponentiellen, irreversiblen Reaktionsablaufs analysiert, da dieses lineare Reaktionsmodell die besten Fit-Ergebnisse brachte. Durch den globalen Fit wurden beim Typ II drei kinetische Prozesse im beobachteten Zeitfenster ermittelt, die mit einem linearen Modell aus drei Reaktionsschritten beschrieben werden können. Die Daten aus den Versuchen nach Typ II sind nicht so aussagekräftig wie die Daten, die für den Typ I ermittelt worden sind. Aufgrund der geringen experimentellen Daten führt dies im globalen Fit zu großen Standardabweichungen der Zeitkonstanten. Dennoch konnte der Ablauf der Reaktion nach Typ II mehrmals reproduziert werden. Das Reaktionsschema der Typ II-Reaktion ist in Abbildung 3-23 dargestellt.

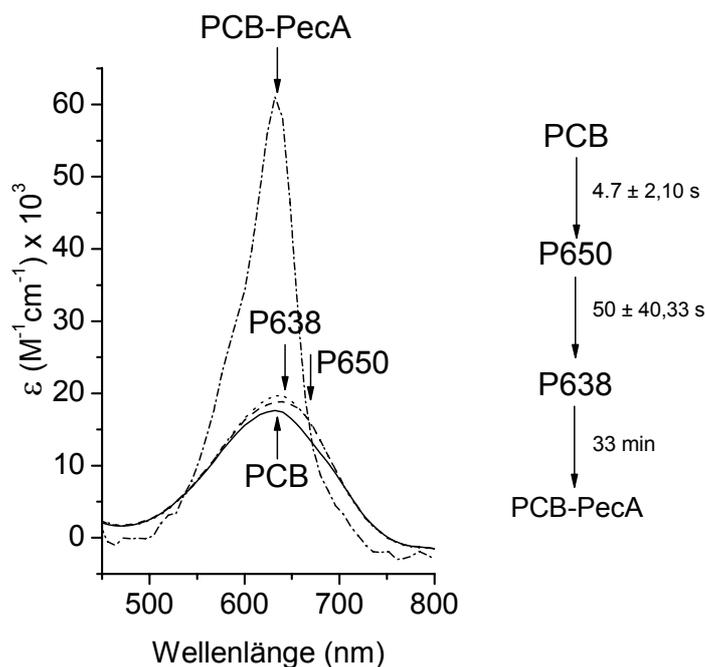


Abbildung 3-23: Schema des Reaktionsverlaufs der PCB-Addukt-Bildung nach Typ II.

Links: Ermittelte Absorptionsspektren aus dem globalen Fit; **rechts:** Reaktionsmodell mit Zeitkonstanten k (\pm Standardabweichung aus sechs Einzelmessungen).

Das Reaktionsmodell für die Typ II-Reaktion unterscheidet sich vom Modell der Typ I-Reaktion durch einen langsameren Reaktionsablauf und das Fehlen des Intermediats P605. Diese Unterschiede werden durch den unterschiedlichen Aufbau der Experimente verursacht. Beim Typ I kann sich ein Gleichgewicht zwischen den Einzelproteinen PecA und PecE sowie einem Proteinkomplex PecA/E einstellen, bevor PCB zur Reaktion gegeben wird und dadurch das Gleichgewicht irreversibel zugunsten der PCB-Adduktbildung verschoben wird. Dieser Komplex zwischen dem Apoprotein und der Lyase-Untereinheit kann sich bei der Typ II-Reaktion vor der PCB-Zugabe nicht bilden, er würde somit die Additionsreaktion kinetisch kontrollieren.

3.3.1.3 PecE/F-katalysierte Bindung von PCB an PecA

Durch die PecE/PecF katalysierte Bindung von PCB an PecA entsteht der native Chromophor PVB, der über eine Thioetherbindung an Cys-84 des Apoproteins gebunden ist. Bei dieser Reaktion kommt es neben der Ausbildung des 3¹-

Thioethers zusätzlich zur Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung in den Ring A (Zhao *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2002). Der PVB-Chromophor ist im Gegensatz zum PCB-Chromophor in der Lage, eine reversible Photochemie durchzuführen (Siebzehrübl *et al.* 1989, Maruthi Sai *et al.* 1992, Zhao *et al.* 1995a). Die PecE/F-katalysierte PVB-Adduktbildung und dessen Photochromismus wurden von Storf (Storf 2003) untersucht. Wesentliche Aspekte, die die α -PEC-Bildung anbelangen, werden in den Kapiteln 3.1.3 und 3.2.1 beschrieben.

Die Substratspezifität der Lyase PecE/F wurde von Storf *et al.* (Storf *et al.* 2001) mit verschiedenen, offenkettigen Tetrapyrrolchromophoren untersucht. Es zeigte sich, dass für eine kovalente Bindung des Chromophors an Cys-84 von PecA die 3-Ethylidengruppe notwendige Voraussetzung ist.

Das in dieser Arbeit verwendete Trispuffersystem und die Optimierung der Rekonstitution von α -PEC *in vitro* erleichtert die Analyse der Additionsprodukte, da der störende Einfluss von 2-Mercapthoethanol nicht auftritt. In Abbildung 3-24 ist der Rekonstitutionsverlauf der His₆-PecE/F-katalysierten PCB-Addition an His₆-PecA dargestellt.

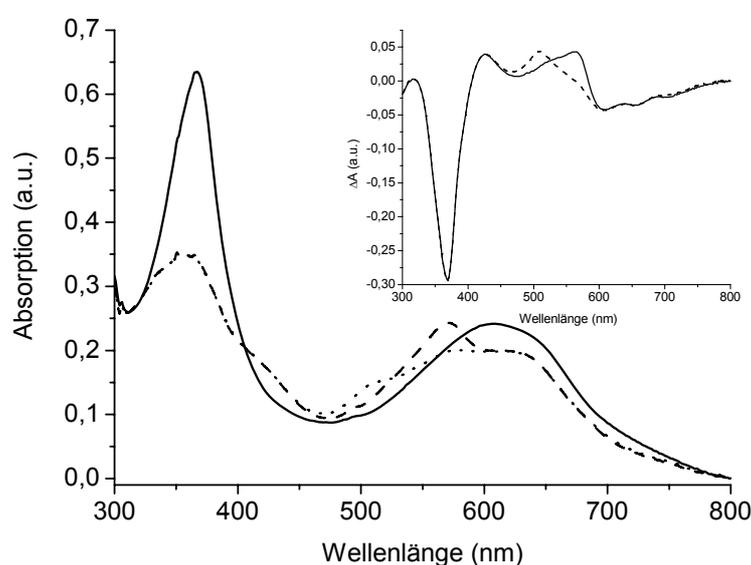


Abbildung 3-24: PecE/F-katalysierte Addition von PCB an PecA.

Absorptionsspektren nach 0 min (—), 180 min + 500 nm-Belichtung (- - -), 180 min + 570 nm-Belichtung (····); Inset: Differenzspektrn 180 min + 500 nm-Belichtung *minus* 0 min (—), 180 min + 570 nm-Belichtung *minus* 0 min (- - -); His₆-PecA (10 μ M), His₆-PecE (10 μ M), His₆-PecF (30 μ M), PCB (9 μ M), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,75% v/v).

Die Rekonstitution ist nach ca. drei Stunden abgeschlossen. Im Absorptionsspektrum zeigen sich Maxima bei 356 nm sowie bei 505 bzw. 568 nm. Letztere reflektieren den lichtinduzierbaren Photochromismus des PVB-Chromophors. Des Weiteren ist eine Schulter im Bereich von 630 nm erkennbar, die dem PCB-Addukt zugordnet werden kann. Die Differenzspektren des Rekonstitutionsverlaufs zeigen neben den beiden Maxima des PVB-Chromophors zwei kleinere Maxima bei 638 und 688 nm. Diese Maxima können Nebenprodukten zugeordnet werden. Das Maximum bei 638 nm entspricht dem PCB-Addukt, während das Maximum bei 688 nm möglicherweise der Absorption eines MBV-Chromophors zugeordnet werden kann. Es stellte sich heraus, dass eine PVB-Adduktbildung ausschließlich in Anwesenheit von PecF zu beobachten ist. Storf und Zhao *et al.* (Storf 2003, Zhao *et al.* 2005b) konnten eine geringe PVB-Adduktbildung in Abwesenheit der Lyase bzw. nur in Anwesenheit von PecF feststellen, wenn sie das Lysat des Bakterienaufschlusses verwendeten. Dies konnte mit den gereinigten Proteinen in dem hier verwendeten Trispuffersystem nicht festgestellt werden. Möglicherweise enthält das Bakterienlysat Proteinkomponenten oder andere Faktoren, die unter diesen Umständen eine PVB-Adduktbildung ermöglichen.

Das gereinigte Rekonstitutionsprodukt wurde absorptions- und fluoreszenzspektroskopisch untersucht (Abbildung 3-25). Das Absorptionsspektrum zeigt die beiden Maxima der *E*- und *Z*-Form des α -PEC und bei 638 nm das Maximum des PCB-Addukts. Im Inset ist die reversible Photochemie des rekonstituierten PVB-Addukts dargestellt. Die Fluoreszenzdaten zeigen die Emission von α -PEC bei 584 nm sowie des PCB-Addukts bei 660 nm. Eine Anregung im kurzwelligen Bereich führte ebenfalls zu Emissionen bei 584 und 660 nm. Es konnte keine Emission im Bereich von 475 nm detektiert werden, die auf einen bilirubin-ähnlichen Chromophor hindeutet. Ebenso konnte keine langwellige Emission, die auf ein MBV-Addukt hindeuten würde, beobachtet werden. Das differenzspektroskopisch identifizierte MBV-Addukt im Rekonstitutionsansatz (Abbildung 3-24) ist im gereinigten Ansatz nach Abtrennung der Lyase-Untereinheiten nicht mehr nachweisbar. Demnach könnte es sich bei der im Rekonstitutionsansatz detektierten Absorption bei 688 nm um ein MBV-Addukt handeln, das als (kovalent gebundenes) Zwischen- oder Nebenprodukt in einem Komplex des Apoproteins und den Lyase-Untereinheiten auftritt.

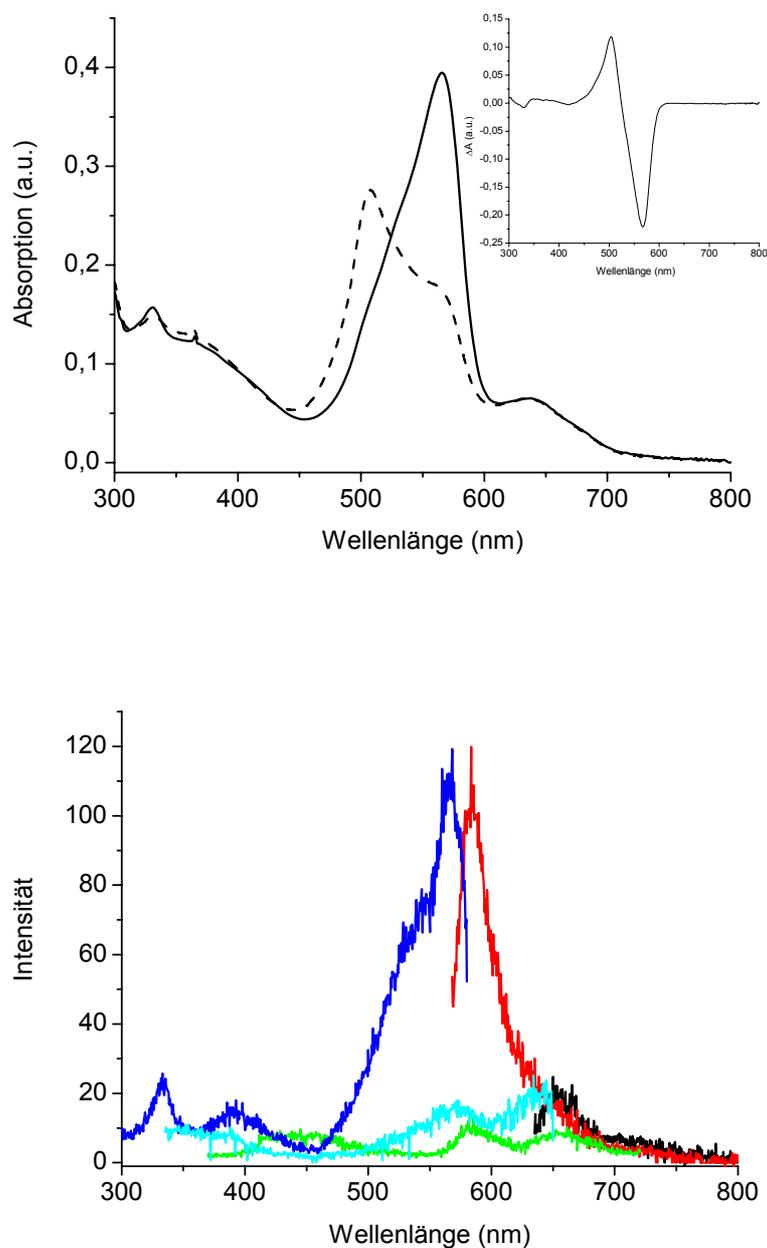


Abbildung 3-25: Spektroskopische Charakterisierung des PVB-Addukts aus der PecE/F-katalysierten Reaktion von PCB mit PecA.

Oben: Absorptionsspektren des gereinigten PVB-Addukts nach Belichtung mit Licht der Wellenlängen 500 nm (—) und 570 nm (- - -); Inset: Differenzspektrum der reversiblen Photochemie;

unten: Fluoreszenzspektren des gereinigten, mit 500 nm-Licht vorbelichteten PVB-Addukts, Emissionsspektren nach Excitation bei 565 nm (—), 630 nm (—) und 365 nm (—); Excitationspektren mit Emission bei 584 nm (—) und 660 nm (—).

Im Gegensatz zu Storf und Zhao *et al.* (Zhao *et al.* 2002, Storf 2003) konnte die Rekonstitution von α -PEC im Trispuffer ohne Mn^{2+} als Cofaktor durchgeführt werden (Abbildung 3-26).

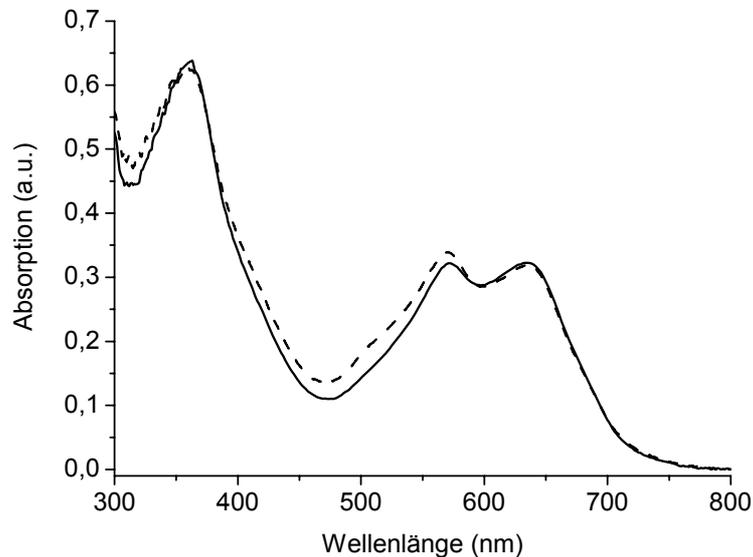


Abbildung 3-26: α -PEC-Bildung in Abhängigkeit von $MnCl_2$.

Absorptionsspektren der Rekonstitutionsansätze ohne Mn^{2+} (—) und mit Mn^{2+} (- - -) nach 180 min. His₆-PecA (10 μ M), His₆-PecE (10 μ M), His₆-PecF (30 μ M), PCB (9 μ M), $MnCl_2$ (1,5 mM).

Die Absorptionsspektren der Ansätze zeigen zwei Maxima bei 568 und 638 nm, die dem PVB-Addukt bzw. PCB-Addukt zugeordnet werden. Mn^{2+} hat im Trispuffersystem keinen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von α -PEC, die Ausbeuten von PVB-Addukt unterscheiden sich in An- und Abwesenheit von $MnCl_2$ nur unwesentlich. Die Notwendigkeit von zweiwertigen Metallionen zur PVB-Adduktbildung wurde bereits im Kapitel 3.1 angeschnitten. Da Mn^{2+} im Phosphatpuffer mit PO_4^{3-} zu einem schwerlöslichen Niederschlag führt (s. Kapitel 3.1.2), ist es fraglich, inwieweit zweiwertige Metallionen als Cofaktor für die PVB-Adduktbildung notwendig sind. Zhao *et al.* (Zhao *et al.* 2002) testeten verschiedene zweiwertige Metallionen (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+}) auf ihren Einfluss. Dabei zeigte sich, dass in Gegenwart von Mn^{2+} die Lyase die höchste Aktivität besitzt, während die α -PEC-Ausbeuten in Gegenwart von Mg^{2+} und Ca^{2+} nur noch bei 80 bzw. 68% lagen. Eine Mn^{2+} -Konzentration, die über der PO_4^{3-} -Konzentration lag, inhibierte die PecE/F-Reaktion vollständig. Somit ist der Einfluss von Mn^{2+} auf die PVB-

Adduktbildung schwierig zu beurteilen. Eine Interaktion des PCB mit Mn^{2+} findet nicht statt, da sich das Absorptionsspektrum von PCB durch Zugabe von Mn^{2+} auf einer kurzen Zeitskala (< 60 min) nicht verändert. Eine Rolle von Mn^{2+} als Katalysator oder Cofaktor bei der Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Bindung nach $\Delta 2,3$ während der PVB-Adduktbildung ist somit unwahrscheinlich. Jedoch zeigt Mn^{2+} eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit bei der PecE-katalysierten Chromophoraddition. Ein derartiger Effekt konnte bei der PecE/F-katalysierten α -PEC-Bildung nicht festgestellt werden. Denkbar ist eine Bindung von Mn^{2+} (oder Mg^{2+}) an PecE, wodurch PecE in eine aktive Form überführt wird. Die Beladung von PecE mit Mn^{2+} kann bereits während der Proteinexpression oder bei der Proteinreinigung stattfinden. Die drei genannten zweiwertigen Metallionen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften voneinander. Sie besitzen ungleiche Ionenradien (Mn^{2+} : 83 pm, Mg^{2+} : 72 pm, Ca^{2+} : 100 pm) und Reduktionspotentiale E° (Mn^{2+} : -1,180 V, Mg^{2+} : -2,356 V, Ca^{2+} : -2,84 V). Eine Oxidation von Mn^{2+} zu Mn^{3+} , die eine andere Art der Komplexierung des Mn-Ions bewirkt, erscheint unter den Rekonstitutionsbedingungen unwahrscheinlich, da sich Mn^{2+} in saurer Lösung gegen Oxidation und Reduktion durch besondere Stabilität auszeichnet (Hollemann 1995). Diese unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Metallionen lassen eine spezifische Rolle bei der PVB-Adduktbildung fraglich erscheinen. Zwertwertige Metallionen als Cofaktoren für andere Biliprotein-Lyasen oder bei der Phytochromrekonstitution wurden bislang nicht beschrieben (Fairchild *et al.* 1992, Zhao *et al.* 2006a, Zhao *et al.* 2006b).

3.3.1.4 Spektroskopische Untersuchungen zur Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte

Die Untersuchungen zur Identifizierung der Rekonstitutionsprodukte wurden im Rahmen einer Zulassungsarbeit von Thomas Kling durchgeführt.

Die mittels FPLC gereinigten Rekonstitutionsprodukte aus der PecE- bzw. PecE/F-katalysierten Adduktbildung sowie natives α -PEC aus *Mastigocladus laminosus* als Vergleich, wurden einem tryptischen Verdau unterworfen, um mit Hilfe der HPLC die Chromopeptide zu isolieren und anschließend durch Massenspektroskopie und NMR weiter zu charakterisieren. Abbildung 3-27 zeigt die 3D-Darstellung der HPLC-

Chromatogramme des tryptischen Verdaus von His₆- α -PEC, His₆-PCB-Addukt und nativem α -PEC.

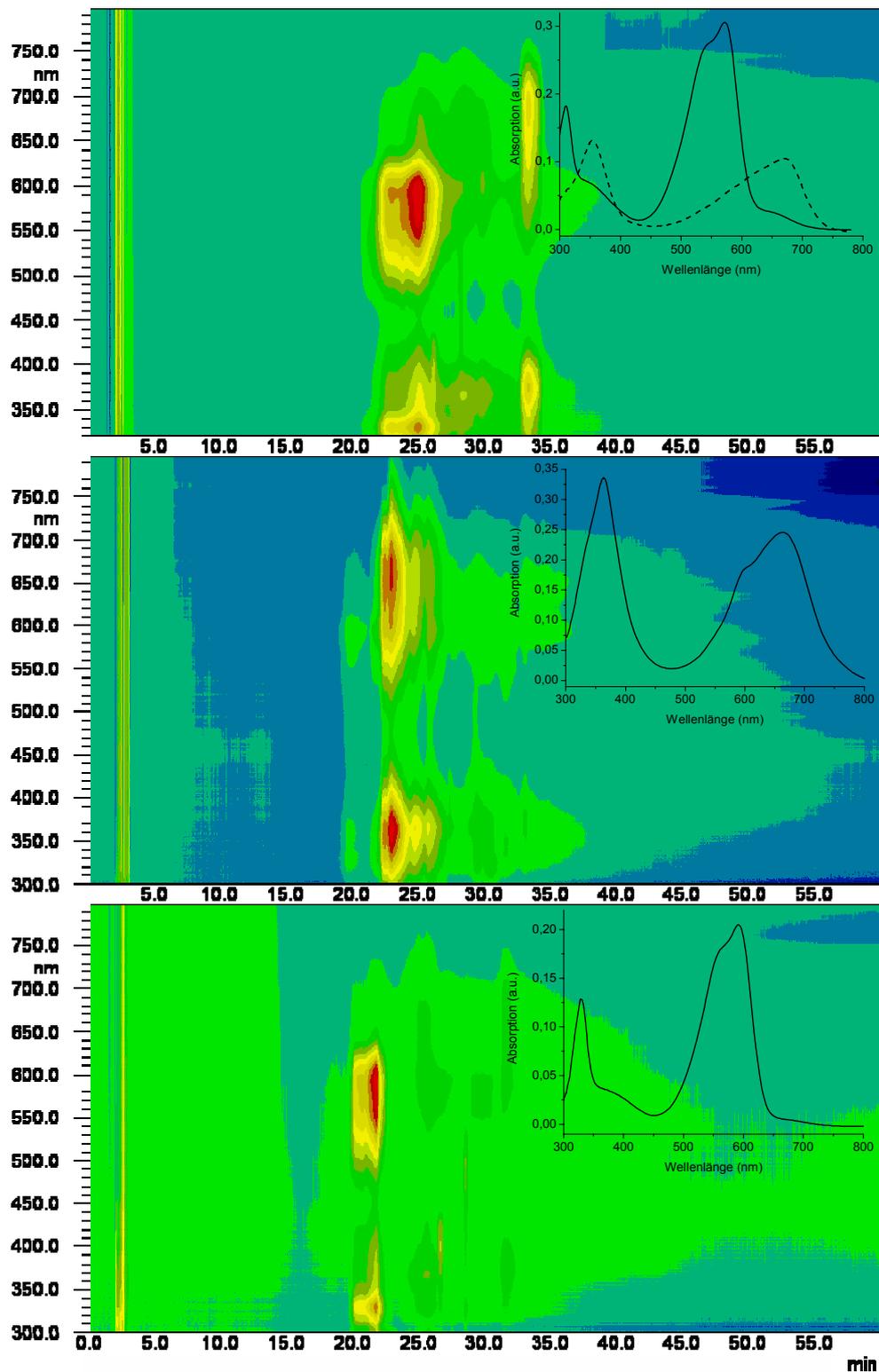


Abbildung 3-27: 3D-Darstellung der HPLC-Chromatogramme des tryptischen Verdaus von His₆-α-PEC (oben), His₆-PCB-Addukt (Mitte) und nativem α-PEC (unten).

Die Farben zeigen von blau nach rot steigende Absorption an. Inset: Absorptionsspektren der Hauptfraktionen; Oben: 24,8 min (—) und 33,3 min (- - -); Mitte: 22,6 min (—); Unten: 21,7 min (—).

Das Chromatogramm des tryptischen Verdau von His₆- α -PEC zeigt zwei Hauptfraktionen bei 24,8 und 33,3 min. Das Absorptionsspektrum der 24,8 min-Fraktion weist zwei Maxima bei 330 und 592 nm auf. Dabei handelt es sich um das 3¹-Cys-PVB-Peptid (Bishop *et al.* 1987). Das gleiche Absorptionsspektrum zeigt α -PEC nach Denaturierung in salzsaurem 8 M Harnstoff. Im denaturierten Zustand zeigt das 3¹-Cys-PVB-Peptid eine reversible Photochemie mit Maxima bei 507 und 599 nm (Siebzehnrübl *et al.* 1989, Storf 2003). Im Gegensatz zu Storf (Storf 2003) konnte keine Trennung der Δ 15,16-Z- und Δ 15,16-E-PVB-Peptide festgestellt werden. Storf stützt sich bei der Identifikation der isomeren PVB-Peptide auf Zhao *et al.* (Zhao *et al.* 1995a, Zhao *et al.* 1995b), die dem Δ 15,16-E-PVB-Peptid eine Absorption bei 529 nm zuschreiben, während das Δ 15,16-Z-PVB-Peptid ein Absorptionsmaxima bei 592 nm mit einer Schulter bei 560 nm aufweist. Eigene Arbeiten zeigen, dass in 8 M Harnstoff denaturiertes α -PEC ein Maximum bei 530 nm aufweist. Storf (Storf 2003) konnte bei der Auftrennung des tryptischen Verdau von His₆- α -PEC mittels HPLC MBV-Peptide detektieren. Eine Absorption, die MBV-Peptiden entspricht, konnte hier nicht detektiert werden. Dies liegt daran, dass hier eine Abtrennung der Lyase-Untereinheiten vor dem tryptischen Verdau erfolgte und somit die im Differenzspektrum (Abbildung 3-24) detektierte MBV-Absorption wahrscheinlich einem Komplex zugeordnet werden muss, der die Lyase-Untereinheiten beinhaltet. Dieser Chromoproteinkomplex wurde in der Arbeit von Storf vor dem tryptischen Verdau nicht abgetrennt.

Die Fraktion bei 33,3 min zeigt das typische Spektrum des freien PCB-Chromophors mit Maxima bei 375 und 690 nm. Durch Co-Chromatographie mit frisch isoliertem PCB konnte dies bestätigt werden. Die Herkunft des freien PCB-Chromophors konnte nicht vollständig geklärt werden. Da die Rekonstitution von α -PEC auch stets zur Bildung einer geringen Menge PCB-Addukts führt, könnte das PCB von diesem PCB-Addukt stammen, das den Chromophor verloren hat. Jedoch zeigt das HPLC-Chromatogramm keine Signale für tryptisch verdautes PCB-Addukt. Möglicherweise kam es zu einer spontanen Eliminierung des peptidgebundenen Chromophors durch die Bedingungen während der Vorbereitung der Probe für die HPLC-Analyse. Unter diesen Bedingungen ist eine säurekatalysierte Eliminierung vorstellbar, die zu einer Umlagerung der Δ 2,3-Doppelbindung nach Δ 4,5 führt.

Das Chromatogramm des tryptischen Verdaus des His₆-PCB-Addukts zeigt eine Hauptfraktion bei 22,6 min mit mehreren Nebenfraktionen, die etwas später eluieren, sich jedoch im spektralen Verhalten nicht von der Hauptfraktion unterscheiden. Demnach handelt es sich hierbei um längerkettige Chromopeptide (Wedemayer *et al.* 1992). Das Absorptionsspektrum der Hauptfraktion zeigt zwei Maxima bei 363 und 664 nm sowie eine prominente Schulter bei 599 nm. Das UV/VIS-Verhältnis beträgt 1,4. Nach Arciero *et al.* und Fairchild *et al.* (Arciero *et al.* 1988a, Fairchild *et al.* 1994) besitzt das PCB-Chromopeptid in 10 mM TFA Maxima zwischen 345-352 und 650-660 nm mit einem Verhältnis UV/VIS <1,5. Somit liegen die Maxima des hier detektierten Chromopeptids außerhalb des zitierten Spektralbereichs, das UV/VIS-Verhältnis innerhalb des Kriteriums. Die Spektren der PCB-Chromopeptide in der angeführten Literatur sowie bei Storf (Storf 2003) weisen keine Schulter bei 599 nm auf. Die Ursache der Schulter bleibt ungeklärt. Möglicherweise wird die Schulter durch unterschiedliche konformere Formen (Lactam-Lactim-Tautomere, Diastereomere) des 3¹-Cys-PCB-Peptids verursacht. Dennoch kann das detektierte Chromopeptid einem PCB-Chromophor zugeordnet werden. Eine Detektion von PVB- bzw. MBV-Chromopeptiden, wie sie von Storf (Storf 2003) bei der autokatalytischen Rekonstitution von PecA mit PCB beobachtet wurden, konnte bei der PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung nicht festgestellt werden. Dies zeigt, dass durch PecE eine rasche kovalente Chromophorbindung erfolgt, die eine Isomerisierung oder Oxidation des Chromophors verhindert.

Das Chromatogramm des tryptischen Verdaus von nativem α -PEC zeigt eine Hauptfraktion, die bei 21,7 min eluiert. Die im Vergleich mit der HPLC des rekonstituierten PVB-Addukts geringe Retentionszeit ist auf die Variierung der Zusammensetzung der mobilen Phase zurückzuführen. Das Absorptionsspektrum der Fraktion bei 21,7 min weist die charakteristischen Signale für den PVB-Chromophor mit Maxima bei 330 und 592 nm auf (Bishop *et al.* 1987, Zhao *et al.* 1995a). Im Gegensatz zum His₆- α -PEC konnte hier keine nennenswerte Menge an freiem PCB-Chromophor detektiert werden.

Im weiteren Verlauf war es von Interesse, die Chromopeptide des nativen α -PEC sowie des rekonstituierten α -PEC zu vergleichen, um den Nachweis der Identität der Chromophore im nativen α -PEC sowie im rekonstituierten α -PEC zu erbringen. Dazu wurden massen- und CD-spektroskopische Untersuchungen der PVB-

Chromopeptide unternommen. Durch massenspektroskopische Analysen konnte das PVB-Tripeptid mit der Aminosäuresequenz Cys^{PVB}-Val-Arg in beiden Proben nachgewiesen werden. In Abbildung 3-28 sind die CD-Spektren der PVB-Tripeptide des nativen und rekonstituierten α -PEC dargestellt.

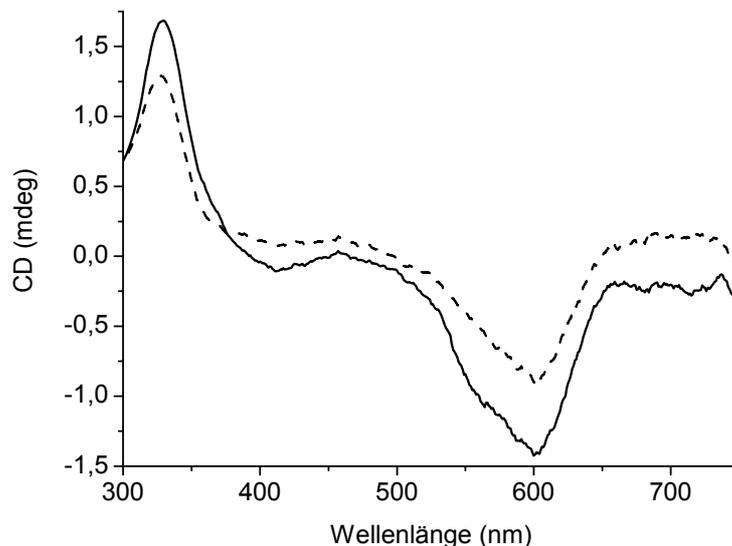


Abbildung 3-28: CD-Spektren der PVB-Tripeptide des rekonstituierten (—) und nativen α -PEC (---).

Die Spektren wurden in 10 mM Trifluoressigsäure aufgenommen und haben die gleiche ODml.

Die CD-Spektren zeigen für beide Chromopeptide ein positives Extremum bei 328 nm und ein negatives Extremum bei 600 nm. Das CD-Spektrum des PVB-Chromopeptids ist identisch mit den CD-Spektren der PVB-Chromopeptide aus *M. lamosus* und *A. variabilis* (Bishop *et al.* 1987). Dies zeigt, dass die Lyase PecE/F das Substrat PCB zu PVB isomerisiert und stereochemisch korrekt an PecA bindet.

Zusammenfassende Diskussion:

Die Bindung von PCB an PecA kann autokatalytisch, sowie PecE- und PecE/F-katalysiert erfolgen, dabei treten unterschiedliche Produkte auf. Die spektralen Eigenschaften der Produkte sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Vergleich der autokatalytischen (P645), der PecE-katalysierten (P641) und PecE/F-katalysierten Adduktbildung (P505/568) von PCB mit PecA.

	P645	P641	P505/568
Absorptionsmaximum $\lambda_{UV/VIS}$ (nm)	361, 645	355, 641	331, 505, 568
Q_{UV}^{VIS}	1,11	2,72	4,2
Absorptionsmaximum denaturiert/H ⁺ λ_{VIS} (nm)	662	662	570 ^s , 595 ^a
Fluoreszenzmaximum (nm)	660	660	584
rel. Fluoreszenzquantenausbeute ^b η	285	642	n.b.

^a Photochemie im denaturierten Zustand induzierbar ($\Delta\Delta A = 13\%$); ^b Die verwendeten Chromoproteinlösungen zur Fluoreszenzmessung hatten eine OD von 0,1 im roten Absorptionsmaximum; rel. Fluoreszenzquantenausbeute $\eta = \text{Fluoreszenzintensität}/\text{Absorption } \lambda_{\text{max}}$;

^s Schulter; n.b. = nicht bestimmt.

Die autokatalytische PCB-Adduktbildung erfolgt in einer langsamen Reaktion und resultiert in einem Chromoprotein mit einem Absorptionsmaximum bei 645 nm (P645). Die PecE-katalysierte Addition verläuft bedeutend schneller und das dabei entstehende Produkt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 641 nm (P641). Beide Produkte weisen das selbe Fluoreszenzemissionsmaximum bei 660 nm auf, jedoch unterscheiden sie sich in der relativen Fluoreszenzquantenausbeute, die bei P645 um mehr als die Hälfte niedriger ist als bei P641. Die geringen spektralen Unterschiede in den Absorptionseigenschaften sowie im Fluoreszenzverhalten belegen zum einen die kovalente Bindung des Chromophors an das Apoprotein, zeigen aber zum anderen, dass die Proteine oder die Chromophor-Protein-Wechselwirkungen bei P645 und P641 unterschiedlich sind.

Werden die Chromophor-Proteinwechselwirkungen durch Zugabe von Harnstoff im sauren Milieu aufgehoben, zeigen beide Chromoproteinlösungen ein Absorptionsmaximum bei 662 nm, das die Existenz eines kovalent gebundenen PCB-Chromophors belegt (Glazer *et al.* 1973a). Somit sind die leicht unterschiedlichen spektralen Eigenschaften von P645 und P641 nicht auf die Existenz unterschiedlicher Chromophore zurückzuführen.

Durch die Bindung des Chromophors an das Apoprotein und dessen Einpassung in die Bindungstasche des Apoproteins kommt es zur Streckung des Chromophors mit Ausbildung spezifischer Chromophor-Proteinwechselwirkungen, durch die das spektrale Verhalten des Holoпротеins sich deutlich vom freien Chromophor in

Lösung unterscheidet. Das Verhältnis Q_{UV}^{VIS} der lang- zu kurzwelligen Absorptionsmaxima deutet auf eine unterschiedliche Bindungssituation des Chromophors im Protein hin. Demnach scheint es beim P645 nicht oder nur teilweise zu spezifischen Chromophor-Proteinwechselwirkungen zu kommen. Der niedrige Q_{UV}^{VIS} -Wert lässt auf einen Chromophor schließen, der in einer mehr helicalen Form gebunden ist. Dies zeigt, dass die katalytische Domäne zur Chromophorbindung im Apoprotein selbst liegt und dass es zur Ausbildung spezifischer Interaktionen zwischen Chromophor und Protein eines Enzyms bedarf. Das Enzym, PecE, bewirkt die Einpassung des Chromophors in mehr gestreckter Form in die Bindungstasche und ist somit wesentlich für die spektralen Eigenschaften des Holo proteins verantwortlich.

Mittels zeitaufgelöster Kurzzeitspektroskopie wurde die Rolle von PecE während der Assemblierungsreaktion näher charakterisiert. Dabei konnten mehrere Intermediate detektiert werden, die sich zwar in der Lage ihrer Absorptionmaxima, jedoch kaum in ihren Extinktionskoeffizienten unterscheiden. Diese Intermediate können reversiblen Prozessen bei der Chromophor-Proteinanpassung zugeordnet werden. Eine deutliche Änderung im Extinktionskoeffizienten ist erst im letzten absorptionsspektroskopisch detektierbaren Schritt feststellbar, bei dem es zur Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Chromophor und Apoprotein kommt. Dabei zeigt sich ein rotes Intermediat, aus dem schließlich das P641 entsteht. Die Natur dieses Intermediats bleibt vorerst offen.

Mn^{2+} hat nur bei der PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung eine Bedeutung als Cofaktor, es steigert die Reaktionsgeschwindigkeit um ein Vielfaches. Dies deutet darauf hin, dass Mn^{2+} kein Cofaktor für die Chromophorbindung selbst darstellt, möglicherweise aber als Aktivator für die Lyase-Untereinheit PecE dient. Das Detergenz Triton X-100 zeigt einen negativen Effekt auf die PCB-Adduktbildung und führt zu stark verminderten Produktausbeuten. Dieser negative Effekt bei der PCB-Adduktbildung kehrt sich in einen fördernden, positiven Einfluss bei der PVB-Adduktbildung um, in dem Triton X-100 die PVB-Adduktbildung auf zwei Arten beeinflusst. Zum einen hemmt es die bei der PVB-Adduktbildung unerwünschte Nebenreaktion der PCB-Adduktbildung, und zum anderen bewirkt Triton X-100 eine Änderung in der Struktur des Chromophors, die zu einer vermehrten α -PEC-Bildung führt (Zhao *et al.* 2004). Die alleinige Anwesenheit von PecF ist für eine PVB-Adduktbildung nicht ausreichend, hierbei kommt es sogar zu einem starken

Rückgang der autokatalytischen PCB-Adduktbildung. Dies deutet auf eine Wechselwirkung zwischen PecF und dem Chromophor hin. Für die Bildung von α -PEC ist neben der Lyase-Untereinheit PecE die zweite Lyase-Untereinheit PecF notwendig. Nur in Kombination dieser beiden Untereinheiten kommt es zur PVB-Adduktbildung.

Bei der PVB-Adduktbildung kam es auch zur Bildung des PCB-Addukts. Im Differenzspektrum der Reaktion lässt sich zudem ein Hinweis darauf finden, dass als drittes Produkt ein MBV-Addukt entsteht. Dieses MBV-Addukt konnte jedoch nach Abtrennung der Lyase-Untereinheiten und dem tryptischen Verdau des rekonstituierten PecA-Chromoproteins mittels HPLC nicht mehr nachgewiesen werden. Folglich kann das MBV-Addukt im Komplex mit den Lyase-Untereinheiten abgetrennt worden sein (s. Kapitel 3.6.2.6).

3.3.2 Rekonstitution von PecA mit Phycocyanobilin-Dimethylester (PCB-DME)

Die Kristallstruktur von PEC zeigt Interaktionen der beiden Carbonsäuren des α -84-PVB-Chromophors mit Aminosäureresten des Apoproteins (Tabelle 3-6) (Düring *et al.* 1990). Diese spezifischen Chromophor-Proteininteraktionen stabilisieren den Chromophor in der Bindungstasche von PecA. Mit Hilfe des PCB-DME soll untersucht werden, welche Rolle die Propionsäuren bei der Bindung des Pigments an das Apoprotein spielen.

Tabelle 3-6: Spezifische Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren von α -PEC mit den Propionsäuren des PVB-Chromophors. Die Nomenklatur erfolgt nach Düring *et al.* (Düring *et al.* 1990).

Atom des Chromophors	Atom der Aminosäure	Distanz (Å)	Carbonsäure des PVB
O ₍₈₅₎	O-Pro-72,	3,1	C ₍₈₎ -C ₍₈₁₎ H ₂ C ₍₈₂₎ H ₂ CO ₍₈₄₎ O ₍₈₅₎ ⁻
O ₍₈₄₎	NZ-Lys-83	3,2	C ₍₈₎ -C ₍₈₁₎ H ₂ C ₍₈₂₎ H ₂ CO ₍₈₄₎ O ₍₈₅₎ ⁻
O ₍₁₂₄₎	NZ-Lys-83	3,1	C ₍₁₂₎ -C ₍₁₂₁₎ H ₂ C ₍₁₂₂₎ H ₂ CO ₍₁₂₄₎ O ₍₁₂₅₎ ⁻
O ₍₁₂₅₎	NH1-Arg-86	3,1	C ₍₁₂₎ -C ₍₁₂₁₎ H ₂ C ₍₁₂₂₎ H ₂ CO ₍₁₂₄₎ O ₍₁₂₅₎ ⁻

Die Distanzen zwischen den Aminosäuren und den Carboxylgruppen des Chromophors liegen im Bereich von 3 Å (Tabelle 3-6). Somit spielen die

Carboxylgruppen bei der Chromophor-Protein-Erkennung eine wichtige Rolle, da es dadurch zur Ausbildung von polaren und ionischen Bindungen zum Apoprotein kommt. Im Nachfolgenden wird untersucht, wie sich der PCB-DME-Chromophor im Vergleich mit PCB bei der Rekonstitution von PecA verhält.

PCB-DME wurde während der Reinigung von PCB über die RP₈-Säule nach methanolischer Extraktion aus *Spirulina platensis* gewonnen und mit verschiedenen spektroskopischen Methoden charakterisiert.

In Abbildung 3-29 sind die Absorptionsspektren sowie die DC-Analyse von PCB und PCB-DME dargestellt.

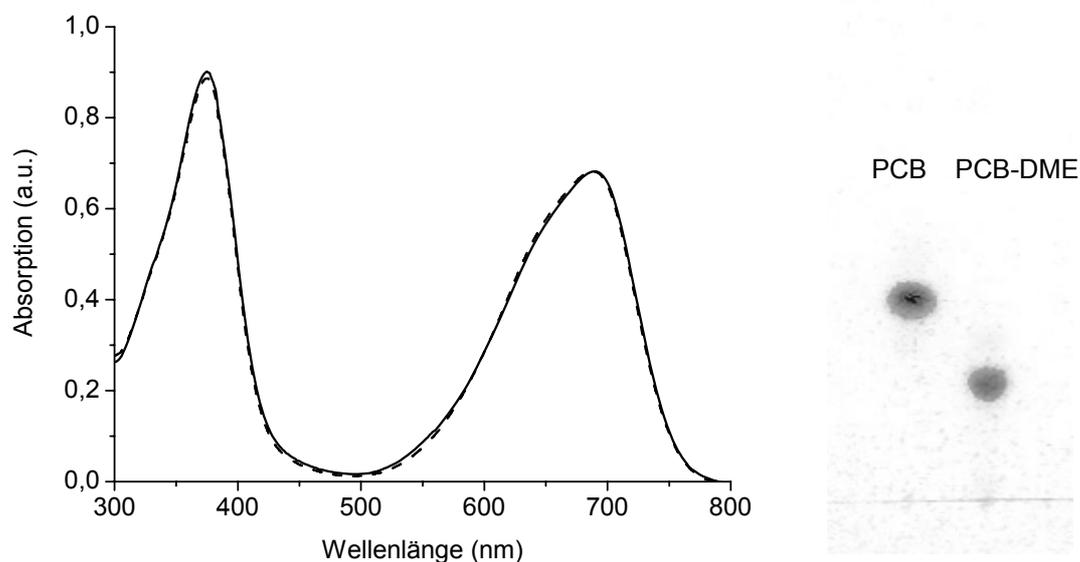


Abbildung 3-29: Absorptionsspektren (links) und Dünnschichtchromatographie (rechts) von PCB und PCB-DME aus der PCB-Reinigung mittels RP₈-Säulenchromatographie.

