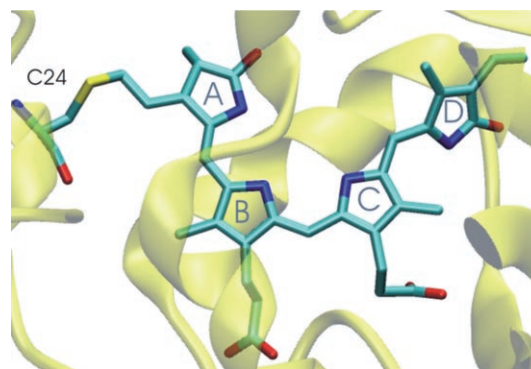


# Resonanz-Raman-spektroskopische Untersuchung der Chromophorheterogenität und Photokonversion in Phytochromkristallen und -lösungen\*\*

David von Stetten, Mina Günther, Patrick Scheerer, Daniel H. Murgida, Maria Andrea Mroginski, Norbert Krauß, Tilman Lamparter, Junrui Zhang, David M. Anstrom, Richard D. Vierstra, Katrina T. Forest und Peter Hildebrandt\*

Phytochrome bilden eine Familie sensorischer Photorezeptoren, die in Pflanzen, Bakterien und Pilzen verbreitet sind.<sup>[1]</sup> Der auf Licht reagierende Cofaktor, ein methinverbrücktes Tetrapyrrol, ist über eine Thioetherbrücke kovalent an das Apoprotein gebunden (Abbildung 1). Lichtabsorption des Chromophors im Ausgangszustand Pr führt zu einer *Z*→*E*-Doppelbindungsisomerisierung der Methinbrücke zwischen den Ringen C und D, gefolgt von einer Reihe thermischer Relaxationsprozesse, in denen die Strukturänderungen von Chromophor und Protein gekoppelt werden. Der letzte Schritt ist die Bildung des Pfr-Zustandes, der in Pflanzen die physiologisch aktive Form des Proteins darstellt. Der molekulare Mechanismus der Pr→Pfr-Photokonversion ist noch nicht aufgeklärt, allerdings gelang kürzlich ein entscheidender Durchbruch mit der Bestimmung der dreidimensionalen Strukturen des Pr-Zustandes von bakteriellen, Biliverdin-



**Abbildung 1.** ZZZssa-Geometrie des Biliverdins im Pr-Zustand der Chromophorbindungsdomäne von DrBphP gemäß der Kristallstrukturdaten.<sup>[2b]</sup>

bindenden Phytochromen, die als repräsentative Modelle für diese Familie von Photorezeptoren gelten.<sup>[2]</sup> Diese Strukturen beziehen sich allerdings auf die Chromophorbindungsdomäne (CBD) des Phytochroms, dem die für die Pr→Pfr-Photokonversion als essentiell angenommene PHY-Domäne fehlt. Gleichzeitig können sowohl die durch Strahlenschädigung verursachte Freisetzung des Chromophors als auch die begrenzte Auflösung Grund zu der Annahme geben, dass die Chromophorgeometrie, insbesondere im Bereich der Thioetherbrücke und des Ringes A, eine Verfeinerung der Strukturdaten erfordert.<sup>[2c]</sup> In der Tat haben spektroskopische Untersuchungen an Phytochromen in Lösung zu Schlussfolgerungen geführt, die hinsichtlich der Konformation und der Strukturhomogenität des Chromophors im Widerspruch zu den Resultaten der Kristallstrukturanalyse stehen.<sup>[3,4]</sup> Aus diesem Grunde ist es wünschenswert, die Chromophorstruktur von Phytochromen in Lösung und in kristalliner Form mithilfe derselben Methode zu untersuchen.

In dieser Arbeit haben wir die Resonanz-Raman(RR)-Spektroskopie eingesetzt, die ausschließlich die Schwingungsbanden des Cofaktors abfragt und so Informationen über die Struktur des Tetrapyrrols liefert.<sup>[3]</sup> Die ersten RR-Spektren von Photorezeptorkristallen bezogen sich auf Bakteriorhodopsin,<sup>[5]</sup> wobei wegen der strengen Resonanzbedingungen nur photostationäre Mischungen gemessen werden konnten. In dieser Arbeit wurde eine Anregungswellenlänge von 1064 nm verwendet, um die Initiierung photochemischer Prozesse des Phytochroms durch den Raman-Anregungslaser zu vermeiden. Auf diese Weise konnten zum ersten Mal RR-