Links: PCB (—), PCB-DME (---), die Absorptionsspektren wurden in MeOH/2% HCl (v/v) aufgenommen und im roten Maximum normiert. **Rechts:** stationäre Phase: RP₈-F₂₅₄, mobile Phase: Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄, pH 2,1)/2-Propanol = 60:40 (v/v).

PCB und PCB-DME zeigen das gleiche Absorptionsverhalten in MeOH/2% HCl mit Maxima bei 375 nm und 690 nm. Damit entsprechen sie jeweils einem 3(*E*)-konfigurierten Chromophor (Cole W. J. 1968, Beale *et al.* 1991). Die Analyse der Dünnschichtchromatographie zeigt ein unterschiedliches Laufverhalten der beiden

Chromophore. Der R_f -Wert von PCB beträgt 0,27, der von PCB-DME 0,15. Damit ist PCB-DME deutlich unpolarer als PCB.

Die massenspektroskopische Analyse der beiden PCB-Chromophore zeigte folgende Ergebnisse:

Tabelle 3-7: Haupt- und Nebensignale der massenspektroskopischen Analyse von PCB und PCB-DME. M^+ [m/z] (%)

PCB	PCB-DME
587,2 (100)	616,3 (80)
	637,3 (60)
	601,3 (12)

Die Masse von PCB mit $m/z = 587,2$ stimmt mit der theoretisch berechneten Masse eines PCB-Chromophors überein. Hingegen ist der Hauptpeak des PCB-DME 29 Masseneinheiten schwerer. Diese Massendifferenz entspricht zwei zusätzlichen Methylgruppen. Die Masse bei $m/z = 637,3$ kann dem Na^+ -Addukt des PCB-DME zugeordnet werden, während die Masse bei $m/z = 601,3$ nur einer zusätzlichen Methylgruppe entspricht. Um die Struktur der beiden Chromophore vollständig aufzuklären, wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren des PCB und PCB-DME aufgenommen (Abbildung 3-30).

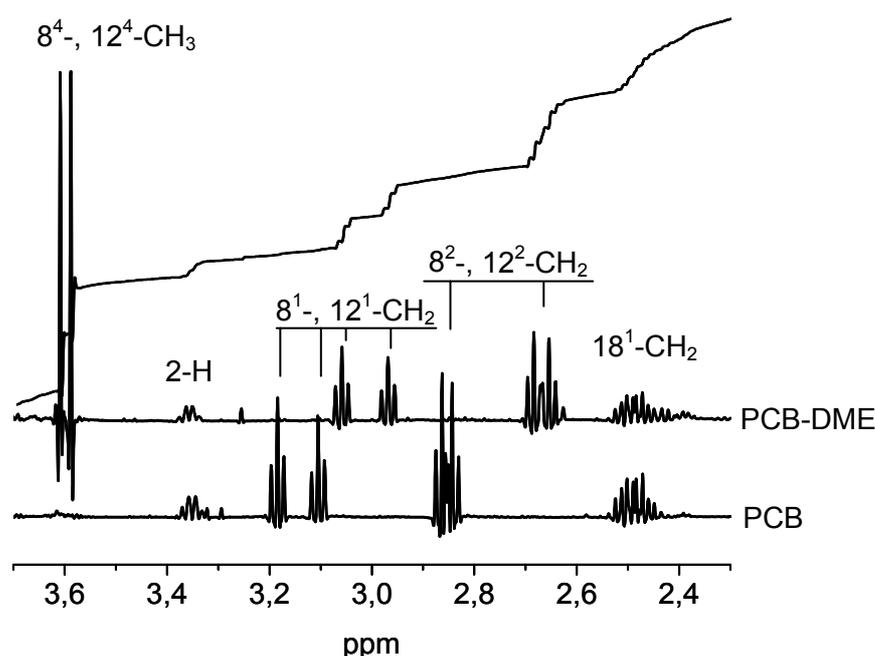


Abbildung 3-30: 600 MHz- ^1H -NMR-Spektren vom PCB und PCB-DME im Bereich von 2,2-3,7 ppm.

Für PCB-DME ist das Integral abgebildet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte in Pyridin- d_5 .

Durch ^1H -NMR konnte die Struktur der beiden Chromophore aufgeklärt werden. Abbildung 3-30 und Tabelle 3-8 zeigen einen Ausschnitt aus den ^1H -NMR-Spektren der beiden Pigmente und die Zuordnung der Signale zu den einzelnen H-Atomen. Die ^1H -NMR-Spektren von PCB und PCB-DME unterscheiden sich im Wesentlichen nur im Bereich von 2,6 – 3,7 ppm. PCB-DME zeigt bei 3,6 ppm zwei Singulett-Signale, die im Spektrum von PCB nicht vorhanden sind. Diese beiden Signale konnten den Methylprotonen der Propionsäureesterfunktionen an C8 und C12 zugeordnet werden. Die Integration der Singulett-Signale von PCB-DME bei 3,6 ppm liefert sechs H-Atome.

Durch die Veresterung der Propionsäuren kommt es zur Abschirmung der Protonen an C8¹/C8² und C12¹/C12² und folglich zur Hochfeldverschiebung dieser Signale. Durch den Vergleich der ^1H -NMR-Signale mit Literaturwerten wurden die beiden Chromophore als 3(*E*)-Konformere identifiziert. Nachfolgende Tabelle zeigt die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden H-Atomen.

Tabelle 3-8: ¹H-NMR-Zuordnungstabelle der Signale von PCB und PCB-DME.Die Aufnahme der Spektren erfolgte in Pyridin-*d*₅.

Proton	PCB	PCB-DME	Referenz
18 ² -CH ₃	1.25, t	1.25, t	1.24, t
2 ¹ -CH ₃	1.49, d	1.49, d	1.47, d
3 ² -CH ₃	1.69, d	1.69, d	1.72, d
7-, 13-, 17-CH ₃	2.05; 2.07; 2.13, 3s	2.02; 2.13; 2.14, 3s	1.97; 2.09; 2.09, 3s
18 ¹ -CH ₃	2.49, q	2.49, q	2.47, q
8 ² -CH ₂ , 12 ² -CH ₂	2.85, m	2.67, m	2.68, m
2-CH	3.35, m	3.35, m	3.39, m
8 ¹ -CH ₂ , 12 ¹ -CH ₂	3.1-3.2, m	2.9-3.1, m	2.99, m
8 ⁴ -CH ₃ , 12 ⁴ -CH ₃	---	3.59; 3.61, 2s	3.6; 3.8, 2s
15-CH	5.85, s	5.85, s	6.16, s
5-CH	6.08, s	6.08, s	5.85, s
3 ¹ -CH	6.30, dq	6.30, dq	6.33, dq
10-CH	7.29, s	7.29, s	6.99, s

Referenz: 3(*E*)-PCB-Dimethylester (Gossauer *et al.* 1974, Weller *et al.* 1980, Beale *et al.* 1991)

Das Veresterungsprodukt entsteht während der Isolierung von PCB aus *Spirulina platensis*, da bei verschiedenen Arbeitsschritten in saurer, methanolischer Lösung gearbeitet wird, wodurch eine säurekatalysierte Veresterung möglich ist (Schram *et al.* 1971).

Sowohl das 3(*E*)-PCB (s. Kapitel 3.3.1) als auch der 3(*E*)-PCB-DME wurden in Rekonstitutionsexperimenten auf ihre Fähigkeit zur PCB-Addukt- und α -PEC-Bildung hin getestet. Dabei zeigte sich, dass bereits die Inkubation der beiden Pigmente in Tris-Puffer (1 M, pH 6.0) zu unterschiedlichen Absorptionsverhalten führte (Abbildung 3-31).

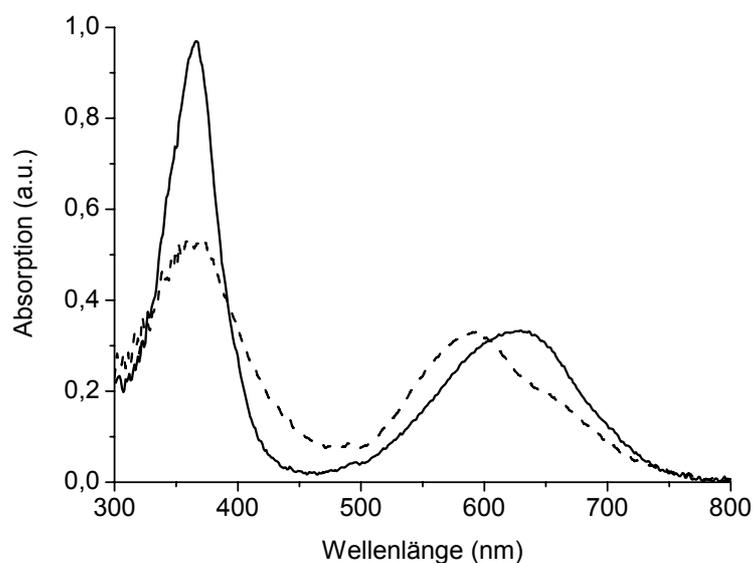


Abbildung 3-31: Absorptionsspektren von 3(E)-PCB (—) und 3(E)-PCB-DME (- - -) in Tris-Puffer (1 M, pH 6.0).

Die Spektren wurden im roten Absorptionsmaximum normiert.

Die Inkubation von 3(E)-PCB zeigt zwei Maxima bei 368 nm und 630 nm mit einem Verhältnis der lang- zu kurzwelligen Absorption (Q_{UV}^{VIS}) von 0,34. Das Esterderivat zeigt zwei Maxima bei 368 nm und 594 nm, sowie eine deutliche Schulter bei 660 nm. Das Verhältnis von lang- zu kurzwelliger Absorption (Q_{UV}^{VIS}) beträgt 0,63. Diese Werte belegen, dass beide Chromophore im Trispuffer in helicaler Form vorliegen. Dennoch führen die Esterfunktionen zu einer anderen räumlichen Geometrie des PCB-DME. Die hypsochrome Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums des PCB-DME im Vergleich mit PCB kann auf die Bevorzugung eines anderen Isomers zurückgeführt werden (Falk 1989). Während PCB vorwiegend als 4Z, 9Z, 15Z-Isomer in Tris-Puffer vorliegt, könnte die geometrische Struktur des PCB-DME im Trispuffer 4Z, 9Z, 15E bzw. 4E, 9Z, 15Z sein. Dadurch kommt es zur Störung des planaren π -Systems an den 15- bzw. 5-Methinbrücken und zu einer hypsochromen Verschiebung der Absorption um ca. 30 nm (Falk 1989).

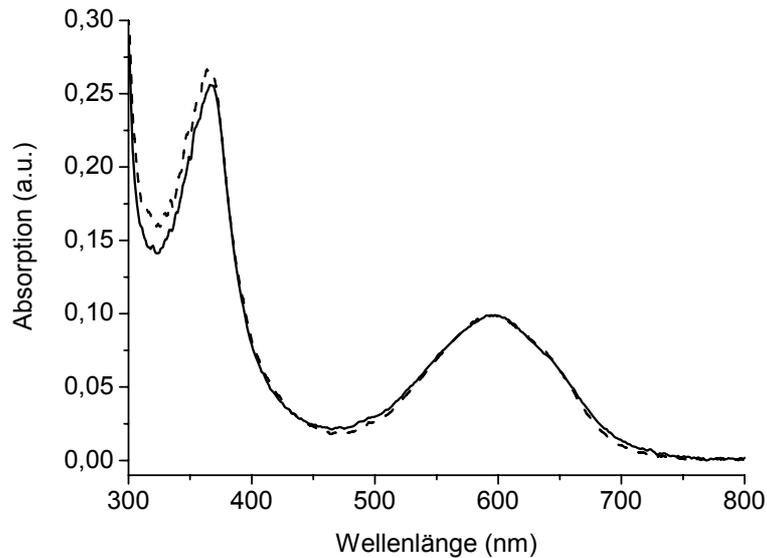


Abbildung 3-32: Absorptionsspektren von 3(E)-PCB (—) und 3(E)-PCB-DME (- - -) in Tris-Puffer mit Triton X-100 (1 M, pH 6.0, Triton X-100 0,75% v/v).

Die Spektren wurden im roten Absorptionsmaximum normiert.

Die Zugabe von Triton X-100 führt zur Aufhebung der Absorptionsunterschiede. Beide Pigmente zeigen Maxima bei 365 nm und 598 nm mit einem Q_{UV}^{VIS} -Verhältnis von 0,38 (s. Abbildung 3-32). Triton X-100 verleiht beiden Chromophoren die gleiche Konformationsfreiheit und führt somit zu einer Flexibilisierung des PCB-DME, möglicherweise durch Streckung des Chromophors.

3.3.2.1 Autokatalytische Bindung von PCB-DME an PecA

PCB-DME wurde zusammen mit His₆-PecA inkubiert, um dessen Fähigkeit zur autokatalytischen Rekonstitution zu testen (Abbildung 3-33).

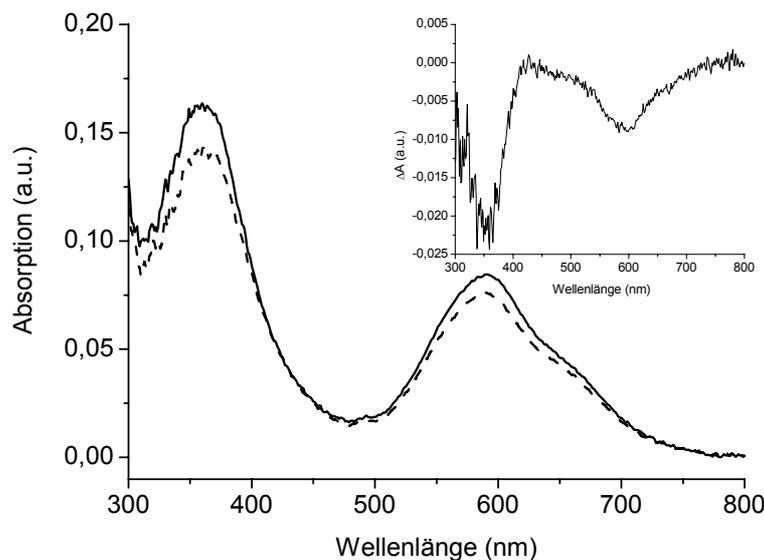


Abbildung 3-33: Autokatalytische Addition von PCB-DME an PecA.

Absorptionsspektren nach 0 min (—) und 180 min (---), Inset: Differenzspektrum 180 min *minus* 0 min; His₆-PecA (10 μM), PCB-DME (5 μM), MnCl₂ (1,5 mM).

Die Absorptionsspektren des autokatalytischen Rekonstitutionsansatzes zeigen keine wesentlichen spektralen Veränderungen. Es kommt zu einem Rückgang der Absorption sowohl im blauen Wellenlängenbereich bei 360 nm als auch im roten Wellenlängenbereich bei 590 nm. Dieser Rückgang ist auch im Differenzspektrum zu erkennen. Absorptionsspektroskopisch lässt sich keine autokatalytische Rekonstitution von PecA mit PCB-DME feststellen. Die spektroskopische Untersuchung der affinitätschromatographisch gereinigten Probe zeigte keine detektierbare Absorption. Demnach kam es zu keiner kovalenten Bindung des Chromophors an das Apoprotein. Ein Einfluss von Mn²⁺ auf die autokatalytische Addition des PCB-DME konnte nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zur autokatalytischen Rekonstitution von PecA mit PCB, bei der der Chromophor in einer langsamen Reaktion gebunden wird, kommt es hier zu keiner Assemblierung. Die Methylgruppen der Esterfunktionen bewirken zum einen eine sterische Hinderung der Chromophor-Protein-Wechselwirkungen und zum anderen ändert sich die Polarität, die für nichtkovalente Bindungen zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein von Bedeutung sein könnte. Der Chromophor kann nicht selbstständig soweit in die Bindungstasche des PecA gelangen, dass es zu einer Reaktion zwischen Cys-84 und der Ethylidengruppe des PCB-DME kommt.

Die Rekonstitution von Phytochrom mit PCB-DME resultiert ebenfalls in keiner kovalenten Bindung des Chromophors an das Apoprotein (Jorissen *et al.* 2002a). Eine reversible Chromophor-Proteinwechselwirkung, die sich nur in geringen Änderungen des Extinktionskoeffizienten zeigt, kann hier nicht ausgeschlossen werden. Der Chromophor kann jedoch keine elektronischen Interaktionen mit dessen Carboxylgruppen und den positiven Ladungen von Aminosäuren in der Bindungstasche eingehen. Dies zeigt die Bedeutung der Carboxylgruppen für Protein-Chromophor-Wechselwirkungen, die einer kovalenten Bindung des Chromophors vorausgehen.

3.3.2.2 PecE-katalysierte Bindung von PCB-DME an PecA

PecA kann in einer autokatalytischen Reaktion PCB binden. Diese Reaktion wird durch PecE stark beschleunigt und resultiert in einer PCB-Adduktbildung (P641), bei der der Chromophor über dessen Ethylidenfunktion an Cys84 des Apoproteins PecA gebunden wird (s. Kapitel 3.3.1.2).

Abbildung 3-34 zeigt die His₆-PecE-katalysierte Addition von PCB-DME an His₆-PecA.

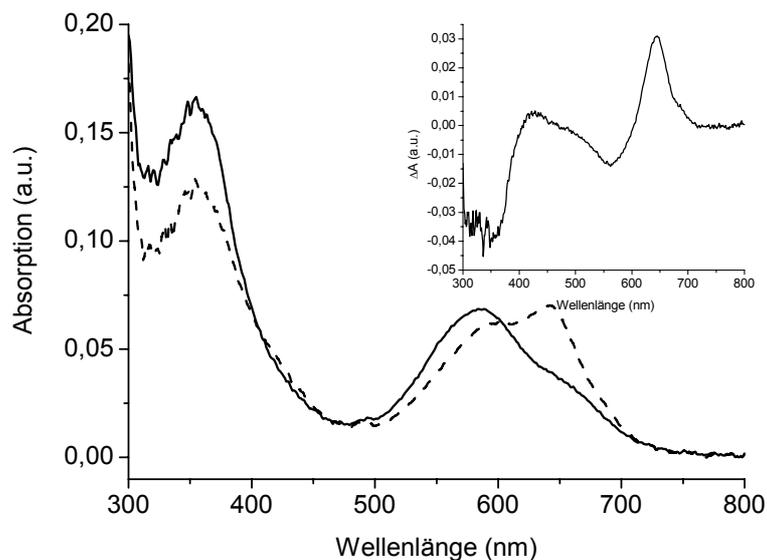


Abbildung 3-34: PecE-katalysierte PCB-Adduktbildung mit 3(E)-PCB-DME.

Absorptionsspektren nach 0 min (—) und 180 min (- - -), Inset: Differenzspektrum 180 min *minus* 0 min; His₆-PecA (10 μM), His₆-PecE (10 μM), PCB (5 μM) und MnCl₂ (1,5 mM).

3(E)-PCB-DME zeigt in Anwesenheit von His₆-PecE eine Adduktbildung mit einem Maximum bei 643 nm. Dieses Absorptionsmaximum liegt in der Mitte zwischen den beiden Absorptionsmaxima der autokatalytischen bzw. PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung mit PCB. Das verdeutlicht die Notwendigkeit spezifischer Interaktionen zwischen Chromophor und Protein im Holoprotein für dessen spektrales Verhalten. Die Ausbeute beträgt nur ca. 10%, verglichen mit der His₆-PecE-katalysierten Rekonstitution von 3(E)-PCB. Damit konnte im Gegensatz zu Storf (Storf 2003) eine Rekonstitution des PCB-DME an PecA durchgeführt werden. Durch PecE ist das Apoprotein in der Lage den PCB-DME-Chromophor kovalent zu binden. Dabei kann PecE entweder durch Interaktion mit dem Chromophor diesen in eine Konformation bringen, die eine Bindung der Ethylidengruppe an Cys-84 von PecA ermöglicht, oder aber PecE interagiert mit PecA in einer Weise, durch die die Bindungstasche weiter geöffnet wird und der Chromophor in die Tasche hineingleiten kann.

3.3.2.3 PecE/F-katalysierte Bindung von PCB-DME an PecA

Deutliche Unterschiede zeigen sich bei der His₆-PecE/F-katalysierten Rekonstitution von His₆-PecA mit 3(*E*)-PCB-DME, verglichen mit 3(*E*)-PCB. Abbildung 3-35 zeigt den spektralen Verlauf dieser Reaktion.

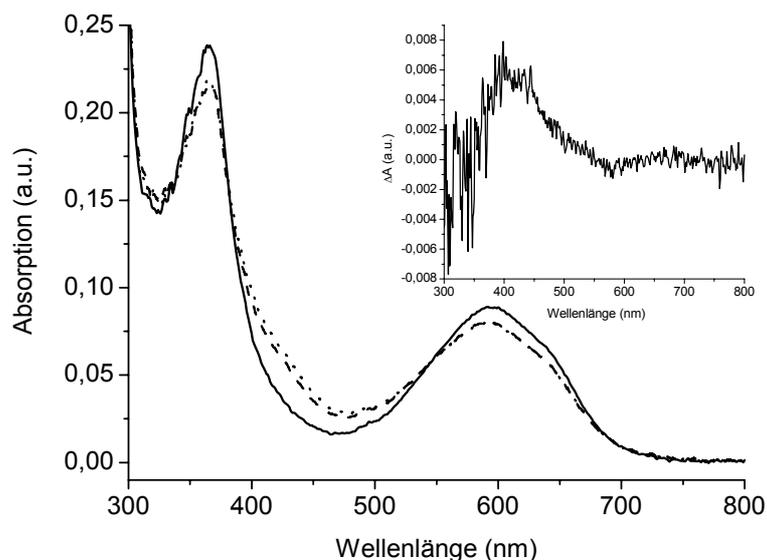


Abbildung 3-35: PecE/F-katalysierte α -PEC-Bildung mit 3(*E*)-PCB-DME.

Absorptionsspektren nach 0 min (—), 180 min + Belichtung mit 570 nm-Licht (····) und 180 min + Belichtung mit 505 nm-Licht (- - -); Inset: Differenzspektralen der Belichtung 570 nm *minus* 505 nm; His₆-PecA (10 μ M), His₆-PecE (10 μ M), His₆-PecF (20 μ M), PCB (5 μ M), MnCl₂ (1,5 mM) und Triton X-100 (0,85% v/v).

Das Absorptionsspektrum zum Zeitpunkt 0 min unterscheidet sich nur wenig vom Spektrum nach 180 min. Eine Verschiebung oder Intensivierung des Absorptionsmaximums bei 590 nm, die auf eine Reaktion zwischen PCB-DME und His₆-PecA hindeuten, ist nicht ersichtlich. Der Rekonstitutionsansatz wurde zur Induktion der reversiblen Photochemie von α -PEC mit Licht der Wellenlängen 505 und 570 nm belichtet. Das Differenzspektrum dieser Belichtungen enthält keinen Hinweis auf eine lichtinduzierte *E/Z*-Isomerisierung des Chromophors (Inset in Abbildung 3-35). Demnach konnte PCB-DME durch die PecE/F-Katalyse nicht an das Apoprotein gebunden werden und es kam auch zu keiner Umlagerung der Δ 4,5-Doppelbindung nach Δ 2,3. PCB-DME dient nicht als Substrat für die Lyase PecE/F. Neben der Interaktion zwischen den Propionsäureketten und dem Apoprotein ist die

Interaktion zwischen den Carboxylgruppen und PecF eine notwendige Voraussetzung zur Bildung von α -PEC. Es konnte im Gegensatz zur PecE-katalysierten Reaktion mit PCB-DME keine PCB-Adduktbildung festgestellt werden, wie sie als Nebenreaktion bei der PecE/F-katalysierten α -PEC-Bildung mit PCB auftritt. Die Ursache dieses Effekts kann in der Anwesenheit von Triton X-100 liegen oder aber durch PecF verursacht sein.

Zusammenfassende Diskussion:

Die Adduktbildung von PecA mit PCB bzw. PCB-DME zeigt große Unterschiede sowohl bei der autokatalytischen, wie auch bei der PecE- und bei der PecE/F-katalysierten Rekonstitution (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: Rekonstitutionsverhalten von PecA mit PCB und PCB-DME.

Angegeben ist das Maximum der Absorption im roten Wellenlängenbereich (nm) in Tris-Puffer (1 M, pH 6.0).

	autokatalytisch λ_{\max} (nm)	PecE-katalysiert λ_{\max} (nm) rel. Ausbeute (%)	PecE/F-katalysiert λ_{\max} (nm)
PCB	645	641 (100)	505/568
PCB-DME	k. R.	643 (10)	k. R.

k. R. = keine Reaktion

Durch den Vergleich der Rekonstitutionen von PCB und PCB-DME lassen sich mehrere Aussagen über die Bedeutung der Propionsäuren bei der Bindung des PCB an PecA machen:

- Die Interaktion zwischen den Propionsäuren des Chromophors und dem Apoprotein ist ein wichtiger Schritt zur Bindung des Chromophors. Findet diese spezielle Chromophor-Wechselwirkung nicht statt, kann der Chromophor nicht autokatalytisch an das Apoprotein gebunden werden.
- PCB-DME kann mit Hilfe von PecE an PecA gebunden werden. Dies deutet auf eine Chaperonfunktion von PecE hin, durch die die Bindungstasche von PecA für den Chromophor zugänglicher gemacht wird. Durch reversible Apoprotein-Chromophor-Wechselwirkungen entsteht ein PecA-

Chromophorkomplex, der von PecE als Substrat erkannt wird (s. PecE-katalytische Bindung).

- Eine Interaktion zwischen PecF und dem Chromophor (speziell zu den Propionsäuren) ist Voraussetzung für die Erkennung des PCB durch PecF, die zur Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung nach $\Delta 2,3$ führt. Da PCB-DME kein Substrat für die α -PEC-Bildung darstellt, scheint die Ausbildung von Ionenpaar- und polaren Bindungen zwischen PecF und den Propionsäuren ein wichtiges Erkennungsmotiv zu sein.

Die Rekonstitution von Phytochrom mit PCB-DME führt zu keiner Bindung des Chromophors an das Apoprotein (Bhoo *et al.* 1997, Jorissen *et al.* 2002a). Die Interaktion zwischen den negativ geladenen Carboxylgruppen der Propionsäuren und den positiv geladenen Aminosäuren des Apo-Phytochroms spielen eine wichtige Rolle bei der Assemblierungsreaktion. Bei der Bindung des Chromophors an PecA haben diese Interaktionen ebenfalls eine große Bedeutung. Für eine korrekte Rekonstitution ist zum einen die Interaktion zwischen den Propionsäuren des Chromophors und des Apoproteins notwendig. Ohne die Ausbildung dieser elektronischen Wechselwirkungen findet keine Chromophor-Protein-Interaktion statt. Zum anderen bedarf es der Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen den Propionsäureseitenketten mit der Lyase-Untereinheit PecF, ohne die eine α -PEC-Bildung nicht möglich ist. Die Bedeutung der Propionsäuren des Chromophors zeigt sich auch bei dessen Bindung an Proteine der Bilinbiosynthese. Hagiwara *et al.* (Hagiwara *et al.* 2006) kristallisierten PcyA (PCB:Ferredoxin-Oxidoreduktase), ein Enzym, das die Reaktion von Biliverdin IX α (BV) zu PCB katalysiert. Dabei zeigt die Kristallstruktur, dass die Carboxylgruppen der Propionsäuren des BV über Ionenpaar- und Wasserstoffbrückenbindungen an das Protein gebunden sind und somit einen wesentlichen Teil zur Fixierung des BV in der Bindungstasche beitragen.

3.3.3 Rekonstitution von PecA mit Phycoerythrobilin (PEB)

PecA kann neben PCB auch Phycoerythrobilin (PEB) binden (Storf *et al.* 2001), das im Gegensatz zum PCB eine weitere Doppelbindung an C-18¹,18² besitzt und dem die Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen C und D fehlt (Abbildung 3-15). Die

fehlende Methinbrücke bewirkt, dass PEB zum einen ein verkürztes konjugiertes π -System aufweist und zum anderen, dass der Ring D frei drehbar ist. Aufgrund der fehlenden Methinbrücke kann keine reversible, lichtinduzierte *E/Z*-Isomerisierung an $\Delta 15,16$ stattfinden. Mit Hilfe von PEB sollen Chromophor-Lyase-Interaktionen näher charakterisiert werden. Nachdem mit PCB-DME die Relevanz von funktionellen Gruppen untersucht wurde, soll nun mit PEB getestet werden, ob die planare Geometrie des Chromophors eine notwendige Voraussetzung für die Interaktion mit der Lyase ist.

Da auch bei diesen Experimenten der Einfluss von Cofaktoren untersucht werden soll, wurde PEB in verschiedenen Pufferzusammensetzungen über einen Zeitraum von drei Stunden inkubiert. Dabei kam es bei der Inkubation in Anwesenheit von Mn^{2+} zu ähnlichen Verschiebungen der Absorptionsspektren wie bei der Inkubation von PCB mit Mn^{2+} , die auf einen destruktiven Effekt des Metallions auf den Chromophor hindeuten. Die Inkubation von PEB in Triton X-100-haltigem Puffer ist in Abbildung 3-36 dargestellt.

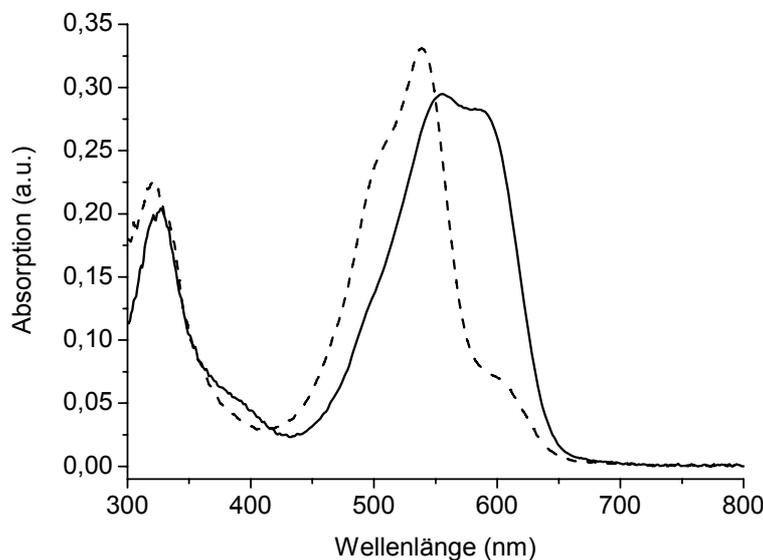


Abbildung 3-36: Absorptionsspektren von PEB (8 µM) in Trispuffer in Abwesenheit (—) und Gegenwart von Triton X-100 (0,7% v/v) (- - -).

PEB zeigt im Trispuffer drei Absorptionmaxima bei 328, 555 und 590 nm. Die Zugabe von Triton X-100 bewirkt eine hypsochrome Verschiebung der Absorption. Dabei zeigen sich nur noch zwei Maxima bei 320 und 538 nm mit zwei Schultern bei

502 und 598 nm. Die beiden Maxima im roten Wellenlängenbereich deuten zwei unterschiedliche Konformere des Chromophors an, die in den beiden Puffersystemen in verschiedenen Gleichgewichten vorliegen. Das Auftreten von Fluoreszenz und die Verschmälerung der Absorptionsbande durch Zugabe von Triton X-100 deuten auf Einengung der Konformationsvielfalt und somit geringere Flexibilität des Chromophors hin. Eine Streckung des Chromophors ist damit nicht verbunden, da es zu keiner Intensivierung der langwelligen Absorption kommt (Scheer 1982, Falk 1989, Storf *et al.* 2001). Die Absorptionsspektren von PEB in diesen beiden Puffersystemen änderten sich über einen Zeitraum von drei Stunden nur wenig. Es konnte lediglich ein leichter hypochromer Effekt festgestellt werden, der wahrscheinlich durch ein Ausbleichen des Chromophors verursacht wird.

3.3.3.1 Autokatalytische Bindung von PEB an PecA

Die autokatalytische PEB-Adduktbildung erfolgte sowohl in Gegenwart wie auch in Abwesenheit von MnCl_2 , ohne dass es zu Unterschieden in den Produktausbeuten kam. Wie auch bereits bei der autokatalytischen Rekonstitution von PCB mit PecA ist Mn^{2+} kein notwendiger Cofaktor. Abbildung 3-37 zeigt den Verlauf der autokatalytischen Rekonstitution von His₆-PecA mit PEB, die nach ca. 90 Minuten abgeschlossen ist. Damit verläuft die autokatalytische PEB-Addition fast doppelt so schnell wie die autokatalytische PCB-Addition an PecA.

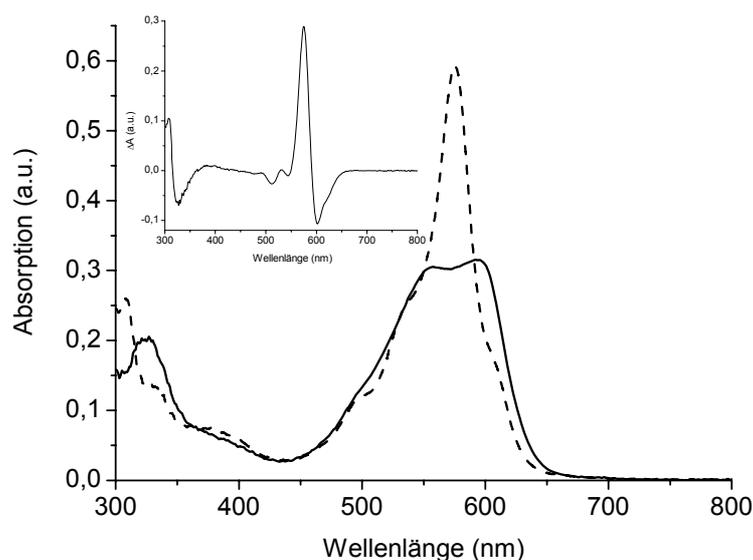


Abbildung 3-37: Autokatalytische Reaktion von Phycoerythrobilin (PEB) mit PecA. Absorptionsspektren nach 0 min (—) und 90 min (- - -); Inset: Differenzspektrum 90 min *minus* 0 min; His₆-PecA (10 μ M), PEB (8 μ M), MnCl₂ (1,5 mM).

Das Rekonstitutionsprodukt zeigt zwei Absorptionsmaxima bei 308 und 574 nm. Zudem sind drei Schultern bei 498, 540 und 603 nm zu erkennen. Im Differenzspektrum der Reaktion zeigen sich zwei Minima bei 328 und bei 600 nm sowie zwei Maxima bei 308 und 574 nm. Die Maxima bei 540 und 574 nm können dem PEB-Addukt, und die Schulter bei 495 nm dem PUB-Addukt zugeordnet werden (Fairchild *et al.* 1994). Die Schulter bei 603 nm wurde von Storf und Fairchild *et al.* (Fairchild *et al.* 1994, Storf 2003) dem 15,16-Dihydrobiliverdin zugeordnet, das gegenüber dem PEB ein um eine Doppelbindung verlängertes, konjugiertes π -Elektronensystem besitzt. Im Differenzspektrum der Reaktion sind Absorptionsabnahmen bei 328 und 603 nm zu erkennen, während es zu einer Zunahme der Absorptionen bei 308 und 574 nm kommt. Dies deutet darauf hin, dass die Additionsreaktion des Chromophors über ein Intermediat erfolgt, das im Vergleich zum Produkt längerwellig absorbiert. Die chemische Natur dieses Intermediats wurde bei der autokatalytischen Addition nicht untersucht. Darauf wird im folgenden Kapitel eingegangen, in dem die PecE-katalysierte PEB-Adduktbildung betrachtet wird.

3.3.3.2 PecE-katalysierte Bindung von PEB an PecA

Die PecE-katalysierte PEB-Adduktbildung ist nach ca. 50 min abgeschlossen (Abbildung 3-38) und damit schneller als die autokatalytische Rekonstitution mit PEB. Im Vergleich mit der PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung ist die PecE-katalysierte PEB-Adduktbildung um den Faktor 2-3 langsamer. Dadurch läßt sich die Reaktion absorptionsspektroskopisch gut verfolgen und mit den Ergebnissen der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie zur PecE-katalysierten PCB-Adduktbildung vergleichen.

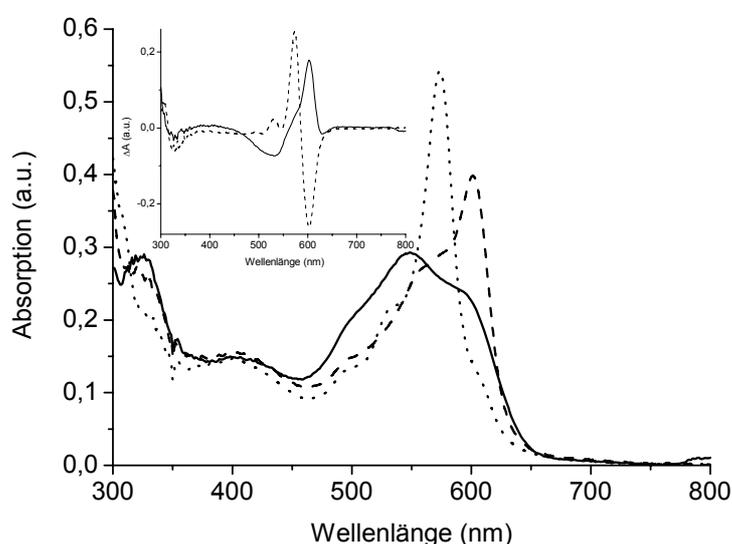


Abbildung 3-38: PecE-katalysierte Reaktion von Phycoerythrobilin (PEB) mit PecA. Absorptionsspektren direkt nach dem Mischen von PEB mit MnCl₂ und PecE (—, A), direkt nach Zugabe von PecA (- - -, B), sowie nach 50 min (....., C); Inset: Differenzspektren B *minus* A (—), C *minus* B (- - -); His₆-PecA (10 μM), His₆-PecE (10 μM), PEB (8 μM), MnCl₂ (1,5 mM).

Direkt nach Zugabe des Apoproteins zum Gemisch aus His₆-PecE, PEB und MnCl₂ erfolgt im Gegensatz zur nicht katalysierten PEB-Addition eine starke Zunahme der Absorption bei 603 nm, die im weiteren Verlauf der Reaktion kontinuierlich zurückgeht. Diese starke Zunahme der Absorption bei 603 nm ist auch im Differenzspektrum gut zu erkennen. Mit der kontinuierlichen Abnahme der Absorption bei 603 nm geht eine Zunahme der Absorption bei 574 nm einher, die dem PEB-Addukt zugeordnet wird. Dieser Übergang aus der 603 nm absorbierenden Form in die bei 574 nm absorbierende Form ist im

Differenzspektrum deutlich zu sehen. Das bei der autokatalytischen Bindung von PEB an PecA auftretende, mögliche Intermediat mit einer Absorption bei 603 nm tritt bei der PecE-katalysierten Bindung klar hervor. Das Absorptionsverhalten des Intermediats kann durch zwei unterschiedliche Strukturen erklärt werden. Die erste mögliche Struktur besteht in der Bildung eines langwellig absorbierenden Chromophors, der mindestens eine Doppelbindung mehr besitzt, als der PEB-Chromophor (Fairchild *et al.* 1994, Storf 2003). Die zweite Möglichkeit wäre eine Protonierung des Chromophors, die zu einem batho- und hyperchromen Effekt führt (Falk 1989). Um die Natur dieses Intermediats näher zu charakterisieren, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der PecE-katalysierten PEB-Addition die Probe in 8 M Harnstoff denaturiert und angesäuert (Abbildung 3-39).

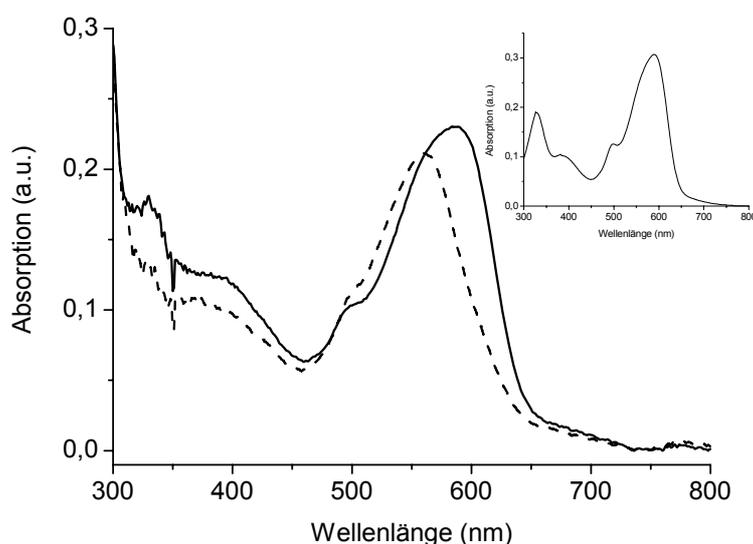


Abbildung 3-39: Absorptionsspektren des denaturierten Intermediats (λ_{max} 603 nm) und Produkts (λ_{max} 574 nm) aus der PecE-katalysierten PEB-Addition.

Intermediat (—) und Produkt (- - -), jeweils in 8 M Harnstoff/2% HCl (v/v). Inset: PEB in Tris-Puffer (1 M, 2% HCl v/v).

Das Intermediat (P603) zeigt in denaturierender, saurer Umgebung ein Absorptionsmaximum bei 588 nm, während das PEB-Addukt (λ_{max} 574 nm) unter diesen Bedingungen ein Maximum bei 561 nm aufweist. Der freie PEB-Chromophor zeigt in saurer Umgebung ein Maximum bei 586 nm. Die Form des Spektrums stimmt dabei mit der des Intermediats (P603) überein. Demnach handelt es sich bei dem Intermediat (P603) um den freien PEB-Chromophor, der mit dem Apoprotein

interagiert und dadurch protoniert wird, aber noch nicht kovalent gebunden vorliegt. Eine Protonierung des Chromophors durch einen internen Protonendonator wird auch im Zusammenhang mit der Chromophorbindung beim Phytochrom diskutiert (Li *et al.* 1995, Borucki *et al.* 2003). Tabelle 3-10 fasst die beobachteten Absorptionen der einzelnen Spezies zusammen.

Tabelle 3-10: Vergleich der absorptionspektroskopischen Daten der bei der Addition von PEB an PecA auftretenden Spezies.

	Absorption (nm)	
	Trispuffer	denaturiert/H ⁺
PEB	328, 555, 590	328, 495, 588
P603	330, 603	328, 495 ^s , 588
PEB-Addukt	308, 574	330, 495 ^s , 560

^s Schulter

Arciero *et al.* (Arciero *et al.* 1988c) rekonstituierten in einem autokatalysierten Prozess Apophycocyanin mit PEB und erhielten ein PEB-Addukt mit einer Absorption bei 574 nm sowie ein weiteres Addukt, das bei 605 nm absorbiert. HPLC-Trennungen des verwendeten PEB zeigten zwei Fraktionen im Verhältnis 80:20, die separat in Rekonstitutionsexperimenten eingesetzt wurden. Die Rekonstitutionsaddukte mit diesen beiden PEB-Fraktionen zeigten die selben Absorptionscharakteristika. Bei diesen beiden PEB-Fraktionen aus der HPLC-Trennung soll es sich um 10-*E/Z*-Isomere handeln. Bereits Fu *et al.* (Fu *et al.* 1979) charakterisierten mittels HPLC und Massenspektroskopie PEB und PCB aus methanolischer Extraktion. Dabei stellten sie fest, dass die HPLC-Trennung zu jeweils zwei Fraktionen im Verhältnis von ca. 80:20 führten, die sich in ihrer jeweiligen Massen nicht unterschieden. Sie schlugen deshalb 10-*E/Z*-Isomere der Verbindungen in Lösung vor, die sich durch intramolekulare Wechselwirkungen stabilisieren (Abbildung 3-40).

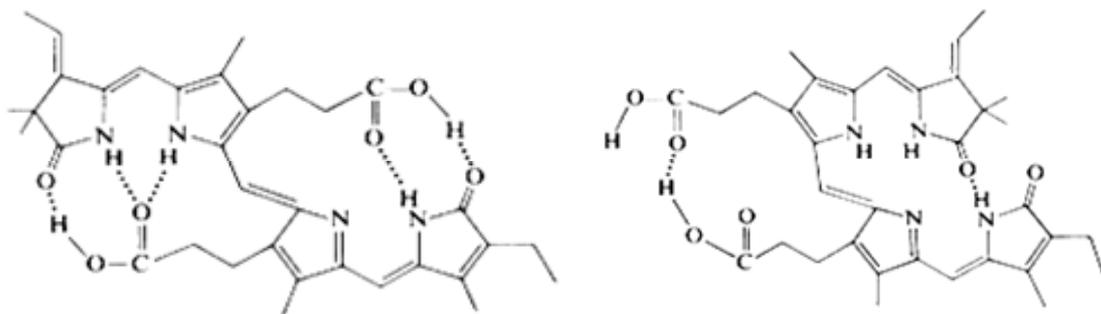


Abbildung 3-40: 10-*E/Z*-Isomere am Beispiel von PCB.

E-Isomer (links), *Z*-Isomer (rechts). Die Stabilisierung der Isomere erfolgt durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken (aus: (Fu *et al.* 1979)).

Theoretisch betrachtet dürfte in Lösung das 10-*E*-Isomer durch die höhere Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen stabiler sein und somit der Hauptfraktion bei der HPLC-Trennung entsprechen. Hingegen dürfte die Affinität des 10-*Z*-Isomers durch die bessere Exposition der Propionsäureketten sowie seiner geometrischen Struktur, die eine Protonierung der Pyrrolstickstoffe der Ringe B und C durch einen Donor des Apoproteins erleichtert, zu PecA größer sein. Deswegen sollte das 10-*Z*-Isomer bei der Adduktbildung bevorzugt abreagieren.

3.3.3.3 PecE/F-katalysierte Bindung von PEB an PecA

Die PecE/F-katalysierte Addition von PEB an PecA wurde in An- und Abwesenheit von Triton X-100 sowie von $MnCl_2$ durchgeführt. $MnCl_2$ besitzt weder Einfluss auf die entstehenden Produkte noch auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Somit hat Mn^{2+} keine Bedeutung bei der PecE/F-katalysierten PEB-Adduktbildung. Abbildung 3-41 zeigt die PecE/F-katalysierten Rekonstitutionen von PecA mit PEB in An- und Abwesenheit von Triton X-100.

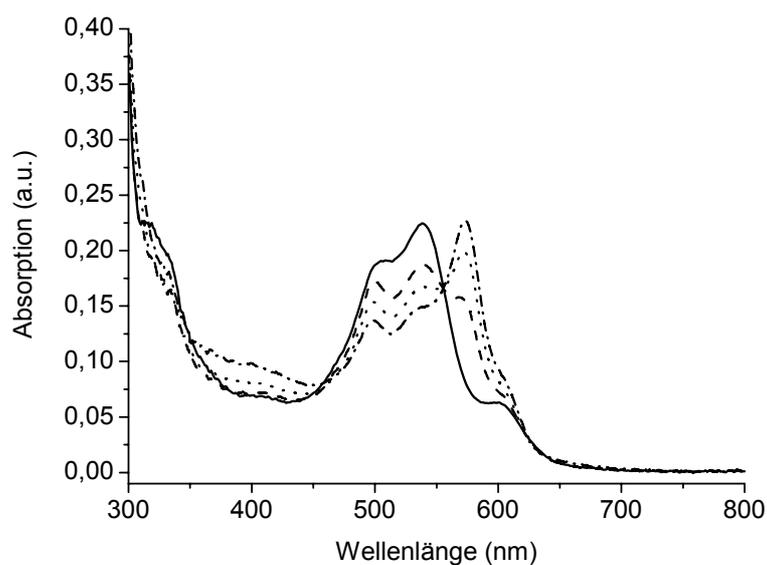
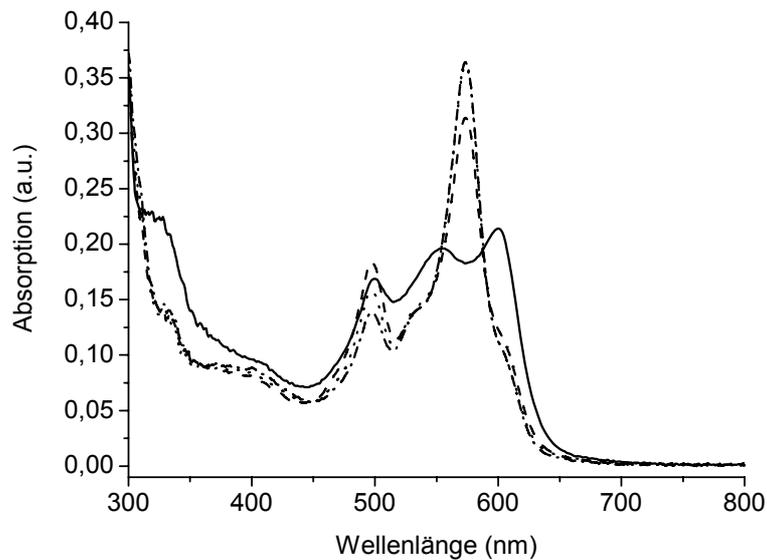


Abbildung 3-41: PecE/F-katalysierte Adduktbildung von PEB mit PecA in Abwesenheit (oben) und Gegenwart (unten) von Triton X-100.

Absorptionsspektren nach 0 min (—), 45 min (---), 120 min (····) und 300 min (----); His₆-PecA (10 μM), His₆-PecE (10 μM), His₆-PecF (25 μM), PEB (8 μM), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,75% v/v).

In Abwesenheit des Detergens zeigt der Rekonstitutionsansatz direkt nach dem Mischen aller Komponenten drei Absorptionsmaxima im roten Wellenlängenbereich bei 498, 555 und 602 nm. Damit unterscheidet sich dieses Spektrum sehr deutlich

von einem PEB-Spektrum im Puffer (Abbildung 3-36). Dies deutet auf eine Interaktion zwischen dem Chromophor und den PecF-haltigen Komplex hin. Im Verlauf der Rekonstitution nimmt das Maximum bei 602 nm ab, während es zur Verstärkung der Absorption bei 498 nm kommt. Gleichzeitig bildet sich ein neues Maximum bei 574 nm. Schließlich kommt es zu einer Abnahme der Absorption bei 498 nm während die Absorption bei 574 nm nur noch marginal zunimmt.

Ähnliche Effekte sind bei der Rekonstitution in Gegenwart von Triton X-100 zu beobachten. Zu Beginn der Reaktion zeigt das Absorptionsspektrum drei Maxima bei 500, 540 und 602 nm. Das entspricht im Wesentlichen der PEB-Absorption unter Einfluss des Detergens, lediglich die Absorption bei 500 nm wird durch das Detergenz prominenter (Abbildung 3-36). Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Absorption bei 500 nm, während die Absorption bei 574 nm zunimmt.

Die Absorptionen bei 498 nm und 574 nm können dem Urobilin- bzw. dem PEB-Addukt zugeordnet werden (Fairchild *et al.* 1994). Im Gegensatz zu Storf und Arciero *et al.* (Arciero *et al.* 1988c, Storf 2003) kann die Absorption bei 603 nm nicht dem 15,16-Dihydrobiliverdin (DBV) zugeordnet werden, da in Kapitel 3.3.3.2 gezeigt wurde, dass es sich hierbei um den freien, protonierten PEB-Chromophor handelt. Arciero *et al.* konnten die Signale der 2-, 3-Protonen in den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der DBV-Peptide im kritischen Bereich aufgrund von Überlappungen nicht eindeutig zuordnen. Deswegen wird in dieser Arbeit die Absorption bei 603 nm dem protonierten PEB-Chromophor zugeordnet, der zwar mit den Proteinen interagiert aber noch nicht kovalent gebunden wurde. Bei der PecE/F-katalysierten Reaktion mit PEB kommt es bereits innerhalb von wenigen Sekunden zur PUB-Adduktbildung mit einem Maximum bei 498 nm. Dadurch wird die $\Delta 4,5$ -Doppelbindung nach $\Delta 2,3$ umgelagert. Die schnelle PUB-Adduktbildung überrascht, da die analoge Reaktion, die Isomerisierung von PCB zu PVB, vergleichsweise langsam verläuft. Die Ursache für die unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten kann in der geometrischen Struktur der Chromophore liegen. PCB liegt in Lösung bedingt durch das planare, über alle vier Pyrrolringe konjugierte π -System, überwiegend in helicaler Form vor (Knipp *et al.* 1998). Hingegen kann die Struktur von PEB aufgrund der freien Drehbarkeit des Ringes D stärker von der planaren Geometrie abweichen. Dies könnte der Grund für die rasche PUB-Bildung sein, da unter *in vivo*-Bedingungen anzunehmen ist, dass Chromophore stets proteinassoziiert vorliegen und somit von

der Struktur in Lösung bei *in vitro*-Experimenten abweichen. Möglicherweise entspricht die Konformation des PEB eher solch einer proteinassoziierten Struktur und wird dadurch von PecE/F sofort als Substrat erkannt. Der Anteil an PUB nimmt jedoch im Verlauf der Reaktion kontinuierlich ab, während der PEB-Adduktanteil zunimmt. Tabelle 3-11 zeigt das Verhältnis der 574/498 nm-Absorption im zeitlichen Verlauf für die PecE/F-katalysierte Reaktion von PEB mit PecA in Abhängigkeit von Triton X-100.

Tabelle 3-11: Relatives Verhältnis der 574/498 nm-Absorption in Abhängigkeit von Triton X-100 im zeitlichen Verlauf der PecE/F-katalysierten Reaktion von PEB mit PecA.

	45 min	120 min	300 min
- Triton X-100	1,71	2,28	2,62
+ Triton X-100	0,89	1,30	1,66

Es zeigt sich, dass Triton X-100 die PUB-Adduktbildung fördert, da das 574/498 nm-Verhältnis in Gegenwart von Triton X-100 kleiner ist als in Abwesenheit des Detergens. Aus den Absorptionsspektren in Abbildung 3-41 geht hervor, dass im Verlauf der Reaktion die absolute Menge an PUB abnimmt. Mögliche Ursache für diesen Rückgang des PUB-Anteils kann eine unzureichende Interaktion zwischen dem gebundenen PUB und dem PecA sein. Dadurch liegt der Ring A nicht ausreichend geschützt in der Tasche des Proteins, sodass eine Reduktion der Δ 2,3-Doppelbindung (durch PecF in einer reversiblen Reaktion?) möglich ist, wodurch es zur Umwandlung des PUB-Addukts in das PEB-Addukt kommt. Eine reversible Photochemie der Addukte aus der PEB-Addition an PecA kann aufgrund der fehlenden Δ 15,16-Doppelbindung weder bei PUB noch bei PEB beobachtet werden.

Zusammenfassende Diskussion:

PEB kann autokatalytisch wie auch durch die Lyase PecE/F an PecA gebunden werden. Dabei wird hauptsächlich das PEB-Addukt gebildet. Bei der autokatalytischen und PecE-katalysierten PEB-Adduktbildung konnte absorptionsspektroskopisch ein rotabsorbierendes Intermediat (P603) der Reaktion detektiert werden. Denaturierungsexperimente zeigten, dass es sich bei diesem Intermediat um einen protonierten PEB-Chromophor handelt, der nicht kovalent an das Apoprotein gebunden ist. Damit scheint neben der Interaktion zwischen den

Propionsäureseitenketten und dem Apoprotein eine Protonierung des Chromophors durch einen internen Protonendonator der Ausbildung der Thioetherbindung vorauszu gehen.

Durch PecF ist eine Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung nach $\Delta 2,3$ beim PEB möglich, wodurch das PUB-Addukt entsteht. Dieses PUB-Addukt zeigt eine geringe Stabilität im Rekonstitutionsansatz, die möglicherweise auf eine nicht korrekte Protein-Chromophorwechselwirkung zurückzuführen ist. α -PEC zeigt in seiner Kristallstruktur eine planare Ausrichtung des Tryptophans 128 zum Ring A des PVB, die zu einer elektronischen Interaktion führt und im Phycocyanin fehlt. (Düring *et al.* 1990). Durch eine fehlende stabilisierende Interaktion des Tryptophans 128 mit dem Ring A des PUB kann die $\Delta 2,3$ -Doppelbindung reduziert werden und es entsteht ein 2,3,4,5-Tetrahydro-PEB-Chromophor. Ein Hinweis auf einen 2,3,4,5-Tetrahydro-PEB-Chromophor könnte die Absorption bei 420 nm sein, die Storf bei der Rekonstitution von PecA mit PEB-DME gefunden hat (Storf 2003). Die planare Struktur des Chromophors, bedingt durch die Methinbrücken, scheint ein wichtiger Faktor bei der Erkennungsreaktion zwischen dem Chromophor und der Lyase-Untereinheit PecF zu sein. Versuche zur Rekonstitution von PecA mit Phytochromobilin (P Φ B), das sich vom PEB formal nur durch die Methinbrücke zwischen den Ringen C und D unterscheidet, zeigen, dass P Φ B im Gegensatz zu PEB unter PecE/F-Katalyse zum entsprechenden $\Delta 2,3$ -(4,5-Dihydro)-P Φ B-Chromophor (18-Vinyl-PVB) umgelagert werden kann (Storf *et al.* 2001, Storf 2003).

Die rasche PUB-Adduktbildung im Vergleich zur langsamen PVB-Adduktbildung zeigt, dass die geometrische Struktur des Chromophors die Geschwindigkeit der PecE/F-Katalyse beeinflusst.

3.3.4 Rekonstitution von PecA mit Thia-Phycocyanobilin (S-PCB)

Thia-Phycocyanobilin (S-PCB) wurde als mögliches Substrat für die Bindung an PecA getestet. Das Pigment wurde von Christian Bongards (Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mühlheim an der Ruhr) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Bei diesem Thia-Analogon zu PCB wurde der Pyrrolstickstoff im Ring D mit Schwefel substituiert und die Ethylfunktion an C18 wurde durch eine Methylgruppe

ersetzt. Das im sp^2 -hybridisierten Orbital des Schwefels befindliche freie Elektronenpaar kann nicht am π -Elektronensystem des Tetrapyrrols teilnehmen, da es orthogonal zu den Orbitalen steht, die das konjugierte π -System ausbilden.

In Abbildung 3-42 sind die Absorptionsspektren von S-PCB (Abbildung 3-15) in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt. Tabelle 3-12 listet die daraus abgeleiteten Spektraldaten von S-PCB im Vergleich mit PCB auf.

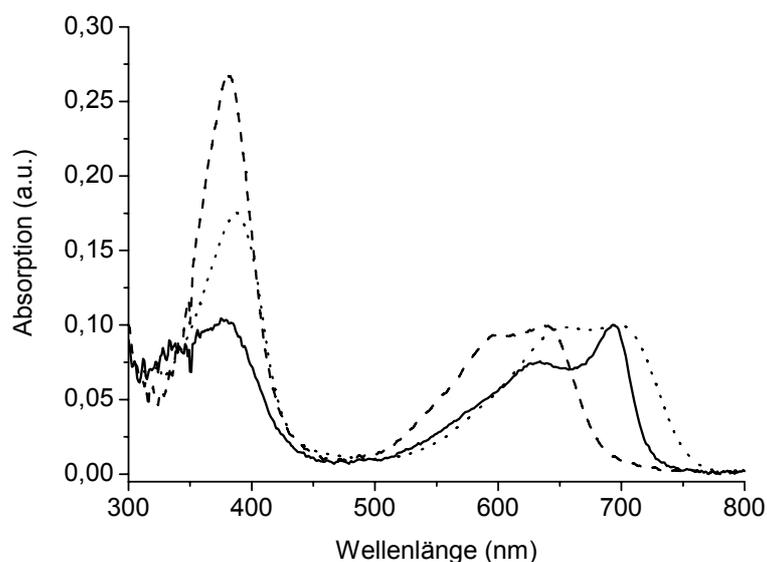


Abbildung 3-42: Absorptionsspektren von Thia-Phycocyanobilin (S-PCB) in verschiedenen Lösungsmitteln.

MeOH/2% HCl (····), Trispuffer (1 M, pH 6.0) (—), Trispuffer (1 M, 0.8% Triton X-100, pH 6.0) (- - -).

Tabelle 3-12: Vergleich der UV/VIS-Eigenschaften von PCB und S-PCB in verschiedenen Lösungsmitteln. $\lambda_{\max}^{UV} / \lambda_{\max}^{VIS}$ (nm) [Q_{UV}^{VIS}]

	MeOH/2% HCl	Trispuffer ^{a, c}	Trispuffer/Triton X-100 ^{b, c}
PCB	375/690 [0,77]	365/625 [0,34]	365/598 [0,38]
S-PCB	387/655, 697 [0,66]	380/634, 698 [0,97]	380/595, 635 [0,37]

^a Trispuffer (1 M, pH 6.0), ^b Trispuffer (1 M, 0.8% Triton X-100, pH 6.0), ^c Die Pigmente wurden in DMSO angelöst; max. DMSO-Konzentration: 0,5%.

S-PCB weist in saurer methanolischer Lösung im roten Wellenlängenbereich zwei Absorptionsmaxima bei 655 und 697 nm auf, hingegen zeigt PCB im selben

Lösungsmittel nur ein Maximum bei 690 nm. Das Verhältnis der lang- zu kurzwelliger Absorption (Q_{UV}^{VIS} -Verhältnis) unterscheidet sich nicht wesentlich. Wird S-PCB im Trispuffer-System gelöst, zeigen sich drei Absorptionsmaxima bei 380, 634 und 698 nm (PCB: 365, 625 nm), wobei das langwelligere Maximum eine höhere Intensität aufweist. Der Q_{UV}^{VIS} -Wert liegt bei 0,97 und ist somit fast dreimal so hoch wie beim PCB. In Anwesenheit des Detergens Triton X-100 kommt es bei beiden Pigmenten zu einer hypsochromen Verschiebung der Maxima im roten Wellenlängenbereich mit einer Angleichung der Q_{UV}^{VIS} -Werte. Im Falle des S-PCB nimmt die Intensität des langwelligeren roten Absorptionsmaximums stark ab.

Die Substitution des Stickstoffs im Ring D durch Schwefel führt zu einem geänderten spektralen Verhalten im Vergleich mit PCB. Der Austausch der Ethyl- gegen eine Methylgruppe an C18 dürfte keinen Einfluss auf das Absorptionsverhalten haben. Im Gegensatz zum Pyrrolring des PCB besitzt der Thiophenring des S-PCB keine basischen Eigenschaften und kann nicht protoniert werden. Das Auftreten von zwei Absorptionsbanden im roten Wellenlängenbereich könnte darauf zurückgeführt werden, dass zwei Formen des S-PCB vorliegen. Möglicherweise ist die langwellig absorbierende Form der protonierte Chromophor.

S-PCB wurde in verschiedenen Rekonstitutionsexperimenten eingesetzt, um anschließend die Produkte der Adduktbildung mit denen der PCB-Adduktbildungen zu vergleichen. Dabei ist von Interesse, welche Rolle der Schwefel auf das Rekonstitutionsverhalten ausübt und ob ein Addukt entsteht, das wie das PVB-Addukt eine reversible Photochemie aufweist.

3.3.4.1 Autokatalytische Bindung von S-PCB an PecA

Die autokatalytische Adduktbildung von S-PCB mit PecA erfolgte im Trispuffer-System und unter Zusatz von $MnCl_2$. Abbildung 3-43 zeigt den spektralen Verlauf der autokatalytischen Rekonstitution und das Absorptionsspektrum des affinitätschromatographisch gereinigten S-PCB-PecA-Addukts.

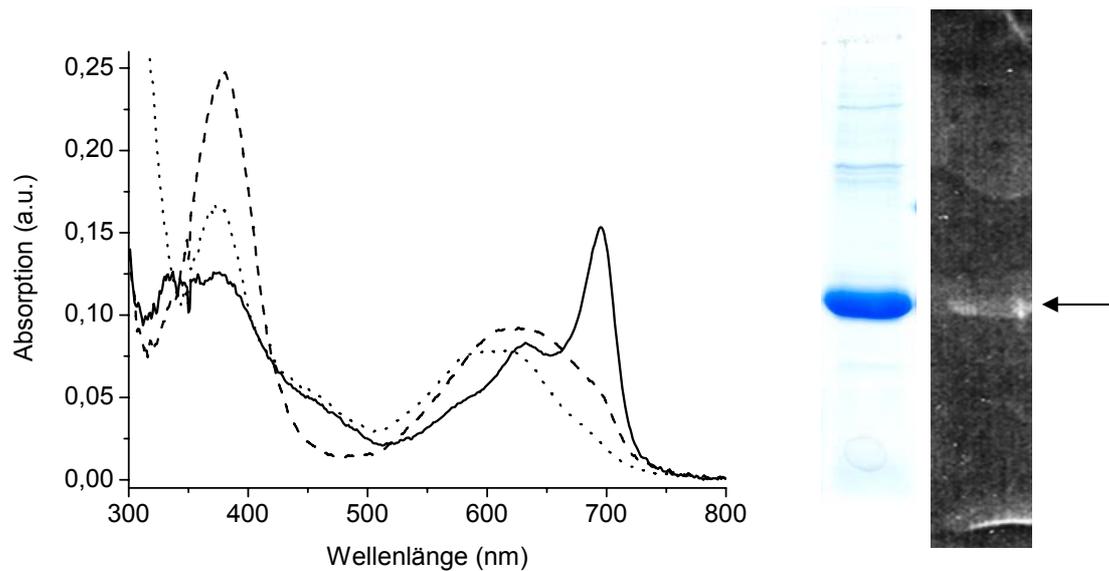


Abbildung 3-43: Autokatalytische Rekonstitution von PecA mit S-PecA.

Links: Absorptionsspektren nach 0 h (—), 3 h Inkubation bei 37 °C (---) und affinitätschromatographisch gereinigt (····), **rechts:** SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und Zn^{2+} -induzierter Fluoreszenz; der Pfeil zeigt das PecA/Rekonstitutionsprodukt an; PecA (15 μmol), $MnCl_2$ (1,5 mM); SDS-PAGE im Bereich von 67 bis 14 kDa.

Das Endprodukt der autokatalytischen Rekonstitution zeigt ein breites Absorptionsmaximum im Bereich um 600 nm. Die Zn^{2+} -induzierte Fluoreszenzfärbung der SDS-PAGE zeigt nur ein schwaches Signal. Demnach konnte PecA in einem autokatalytischen Prozess S-PCB binden, allerdings nur in geringem Ausmaß. Der gebundene Chromophor dürfte aufgrund des geringen Q_{UV}^{VIS} -Werts von 0,48 und der breiten Absorptionsbande im roten Wellenlängenbereich eine zyklisch-helicale Struktur besitzen. Belichtungen mit Licht verschiedener Wellenlängen führten nicht zur Induktion einer Photochemie. Die deutliche Schulter bei 450 nm kann auf einen bilirubin-ähnlichen Chromophor hindeuten.

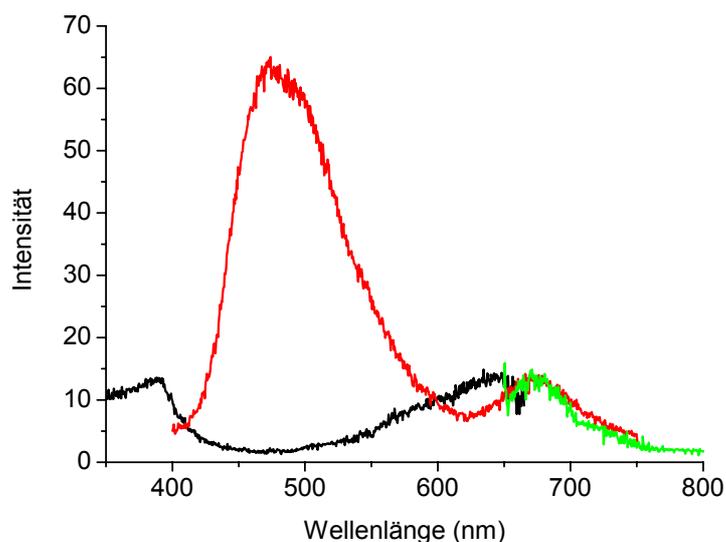


Abbildung 3-44: Fluoreszenzspektren des affinitätschromatographisch gereinigten Produkts aus der autokatalytischen Rekonstitution von S-PCB mit PecA.

Emissionsspektren nach Anregungen bei 390 nm (—) und 645 nm (—), Excitationspektrum mit Emission bei 670 nm (—).

Das S-PCB-PecA-Addukt zeigt nach Anregung bei 645 nm eine schwache Fluoreszenzemission bei 670 nm. Die geringe Fluoreszenzemission kann u. U. auf fehlende Chromophor-Protein-Interaktionen zurückgeführt werden, wodurch die aufgenommene Lichtenergie in Form von Wärme abgegeben wird. Wird zur Anregung in die kurzwellige Absorptionsbande bei 390 nm eingestrahlt, zeigt sich neben der Emission bei 670 nm ein starkes Signal bei 475 nm. Die Emission bei 475 nm kann auf einen bilirubinähnlichen Chromophor hinweisen, der durch die Bindung von Cystein an C10 des Chromophors entsteht.

3.3.4.2 PecE-katalysierte Bindung von S-PCB an PecA

Die autokatalytische Bindung von S-PCB an PecA zeigt nur geringe Produktausbeuten. Durch Zugabe von PecE soll nun das Rekonstitutionsverhalten untersucht werden. Abbildung 3-45 zeigt den spektralen Verlauf der Rekonstitution.

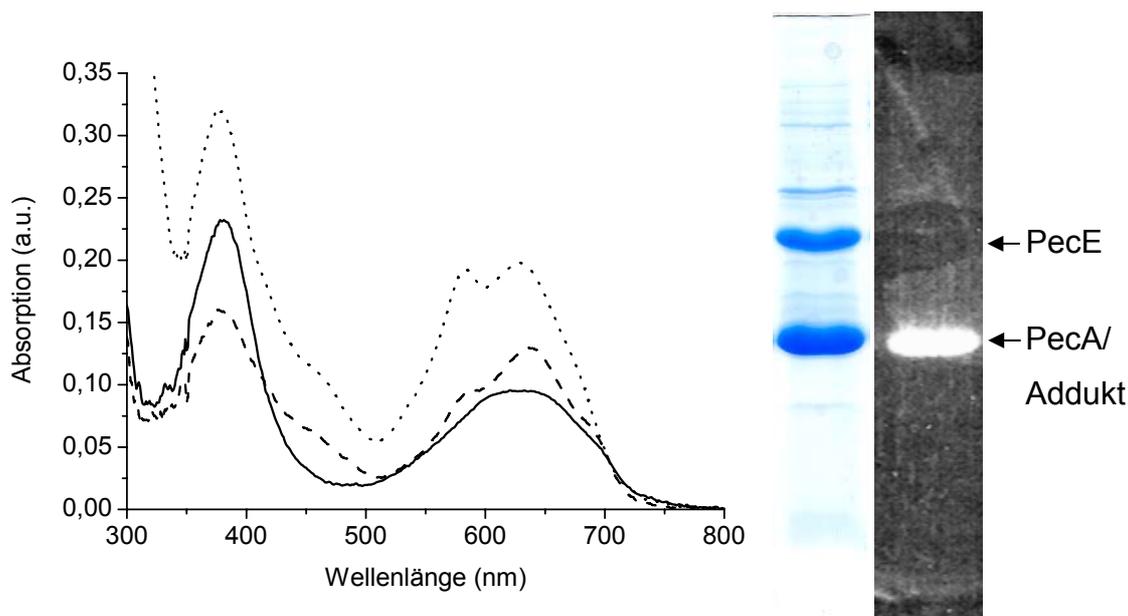


Abbildung 3-45: PecE-katalysierte Rekonstitution von PecA mit S-PecA.

Links: Absorptionsspektren nach 0 h (—), 3 h Inkubation bei 37 °C (- - -) und affinitätschromatographisch gereinigt (····); **rechts:** SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und Zn^{2+} -induzierter Fluoreszenz; PecA (15 μmol), PecE (15 μmol), $MnCl_2$ (1,5 mM); SDS-PAGE im Bereich von 67 bis 14 kDa.

Im Gegensatz zur autokatalytischen Addition zeigt das 0 h-Spektrum ein breites Absorptionsmaximum um 630 nm mit einer kleinen Schulter bei 698 nm. Im Verlauf der Reaktion bilden sich zwei Maxima bei 584 und 634 nm. Die Ausbildung einer Schulter im Bereich von 450 nm ist deutlich zu erkennen. Das affinitätschromatographisch gereinigte Additionsprodukt weist ebenfalls zwei Maxima bei 584 und 628 nm auf. In der Zn^{2+} -induzierten Fluoreszenz der SDS-PAGE ist ein deutliches Signal für das Rekonstitutionsprodukt zu erkennen. Der Q_{UV}^{VIS} -Wert mit 0,61 deutet eine zyklisch-helicale Form des gebundenen Chromophors an.

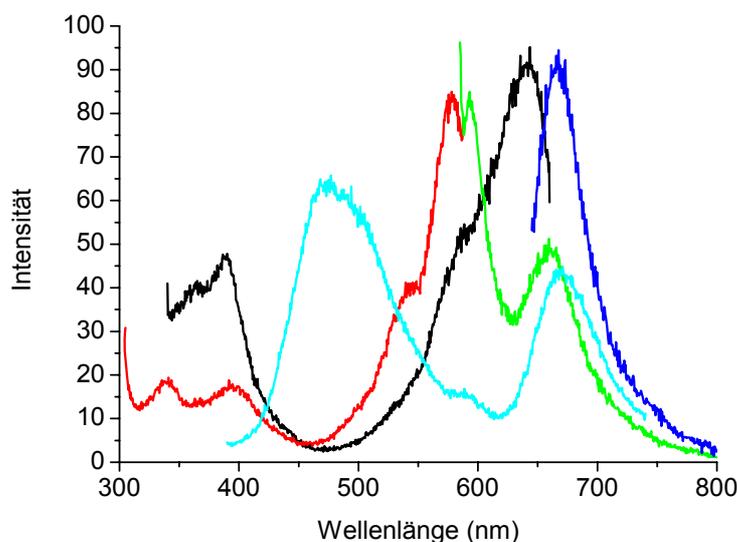


Abbildung 3-46: Fluoreszenzspektren des affinätschromatographisch gereinigten Produkts aus der PecE-katalysierten Rekonstitution von S-PCB mit PecA.

Emissionsspektren nach Anregungen bei 380 nm (—), 580 nm (—) und 640 nm (—), Excitationspektrum mit Emission bei 665 nm (—), Excitationspektrum mit Emission bei 594 nm (—).

Die Fluoreszenzspektren der PecE-katalysierten Addition zeigen eine größere Komplexität als die Fluoreszenzspektren der autokatalytischen Addition. Durch Anregung bei 580 nm lassen sich Emissionen bei 594 und 660 nm induzieren, während nach Anregung bei 640 nm eine Emission bei 668 nm auftritt. Excitation bei 380 nm zeigt neben der breiten Emission bei 475 nm eine schwache Emission bei 594 nm und ein deutliches Signal bei 668 nm. Das Excitationspektrum der 475 nm-Emission zeigt ein breites Signal zwischen 360 und 440 nm (nicht gezeigt).

Aus den Absorption- und Fluoreszenzspektren lassen sich drei Additionsprodukte aus der PecE-katalysierten Reaktion ableiten. Im Gegensatz zur PecE-katalysierten Rekonstitution mit PCB entsteht ein bilirubinähnlicher Chromophor sowie zwei weitere Addukte, deren Strukturen nicht geklärt werden konnten. Möglicherweise handelt es sich dabei um das S-PCB-Addukt (λ_{\max} 628 nm) und um ein weiteres photochemisch inaktives S-PCB-Addukt (λ_{\max} 584 nm).

3.3.4.3 PecE/F-katalysierte Bindung von S-PCB an PecA

Die PecE/F-katalysierte Rekonstitution von PecA mit S-PCB erfolgte im Trispuffer. Dabei zeigte sich ein deutlicher Unterschied zur Rekonstitution mit PCB. Während die PVB-Adduktbildung durch Triton X-100 gefördert wird, besitzt Triton X-100 bei der analogen PecE/F-katalysierten Adduktbildung mit S-PCB einen hemmenden Effekt, der evtl. durch die Generierung unterschiedlicher Konformerenpopulationen entsteht.

Abbildung 3-47 und Abbildung 3-50 zeigen die PecE/F-katalysierten Adduktbildungen in Ab- und Anwesenheit des Detergens Triton X-100.

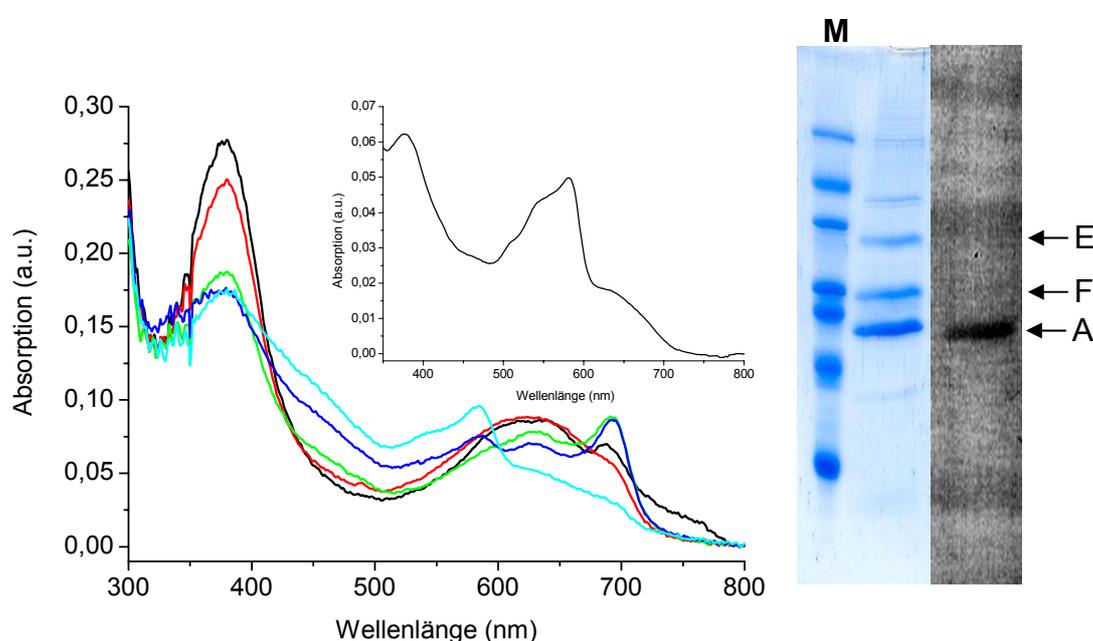


Abbildung 3-47: PecE/F-katalysierte Rekonstitution von PecA mit S-PecA in Abwesenheit von Triton X-100.

Absorptionsspektren (links) nach 0 min (—), 10 min (—), 40 min (—), 120 min (—) und 360 min (—) bei 37 °C. Inset: Rekonstitutionsprodukt nach affinitätschromatographischer Reinigung; SDS-PAGE (rechts) mit Coomassie-Färbung und Zn^{2+} -induzierter Fluoreszenz, E: His₆-PecE, F: His₆-PecF, A: His₆-PecA/S-PCB-Addukt, M: Marker (67, 45, 29, 24, 20, 14 kDa); PecA (15 μ mol), PecE (10 μ mol), PecF (15 μ mol), $MnCl_2$ (1,5 mM), 2-Mercaptoethanol (5 mM).

Der Rekonstitutionsverlauf in Abwesenheit von Triton X-100 zeigt direkt nach dem Start der Reaktion ein breites Absorptionsmaximum im Bereich von 590 bis 670 nm mit einem weiteren Maximum bei 695 nm. In den ersten 10 Minuten nimmt das Maximum bei 695 nm ab, verstärkt sich aber im weiteren Verlauf der Reaktion. Nach

120 Minuten zeigen sich drei Absorptionsmaxima bei 582, 630 und 595 nm. Das Maximum bei 583 nm nimmt im weiteren Verlauf an Intensität zu, während die beiden anderen Maxima nur noch als Schultern im Absorptionsspektrum zu erkennen sind. Das affinitätschromatographisch gereinigte Chromoprotein weist im roten Wellenlängenbereich ein Maximum bei 582 nm sowie zwei Schultern bei 505 und 540 nm auf.

In der Zn^{2+} -induzierten Fluoreszenzfärbung der SDS-PAGE ist ein deutliches Signal für das S-PCB-PecA-Addukt zu erkennen, das die kovalente Bindung des S-PCB an His₆-PecA belegt.

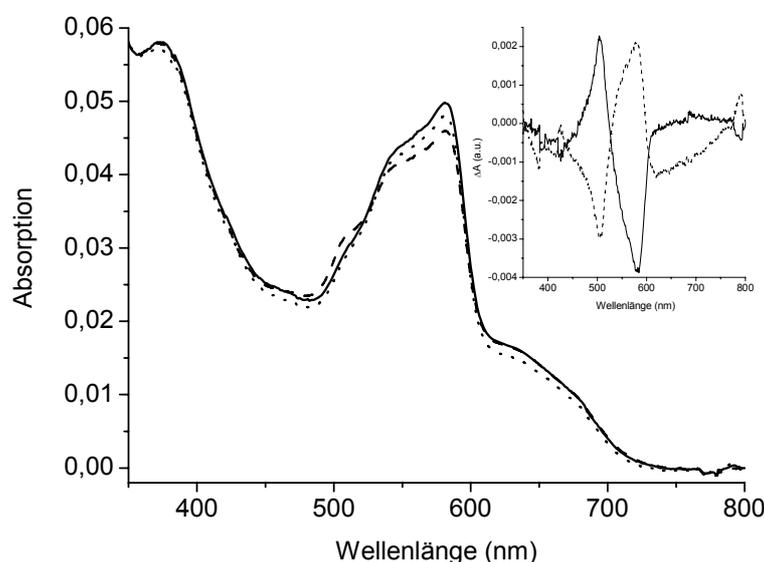


Abbildung 3-48: Reversible Photochemie des S-PCB-PecA-Addukts.

Absorptionsspektren nach Belichtung mit 505 nm-Licht (—,⋯) und 576 nm-Licht (- - -); Inset: Differenzspektren der Belichtungen 576 nm *minus* 505 nm (—), 505 nm *minus* 576 nm (⋯).

Durch Belichtung mit Licht der Wellenlängen 505 und 576 nm lässt sich eine reversible Photochemie induzieren, die der Photochemie von α -PEC ähnelt. Die *E*-Form des S-PCB-Addukts weist ein Absorptionsmaximum bei 505 nm auf, während die *Z*-Form ein Maximum bei 582 nm besitzt. Damit ist das Maximum der *Z*-Form im Vergleich mit der *Z*-Form des α -PEC um 14 nm bathochrom verschoben. Der $\Delta\Delta A$ -Wert beträgt ca. 15% und liegt somit weit unter dem $\Delta\Delta A$ -Wert von α -PEC, der beim rekonstituierten His₆- α -PEC Werte zwischen 100 und 110% erreicht (Storf 2003). Hingegen zeigt die Rekonstitution des Apo-Phytochroms (Gerste) mit S-PCB keine

charakteristische Photochemie, es zeigt sich nur ein Absorptionsmaximum bei 628 nm (persönl. Mitteilung Prof. W. Gärtner, MPI Mülheim an der Ruhr).

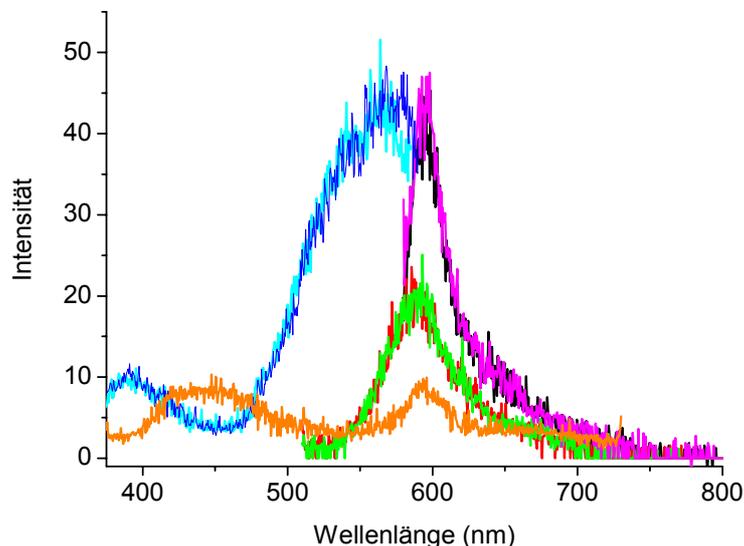


Abbildung 3-49: Fluoreszenzspektren des S-PCB-Addukts aus der Rekonstitution von PecA mit PecE/F in Abwesenheit von Triton X-100.

Emissionsspektren nach Excitationen bei 505 nm (—^a) (—^b), 576 nm (—^a) (—^b) und 390 nm (—). Excitationsspektren mit Emission bei 590 nm (—) und 595 nm (—). Vor der Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte eine sättigende Belichtung der Probe mit ^a 505 nm- bzw. ^b 576 nm-Licht.

Die Fluoreszenzspektren zeigen zwei Emissionsmaxima bei 588 nm und 595 nm, nach Excitation bei 505 bzw. 576 nm. Die Excitationsspektren für die beiden Emissionsmaxima zeigen kaum Unterschiede. Demnach ist die Z-Form des S-PCB-PecA-Addukts die emittierende Spezies, während die E-Form keine Fluoreszenzemission besitzt. Die leichte Verschiebung der Emissionsmaxima kann auf eine Selbstabschattung der Z-Form zurückgeführt werden. Damit zeigt das photochemisch aktive S-PCB-Addukt das gleiche Fluoreszenzverhalten wie α -PEC, bei dem ebenfalls nur die Z-Form die emittierende Spezies ist (Maruthi Sai *et al.* 1992). Excitation bei 390 nm führt zu schwachen Emissionen im Bereich bei 450 nm und bei 588 nm. Die geringe Emission bei 450 nm kann auf einen bilirubin-ähnlichen Chromophor zurückgeführt werden, der aber im Vergleich zur Rekonstitution in Anwesenheit von Triton X-100, in geringen Mengen gebildet wird.

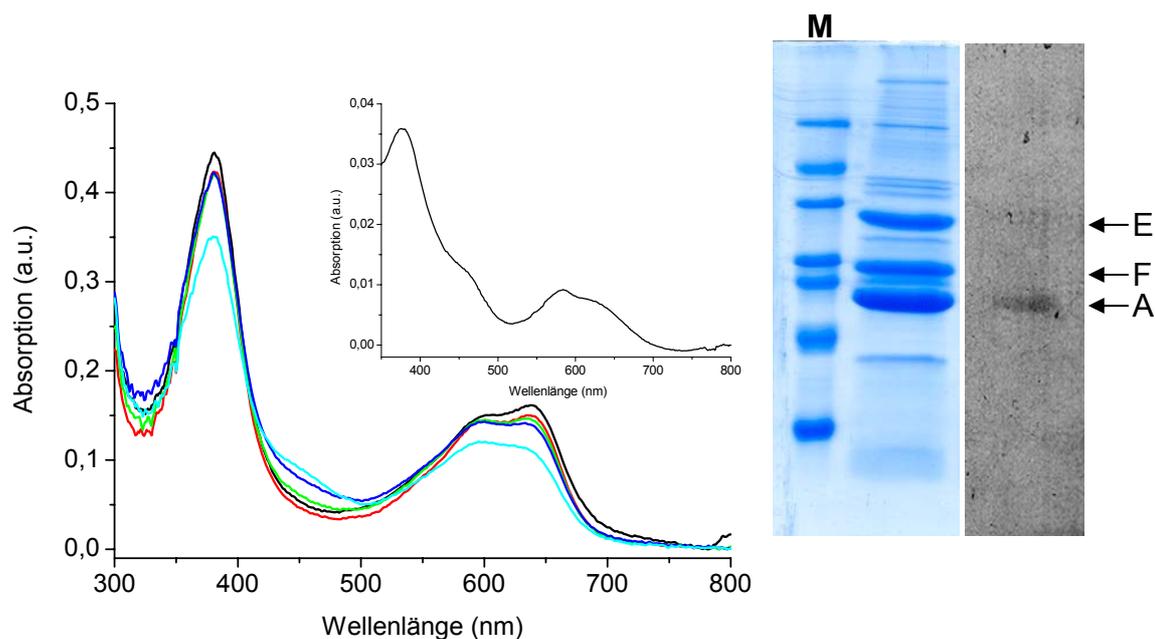


Abbildung 3-50: PecE/F-katalysierte Rekonstitution von PecA mit S-PCB in Anwesenheit von Triton X-100.