[\*] D. von Stetten, M. Günther, M. A. Mroginski, Prof. P. Hildebrandt  
Institut für Chemie, Sekr. PC14, Technische Universität Berlin  
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)  
Fax: (+49) 303-142-1122  
E-Mail: Hildebrandt@chem.tu-berlin.de

P. Scheerer  
Institut für Medizinische Physik und Biophysik  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Ziegelstraße 5–9, 10098 Berlin (Deutschland)

D. H. Murgida  
INQUIMAE, Universidad de Buenos Aires  
C1428EH Buenos Aires (Argentinien)

N. Krauß  
School of Biological and Chemical Sciences  
Queen Mary, University of London  
Mile End Road, London E1 4NS (Großbritannien)

Prof. T. Lamparter  
Botanik 1, Universität Karlsruhe  
Kaiserstr. 12, 76128 Karlsruhe (Deutschland)

J. Zhang, Prof. R. D. Vierstra  
Department of Genetics, University of Wisconsin, Madison  
Madison, WI 53706 (USA)

D. M. Anstrom, Prof. K. T. Forest  
Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison  
Madison, WI 53706 (USA)

[\*\*] Die Arbeit wurde durch die DFG [SFB 498 (N.K., T.L., P.H., M.A.M.) und CoE „Unicat“ (P.H., M.A.M.)] und die NSF [0719153 (K.T.F., R.D.V.)] gefördert.

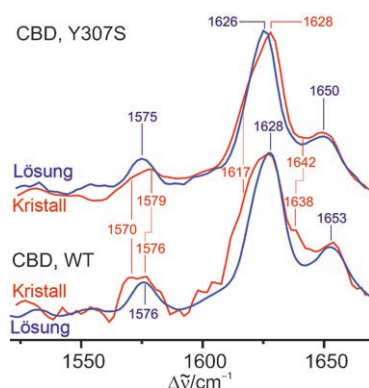
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Spektren eines Photorezeptorkristalls im reinen Ausgangs- und in einem Intermediatzustand aufgenommen werden.

Die Präparation der Kristalle der CBD des Wildtyps (WT) und der Y307S-Mutante des Phytochroms aus *Deinococcus radiodurans* (DrBphP) sowie eines Konstrukts des Phytochroms Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens*, das sowohl die CBD als auch die PHY-Domäne enthält (Agp1-M15), wurde in früheren Veröffentlichungen beschrieben.<sup>[2a,b,6]</sup> Während der RR-Experimente wurden die Proteinkristalle in Pufferlösung gehalten, wobei bei großen Kristallen sich in der Regel ein Kristall im Fokus des Laserstrahls befand. Unterschiedliche Kristalle zeigten identische RR-Spektren, weshalb Anisotropieeffekte ausgeschlossen werden können. Die schrittweise Erhöhung der Laserleistung von 15 auf 700 mW führte zu keinen spektralen Veränderungen, woraus man schließen kann, dass die Kristalle durch den Nahinfrarot-Laser nicht beschädigt werden. Die Photokonversionsprodukte der Lösungs- und Kristallproben wurden durch Bestrahlung mit Rotlicht erzeugt.<sup>[3]</sup> Alle Messungen wurden bei  $-140^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Spektren der Proteinkristalle enthalten beträchtliche Beiträge aus den Raman-Banden des umgebenden Puffers, die jedoch die für die Methinbrückengeometrie des Tetrapyrrols charakteristischen Banden (Markerbanden) nicht verdecken.<sup>[3]</sup>

Die RR-Spektren des Pr-Zustandes des WT-Volllängenphytochroms DrBphP und der WT-CBD in gefrorenen Lösungen sind identisch, was darauf hindeutet, dass die Struktur des Chromophors und dessen Wechselwirkung mit der Proteinumgebung im CBD-Fragment des Proteins nicht durch die PHY- und Histidinkinase-Domänen beeinflusst werden. (Abbildung S1, Hintergrundinformationen). In beiden Fällen ist der Chromophor protoniert, wie die Moden der N-H-Biegeschwingungen der Ringe B und C bei  $1576\text{ m}^{-1}$  belegen. Diese Moden verschwinden in  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösungen. Vom CBD-Fragment der Y307S-Mutante in Lösung wurde ein sehr ähnliches Spektrum aufgenommen, wenngleich die Markerbanden im Vergleich zum Spektrum des WT-CBD-Fragments um 1 bis  $2\text{ cm}^{-1}$  nach niedrigeren Wellenzahlen verschoben sind (Abbildung 2).

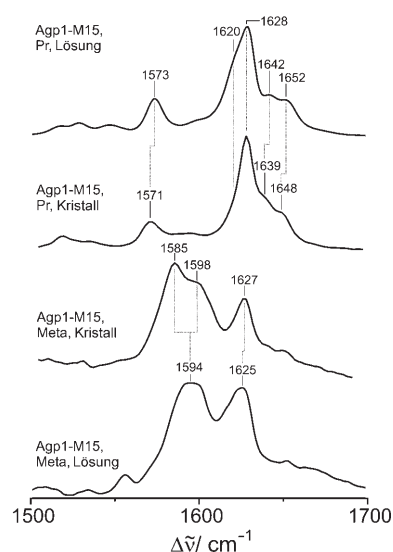
In den RR-Spektren der kristallinen CBD erkennt man die charakteristischen Merkmale des Pr-Zustandes, was die Übereinstimmung der Chromophorstruktur im kristallinen



**Abbildung 2.** RR-Spektren der Markerbandenregion im Pr-Zustand der WT-CBD (DrBphP) (unten) und der Y307S-CBD (DrBphP) (oben) in Lösung (blau) und im kristallinem Zustand (rot).

und im gelösten Protein belegt. Allerdings sind die Banden des WT-CBD-Kristalls im Gegensatz zu denen der Y307S-CBD beträchtlich verbreitert und zeigen eine stärkere Asymmetrie als die Banden des Proteins in gefrorener Lösung, was als Hinweis auf eine erhöhte Heterogenität im Kristall gewertet werden muss (Abbildung 2). Insbesondere das markante Signal bei  $1628\text{ cm}^{-1}$  (C=C-Streckschwingung der C-D-Methinbrücke<sup>[3]</sup>) ist durch zusätzliche Banden auf der höher- und der niederfrequenten Seite von  $16\text{ auf }26\text{ cm}^{-1}$  verbreitert. Diese neuen Banden bei ca.  $1617\text{ und }1638\text{ cm}^{-1}$  werden jeweils der C=C-Streckschwingungsmoden der C-D- und A-B-Methinbrücke zugeordnet. Auch die Mode der N-H-Biegeschwingung zeigt sich als Dublett mit Bandenkomponenten bei  $1576\text{ und }1570\text{ cm}^{-1}$ .

Die Spektren der Kristalle von Agp1-M15 zeigen ein umgekehrtes Verhalten wie die Spektren des Proteins in Lösung (Abbildung 3). Das Spektrum der Lösung weist ein



**Abbildung 3.** RR-Spektren der Markerbandenregion des Pr-Zustandes von Agp1-M15 in Lösung und in kristalliner Form im Vergleich mit dem Meta-Rc-ähnlichen Zuständen von Agp1-M15 im Kristall und in Lösung, gemessen nach Bestrahlung mit Rotlicht bei  $20^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-30^{\circ}\text{C}$ . Die spektralen Anteile des nicht-photolysierten Ausgangszustandes Pr wurden subtrahiert.

Bandenmuster auf, das charakteristisch für zwei Chromophor-Konformationen ist, was sich aus den Bandenverdoppelungen bei  $1652\text{ und }1642\text{ cm}^{-1}$  (A-B-Streckschwingung) sowie bei  $1628\text{ und }1620\text{ cm}^{-1}$  (C-D-Streckschwingung) ableiten lässt. Die RR-Spektren des Agp1-Kristalls hingegen lassen eine Verschmälerung des Signals bei  $1628\text{ cm}^{-1}$  erkennen, die eindeutig dem Intensitätsverlust der Schulter bei  $1620\text{ cm}^{-1}$  zugeschrieben werden kann. Weiterhin hat sich die Intensitätsverteilung der hochfrequenten Doppelbande auf Kosten der Bande bei  $1652\text{ cm}^{-1}$  verändert. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Kristallisation von Agp1-M15 zu einer homogeneren, wenngleich auch nicht vollkommen einheitlichen Chromophor-Konformation führt.

Die Doppelbanden bei  $1650\text{ und }1640\text{ cm}^{-1}$ ,  $1628\text{ und }1617\text{ cm}^{-1}$  sowie  $1576\text{ und }1570\text{ cm}^{-1}$ , die sowohl in den RR-