Links: Absorptionsspektren nach 0 min (—), 10 min (—), 40 min (—), 120 min (—) und 360 min (—) bei 37 °C. Inset: Rekonstitutionsprodukt nach affinitätschromatographischer Reinigung; **rechts:** SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und Zn^{2+} -induzierter Fluoreszenz, E: His₆-PecE, F: His₆-PecF, A: His₆-PecA/S-PCB-Addukt, M: Marker (67, 45, 29, 24, 20, 14 kDa); His₆-PecA (15 μmol), His₆-PecE (15 μmol), His₆-PecF (20 μmol), MnCl₂ (1,5 mM), 2-Mercaptoethanol (5 mM), Triton X-100 (0,5% v/v).

Die PecE/F-katalysierte Rekonstitution in Anwesenheit von Triton X-100 zeigt zum Beginn der Reaktion zwei Absorptionsmaxima bei 600 und 638 nm. Im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es zu einem Rückgang in den Intensitäten ohne Verschiebung der Maxima. Dabei nimmt die Absorption bei 638 nm stärker ab als die Absorption bei 600 nm. Das affinitätschromatographisch gereinigte Chromoprotein zeigt ein Maximum bei 582 nm mit zwei deutlichen Schultern im Bereich von 450 und 630 nm. Die bei der Rekonstitution ohne Triton X-100 sichtbaren Schultern bei 505 und 540 nm treten hier nicht auf. Im Gegensatz zur Rekonstitution ohne Triton X-100 zeigt das Produkt aus der Rekonstitution mit Triton X-100 keine reversible Photochemie. Die SDS-PAGE zeigt in der Zn^{2+} -induzierten Fluoreszenz nur ein sehr schwaches Signal und belegt damit, dass Triton X-100 eine effektive Bindung von S-PCB an PecA verhindert.

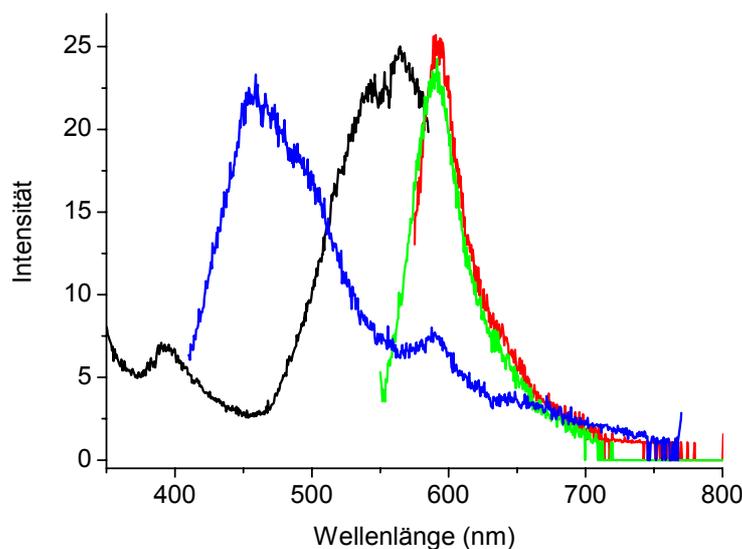


Abbildung 3-51: Fluoreszenzspektren des S-PCB-Addukts aus der Rekonstitution von PecA mit PecE/F in Anwesenheit von Triton X-100.

Emissionsspektren nach Excitationen bei 390 nm (—), 543 nm (—) und 565 nm (—); Excitationspektrum mit Emission bei 595 nm (—).

Die Fluoreszenzspektren zeigen nach Excitation bei 543 und 565 nm Emission bei 592 nm. Das breite Emissionsmaximum bei 475 nm deutet auf einen bilirubin-ähnlichen Chromophor hin. Durch die Anwesenheit von Triton X-100 während der Rekonstitution wird die Bildung des Absorptionsmaximums bei 634 nm und das dazugehörige Fluoreszenzsignal bei 668 nm unterdrückt. Möglicherweise wird durch Triton X-100 ein bestimmtes Konformer in Lösung gebildet, das zum einen ein schlechtes Substrat für PecE/F darstellt und zum anderen nach der Bindung an PecA nicht in der Lage ist, eine reversible $\Delta 15,16$ -*E/Z*-Photochemie durchzuführen. Zudem ist nach Anregung bei 390 nm eine starke Emission bei 450 nm zu beobachten, die auf einen bilirubin-ähnlichen Chromophor zurückgeführt werden kann. Dies verdeutlicht, dass Triton X-100 wesentlichen Einfluss auf die Rekonstitution ausübt, in dem es unterschiedliche Konformationspopulationen generieren kann, die sich in ihren Reaktivitäten unterscheiden.

Zusammenfassende Diskussion der Rekonstitutionen mit S-PCB

S-PCB kann unter den verschiedenen Rekonstitutionsbedingungen kovalent an PecA gebunden werden. Die autokatalytische Bindung liefert nur sehr geringe

Produktausbeuten, während durch die PecE-katalysierte Adduktbildung zwei Addukte entstehen, die sich auch in ihren Fluoreszenzeigenschaften unterscheiden. Durch die Zugabe von PecE/F zum Rekonstitutionsansatz entsteht ein S-PCB-PecA-Addukt, welches eine reversible Photochemie zeigt. Im Gegensatz zur *in vitro*-PVB-Adduktbildung, bei der Triton X-100 eine entscheidende Rolle spielt, führt die Zugabe von Triton X-100 bei der Rekonstitution mit S-PCB zu einem Reaktionsverlauf, der eine Photochemie verhindert. Tabelle 3-13 fasst die spektralen Eigenschaften der Rekonstitutionsprodukte zusammen.

Tabelle 3-13: Vergleich der Spektraldaten der S-PCB-PecA-Addukte aus den Rekonstitutionen von His₆-PecA mit S-PCB unter verschiedenen Rekonstitutionsbedingungen.

Rekonstitutionsprodukt, dargestellt durch	Absorption λ_{\max}^{VIS} (nm)	Fluoreszenz λ_{\max}^{em} (nm)	Photochemie $\Delta\Delta A$ (%)
PecA (autokatalytisch)	~ 600	670	---
PecE	584, 628	593 ^a , 660 ^a , 668 ^b	---
PecE/F + Triton X-100	582, 630 ^s	592	---
- Triton X-100	505, 582, 540 ^s	595	15

^a Excitation 580 nm, ^b Excitation 640 nm, ^s Schulter im Absorptionsspektrum

Interessanterweise erfolgt bei der S-PCB-Adduktbildung unter allen Bedingungen (mit Ausnahme des Ansatzes mit Triton X-100) zuerst eine rasche Bildung eines Intermediats mit einer Absorption bei 698 nm. Dieses Intermediat zeigt sich auch bei der Inkubation von S-PCB im Tris-Puffer. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen nicht vollständig protonierten Chromophor. Jedoch scheint auch die Geometrie des S-PCB eine Rolle dabei zu spielen, da der Zusatz von Triton X-100 im selben Puffer eine Ausbildung des Absorptionsmaximums bei 695 nm verhindert. Da der Thiophenring des S-PCB im Gegensatz zum Pyrrolring des PCB nur eine geringe Basizität aufweist, ist eine Protonierung des Thiophenrings kaum möglich, bzw. findet eine Protonierung nicht am Schwefelatom sondern an einem der benachbarten Sauerstoffatome statt. S-PCB kann ebenso wie andere $\Delta 10,11$ -Biline, als 10-*E/Z*-Isomer vorliegen (Fu *et al.* 1979). Deshalb ist es denkbar, dass die Lage des Gleichgewichts zwischen den beiden Isomeren sowohl durch die Protonierung als auch durch das Lösungsmittel bestimmt wird. Da der Schwefel im Ring D kein Wasserstoffbrückendonator ist, dürfte das *Z*-Isomer (s. Abbildung 3-40) in Lösung destabilisiert sein.

3.3.5 Proteingebundene Biline - Substrate zur Rekonstitution von PecA

Untersuchungen zur Bindung von Chromophoren an PecA durch die Lyase PecE/PecF wurden bisher hauptsächlich mit den freien Bilinchromophoren durchgeführt (Storf 2003). Es zeigte sich, dass für die Bindung an das Apoprotein die Ethylidengruppe an C3 eine notwendige Voraussetzung ist.

Im Nachfolgenden wurde untersucht, ob ein Biliprotein selbst als Substrat für die Lyase dienen kann. Dabei wurde als Substrat das PCB-Addukt verwendet. Tabelle 3-14 zeigt die Zusammensetzungen der verschiedenen Versuchsansätze. Nach Inkubation der Ansätze über Nacht wurden diese einem Belichtungszyklus zur Induktion der Photochemie von α -PEC unterworfen, um zu testen, ob eine Isomerisierung des PCB-Chromophors stattgefunden hat.

Tabelle 3-14: Übersicht der Versuche zur Umwandlung des PCB-Addukts zum PVB-Addukt. His₆-PCB-Addukt (5 μ M), His₆-PecE (10 μ M), His₆-PecF (15 μ M), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,8% v/v).

PCB-Addukt	PecE	PecF	Mn ²⁺	Triton X-100	Beobachtung
+			+		a
+				+	b
+			+	+	c
+	+				a
+	+		+		a
+	+		+	+	b
+	+			+	c
+		+			a
+		+	+		a
+		+	+	+	b
+		+		+	c
+	+	+			a
+	+	+	+		a
+	+	+	+	+	b
+	+	+		+	c

a: keine Veränderung im Absorptionsspektrum feststellbar, b: Rückgang der Absorption bei 641 nm um bis zu 30%; c: Rückgang der Absorption bei 641 nm um bis zu 30% mit hypsochromer Verschiebung auf ca. 620 nm.

Das PCB-Addukt kann durch Zugabe von PecE, PecF bzw. PecE/F und Inkubation über Nacht in verschiedenen Pufferzusammensetzungen (Triton X-100, MnCl_2 , 2-Mercaptoethanol) in keinem Fall in das PVB-Addukt umgewandelt werden. Demnach ist der an das Protein gebundene Chromophor kein Substrat mehr für die Untereinheiten der Lyase. Die Isomerisierung des freien PCB zum PVB-Chromophor scheint vor oder intermediär während der Bindung an das Apoprotein zu geschehen. Die beobachteten Veränderungen in den Absorptionsspektren der verschiedenen Ansätze lassen mehrere Schlussfolgerungen zu. Der kovalent gebundene Chromophor wird durch das Protein vom Außenmedium abgeschirmt. Dadurch kann Mn^{2+} , das auf PCB in Lösung einen destruktiven Effekt besitzt, nicht mit dem gebundenen Chromophor interagieren. Dies zeigt sich in den Ansätzen, denen Mn^{2+} zugesetzt worden ist. Durch Zugabe von Triton TX-100 scheint die Tertiärstruktur des PCB-Addukts aufgeweicht zu werden. Dies führt zu schwächeren Chromophor-Protein-Interaktionen und somit zu einem Rückgang der Absorption. Wird Mn^{2+} und Triton X-100 zu den Ansätzen gegeben, verschwindet das Maximum bei 641 nm und ein breites Maximum bei 620 nm entsteht, das auf einen kovalent gebundenen Chromophor schließen lässt, der eine große Konformationsfreiheit besitzt. Dies kann durch Zugabe der Lyase-Untereinheiten verhindert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die Tertiärstruktur des PCB-Addukts durch Triton X-100 aufgeweicht wird, der Chromophor dadurch mehr Freiheitsgrade erhält, aber dieser Zustand von den Lyase-Untereinheiten als Substrat erkannt wird und die ursprünglichen Chromophor-Protein-Interaktionen wieder hergestellt werden.

Eine Ablösung des Chromophors vom Holoprotein und dessen Übertragung auf die apo- α -Untereinheit kann beim C-Phycocyanin durch CpcE/CpcF beobachtet werden (Fairchild *et al.* 1992). Somit wird durch CpcE/CpcF sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion katalysiert. Um eine mögliche Chromophorübertragung vom PCB-Addukt auf apo- α -Phycoerythrocyanin (PecA) zu untersuchen, wurden PCB-Addukt, His₆-PecE/His₆-PecF sowie His₆-PecA in verschiedenen Pufferzusammensetzungen (Triton X-100, MnCl_2 , 2-Mercaptoethanol) miteinander inkubiert (Tabelle 3-15).

Tabelle 3-15: Übersicht der Versuche zur Übertragung des Chromophors vom PCB-Addukt auf PecA. His₆-PCB-Addukt (5 µM), His₆-PecE (10 µM), His₆-PecF (15 µM), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,8% v/v).

PCB-Addukt	PecA	PecE	PecF	Mn ²⁺	Triton X-100	ΔA
+	+	+	+			---
+	+	+	+	+		---
+	+	+	+	+	+	---
+	+	+	+		+	---

Im Falle einer Ablösung des Chromophors vom PCB-Addukt und dessen Übertragung auf das Apoprotein, sollte eine reversible Photochemie durch Belichtung mit Licht der Wellenlängen 505 nm und 570 nm detektiert werden können, da es zur PVB-Adduktbildung kommen müsste. In keinem der Ansätze konnte nach Inkubation über Nacht mit anschließendem Belichtungszyklus (500 nm - 570 nm - 500 nm) eine reversible Photochemie detektiert werden. PecE/F kann somit nur die Bindung des PCB-Chromophors und dessen gleichzeitige Isomerisierung zum PVB-Addukt katalysieren. Eine Rückreaktion und/oder Übertragung des abgelösten Chromophors ist durch PecE/F nicht möglich.

Demzufolge besitzen die Lyase-Untereinheiten PecE und PecF Domänen, die die Chromophorbindung und -isomerisierung ermöglichen. Für einen denkbaren Reaktionsmechanismus bedeutet das, dass die katalytische Domäne zur kovalenten Bindung des Chromophors nicht bei der Lyase liegt, sondern im Apoprotein lokalisiert ist.

Das rekonstituierte PCB-Addukt (P641) dient nicht als Substrat für die Lyase-Untereinheiten. Hingegen dient das durch autokatalytische Assemblierung dargestellte PCB-Addukt mit einem Absorptionsmaximum von 645 nm (P645) als Substrat für die PecE-katalysierte PCB-Adduktbildung (Abbildung 3-52).

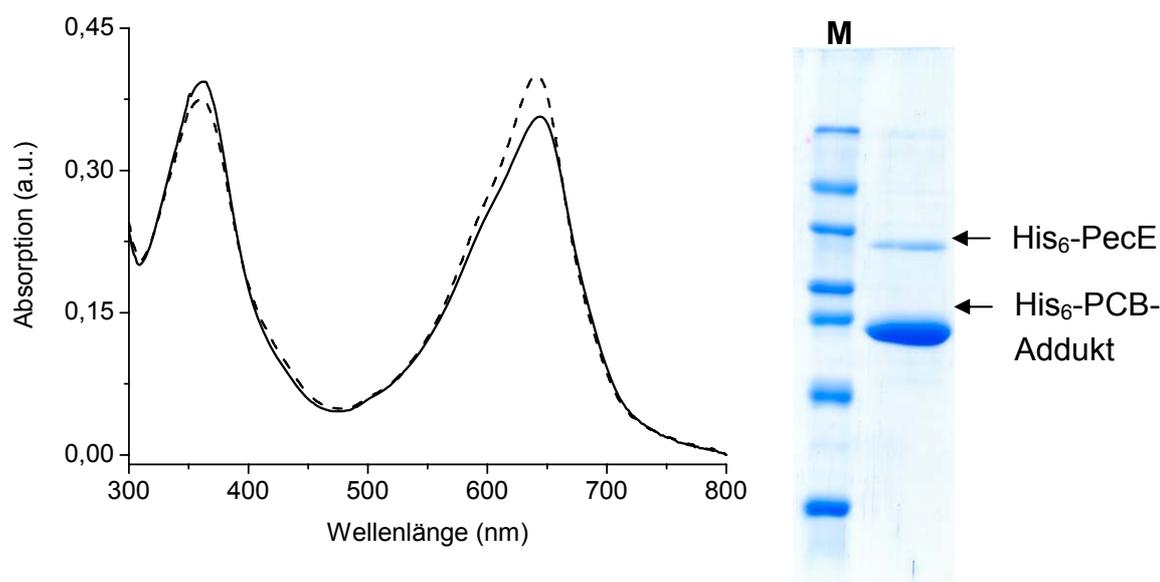


Abbildung 3-52: Reaktion von P645 mit PecE.

Zu einem Ansatz aus His₆-PecA (15 μM), PCB (8 μM) und MnCl₂ (1,5 mM) wurde nach Beendigung der autokatalytischen Assemblierung His₆-PecE (2 μM) zugegeben. **Links:** Absorptionsspektren P645 (—) und 10 min nach Zugabe von PecE (- - -); **rechts:** SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, M = Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa).

Durch die Zugabe von PecE verschiebt sich das Maximum des Chromoproteins aus der autokatalytischen Rekonstitution von 645 nm auf 641 nm. PecE wurde nach Beendigung der autokatalytischen Reaktion zum Ansatz gegeben, so dass eine PecE-katalysierte Adduktbildung mit einem entsprechenden Produktmaximum bei 641 nm ausgeschlossen werden kann. Die Verschiebung des Maximums von 645 nm auf 641 nm wird durch die Interaktion von P645 mit PecE verursacht. P645 hat den PCB-Chromophor kovalent gebunden, jedoch sind die Chromophor-Proteininteraktionen in der Bindungstasche nicht korrekt ausgebildet. PecE erkennt P645 als Substrat und weitet die Bindungstasche, so dass es zu einem Rearrangement der Chromophor-Proteinwechselwirkungen kommen kann. Dadurch kommt es zur hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Die Absorptionsspektren von P645 und dem PCB-Addukt, das aus P645 und PecE dargestellt wurde, in saurer denaturierter Umgebung (8 M Harnstoff/2% HCl), zeigen beide Maxima bei 662 nm, die Belege für kovalent gebundene PCB-Chromophore sind (Glazer *et al.* 1973a). Dies zeigt, dass es während der Chromophorbindung zur

Interaktion zwischen PecA und PecE kommt und dass ein PecA-PCB-Komplex das Substrat für PecE darstellt.

Die Funktion von PecE liegt demnach in der Öffnung der Bindungstasche sowie in der Modellierung der chromophorumgebenden Aminosäuren, um eine regio- und stereospezifische Bindung des Chromophors an das Apoprotein zu ermöglichen, d. h. PecE ist ein Chaperon. Hingegen ist PecF für die Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung des PCB in den Ring A während der Bindung verantwortlich.

3.4 Die Bedeutung von Cysteinen bei der Chromophorbindung

PCB ist in der Lage, mit Thiolverbindungen über die 3-Ethylidengruppe Thioether auszubilden, und kann dadurch in einer nucleophilen Addition mit Cysteinen in Proteinen reagieren. Cysteine in Proteinen können zudem der Ausbildung von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken dienen, die oftmals die Tertiärstruktur eines Proteins verändern und somit seine Aktivität beeinflussen.

In diesem Kapitel soll die Bedeutung der Cysteine im Apoprotein PecA wie auch in den Lyase-Untereinheiten näher betrachtet werden. Dazu wurde Iodessigsäure (IES) als thiolmodifizierendes Reagenz anstelle von p-Chloromercuriphenylsulfonat-Natriumsalz (PCMS) (Siebzehrnühl 1990, Zhao *et al.* 1995b) verwendet. IES besitzt gegenüber PCMS einige Vorteile. Bei der Verwendung von IES kommt es im Gegensatz zu PCMS zu keiner Präzipitation des Proteins und es ist sterisch nicht so anspruchsvoll. Dadurch können auch Cysteine im Protein blockiert werden, die durch das PCMS nicht erreicht werden können. Iodessigsäure reagiert mit Cysteinen irreversibel zu einem Essigsäurethioether-Derivat ($R-SH + I-CH_2-COOH \rightarrow R-S-CH_2-COOH + HI \uparrow$) und blockiert somit eine mögliche Bindung zwischen PCB und Cystein.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit zwei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. Proteine im Ansatz A wurden gegen Tris-Puffer mit 2-Mercaptoethanol (1 M Tris, 3 mM 2-Mercaptoethanol) und anschließend gegen Tris-Puffer mit Iodessigsäure (1 M Tris, 6 mM IES) dialysiert. Proteine im Ansatz B wurden nur gegen Tris-Puffer mit Iodessigsäure dialysiert. Abschließend wurden alle Proteine gegen Tris-Puffer (1 M, pH 6.0) dialysiert. Die Dialyse der Proteine im Ansatz A

zuerst gegen 2-Mercaptoethanol-haltigen Puffer soll Cysteine, die in oxidiert Form vorliegen und somit nicht mit IES reagieren können, reduzieren. Die reduzierten Cysteine können anschließend mit IES reagieren. Die verwendeten Proteine wurden massenspektroskopisch untersucht, um festzustellen, wie viele Cysteine in den Proteinen durch IES blockiert werden konnten (Tabelle 3-16).

Tabelle 3-16: Ergebnis der massenspektroskopischen Analyse von IES-behandelten Proteinen mit (A) bzw. ohne (B) vorangegangener Dialyse gegen 2-Mercaptoethanol.

	Cysteine in der AS-Sequenz	durch IES blockierte Cysteine	
		Ansatz A	Ansatz B
His ₆ -PecA	3	0	0
His ₆ -PecE	7	>2	2
His ₆ -PecF	5	>3	3

Die massenspektroskopische Untersuchung der IES-behandelten Proteine zeigt, dass die Cysteine in PecA durch IES nicht modifiziert werden konnten. Demnach liegen die Cysteine in PecA tief im Protein und sind nicht zugänglich. Eine Modifikation der Cysteine in PecE und PecF durch IES ist teilweise möglich. Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied, wenn die Proteine vor der IES-Behandlung gegen 2-Mercaptoethanol dialysiert wurden. Die Massenspektren der ME-behandelten Proteine deuten darauf hin, dass mehr Cysteine mit IES reagiert haben, wenn diese zuvor gegen 2-Mercaptoethanol dialysiert worden waren, als Proteine ohne vorangegangene Dialyse gegen 2-Mercaptoethanol. Demnach konnten oxidiert vorliegende Cysteine durch 2-Mercaptoethanol reduziert werden und somit für eine Reaktion mit IES zugänglich gemacht werden. Das heißt, dass die Lyase-Untereinheiten intermolekulare Disulfidbrücken besitzen. Ein weiterer interessanter Befund ist, dass His₆-PecE und PecF aus Ansatz B keine Einzelbande in der SDS-PAGE aufweisen, sondern dass es zur Auftrennung der Proteinbande in zwei Einzelbanden kommt (Abbildung 3-53).

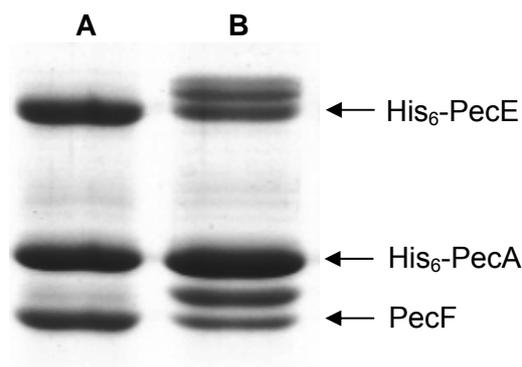


Abbildung 3-53: SDS-PAGE des Effekts von Iodessigsäure (IES) auf His₆-PecE, His₆-PecA und PecF.

(A) Proteine wurden zuerst gegen Tris-Puffer mit 2-Mercaptoethanol und anschließend gegen Tris-Puffer mit IES dialysiert; (B) Dialyse der Proteine erfolgte gegen Tris-Puffer mit IES.

Die SDS-PAGE von IES-behandelten His₆-PecE und PecF zeigt oberhalb des eigentlichen Molekulargewichts je eine zusätzliche Bande. Diese zusätzliche Bande bedeutet eine Molekulargewichtszunahme von ca. 2-3 kDa. Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden. Prinzipiell kann mit Hilfe der SDS-PAGE qualitativ abgeschätzt werden, ob ein Protein mit IES reagiert oder nicht, da, wie im Falle von His₆-PecA, nach IES-Behandlung keine zusätzlichen Banden in der SDS-PAGE auftauchen.

In Tabelle 3-17 ist das Rekonstitutionsverhalten der Proteine aus den Ansätzen A und B bei der Bildung von α -PEC dargestellt.

Tabelle 3-17: Relative His₆- α -PEC-Ausbeuten (ΔA , in %) mit IES-behandelten Proteinen (unterstrichen), relativ zur Kontrolle (100%). Proteine im Ansatz A wurden zuerst gegen 2-Mercaptoethanol dialysiert und anschließend gegen IES. Proteine im Ansatz B wurden nur gegen IES dialysiert. Proteine im Kontrollansatz wurden nur gegen Tris-Puffer dialysiert. His₆-PecA (10 μ M), His₆-PecE (10 μ M), PecF (30 μ M), PCB (8 μ M), MnCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,5% v/v).

	Ansatz A	Ansatz B
His ₆ -PecA/E/F	100	100
His ₆ -Pec <u>A</u> /E/F	96	100
His ₆ -PecA/ <u>E</u> /F	75	81
His ₆ -PecA/E/ <u>E</u>	0	27
His ₆ -PecA/E/ <u>F</u>	0	27

	Ansatz A	Ansatz B
His ₆ -Pec <u>A</u> /E/F	0	25
His ₆ -Pec <u>A</u> / <u>E</u> /F	100	68
His ₆ -Pec <u>A</u> / <u>E</u> / <u>F</u>	0	25

Die Ansätze wurden für 5 h bei 37 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit Licht der Wellenlängen 505 und 570 nm belichtet, um die Photochemie des α -PEC zu induzieren. Aus dem Differenzspektrum (570 nm *minus* 505 nm) wurde der ΔA -Wert abgeleitet, der als Kriterium für die gebildete α -PEC-Menge herangezogen wurde.

Aus Tabelle 3-16 und Tabelle 3-17 lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

- Eine Blockierung der Cysteine durch IES hat bei PecA nicht stattgefunden. Dadurch ist auch kein Rückgang bei der α -PEC-Bildung zu beobachten.
- Die Verwendung von IES-behandelten His₆-PecE führt sowohl im Ansatz A wie auch im Ansatz B zu einem geringen Rückgang der α -PEC-Ausbeute auf 75 bzw. 81%.
- Der größte Effekt ist bei der Verwendung von IES-behandelten PecF zu beobachten. Im Ansatz A kam es zu keiner α -PEC-Bildung mehr, während im Ansatz B die α -PEC-Ausbeute bei nur noch 25% lag.
- Die Kombination von IES-behandelten Proteinen (Lyase-Untereinheiten, Apoprotein) führt im Wesentlichen zu den gleichen Resultaten.
- Proteine, die zuvor mit 2-Mercaptoethanol behandelt worden sind, zeigen nach Behandlung mit IES eine generell geringere Aktivität (Fähigkeit zur α -PEC-Bildung), als Proteine, die nicht mit 2-Mercaptoethanol behandelt worden sind.

Die Ergebnisse der Versuche mit IES-behandelten Proteine zeigen, dass Cysteine der Lyase-Untereinheiten für die Addition des Chromophors PCB an das Apoprotein und dessen Isomerisierung zu PVB eine Rolle spielen. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob die Cysteine eine temporäre Bindung mit dem Chromophor eingehen, ob die Cysteine Teil einer katalytischen Domäne zur Isomerisierung des Chromophors bzw. zur Bindung des Chromophors an das

Apoproteine sind, oder ob die Cysteine für Protein-Protein-Wechselwirkung über Disulfidbrücken verantwortlich sind. Die Bedeutung der Cysteine zeigt sich auch darin, dass Storf sowie Zhao *et al.* (Zhao *et al.* 2000, Storf *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2002, Storf 2003) für die Rekonstitution von α -PEC im Phosphat-Puffersystem zwingend 2-Mercaptoethanol benötigen, während im Tris-Puffersystem auf dessen Zusatz verzichtet werden kann. Möglicherweise spielen Disulfidbrücken zwischen den Lyase-Untereinheiten bei der Komplexbildung eine Rolle, da die α -PEC-Ausbeute im Tris-Puffersystem in Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol etwas höher ist.

In einem weiteren Versuch wurden PecA und PecE mit IES versetzt und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz geteilt, zur einen Hälfte wurde direkt PCB gegeben (A), die andere Hälfte wurde gegen Trispuffer dialysiert, um überschüssiges IES zu entfernen (B) und anschließend mit PCB versetzt. Mit Hilfe dieses Versuches soll untersucht werden, ob eine Interaktion zwischen PecE und PecA in Abwesenheit des Chromophors stattfindet. Bildet PecA mit PecE in Abwesenheit des Chromophors einen Komplex, der die Bindungstasche öffnet und Cys-84 zugänglich macht, müsste bei diesem Versuch Cys-84 durch IES blockiert werden. Folglich dürfte es nicht zu einer PCB-Adduktbildung kommen. Das Ergebnis des Versuchs zeigt, dass es weder im Ansatz A noch im Ansatz B zu einem Rückgang der PCB-Adduktausbeute kam, verglichen mit einem Ansatz, dem kein IES zugesetzt worden war. Daraus lässt sich schließen, dass es erst zu einer Komplexbildung zwischen PecA und PecE kommt, wenn der Chromophor mit dem Apoprotein interagiert, oder dass auch im Komplex aus PecA und PecE die Bindungstasche geschützt ist.

3.5 Chromophorbindung an die Lyase-Untereinheiten PecE und PecF

Sequenzvergleiche der Lyase-Untereinheiten PecE und PecF mit Aminosäuresequenzen bekannter Biliproteinlyasen wurden vorgenommen, um potentiell wichtige Aminosäureabschnitte oder einzelne wichtige Aminosäuren identifizieren zu helfen. Generell kann bei den Biliproteinlyasen zwischen isomerisierenden und nicht-isomerisierenden Lyasen unterschieden werden. In

diesem Kapitel werden Unterschiede zwischen diesen beiden Typen von Biliproteinlyasen anhand des Vergleichs ihrer Aminosäuresequenzen angestellt.

3.5.1 Aminosäuresequenz der Lyase- α -Untereinheit PecE

Der Sequenzvergleich der α -Untereinheiten von Biliproteinlyasen zeigt ein hohes Maß an Homologie zwischen den Lyase- α -Untereinheiten. Eine genauere Betrachtung der Aminosäuresequenzen verdeutlicht einige Unterschiede. In Abbildung 3-54 sind die Aminosäuresequenzen verschiedener α -Untereinheiten von Biliproteinlyasen dargestellt.

```

P29729 | 1 -----MTAACCAQPILSPEAATAALAGE-DNQIRYYAAWWLGK
P35791 | 1 -----MTAEPILSPETAIAALSGE-DNQIRYYAAWWLGK
P07125 | 1 -----MIEPSVEEFPANGPOLTPELAIANLOSS-DLSLRYAAWWLGK
Q8KT48 | 1 -----MTEATAEEYSPTNAPPLTKEQALSNLOSP-DLSLRYAAWWLGK
Q7U4P2 | 1 -----MPIDSVTAALEALDHQDAGVRYHGAWWLGK
P07126 | 1 --MYRHLSEGIEDHREQEQKVENAANIQDDNQLTVEQAIANLQGE-DLGLRVYAAWWLGR
P50037 | 1 -----MSGEGMTAVSEPVQLTVPQMLAQLOGT-DTSLRYAAWWLGK
Q52448 | 1 -----MNEETGIPDDNLLTIEQAIANLQSE-DLGLRVYAAWWLGR
P31967 | 1 -----MSDWQMAEAWTLEEAIANIQQTEDTGKRYAAWWFGK
Q7NL58 | 1 -----MTLITPDTSLTVEEAVEQLRGE-DLSQRYAAWWYLG-
Q84FP5 | 1 MQDSESKTPGASPLVGADNAPLTGGEAEGDAWTVEQAIANLHQEPN-RRYYAAWWLGR
P73638 | 1 -----MSEPNLNPAYTLDQAIANLQQTEDASARYAAWWI GR
Q44115 | 1 -----MSEAGTPAEALTYEQAIANLRQTADTGDRYYAAWWLGR
    
```

```

                                     ↓
38  HQVQAG-----CAALCEALFDERYRIPSGGYPLRRQAARALGQLKNPQAVPALIAAL
34  HNVQAG-----FTALCVALFDERYRIPSGGYPLRRQAARALGLLKNPQAVPALIAAL
44  YRVKES-----AAVDALIAALEDEADRTELGGYPLRRNAARALGKLGNRKAVPGLINCL
44  FRVRSPL-----AVVDALLAALDEIDRTEMGGYPLRRNAARALGKLGDLRAVPGLIKCL
31  NRSAEG-----VPRLVECLLDERDKTCTGGYPLRRQAARSLGMIKDSRCLPELTKTL
58  FRVDAP-----EAIIDVLIQALEDEDDRTNNGGYPLRRNAARALGKLGKRAVPALIKAL
42  FGLLETATAAERQAIIVSALIAALADEADRTELGGYPLRRNAARALGKLGDRQAVPALIECL
40  FRVNVP-----EAIIDLLIAALADEADRTEAGGYPLRRNAARALGKLGDRRAVPALITSL
38  FRVQDE-----RAVNALLAALKDETDSPDGGYPLRRNAAKALGKLGDLAAVQPLIESL
36  -YLEDPL-----RAVEALVAALADESDRTEMGGYPLRRKAAEISLGRIGEARAVPSLVEIL
60  FRVCDA-----IAVDALIMALDDESDRTKDDGGYPLRRNAARALGKLGDRRAVTEPLVKCL
38  FRAAQP-----ETIAALLVALEDETDSPDGGYPLRRNAAKALGKLGDRQVVPALIKAL
39  FRMKQP-----EAIALLIEALDDSLDRAPDGGYPLRRNAARALGKLESPEATAPLIACL
    
```

```

          ++++++
90  ACEEDLGLREAVIQALAMIGDRRAVHPLVQLLQSQ-----QFOPYEALIEALA
86  ECDEDLRLREAVICSLAAIGDKRAVTPLLNLLQSS-----QAOPYEALIEALA
98  EC-PDFYVREAAAQSLLEMLKDKTAAPALIKLLDGGVAQAVQVTRGRPHLVOPYEAVIEALG
98  QC-SDFYVREAAAQSLAMLKDKRAQAALMQLLEPCVAAAQVQVGRPHLTOPYEATIEALG
83  ET-DDVQLHEATLRLALIQIKSDQCSSSLINYLDRDIP-----NKPTEALIEALT
112 EC-SDFYVREAAAQSLLEMLGDSSSIPRLIEELLNDQVPGTLPAPEPPQLTOPFDALIEALG
102 RC-EDFYVREAAAIALGQLGDPRAIAPLQSLLEGGVAMARLVVGRPHLVQPVFAVIEISLG
94  EC-DDFYVREAVAQSLLEMLGDNSCVPYLIELIKNPNPEASADTEP---EHPYDAFIEALG
92  ES-PDYVRESAAQSLLEMLGDRQAIPALQALLAGGVAAAQVQVGRPHLVOPYEAVIEALG
89  GC-EDYVREAAAWSLARIGDALAVEPLVALLGQGG-----SQPYEATIEALG
114 DC-QDFYVREAAAQALEGLGDSVCVSRLLVGGVEDTAPIAGKPHLKOPYDAVIEAIG
92  EC-EDYVRESAAQALEGLGDARAMAPLMAKLTGGLAAAQVQVGRPHLVOPYEATIEALG
93  QC-EDYVREAAATQSLGELQATVAVPALIKLLEGGPEATAAIPGKPHLTOPADAVMETLG
    
```

```

          ↓           ↓           #           ***           #
138 TLQVWSARPQIEPFLYHSSERVQCAAARYLYLLTKQPQYL-----ERVQNLNHDNMYLR
134 TLQVWSARPQIEPFLQHYSERVQCAAARYMYLLTQSEYI-----ERVKNLNHDNMYLR
157 AIGATDAIPLIQPFLEHPVSRVQCAAARAMYQLTQEPVYG-----ELLVKVLGNDLNLR
157 AMGATEAIPLEPFLHPMPRVQCAAARAMYQLTRDFCYG-----EYLVKMLDSSNLQLR
131 EQRMWDVSEKIQPFLNDKSERIAGSAAAFFYSYTGEMTYLN----KVISLLDHQNRFRIR
171 TLGASDAIPIIQEFLEHTVPRIQYAAARAMYQLTSESTAGYNQYGDRLVQALAQDDLQLR
161 HLGATEAIALIEPFLAHEMPRVQFAAARALFQLTGDAVYG-----DRLLAALNSEDVQLR
150 TLGAVKAIPHILPFLDHPPIPKVQYAAARAMYQLSEPMVA--DQYGDRLVAALANDDLQLR
151 TIGATAAIAEIEPFLDHEFAKIPYAALRALYQLTQEAHYA-----EQLMEALNGNQLQLR
136 DLRVHRAVPLIQPFLQERSERIRYAAARSLFQLTGEVALI-----DILLGGLASADSHIR
173 TLGATEALTDIEPFINHPIARIQYAAALRAMYQLTGDVPYG-----DRLIAALRGEDLQLR
151 TLQAVESIGLIEPFLIEHFSKPVQYAAARALFQLTGDNRYG-----DILLITALGGTDLQLR
152 QLRATVAVPVVQAFLEHPIDKIRLAAARSLYQLTGDHYA-----ERVVQGLSDPKLQRR
    
```

```

          ↓           $$$
193 WAAIFDLAALGHRQAVDAILAAKVPNSLKLINLKRILETLIDGDRSQLNNGEFCQNQSDR
189 WAAVFDLGAVAHQAVQAAILTAQVPNSLKLINLKRILEAMLNN-----NSVNH
212 RVALGDLGAIGYLAEEAIAANAKAENSFKLIALKGLLEHQMSAES-----NALSIS
212 RVALADLGAIGYMPAAEAIAAAKVENSFKLIALKGLLEHQMQES-----QGLFLT
186 QSAAFDLARIGTIKATDPILTAKIPNNVKMFATKAILNKSLSRSNQADS----IPDTDLA
231 RAVLSDLGAIGYLPAAEAIAADTLAENSLKLI SLKGLLEKQFQPTK-----P-EDLS
216 RTALLDLGAMGYLPAAEAIALQAGVEASFKLIALHGILGQQLRQAAP-----A
208 RTVLSDLGAIGYLSAAEAIGNTMAENSLKLI SLKGLLEKQIVLAT-----P-PDIT
206 RSALLDLGAIGYVPAGQAIAKAYAENSLKLI SLKGLLESHLQOR-----TAETLD
191 RAALFDLADTGYLPAAVKIVHADVTATLKLIALKQLADVQTT-----D
228 RSALMDLGAIGYLQAAEPIANTLAENSLKLI ALQGLEHHLSQIG-----EKCLS
206 RSAMMDLGATGYLPGAQAIAKAFKAENSLKLI ALRDLWATHRQRQASS-----ESKALS
207 AVGPDGFRGDRFLFPAAPQIAQTVAENSLKLI SLKGLLDTHLRQQTPE-----RSQSWM
    
```

```

253 ETIELLFQAIDDLLIQL-----
237 EKAALIFGAIDDLLIQL-----
263 DQAIRVMNLMDSLL-----
263 ADAIRVMNLMDSLL-----
242 SIHSSLFKALDSLARDNFSGNLLIEQDNQIPETYPGDGSTESDLLSNAFDNLRSPSLTSR
281 PGAIKVMQLMDALL-----
263 EQTLLSLFQGLDQLL-----
258 DGAIRVMALMDDL-----
255 ADGLQLLELMDSLL-----
234 AAAADVLPFIDSIL-----
278 EEAVKIMKLMDSLL-----
259 PASRQILELMDSLL-----
260 SRQSR-----

```

Abbildung 3-54: Aminosäuresequenzvergleich (Clustal_W) ausgewählter α -Untereinheiten von Biliproteinlyasen.

P29729: PecE, *Fischerella* sp. (PCC7603); P35791: PecE, *Anabaena* sp. (PCC7120); P07125: CpcE, *Anabaena* sp. (PCC7120); Q8KT48: CpcE, *Fischerella* sp. (PCC7603); Q7U4P2: Putative phycocyanobilin lyase alpha and beta fusion protein, *Synechococcus* sp. (WH8102); P07126: CpcE, *Fremyella diplosiphon* (PCC7601); P50037: CpcE, *Synechococcus elongatus*; Q52448: CpcE1, *Pseudoanabaena* sp. (PCC7409); P31967: CpcE, *Synechococcus* sp. (PCC7002); Q7NL58: CpcE, *Gloeobacter violaceus*; Q84FP5: CpcE, *Spirulina platensis*; P73638: CpcE, *Synechocystis* sp. (PCC6803); Q44115: CpcE, *Synechococcus* sp. (PCC7942). Angegeben ist jeweils der Datenbankname, Proteinname und der Organismus.

Es lassen sich einige Unterschiede zwischen den α -Untereinheiten isomerisierender und nicht-isomerisierender Lyasen feststellen. Die α -Untereinheiten isomerisierender Lyasen weisen eine Deletion beginnend bei Q125 (+++, gezeigt für *Fischerella* sp. PCC7603) auf. Dieser Sequenzabschnitt besitzt bei den α -Untereinheiten nicht-isomerisierender Lyasen wenig Homologie. Ein weiteres Merkmal der α -Untereinheiten isomerisierender Lyasen ist die kurze Aminosäuresequenz N185HD, gekennzeichnet durch ***, die in einem Abschnitt auftaucht, bei der die α -Untereinheiten nicht-isomerisierender Lyasen wiederum kaum Homologie aufweisen. Diese kurze Sequenz (NHD) bei *Fischerella* sp. (P29729) und *Anabaena* sp. (P35791) zeigt sich interessanterweise bei einer möglichen weiteren α -Untereinheit einer isomerisierenden Lyase aus *Synechococcus* sp. (WH8102) (Q7U4P2) als DHQ. Dabei ist die polare Aminosäure Asparagin gegen die polare Aminosäure Glutamin ersetzt und die Reihenfolge umgekehrt worden. Flankiert wird dieser kurze Sequenzabschnitt von den hydrophoben Aminosäuren Tyrosin (*Fischerella* sp., P29729 und *Anabaena* sp., P35791) bzw. Phenylalanin (*Synechococcus* sp., Q7U4P2) in den Positionen -20 (#) und +4 (#), relativ zur NHD- bzw. DHQ-Sequenz. Bei dieser Lyase handelt es sich um ein Fusionsprotein aus

Synechococcus sp. (WH8102). Es wurde als mögliche weitere isomerisierende Biliproteinlyase identifiziert (Zhao *et al.* 2005b). Des Weiteren zeigen sich Unterschiede bei einzelnen Aminosäuren zwischen isomerisierenden und nicht-isomerisierenden α -Untereinheiten (\downarrow). Ein weiterer kurzer Sequenzabschnitt K121LL bzw. KLI, gekennzeichnet durch \$\$\$, kann von Interesse sein. Diese Aminosäuresequenz tritt als LLK bzw. in abgewandelter Form bei einem Protein auf, das beim Abbau der Phycobilisomen beteiligt ist (Bienert *et al.* 2006). Auf diese Sequenzhomologie wird im Kapitel 3.6.2.4 näher eingegangen.

Allgemein fällt auf, dass die Homologie im N-terminalen Abschnitt geringer ist als im C-terminalen Bereich.

3.5.2 Aminosäuresequenz der Lyase- β -Untereinheit PecF

Die Funktion der β -Untereinheit von nicht-isomerisierenden Biliproteinlyasen ist bislang nicht bekannt. Bei den isomerisierenden Biliproteinlyasen ist die Umlagerung der Doppelbindung von der Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen A und B in den Pyrrolring A nur in Gegenwart der β -Untereinheit möglich (Zhao *et al.* 2000). Die Sequenzanalyse der β -Untereinheiten soll mögliche Aminosäureabschnitte identifizieren, die für die Isomerisierung zuständig sein können. Abbildung 3-55 zeigt den Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener β -Untereinheiten von Biliproteinlyasen.

P29730		1	-----MIAARFTNSKQLISQLNCAISPADAL
P35798		1	-----
Q7U4P2		181	NRFIQSAAFDLARIGTIKATDPILTAKIPNNVKMFAIKAILNKSLSRSNQADSIPDSDL
P31968		1	-----MTVDVLIIRAVNNPTSA
Q84FP4		1	-----MTKVEELILAVEQADSA
P29985		1	-----MTNELINGVALADTP
P72652		1	-----MEGNSVVTPEERLIQAVETADSA
Q52449		1	-----MTDRLSQLIQAVEEADSS
Q3AUV3		1	-----MSASALQKAILALDRATTT
P50038		1	-----MSDLGAYIHAVETASSA

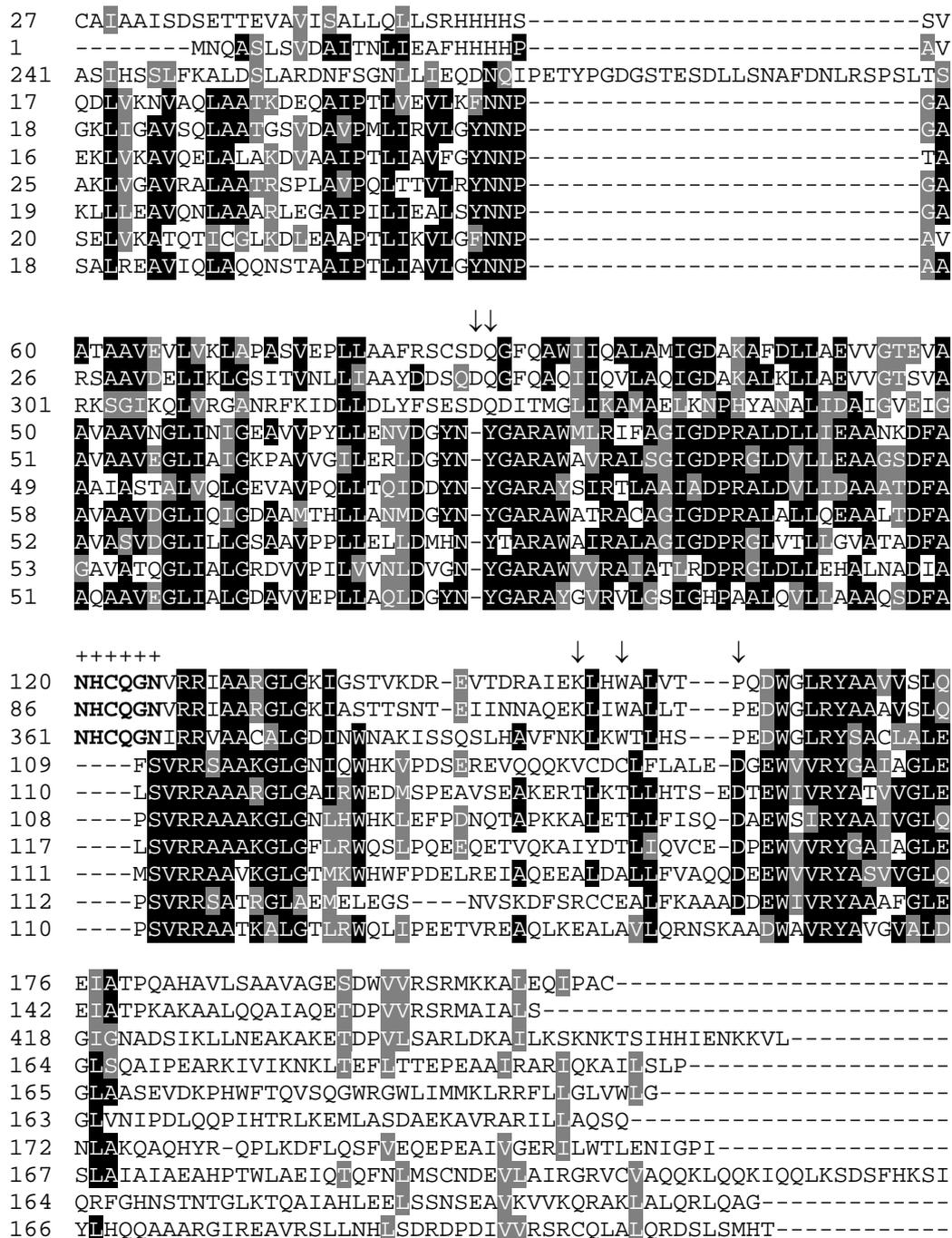


Abbildung 3-55: Aminosäuresequenzvergleich (Clustal_W) ausgewählter β -Untereinheiten von Biliproteinlyasen.

P29730: PecF, *Fischerella* sp. (PCC7603); P35791: PecF, *Anabaena* sp. (PCC7120); Q7U4P2: Putative phycocyanobilin lyase alpha and beta fusion protein, *Synechococcus* sp. (WH8102); P31968: CpcF, *Synechococcus* sp. (PCC7002); Q84FP4: CpcF, *Spirulina platensis*; P29985: CpcF, *Anabaena* sp. (PCC7120); P72652: CpcF, *Synechocystis* sp. (PCC6803); Q52449: CpcF1, *Pseudoanabaena* sp. (PCC7409); Q3AUV3: CpcF, *Synechococcus* sp. (CC9902); P50038: CpcF, *Synechococcus elongatus*. Angegeben ist jeweils der Datenbankname, Proteinname und der Organismus.

Der Sequenzvergleich der β -Untereinheiten von Biliproteinlyasen zeigt deutliche Unterschiede zwischen Lyasen, die in der Lage sind, den Chromophor zu isomerisieren (P29729, P35791) und Lyasen, die diese Eigenschaft nicht aufweisen. Einzelne Aminosäuren (\downarrow), sowie das durch (+++++) markierte Motiv (N120HCQGN), tauchen nur bei den isomerisierenden Lyase- β -Untereinheiten von *Fischerella sp.* (P29730) und *Anabaena sp.* (P35791) auf. Zudem findet sich dieses Motiv wieder bei der der β -Untereinheit entsprechenden Domäne von *Synechococcus sp.* (WH8102) (Q7U4P2), einer weiteren putativen Lyase-Isomerase. Das weist auf ein eventuell einheitliches Strukturmotiv für isomerisierende Lyasen hin (Zhao *et al.* 2005b).

Die Homologie zwischen den β -Untereinheiten ist im Gegensatz zu den α -Untereinheiten im C-terminalen Bereich geringer und im N-terminalen Bereich höher.

3.5.3 Interaktion von PCB mit der Lyase- α -Untereinheit PecE

Die Funktionen der Lyase-Untereinheiten PecE und PecF während der Chromophorbinding an das Apoprotein wurden bislang darauf beschränkt, dass sie für eine korrekte Bildung des PVB-Chromophors notwendig sind. Eine mögliche temporäre Bindung des Chromophors an die Lyase-Untereinheiten mit abschließender Übertragung des Chromophors auf das Apoprotein soll in den beiden nächsten Kapitel näher betrachtet werden. Dazu wurden affinitätschromatographisch gereinigte PecE- und PecF-Fractionen jeweils gegen a) Tris-Puffer und b) Tris-Puffer mit Iodessigsäure (IES, 3 mM) dialysiert und anschließend mit PCB inkubiert. Die Proteine wurden zur Inkubation mit IES nicht denaturiert und anschließend renaturiert, um somit die Zugänglichkeit der Cysteine in den Proteinen abschätzen zu können. Massenspektroskopische Untersuchungen dienten dabei zur Abschätzung der Anzahl der Cysteine, die durch IES blockiert worden sind (s. Tabelle 3-16).

Die Inkubation von PecE mit PCB in Abwesenheit von PecA zeigt erst nach einer Inkubationszeit von mehr als zwei Stunden spektrale Veränderungen. Inkubationszeiten von weniger als zwei Stunden führten bei der

affinitätschromatographischen Reinigung des Ansatzes zu kaum detektierbarem Chromoprotein.

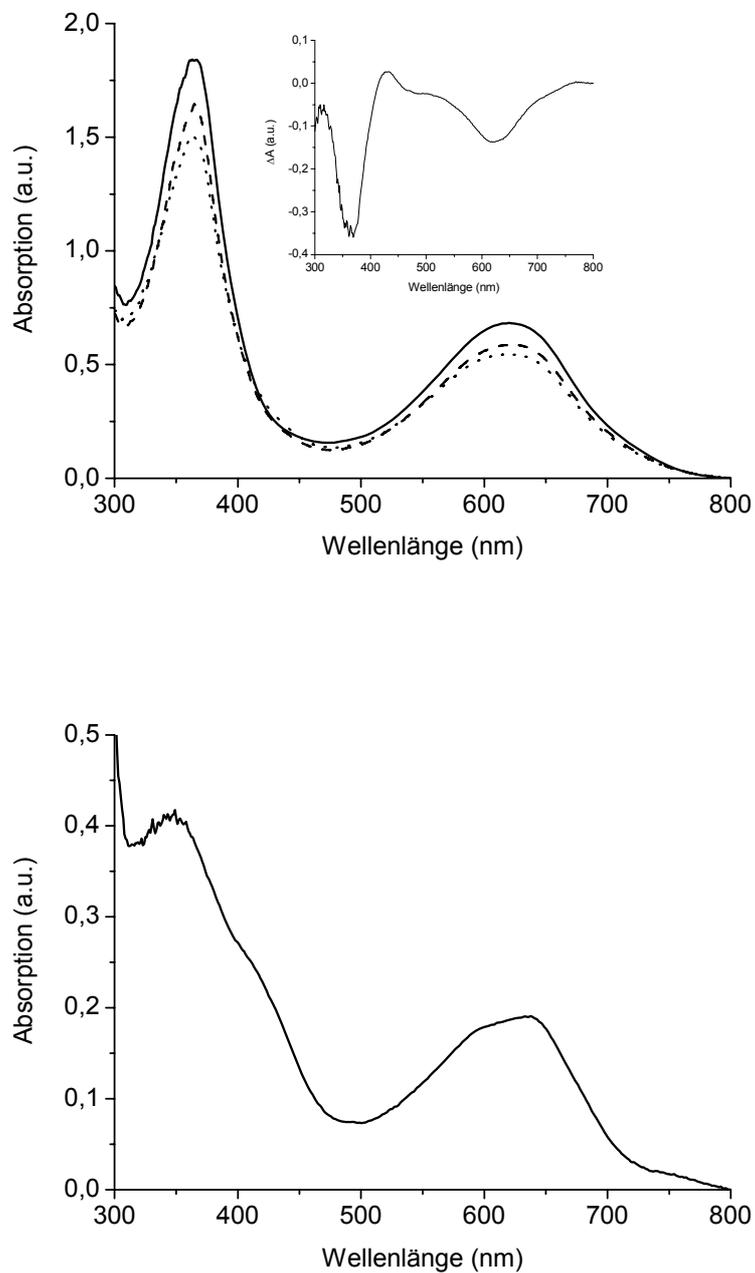


Abbildung 3-56: Reaktion von His₆-PecE (60 μ M) mit PCB (40 μ M).

Oben: Verlauf der Reaktion bei 37 °C, Absorptionsspektren nach 0 h (—), 1,5 h (- - -) und 3 h (⋯); Inset: Differenzspektrum 3 h *minus* 0 h Inkubation; **unten:** Reaktionsprodukt nach affinitätschromatographischer Reinigung und Dialyse gegen Trispuffer (1 M, pH 6.0).

Abbildung 3-56 zeigt den spektralen Verlauf der Reaktion von PCB mit PecE. Um ausreichende Mengen an Reaktionsprodukt zu erhalten, wurde mit sehr hohen Protein- und Pigmentkonzentrationen gearbeitet, wobei His₆-PecE im Überschuss verwendet wurde. Absorptionsspektroskopisch lässt sich eine Abnahme des kurz- und langwelligen Maximums bei 365 nm bzw. 620 nm feststellen. Spektrale Verschiebungen, wie sie bei der PCB-Addukt- bzw. α -PEC-Bildung auftreten, sind bei der Reaktion von PecE mit PCB nicht zu beobachten. Eine spezifische Wechselwirkung zwischen His₆-PecE und PCB ist somit nicht erkennbar. Im Gegensatz zur Bindung des PCB an PecA lässt sich im Differenzspektrum kein langwelliges Maximum feststellen, lediglich die Abnahme des kurz- und langwelligen Maximums ist erkennbar. Dabei kommt es zu einer Abnahme bei 620 nm und einer Zunahme bei 425 nm. Wird die Absorptionsdifferenz zwischen dem Maximum bei 425 nm und dem Minimum bei 620 nm aus dem Differenzspektrum relativ zum roten Maximum der eingesetzten PCB-Menge ins Verhältnis gesetzt, so ergibt sich ein Wert R von 0,24. Dieser Wert kann im Vergleich zu den Versuchen mit PecF (R = 0,58) als Maß zur Abschätzung der Chromophor-Proteinwechselwirkungen herangezogen werden, da gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Je höher dieser Wert, desto mehr interagieren Chromophor und Protein.

Während der affinitätschromatographischen Reinigung wurde ein Großteil des eingesetzten Pigments von der Säule eluiert, obgleich His₆-PecE im Überschuss eingesetzt wurde. Das dialysierte Proteineluat aus der affinitätschromatographischen Reinigung zeigte eine blaugrüne Färbung mit Absorptionsmaxima bei 350 nm und 638 nm. Zudem treten im Absorptionsspektrum (Abbildung 3-56) zwei deutliche Schultern bei 420 nm und 590 nm auf. Die Schulter bei 420 nm kann auf die Bindung von Cystein an das C₁₀-Atom des PCB zurückgeführt werden, wodurch ein bilirubin-ähnliches Addukt entsteht. Das Maximum bei 638 nm kann einem gebundenen PCB-Chromophor zugeordnet werden. Die Breite der Absorptionsbande sowie der Q_{UV}^{VIS} -Wert von 0,46 lassen auf einen gebundenen PCB-Chromophor schließen, der in seiner Konformationsvielfalt kaum eingeschränkt ist und in zyklisch-helicaler Form vorliegt.

Das PCB-PecE-Chromoprotein wurde fluoreszenzspektroskopisch untersucht, um durch Excitation bei verschiedenen Wellenlängen unterschiedlich gebundene Chromophore identifizieren zu können (Abbildung 3-57).

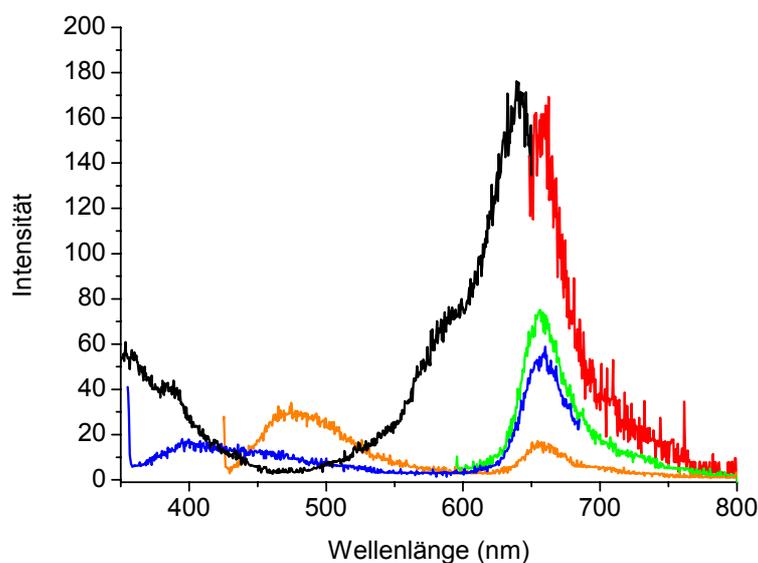


Abbildung 3-57: Fluoreszenzspektrien des PCB-PecE-Chromoproteins.

Emissionsspektren nach Excitation bei 350 nm (—), 420 nm (—), 590 nm (—) und 638 nm (—); Excitationspektrum mit Emission bei 655 nm (—).

Bei allen Excitationswellenlängen (350–638 nm, Abbildung 3-57 zeigt eine Auswahl) lässt sich eine Emission bei 655 nm induzieren. Des Weiteren treten breite Emissionsmaxima bei 395 nm (Excitation 350 nm) und 475 nm (Excitation 420 nm) auf. Das Maximum bei 475 nm kann auf einen bilirubin-ähnlichen Chromophor zurückgeführt werden. Durch Excitation bei 590 nm tritt, wie auch nach Excitation bei 638 nm, ein deutliches Emissionsmaximum bei 655 nm auf. Dies lässt darauf schließen, dass der Chromophor zum einen über die Ethylidengruppe an ein Cystein gebunden wurde und zum anderen, dass der Chromophor in mehreren verschiedenen, ineinander überführbaren Konformationen vorliegt, die sich in ihren Stabilisierungsenergien unterscheiden (Falk *et al.* 1982, Marai *et al.* 2004).

Die Inkubation von PecE^{IES} mit PCB führte ebenfalls zur Bindung des Chromophors an das Protein. Hierbei zeigten sich sowohl in der Absorption wie auch in der Fluoreszenz Unterschiede zum unbehandelten PecE, die in Tabelle 3-18 zusammengefasst sind.

Tabelle 3-18: Spektraldaten der Chromoproteine PCB-PecE und PCB-PecE^{IES}.

	Absorption λ_{\max}^{VIS} (nm)	Fluoreszenz λ_{\max}^{em} (nm)	denaturiert/H ⁺ λ_{\max}^{VIS} (nm)
PecE	638, 590 ^s	655	662
PecE ^{IES}	600, 652	---	662

^s Schulter im Absorptionsspektrum

Das Absorptionsmaximum bei 638 nm verschob sich beim PecE^{IES}-Chromoprotein auf 652 nm und zeigt die gleiche Absorptionshöhe wie das Maximum bei 590 nm. Durch Excitation bei unterschiedlichen Wellenlängen lassen sich die Emissionen bei 395 nm und 475 nm induzieren, jedoch konnte keine Emission bei 655 nm detektiert werden. Demnach scheint durch IES ein Cystein in PecE blockiert worden zu sein, das in der Lage ist, die Proteinumgebung zum Chromophor bzw. die Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und dem Protein zu beeinflussen. Dadurch kommt es zu einem veränderten spektralen Verhalten. Nach Denaturierung und Ansäuerung der beiden Chromoproteine zeigen sich jeweils Absorptionsmaxima bei 662 nm, die auf einen kovalent gebundenen PCB-Chromophor hindeuten (Glazer *et al.* 1973a).

3.5.4 Interaktion von PCB mit der Lyase- β -Untereinheit PecF

Die Inkubation von PecF mit PCB zeigt, im Gegensatz zu PecE, bereits bei relativ kurzen Inkubationszeiten spektrale Veränderungen (Abbildung 3-58).

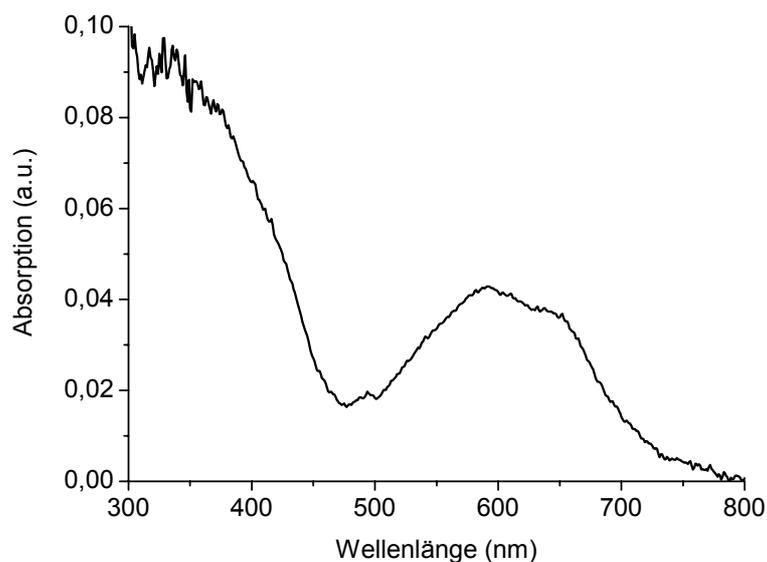
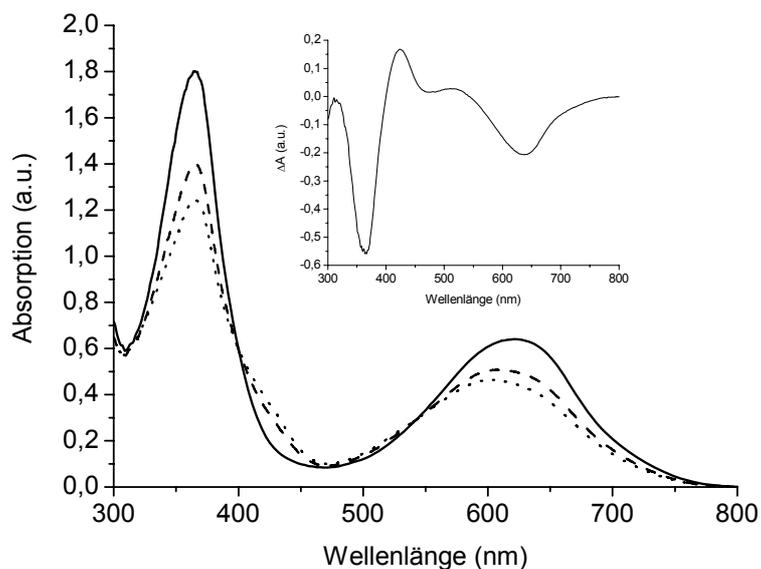


Abbildung 3-58: Reaktion von His₆-PecF (60 µM) mit PCB (40 µM).

Oben: Verlauf der Reaktion bei 37 °C, Absorptionsspektren nach 0 h (—), 1,5 h (- - -) und 3 h (⋯); Inset: Differenzspektrum 3 h *minus* 0 h Inkubation; **unten:** Reaktionsprodukt nach affinitätschromatographischer Reinigung und Dialyse gegen Trispuffer (1 M, pH 6.0).

Das Absorptionsmaximum von PCB bei 620 nm wird hypsochrom auf 600 nm verschoben. Gleichzeitig kommt es zu einem starken Rückgang der Absorption sowohl in der blauen als auch in der roten Absorptionsbande. Bei 420 nm kommt es zur Ausprägung einer deutlichen Schulter. Im Differenzspektrum lässt sich, wie im

Falle von PecE, kein Maximum im rotwelligen Bereich feststellen, das auf eine Chromophorbindung hindeutet. Es zeigt sich ein Minimum bei 637 nm, sowie ein ausgeprägtes Maximum bei 425 nm. Die Berechnung des R-Werts, analog zu den Versuchen mit PecE, ergibt einen Wert von 0,58. Dieser Wert liegt damit mehr als doppelt so hoch wie bei den Versuchen mit PecE und deutet eine intensivere Chromophor-Proteinwechselwirkung an.

Während der affinitätschromatographischen Reinigung des Ansatzes wurde der größte Teil des PCB von der Säule gewaschen, bevor die Proteinfraction eluiert wurde. Nach Dialyse gegen Trispuffer zeigt das PCB-PecF-Chromoprotein ein Absorptionsmaximum bei 590 nm mit einer deutlichen Schulter bei 650 nm (Abbildung 3-58). Dieses Absorptionsverhalten sowie der Q_{UV}^{VIS} -Wert von ca. 0,4 deuten auf eine Bindung von Cystein an die Ethylidengruppe des PCB hin, bei der der Chromophor, aufgrund der Breite der Absorptionsbande, in mehreren Konformationen vorliegen kann. Eine zweite Schulter ist im Bereich von 420 nm zu erkennen, die auf die Bindung von Cystein mit PCB an C10 zurückzuführen ist.

Das PCB-PecF-Chromoprotein wurde fluoreszenzspektroskopisch untersucht, um weitere Informationen über das Bindungsverhalten des Chromophors zu erhalten (Abbildung 3-59).

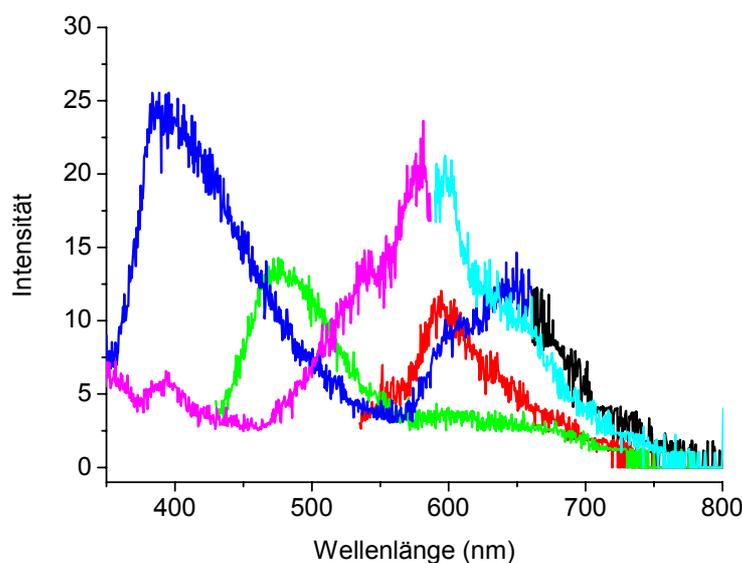


Abbildung 3-59: Fluoreszenzspektren des PCB-PecF-Chromoproteins.

Emissionsspektren nach Excitation bei 340 nm (—), 420 nm (—), 525 nm (—), 580 nm (—) und 650 nm (—); Excitationsspektrum mit Emission bei 595 nm (—).

Nach Excitation bei 340 nm zeigen sich Emissionen bei 395 nm, 595 nm und 645 nm. Damit zeigt das PCB-PecF-Chromoprotein das gleiche Verhalten wie das PCB-PecE-Chromoprotein, das nach Anregung bei 350 nm ebenfalls bei 395 nm und im roten Wellenlängenbereich Licht emittiert. Ob die Emission bei 395 nm auf eine heiße Emission zurückgeht, bei der ein Übergang aus einem vibronisch angeregten („heißen“) Niveau erfolgt, wie er bei Porphyrinen beobachtet werden kann (Mataga *et al.* 2000), kann hier nicht geklärt werden. Im Gegensatz zum PCB-PecE-Chromoprotein findet nach Anregung bei 420 nm nur eine Emission bei 475 nm statt, jedoch keine im roten Spektralbereich. Anregungen im Bereich zwischen 500 und 590 nm führten zu einer Emission bei 595 nm, eine Anregung bei 650 nm zeigte eine Emission bei 655 nm. Die im Vergleich mit PCB-PecE kürzerwelligere Absorption und Fluoreszenzemission deuten auf einen veränderten Chromophor hin. Dies wird durch Denaturierungsexperimente (8 M Harnstoff/ H^+) des PCB-PecF-Chromoproteins unterstützt, bei dem ein Absorptionsmaximum bei 611 nm auftrat (Tabelle 3-19). Dies entspricht nicht einem kovalent gebundenen PCB-Chromophor, sondern die hypsochrome Verschiebung im Vergleich zum PCB-PecE-Chromoprotein deutet auf die Reduktion einer ($\Delta 4,5?$)-Doppelbindung hin, die

zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums führt. In 8 M Harnstoff/H⁺ denaturiertes α -PEC zeigt ein Maximum bei 599 nm. Demnach kann es sich bei den hier gezeigten spektralen Veränderungen um eine Interaktion zwischen PecF und PCB handeln, bei der es zu einer Isomerisierung des PCB kommt.

Die Inkubation von PecF^{IES} mit PCB führte zu einem fast vollständigen Verlust der deutlichen Schulter im Absorptionsspektrum bei 650 nm, wie sie beim PCB-PecF-Chromoprotein zu erkennen ist. Das Maximum bei 590 nm lag nun bei 580 nm. Fluoreszenzspektroskopisch konnten Emissionen bei 395 nm, 475 nm und 610 nm nach Excitationen bei 350 nm, 420 nm und 580 nm induziert werden.

Tabelle 3-19: Spektraldaten der Chromoproteine PCB-PecF und PCB-PecF^{IES}.

	Absorption λ_{\max}^{VIS} (nm)	Fluoreszenz λ_{\max}^{em} (nm)	denaturiert/H⁺ λ_{\max}^{VIS} (nm)
PecF	590, 650 ^s	595, 655	611
PecF ^{IES}	580, 650 ^s	610	603

^s Schulter im Absorptionsspektrum

Die Aminosäuresequenz von PecF weist fünf Cysteine auf. Eine massenspektroskopische Untersuchung des mit Iodessigsäure behandelten PecF zeigte, dass drei Cysteine chemisch blockiert wurden (s. Kapitel 3.4). Die blockierten Cysteine scheinen bei den PecF-PCB-Wechselwirkungen von Bedeutung zu sein. Dies wird durch Mutationsexperimente unterstützt, bei der das Cystein in Position 122 in der Aminosäuresequenz von PecF gegen Leucin ersetzt wurde. Durch diesen Aminosäureaustausch konnte nur noch 4% der üblichen Menge an α -PEC rekonstituiert werden (Zhao *et al.* 2005b).

3.5.5 Übertragung des lyasegebunden Chromophors auf das Apoprotein PecA

Beide Lyasenuntereinheiten sind in der Lage PCB, in substöchiometrischen Mengen zu binden. Dabei handelt es sich um eine starke, wahrscheinlich kovalente Bindung des Chromophors an das Protein, da in der Zn²⁺-induzierten Fluoreszenzfärbung der SDS-PAGE Signale der PCB-PecE- und PCB-PecF-Chromoproteine detektiert werden können (Abbildung 3-60).

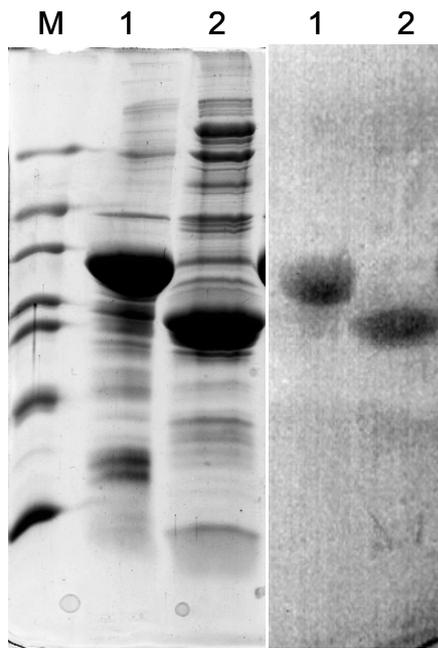


Abbildung 3-60: SDS-PAGE des PecE-Chromoproteins (1) und PecF-Chromoproteins (2). Links: Coomassiefärbung; rechts: Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz, invertiert und kontrastverstärkt; M = Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa)

Aus dem Vergleich der Coomassie-Färbung und des Zn²⁺-induzierten Fluoreszenzjgels der SDS-PAGE ist ersichtlich, dass es zu keiner quantitativen Bindung des Chromophors an die Lyase-Untereinheiten kommt. Die Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz der SDS-PAGE ist schwach ausgeprägt, besonders im Vergleich mit chromophortragenden Biliproteinen. Eine quantitative Auswertung ergab, dass die Lyase-Untereinheiten maximal 10% des eingesetzten Chromophors binden. Die geringen Produktausbeuten von PCB-PecE und PCB-PecF, sowie deren schwache Fluoreszenzsignale in der SDS-PAGE lassen vermuten, dass die Bindung von PCB an die Lyase-Untereinheiten nicht spezifisch oder reversibel erfolgt. Das bedeutet, dass es zwar zu Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und dem Chromophor kommen kann, jedoch sind diese *in vivo* oder unter vollständigen *in vitro*-Rekonstitutionsbedingungen temporär.

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass beide Lyase-Untereinheiten in der Lage sind, den PCB-Chromophor (kovalent) zu binden. In diesem Kapitel wird untersucht, ob der lyase-gebundene Chromophor auf das Apoprotein PecA übertragen werden kann. Dazu wurden a) PecE, b) PecF und c) PecE/F jeweils mit PCB für drei Stunden bei 37 °C inkubiert, affinitätschromatographisch gereinigt,

gegen Trispuffer (1 M, pH 6.0) dialysiert und in Rekonstitutionen mit PecA eingesetzt. Die Absorptions- und Emissionsspektren von a) und b) ähneln den Spektren, wie sie in Kapitel 3.5.3 und Kapitel 3.5.4 beschrieben sind. Die Inkubationen der gereinigten und dialysierten Ansätze von a) und b) mit PecA führten zu keiner Übertragung des Chromophors auf das Apoprotein, da weder die reversible Photochemie des PVB-Chromophors noch ein für α -PEC typisches Fluoreszenz-Emissionssignal bei 584 nm nach Anregung bei 525 nm detektiert werden konnte. Auch der Zusatz der jeweils fehlenden Lyase-Untereinheit zu den Ansätzen a) und b) resultierte nicht in einem rekonstituierten Apoprotein. Eine Übertragung des Chromophors von der Lyase auf das Apoprotein konnte hingegen im Ansatz c) beobachtet werden.

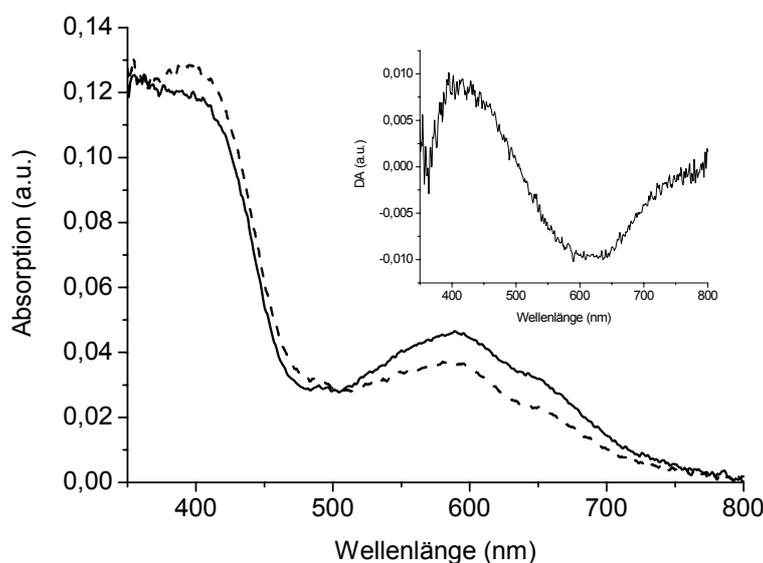


Abbildung 3-61: Übertragung des lyasegebundenen Chromophors auf PecA.

Absorptionsspektren nach 0 h (—) und 5 h (- - -) Inkubation bei 37 °C im Dunkeln. Die Reaktion erfolgte in Trispuffer (1 M, pH 6.0, 0.85% Triton X-100 (v/v)), PecA (25 μ M), PecE (60 μ M), PecF (60 μ M); Inset: Differenzspektrum 5 h *minus* 0 h.

Das Absorptionsspektrum des lyasegebundenen Chromophors zeigt vor Zugabe von PecA ein Maximum bei 590 nm und eine Schulter bei ca. 650 nm (Abbildung 3-61). Somit entspricht dieses Spektrum einer Überlagerung der Einzelspektren von PCB-PecE und PCB-PecF. Nach fünfstündiger Inkubation bei 37 °C im Dunkeln kam es zu einer Abnahme der Absorption im roten Wellenlängenbereich, während die

Absorption im Bereich von ca. 420 nm zunahm. Eine Chromophorübertragung, die in Maxima für α -PEC (568 nm) oder PCB-Addukt (641 nm) resultieren würde, konnte durch Aufnahme von Absorptionsspektren der Reaktion nicht festgestellt werden. Um dennoch eine mögliche α -PEC-Bildung detektieren zu können, wurde der Ansatz mit 505 nm-Licht und 570 nm-Licht belichtet, um die reversible Photochemie des PVB-Chromophors zu induzieren.

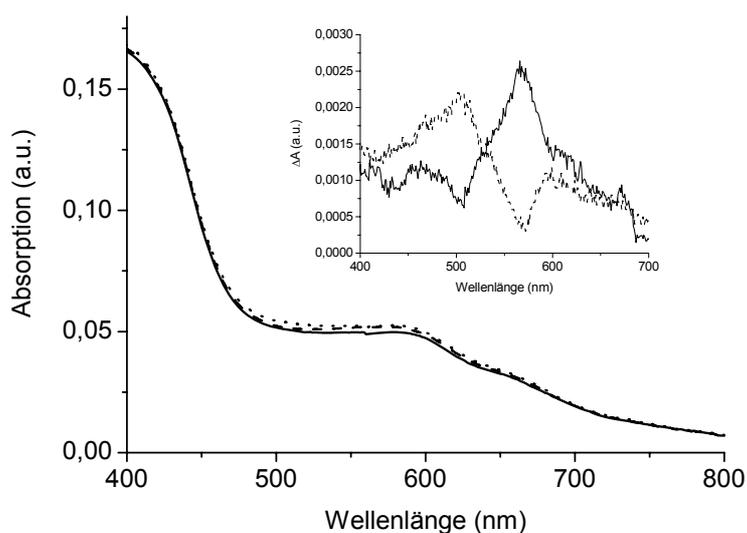


Abbildung 3-62: Lichtinduzierter, reversibler Photochromismus von PCB-PecA nach Übertragung des lyasegebundenen Chromophors auf PecA.

Absorptionsspektren nach Belichtung mit 570 nm-Licht (—), Belichtung mit 505 nm-Licht (- - -) und Belichtung mit 570 nm-Licht ($\cdot \cdot \cdot$); Inset: Differenzspektralen des Belichtungszykluses 570 nm – 505 nm – 570 nm.

Bei der Probe handelt es sich um die selbe Probe wie in Abbildung 3-61, jedoch erfolgte die Aufnahme der Spektren des Belichtungszykluses an einem Photometer der Firma Perkin Elmer, die Spektren des Reaktionsverlaufes in Abbildung 3-61 hingegen an einem Photometer der Firma Shimadzu mit Ulbricht-Kugel.

Durch Differenzspektroskopie (Abbildung 3-62) konnte eine reversible Photochemie mit einem $\Delta\Delta A$ -Wert von ca. 25% detektiert werden. Dabei treten die für α -PEC typischen Maxima bei 505 und 568 nm auf.

Die mögliche Chromophorübertragung wurde zusätzlich mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden untersucht (Abbildung 3-63).

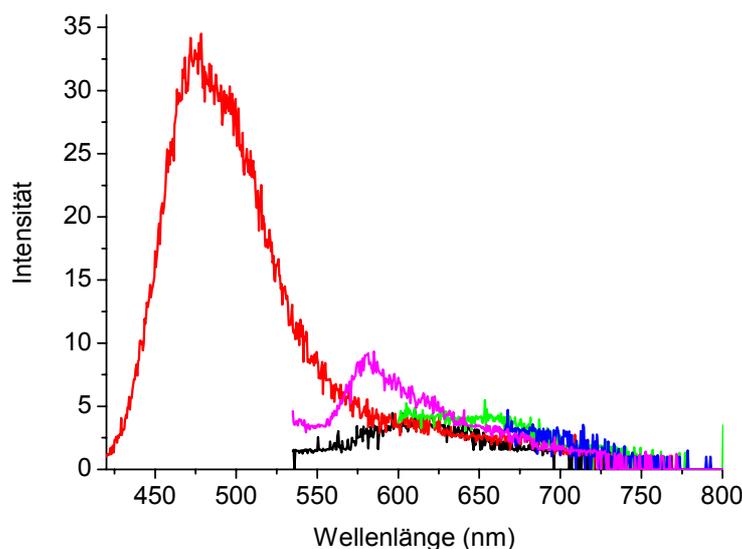


Abbildung 3-63: Fluoreszenz-Emissionsspektren des PCB-PecE/PecF-Chromoproteins vor der Rekonstitution mit PecA (—/—/—/—) und Fluoreszenz-Emissionsspektrum des selben Gemisches nach Rekonstitution mit His₆-PecA (—).

Excitation bei 420 nm (—), 525 nm (—/—), 590 nm (—) und 650 nm (—).

Vor Zugabe von PecA zum PCB-Lyase-Gemisch konnte nur nach Anregung bei 420 nm eine Emission bei 475 nm detektiert werden. Im Gegensatz zur Inkubation von PCB mit PecE bzw. PecF (Kapitel 3.5.3 und 3.5.4) konnte keine Fluoreszenz bei 655 nm durch Anregung bei verschiedenen Wellenlängen induziert werden. Eine Anregung bei 525 nm zeigte kein Fluoreszenzsignal bei 584 nm, wie es für einen PVB-Chromophor charakteristisch wäre. Erst nach Zugabe von PecA zum PCB-Lyase-Gemisch und nach Inkubation für fünf Stunden bei 37 °C im Dunkeln konnte eine Fluoreszenz-Emission bei 584 nm nach Anregung mit 525 nm-Licht induziert werden. Die reversible Photochemie sowie das Emissionssignal bei 584 nm lassen auf eine Übertragung des Chromophors von der Lyase auf das Apoprotein schließen. Die geringe α -PEC-Ausbeute bei der Übertragung des Chromophors von der Lyase auf das Apoprotein kann darauf zurückgeführt werden, dass es, bedingt durch die lange Versuchsdauer mit wiederholten Reinigungs- und Dialyseschritten, zu Aktivitätsverlusten und Chromophoroxidationen kommt. Für eine optimale α -PEC-Bildung muss es zu koordinierten Wechselwirkungen zwischen den Proteinkomponenten und zu Protein-Chromophorwechselwirkungen kommen. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass es zu Wechselwirkungen zwischen PecE

und PecF kommt, bei denen der Chromophor gebunden werden kann. Dennoch schließt die geringe Affinität der Lyase-Untereinheiten zu PCB einen Reaktionsschritt aus, bei dem es zuerst zu Interaktionen zwischen den Lyase-Untereinheiten und PCB kommt.

3.6 Protein-Protein-Interaktionen

Bei der enzymkatalysierten Reaktion der PVB-Adduktbildung kommt es zum Zusammenspiel dreier Proteinkomponenten und dem Chromophor. Dabei muss es zum einen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen und zum anderen zu Protein-Chromophorwechselwirkungen kommen. Um die Funktion und Wechselwirkung der beteiligten Proteinkomponenten und dem Chromophor näher zu untersuchen, wurden mit Hilfe der Gel-Permeationschromatographie (GPC) mögliche Komplexbildungen zwischen den Proteinen sowie dem Chromophor untersucht. Die GPC dient dabei auch zur Abschätzung der Größe von Proteinaggregaten. Alle verwendeten Proteine wurden vor dem Auftragen auf die Gelfiltrationssäule zweimal affinitätschromatographisch gereinigt, um mögliche Wechselwirkungen mit bakteriellen Proteinen zu vermeiden.

Für die GPC wurden überwiegend His₆-Tag-Proteine verwendet. Trotz des relativ großen Molekulargewichts des Tags (5,2 kDa) scheint dieser die Reaktion zwischen den Lyase-Untereinheiten und dem Apoprotein nicht zu beeinflussen (Zhao *et al.* 2002). Unter dieser Annahme wird ein möglicher störender Einfluss des His₆-Tags nicht berücksichtigt.

Die Molekulargewichte der Proteinkomplexe werden in den Abbildungsbeschriftungen in Klammern (berechnet/experimentell ermittelt) angegeben.

3.6.1 Homo-Proteinkomplexe

In diesem Abschnitt soll zunächst auf der Ebene der Einzelproteine untersucht werden, ob diese als Monomer oder in höher aggregierten Komplexen vorliegen. Die Versuche wurden teilweise in Ab- und Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol

durchgeführt, um zu überprüfen, ob durch Reduktion von Cysteinen (intermolekulare Disulfidbrücken) die Komplexgrößen beeinflusst werden können.

3.6.1.1 Apoprotein PecA

In Abbildung 3-64 ist das Chromatogramm der Gelfiltration von His₆-PecA dargestellt.