Spektren von Agp1-M15 in Lösung und in kristalliner Form als auch in denen von WT-CBD(DrBphP)-Kristallen deutlich erkennbar sind, deuten auf die Koexistenz von mindestens zwei, vermutlich sehr ähnlichen Konformeren hin. Die zugrunde liegenden strukturellen Unterschiede beziehen sich höchst wahrscheinlich auf die C=C-Torsionswinkel der A-B- und C-D-Methinbrücke, die die Frequenzen der A-B- und C-D-Streckschwingungsmoden sehr empfindlich beeinflussen, und auf die Wasserstoffbrücken der Pyrrolringe B und C. Im Falle des Agp1-M15 und WT-CBD(DrBphP) beeinflusst die Kristallisation diese Heterogenität, nicht jedoch bei Y307S-CBD(DrBphP), für das die Struktur mit der höchsten Auflösung ermittelt wurde.<sup>[2b]</sup> Das auffällig abweichende Verhalten des Agp1-M15-Proteins steht offenbar in Zusammenhang mit der Wechselwirkung zwischen der PHY- und der CBD-Domäne, die in kristalliner Packung eine homogenere Chromophorstruktur stabilisiert als in Lösung. An dieser Stelle sei angemerkt, dass auf eine Strukturheterogenität des Chromophors auch aus spektroskopischen Untersuchungen an pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen geschlossen wurde.<sup>[4,7]</sup>

Die Bestrahlung der Y307S-CBD(DrBphP)-Kristalle bei 20 °C führte zu keinen spektralen Veränderungen, was belegt, dass eine Photoisomerisierung des Chromophors nicht möglich ist. Auch hier zeigen die CBD-Fragmente in Lösung ein anderes Verhalten, da sie durch Photokonversion in einen Meta-Rc-ähnlichen Zustand überführt werden können (Abbildung S2, Hintergrundinformationen), was die Vermutung nahelegt, dass die Unfähigkeit der CBD(DrBphP)-Kristalle, eine Photoreaktion einzugehen, auf Packungseffekte im Kristall zurückzuführen ist. Im Unterschied dazu durchläuft kristallines Agp1-M15, das die essentielle PHY-Domäne enthält, den Photozyklus bis zum Meta-Rc-ähnlichen Zustand und liefert ein Spektrum, das ähnlich, wenn auch nicht identisch ist zu dem des Meta-Rc-Zustandes von Agp1-M15 in Lösung (Abbildung 3). Der finale Relaxationsprozess zum Pfr-Zustand wird im Kristall blockiert und kann nur bei Agp1-M15 in Lösung beobachtet werden.<sup>[8]</sup> Die vollständige

Phototransformation bis zum Pfr-Zustand würde im kristallinen Zustand höchstwahrscheinlich das Auseinanderbrechen der Kristallpackung erfordern, was angesichts der weitreichenden Strukturänderungen des Proteins beim Meta-Rc → Pfr-Übergang verständlich ist.<sup>[8a]</sup>

Eingegangen am 13. Dezember 2007  
Online veröffentlicht am 16. Mai 2008

**Stichwörter:** Photorezeptoren · Phytochrom · Proteinkristalle · Raman-Spektroskopie · Tetrapyrrole

- 
- [1] a) N. C. Rockwell, Y. S. Su, J. C. Lagarias, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 837; b) P. H. Quail, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 85.
- [2] a) J. R. Wagner, J. S. Brunzelle, K. T. Forest, R. D. Vierstra, *Nature* **2005**, *438*, 325; b) J. R. Wagner, J. Zhang, J. S. Brunzelle, R. D. Vierstra, K. T. Forest, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12298; c) X. Yang, E. A. Stojkovic, J. Kuk, K. Moffat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 12571.
- [3] a) M. A. Mroginski, D. H. Murgida, D. von Stetten, C. Kneip, F. Mark, P. Hildebrandt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16734; b) D. H. Murgida, D. von Stetten, P. Hildebrandt, P. Schwinté, F. Siebert, S. Sharda, W. Gärtner, M. A. Mroginski, *Biophys. J.* **2007**, *93*, 2410.
- [4] J. J. van Thor, M. Mackeen, I. Kuprov, R. A. Dwek, M. R. Wormald, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 1811.
- [5] L. S. Sani, A. W. Schill, C. E. Moran, M. A. El-Sayed, *Biophys. J.* **2005**, *89*, 444.
- [6] P. Scheerer, N. Michael, J. H. Park, S. Noack, C. Förster, M. A. S. Hammam, K. Inomata, H. W. Choe, T. Lamparter, N. Krauß, *J. Struct. Biol.* **2006**, *153*, 97.
- [7] P. Schmidt, T. Gensch, A. Remberg, W. Gärtner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 754.
- [8] a) D. von Stetten, S. Seibeck, N. Michael, P. Scheerer, M. A. Mroginski, D. H. Murgida, N. Krauss, M. P. Heyn, P. Hildebrandt, B. Borucki, T. Lamparter, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2116; b) K. Inomata, M. A. S. Hammam, H. Kinoshita, Y. Murata, H. Khawn, S. Noack, N. Michael, T. Lamparter, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24491.