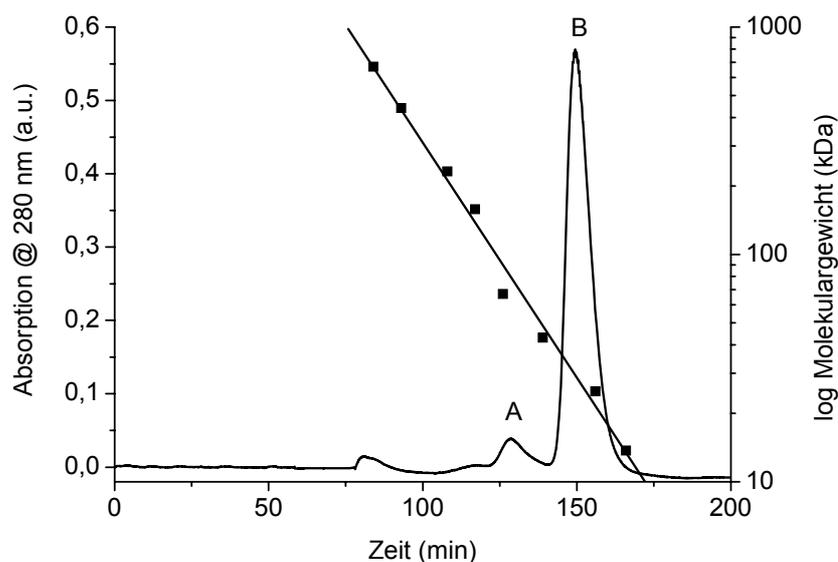


Abbildung 3-64: Chromatogramm der Gelfiltration von His₆-PecA.

A: Dimer (45,4/60 kDa), B: Monomer (22,7/27 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 669, 440, 232, 158, 67, 43, 25, 13.7 kDa).

Das Chromatogramm bei 280 nm zeigt zwei Peaks bei 128 min und 150 min. Die dazu ermittelten Molekulargewichte betragen für den Peak A 60 kDa und für den Peak B 27 kDa. Somit kann der Peak A einem His₆-PecA-Dimer und der Peak B einem His₆-PecA-Monomer zugeordnet werden. Das Gleichgewicht liegt weit auf der Seite des Monomers und His₆-PecA zeigt kaum Tendenz zur Bildung von größeren Proteinaggregaten. Hingegen zeigt natives α -PEC eine große Neigung zur Bildung von Homo-Dimeren (persönl. Mitteilung von PD M. Schmidt, TU München). Für diese Aggregation des nativen α -PEC sind die beiden N-terminalen X- und Y-Helices verantwortlich, die im Phycoerythrocyanin zur Dimerisierung der α - und β -Untereinheiten dienen. PecA liegt dagegen hier als His₆-PecA mit einem 5,2 kDa großen His₆-Tag am N-terminalen Ende vor, der eine mögliche Aggregation der

Apoproteine unterbindet. Eine weitere Möglichkeit zur Komplexbildung, außer über die beiden N-terminalen Helices, scheint es bei PecA nicht zu geben. Des Weiteren ist es möglich, dass das Apoprotein, anders als das chromophortragende α -PEC, eine abweichende Tertiärstruktur aufweist, und deswegen nicht in der Lage ist, Dimere über die beiden N-terminalen Helices zu bilden.

3.6.1.2 Lyase- α -Untereinheit PecE

Die Neigung von His₆-PecE zur Bildung von Homo-Proteinkomplexen kann aus Abbildung 3-65 abgeschätzt werden.

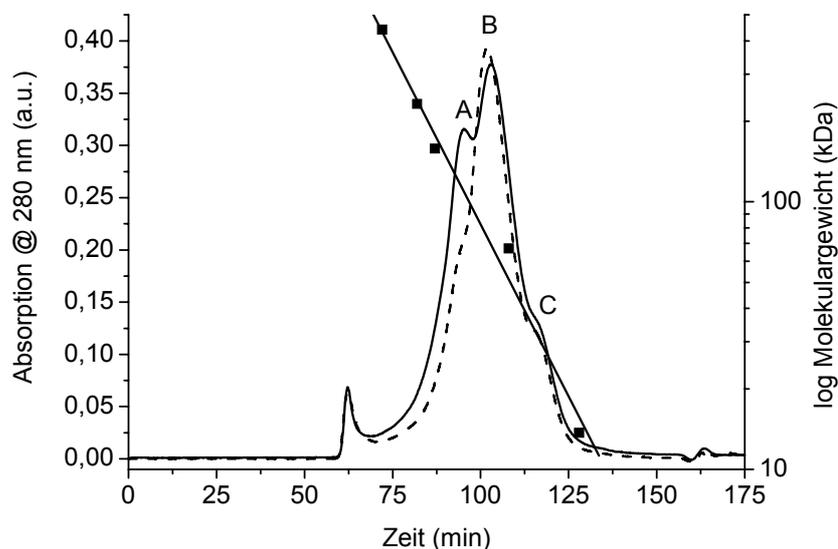


Abbildung 3-65: Chromatogramme der Gelfiltration von His₆-PecE in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol (- - -).

A: Trimer (105,6/100 kDa), B: Dimer (70,4/65 kDa), C: Monomer (35,2/29 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 440, 232, 158, 43, 13.7 kDa).

His₆-PecE liegt in Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol in Form von drei unterschiedlich großen Proteinkomplexen vor. Die Molekulargewichtsbestimmung der His₆-PecE-Proteinkomplexe mittels Eichproteinen ergibt, dass His₆-PecE vorwiegend als Trimer und Dimer vorliegt. Es zeigt sich ein geringfügiger Einfluss von 2-Mercaptoethanol, der das Gleichgewicht zugunsten des Dimers verschiebt.

Demnach scheint PecE in seiner Aminosäuresequenz ein Motiv zu besitzen, das Protein-Protein-Interaktionen über Disulfidbrücken ermöglicht.

3.6.1.3 Lyase- β -Untereinheit PecF

Abbildung 3-66 zeigt Homo-Proteinkomplexe von PecF in An- und Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol.

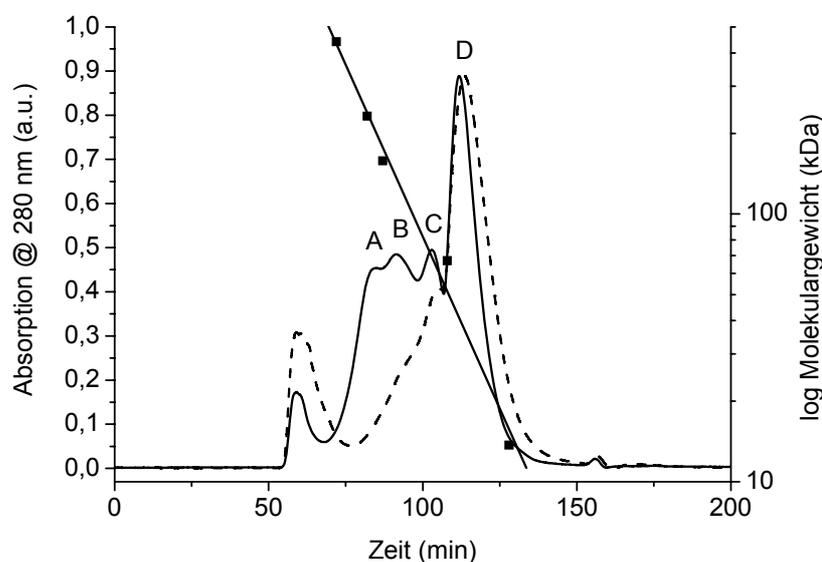


Abbildung 3-66: : Chromatogramme der Gelfiltration von PecF in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol (- - -).

A: Nonamer (189,9/197 kDa), B: Hexamer (126,6/120 kDa), C: Trimer (63,3/61 kDa), D: Monomer (21,1/33 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 440, 232, 158, 43, 13.7 kDa).

PecF zeigt im Gegensatz zu His₆-PecA und His₆-PecE deutlich komplexere Protein-Protein-Wechselwirkungen. Neben der monomeren Form (Peak D) konnten in Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol höher aggregierte Komplexe (Nonamer, Hexamer und Trimer) detektiert werden. 2-Mercaptoethanol zeigt im Gegensatz zur Lyase- α -Untereinheit einen deutlichen Einfluss auf die Größe der PecF-Komplexe. Das Gleichgewicht der Komplexe wird in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol fast vollständig auf die Seite des Monomers verschoben. Dies deutet auf eine Beteiligung von Disulfidbrücken bei der Komplexbildung hin.

3.6.2 Hetero-Proteinkomplexe

Zur Chromophorbinding an das Apoprotein müssen die Proteinkomponenten miteinander in Wechselwirkung treten. Mit der Untersuchung der Komplexbildung zwischen den Lyase-Untereinheiten und dem Apoprotein soll geprüft werden, ob eine gegenseitige Protein-Protein-Interaktion auftritt. Dazu wurden zum einen die Interaktion zwischen den Lyase-Untereinheiten selbst und zum anderen die Interaktionen zwischen den Lyase-Untereinheiten mit dem Apoprotein in An- und Abwesenheit des Chromophors untersucht. Das Elutionsprofil der Gelfiltration wurde mittels SDS-PAGE analysiert, um auftretende Komplexe auf ihre Proteinzusammensetzung hin zu untersuchen.

3.6.2.1 Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Lyase-Untereinheiten PecE und PecF

Abbildung 3-67 zeigt das Komplexbildungsverhalten zwischen den Lyase-Untereinheiten PecE und PecF.

His₆-PecE und PecF bilden zusammen große Proteinaggregate mit Molekulargewichten zwischen 286 kDa und 58 kDa. Dabei zeigt die Analyse der SDS-PAGE stets ein 1:1-Verhältnis zwischen His₆-PecE und PecF. Im Überschuss eingesetztes PecF-Protein eluiert als monomeres Protein von der Gelfiltrationssäule. Die beiden Lyase-Untereinheiten scheinen in der Lage, sich gegenseitig über Bindungsdomänen zu erkennen und zusammen eine funktionelle Einheit zu bilden. Cofaktoren scheinen zur Bildung des Komplexes zwischen PecE und PecF nicht notwendig zu sein.

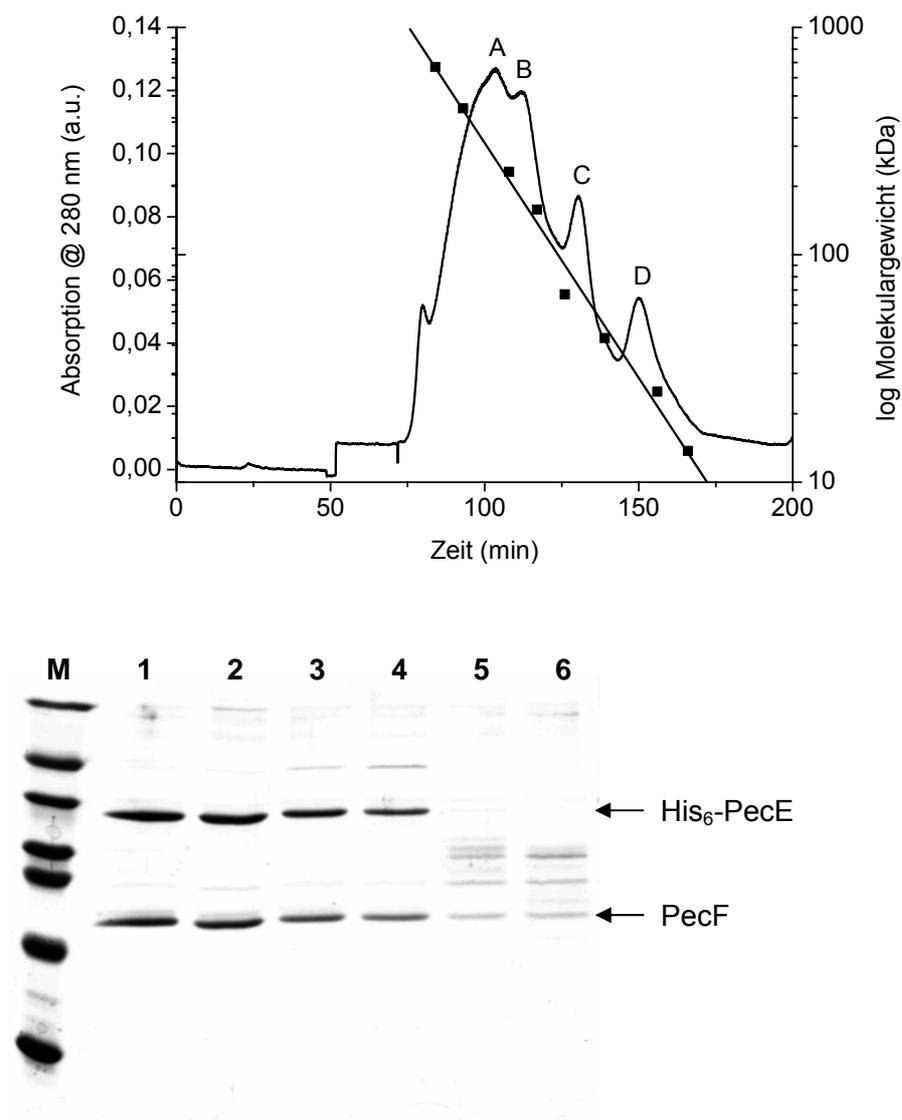


Abbildung 3-67: Chromatogramm (oben) und SDS-PAGE (unten) der Gelfiltration von His₆-PecE mit PecF.

Chromatogramm: A: (His₆-PecE/PecF)₅ (281,5/286 kDa), B: (His₆-PecE/PecF)₃ (168,9/194 kDa), C: (His₆-PecE/PecF) (56,3/58 kDa), D: PecF-Monomer (21,1/28 kDa). Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 669, 440, 232, 158, 67, 43, 25, 13,7 kDa); SDS-PAGE: 1: 103 min, 2: 114 min, 3: 129 min, 4: 135 min, 5: 144 min, 6: 155 min, M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa).

3.6.2.2 Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Lyase-Untereinheiten und dem Apoprotein PecA

Zur PecE-katalysierten Chromophorbinding von PCB an PecA muss es zu einer Interaktion zwischen dem Apoprotein und der Lyase bzw. mindestens zu einer der

beiden Lyase-Untereinheiten kommen. Dazu wurden His₆-PecA, His₆-PecE und His₆-PecF miteinander inkubiert und mittels Gelfiltration wurden Protein-Protein-Interaktionen untersucht (Abbildung 3-68).

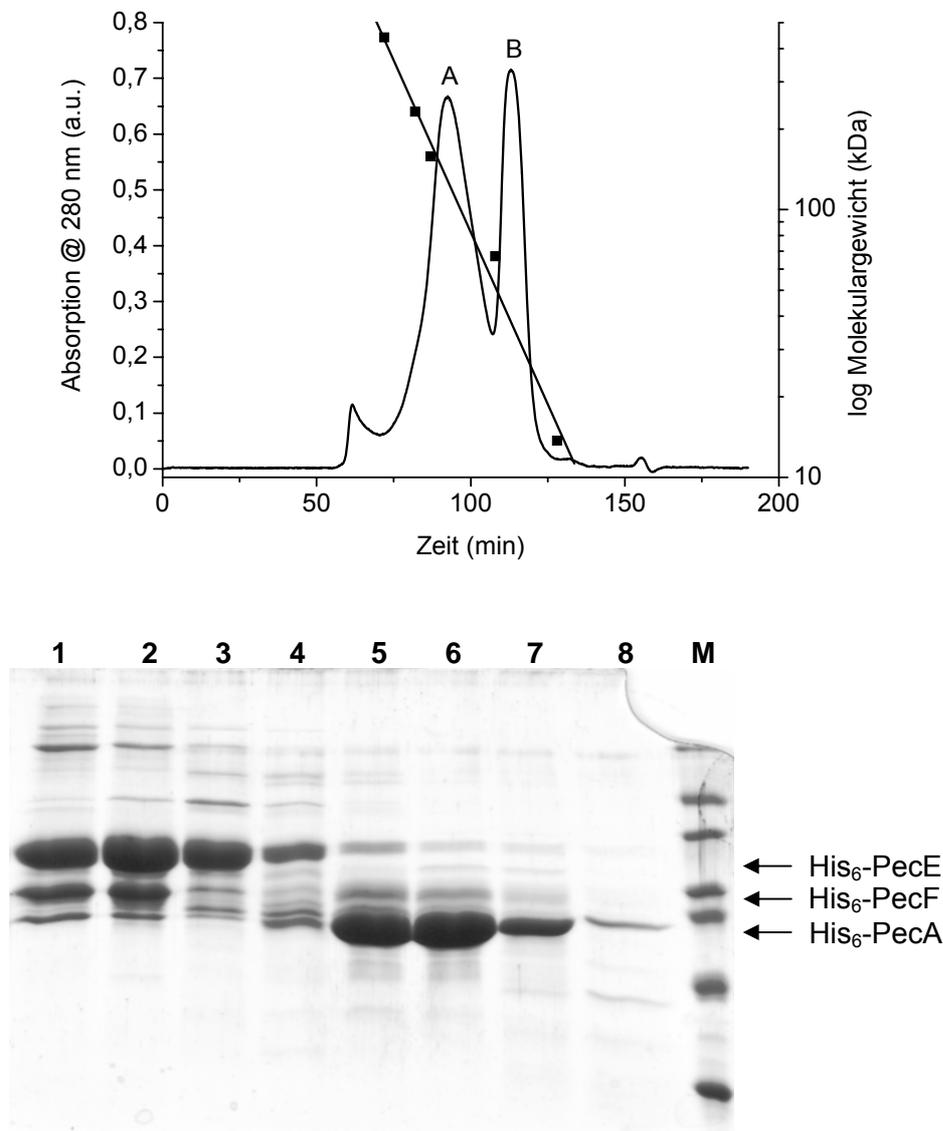


Abbildung 3-68: Chromatogramm (oben) und SDS-PAGE (unten) der Gelfiltration von His₆-PecE mit His₆-PecF und His₆-PecA.

Chromatogramm: A: (His₆-PecE/His₆-PecF)₂ (126,0/120 kDa); B: His₆-PecA (22,7/30 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 440, 232, 158, 43, 25, 13,7 kDa); SDS-PAGE: 1: 88 min, 2: 94 min, 3: 99 min, 4: 110 min, 5: 113 min, 6: 117 min, 7: 120 min, 8: 130 min; M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa).

Das Chromatogramm zeigt zwei Peaks (A, B) mit Molekulargewichten von 115 kDa bzw. 33 kDa. Deren Zusammensetzung wurde mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert.

Dabei zeigte sich, dass es zur Komplexbildung zwischen His₆-PecE und His₆-PecF kommt (Peak A), jedoch nicht in einem stöchiometrischen 1:1-Verhältnis (Spuren 2 und 3 der SDS-PAGE) wie bei Mischungen aus His₆-PecE und PecF (s. Kapitel 3.6.2.1). Dies kann entweder daran liegen, dass His₆-PecF nicht in äquimolarer Menge zu His₆-PecE eingesetzt wurde, oder daran, dass der voluminöse His-tag eine sterische Behinderung darstellt und es dadurch nicht zu 1:1-Komplexen zwischen His₆-PecE und PecF, wie in Kapitel 3.6.2.1 beschrieben, kommt. Spuren 4 und 5 zeigen Banden für His₆-PecE, die sich ebenfalls unter dem Peak A befinden. Bei den Banden mit geringer Intensität, in den Spuren 1 bis 4, die sich auf ungefährer Höhe von His₆-PecA befinden, könnte es sich um His₆-PecA handeln. Dies würde auf eine reversible Interaktion von His₆-PecA mit dem Lyasekomplex hindeuten. Peak B besteht aus monomerem PecA-Protein. Die Inkubation der drei Proteinkomponenten zeigt eine Wechselwirkung zwischen PecE und PecF, jedoch keine bzw. nur geringe Protein-Protein-Interaktion zwischen PecA und den Lyase-Untereinheiten. Daraus lässt sich schließen, dass die Lyase-Untereinheiten keinen Komplex mit dem Apoprotein bilden bzw. dass ein möglicher Komplex zwischen PecE/PecF und dem Apoprotein sich im Gleichgewicht mit den Einzelproteinen befindet, wobei die Lage des Gleichgewichts auf der Seite der Einzelproteine liegt. Demnach kann es sich bei der Bindung von PecA an die Lyase-Untereinheiten um schwache Wechselwirkungen handeln, oder aber ein weiterer Cofaktor (Chromophor) ist zur gegenseitigen Erkennung notwendig. PecA alleine reicht für eine stabile Komplexbildung zwischen der Lyase und dem Apoprotein nicht aus.

3.6.2.3 Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase- β -Untereinheit und dem Apoprotein PecA

Abbildung 3-69 zeigt das Elutionsprofil der GPC aus der Inkubation von PecF mit PecA.

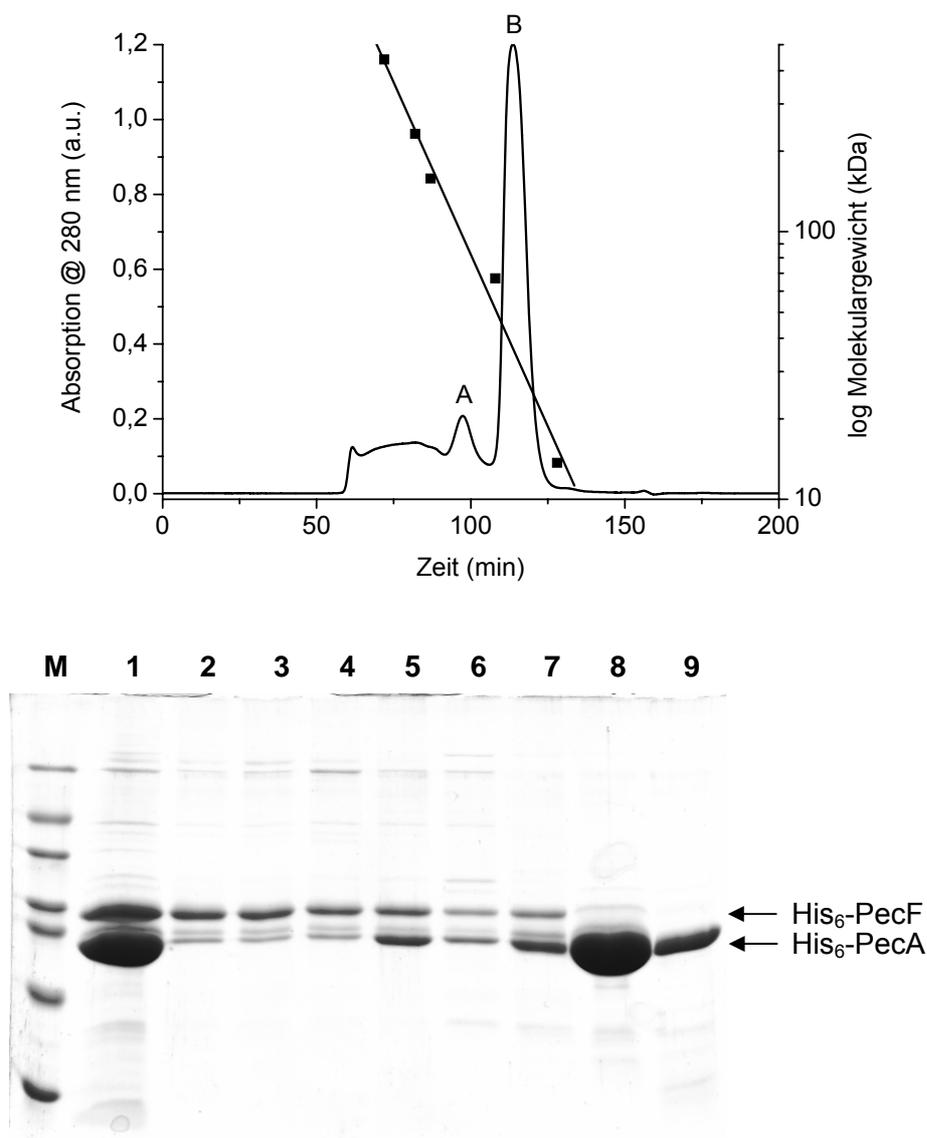


Abbildung 3-69: Chromatogramm (oben) und SDS-PAGE (unten) der Gelfiltration von His₆-PecF mit His₆-PecA.

Chromatogramm: A: (His₆-PecA/F)₂ (101,0/89 kDa), B: His₆-PecA (22,7/30 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 440, 232, 158, 43, 13.7 kDa); SDS-PAGE: 1: vor Gelfiltration, 2: 75 min, 3: 81 min, 4: 87 min, 5: 96 min, 6: 102 min, 7: 108 min, 8: 115 min, 9: 124 min; M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa).

Die Analyse der Gelfiltration von His₆-PecF mit His₆-PecA ist nicht ganz eindeutig (Abbildung 3-69). Das Chromatogramm zeigt zwei distinkte Peaks mit Größen von 89 und 30 kDa, die mit Hilfe der Eichproteine und der SDS-PAGE einem PecA/F-Heterodimer und dem His₆-PecA-Monomer zugeordnet werden können. Die Analyse der SDS-PAGE deutet ebenfalls auf eine Komplexbildung zwischen His₆-PecF und

His₆-PecA hin. Diese Interaktion ist abhängig von der Komplexgröße. Im Bereich von hohem Molekulargewicht kommt es zu nur geringen Interaktionen zwischen PecF und PecA. PecF zeigt in Abwesenheit von thiolreduzierenden Reagenzien eine Bildung von höher aggregierten Komplexen (Kapitel 3.6.1.3). Hingegen zeigen PecA und PecF im niedrigen Molekulargewichtsbereich der Trennsäule ein annäherndes 1:1-Verhältnis. Der Peak B kann nach Analyse der SDS-PAGE eindeutig dem PecA-Monomer zugeordnet werden. Bei diesem Experiment wurde mehr PecA als PecF eingesetzt. Deswegen eluiert überschüssiges PecA als eigene Fraktion von der Trennsäule.

3.6.2.4 Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase- α -Untereinheit und dem Apoprotein PecA

In den kinetischen Experimenten zeigte sich, dass PecE nach Vorinkubation mit PecA die Additionsreaktion von PCB an PecA stark beschleunigt (s. Kapitel 3.3.1.2). Folglich muss es zu Interaktionen zwischen dem Apoprotein und der Lyase- α -Untereinheit kommen. Um diese Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden GPC-Experimente durchgeführt, die auch den Einfluss des Cofaktors Mn²⁺ und des Chromophors (s. Kapitel 3.6.2.5) näher betrachten.

Abbildung 3-70 zeigt das Chromatogramm und die SDS-PAGE der Gel-Permeationschromatographie von His₆-PecA mit His₆-PecE.

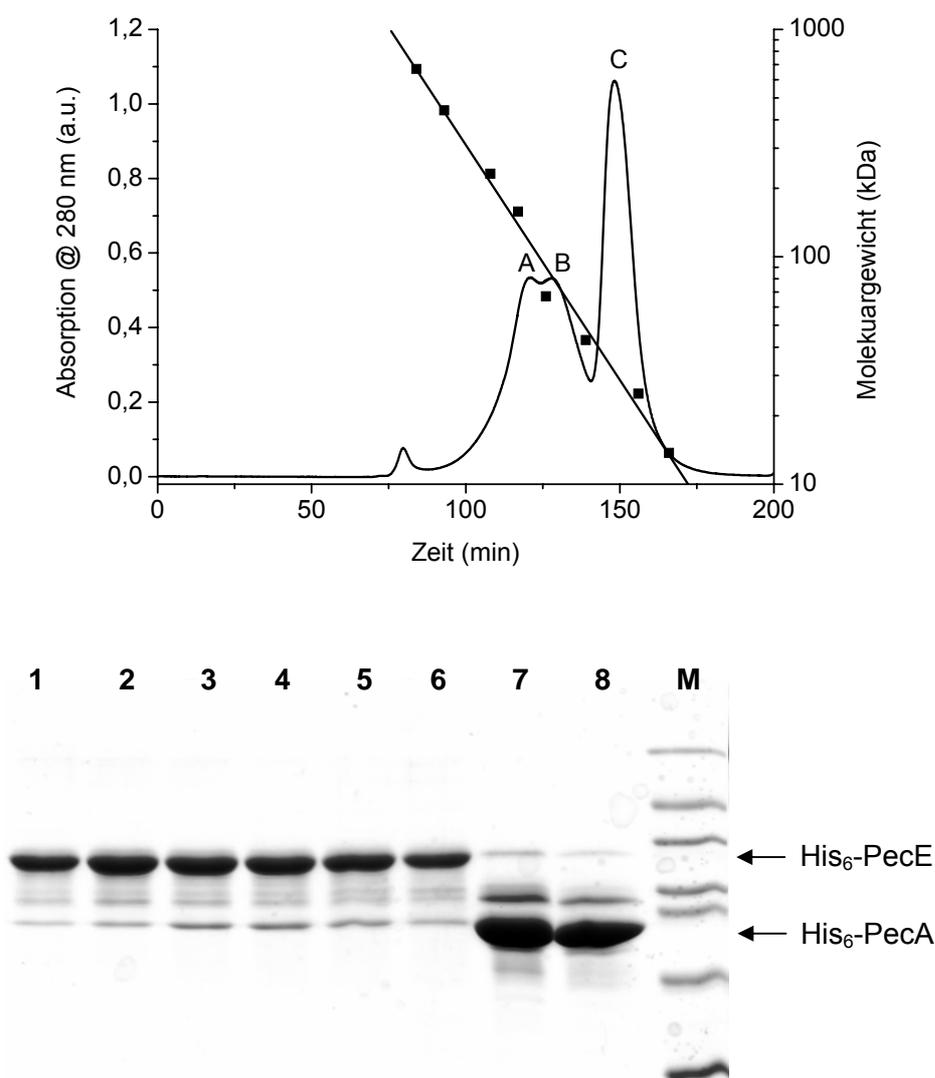


Abbildung 3-70: Chromatogramm (oben) und SDS-PAGE (unten) der Gelfiltration von His₆-PecE mit His₆-PecA.

Chromatogramm: A: (His₆-PecE)₃ (105,6/86 kDa), B: (His₆-PecE)₂ (70,4/65 kDa), His₆-PecA (22,8/30 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 669, 440, 232, 158, 67, 43, 25, 13,7 kDa); SDS-PAGE: 1: 115 min, 2: 119 min, 3: 123 min, 4: 127 min, 5: 131 min, 6: 136 min, 7: 147 min, 8: 151 min; M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa).

Das Chromatogramm der Gelfiltration von His₆-PecE mit His₆-PecA zeigt drei unterscheidbare Peaks A, B und C (Abbildung 3-70). Peak A und B unterscheiden sich nur in ihrem Molekulargewicht, jedoch nicht in der Proteinzusammensetzung, wie die Analyse der SDS-PAGE zeigt. Demnach handelt es sich bei Peak A um einen trimeren Komplex und bei Peak B um einen dimeren Komplex aus His₆-PecE, wie sie bereits bei Inkubation ohne PecA gefunden wurden. Peak C besteht aus

monomeren His-PecA. Geringe Mengen von PecA in den Spuren 1 bis 6 der SDS-PAGE lassen eine mögliche Interaktion zwischen His₆-PecE und His₆-PecA erkennen, jedoch liegt das Gleichgewicht sehr stark auf der Seite der Einzelproteine. Demnach kommt es zwischen His₆-PecE und His₆-PecA in Abwesenheit des Chromophors nur zu geringen Protein-Protein-Interaktionen.

Das gleiche GPC-Ergebnis wurde erhalten, wenn Mn²⁺ als Cofaktor mit His₆-PecA und His₆-PecE inkubiert wurde. Mn²⁺ hat somit keinen Einfluss auf die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen His₆-PecA und His₆-PecE.

Der Sequenzvergleich verschiedener α -Lyase-Untereinheiten zeigt ein Motiv, welches bei NblA, einem am Phycobilisomabbau beteiligtem Protein, ebenfalls vorkommt (Kapitel 3.5.1). Der Phycobilisomabbau bzw. -umbau erfolgt durch Veränderungen der Umweltfaktoren wie z. B. Stickstoffmangel (Collier *et al.* 1994). Dabei erfolgt der proteolytische Abbau in einem kontrollierten Prozess, um stickstoffhaltige Verbindungen wiederzugewinnen und eine Schädigung der Zelle durch Licht zu vermeiden (Yamanaka *et al.* 1980, Collier *et al.* 1992). Eine Schlüsselrolle kommt dabei dem ca. 7 kDa großen NblA-Protein zu. Wird die Expression von NblA z. B. durch Stickstoffmangel induziert, führt dies zu einer Farbveränderung der Zellen von blau-grün nach gelb-grün (Allen *et al.* 1969). Die Funktion von NblA ist bis heute nicht geklärt und es existieren mehrere Theorien über dessen Rolle (Collier *et al.* 1994, Luque *et al.* 2003). Die Kristallstruktur NblA aus *Anabaena sp.* (PCC7120) wurde von Bienert *et al.* (Bienert *et al.* 2006) gelöst und zeigt als funktionelle Einheit ein Dimer, das jeweils aus einem Bündel von vier α -Helices besteht. Zudem konnten sie zeigen, dass NblA spezifisch an Bereich der Y- und A-Helices der α -Untereinheiten von Phycocyanin und Phycoerythrocyanin bindet. Vor kurzem durchgeführte Komplexbindungsstudien von NblA mit mini- α -PEC zeigen allerdings, dass es trotz fehlender X- und Y-Helices zu einer Erkennung und Bindung zwischen NblA und mini- α -PEC kommt (Abbildung 3-71).

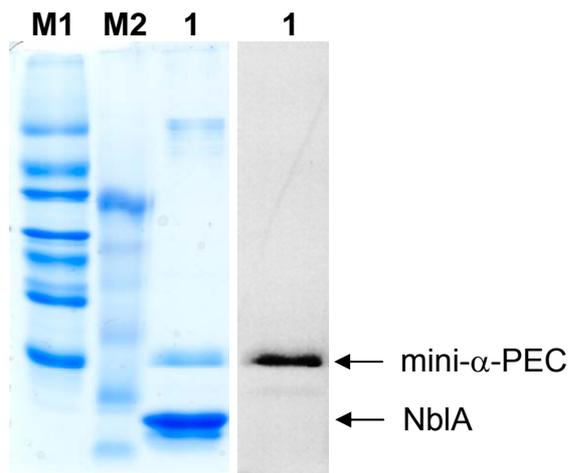


Abbildung 3-71: SDS-PAGE zur Interaktion von NblA mit mini- α -PEC.

Coomassie-Färbung (links), Zn^{2+} -induzierte Fluoreszenz (rechts), 1: NblA und mini- α -PEC, Eluat der GPC (Sephadex G75, 50 mM K_2HPO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.0); Marker M1: 67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa; M2: Marker: 36.4, 26, 22, 16, 8.4, 3.8 kDa.

Die GPC wurde von M. Krajewski (MPI für Biochemie, Martinsried) durchgeführt.

Durch Austauschmutanten konnten Bienert *et al.* (Bienert *et al.* 2006) die Aminosäuren 51L und 53K, als notwendig für die Bindung an die Biliproteine identifizieren. Die kurze NblA-Aminosäuresequenz 51LLK kommt in Abwandlung in vielen NblA-Proteinen verschiedener Organismen vor. Interessanterweise besitzen die Lyase- α -Untereinheiten verschiedener Organismen dieses Motiv C-terminal in abgewandelter Form in ihren Aminosäuresequenzen (s. Abbildung 3-54, \$\$\$). Ausgehend von der Idee, dass PecE als Chaperon fungiert, kann diese Aminosäuresequenz somit ein mögliches Strukturmotiv zur Interaktion mit PecA sein.

In den beiden folgenden Kapiteln wird nun der Einfluss des Chromophors auf die Wechselwirkungen zwischen den Proteinkomponenten näher betrachtet.

3.6.2.5 Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase- α -Untereinheit, dem Apoprotein und PCB

In Abbildung 3-72 sind die Chromatogramme, Absorptionsspektren und die SDS-PAGE der GPC aus der Reaktion von His₆-PecA und His₆-PecE mit PCB in Gegenwart von Mn^{2+} abgebildet.

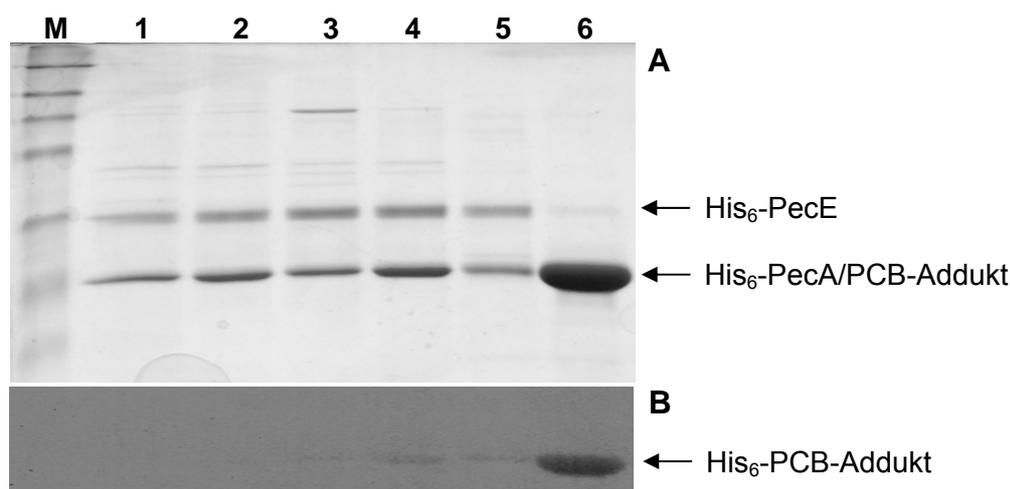
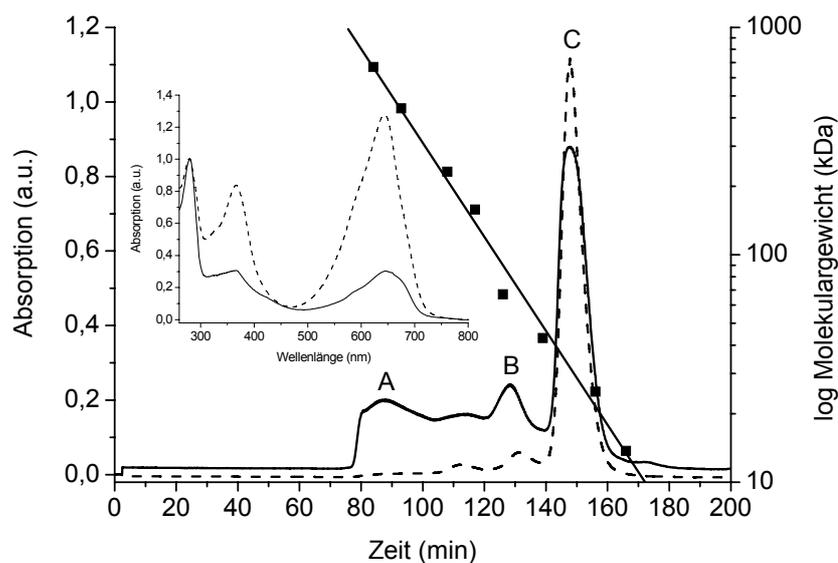


Abbildung 3-72: Chromatogramme und Absorptionsspektren (oben) sowie SDS-PAGE (unten) der Gelfiltration der Reaktion von His₆-PecE mit His₆-PecA und PCB. Chromatogramm: Detektion bei 280 nm (—) und 641 nm (- - -). A: (His₆-PecE/A)₉ (569/567 kDa)*, B: (His₆-PecE/A)₂-PCB (58,5/65 kDa), C: His₆-PCB-Addukt (23,3/30 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 669, 440, 232, 158, 67, 43, 25, 13.7 kDa); Inset: Absorptionsspektren zu den Zeitpunkten 130 min (—) und 148 min (- - -), die Spektren wurden in der Proteinabsorption bei 280 nm normiert. SDS-PAGE: A: Coomassie-Färbung; B: Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz; 1: 80 min, 2: 88 min, 3: 114 min, 4: 128 min, 5: 138 min, 6: 145 min, M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa). * Das ermittelte Molekulargewicht liegt außerhalb des Trennbereichs der GPC-Säule.

Die Inkubation von His₆-PecA mit der Lyase- α -Untereinheit und PCB führt zur PCB-Adduktbildung. Nach 20 min Reaktionszeit wurde das Produktgemisch mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und nach Dialyse auf die GPC-Säule

aufgetragen. Das Chromatogramm bei 280 nm zeigt zwei Bereiche, in denen unterschiedlich große Proteinkomplexe (567-65 kDa) auftreten. Im ersten Bereich von 75 min bis 137 min lassen sich Proteinkomplexe zwischen His₆-PecE und His₆-PecA nachweisen, bei denen es sich um 1:1-Komplexe der beiden Proteine handelt, wie die Analyse der SDS-PAGE zeigt. Der zweite Bereich besteht aus dem Produkt der Reaktion – PCB-Addukt in monomerer Form, ohne His₆-PecE. Die Detektion bei 641 nm sowie die Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz der SDS-PAGE zeigen, dass die kleineren Komplexe zwischen His₆-PecE und His₆-PecA PCB gebunden haben (Peak B). Belegt wird dieser Befund durch das Absorptionsspektrum bei 130 min, das auf eine Bindung von PCB an His₆-PecA hindeutet. Allerdings unterscheidet sich das Absorptionsspektrum deutlich von dem des PCB-Addukts bei 148 min. Die breite Form des Spektrums und der Q_{UV}^{VIS} -Wert von 0,9 lassen auf eine Interaktion des Chromophors mit den Proteinen schließen, bei der der Chromophor jedoch in einer mehr zyklisch-helicalen Konformation vorliegt.

3.6.2.6 Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Lyase, dem Apoprotein PecA und PCB

In Anwesenheit von PCB führt die Inkubation von His₆-PecA mit den beiden Lyase-Untereinheiten zur α -PEC-Bildung und dem Nebenprodukt PCB-Addukt. In Abbildung 3-73 sind die Chromatogramme der Gelfiltration bei verschiedenen Wellenlängen sowie die SDS-PAGE von Proben aus der GPC dargestellt.

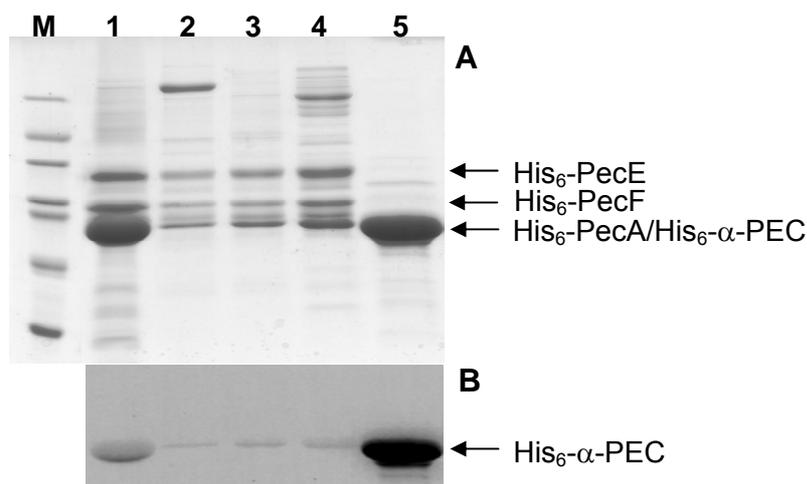
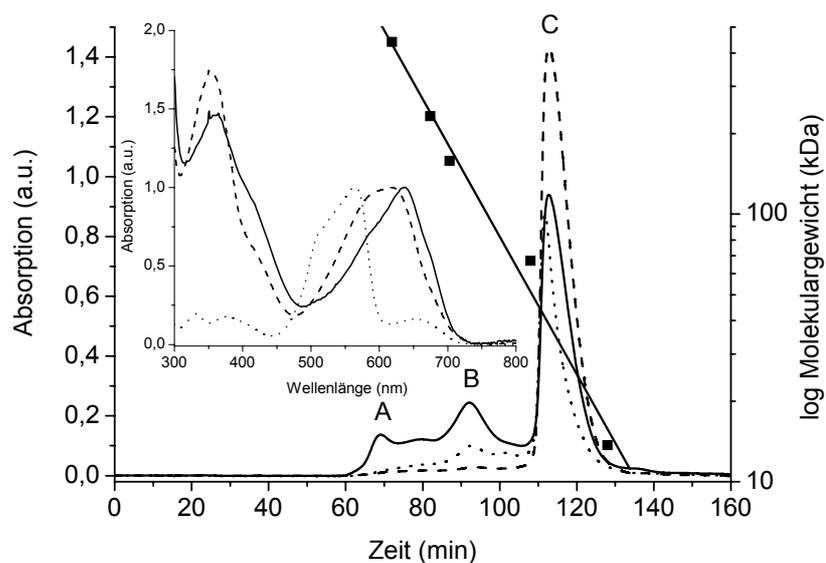


Abbildung 3-73: Chromatogramm (oben) und SDS-PAGE (unten) der Gelfiltration der Reaktion von His₆-PecE, His₆-PecF mit His₆-PecA und PCB.

Chromatogramm: Detektion bei 280 nm (—), 505 nm (- - -) und 641 nm (· · · ·). A: His₆-PecE/F/A-PCB-Hexamer (514/494 kDa)* B: His₆-PecE/F/A-PCB-Monomer (85,7/113 kDa), C: His₆-α-PEC- bzw. His₆-PCB-Addukt-Monomer (23,3/30 kDa); Eichgerade mit Markerproteinen (—■— 440, 232, 158, 43, 13,7 kDa); Inset: Absorptionsspektren zu den Zeitpunkten 93 min (—), 103 min (- - -) und 114 min (· · · ·), die Spektren wurden im jeweiligen roten Maximum normiert; SDS-PAGE: A: Coomassie-Färbung; B: Zn²⁺-induzierte Fluoreszenz; 1: vor Gelfiltration, 2: 70 min, 3: 80 min, 4: 93 min, 5: 114 min; M: Marker (67, 45, 36, 29, 24, 20, 14 kDa). * Das ermittelte Molekulargewicht liegt außerhalb des Trennbereichs der GPC-Säule.

Das Chromatogramm bei 280 nm ähnelt dem der Komplexbildung bei der PCB-Adduktbildung. Es lassen sich zwei Bereiche zeigen, die sich in ihrer

Proteinzusammensetzung unterscheiden. Im höheren Molekularbereich lassen sich Proteinkomplexe aus His₆-PecE, His₆-PecF und His₆-PecA nachweisen (Peak A, B). Das Molekulargewicht dieser Komplexe liegt zwischen 494 kDa (Hexamer) und 113 kDa (Monomer). Die Existenz des Hexamers ist aufgrund der Trenngröße der verwendeten Säule nicht eindeutig. Die Analyse der SDS-PAGE in diesem Bereich zeigt, dass die Lyase-Untereinheiten und das Apoprotein einen 1:1:1-Komplex bilden, der den Chromophor gebunden hat. Das Absorptionsspektrum des ternären Komplexes auf der GPC-Säule bei 93 min ähnelt dem Spektrum des Komplexes zwischen His₆-PecA/His₆-PecE-PCB (s. Kapitel 3.6.2.5). Das Maximum der Chromophorabsorption liegt bei 641 nm, der Chromophor ist in substöchiometrischen Mengen an den Komplex gebunden. Das Q_{UV}^{VIS} -Verhältnis weist einen um die Streuung korrigierten Wert von ca. 0,8 auf. Demnach liegt der Chromophor in dieser Stufe des Multiproteinkomplexes in zyklisch-helicaler Form vor. Die relativ schmale Bande des roten Maximums im Zusammenhang mit dem geringen Q_{UV}^{VIS} -Verhältnis könnte auf einen protonierten Chromophor hindeuten. Deutlich ist zu diesem Zeitpunkt eine Schulter bei ca. 685 nm zu erkennen, die auf ein mögliches MBV-Addukt zurückgeführt werden kann. Das Spektrum zum Zeitpunkt von 103 min zeigt eine breite Absorption zwischen 585 und 625 nm mit einem korrigierten Q_{UV}^{VIS} -Verhältnis von ca. 0,7, das auf einen proteingebundenen, zyklisch helicalen Chromophor hindeutet. Dennoch ist der Chromophor in seiner Konformationsfreiheit eingeengt, da die rote Absorptionsbande schmaler ist, verglichen mit PCB in Lösung. Deutlich sind sowohl in der 93 min- und 103 min-Fraktion Schultern in den Absorptionsspektren bei 420 nm zu erkennen, die auf Bilirubin zurückgeführt werden können.

Im niedrigeren Molekulargewichtsbereich ist bei allen drei dargestellten Detektionswellenlängen ein Peak bei 113 min zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt eluiert das Rekonstitutionsprodukt als Monomer von der Säule. Das Absorptionsspektrum zu diesem Zeitpunkt besitzt im Chromophorbereich Maxima bei 505, 568 und 641 nm. Demnach sind bei der Reaktion zwei Produkte – PVB- und PCB-Addukt – entstanden. Die Analyse der SDS-PAGE zeigt sowohl in der Coomassie-, als auch in der Zn²⁺-induzierten Fluoreszenzfärbung eine Bande bei 23 kDa, die dem His₆-PecA-Reaktionsprodukt zugeordnet werden kann.

Mittels GPC kann so ein Einblick in den Aufbau und die Zusammensetzung des

ternären Proteinkomplexes gewonnen werden. Die Tatsache, dass ein ternärer Komplex mit Chromophor mittels GPC isoliert werden kann, eröffnet die Möglichkeit diesen zu kristallisieren und so neue Einblicke in dessen Struktur und mögliche Reaktionsmechanismen zu gewinnen.

4 Abschließende Diskussion

4.1 Photochemie von α -PEC

Abbildung 4-1 zeigt die Chromophorumgebung von α -PEC aus *M. laminosus* im Vergleich mit R-PC aus *Polisiphonia urceolata*. Die Kristallstrukturen von C-PC aus *Fremyella diplosiphon* (Düring *et al.* 1991) und *Cyanidium caldarium* (Stec *et al.* 1999) sind im Bereich der Chromophorumgebung mit der Struktur von R-PC identisch.

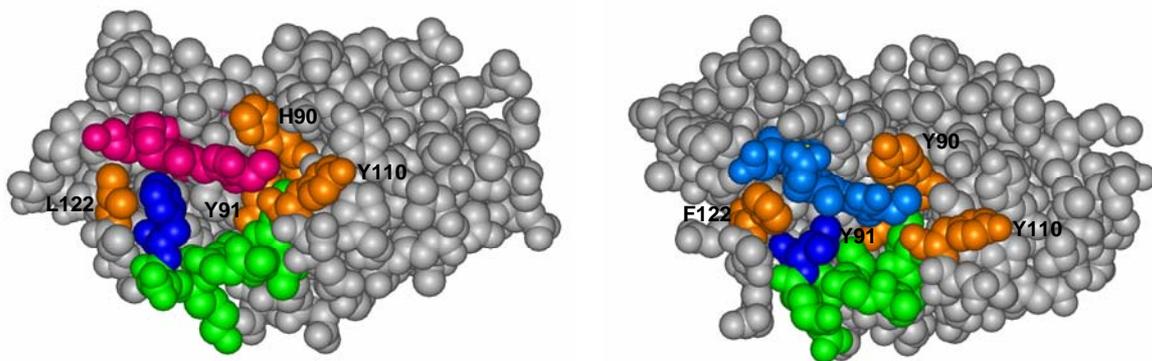


Abbildung 4-1: 3D-Strukturen (CPK-Modelle) der α -Untereinheiten von Phycoerythrocyanin (PEC) aus *Mastigocladus laminosus* (links) (Düring *et al.* 1990) und R-Phycocyanin (PC) aus *Polisiphonia urceolata* (rechts) (Jiang *et al.* 2001).

Dargestellt sind die Chromophordomänen, die Chromophore und Bindungstaschen sind farbig hervorgehoben, die X- und Y-Helices sind nicht abgebildet. Der PVB-Chromophor ist rosa und der PCB-Chromophor ist hellblau dargestellt. Unpolare sowie hydrophobe aliphatische Aminosäuren 111-117 der Bindungstaschen sind grün eingefärbt. PEC-Phe-118 bzw. PC-Ile-118 sind dunkelblau dargestellt. PEC-His-90 bzw. PC-Tyr-90, Tyr-91, 110, PEC-Leu-122 bzw. PC-Phe-122 sind orange koloriert.

Die Photochemie des α -PEC hängt nicht nur von der Struktur und Geometrie des Tetrapyrrols, sondern auch von der ihn umgebenden Proteinumgebung ab. Beim Vergleich der Kristallstrukturen und der Aminosäuresequenzen von α -PEC mit den α -Untereinheiten anderer, photochemisch inaktiver Phycobiliproteine, zeigen sich im Bereich des Ringes D einige Sequenzvarianten, die für den Photochromismus von Bedeutung sein können (Abbildung 4-1). Sowohl beim α -PEC wie auch beim PC bilden die Aminosäuren 111 bis 117 eine Tasche im Protein, die im Bereich des

Pyrrolrings D relativ „geräumig“ ist. Allerdings gibt es einige wichtige Unterschiede: In Position 118 findet sich beim α -PEC die Aminosäure Phenylalanin (bzw. Leucin bei *Anabaena sp.*) und bei PC Isoleucin bzw. Methionin. Während Phenylalanin die Tasche nicht einengt, ragt Isoleucin in die Tasche hinein und verringert die Distanz zum gegenüberliegenden Tyrosin 110 um 0,9 Å. Es ist vorstellbar, dass genau diese Verengung der Tasche eine Δ 15,16-*E/Z*-Isomerisierung des PCB-Chromophors verhindert. Die erste Röntgenstruktur eines Phytochroms (P_r -Form aus *Deinococcus radiodurans*) zeigt im Bereich des Ringes D zwei Phenylalanine, die zusammen mit einem Histidin und Tyrosin die P_r/P_{fr} -Photochemie mitbestimmen können (Wagner *et al.* 2005). Möglicherweise beruht die lichtinduzierbare Photochemie des Phytochroms und des α -PEC auf solchen Chromophor-Protein-Wechselwirkungen, bei denen es zu Interaktionen zwischen aromatischen Aminosäuren und dem Ring D des Chromophors kommt.

Sowohl der PVB- als auch der PCB-Chromophor sind von aromatischen Aminosäuren umgeben (Düring *et al.* 1990, Jiang *et al.* 2001). Aber auch hier gibt es Unterschiede: α -PEC weist in Position 122 ein Leucin auf, während PC in dieser Position ein Phenylalanin besitzt. Möglicherweise hat diese Aminosäure bei der Stabilisierung bzw. der Dynamik des Chromophors durch Interaktion mit den Propionsäureseitenketten des Chromophors eine Bedeutung.

Die Daten aus den NMR-Messungen lassen darauf schließen, dass das α -PEC-Molekül in den beiden Belichtungszuständen eine unterschiedlich hohe Flexibilität aufweist. Die *E*- und *Z*-Form sind im Dunkeln stabil und zeigen keine thermische Umwandlung der isoformen Zustände ineinander. Die hohe thermische Stabilität der Zustände (Photochemie Typ I) könnte durch rigide Chromophor-Proteininteraktionen bedingt sein. Diese Interaktionen können durch thermische Prozesse unter Normalbedingungen nicht aufgehoben werden, da erst durch Belichtung genügend Energie dem System zugeführt wird. Möglicherweise kommt es dabei nicht nur zur Drehung des Ringes D des PVB-Chromophors, sondern auch zu Änderungen im Proteinrückgrat, die den Chromophor daran hindern, thermisch zu relaxieren und in die andere Konformation überzugehen. Dies könnte durch einen intramolekularen Schalter geschehen, bei dem Aminosäuren ihre Positionen so verändern, dass ein „Zurückklappen“ des Chromophors nach der Belichtung verhindert wird. Unterstützt wird diese Hypothese zum einen durch Untersuchungen von Schmidt *et al.* (Schmidt

et al. 2006), die die Röntgenstrukturen von α -PEC (*Mastigocladus laminosus*) und α -PC (*Thermosynechococcus vulcanus*), deren Strukturen eine hohe Homologie aufweisen, verglichen haben. Sie kommen zu dem Schluss, dass möglicherweise flexible Bereiche von α -PEC für die Stabilisierung und die reversible Photochemie verantwortlich sein können. Zum anderen konnte α -PEC bislang nur in einer Konformation kristallisiert werden. Eine Belichtung des Kristalls, führt zu dessen Zerstörung und zeigt damit, dass erhebliche Veränderungen in der Tertiärstruktur stattfinden (Wiegand *et al.* 2002).

4.2 Chromophorbindung

Untersuchungen zur Chromophorbindung an Biliproteinen wurden bislang im Hinblick auf die Substratspezifität der Biline durchgeführt (Storf *et al.* 2001, Storf 2003) und auf die Suche spezifischer Lyasen beschränkt, die eine regio- und stereoselektive Chromophorbindung ermöglichen (Zhao *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2002, Zhao *et al.* 2005a, Shen *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2006a, Zhao *et al.* 2006b). Über die Funktionsweise der Lyase-Untereinheiten sowie den Mechanismus der Chromophorbindung bei Biliproteinen ist wenig bekannt. Verschiedene Mutanten der Lyase-Untereinheiten PecE und PecF, die die kovalente Bindung von PCB an PecA und dessen Isomerisierung zu PVB katalysieren, zeigen Aminosäuremotive, die für die Aktivität der Lyase-Untereinheiten notwendig sind (Zhao *et al.* 2005b).

Bei einer anderen Klasse tetrapyrroltragender Holoproteine, den Phytochromen, verläuft die Chromophorbindung in einem spontanen, autokatalytischen Prozess (Wahleithner *et al.* 1991, Lamparter *et al.* 1997). Der Mechanismus der Chromophoraddition beim bakteriellen Phytochrom wurde bereits intensiv untersucht (Deforce *et al.* 1991, Kunkel *et al.* 1993, Hill *et al.* 1994, Li *et al.* 1995, Lamparter *et al.* 2001, van Thor *et al.* 2001, Jorissen *et al.* 2002a, Jorissen *et al.* 2002b, Borucki *et al.* 2003, Quest *et al.* 2004, Borucki *et al.* 2005, Hahn *et al.* 2006). Dabei wird letztendlich ebenfalls der 3-Ethyliden-Tetrapyrrolchromophor (PCB oder P Φ B) kovalent über eine Thioetherbrücke an das Bindungscystein (Cys-259) gebunden. Dieser kovalenten Bindung gehen reversible Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein voraus. Nach Bildung eines rotverschobenen Intermediats, das durch Protonierung des Chromophors entsteht, erfolgt die

Thioetherbindung, die von einer hypsochromen Verschiebung der Absorption begleitet wird. Die Lyase-Aktivität liegt somit bei den Phytochromproteinen im Apoprotein selbst (Lagarias *et al.* 1980, Terry *et al.* 1993, Wu *et al.* 2000). Möglicherweise spielen die Redoxbedingungen des Puffers bei den Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein eine Rolle (Hahn *et al.* 2006).

In dieser Arbeit werden die Lyase-Untereinheiten PecE und PecF näher charakterisiert, die die Chromophorbindung an PecA katalysieren. Für eine kovalente Bindung von PCB an PecA ist prinzipiell ebenfalls keine Katalyse notwendig, da PCB, wie auch weitere 3-Ethyliden-Chromophore, autokatalytisch an PecA binden. Dies bedeutet, dass eine gewisse katalytische Kompetenz zur Chromophorbindung im Apoprotein selbst lokalisiert ist. Als katalytische Domäne könnte prinzipiell sogar das Bindungscystein aufgrund seiner reaktiven Thiofunktion ausreichen, das in einer nucleophilen Additionsreaktion mit elektrophilen Zentren des Chromophors reagiert.

Der autokatalytische Prozess der Chromophoraddition belegt, dass eine hohe Affinität zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein besteht. Dabei spielen die Carboxylfunktionen der Propionsäureseitenketten des PCB eine bedeutende Rolle, da der PCB-DME in einer autokatalytischen Reaktion nicht zur kovalenten Bindung und damit zu einem rekonstituierten Chromoprotein führt. Durch die autokatalytische Rekonstitution von PecA mit PCB entsteht allerdings ein Chromoprotein, P645, welches in seinen Absorptionseigenschaften stark von den Eigenschaften des α -PEC abweicht.

In Anwesenheit der Lyase-Untereinheit PecE entsteht in einer raschen Reaktion ein Chromoprotein, P641, das sich, wie P645, in seinen spektralen Eigenschaften von α -PEC unterscheidet. P645 und P641 unterscheiden sich in der Lage ihrer Absorptionsmaxima und im Q_{UV}^{VIS} -Verhältnis, das im Falle von P645 einen Wert von 1,11 und für P641 einen Wert von 2,72 aufweist. Dies deutet auf unterschiedliche Konformationen des gebundenen Chromophors hin, die im Falle von P645 eine eher zyklisch-helicale Struktur sein dürfte, während der Chromophor des P641 hingegen eine gestreckte Form besitzt. P645 kann durch PecE in P641 umgewandelt werden, wodurch der Q_{UV}^{VIS} -Wert zunimmt. Dies zeigt, dass PecE einen PecA-PCB-Komplex erkennt, bei dem der Chromophor bereits kovalent an das Apoprotein gebunden ist.

Durch die Interaktion von PecE mit PecA-PCB kommt es zu einer Ausrichtung des Chromophors in der Bindungstasche des Apoproteins, wodurch spezifische Chromophor-Protein-Wechselwirkungen entstehen, die den Chromophor stabilisieren und die spektralen Eigenschaften des Holo­proteins bestimmen. Dies klassifiziert PecE als Chaperon.

Die Chromophorbindung des PCB-Addukts (P641) in einer für PCB-Bindungstaschen typischen Konformation ist allerdings irreversibel und stellt bezüglich der PVB-Bildung eine „Sackgasse“ dar. P641 ist, wie P645, kein Substrat für die PecE/F-Lyase zur α -PEC-Bildung mehr. α -PEC kann *in vitro* ausschließlich in Anwesenheit des frei vorliegenden Chromophors durch die Reaktion von PecE mit PecF und PecA gebildet werden. Dabei spielen Chromophor-Protein- sowie Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle. Durch das Zusammenspiel aller Komponenten entsteht ein ternärer Proteinkomplex, der aus PecA/E/F-Monomeren besteht und in der Lage ist, α -PEC zu bilden. Da PCB-DME nicht als Substrat der Lyase dient, spielen dabei die Carboxylfunktionen der Propionsäureseitenketten eine wichtige Rolle. Wahrscheinlich kommt es zwischen ihnen und positiv geladenen Aminosäuren des PecF zu Wechselwirkungen, die durch die Esterfunktion des PCB-DME nicht mehr gewährleistet sind.

Die PecE/F-katalysierte α -PEC-Bildung erfolgt *in vitro* auch in Abwesenheit von Triton X-100 in einem relativ langsamen Prozess, der etwa sechsmal langsamer ist, als die PecE-katalysierte Bildung des P641-Chromoproteins. Dies legt nahe, dass bei der α -PEC-Bildung auch die Geometrie des Chromophors eine Rolle spielt. Experimente mit PEB, dem die $\Delta_{15,16}$ -Doppelbindung fehlt, und das folglich in verschiedenen 15,16-Rotameren vorliegen kann, zeigen, dass im Vergleich mit PCB die autokatalytische Bindung um den Faktor 5 schneller, hingegen die PecE-katalysierte Bindung um den Faktor 1,6 langsamer verläuft. Die PecE/F-katalysierte Bindung von PEB an PecA zeigt ein Produktgemisch aus PUB- und PEB-Addukt, wobei das PUB-Addukt nur in geringen Mengen entsteht und nicht stabil ist. Daraus lässt sich schließen, dass zum einen die Struktur des Chromophors wesentlich zu Protein-Chromophor-Wechselwirkungen beiträgt, die wiederum für eine schnelle und effiziente Chromophor-Proteinerkennung notwendig sind. Zum anderen verdeutlicht die geringe Bildung und Stabilität des PUB-Addukt (welches bezüglich der elektronischen Struktur von Ring A dem PVB-Addukt entspricht) die Notwendigkeit

spezifischer Protein-Chromophor-Interaktionen während der Chromophorbindung sowie im rekonstituierten Chromoprotein. Aufgrund der freien Drehbarkeit des Ringes D kommt es wahrscheinlich zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen PecF und PEB, die eine vermehrte PUB-Adduktbildung verhindern. Dies würde erklären, dass für verschiedene Biliproteinuntereinheiten spezifische Lyasen existieren, die neben einer Selektivität für die Untereinheiten auch eine hohe Substratspezifität bezüglich der Chromophore aufweisen. Dadurch bleibt der hoch geordnete Aufbau der Phycobilisomen, der für die effiziente Energieweiterleitung notwendig ist, gewährleistet.

Die Chromophor-Protein- sowie Protein-Proteinwechselwirkungen wurden mit unterschiedlichen spektroskopischen und chromatographischen Methoden untersucht. Die einzelnen Ergebnissen lassen sich zu einem Modell des Reaktionsablaufs zusammenfassen (Abbildung 4-2).

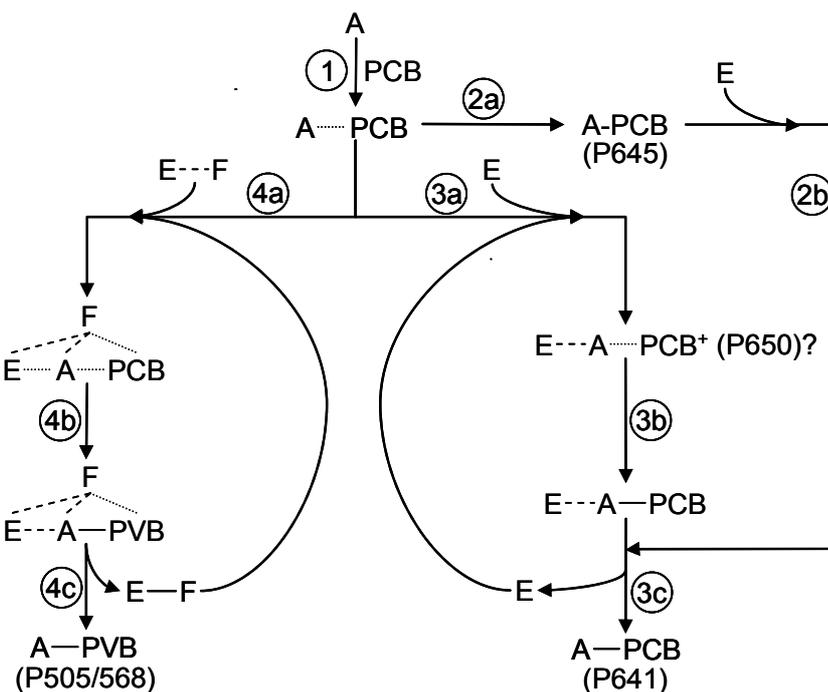


Abbildung 4-2: Schematisches Modell zur PCB-Addukt- und PVB-Adduktbildung.

Die Proteine PecA, PecE und PecF sind mit A, E bzw. F abgekürzt; kovalente Protein-Chromophorbindung sind durch — symbolisiert, Komplexbildungen zwischen Proteinen sind durch - - - gekennzeichnet, während reversible Interaktionen des Chromophors durch ···· dargestellt sind. (PXXX) deutet die Zuordnung von Absorptionspezies zu Chromophor-Proteinstrukturen an. Weitere Erklärungen erfolgen im Text.

Eingeleitet wird die Chromophorbindung durch Wechselwirkung zwischen dem Chromophor und dem Apoprotein (Abbildung 4-2 **(1)**). Die Affinität des Chromophors zum Apoprotein ist viel größer als zu einer der beiden Lyase-Untereinheiten. Dabei spielen Geometrie und Struktur des Chromophors eine wichtige Rolle. Zwischen den Propionsäurecarboxylgruppen des Chromophors und dem Apoprotein kommt es zur Ausbildung von ionischen Bindungen. Diese Interaktionen sind spektroskopisch nur schwer erfassbar, da es sich dabei um geringe spektrale Änderungen handelt. Änderungen in der Chromophorgeometrie, die nicht auf eine Protonierung zurückzuführen sind, äußern sich nur in geringen Absorptionsverschiebungen und Änderungen der Oszillatorstärken, können aber Rotationsbewegungen um die Methinbrücken beinhalten (Göller *et al.* 2005). Die Bedeutung reversibler Interaktionen zwischen dem Apoprotein und dem Chromophor lässt sich am PCB-DME nachvollziehen, der nicht in einem autokatalytischen Prozess an das Apoprotein bindet. Zwar konnten Storf *et al.* (Storf *et al.* 2001) zeigen, dass PEB-DME autokatalytisch an PecA bindet, offen bleibt jedoch die Effektivität dieses Prozesses. Obwohl PEB nicht das natürliche Substrat ist, bindet es in einer autokatalytischen Reaktion deutlich schneller an PecA als PCB. Dies deutet darauf hin, dass die Konformationsfreiheit des PEB am Ring D des Tetrapyrrols eine Rolle bei der Protein-Chromophorerkennung spielt. Die Röntgenstruktur von α -PEC (Düring *et al.* 1990) weist im Bereich des Ringes D eine unpolare, hydrophobe Proteintasche auf (Abbildung 4-1). Aufgrund der Konformationsfreiheit des PEB ist es denkbar, dass der Ring D, der aus der weitgehend planaren Geometrie der konjugierten Ringe A, B und C herausragt, in diese Tasche gleitet und somit einen ersten Schritt für eine Bindung darstellt. Diese Art der Wechselwirkung ist beim PCB aufgrund des vollständig konjugierten π -Systems und der daraus resultierenden bevorzugten Planarität des zyklisch-helical vorliegenden Chromophors erschwert. Der Unterschied in den geometrischen Strukturen der beiden Chromophore PCB und PEB bedingt folglich verschiedene Möglichkeiten der Chromophor-Protein-Wechselwirkungen und kann somit auch die unterschiedlichen Reaktionszeiten erklären.

Bei der autokatalytischen Reaktion erfolgt die Chromophorbindung spontan **(2a)** und führt zum Chromoprotein P645. P645 wird von PecE, jedoch nicht von PecF, als Substrat erkannt und zum P641 umgewandelt **(2b)**.

Bei der PecE-katalysierten Chromophoraddition wird der reversible Komplex aus

PecA und PCB von PecE als Substrat erkannt (**3a**). Hingegen dient das Apoprotein PecA wahrscheinlich nicht als Substrat für PecE, da auch in Anwesenheit von PecE keine Blockierung von Cys-84-PecA durch Iodessigsäure erfolgt. Damit unterscheidet sich PecA deutlich vom Phytochromsystem, bei dem eine Blockierung des Bindungscysteins durch Iodoacetamid möglich ist (Lamparter *et al.* 2001). Eine absorptionsspektroskopisch sichtbare Interaktion zwischen dem freien Chromophor und PecE findet nicht statt, da die Affinität zwischen PCB und PecE im Vergleich mit PecA gering ist. Durch die Komplexbildung zwischen PecE und PecA-PCB kommt es zu einer Änderung der Tertiärstruktur von PecA, wodurch sich die Bindungstasche des Apoproteins weitet und der Chromophor in Kontakt mit einem Protonendonator von PecA tritt. Als möglicher Kandidat kommt Asp-87 in Frage, um die Pyrrolstickstoffe der Ringe B und C zu protonieren (Scharnagl *et al.* 1989, Kikuchi *et al.* 1997). Dieser Reaktionsschritt beinhaltet neben der Protonierung des Chromophors auch dessen Streckung, für die der Chromophor spezifische Wechselwirkungen mit dem Protein eingehen muss. Auch bei der Rekonstitution von Phytochrom kann eine Änderung der Tertiärstruktur beobachtet werden, die auf die Chromophorbindung zurückgeführt wird (Sommer *et al.* 1990, Park *et al.* 2000). Die Protonierung des Chromophors erfolgt dort vor der Knüpfung der Thioetherbindung und verursacht starke spektrale Veränderungen (Göller *et al.* 2005). Mittels Kurzzeitspektroskopie konnte auch bei der PecE-katalysierten PCB-Addition ein rotverschobenes Intermediat detektiert werden, dessen Oszillatorstärke anstieg (P650). Dies lässt sich durch Protonierung des noch nicht kovalent gebundenen PCB-Chromophors erklären.

Des Weiteren zeigte sich sowohl bei der autokatalytischen als auch bei der PecE-katalysierten PEB-Addition ein rotverschobenes, relativ langlebiges Intermediat. Dieses Intermediat konnte näher charakterisiert werden und zeigte typische Charakteristika eines protonierten, nicht kovalent gebundenen PEB-Chromophors. Die Protonierung erfolgt durch einen Protonendonator des Apoproteins, da erst in dessen Anwesenheit das Intermediat gebildet wird. Hahn *et al.* (Hahn *et al.* 2006) diskutieren auf der Grundlage von Mutanten und der Kristallstruktur des Phytochroms (Wagner *et al.* 2005) die Rolle eines Protonendonors bei der Chromophorbindung. Dabei kommen sie zu dem Schluss, dass die Aminosäuren Aspartat und Glutamat, die über ausreichend hohe pK_a -Werte für eine Protonierung verfügen würden (Stanek *et al.* 1998), aufgrund der fehlenden Nähe zum

Chromophor nicht dessen Protonierung bewirken können. Der Protonendonor beim Phytochrom bleibt somit unklar.

Nachdem es zur kovalenten Bindung zwischen Cys-84 und PCB gekommen ist (**3b**), zerfällt der PecE-PecA-Holoprotein-Komplex und entlässt das PCB-Addukt (P641) (**3c**). Durch die Ausbildung der Thioetherbrücke zwischen dem Chromophor und PecA wird die $\Delta^{3,3^1}$ -Doppelbindung aufgelöst, wodurch eine Verkürzung des konjugierten π -Systems erfolgt. Dies bewirkt auch beim Phytochrom eine hypsochrome Verschiebung der Absorption (Borucki *et al.* 2003). Die Knüpfung der Thioetherbindung lässt sich ebenfalls bei der PecE-katalysierten PEB-Adduktbildung gut beobachten. Das Intermediat (P603; protonierter, nicht kovalent gebundener Chromophor) geht in das PEB-Addukt (P574) über, wobei die Natur des Intermediats (= PEB-Chromophor) und des PEB-Addukts (= 3^1 -Cys-Additionsprodukt) durch begleitende Denaturierungsexperimente verfolgt werden kann.

Die PecE-katalysierte PCB-Adduktbildung wird durch Mn^{2+} stark beschleunigt, während bei der autokatalytischen Rekonstitution Mn^{2+} keinen Einfluss zeigt. Mn^{2+} kann somit als Aktivator für die Lyase-Untereinheit PecE dienen und somit möglicherweise durch Änderung der Tertiärstruktur die Aktivität des Proteins beeinflussen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es dabei zu Wechselwirkungen zwischen Mn^{2+} und dem Chromophor kommt. Durch diese Ionenabhängigkeit der Lyase kann *in vivo* möglicherweise der Assemblierungsprozess reguliert werden. Die kinetischen Daten der zeitaufgelösten Absorptionsspektroskopie lassen einen transienten Komplex zwischen PecE und PecA erkennen. Die Ergebnisse aus den GPC-Versuche zeigen allerdings, dass das Gleichgewicht zwischen dem transienten Komplex und den Einzelproteinen auf der Seite der Einzelproteine liegt und der Chromophor notwendig ist, um das Gleichgewicht auf die Seite des Komplexes zu verschieben. Die Funktion, die PecE bei der Chromophorbindung einnimmt, kann aus folgenden Gründen als die eines Chaperons beschrieben werden: Zum einen beschleunigt PecE die Chromophoraddition an PecA, zum anderen ist durch PecE die Chromophorbindung des PCB-DME an PecA möglich und schließlich ist PecE in der Lage, das Produkt der autokatalytischen Chromophoraddition in P641 umzuwandeln, welches eine mehr gestreckte Chromophorkonformation aufweist.

PecE und PecF bilden zusammen einen stabilen Komplex, der in der Lage ist, den PecA-PCB-Komplex als Substrat zu erkennen (**4a**). PecF interagiert in diesem hochmolekularen Komplex mit PCB, während es zu keinen Wechselwirkungen zwischen PCB und PecE kommt. Für die Wechselwirkungen zwischen PecF und dem Chromophor sind wiederum die Propionsäureseitenketten (Carboxylgruppen) von Bedeutung, da PCB-DME nicht zum PVB-Addukt isomerisiert werden kann. Offensichtlich ist die Isomerase-Funktion im PecF-Protein lokalisiert. Der Reaktionsmechanismus, der vom PCB zum PVB führt (**4b**, **4c**), ist bislang nicht geklärt. Formal handelt es sich bei der PVB-Adduktbildung um eine Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung nach $\Delta 2,3$, verbunden mit einer gleichzeitigen Ausbildung der Thioetherbindung. Bei der PVB-Adduktbildung treten *in vitro* neben dem Hauptprodukt α -PEC auch zwei Nebenprodukte in unterschiedlichen Ausbeuten auf. Das PCB-Addukt kann bis zu 20% der Menge an rekonstituiertem Chromoprotein ausmachen, während das MBV-Addukt nur in minimalen Mengen auftritt und dabei im Lyase-Holoproteinkomplex verbleibt. Aufgrund der Bildung der Nebenprodukte sind folgende Wege zur PVB-Adduktbildung denkbar (Abbildung 4-3).

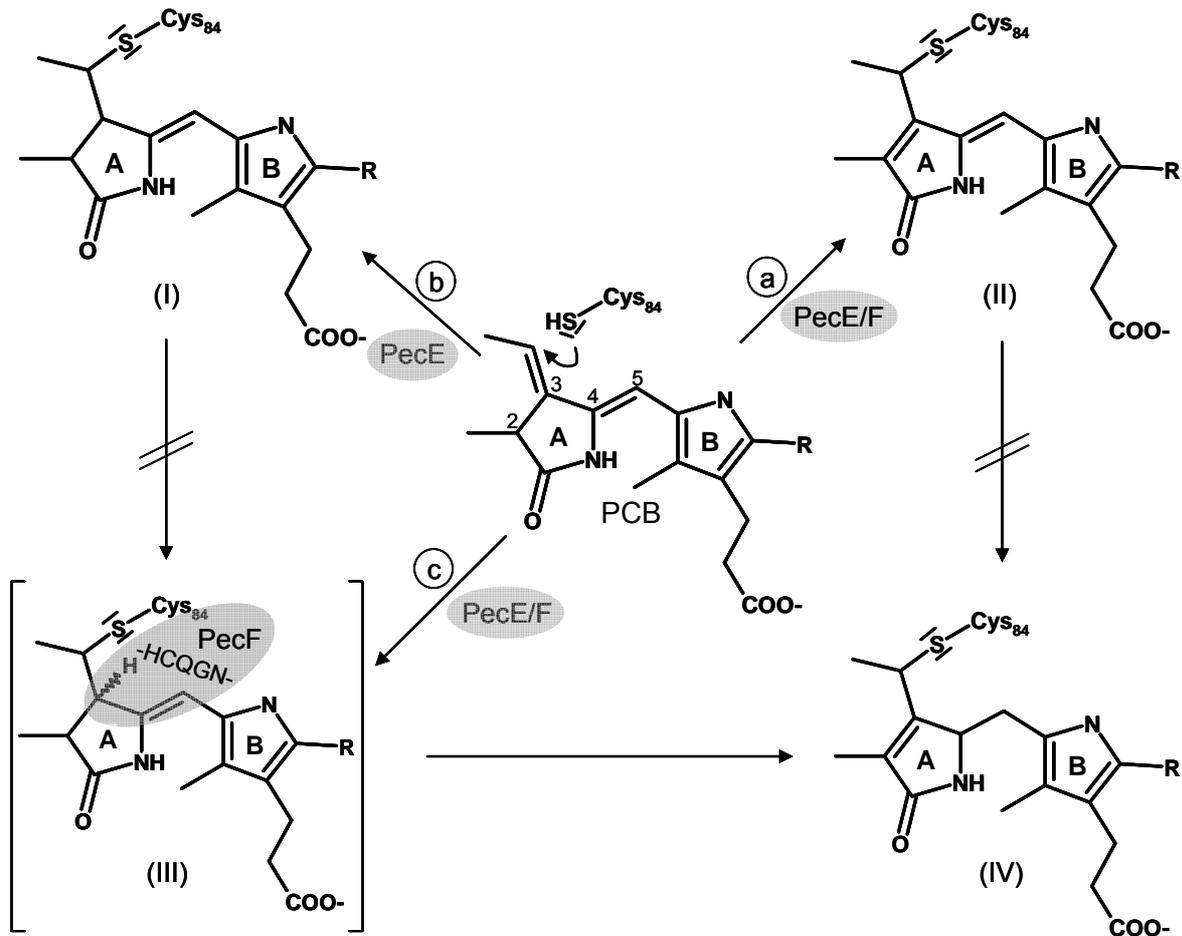


Abbildung 4-3: Reaktionsschema zur PVB-Adduktbildung.

Zur besseren Übersicht sind nur die Ringe A und B dargestellt; R bezeichnet den Rest des Chromophors. Cys₈₄ kennzeichnet die Bindungsstelle des Chromophors in PecA. Die Lyase-Untereinheiten PecE bzw. PecF sind grau unterlegt dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text.

Beim Reaktionsweg (a) würde durch den nucleophilen Angriff des Thiols auf C3¹ die $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung formal in den Ring A verschoben. Dazu müsste jedoch an C2 ein Hydridion abgehen, das durch das umgebende Medium abgefangen werden müsste. Theoretisch könnte Cys-122 im PecF-Isomerasemotiv an dieser Redoxreaktion beteiligt sein. Als Zwischenstufe entstünde das MBV-Addukt (II), welches anschließend durch PecF zum PVB-Addukt (IV) reduziert würde. Dieser Reaktionsweg erscheint unwahrscheinlich, da dadurch bei der PecE-katalysierten Chromophorbinding (b) mit PCB überwiegend das MBV-Addukt anstelle des PCB-Addukts (I) entstehen müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall. Deswegen erscheint der Reaktionsweg (c) wahrscheinlicher, bei dem durch den nucleophilen Angriff des Thiols auf C3¹ die $\Delta 3,3^1$ -Doppelbindung als freies Elektronenpaar eine Bindung mit

einem Proton eingeht, wodurch der 3¹-Cys-Chromophor (III) entsteht. Dieser Chromophor ist formal das Endprodukt der PecE-katalysierten Adduktbildung, kann aber bei gleichzeitiger Anwesenheit durch die isomerase-spezifische Aminosäuresequenz (HCQGN) von PecF zum PVB-Addukt (IV) weiterreagieren. Ein möglicher Reaktionsweg beginnt mit der Protonierung an C5, wodurch ein Carbeniumion an C4 entsteht. Anschließend wird das Proton an C2 abgespalten, während das freie Elektronenpaar in den Ring A verlagert wird. Dadurch wird das H-Atom an C3 als Hydridion nach C4 verschoben. Durch den Reaktionsweg **(c)** kann die Stereochemie an C3 spezifisch beeinflusst werden. Dadurch würde sich auch die Notwendigkeit von nicht-isomerisierenden Lyase- β -Untereinheiten für die α -Untereinheit von Phycocyaninen erklären, die dann aufgrund des fehlenden Aminosäuremotivs (HCQGN) ausschließlich für die korrekte Stereochemie an C3 zuständig wären.

Geringe Mengen des MBV-Addukts können bei der PecE/F-katalysierten Reaktion *in vitro* entstehen und bewirken, dass der Lyase-Holoproteinkomplex inaktiviert wird und nicht zerfällt. Dies könnte eine Möglichkeit zur Kristallisation des Komplexes eröffnen.

Die starke Tendenz des PecE/F-Holoproteinkomplexes zur Bildung von größeren Aggregaten zeigt, dass die Biosynthese von Bilinen und deren Assemblierung zu Phycobilisomuntereinheiten in einer Reaktionskette erfolgen könnte, bei der die benötigten Enzyme einen Multienzymkomplex bilden. Durch diesen Multienzymkomplex wandert das Substrat von einem Enzym zum nächsten, bis es kovalent an die entsprechende Untereinheit gebunden wird. Da Biline in Lösung instabil sind und viele Reaktionen eingehen können, wird durch den Multienzymkomplex der Chromophor geschützt. Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen zu Komplexbildungen zwischen Proteinen und Chromophor der Bilinbiosynthese, bei denen es zu einer reversiblen (nichtkovalenten) Bindung des Chromophors im Protein kommt. Daraus lässt sich die Idee eines Substrat-Channelings bei der PCB-Biosynthese ableiten, durch das der Chromophor durch einen Multienzymkomplex gereicht wird, und bei dem die Regulation der Bilinsynthese durch das finale Akzeptorprotein (z. B. Phytochrom) erfolgen könnte (persönl. Kommunikation mit Prof. N. Frankenberg-Dinkel, Ruhr-Universität Bochum).

Ausblick:

Post-translationale Modifikationen haben in letzter die Vielfältigkeit von Proteinen über die im Genom kodierten Strukturen hinaus bedeutend erweitert (Walsh 2005). Die PecE/F-katalysierte Chromophorylierung von PecA stellt in diesem Zusammenhang ein interessantes System dar, da sie gleichzeitig mit der posttranslationalen Modifikation den kovalent gebundenen Cofaktor modifiziert. Aufbauend auf den vorgelegten Ergebnissen sollten sich eine Reihe offener Fragestellungen unmittelbar weiter untersuchen lassen: Dazu gehören insbesondere: a) Mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzspektroskopie können die Vorgänge während der Chromophorbindung detaillierter untersucht werden. b) Der stabile, aber nicht mehr aktive, ternäre Komplex aus den Lyase-Untereinheiten, dem Apoprotein und dem Chromophor stellt eine Möglichkeit zur Strukturaufklärung mittels Röntgenstrukturanalyse dar. c) Die Hypothese der Bildung von Multienzymkomplexen und Substrat-Channeling kann durch Hinzufügen vorangehender Komponenten der Bilinbiosynthese getestet werden. Mit diesen Arbeiten wurde zum Teil bereits begonnen. d) Über das relativ eng umgrenzte Problem der Bildung des PVB-Chromophors im α -PEC hinaus könnten ähnliche Enzyme auch bei der Bildung des im freien Zustand bisher ebenfalls unbekannt, aber wesentlich weiter verbreiteten PUB-Chromophors beteiligt sein.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Bereiche. Der erste Bereich beschäftigt sich mit dem reversiblen Photochromismus von α -PEC. Es sollten die Strukturen des Chromoproteins in den beiden isomeren *E/Z*-Zuständen mittels NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden.

Dazu war es einerseits notwendig, das Rekonstitutionssystem auf eine möglichst hohe Ausbeute von α -PEC zu optimieren, und andererseits das erhaltene Chromoprotein so zu modifizieren, dass es unter Messbedingungen stabil war. Beide Ziele konnten erreicht werden, sodass α -PEC als sog. mini- α -PEC in grossen Mengen, auch als isotopenmarkiertes Protein für NMR-Messungen *in vitro* dargestellt werden konnte. Mini- α -PEC unterscheidet sich von α -PEC durch den Verlust der beiden für die Aggregation mit β -PEC verantwortlichen N-terminalen X- und Y-Helices.

In Zusammenarbeit mit PD M. Schmidt (TU München) konnte mini- α -PEC kristallisiert werden. Allerdings ist die Größe der Kristalle für Röntgenstruktorexperimente noch nicht ausreichend.

In Kooperation mit M. Krajewski (Arbeitsgruppe Dr. T. Holak, MPI Martinsried) wurden die NMR-spektroskopischen Untersuchungen zur Dynamik von α -PEC durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigen eine hohe Flexibilität des mini- α -PEC-Proteins in den beiden Belichtungsformen. Eine Zuordnung aller Signale zur Strukturaufklärung der *E*- und *Z*-Form war zum Ende dieser Arbeit noch nicht abgeschlossen.

Der zweite Bereich der Arbeit beschäftigt sich mit der enzymatischen Rekonstitution von α -PEC. Die für die Rekonstitution notwendigen Lyase-Untereinheiten PecE und PecF wurden hinsichtlich ihrer Substratspezifität und Funktion untersucht. Dazu wurde ein verbessertes Rekonstitutionssystem entwickelt, in dem die Proteine eine höhere Löslichkeit aufweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass die katalytische Domäne zur Chromophorbindung im Apoprotein PecA selbst lokalisiert ist, und dass der autokatalytischen Chromophorbindung reversible Chromophor-Proteininteraktionen vorausgehen, an

denen die Carboxylfunktionen der Propionsäuren des Chromophors beteiligt sind. Die autokatalytische Chromophoraddition resultiert in einem PCB-Addukt und lässt sich durch Zugabe von Mn^{2+} nicht beschleunigen.

Die Lyase-Untereinheit PecE beschleunigt die Chromophorbindung, d. h. die PCB-Adduktbildung, um den Faktor 7, in Anwesenheit von Mn^{2+} um den Faktor 13. Dies lässt vermuten, dass PecE als Chaperon fungiert und die Bindungstasche des Apoproteins öffnet, während Mn^{2+} möglicherweise einen Aktivator für PecE darstellt. Über die Mn^{2+} -Konzentration könnte die Aktivität *in vivo* gesteuert werden. Kurzzeitspektroskopische Untersuchungen dieser Reaktion zeigten mehrere Intermediate, darunter ein rotabsorbierendes, hyperchromes Intermediat. Ein rotverschobenes Intermediat wurde auch bei der autokatalytischen und der PecE-katalysierten Rekonstitution mit PEB beobachtet. Es konnte als protonierter Chromophor identifiziert werden. Dabei ist nicht völlig geklärt, ob der protonierte Chromophor proteinassoziiert oder bereits kovalent gebunden vorliegt.

Die Bindung und Isomerisierung von PCB kann nur in Anwesenheit beider Lyase-Untereinheiten, PecE und PecF, stattfinden. PecF kann in Abwesenheit von PecE weder den Chromophor an das Apoprotein binden, noch einen gebundenen PCB-Chromophor zum PVB isomerisieren. PecF ist nur in Anwesenheit von PecE aktiv, beide Untereinheiten sind für eine PVB-Adduktbildung notwendig.

Die PecE/F-katalysierte Reaktion von PEB mit PecA liefert einen gebundenen PUB-Chromophor, welcher bezüglich der Konfiguration des Ringes A dem PVB-Chromophor entspricht. Dies bedeutet, dass auch hier die Bindung und gleichzeitige Isomerisierung des Chromophors durch PecE/F katalysiert wird, allerdings wird PUB nur in geringen Mengen gebildet. Das Hauptprodukt der Reaktion ist PEB-Addukt. Dies zeigt, dass spezifische Lyasen eine hohe Substratspezifität für die Bindung der Chromophore an die einzelnen Biliproteinuntereinheiten besitzen.

Als weiteres Substrat für die Lyase wurde ein Thia-Analogon zum PCB (S-PCB) getestet, bei dem der Stickstoff im Pyrrolring D durch Schwefel substituiert wurde. S-PCB konnte autokatalytisch, PecE- sowie PecE/F-katalysiert an PecA gebunden werden. Die PecE/F-katalysierte Reaktion lieferte ein Chromoprotein mit reversiblen Photochromismus, das Absorptionsmaxima der *E*- bzw. *Z*-Form bei 505 bzw.

582 nm besitzt. Der $\Delta\Delta A$ -Wert lag bei ca. 15% und somit deutlich unter dem Wert von α -PEC.

Cysteine in PecE und PecF spielen bei der Chromophorbinding eine wesentliche Rolle. Zum einen konnte gezeigt werden, dass PecE und PecF den Chromophor in substöchiometrischen Mengen kovalent binden können, zum anderen zeigt insbesondere cysteinmodifiziertes PecF eine deutlich verminderte Aktivität. Hingegen weisen die autokatalytische und PecE-katalysierte PCB-Adduktbildung mit cysteinmodifizierten PecA und/oder PecE keinen wesentlichen Aktivitätsverlust auf. PecE/F sind in der Lage den Chromophor zu binden und auf PecA zu übertragen.

Die Lyase-Untereinheiten bilden miteinander einen stabilen Komplex. Die Komplexbildung ist auch zwischen PecE bzw. PecF und dem Apoprotein in Abwesenheit des Chromophors möglich, das Gleichgewicht liegt jedoch auf der Seite der Einzelproteine. Bei der PecE/F-katalysierten Chromophorbinding konnte in Gegenwart von PCB ein ternärer Komplex im stöchiometrischen 1:1:1-Verhältnis mit Absorption im Chromophorbereich detektiert werden, er könnte einen Ansatz zur Kristallisation darstellen.

Für die PecE/F-katalysierte α -PEC-Bildung wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, bei dem PecE als Chaperon fungiert und die Cys-84-Bindungsstelle im PecA zugänglich macht, während PecF für die Umlagerung der $\Delta 4,5$ -Doppelbindung nach $\Delta 2,3$ verantwortlich ist. Die Notwendigkeit von nicht-isomerisierenden Lyasen (z. B. CpcF) könnte aufgrund des hier vorgestellten Reaktionsmechanismus in der korrekten Ausbildung der Stereochemie an C3 liegen.

6 Literaturverzeichnis

- Allen, M. M. & Smith, A. J. (1969) Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.* **69**: 114-120.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- 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 Cysteinyll 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. & Cornejo, J. (1991) Biosynthesis of phycobilins: 3(Z)-phycoerythrobilin an 3(Z)-phycocyanobilin are intermediates in the formation of 3(E)-phycocyanobilin from biliverdin IX α . *J. Biol. Chem.* **266**: 22333 - 22340.
- Beale, S. I. (1993) Biosynthesis of phycobilins. *Chem. Rev.* **93**: 785-802.
- Beltrame, L. G., Monti D., Sala R., Manitto, P. (1985) Addition of 2-mercaptopropionylglycine to biliverdin: a kinetic and thermodynamic study. *Gazzetta Chimica Italiana* **115**: 223-226.
- Bennett, A. & Bogorad, L. (1973) Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell. Biol.* **58**: 419-435.
- 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.
- Bhalerao, R. P., Kind, L. K. & Gustafsson, P. (1994) Cloning of the cpcE and cpcF genes from *Synechococcus* sp. PCC6301 and their inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Plant Mol. Biol.* **26**: 313-326.
- Bhoo, S. H., Hirano, T., Jeong, H. Y., G., L. J., Furuya, M. & Song, P. S. (1997) Phytochrome photochromism probed by site-specific mutations. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 11717-11718.

- Bienert, R., Baier, K., Volkmer, R., Lockau, W. & Heinemann, U. (2006) Crystal structure of NblA from *Anabaena* sp. PCC 7120, a small protein playing a key role in phycobilisome degradation. *J. Biol. Chem.* **281**: 5216-5223.
- Bishop, J. E., Lagarias, J. C., Nagy, J. O., Schoenleber, R. W., Rapoport, H., Klotz, A. V. & Glazer, A. N. (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., Flüglstaller, 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. & Björn, L. O. (1976) Photochromic pigments from blue-green algae: phycochromes a, b and c. *Physiol. Plant* **36**: 297-300.
- Blauer, G. (1974) Optical activity of conjugated proteins. *Struct. Bonding (Berlin)* **18**: 69-129.
- Bogorad, L. (1975) Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **26**: 369-401.
- Bois-Choussy, M. & Barbier, M. (1978) Isomerizations and cyclizations in bile pigments. *Heterocycles* **9**: 677-690.
- Bonnett, R., Davies, J. E. & Hursthouse, M. B. (1976) Structure of bilirubin. *Nature* **262**: 326-328.
- Borucki, B., Otto, H., Rottwinkel, G., Hughes, J., Heyn, M. P. & Lamparter, T. (2003) Mechanism of Cph1 phytochrome assembly from stopped-flow kinetics and circular dichroism. *Biochemistry* **42**: 13684-13697.
- Borucki, B., von Stetten, D., Seibeck, S., Lamparter, T., Michael, N., Mroginski, M. A., Otto, H., Murgida, D. H., Heyn, M. P. & Hildebrandt, P. (2005) Light-induced proton release of phytochrome is coupled to the transient deprotonation of the tetrapyrrole chromophore. *J. Biol. Chem.* **280**: 34358-34363.
- Braslavsky, S. E., Schneider, D., Heihoff, K., Nonell, S., Aramendia, P. F. & Schaffner, K. (1991) Phytochrome models 11. Photophysics and photochemistry of phycocyanobilin dimethylester. *J. Am. Chem. Soc.* **113**: 7322-7334.
- Brejc, 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., Glazer, A. N. & Eiserling, F. A. (1976) Characterization and structural properties of the major biliproteins of *Anabaena* sp. *Arch. Microbiol.* **110**: 61-75.
- Bryant, D. A. & Cohen-Bazire, G. (1981) Effects of chromatic illumination on cyanobacterial phycobilisomes. Evidence for the specific induction of a second pair of phycocyanin subunits in *Pseudanabaena* 7409 grown in red light. *Eur. J. Biochem.* **119**: 415-424.
- Bryant, D. A. (1982) Phycoerythrocyanin and Phycoerythrin - properties and occurrence in Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 835 - 844.

- Bryant, D. A. (1991) Cyanobacterial phycobilisomes: Progress toward complete structural and functional analysis via molecular genetics. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Bogorad, L. & Vasil, I. K. (Hrsg.). 257-300. Academic Press Inc., New York.
- Bryant, D. A., Stirewalt, V. L., Glauser, M., Frank, G., Sidler, W. & Zuber, H. (1991) A small multigene family encodes the rod-core linker polypeptides of *Anabaena* sp. PCC 7120 phycobilisomes. *Gene* **107**: 91-99.
- Bryant, D. A. (1994) Advances in photosynthesis: The molecular biology of cyanobacteria. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Cheng, L., Ma, J. & Chiang (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.
- Choi, J. S., Chung, Y. H., Moon, Y. J., Kim, C., Watanabe, M., Song, P. S., Joe, C. O., Bogorad, L. & Park, Y. M. (1999) Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol.* **70**: 95-102.
- Choussy, M. & Barbier, M. (1975) *Helv. Chim. Acta* **58**: 2651.
- 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.
- Cobley, J. G., Clark, A. C., Weerasurya, S., Queseda, F. A., Xiao, J. Y., Bandrapali, N., D'Silva, I., Thounaojam, M., Oda, J. F., Sumiyoshi, T. & Chu, M. H. (2002) CpeR is an activator required for expression of the phycoerythrin operon (cpeBA) in the cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* and is encoded in the phycoerythrin linker-polypeptide operon (cpeCDEST). *Mol. Microbiol.* **44**: 1517-1531.
- Cole W. J. , C. D. J., and Siegelman H. W. (1968) The Structure and Properties of Phycocyanobilin and Related Bilatrienes. *Biochemistry* **7**: 2929-2935.
- Cole, W. J., Chapman, D. J. & Siegelman, H. W. (1967) Structure of Phycocyanobilin. *J. Am. Chem. Soc.* **89**: 3643-3645.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1992) Chlorosis induced by nutrient deprivation in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942: not all bleaching is the same. *J. Bacteriol.* **174**: 4718-4726.
- Collier, J. L. & Grossman, A. R. (1994) A small polypeptide triggers complete degradation of light-harvesting phycobiliproteins in nutrient-deprived cyanobacteria. *EMBO J.* **13**: 1039-1047.
- Copeland, A., Lucas, S., Lapidus, A., Barry, K., Detter, J. C., Glavina, T., Hammon, N., Israni, S., Pitluck, S., Schmutz, J., Martinez, M., Larimer, F., Land, M., Kyrpides, N., Ivanova, N. & Richardson, P. (2005b) Complete sequence of *Synechococcus* sp. CC9605. UniProtKB/TrEMBL entry: Q3AMI8.

- Cornejo, J., Beale, S. I., Terry, M. J. & Lagarias, J. C. (1992) Phytochrome assembly. The structure and biological activity of 2(*R*),3(*E*)-phytychromobilin derived from phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* **267**: 14790-14798.
- Cornejo, J., Willows, R. D. & Beale, S. I. (1998) Phytobilin biosynthesis: cloning and expression of a gene encoding soluble ferredoxin-dependent heme oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant J.* **15**: 99-107.
- Davis, S. J., Vener, A. V. & Vierstra, R. D. (1999) Bacteriophytochromes: Phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**: 2517-2520.
- Deforce, L., Tomizawa, K., Ito, N., Farrens, D., Song, P. S. & Furuya, M. (1991) In vitro assembly of apophytochrome and apophytochrome deletion mutants expressed in yeast with phycocyanobilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10392-10396.
- Drygas, M. E., Lambowitz, A. M. & Nargang, F. E. (1989) Cloning and analysis of the *Neurospora crassa* gene for cytochrome *c* heme lyase. *J. Biol. Chem.* **264**: 17897-17906.
- Ducret, A., Sidler, W., Wehrli, E., Frank, G. & Zuber, H. (1996) Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidisoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Eur. J. Biochem.* **236**: 1010-1024.
- Ducret, A., Muller, S. A., Goldie, K. N., Hefti, A., Sidler, W. A., Zuber, H. & Engel, A. (1998) Reconstitution, characterisation and mass analysis of the pentacylindrical allophycocyanin core complex from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *J. Mol. Biol.* **278**: 369-388.
- Dumont, M. E., Ernst, J. F., Hampsey, D. M. & Sherman, F. (1987) Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.* **6**: 235-241.
- Düring, M., Huber, R., Bode, W., Rübéli, 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-phycoerythrocyanin from the chromatically adapting cyanobacterium *Fremyella diplosiphon* at 1.66 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **577**-592.
- Eberlein, M. & Kufer, W. (1990) Genes encoding both subunits of phycoerythrocyanin, a light-harvesting biliprotein from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Gene* **94**: 133 - 136.
- Emerson, T. E. (1989) Unique feature of albumin: a brief review. *Crit. Care Med.* **17**: 690-694.
- Endres, S. (2005) Spectroscopic investigation of chromophore attachment in phycoerythrocyanin of *Fischerella* sp. PCC7603. *Diplomarbeit*, LMU München.
- Fairchild, C., Zhao, J., Zhou, J., Colson, S., Bryant, D. & Glazer, A. (1992) Phycocyanin α -Subunit Phycocyanobilin Lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7017-7021.
- Fairchild, C. D. & Glazer, A. N. (1994) Nonenzymatic bilin addition to the α subunit of an apophycoerythrin. *J. Biol. Chem.* **269**: 28988 - 28996.
- Falk, H. & Grubmayr, K. (1977) The first *Z-E* isomerization of a bile pigment. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **16**: 470-471.

- Falk, H., Grubmayr, K., Haslinger, E., Schleder, T. & Thirring, K. (1978) Contributions to the chemistry of pyrrole pigments, XXV: The diastereomeric (geometrically isomeric) biliverdin dimethyl esters - structure, configuration and conformation. *Monatsh. Chem.* **109**: 1451-1473.
- Falk, H. & Müller, N. (1982) Force field calculations on linear polypyrrole systems. *Tetrahedron* **39**: 1875-1885.
- Falk, H. (1989) The chemistry of linear oligopyrroles and bile pigments. Springer-Verlag, Wien.
- Feng, D. F. & Doolittle, R. F. (1987) Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* **25**: 351-360.
- 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.
- Flüglstaller, P., H., W., W., S., G., F. & H., Z. (1981) Isolation and characterisation of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Arch. Microbiol.* 268 - 274.
- Foerstendorf, H., Parbel, A., Scheer, H. & Siebert, F. (1997) *Z,E* isomerization of the α -84 phycoviolobilin chromophore of phycoerythrocyanin from *Mastigocladus laminosus* investigated by fourier-transform infrared difference spectroscopy. *FEBS Lett.* **402**: 173-176.
- 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 Interactions. *Biochemistry* **40**: 14952-14959.
- 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.
- Frankenberg, N., Mukougawa, K., Kohchi, T. & Lagarias, J. C. (2001) Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**: 965-978.
- Fu, E., Friedman, L. & Siegelman, H. W. (1979) Mass-spectral identification and purification of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. *Biochem J* **179**: 1-6.
- Füglstaller, P., Widmer, H., Sidler, W., Frank, G. & Zuber, H. (1981) Isolation and characterisation of phycoerythrocyanin and chromatic adaptation of the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Arch. Microbiol.* **129**: 268-274.
- Füglstaller, P., Suter, F. & Zuber, H. (1983) The complete amino-acid sequence of both subunits of phycoerythrocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **364**: 691-712.
- Gampp, H., Maeder, M. I., Meyer, C. J. & Zuerühler, A. D. (1985) Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data - I. *Mathematical Considerations* **32**: 95-101.
- 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. (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: Photosynthesis III. Staehelin, L. A. & Arntzen, C. J. (Hrsg.). 327-337. Springer-Verlag, Berlin.
- Gantt, E. (1988) Phycobilisomes: assessment of core structure and thylakoid interaction. In: *Light-Energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plants and Bacterial Models*. Stevens, S. E. & Bryant, D. A. (Hrsg.). 91-101. American Society of Plant Physiologists, Rockeville, USA.
- Gärtner, W. (1997) Das pflanzliche Photorezeptorsystem Phytochrom. *Biol. unserer Zeit* **27**: 235-244.
- Glazer, A., Fang, S. & Brown, D. (1973a) Spectroscopic properties of C-phycoerythrin and of its α and β subunits. *J. Biol. Chem.* **248**: 5679-5685.
- 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. (1973b) Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins. *J. Biol. Chem.* **248**: 663-671.
- Glazer, A. N. (1980) Structure and Evolution of Photosynthetic Accessory Pigment Systems with Special Reference to Phycobiliproteins. In: *The Evolution of Protein Structure and Function*. Sigman, D. & Brazier, M. A. B. (Hrsg.). Academic Press, New York.
- Glazer, A. N. (1987) Phycobilisomes: assembly and attachment. In: *The Cyanobacteria*. Fay, P. & Van Baalen, C. (Hrsg.). 69-88. Elsevier Biomedical, Amsterdam.
- 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.
- Glick, R. E. & Zilinskas, B. A. (1982) Role of the colourless polypeptides in phycobilisome reconstitution from separated phycobiliproteins. *Plant Physiol.* **69**: 991-997.
- Göller, A. H., Strehlow, D. & Hermann, G. (2005) The excited-state chemistry of phycocyanobilin: a semiempirical study. *Chem. Phys. Chem.* **6**: 1259-1268.
- 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.
- Hagiwara, Y., Sugishima, M., Takahashi, Y. & Fukuyama, K. (2006) Crystal structure of phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase in complex with biliverdin IXalpha, a key enzyme in the biosynthesis of phycocyanobilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 27-32.
- Hahn, J., Strauss, H. M., Landgraf, F. T., Gimenez, H. F., Lochnit, G., Schmieder, P. & Hughes, J. (2006) Probing protein-chromophore interactions in Cph1 phytochrome by mutagenesis. *FEBS J.* **273**: 1415-1429.
- 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: DNA cloning, a practical approach. Glover, D. M. (Hrsg.). 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.
- Hill, C., Gartner, W., Towner, P., Braslavsky, S. E. & Schaffner, K. (1994) Expression of phytochrome apoprotein from *Avena sativa* in *Escherichia coli* and formation of photoactive chromoproteins by assembly with phycocyanobilin. *Eur. J. Biochem.* **223**: 69-77.
- Holleman, A., F. (1995) Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- Hong, Q., Zhao, K. H. & Scheer, H. (1993) Two different types of photochemistry in phycoerythrocyanin α -subunit. *Photochem. Photobiol.* **58**: 745-747.
- Hughes, J., Lamparter, T., Mittmann, F., Hartmann, E., Gärtner, W., Wilde, A. & Börner, T. (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* **386**: 663.
- Jander, G. (1995) Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum. S. Hirzel Verlag, Stuttgart, Leipzig.
- Jauregui-Adell, J. & Marti, J. (1975) Acidic cleavage of the aspartyl-proline bond and the limitation of the reaction. *Anal. Biochem.* **69**: 468-473.
- Jiang, T., Zhang, J. P., Chang, W. R. & Liang, D. C. (2001) Crystal structure of R-phycoyanin and possible energy transfer pathways in the phycobilisome. *Biophys. J.* **81**: 1171-1179.
- 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. & 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. & Glazer, A. N. (1995) Candidate genes for the phycoerythrocyanin α subunit lyase. *J. Biol. Chem.* **270**: 12877-12884.
- 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; 227-253.
- Kikuchi, H., Sugimoto, T. & Mimuro, M. (1997) An electronic state of the chromophore, phycocyanobilin, and its interaction with the protein moiety in C-phycocyanin: protonation of the chromophore. *Chem. Phys. Lett.* **274**: 460-465.
- Klein, G. & Rüdiger, W. (1979) Thioether formation of phycocyanobilin: a model reaction of phycocyanin biosynthesis. *Z. Naturforsch.* **34c**: 192-195.
- Klotz, A. V. & Glazer, A. N. (1985) Characterization of the bilin attachment sites in R-phycoerythrin. *J Biol Chem* **260**: 4856-4863.
- Kneip, C., Parbel, A., Foerstendorf, H., Scheer, H., Siebert, F. & Hildebrandt, P. (1998) Fourier transform near-infrared resonance raman spectroscopic study of the α -subunit of phycoerythrocyanin an phycocyanin from the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. Raman. Spectrosc.* **29**: 939-944.
- Knipp, B., Müller, M., Metzler-Nolte, N., Balaban, T. S. & Braslavsky, S. (1998) NMR verification of helical conformations of phycocyanobilin in organic solvents. *Helv. Chim. Acta* **81**: 881-888.
- Kufer, W. (1980) Untersuchungen zur Protein-Chromophor-Wechselwirkung in Biliproteinen. Reversible Denaturierung und Darstellung von Biliproteiden mit chemisch modifizierten Chromophoren. *Dissertation*, LMU München.
- Kufer, W., Cmiel, E., Thümmel, F., Rüdiger, W., Schneider, S. & Scheer, H. (1982) Studies on plant bile pigments. II. Regioselective photochemical and acid catalyzed Z,E isomerization of dihydrobilindione as phytochrome model. *Photochem. Photobiol.* **36**: 603-607.
- Kufer, W. & Björn, G. S. (1989) Photochromism of the cyanobacterial light harvesting biliprotein phycoerythrocyanin. *Physiol. Plant* **75**: 389-394.
- 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.
- Kupka, M. (2006) Statische und kinetische Untersuchungen zur Entfaltung von Phycocyanin aus *Mastigocladus laminosus*. *Dissertation*, LMU München.
- Kylin, H. (1910) Über Phykoerythrin und Phykocyan bei *Ceramium rubrum* (Huds.). *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **69**: 169-239.
- Kylin, H. (1912) Über die roten und blauen Farbstoffe bei Algen. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **76**: 396-425.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lagarias, J. C. & Rapoport, H. (1980) Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* **102**: 4821-4828.
- 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.
- Lamparter, T., Esteban, B. & Hughes, J. (2001) Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly, and quaternary structure. *Eur. J. Biochem.* **268**: 4720-4730.
- Lamparter, T., Carrascal, M., Michael, N., Martinez, E., Rottwinkel, G. & Abian, J. (2004) The biliverdin chromophore binds covalently to a conserved cysteine residue in the N-terminus of *Agrobacterium* phytochrome Agp1. *Biochemistry* **43**: 3659-3669.
- Leeper, F. J. (1991) Intermediate steps in the biosynthesis of chlorophylls. In: Chlorophylls. Scheer, H. (Hrsg.). 407-431. CRC Press, Boca Raton.
- Li, L. & Lagarias, J. C. (1992) Phytochrome Assembly. *J. Biol. Chem.* **267**: 19204-19210.
- Li, L., Murphy, J. T. & Lagarias, J. C. (1995) Continuous fluorescence assay of phytochrome assembly *in vitro*. *Biochemistry* **34**: 7923-7930.
- Liu, J. Y., Jiang, T., Zhang, J. P. & Liang, D. C. (1999) Crystal structure of allophycocyanin from red algae *Porphyra yezoensis* at 2.2-Å resolution. *J Biol Chem* **274**: 16945-16952.
- 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.
- Luque, I., Ochoa De Alda, J. A., Richaud, C., Zabulon, G., Thomas, J. C. & Houmard, J. (2003) The NblA1 protein from the filamentous cyanobacterium *Tolypothrix* PCC 7601: regulation of its expression and interactions with phycobilisome components. *Mol. Microbiol.* **50**: 1043-1054.
- MacColl, R., O'Connor, G., Crofton, G. & Csatorday, K. (1981) Phycoerythrocyanin: its spectroscopic behavior and properties. *Photochem. Photobiol.* **34**: 719-723.
- MacColl, R. (1987) Phycobiliproteins. CRC Press, Boca Raton.
- MacColl, R. (1998) Cyanobacterial Phycobilisomes. *J. Struct. Biol.* **124**: 311-334.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Marai, C. N. J., Chass, G. A., Doust, A. B. & Scholes, G. D. (2004) An ab initio conformational study on 2,3-dihydrobilin-1,19(21H,24H)-dione, a model compound for open-chain tetrapyrroles. *J. Mol. Structure (Theochem.)* **680**: 219-225.
- Maruthi Sai, P. S., Siebzehnrübl, 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.
- Mataga, N., Shibata, Y., Chosrowjan, H., Yoshida, N. & Osuka, A. (2000) Internal conversion and vibronic relaxation from higher excited electronic state of porphyrins: Femtosecond fluorescence dynamics studies. *J. Phys. Chem. B* **4**: 4001-4004.

- Montelione, G. T., Zheng, D., Huang, Y. J., Gunsalus, K. C. & Szyperski, T. (2000) Protein NMR spectroscopy in structural genomics. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 982-985.
- Mörschel, E., Koller, K. P., Wehrmeyer, W. & H., S. (1977) Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*: I. Electron microscopy of phycobilisomes in situ and analysis of their architecture after isolation and negative staining. *Eur. J. Cell Biol.* **18**: 118-129.
- Muchmore, D. C., McIntosh, L. P., Russell, C. B., Anderson, D. E. & Dahlquist, F. W. (1989) Expression and nitrogen-15 labeling of proteins for proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance. *Meth. Enzymol.* **177**: 44-73.
- Muhlhahn, P., Zweckstetter, M., Georgescu, J., Ciosto, C., Renner, C., Lanzendorfer, M., Lang, K., Ambrosius, D., Baier, M., Kurth, R. & Holak, T. A. (1998) Structure of interleukin 16 resembles a PDZ domain with an occluded peptide binding site. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 682-686.
- Nagy, J. O., Bishop, J. E., Klotz, A. V., Glazer, A. N. & Rapoport, H. (1985) Bilin attachment sites in the alpha, beta, and gamma subunits of R-phycoerythrin. Structural studies on singly and doubly linked phycourobilins. *J. Biol. Chem.* **260**: 4864-4868.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Mimuro, M., Miyashita, H., Tsuchiya, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2003) Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* **10**: 137-145.
- Nargang, F. E., Drygas, M. E., Kwong, P. L., Nicholson, D. W. & Neupert, W. (1988) A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome *c* heme lyase activity cannot import cytochrome *c* into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **263**: 9388-9394.
- Needleman, S. B. & Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**: 443-453.
- Nevill-Manning, C. G., Huang, C. N. & Brutlag, D. L. (1997) Pairwise protein sequence alignment using Needleman-Wunsch and Smith-Waterman algorithms. *personal communication*
- Ng, W. O., Grossman, A. R. & Bhaya, D. (2003) Multiple light inputs control phototaxis in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **185**: 1599-1607.
- 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.
- Ong, L. J. & Glazer, A. N. (1987) R-phycoerythrin II, a new phycoerythrin occurring in marine *Synechococcus* species. Identification of the terminal energy acceptor bilin in phycoerythrin. *J. Biol. Chem.* **262**: 6323-6327.

- Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R. & Ramakumar, S. (2001) Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**: 893-898.
- Palenik, B., Brahamsha, B., Larimer, F. W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., Lamerdin, J., Regala, W., Allen, E. E., McCarren, J., Paulsen, I., Dufresne, A., Partensky, F., Webb, E. A. & Waterbury, J. (2003) The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**: 1037-1042.
- Parbel, A. (1997) Charakterisierung von Phycobiliprotein-Linkerkomplexen aus dem Phycobilisom von *Mastigocladus laminosus*. *Dissertation*, LMU München.
- 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. PCC6803 phytochrome Cph1. *Biochemistry* **39**: 6349-6356.
- Parker, M. W., Hendricks, S. B., Borthwick, H. A. & Scully, N. J. (1945) *Science* **102**: 152.
- Petryka, Z. J. & Howe, R. B. (1979) Historical and clinical aspects of bile pigments. In: *The Porphyrins* Vol. VI. Dolphin, D. (Hrsg.). Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Prestegard, J. H., Valafar, H., Glushka, J. & Tian, F. (2001) Nuclear magnetic resonance in the era of structural genomics. *Biochemistry* **40**: 8677-8685.
- Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. & Wagner, D. (1995) Phytochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* **268**: 675-680.
- Quest, B. & Gärtner, W. (2004) Chromophore selectivity in bacterial phytochromes: Dissecting the process of chromophore attachment. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1117-1126.
- Reuter, W. & Wehrmeyer, W. (1988) Core substructure in *Mastigocladus laminosus* phycobilisomes. I. Microheterogeneity in two of three allophycocyanin core complexes. *Arch. Microbiol.* **150**: 534-540.
- Reuter, W., Wiegand, G., Huber, R. & Than, M. E. (1999) Structural analysis at 2.2 Å of orthorhombic crystals presents the asymmetry of the allophycocyanin-linker complex, AP.LC7.8, from phycobilisomes of *Mastigocladus laminosus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1363-1368.
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schumann, K., Veith, G., Zuber, G. & Knorre, W. A. (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 77-82.
- Rüdiger, W. (1970) Bile pigments in invertebrates. *Naturwissenschaften* **57**: 331-337.
- Rüdiger, W. (1971) Gallenfarbstoffe und Biliproteide. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **29**: 60-139.
- Rüdiger, W. & Thümmel, F. (1991) Phytochrom, das Sehpigment der Pflanzen. *Angew. Chem.* **103**: 1242-1254.
- Rüdiger, W. (1994) Phycobiliproteins and phycobilins. In: *Progress in phycological research*. Round, F. E. & Chapman, D. J. (Hrsg.). 97-135. Biopress, Bristol.

- Rüdiger, W. & Thümmler, F. (1994) The phytochrome chromophore. In: Photomorphogenesis in Plants. Kendrick, R. E. & Kronenberg, G. H. M. (Hrsg.). 51-69. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.
- 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. B.* **3**: 603-614.
- Scheer, H. & Kufer, W. (1977) Conformational studies on C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Z. Naturforsch.* **32**: 513-519.
- Scheer, H. (1981) Biliproteine. *Angew. Chem.* **93**: 230-250.
- Scheer, H. (1982) Phycobiliproteins: Molecular aspects of photosynthetic antenna system, Vol. 35 Light reaction path of photosynthesis. In: Molecular biology, biochemistry and biophysics. Fong, F. K. (Hrsg.). 7-45. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Scheer, H. (1999) Pigmente und Antennenkomplexe. In: Photosynthese. Häder, D. P. H. (Hrsg.). 65-90. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Scheer, H. (2003) The pigments. In: Light-harvesting antennas in photosynthesis. Green, B. R. & Parson, W. W. H. (Hrsg.). 29-81. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- Schirmer, T., Bode, W., Huber, R., Sidler, W. & Zuber, H. (1985) X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *Mastigocladus laminosus* and its resemblance to globin structure. *J. Mol. Biol.* **184**: 257-277.
- Schirmer, T., Huber, R., Schneider, M., Bode, W., Miller, M. & Hackert, M. L. (1986) Crystal structure analysis and refinement at 2.5 Å of hexameric C-phycoyanin from the cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. The molecular model and its implications for light-harvesting. *J. Mol. Biol.* **188**: 651-676.
- Schirmer, T., Bode, W. & Huber, R. (1987) Refined three-dimensional structure of two cyanobacterial C-phycoyanins at 2.1 and 2.5 Å resolution. A common principal of phycobilin-protein interaction. *J. Mol. Biol.* **196**: 677-695.
- Schluchter, W. M. & Glazer, A. N. (1999) Biosynthesis of phycobiliproteins in cyanobacteria. In: The phototrophic prokaryotes. Peschek, G. A., Loeffelhardt, W. & Schmetterer, G. (Hrsg.). 83-95. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York.
- Schmid, R. & McDonagh, A. F. (1979) Formation and metabolism of bile pigments in vivo. In: The Porphyrins, Vol. VI. Dolphin, D. (Hrsg.). Academic Press, New York, San Francisco, London.
- Schmidt, M., Krasselt, A. & Reuter, W. (2006) Local protein flexibility as a prerequisite for reversible chromophore isomerization in alpha-phycoerythrocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**: 55-62.
- Schram, B. L. & Kroes, H. H. (1971) Structure of phycocyanobilin. *Eur. J. Biochem.* **19**: 581 - 594.
- Senn, H., Eugster, A., Otting, G., Suter, F. & Wuthrich, K. (1987) ¹⁵N-labeled P22 c2 repressor for nuclear magnetic resonance studies of protein-DNA interactions. *Eur. Biophys. J.* **14**: 301-306.

- Shen, G., Saunee, N. A., Gallo, E., Begovic, Z., Schluchter, W. M. & Bryant, D. A. (2004) Identification of novel phycobiliprotein lyases in cyanobacteria. In: Photosynthesis 2004 light-harvesting systems workshop. Niederman, R. A., Blankenship, R. E., Frank, H., Robert, B. & van Grondelle, R. (Hrsg.). 14-15. Saint Adele, Québec, Canada.
- Shen, G., Saunee, N. A., Williams, S. R., Gallo, E. F., Schluchter, W. M. & Bryant, D. A. (2006) Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the *cpcT* gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta subunit of phycocyanin in *Synechococcus* sp. PCC 7002. *J. Biol. Chem.* **281**: 17768-17778.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. (1996) Discovering highaffinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* **274**: 1531-1534.
- Sidler, W., Gysi, J., Isker, E. & Zuber, H. (1981) The complete amino acid sequence of both subunits of allophycocyanin, 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*. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **367**: 627-642.
- Sidler, W. (1994) Phycobilisomes and phycobiliprotein structures. In: The Biology of Cyanobacteria. Bryant, D. A. (Hrsg.). 139-216. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 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.
- Siebzehnrübl, S. (1990) Chromophorzuordnung und reversible Photochemie von C-Phycocyanin und Phycoerythrocyaninen. *Dissertation*, LMU München.
- Siedel, W. & Fischer, H. (1933) Über die Konstitution des Bilirubins, Synthese der Neo- und der Isonoxanthobilirubinsäure. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **214**,: 145.
- Six, C., Thomas, J.-C., Thion, L., Lemoine, Y., Zal, F. & Partensky, F. (2005) Two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain WH8102. *J. Bacteriol.* **187**: 1685-1694.
- Smith, H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature* **407**: 585-591.
- Smith, R. & Waterman, M. S. (1981) Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* **147**: 195-197.
- Sommer, D. & Song, P. S. (1990) Chromophore topography and secondary structure of 124-kilodalton *Avena* phytochrome probed by Zn²⁽⁺⁾-induced chromophore modification. *Biochemistry* **29**: 1943-1948.
- Städeler, G. (1864) Über die Farbstoffe der Galle. *Liebigs Ann. Chem.* **132**: 323.
- Stanek, M. & Grubmayr, K. (1998) Protonated 2,3-dihydrobilindiones - models for the chromophores of phycocyanin and the red-absorbing form of phytochrome. *Chem. Eur. J.* **4**: 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.
- Stec, B., Troxler, R. F. & Teeter, M. M. (1999) Crystal structure of C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. *Biophys. J.* **76**: 2912-2921.
- Storf, M., Parbel, A., Meyer, M., Strohmann, B., Scheer, H., Deng, M., Zheng, M., Zhou, M. & Zhao, K. (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.
- Storf, M. (2003) Chromophorbindung und Photochemie der α -Untereinheit des Phycoerythrocyanins aus *Mastigocladus laminosus*. *Dissertation*, LMU München.
- Strauss, H. M., Hughes, J. & Schmieder, P. (2005) Heteronuclear solution-state NMR studies of the chromophore in cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* **44**: 8244-8250.
- Stuart, R. A. & Neupert, W. (1990) Apocytochrome c: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway. *Biochimie* **72**: 115-121.
- 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.
- 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 phycocourobilin content. *J. Biol. Chem.* **266**: 9528-9534.
- 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. & Cohen-Bazire, G. (1977) Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1635-1639.
- Tandeau de Marsac, N., Mazel, D., Capuano, V., Damerval, T. & Houmard, J. (1990) *Molecular Biology of Membrane-Bound Complexes in Phototrophic Bacteria*. Plenum, New York.
- Terry, M. J., Wahleithner, J. A. & Lagarias, J. C. (1993) Biosynthesis of the plant photoreceptor phytochrome. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**: 1-15.
- Thenard, L. J. (1807) Mémoire sur la bile. *Mem. Phys. Chim. Arc.* **1**: 23.
- Tong, J. & Margoliash, E. (1998) Cytochrome c heme lyase activity of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**: 25695-25702.
- Tooley, A. J., Cai, Y. A. & Glazer, A. N. (2001) Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo- α subunit in a heterologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10560-10565.
- 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.

- van Thor, J. J., Borucki, B., Crielgaard, W., Otto, H., Lamparter, T., Hughes, J., Hellingwerf, K. J. & Heyn, M. P. (2001) Light-induced proton release and proton uptake reactions in the cyanobacterial phytochrome Cph1. *Biochemistry* **40**: 11460-11471.
- Virchow, R. (1847) Die pathologischen Pigmente. *Arch. Pathol. Anat. Klin. Med.* **1**: 379-404.
- Wagner, J. R., Brunzelle, J. S., Forest, K. T. & Vierstra, R. D. (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**: 325-331.
- 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.
- Walsh, C. T. (2005) Posttranslational modification of Proteins. Roberts & Co. Publisher, Colorado.
- 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.
- Wehrmeyer, W. (1983) Phycobiliproteins and phycobiliprotein organization in the photosynthetic apparatus of cyanobacteria, red algae, and cryptophytes. In: Proteins and nucleic acids in plant systematics. Jensen, U. & Fairbrothers, D. E. H. (Hrsg.). 144-167. Springer Verlag, Berlin.
- Weller, J. P. & Gossauer, A. (1980) Synthesis of bile pigments. X. Synthesis and photoisomerization of racemic phytychromobilin dimethyl ester. *Chem. Ber.* **113**: 1603-1611.
- Wider, G. (2000) Structure determination of biological macromolecules in solution using NMR spectroscopy. *BioTechniques* **29**: 1278-1294.
- Wiegand, G., Parbel, A., Seifert, M. H., Holak, T. A. & Reuter, W. (2002) Purification, crystallization, NMR spectroscopy and biochemical analyses of alpha-phycoerythrocyanin peptides. *Eur. J. Biochem.* **269**: 5046-5055.
- Wilbanks, S. M. & Glazer, A. N. (1993) Rod structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. I. Organization and sequence of the gene cluster encoding the major phycobiliprotein rod components in the genome of marine *Synechococcus* sp. WH8020. *J. Biol. Chem.* **268**: 1226-1235.
- Wu, S. H., McDowell, M. T. & Lagarias, J. C. (1997) Phycocyanobilin is the natural precursor of the phytochrome chromophore in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *J. Biol. Chem.* **272**: 25700-25705.
- Wu, S.-H. & Lagarias, J. C. (2000) Defining the Bilin Lyase Domain: Lessons from the Extended Phytochrome Superfamily. *Biochemistry* **39**: 13487-13495.
- Yamanaka, N. & Glazer, A. N. (1980) Dynamic aspects of phycobilisome structure. *Arch. Microbiol.* **124**: 39-47.
- Yatsushashi, H. & Kobayashi, H. (1993) Bibliographic information dual involvement of phytochrome in light-oriented chloroplast movement in *Dryopteris sparsa* protonemata. *Photochem. Photobiol.* **19**: 25-31.

- Yoshihara, S., Katayama, M., Geng, X. & Ikeuchi, M. (2004) Cyanobacterial phytochrome-like PixJ1 holoprotein shows novel reversible photoconversion between blue- and green-absorbing forms. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1729-1737.
- Yoshihara, S., Shimada, T., Matsuoka, D., Zikihara, K., Kohchi, T. & Tokutomi, S. (2006) Reconstitution of blue-green reversible photoconversion of a cyanobacterial photoreceptor, PixJ1, in phycocyanobilin-producing *Escherichia coli*. *Biochemistry* **45**: 3775-3784.
- Zehetmayer, P. (2003) Das Monomer des Lichtsammelkomplexes Phycoerythrocyanin: Optische Experimente am Ensemble, an einzelnen Molekülen und Modellierung des Energietransferverhaltens. *Dissertation*, LMU München.
- Zhao, K. H., Haessner, R., Cmiel, E. & Scheer, H. (1995a) Type I reversible photochemistry of phycoerythrocyanin involves *Z/E*-isomerization of α -84 phycoviolobilin chromophore. *Biochim. Biophys. Acta* **1228**: 235-243.
- Zhao, K. H. & Scheer, H. (1995b) 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. & Scheer, H. (1999) Intermediates of reversible photochemistry of phycoerythrocyanin α -subunit from *Mastigocladus laminosus* probed by low temperature absorption and circular dichroism spectroscopy. *Intern. J. Photoenergy* **1**: 25-30.
- Zhao, K. H., Deng, M.-G., Zheng, M., Zhou, 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 PecE and PecF. *FEBS Lett.* **469**: 9-13.
- Zhao, K. H., Zhu, J. P., Deng, M. G., Zhou, M., Storf, M., Parbel, A. & Scheer, H. (2003) Photochromic chromopeptides derived from phycoerythrocyanin: biophysical and biochemical characterization. *Photochem. Photobiol. Sci.* 741-748.
- Zhao, K. H., Zhu, J. P., Song, B., Zhou, M., Storf, M., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2004) Non-enzymatic chromophore attachment in biliproteins: Conformational control by the detergent Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* **1657**: 131-145.
- Zhao, K. H., Su, P., Böhm, S., Song, B., Zhou, M., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2005a) Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, L_{cm} , by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**: 81-87.
- Zhao, K. H., Wu, D., Zhou, M., Zhang, L., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2005b) Amino acid residues associated with enzymatic activity of the isomerizing phycoviolobilin-lyase PecE/F. *Biochemistry* **44**: 8126-8137.
- Zhao, K. H., Su, P., Li, J., Tu, J. M., Zhou, M., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2006a) Chromophore attachment to phycobiliprotein beta-subunits: phycocyanobilin:cysteine-beta84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from *Anabaena* sp. PCC7120. *J. Biol. Chem.* **281**: 8573-8581.
- Zhao, K. H., Wu, D., Zhang, L., Zhou, M., Böhm, S., Bubenzer, C. & Scheer, H. (2006b) Chromophore attachment in phycocyanin. Functional amino acids of phycocyanobilin-alpha-phycocyanin lyase and evidence for chromophore binding. *FEBS J.* **273**: 1262-1274.

Zhao, K.-H., Wu, D., Wang, L., Zhou, M., Storf, M., Bubenzer, C., Strohmann, B. & Scheer, H. (2002) Characterization of Phycoviolobilin Phycoerythrocyanin- α 84-cysteine-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., Friedrich, J. & Rüdiger, W. (1980) Spectral characterization of monomeric C-phycoerythrin from *Pseudoanabaena* W1173 and its α and β subunits: energy transfer in isolated subunits and C-phycoerythrin. *Photochem. Photobiol.* **31**: 367-376.

Zuber, H. (1987) The structure of light-harvesting pigment-protein complexes. In: The Light Reactions. Barber, J. (Hrsg.). 157-259. Elsevier Biomedical, Amsterdam.

Lebenslauf

Name	Stephan Joachim Böhm
Geburtstag	22.03.1973
Geburtsort	München
1980 – 1984	Grundschule Anzing
1984 – 1985	Hauptschule Markt Schwaben
1985 – 1994	Franz-Marc-Gymnasium Markt Schwaben
1994 – 1995	Wehrdienst in München
1995 – 2002	Studium der Biologie und des Lehramtes Biologie/Chemie für Gymnasien an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2002	Diplom und 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien
August 2002	Beginn der Promotion am Lehrstuhl III (Biochemie der Pflanze) – Department Biologie I – Bereich Botanik, LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. Hugo Scheer

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere ferner, dass ich die vorliegende Arbeit nicht schon als Doktor-, Magister- oder Diplomarbeit bei einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift