

# Biliproteine

Von Hugo Scheer<sup>[\*]</sup>

Professor Hans Herloff Inhoffen zum 75. Geburtstag gewidmet

Biliproteine, die aus Proteinen und Gallenfarbstoffen bestehen, dienen als Lichtsammlerpigmente der Photosynthese und als Lichtsinnespigmente photosynthetisierender Organismen. Es wird ein Überblick über neuere Entwicklungen der Biochemie und Biophysik dieser Pigmente gegeben und versucht, ihre Funktionen als Lichtsammler und Informationswandler auf molekularer Ebene zu beschreiben.

## 1. Einleitung

Cyanobakterien, Rotalgen und Kryptophyten enthalten große Mengen blauer und roter Pigmente, welche wesentlich die Färbung dieser Organismen bestimmen und bis zu 40% des gesamten Proteins ausmachen<sup>[1]</sup>. Engelmann<sup>[2]</sup> brachte diese Pigmente erstmals mit der Photosynthese in Verbindung; Haxo<sup>[3]</sup>, Emerson<sup>[4]</sup> und Gantt<sup>[5]</sup> sowie andere erkannten ihre Funktion als Antennenpigmente hauptsächlich für das Photosystem II. 1928 zeigte Lemberg<sup>[6]</sup>, daß sie Gallenfarbstoffe als chromophore Gruppen enthalten; diese Chromoproteine werden deshalb entsprechend ihrer Herkunft und Zusammensetzung als *Phycobiliproteine* bezeichnet.

Pigmente dieser Struktur, aber völlig anderer Funktion, kommen auch in vielen anderen Organismen vor. Die bei weitem wichtigste Verbindung dieser Gruppe ist das *Phytochrom*. Dieses Sinnespigment grüner Pflanzen wurde 1945 aktionspektroskopisch entdeckt<sup>[7]</sup>, konnte aber wegen seiner Instabilität und geringen Konzentration erst 1959 angereichert und absorptionsspektroskopisch charakterisiert wer-

den<sup>[8]</sup>. Phytochrom ist ein photoreversibel-photochromes Pigment. Die Lage des Gleichgewichts zwischen beiden Formen (R- und FR-Form), die Gesamtkonzentration und andere Faktoren sind ein fundamentaler Faktor bei der pflanzlichen Entwicklung<sup>[9]</sup>.

Photoreversibel-photochrome Pigmente, die *Phycochrome*, wurden auch aus Cyanobakterien isoliert<sup>[10]</sup>, und zumindest ein Phycochrom wurde ebenfalls mit Entwicklungsvorgängen wie der chromatischen Adaptation<sup>[1, 11, 12]</sup> in Verbindung gebracht.

Diese drei Arten von Pigmenten werden als Biliproteine bezeichnet (Tabelle 1). Der vorliegende Beitrag befaßt sich mit neueren Entwicklungen ihrer Biochemie und Biophysik. Seit der letzten Übersicht über das gesamte Gebiet<sup>[13a]</sup> sind mehrere Teilaraspkte zusammenfassend behandelt worden<sup>[1, 5, 9, 13-25, 310]</sup>. Daneben sei noch auf Gallenfarbstoff-Protein-Aggregate ohne kovalente Bindung zwischen beiden Bestandteilen hingewiesen. Dazu gehören die physiologisch wichtigen Komplexe des in Wasser schwerlöslichen Bilirubins mit Serum-Albumin<sup>[26]</sup> und eine wachsende Zahl von

Tabelle 1. Vorkommen und Funktion von Biliproteinen. Im Text werden die ersten drei Pigmentgruppen behandelt.

Pigment	Vorkommen	Funktion	Chromophor-Struktur	Lit.
Phycobiliproteine (z. B. Phycocyanin (PC) Allophycocyanin (APC) Phcoerythrin (PE))	Cyanobakterien, Rotalgen, Kryptophyten	Antennenpigmente der Photosynthese	Phycocyanobilin (1a), Phycoerythrobilin (2) u. a.	siehe Text
Phytochrom	Höhere grüne Pflanzen, einige Algen, Pilze (?), Moose, Rotal- gen (?)	Reaktionszentrumspigment der Photomor- phogenese	(1b), (3) [a]	siehe Text
Phycochrome	Cyanobakterien, Rotalgen	Eventuell Reaktionszentrumspigmente der Photomorphogenese und chromatischen Adaptation („Adaptachrome“)	(1a) (?)	[1, 10-12]
Bilirubin-Serum- Albumin-Komplexe	Wirbeltiere	Wasserlösliche Transportform des Biliru- bins	—	[26]
Aplysiavioolin	<i>Aplysia</i> (marine Nacktschnecke)	Abwehrsekret	Monoester von (5)	[29]
Turboverdin	<i>Turbo cornutus</i> (Muschel)	Schutzfärbung (?)	[18-Ethyl]-[3-(2-hydroxyethyl)]- (19), R = H	[30]
Pterobilin	Lepidopteren	Schutzfärbung (?)	IXγ-Isomer von (19), R = H	[27]
Phorcabiline	Lepidopteren	Schutzfärbung (?)	Gestreckte Derivate von Pterobi- lin, ähnlich (31)	[27]

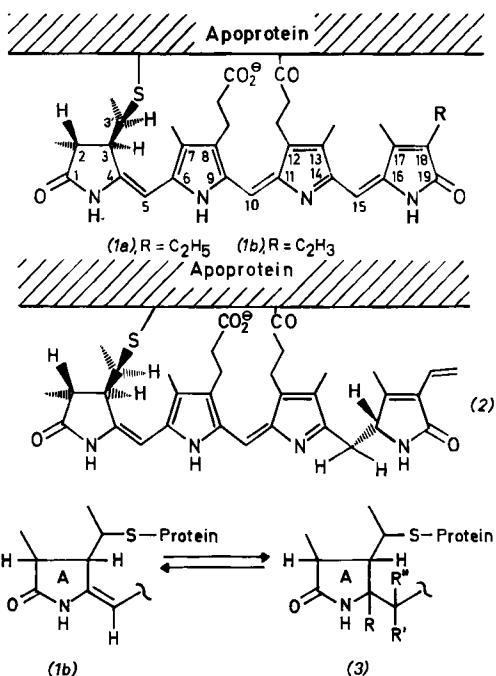
[a] Die Substituenten R, R' und R'' in (3) deuten an, daß sich die in P<sub>1</sub> vorhandene Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 im Absorptionsspektrum von denaturiertem nicht mehr bemerkbar macht (siehe Abschnitt 2.3).

[\*] Dr. H. Scheer  
Botanisches Institut der Universität  
Menzinger Straße 67, D-8000 München 19

Invertebraten-Pigmente<sup>[13, 27-30]</sup>. Eine Auswahl von ihnen ist in Tabelle 1 mit aufgenommen.

## 2. Struktur der Chromophore

Die beiden hauptsächlichen Chromophore von Phycobiliproteinen sind (1a) (Phycocyanobilin) und (2) (Phycoerythrobilin)<sup>[\*]</sup>. (In den Formeln ist die Bindung an das Protein angedeutet.) (1a) ist der blaue Chromophor der Phycocyanine und Allophycocyanine, (2) der rote Chromophor der Phycoerythrine. Einer von ihnen kommt in jedem Phycobiliprotein vor, R-Phycocyanin (R-PC)<sup>[\*\*]</sup> enthält beide. Daneben gibt es mehrere Chromophore mit ungeklärter Struktur, z. B. ein Phycourobilin in der  $\gamma$ -Kette von B-Phycoerythrin (B-PE)<sup>[11,13]</sup>, den roten Chromophor in der  $\alpha$ -Kette von Phycoerythrocyanin<sup>[32]</sup>, den „dritten“ Chromophor (P<sub>590</sub>) von PC aus einem *Hemiselmis*-Stamm<sup>[33]</sup> und den blauen Chromophor von PC aus *Chroomonas*<sup>[34]</sup>.



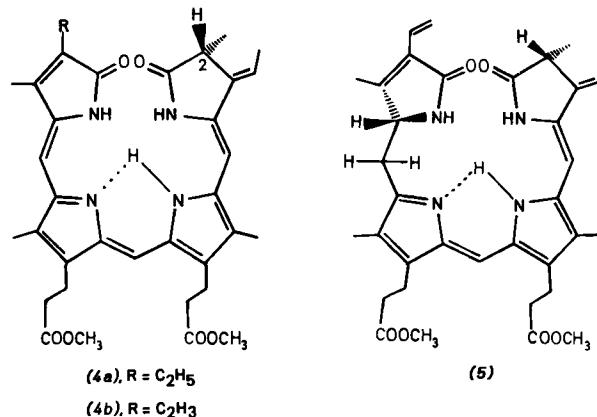
Streng genommen wurden die Strukturen (1a) und (2) bisher erst für wenige Phycobiliproteine eindeutig bestimmt. In den meisten Fällen erfolgte die Zuordnung aufgrund chro-

matographischer Vergleiche und spektroskopischer Daten denaturierter Biliproteine (siehe Abschnitt 2.3).

Der Chromophor (1b) der R-Form des Phytochroms (P<sub>r</sub>) ist dem Phycocyanobilin (1a) sehr ähnlich<sup>[35-38]</sup>. Er enthält eine Vinyl- anstelle der Ethylgruppe an C-18<sup>[37,38]</sup>; die absoluten Konfigurationen an C-2, C-3 und C-3' sind in beiden Fällen gleich<sup>[39]</sup>. Die Struktur des P<sub>fr</sub>-Chromophors ist ungeklärt, man weiß jedoch, daß er ein kürzeres Konjugationssystem als der P<sub>r</sub>-Chromophor<sup>[35]</sup>, aber die gleichen  $\beta$ -pyrroliischen Substituenten<sup>[37]</sup> enthält. Aus vergleichenden Untersuchungen an freien Gallenfarbstoffen ließen sich zwei Modelle ableiten, welche die Eigenschaften des P<sub>fr</sub>-Chromophors erklären: Er könnte ein geometrisches (Z,E)-Isomer<sup>[40]</sup> oder ein Substitutionsprodukt des P<sub>r</sub>-Chromophors sein<sup>[41]</sup> (siehe Abschnitt 2.4).

### 2.1. Abspaltung der Chromophore

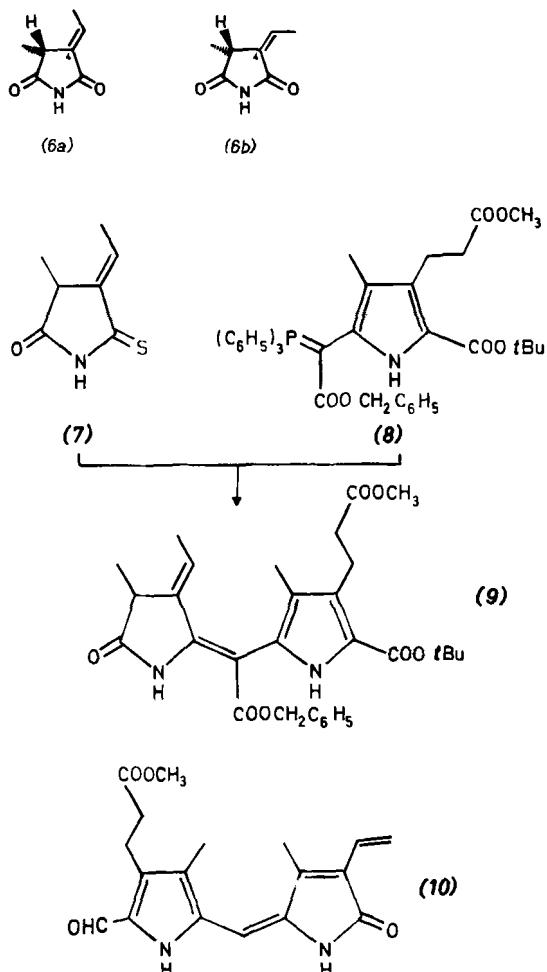
Die Strukturermittlung der Biliprotein-Chromophore wurde lange Zeit dadurch erschwert, daß diese kovalent an die Proteine gebunden sind und nicht chemisch unverändert abgespalten werden können. Je nach den Bedingungen entstehen unterschiedliche Phycobiline aus ein und demselben Pigment, ein Befund, der nicht nur die Nomenklatur sehr unübersichtlich gestaltete (vgl. <sup>[13,22,24]</sup>). Am besten untersucht sind die Ethylenbilin (4a) und (5), welche aus den entsprechenden Biliproteinen mit den Chromophoren (1a) bzw. (2) als Hauptprodukte durch Kochen in Methanol<sup>[42]</sup> oder höheren Alkoholen<sup>[43]</sup> sowie durch Behandlung mit



[\*] Die Nomenklatur der Gallenfarbstoffe hat sich in den letzten Jahren mehrfach geändert. Vier Systeme wurden und werden zum Teil noch nebeneinander verwendet. Die ältere Literatur benutzt Trivialnamen und das Bezifferungssystem von H. Fischer, welches die Gallenfarbstoffe eindeutig mit den Porphyrinen korreliert [Beispiel: (19) = Biliverdin IX  $\alpha$ ]. Die in den Formeln (1) und (2) gezeigte, noch heute übliche Bezeichnung entstand beim ersten Versuch einer rationalen Nomenklatur. Sie ermöglicht jedoch keine eindeutige Korrelation der C-Atome cyclischer und davon abgeleiteter offenkettiger Tetrapyrrole. Neben Trivialnamen verwendet sie das vollständig gesättigte „Bilin“ als Basis. Ausgehend von beiden ist eine Austausch-Nomenklatur möglich: Der neue Substituent einer Stammverbindung, der die Stelle des ursprünglichen einnimmt, wird in eckige Klammern gesetzt [Beispiel: [18-Vinyl]- (1a) = (1b)]. Die Nomenklatur in diesem Beitrag entspricht dem VI. Memorandum der IUPAC-Nomenklatur-Kommission. Neben einer begrenzten Zahl von Trivialnamen [z. B. (19) = Biliverdin] verwendet sie als Basis Bilin, das die in natürlichen Gallenfarbstoffen maximale Zahl nicht-kumulierter Doppelbindungen enthält [vgl. R. Bonnett in [24a], Vol. I, 1978, S. 1; Beispiel: (23) = 2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-2,3-dihydro-1,19[21H,24H]-bilindion]. Die vor kurzem von der IUPAC vorgeschlagene Nomenklatur [Pure Appl. Chem. 51, 2251 (1979)] ist ähnlich.

[\*\*] Abkürzungen: PC = Phycocyanin, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, P<sub>r</sub> und P<sub>fr</sub> = Phytochrom in der R- bzw. FR-Form (siehe dazu Abschnitt 4.3 und 5.2). Vorangestellte Buchstaben kennzeichnen die Herkunft: C = Cyanobakterien, R = Rotalgen, B = Bangiales (eine Rotalgen-Ordnung), K = Kryptophyten.

HBr/Trifluoressigsäure (TFA)<sup>[44]</sup> entstehen. Die Spaltung erfolgt durch stereoselektive Eliminierung oder C-3-Thioether<sup>[45]</sup>; in (2) und/oder (5) kann das asymmetrische C-16 epimerisieren<sup>[46,47]</sup>. Die ursprünglich vor allem aufgrund der <sup>1</sup>H-NMR- und MS-Daten<sup>[48-51]</sup> sowie des Chromsäureabbaus<sup>[13,52,53]</sup> vorgeschlagenen Strukturen sind durch Totalsynthesen gesichert<sup>[46,54]</sup>. Wesentlicher Schritt dabei ist die regioselektive Verknüpfung der Ringe A und B. Sie gelingt in guten Ausbeuten durch Kondensation des Monothioimids (7) mit dem Pyrrolylid (8); die Verknüpfung des Produkts (9) mit dem CD-Fragment (10) führt zu (4b) (Schema 1). Bei thermolabilen Substituenten<sup>[54a]</sup> wird die Schwefel-Kontraktion angewendet<sup>[54a]</sup>. Nach dem ersten Verfahren wurde das 18-Vinyl-bilindion (4b) (= „P<sub>r</sub>-Bilin“) hergestellt<sup>[38]</sup>; durch HBr/TFA-Behandlung von (1b), dem Chromophor von P<sub>r</sub>, ließ sich (4b) mit (1b) korrelieren<sup>[55]</sup>. Die Stereochemie von C-2 in (4a) und (5) wurde durch Chromsäureabbau zum

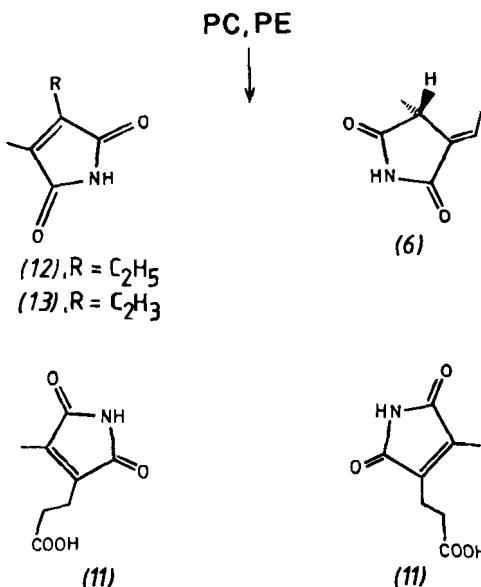


Schema 1.

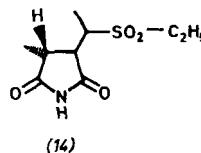
Imid (6) bekannter absoluter (4*R*)-Konfiguration bewiesen<sup>[56]</sup>, die von C-16 in (5) durch asymmetrische Synthese und Korrelation mit (4*R*,16*R*)-Urobilin<sup>[46,57]</sup>.

## 2.2. Abbaureaktion von Biliproteinen

Tetrapyrrole werden durch Chromsäureoxidation in cyclische Imide gespalten, welche (zumindest im Prinzip) die ur-

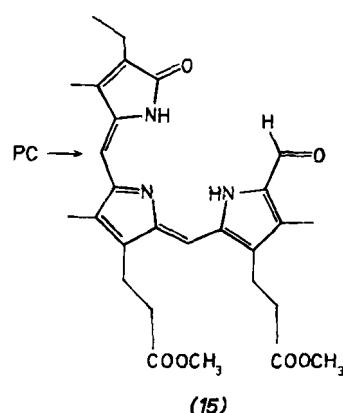


sprünglichen  $\beta$ -pyrrolischen Substituenten enthalten. Diese von *H. Fischer* eingeführte Methode wurde mehrfach verbessert und standardisiert und insbesondere von *Rüdiger* et al. auf Biliproteine angewendet<sup>[13,53]</sup>. Der „hydrolytische“ Chromsäureabbau von Phycocyanin (PC) bei 100 °C ergibt die Imide (6), (11) und (12), der von Phycoerythrin (PE) und P<sub>t</sub><sup>[37]</sup> die Imide (6), (11) und (13), das sich unter den Reaktionsbedingungen leicht zersetzt. Bei Oxidation in der Kälte entsteht kein (6), und auch (11) ist nur in etwa 50% Ausbeute extrahierbar, was auf Protein-Bindungen an den entsprechenden Ringen hinweist<sup>[13]</sup>. Unter diesen Bedingungen wird gleichzeitig mit der Spaltung des Tetrapyrrols der Thioether zum Sulfon (14) oxidiert, welches mit wäßrigem Ammoniak glatt zu (6) eliminiert<sup>[58]</sup>. Diese Reaktionsfolge be-



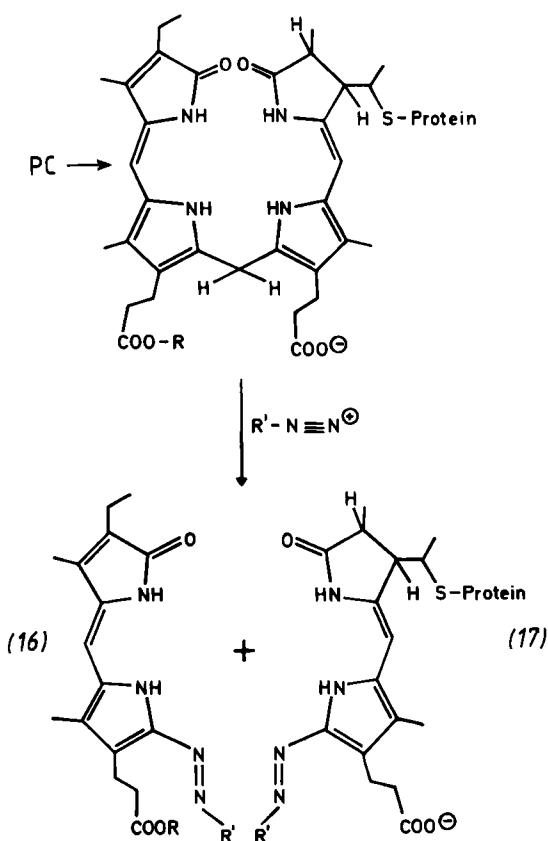
weist nicht nur die Proteinbindung an Ring A, sie ist auch stereoselektiv<sup>[45,58,59]</sup> und führt unter Berücksichtigung der bekannten 4*R*,*E*-Konfiguration des Abbauimids (6a)<sup>[56]</sup> zur (2*R*,3*R*,3'*R*)-Konfiguration für (1a), (1b), (2) und (3). Eine mögliche zweite Bindungsstelle<sup>[13]</sup> ist umstritten<sup>[22,60–65]</sup>.

Beim Chromsäureabbau geht die Information über  $\alpha$ -pyrrolische und Methin-Substituenten verloren, und es sind z. B. hydrolytische Nebenreaktionen an den  $\beta$ -pyrrolischen Substituenten nicht auszuschließen. Beim schonenderen Chromatabbau<sup>[13,53]</sup> erhält man aus den endständigen Ringen wiederum Imide, aus den mittleren dagegen Pyrrolidicarbaldehyde. Damit ist es z. B. möglich, isomere Biliverdine zu unterscheiden und (1)–(5) dem IX $\alpha$ -Substitutionstyp zuzuordnen. Durch eine noch schonendere Oxidationsreaktion gelingt die regioselektive Spaltung der dem Ring A benachbarten Methinbrücke zu Formyltrippyrrinonen, welche spezifisch für A-Dihydrobilindione ist<sup>[66,67]</sup>. Aus PC wurde so das



Tripyrrinon (15) erhalten. Eine weitere selektive Spaltung, diesmal jedoch zwischen den Ringen B und C, ist die Diazospaltung<sup>[68]</sup>. Diese in der medizinischen Analytik des Bilirubins<sup>[69]</sup> wichtige Reaktion lässt sich bei entsprechender Vorbehandlung auch auf die höher oxidierten Bilindione anwenden<sup>[70]</sup>. Dazu muß zuerst das Protein durch Zugabe von

Harnstoff entfaltet und dann die zentrale Methinbrücke der Chromophore mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert werden. Die gesamte Reaktionsfolge ist unter sehr schonenden Bedingungen

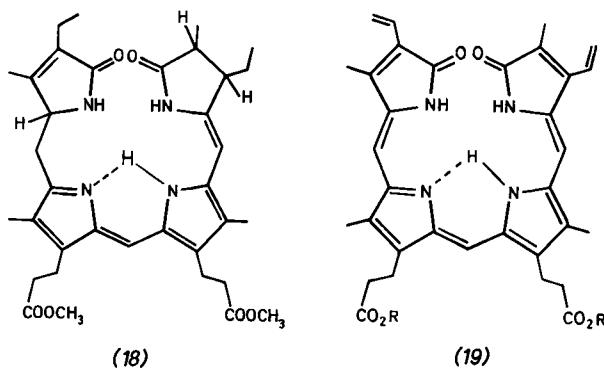


(4°C, pH = 7) durchführbar. Aus PC wurden die Bruchstücke (16) und (17) erhalten. Durch (17) wird die Bindung von Ring A an das Protein bestätigt; beide letzteren Reaktionen weisen aber auch auf eine zweite Bindung an Ring C hin, zumindest im verwendeten PC aus *Spirulina platensis*. Die Menge an freiem, extrahierbaren (16) steigt nach hydrolytischer Vorbehandlung; (15) ist nur so zu erhalten.

### 2.3. Spektroskopie der denaturierten Pigmente

Eine zerstörungsfreie und empfindliche Methode zur Analyse von Biliprotein-Chromophoren ist die Absorptionsspektroskopie. In den nativen Pigmenten sind die Spektren in hohem Maße von der Proteinumgebung abhängig (siehe Abschnitt 3); die nicht-kovalenten Wechselwirkungen, die diesen Effekt bewirken, lassen sich durch Denaturieren des Proteins mit Harnstoff oder Guanidiniumchlorid vollständig entkoppeln. Obwohl immer noch kovalent an das Protein gebunden, können die Chromophore mit freien Gallenfarbstoffen bekannter Struktur korreliert werden. Die Aussagekraft wird bedeutend erhöht, wenn man neben den freien Basen auch die Kationen, Anionen und Metallkomplexe heranzieht, vor allem die Kationen und Zink-Komplexe<sup>[35, 36, 61, 71, 72]</sup>. Die Methode eignet sich auch zur quantitativen Bestimmung der Chromophorzahl (vgl. Tabelle 3)<sup>[61, 72]</sup>, und durch Säure-Base-Titration sind die pH-Werte für Protonierung und Deprotonierung als weitere wichtige Parameter zugänglich<sup>[35, 36]</sup>.

Denaturiertes PE stimmt weitgehend mit (18) überein; PE enthält die Rhodin-Chromophore (2)<sup>[71]</sup>. Denaturiertes PC



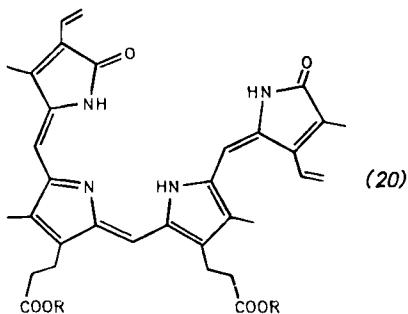
und  $\text{P}_r$  absorbieren längerwellig als (18), aber kürzerwellig als Bilindione wie (19); die spektroskopische Ähnlichkeit mit (23) beweist für die Chromophore beider Pigmente das 2,3-Dihydrobilindion-Konjugationssystem, wobei die 18-Vinylgruppe in (1b) jeweils zu einer geringfügig längerwelligen Absorption als bei Pigmenten mit (1a) führt<sup>[35]</sup>. Das Absorptionsmaximum von denaturiertem  $\text{P}_r$  liegt bei pH ≤ 5.2 bei 610 nm, und damit – im Gegensatz zum nativen Zustand – kürzerwellig als das von  $\text{P}_r$  unter diesen Bedingungen ( $\lambda_{\text{max}}^{\text{Kation}} = 660 \text{ nm}$ ).  $\text{P}_r$  hat demnach ein kürzeres Konjugationssystem als  $\text{P}_r$ <sup>[35]</sup>. Analoge Ergebnisse wurden erhalten, als die Chromophore durch proteolytischen Abbau des Apoproteins von diesem entkoppelt wurden<sup>[55]</sup>. Die A-Dihydrobilindion-Struktur der Chromophore (1a) und (1b) und die Thioether-Bindung wurden kürzlich auch durch NMR-Spektroskopie entsprechender Bilipeptide bewiesen<sup>[38, 65]</sup>.

### 2.4. Reaktivität der Chromophore

Die unterschiedlichen Spektren der beiden Formen des Phytochroms ( $\text{P}_r$  und  $\text{P}_r$ ) im denaturierten Zustand beweisen, daß die Chromophore unterschiedliche Molekülstrukturen haben. Dadurch scheiden Konformationsänderungen<sup>[73]</sup>, Protonierungs-Deprotonierungs-Reaktionen<sup>[74]</sup> u. ä. als alleinige Veränderungen der Chromophore bei der Phytochrom-Umwandlung aus, und photochemische Reaktionen gewinnen besonderes Interesse. Die erste Reaktion des Phytochromsystems ist die photochemische Umwandlung von  $\text{P}_r$  zu  $\text{P}_r$  oder umgekehrt. Die Reaktion verläuft über spektroskopisch definierte Zwischenprodukte, welche jeweils unterschiedlich für die Hin- und Rückreaktion sind. Die Struktur der Zwischenprodukte ist bisher offen, aber die Ergebnisse von kurzzeit-<sup>[75–78]</sup> und tieftemperaturspektroskopischen Untersuchungen<sup>[77, 79–82]</sup> sowie Dehydratisierungsexperimenten<sup>[82–84]</sup> deuten darauf hin, daß nur der Primärschritt photochemisch ist und die weiteren Schritte Dunkelreaktionen sind (vgl. [18]). Diese formale Analogie mit den Reaktionen des Rhodopsins<sup>[85]</sup> führte zu einer analogen Nomenklatur<sup>[84]</sup>.

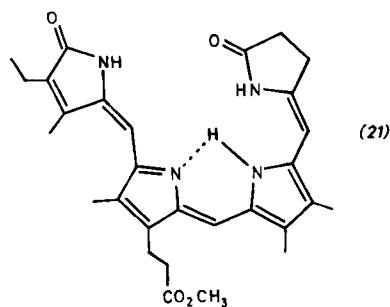
Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wurden auch photochemische Reaktionen von freien Gallenfarbstoffen<sup>[86]</sup> und insbesondere von Bilindionen untersucht, die mit dem  $\text{P}_r$ -Chromophor (1b) verwandt sind. Anhand der am natürlichen System festgelegten Randbedingungen sollte es möglich sein, Hinweise auf die Struktur von  $\text{P}_r$ , den Reaktionsweg und das Primärsignal zu erhalten. Von den heute bekannten photochemischen Reaktionen kommen prinzipiell zwei als Möglichkeit für die  $\text{P}_r \rightarrow \text{P}_r$ -Umwandlung in Frage:

1. die geometrische Isomerisierung an der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 oder C-15 und C-16 und 2. die oxidative Substitution an der C-5-Methinbrücke. Es ist seit langerem bekannt, daß Dipyrromethenone stabile geometrische (*Z,E*)-Isomere bilden, welche sich im photochemischen Gleichgewicht befinden<sup>[87,88]</sup>. Photochemische Untersuchungen des Pterobilins („Biliverdin IX $\gamma$ “) ergaben Hinweise auf entsprechende Isomere auch bei Bilindionen<sup>[27]</sup>. Falk et al. konnten bei systematischen Untersuchungen an Gallenfarbstoffen zeigen, daß Bilindione an einer oder beiden endständigen Methinbrücken isomerisieren, und haben die Produkte



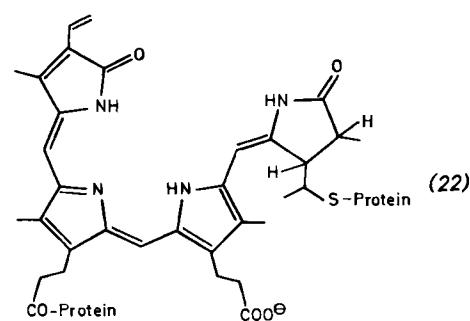
wie (20) isoliert und charakterisiert<sup>[40,88,89]</sup>. Ausgehend von einem *E*-konfigurierten Formylpyrromethenon gelang Gosauer et al.<sup>[90]</sup> kürzlich auch die Totalsynthese von (*E,Z,Z*)-Bilindionen. Die Absorptionsmaxima sind gegenüber denen der (*Z,Z,Z*)-Edukte kurzwellig verschoben und liegen in dem für den  $P_r$ -Chromophor erwarteten Bereich. Dies wird dadurch erklärt, daß sich neben der Konfiguration z. B. der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5 in (20) auch die Konformation der benachbarten Einfachbindung zwischen C-5 und C-6 ändert, wodurch die *E*-konfigurierte Doppelbindung vom restlichen  $\pi$ -System partiell entkoppelt wird<sup>[91]</sup>. Für die thermische Rückisomerisierung wurden  $\Delta G^\circ = -20$  kJ/mol und  $\Delta H^\circ = 105$  kJ/mol bestimmt<sup>[92]</sup>. Bilindione mit nicht spiegelsymmetrischem Substitutionsmuster ergeben zwei (*E,Z,Z*)-Isomere<sup>[40]</sup>. Stärker unsymmetrische Edukte isomerisieren regioselektiv<sup>[93]</sup>.

Die Chromophore der Biliproteine sind infolge des hydrierten Ringes A und bei  $P_r$  [(1b)] zusätzlich durch die 18-Vinylgruppe unsymmetrisch perturbiert. Ramachandran-Rechnungen deuten hier auf eine bevorzugte Isomerisierung der dem hydrierten Ring benachbarten  $\Delta^4$ -Bindung aus sterischen Gründen<sup>[94]</sup>, was Produkte vom Spektraltyp der Vio-



line erwarten läßt. Diese Annahme wurde kürzlich experimentell bestätigt<sup>[90b]</sup>.  $\Delta^{15}-E$ - (21), aber nicht  $\Delta^4-E$ -konfigurierte 2,3-Dihydrobilindione sind totalsynthetisch zugänglich, wobei erstere durch Entkopplung des Ringes D ein

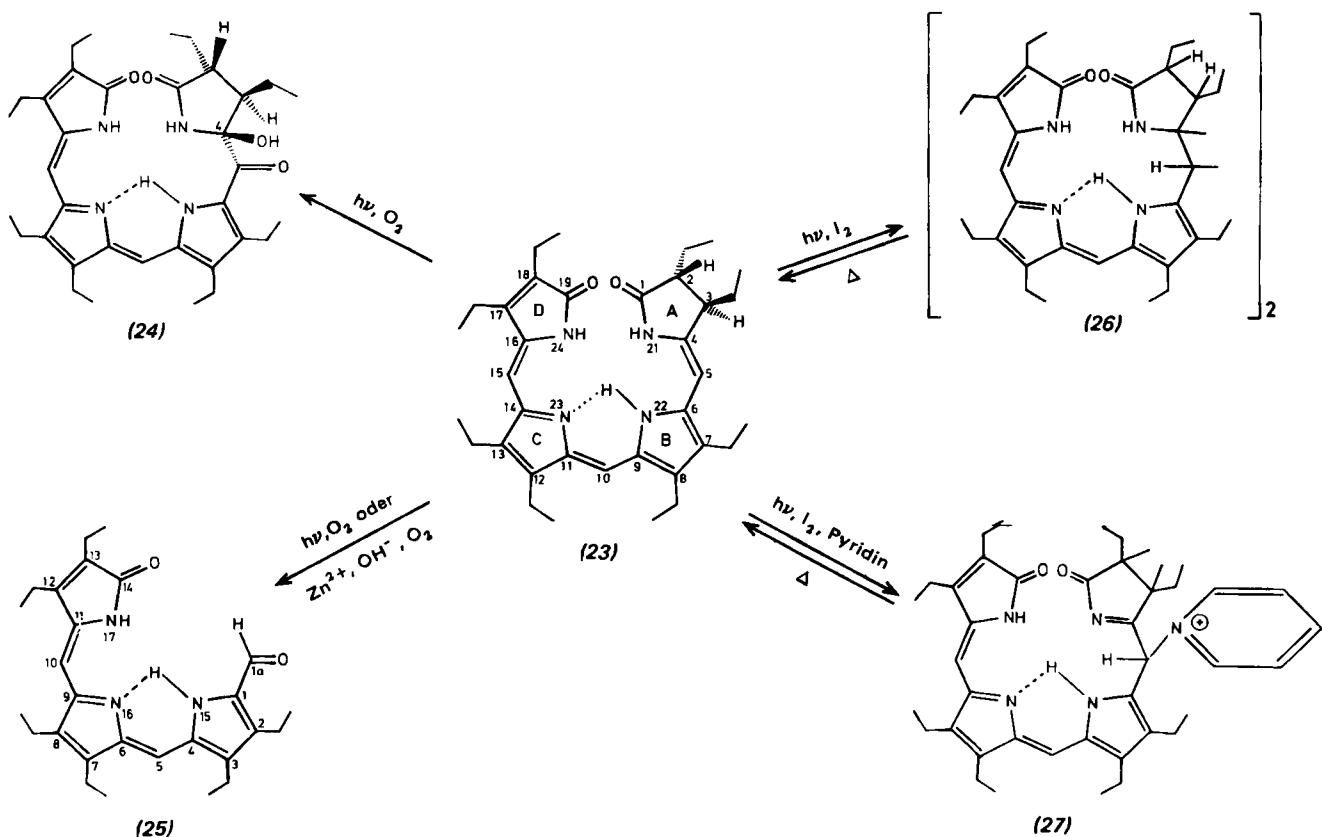
Rhodinspektrum aufweisen<sup>[90b]</sup>. Entsprechend ist für das instabileren  $\Delta^4-E$ -Isomer ein Violinspektrum zu erwarten.



Das hypothetische (*E,Z,Z*)-Isomer von (22) [vgl. (22)] wäre damit spektroskopisch dem  $P_r$ -Chromophor vergleichbar. Dagegen ist der Reaktionsmechanismus bisher mit den Befunden am Phytochrom nur schwierig vereinbar. Die Photoisomerisierung von Bilindionen verläuft nicht direkt, sondern über intermediär in einer Dunkelreaktion gebildete rubinoide Produkte. Aufgrund ihrer geringen Elektronendichte an C-10<sup>[95]</sup> addieren Bilindione dort reversibel Nucleophile<sup>[89b,96-99]</sup>, die entstehenden gelben Pigmente sind die eigentlichen Substrate für die Isomerisierung<sup>[89b]</sup>. Entsprechend ihrem Absorptionsmaximum um 450 nm ist daher blaues Licht besonders wirksam für die Isomerisierung<sup>[89b]</sup>, während das Aktionsspektrum der  $P_r \rightarrow P_r$ -Reaktion sein Maximum im roten Spektralbereich bei 660 nm, dem Absorptionsmaximum des  $P_r$ -Chromophors, hat. Allerdings ist der Mechanismus der Reaktion sehr strukturabhängig, und grundsätzlich scheint eine direkte photochemische Reaktion in allen Fällen möglich, in denen die Geometrie des Tetrapyrrolgerüstes von der flachen, gleichförmigen Helix abweicht. Beispiele dafür sind *N*-alkylierte Bilindione<sup>[93]</sup> und Nicht- $(Z,Z,Z)$ -Isomere<sup>[92]</sup>. Es bleibt deshalb abzuwarten, wie weit die Asymmetrie der natürlichen Chromophore den Reaktionsverlauf beeinflussen kann.

Die zweite Modellreaktion für die  $P_r \rightarrow P_r$ -Umwandlung ist eine photochemische Oxidation des  $P_r$ -Chromophors (1b). Denaturiertes  $P_r$  wird von starken Oxidationsmitteln ( $Fe^{III}$ ,  $Ce^{IV}$ ) zu Produkten oxidiert, welche spektroskopisch dem denaturierten  $P_r$  ähneln<sup>[35]</sup>. Die Phytochrom-Umwandlung ist bereits früher mit Redox-Reaktionen in Zusammenhang gebracht worden<sup>[100-102]</sup>; die Spektren deuten auf photochemische Oxidation des Chromophors bei der  $P_r$ -Bildung. Diese Möglichkeit wurde mit (23) als Modell für  $P_r$  studiert. Durch Vergleich von (23) und (19) läßt sich ferner untersuchen, ob ein hydrierter Ring bei den Gallenfarbstoffen ähnlich starke Unterschiede bedingt wie bei den cyclischen Tetrapyrrolen (vgl. z. B. <sup>[103]</sup>). Die Photooxidationsprodukte von (23) sind in Schema 2 zusammengefaßt. In Gegenwart von Sauerstoff werden in einer regioselektiven selbstsensibilisierten Singulett- $O_2$ -Reaktion die Purpurine (24) und (25) gebildet<sup>[66]</sup>.

(25) ist ebenfalls in einer sehr glatten Dunkelreaktion zugänglich<sup>[19]</sup>, welche sich auch als Abbaureaktion für Biliproteine eignet<sup>[67]</sup>. Spektroskopisch ähnliche Produkte wurden bei der Dunkelreaktion von (19) mit Singulett- $O_2$  beobachtet<sup>[104]</sup>; das typische zweibandige Spektrum<sup>[66]</sup> macht die in<sup>[104]</sup> vorgeschlagene Endoperoxid-Struktur jedoch unwahrscheinlich und läßt dort gleichfalls eine Purpurinbildung



Schema 2.

vermuten. Der Einfluß des hydrierten Ringes ist bei diesen Reaktionen deutlich ausgeprägt: (23) reagiert wesentlich schneller als das vollständig ungesättigte Analogon und andere Bilindione, und die Reaktion ist regioselektiv an C-5. (24) und (25) entsprechen zwar in ihren spektroskopischen Eigenschaften dem denaturierten  $P_{fr}$ , aber sie reagieren wie andere Purpurine<sup>[104]</sup> nur in mäßigen Ausbeuten und unter drastischen Bedingungen zurück zu (23).

Im Hinblick auf die Reversion erscheinen vor allem die Produkte (26) und (27) der anaeroben Photooxidation wichtig, da ihre spektroskopischen Eigenschaften denen des denaturierten  $P_{fr}$  entsprechen, und da sie, zumindest thermisch, zurück zu (23) reagieren können. Auch diese Reaktionen sind spezifisch für das A-Dihydrobilibindion (23) und verlaufen regioselektiv an der C-5-Methinbrücke; entsprechende Reaktionen an C-15 bzw. mit den Bilindionen wurden nur in Ausnahmefällen gefunden<sup>[106]</sup>. Die Dimerisierung von (23) zu (26) erinnert an die reversible Photodimerisierung von Pyrimidinen in Nucleinsäuren (vgl. z. B. <sup>[107]</sup>). Voraussetzung dafür wäre die Anwesenheit von zwei Chromophoren im Phytochrom, was nach den bekannten Daten unwahrscheinlich ist<sup>[14, 18, 21, 55]</sup>. Die Bildung des Pyridinobilindions (27) zeigt jedoch, daß prinzipiell auch andere Reaktionspartner als Bilindion selbst in Frage kommen<sup>[41]</sup>. Die Reaktion verläuft wahrscheinlich in zwei Schritten. Im ersten wird das Edukt in ein oder zwei Ein-Elektronen-Schritten oxidiert. Eine solche Oxidationsfolge ist an Bilindionen elektrochemisch nachgewiesen<sup>[108]</sup> und wird durch den Befund gestützt, daß bei der Oxidation von Zn-(23) langlebige Radikalkationen entstehen<sup>[109]</sup>. Im zweiten Schritt findet die nucleophile Addition von Pyridin an C-5 statt. In diesen Produkten ist offensichtlich die Reaktivität umgepolt. Das entstehende

(27) hat zwar formal das Konjugationssystem des Edukts (23), sein Absorptionsspektrum ist jedoch wiederum kurzwellig verschoben, da die  $\Delta^5$ -Bindung durch die sterische Hinderung zwischen den Ringen A, B und dem sperrigen C-5-Substituenten verdrillt ist<sup>[41, 110]</sup>.

Eine Übertragung dieser Reaktion auf  $P_r$  würde erfordern, daß dieses sowohl ein Oxidans als auch ein Nucleophil enthält. Nach dem heutigen Wissen kommen dafür nur die Aminosäurereste in Frage, da sich Phytochrom in Lösung umwandeln läßt und neben dem Chromophor nur noch Zucker<sup>[111]</sup> gebunden sind. Für die Oxidation käme Cystin in Frage, für die Addition Tryptophan, Tyrosin, Serin, Cystein u. a. Tatsächlich gibt es Hinweise dafür: So enthält  $P_{fr}$  ein bis zwei leicht zugängliche SH-Reste mehr als  $P_r$ <sup>[112, 113]</sup>, und (23) reagiert z. B. mit Tryptophan-Derivaten zu Violinen<sup>[106]</sup>; eine Entscheidung ist aber auch hier noch nicht möglich.

### 3. Chromophor-Protein-Wechselwirkungen

#### 3.1. Molekulare Ökologie

Die Chromophore nativer und denaturierter Biliproteine unterscheiden sich in ihren Eigenschaften so auffällig von einander (Tabelle 2), daß eine Verwandtschaft unwahrscheinlich erscheinen mag. Phycobiliproteine sind durch Harnstoff oder Guanidiniumchlorid in exzellenten Ausbeuten und reversibel denaturierbar<sup>[22]</sup>. Weil dabei die kovalenten Bindungen zwischen Chromophor und Protein erhalten bleiben, sind die veränderten Eigenschaften der Chromophore in den nativen Pigmenten ausschließlich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem Protein bedingt. Diese Wechselwirkungen dienen in wesentlichen Punkten der

**Tabelle 2. Molekulare Ökologie der Biliproteine. Vergleich der Eigenschaften nativer Biliproteine mit denen der denaturierten Pigmente sowie freier Bilindio-ne vergleichbarer Struktur.**

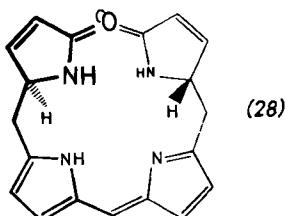
	Freie Bilindione oder denaturierte Biliproteine	Native Biliproteine
UV/VIS-Absorptionsspektren (siehe Abb. 1)	Breite Banden, intensiv ( $\epsilon \approx 35000$ ) [a] im nahen UV, schwach ( $\epsilon \approx 15000$ ) [a] im Sichtbaren	Schmale Banden, schwach ( $\epsilon \approx 15000$ ) [a] im nahen UV, intensiv ( $\epsilon \approx 100000$ ) [a] im Sichtbaren
Photochemie	Vorzugsweise strahlunglose Desaktivierung, geringe Quantenausbeuten ( $\leq 10^{-3}$ ) für Fluoreszenz oder photochemische Reaktionen	Hohe Quantenausbeute für Fluoreszenz ( $\geq 0.6$ in Phycobiliproteinen) oder photochemische Reaktionen ( $\approx 0.15$ im Phytochrom)
Chemische Stabilität	Gering, glatte Bildung von Metallkomplexen, leichte Addition oder Reduktion an C-10, empfindlich gegen Photooxidation	Gut, wenig bis keine Reaktion mit diesen Reagenzien

[a] Alle Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf einen Chromophor. Sie sind dementsprechend mit der Chromophorzahl (Tabelle 3) zu multiplizieren, um die Extinktionskoeffizienten der Biliproteine zu erhalten. Die Berechnungsgrundlagen und entsprechend die  $\epsilon$ -Werte sind in der Literatur unterschiedlich.

Optimierung der Chromophore für ihre Photorezeptorfunktion. Dazu gehört a) zur besseren Lichtabsorption die Erhöhung der Extinktionskoeffizienten im sichtbaren Spektralbereich um nahezu eine Größenordnung, b) zur Verringerung von Verlusten die Unterdrückung der strahlunglosen Desaktivierung zugunsten von Fluoreszenz (bei den Phycobiliproteinen) oder photochemischer Reaktionen (beim Phytochrom), und c) die chemische Stabilisierung der Chromophore (Tabelle 2). Außerdem sind auch die Lagen der Absorptionsmaxima bestimmter Chromophore in beachtlichen Grenzen variabel [z. B. 80 nm für (1a)] und ermöglichen so eine „Feinjustierung“ der Energietransferung. Die Frage nach den Ursachen dieser Optimierung, die man mit dem Schlagwort „molekulare Ökologie“ umreißen kann, ist daher wesentlich zum Verständnis der Funktion von Bilioproteinen. Dabei scheinen geometrische Änderungen, Protionierung-Deprotonierung und eine eingeschränkte Flexibilität der Chromophore wesentliche Faktoren zu sein.

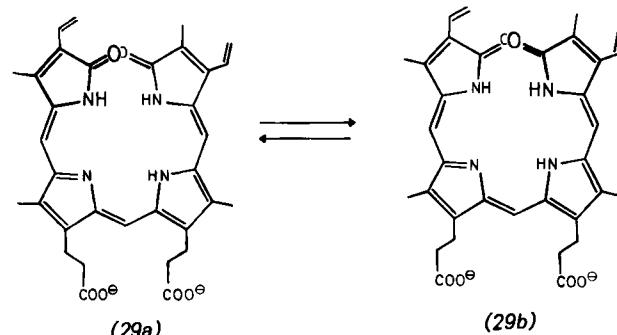
### 3.2. Geometrie der Chromophore

Die erste detaillierte Untersuchung zur Geometrie freier Gallenfarbstoffe stammt von *Moscowitz et al.*<sup>1114</sup>, welche für Urobilin [(28); der Übersichtlichkeit halber wurden die Substituenten weggelassen] in Lösung eine cyclisch-helicale, Porphyrin-ähnliche Struktur postulierten, deren Drehsinn durch die absolute Konfiguration der  $\alpha$ -pyrrolischen Zen-



tren C-4 und C-16 bestimmt wird. Cyclisch-helicale Strukturen wurden auch für Bilindione wie (19) nachgewiesen, und zwar sowohl durch Röntgen-Strukturanalyse<sup>[15,116]</sup> als auch durch <sup>1</sup>H-NMR-Messungen<sup>[17,118]</sup> und Messungen des Lö-

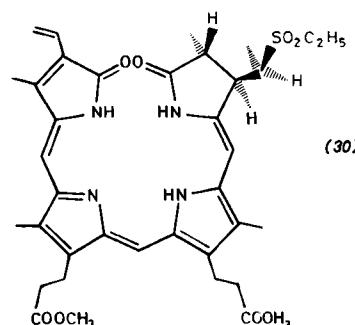
sungsmittel-induzierten Circulardichroismus (SICD)<sup>[117,119]</sup> in Lösung. In den formal achiralen Bilindionen vom Typ des Biliverdins führt dies zu einer gleichmäßigen Population von zwei enantiomeren Konformationen (29a) und (29b), die sich in ihrem Schraubensinn unterscheiden und miteinander im Gleichgewicht stehen [ $\Delta H^\ddagger = 42$  kJ/mol für ein Derivat von (19)<sup>[120]</sup>]. Das Gleichgewicht kann durch Verwendung chiraler Lösungsmittel<sup>[117]</sup> oder durch Adsorption an das chirale Biopolymer Serum-Albumin<sup>[121]</sup> so verschoben werden, daß sich die für inhärent dissymmetrische Chromophore ty-



ischen großen Cotton-Effekte beobachten lassen. In Einklang damit zeigen Purpurine wie (25) mit planaren Chromophoren<sup>[122]</sup> keinen SICD-Effekt<sup>[123]</sup>. Auch (*E,Z,Z,Z*)-isomere Bilindione sind SICD-negativ<sup>[90]</sup>, was die vorgeschlagene *anti,syn,syn*-Konformation [Formel (20)]<sup>[91]</sup> bestätigt.

Die Gleichgewichtslage zwischen den beiden helicalen Formen kann aber auch durch Asymmetriezentren im Molekül verschoben werden. Die hohen Drehwerte optisch aktiver Urobiline sind darauf zurückzuführen, daß die Asymmetriezentren an C-4 und C-16 bei gleicher absoluter Konfiguration aus sterischen Gründen die eine Form stark begünstigen<sup>[114]</sup>. Da sich aus dem Vorzeichen der optischen Aktivität helicaler Chromophore die absolute Konfiguration der Helix ableiten läßt, ist damit indirekt auch die absolute Konfiguration der Asymmetriezentren zugänglich<sup>[46, 57, 90b, 114]</sup>.

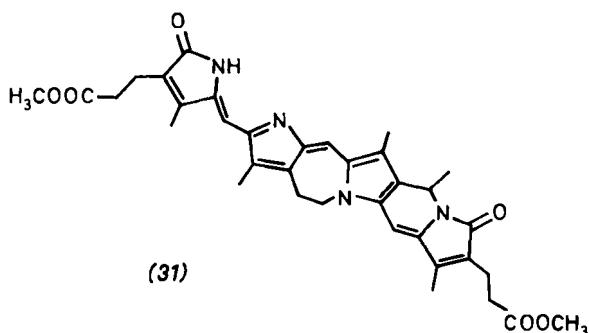
In den Biliprotein-Chromophoren (1)-(3) hat Ring A mindestens drei Asymmetriezentren. Aus Ramachandran-Rechnungen an (30) als Modell für denaturiertes PC und P<sub>r</sub> läßt sich abschätzen, daß die unterschiedliche sterische Hinde-



rung der beiden Formen zu einer Energiedifferenz von  $\Delta G^0 = 4-8 \text{ kJ/mol}$  führt<sup>[94]</sup>. In Einklang damit zeigt denaturiertes PC ausgeprägte optische Aktivität ( $\Theta_{605} = 133\,000$ )<sup>[124]</sup>. Im Chromophor (2) des denaturierten PE sind die Einflüsse der Asymmetriezentren entgegengesetzt zum Einfluß des asymmetrischen C-16; entsprechend ist seine optische Aktivität gering<sup>[144]</sup>.

Die bisher beschriebenen Effekte lassen sich nur mit einer bevorzugten cyclisch-helicalen Konformation freier Gallenfarbstoffe vom Typ des Biliverdins erklären. Zum einen ist diese jedoch nicht starr, sondern flexibel, zum anderen befindet sie sich mit stärker gestreckten Konformationen im Gleichgewicht. Hinweise darauf geben die breiten, auch bei tiefen Temperaturen<sup>[19, 125]</sup> unstrukturierten Absorptionsbänder, wobei planare Pigmente wie (25) wiederum eine Ausnahme sind<sup>[66]</sup>. Das Problem wurde kürzlich von der Mülheimer Gruppe genauer untersucht. Durch Fluoreszenzspektroskopie konnten sie im Biliverdin zumindest zwei Populationen von Konformeren unterscheiden<sup>[119]</sup>. Die längerwellig fluoreszierende Form wurde einer cyclischen Konformation zugeordnet, da nur sie einen SICD-Effekt zeigt, die kürzerwellig emittierende Form aufgrund des erhöhten Extinktionsverhältnisses der sichtbaren und der nahen UV-Bande  $Q_{uv}^{vis}$  (s.u.) einer stärker gestreckten Konformation. Das Gleichgewicht zwischen ihnen ist temperatur- und lösungsmittelabhängig, die offene Form wird in viskosen H-Donor-Lösungsmitteln<sup>[126]</sup> und insbesondere in Lipid-Vesikeln<sup>[127]</sup> bevorzugt. Starke intramolekulare H-Brücken, ähnlich denen des Bilirubins<sup>[128]</sup>, sollen auch bei der Bildung eines Isomers bei der Chromophorspaltung von Biliproteinen beteiligt sein, welche nur bei den freien Säuren beobachtet wurden<sup>[43]</sup>.

Denaturierte Biliproteine sind in ihren Eigenschaften freien Gallenfarbstoffen entsprechender Struktur [(18) bei PE, (23) bei P, und PC] so ähnlich, daß sie ebenfalls bevorzugt cyclisch-helical Konformationen haben müssen. Die geänderten spektroskopischen Eigenschaften nativer Biliproteine (z. B. PC, Abb. 1) sind wesentlich dadurch bedingt, daß ihre Chromophore in einer gestreckten Konformation fixiert sind<sup>[19, 125]</sup>. Das Intensitätsverhältnis  $Q_{uv}^{vis}$  der sichtbaren zur nahen UV-Bande ist vor allem durch die Chromophor-Geometrie bestimmt. Es ist klein und damit Porphyrin-ähnlich bei cyclisch-helicalen Konformationen, groß und damit Polyen-ähnlich bei gestreckten Konformationen. Dies geht als das wesentliche übereinstimmende Resultat aus MO-Rechnungen mehrerer Gruppen<sup>[80, 91, 121, 131-134]</sup> hervor und wird durch die Spektraldaten freier Biline bekannter Konformation bestätigt. Im cyclisch-helicalen (19) (s. o.) ist  $Q_{uv}^{vis} = 0,25$ , dagegen steigt es auf 6.4 im Isophorocobilin (31), das aufgrund seiner intramolekularen Brücken nur eine gestreckte Konformation einnehmen kann<sup>[27b]</sup>.



Für ein 21,24-Methanobilindion, welches zwangsläufig in der *all-syn,Z*-Konformation vorliegt, wurde kürzlich  $Q_{uv}^{vis} = 0.15$  gemessen<sup>[321]</sup>. Die Änderungen von  $Q_{uv}^{vis}$  von Bilindionen bei der Bildung der Kationen, Anionen und Zn-Komplexe sind vergleichsweise gering, und insbesondere bleibt dabei die Absorption im nahen UV praktisch unverändert<sup>[36]</sup>.

Im denaturierten PC bei pH = 7.5 ist  $Q_{uv}^{vis} = 0.43$ , im nativen PC erhöht es sich auf 4.1, wobei sich beide Banden gegensinnig ändern (Abb. 1)<sup>[125]</sup>. Im P, sind die Verhältnisse entsprechend<sup>[55]</sup>. Die Chromophore beider Pigmente liegen demnach in einer gestreckten Konformation vor. Ein interessanter Aspekt ist dabei, daß gestreckte Konformationen von Bilindionen energiereicher sind als die cyclischen<sup>[92, 94]</sup> und daß die erforderliche Energie dann vom Protein geliefert werden müßte. Tatsächlich sind die Faltungsenergien mehrerer Phycocyanine deutlich geringer als die vergleichbarer Proteine<sup>[135]</sup>, d. h. die Differenz beruht möglicherweise auf den Chromophoren<sup>[129]</sup>. Auch im PE erhöht sich  $Q_{uv}^{vis}$  in vergleichbarem Maße wie bei PC gegenüber dem denaturierten Pigment<sup>[139, 144]</sup>. Der Zusammenhang zwischen Chromophor-Absorption und -Geometrie ist beim PE unseres Wissens nur einmal theoretisch untersucht worden<sup>[144a]</sup>, und dem Bilindion (31) entsprechende gestreckte Pigmente mit dem Tetrahydro-Konjugationssystem des Rhodins (18) sind bisher nicht bekannt. Aufgrund der Rechnungen kann man aber annehmen, daß auch hier  $Q_{uv}^{vis}$  ein gewisser Indikator für die Molekülgeometrie ist, woraus sich für natives PE ebenfalls gestreckte Chromophore ergeben.

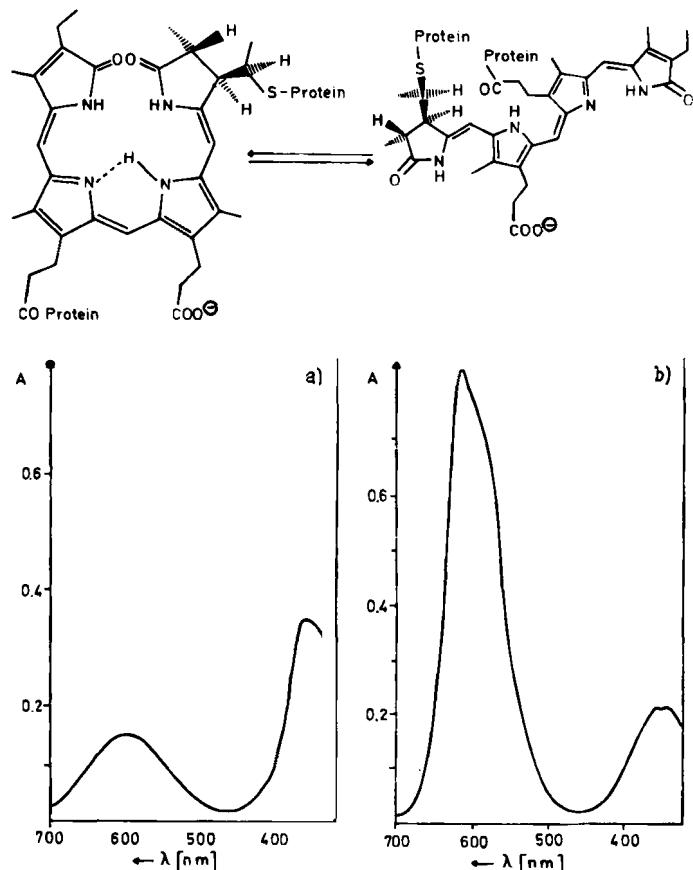


Abb. 1. Spektrum von denaturiertem a) und nativem C-Phycocyanin b) aus *Spirulina platensis* (gleiche Konzentration bei a und b). Die Denaturierung durch Harnstoff (8 M) ist reversibel; die gleichen Änderungen werden beim thermischen Denaturieren beobachtet. Die Formeln entsprechen dem Konformations- typ der beiden Formen: cyclisch-helical für a) und gestreckt (in einer sterisch wenig gehinderten Konformation) für b).

Sowohl beim PC als auch beim PE deuten die hohen Elliptizitäten der langwelligen CD-Banden der nativen Proteine auf einen inhärent dissymmetrischen Chromophor und damit auf eine gleichsinnige Verdrillung der gestreckten Chromophore. Die Banden haben im allgemeinen positives

Vorzeichen. Eine bemerkenswerte Ausnahme ist  $P_{fr}$ , welches – bei vermutlich<sup>[37]</sup> gleicher absoluter Konfiguration der Asymmetriezentren an Ring A wie  $P_r$  – eine negative CD-Bande zeigt<sup>[135a]</sup>. Zumindest in diesem Fall ist Exciton-Kopplung unwahrscheinlich, da Phytochrom nur einen Chromophor hat.

Beim  $P_{fr}$ , der aktiven Form des Phytochroms, sind die Verhältnisse wesentlich komplexer. Zum einen ist  $Q_{uv}^{vis}$  im nativen  $P_{fr}$  nur etwa halb so groß wie im nativen  $P_r$  (vgl. z. B. <sup>[18]</sup>), zum anderen ist das Absorptionsmaximum des nativen Pigments extrem rotverschoben. Denaturiertes  $P_{fr}$  absorbiert in der protonierten Form ( $pH=2$ ) bei 610 nm<sup>[35]</sup>; das entspricht ca. 570 nm für die freie Base<sup>[35, 71]</sup>. Im nativen  $P_{fr}$  ( $\lambda_{max} = 730$  nm) ist das Maximum demgegenüber um 160 nm ( $\approx 3850$  cm<sup>-1</sup>) rotverschoben. Während der verringerte Wert von  $Q_{uv}^{vis}$  noch auf eine gestreckte Konformation hinweist, ist die Rotverschiebung mit einer Konformationsänderung allein nicht zu erklären. Da die Deprotonierung von Bilindionen zu ähnlich ausgeprägten langwelligen Verschiebungen führt [z. B. 3800 cm<sup>-1</sup> bei (23)]<sup>[36]</sup>, wurde dieser Effekt als Deprotonierung des Chromophors im nativen Pigment rationalisiert<sup>[35]</sup>. Neuere MO-Rechnungen an Chromophoren mit dem Konjugationssystem von (3) stützen diese Interpretation<sup>[133]</sup>.

### 3.3. Ladung und Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen

Elektrische Ladungen in der Nähe des Chromophors sind zusätzlich zu geometrischen Änderungen möglicherweise auch für die funktionell wichtige (siehe Abschnitt 5.1) Feinjustierung der Absorptionsmaxima von Phycobiliproteinen wichtig. Diese enthalten bis zu vier Chromophore an einer Peptidkette und bis zu sechs im ( $\alpha\beta$ )-Monomer (Tabelle 3). Obwohl diese Phycobiliproteine häufig die gleichen Chromophore und im großen und ganzen auch ähnliche Geometrien haben, unterscheiden sie sich spektroskopisch, chemisch und funktionell voneinander aufgrund der unterschiedlichen Umgebung der Chromophore (siehe Abschnitt 3.4) und damit auch unterschiedlichen Chromophor-Protein-Wechselwirkungen. Zum Beispiel absorbiert APC-B bei 670 nm<sup>[148b]</sup>, der s-Chromophor von C-PC bei 590 nm<sup>[36, 140–142]</sup>, trotz der Verschiebung um 80 nm ( $\approx 2020$  cm<sup>-1</sup>) handelt es sich beide Male um den Chromophor (1a). Chemisch äußern sich diese Wechselwirkungen z. B. in einer unterschiedlichen Stabilität gegenüber Reduktion<sup>[129]</sup> oder Entfaltung<sup>[125]</sup>, spektroskopisch lassen sich insbesondere bei tiefen Temperaturen<sup>[125, 136–139]</sup> sowie durch Fluoreszenz<sup>-[139–143]</sup> und CD-Messungen<sup>[144–147]</sup> mehrere Absorptionsbanden auflösen. Physiologisch sind diese differentiellen Effekte für eine optimale Energieübertragung wesentlich (siehe Abschnitt 5.1) und wurden auch erstmals bei Fluoreszenzmessungen genauer untersucht<sup>[140]</sup>. Die Chromophor-spezifischen Wechselwirkungen sind offenbar bereits in den Untereinheiten festgelegt, da sich die CD- und Absorptionsspektren bei der Aggregation zu den Monomeren nicht ändern. Bei einem C-PE stimmten die Spektren mit den summierten Spektren der Untereinheiten überein<sup>[144]</sup>. Dagegen führt die weitere Aggregation der Monomere zu langwelligen Verschiebungen der sichtbaren Banden. In den Differenz-<sup>-[148–154]</sup>, Tieftemperatur-<sup>-[136, 137]</sup> und CD-Spektren<sup>-[145–147, 152]</sup> macht sich dies als

Tabelle 3. Zusammensetzung und Eigenschaften einiger Bilioproteine.

Typ [a]	$\lambda_{max}$ [nm] (VIS)	$\alpha$ - Kette	Chromophore $\beta$ - Kette	$\gamma$ - Kette	Monomer	Proteinstruktur Aggregation	$\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - Kette	Mol.-Gew. [k]	Vorkommen	Lit.
APC I H. III B	656	1 × (1a)	1 × (1a)	?	$\alpha\beta\gamma$	1	18	30	Cyanobakterien, Rotalgen	[152, 181, 182]
	650	1 × (1a)	1 × (1a)	–	$\alpha\beta$	(1), 3, 6	16	18	–	[1, 147, 149, 153, 154, 181–183]
	670	1 × (1a)	1 × (1a)	–	$\alpha\beta$	(1), 3, 6	16	20	–	[148b, 184]
C-PC PEC [b] R-PC K-PC [b]	635 [e], 620, (590) [f] 590, 568 620, 555 645, 610, 580 etc.	1 × (1a) 1 × PXB [h] 1 × (1a) 1 × (1a)	2 × (1a) 2 × (1a) 1 × (1a), 1 × (2) 1 × (1a), 1 × (2) (?)	– – – –	$\alpha\beta$ $\alpha\beta$ $\alpha\beta$ $\alpha\beta$	1, 3, 6 3, 6 3, 6 1, 3, 6	16 17 18 20	– – – –	Cyanobakterien Cyanobakterien Cyanobakterien Kryptophyten	[1, 13, 15, 20, 22–25, 147, 185–187] [32] [72, 153, 188] [33, 34, 189]
C-PE R-PE [c] b-PE B-PE K-PE	575 [e], 560, 540 568, 540, 498 [g] 575 [e], 565, 540 565, 545, 498 [e] 545–565	2 × (2) 2 × (2) 2 × (2) 2 × (2) ? × (2)	3–4 × (2) 4 × (2) 4 × (2) 4 × (2) ? × (2)	– 2 × PUB [j], 2 × (2) – 2 × PUB [j], 2 × (2) –	$\alpha\beta$ $\alpha\beta\gamma$ $\alpha\beta$ $\alpha\beta\gamma$ $\alpha\beta$	1, 3, 6 1 3 1 2	17 19 19 19 10	21 19 19 19 16	Cyanobakterien Rotalgen Rotalgen Rotalgen [l] Kryptophyten	[1, 13, 15, 20, 22–25, 154] [22, 190] [153, 190] [31, 153, 192–194] [1, 195–198]
Phytochrom P, [d] $P_{fr}$	660 730	1 × (1b) 1 × (3)	– –	– –	$\alpha$ $\alpha$	(1) 2 (1) 2	120 120	– –	Grüne Pflanzen etc. Grüne Pflanzen etc.	[9, 13, 14, 18, 21, 191, 199–203]

[a] Die vorangestellten Buchstaben kennzeichnen die Herkunft: C = Cyanobakterien, R = Rotalgen, B = Bongardes (eine Rotalgen-Ordnung). K = Kryptophyten. R = Rotalgen. B bzw. B bezieht sich auf die unterschiedliche Quartärstruktur. [b] Phycoerythrocyanin. [c] R-PE ist möglicherweise ein Glycochromoprotein [25, 226]. [d] Phytochrom ist wahrscheinlich ein Glycochromophosphoprotein [111, 199]. [e] Sonderform, eventuell Aggregat [147, 182]. [f] Schuller, bei 77 K aufgelöste Bande [125, 137, 151a]. [g] Schulter,  $\lambda_{max, \text{VIS}} = 600$  nm. [h] Chromophor unbekannter Struktur.  $\lambda_{max, \text{VIS}} = 690$  nm [33, 34, 189]. [i] Phycochlorin-Chromophor, genaue Struktur unbekannt,  $\lambda_{max, 0.1\text{M HCl}} = 498$  nm [22]. [j] Umgeführte Werte  $\times 10^3$ . [l] Ein B-PE-ähnliches Pigment ist auch für ein marines Cyanobakterium beschrieben [204].

zusätzliche langwellige Bande bemerkbar. Diese Verschiebung ist klein beim PC und PE ( $10-15 \text{ nm} \approx 250-450 \text{ cm}^{-1}$ ), aber stark ausgeprägt beim APC. Monomeres APC absorbiert bei 620 nm, die Trimere bei 650-670 nm, dabei erhöht sich die Extinktion auf das Doppelte<sup>[149]</sup>.

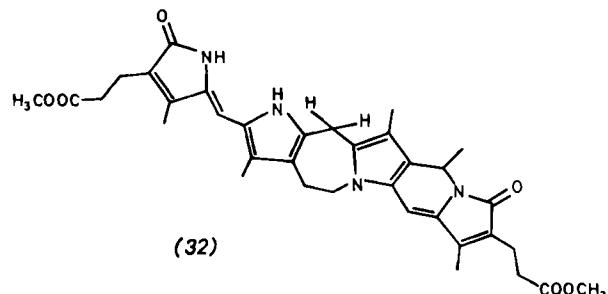
In einigen Fällen wurden in letzter Zeit auch Hinweise auf Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen gefunden und als Ursache für Verschiebungen von Absorptionsmaxima bezeichnet. S-förmige CD-Banden wurden in C-PE<sup>[144]</sup>, B-PE<sup>[31]</sup>, K-PC<sup>[34]</sup> und einem Allophycocyanin<sup>[152]</sup> beobachtet. Dieser Bandentyp kann durch Exciton-Aufspaltung bedingt sein; eine Entscheidung ist bei Anwesenheit mehrerer Chromophore nicht trivial. Die langwellige Verschiebung der Absorptionsbande<sup>[147]</sup> im trimeren APC ( $\alpha\beta_3$ )<sup>[149]</sup> wurde kürzlich als „mittelschwache“ (= CD-inaktive) Chromophor-Chromophor-Wechselwirkung zwischen unterschiedlichen Monomeren im Aggregat interpretiert<sup>[150]</sup>.

### 3.4. Fluoreszenzerhöhung und chemische Stabilität

Die zweite spektroskopische Besonderheit nativer Biliproteine ist ihr photochemisches Verhalten. Phycobiliproteine fluoreszieren mit Quantenausbeuten nahe 1 (vgl. <sup>[142]</sup>), Phytochrom hat Quantenausbeuten von 0.13 bzw. 0.17 für die photoreversible Umwandlung zwischen den beiden Formen<sup>[17]</sup>. Freie Bilindione und denaturierte Biliproteine zeigen nur sehr geringe Fluoreszenz<sup>[96, 119, 130, 132, 155, 157]</sup> und Phosphoreszenz<sup>[156, 158]</sup>, die „natürlichen“ *all-syn*,*Z*-Bilindione<sup>[66, 105, 159-162]</sup> und selbst die deutlich reaktiveren A-Dihydrobilindione<sup>[66, 105]</sup> sind auch photochemisch träge. Der wichtigste Weg angeregter freier Gallenfarbstoffe oder denaturierter Biliproteine für die Rückkehr in den Grundzustand ist demnach strahlungslose Desaktivierung. Dafür kommen insbesondere zwei Möglichkeiten in Frage: Schwingungsinduzierte Desaktivierung<sup>[163]</sup> sowie Protonentransfer oder bereits eine Störung einer Wasserstoffbrücken-Potentialkurve<sup>[164]</sup>. Beide können in komplexer Weise zusammenwirken, da z. B. eine intramolekulare Wasserstoffbrücke einerseits interner Rotation entgegenwirken, andererseits aber bereits einen neuen Kanal der strahlungslosen Desaktivierung öffnen kann (vgl. dazu <sup>[163, 164]</sup>).

Beide Möglichkeiten wurden an Partialstrukturen<sup>[159]</sup> und – bisher weniger systematisch – an Gallenfarbstoffen<sup>[96, 155-157]</sup> untersucht. Beide wurden als wesentlich erkannt, aber eine quantitative Abschätzung ist schwierig, da chemische Manipulationen im allgemeinen beide Faktoren beeinflussen. So wird z. B. durch *N*-Methylierung von Dipyrrromethenonen der intermolekulare Protonentransfer durch Unterdrückung der Dimerisierung in unpolaren Lösungsmitteln verringert<sup>[156]</sup>; auch die konformative Beweglichkeit wird eingeschränkt. Ähnlich wirkt sich die *N*-Protonierung aus<sup>[96, 155]</sup>. Der Einfluß der Viskosität – bisher vor allem<sup>[158]</sup> durch Verringerung der Temperatur variiert<sup>[96, 132, 155]</sup> – betrifft im wesentlichen die Schwingungsrelaxation. Bei 77 K zeigen Bilindione allgemein<sup>[96, 132, 155]</sup>, aber insbesondere konformativ stärker fixierte Pigmente wie Isophorocabilin (31), eine mäßige Fluoreszenz<sup>[155c]</sup>.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß Isophorocarubin (32) kräftig fluoresziert<sup>[165]</sup>. Das Ring-A,B-Fragment entspricht dem eines gewöhnlichen 10,23-Dihydrobilindions („Bilirubin“) und sollte entsprechend nur sehr schwach fluoreszieren<sup>[86, 166]</sup>, dagegen ist der C,D-Teil starr



und unfähig zum intramolekularen Protonentransfer, so daß ihm die Fluoreszenz zugeschrieben wird<sup>[165]</sup>. Für die Separierung und quantitative Abschätzung von Protonentransferprozessen gibt es bisher noch wenige direkte Hinweise, eine Möglichkeit wäre die systematische Untersuchung von <sup>2</sup>H-Isotopeneffekten<sup>[167]</sup>.

In den Biliproteinen ist die strahlungslose Desaktivierung weitgehend unterdrückt. Die Schwingungsrelaxation kann wirksam durch eine starre Fixierung der Moleküle verringert werden. Hinweise dafür sind die verringerte Bandenbreite der Absorptionsspektren<sup>[66, 125]</sup>, die auch bei den Fluoreszenzanregungsspektren<sup>[139-143]</sup> zum Ausdruck kommt, und der starke negative Temperaturkoeffizient der Fluoreszenz<sup>[17, 139]</sup>.

Ein wirksames Mittel zur Unterdrückung des Protonentransfers wäre die Überführung der Chromophore in eine hydrophobe Umgebung, z. B. in das Innere der Proteine. Die Streckung des Moleküls würde dabei zugleich den intramolekularen Transfer erschweren. Das Ausbleiben typischer Reaktionen der Bilindione, z. B. der Zinkkomplex-Bildung<sup>[168]</sup>, ließe sich so erklären<sup>[22, 169]</sup>, oder das Löschen der Fluoreszenz durch Benzochinon<sup>[170, 322]</sup>.

Andererseits gibt es in jüngerer Zeit Hinweise, nach denen die Chromophore von Biliproteinen sich wahrscheinlich in einer hydrophilen oder zumindest Wasser zugänglichen Position nahe der Proteinoberfläche befinden. Beispiele sind Redox-Reaktionen der Chromophore an Elektroden-Oberflächen<sup>[171]</sup>, in Lösung<sup>[99, 100, 129, 172]</sup> und an Membranen<sup>[173]</sup>, die reversible Addition von Thiolen und Dithionit (oder Sulfroxylat<sup>[174]</sup>) an die zentrale Methinbrücke<sup>[129, 172]</sup>, die Chromophor-Chromophor-Wechselwirkungen bei der Aggregation von APC<sup>[151]</sup> und der  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ -Austausch der beiden Lactam-Sauerstoffatome an C-1 und C-19<sup>[175]</sup>. Im Falle der Reaktion von PC, APC und PE mit Dithionit konnte gezeigt werden, daß sich dieses Reagens im thermodynamischen Gleichgewicht mit den Chromophoren befindet. Zumindest in diesem Fall ist demnach die verringerte Reaktionsfähigkeit der Chromophore im nativen Pigment thermodynamisch und nicht kinetisch bedingt<sup>[129]</sup>. Möglicherweise sind die Konformationsänderungen eine direkte Ursache für die erhöhte Stabilität.

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist vielleicht der empfindlichste Parameter für den Zustand von Phycobiliproteinen. Beim kontrollierten Entfalten der Proteine sinkt sie bereits deutlich, bevor sich die Absorptions- oder CD-Spektren merklich ändern<sup>[144, 176]</sup>. Unter schwach denaturierenden Bedingungen ändert sich komplementär dazu auch das photochemische Verhalten von Phycobiliproteinen. Die photochemische Stabilität von PC ist in Gegenwart von Allylthioharnstoff<sup>[178]</sup> verringert<sup>[177]</sup>. Lösungen von PC und APC bekommen in Gegenwart von 0.5 M Guanidiniumchlorid<sup>[179]</sup>

oder nach Senken des pH-Werts auf 3.8<sup>[180]</sup> photoreversibel-photochrome Eigenschaften. Der letzte Befund ist vor allem im Hinblick auf die Phycocrome<sup>[10-12]</sup> interessant, da diese ähnliche Differenzspektren zeigen, und prinzipiell wohl auch im Hinblick auf Phytochrom.

#### 4. Proteine

Phycobiliproteine repräsentieren eine Entwicklungsgeschichte von etwa 3.5 Milliarden Jahren und kommen sowohl in Pro- als auch in Eukaryonten in sehr unterschiedlichen Biotopen vor. Sie interessieren deshalb für vergleichende Untersuchungen, welche derzeit in der vollständigen Sequenzierung von zwei Phycocyaninen gipfeln<sup>[62, 63]</sup>. Die wichtigsten Daten der spektroskopisch und aufgrund ihrer Herkunft charakterisierten Typen der Biliproteine sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Phycobiliproteine sind globular und wasserlöslich, diejenigen aus Rotalgen und Cyanobakterien zeigen ausgeprägte Aggregation. Sequenzanalysen der N-Termini, immunochemische Untersuchungen und Hybridisierungsexperimente deuten auf einen gemeinsamen Stammbaum dieser Pigmente (Abb. 2). Die engste Verwandtschaft besteht zwischen entsprechenden Untereinheiten eines Proteintyps aus unterschiedlichen Organismen, eine entferntere zwischen entsprechenden Untereinheiten verschiedener Pigmenttypen und zwischen verschiedenen Untereinheiten des gleichen Pigments. Dabei scheinen die Pigmente aus Rotalgen und Cyanobakterien miteinander enger verwandt zu sein als mit den Pigmenten aus Kryptophyten.

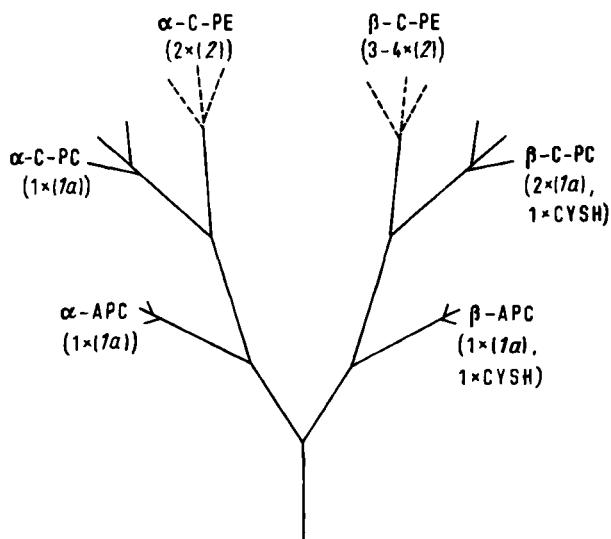


Abb. 2. Phylogenetischer Stammbaum der Biliproteine und ihrer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aus Cyanobakterien. C-PC: Phycocyanin, C-PE: Phycerythrin, APC: Allophycocyanin (nach [205]).

Phytochrom ist proteinchemisch deutlich von den Phycobiliproteinen abgetrennt. Es ist wesentlich größer, hat wahrscheinlich eine hantelförmige Struktur, und insbesondere  $P_{fr}$  tendiert zur Assoziation mit Membranen. Immunochemische und spektroskopische Untersuchungen zeigen die große Ähnlichkeit von Phytochrom(en) aus unterschiedlichen Organismen. Bisher gibt es keinen direkten Hinweis für eine phylogenetische Verwandtschaft mit den Phycobiliproteinen. Die ähnliche Struktur der Chromophore, ihre gleichar-

tige Protein-Bindung, vergleichbare nicht-kovalente Wechselwirkungen und schließlich auch das Auftreten der Phycocrome sind indirekte Hinweise dafür, schließen aber eine konvergente Entwicklung nicht aus.

#### 4.1. Phycobiliproteine: Monomere

Die weitaus meisten Daten zur Primärstruktur sind für Phycocyanine bekannt. Neben der Sequenzermittlung der N-Termini (vgl. [15, 205, 206]) und der Chromophor-Bindungsbereiche<sup>[62-65, 207-211]</sup> einer Reihe von Organismen gelang kürzlich die vollständige Analyse von PC aus *Mastigocladus laminosus*<sup>[62]</sup>, einem thermophilen Cyanobakterium, und aus *Cyanidium caldarium*<sup>[63]</sup>, einer einzelligen thermo-acidophilen Rotalge, sowie die der  $\beta$ -Kette von PC aus *Synechococcus spec.* 6301 (früher *Anacystis nidulans*)<sup>[64]</sup>, einem einzelligen mesophilen Cyanobakterium, und die der  $\beta$ -Kette von APC aus *M. laminosus*<sup>[205]</sup>. Für die beiden vollständigen Strukturen sind die jeweiligen Homologien der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten (80 bzw. 78%) in Anbetracht der unterschiedlichen systematischen Stellung und Biotope der Organismen beachtlich.

Allerdings handelt es sich bei beiden um thermophile Organismen; die zu 80% bekannte Sequenz des marinischen Cyanobakteriums *Agmenellum quadruplicatum* zeigt nur etwa 30% Homologie (L. Fox, persönliche Mitteilung). Eine hohe Homologie findet sich auch beim Vergleich der  $\beta$ -Ketten mit der  $\beta$ -Kette von *S. spec.* Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von PC aus jedem der beiden Organismen zeigen erheblich geringere Homologien (25% bei PC aus *M. laminosus*)<sup>[205]</sup>. Bei den Primärstrukturen wird auch die Verwandtschaft gleichartiger Untereinheiten von Pigmenten unterschiedlichen Spektraltyps deutlich. So sind die  $\beta$ -Ketten von PC und APC aus *M. laminosus* zu 25% homolog; die Verwandtschaft wird noch deutlicher beim Vergleich der (nach Chou und Fassman berechneten) Sekundärstrukturen<sup>[205]</sup>.

Die Homologie ist nicht gleichförmig, sondern besonders hoch in den Chromophorbereichen. Eine frühere Zusammenstellung deutete auf eine sehr hohe Homologie im N-terminalen Bereich für die entsprechenden Untereinheiten von Pigmenten unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlichen Spektraltyps<sup>[15]</sup>. Die von der Zürcher Gruppe gefundene geringe Homologie in diesen Bereichen beim PC und APC ist jedoch ein erstes Beispiel für eine Ausnahme von dieser Regel oder deutet auf eine Sonderstellung von APC. Die Homologie in den Chromophor-Bindungsbereichen wird durch Sequenzvergleich von Chromopeptiden aus mehreren Phycoerythrinen<sup>[209]</sup> und Cyaninen<sup>[62-65, 207, 210, 211]</sup> gestützt. So wurden z. B. für das fünf Chromophore enthaltende PE aus *Pseudanabaena* W 1173 fünf unterschiedliche Aminosäuresequenzen im Bereich der bindenden Cysteine gefunden. Das sechs Chromophore enthaltende PE aus *Phormidium persicinum* hat sechs unterschiedliche Bereiche, von denen sich fünf eindeutig den fünf Bereichen des ersten Pigments zuordnen lassen<sup>[209]</sup>. Die für die einzelnen Chromophore charakteristischen Peptidsequenzen lassen sich mit den unterschiedlichen Spektren der Chromophore in diesen Pigmenten korrelieren<sup>[139]</sup>.

Studien des Proteinanteils der Biliproteine ergeben die zu den Chromophor-Untersuchungen (siehe Abschnitt 2) komplementären Daten über die Bindung der Chromophore. Mit einer Ausnahme<sup>[213]</sup> enthalten alle bisher bekannten „Chro-

mopeptide“ Cystein<sup>[35, 62, 65, 205–216]</sup>. Die frühe Vermutung<sup>[212]</sup>, daß Cystein an der Chromophor-Bindung beteiligt ist, wurde erstmals für ein B-PE-Peptid aus *Porphyridium cruentum* bewiesen<sup>[208]</sup>; seitdem wurde für mehrere C-Phycocyanine und Phycoerythrine erkannt, daß Cystein als bindende Aminosäure für alle Chromophore fungiert<sup>[62–63, 209, 211, 216]</sup>. Diese Ergebnisse werden gestützt durch einen Vergleich der gebundenen Cysteine und der Zahl der Chromophore mehrerer Rotalgen- und Cyanobakterien-Pigmente<sup>[217]</sup>. Daraus geht zusammen mit dem Beweis der Thioether-Bindung der Chromophore an Ring A [Abschnitt 2.2, Formeln (1), (2)] hervor, daß die blauen (1a) und roten (2) Chromophore über eine Cystein-Bindung mit dem Protein verknüpft sind. Die gelben, urobilinoiden Chromophore von B-PE und R-PE haben vermutlich sogar noch eine zweite Cystein-Chromophor-Bindung zu Ring D<sup>[22, 217]</sup>.

Kryptophyten-Pigmente sind bisher weniger untersucht worden; der Befund eines einzigen, freien Cysteins in einem Chromopeptid deutet auf eine gewisse Sonderstellung<sup>[215]</sup>.

Weniger Übereinstimmung gibt es dagegen über andere, eventuell zusätzliche Bindungsstellen. Hierfür kommt insbesondere die Verknüpfung von Serin mit einer Propionsäure-Seitenkette in Frage<sup>[22, 209, 213, 215]</sup>. In den sequenzierten Phycocyaninen und Allophycocyaninen gibt es keine Hinweise darauf, aber für ein K-PC<sup>[215]</sup> und R-PE<sup>[22]</sup> wird eine solche als einzige Bindung diskutiert, und für einen der C-PE-Chromophore wurde sie zusätzlich zur Cystein-Bindung identifiziert<sup>[209]</sup>. Das Problem ist dadurch kompliziert, daß beim Proteinabbau Esterhydrolyse eintreten kann, daß aber auch artifizielle neue Bindungen gebildet werden können (vgl. <sup>[22]</sup>). Crespi und Smith<sup>[214]</sup> postulierten eine Lactimester-Bindung zu Asparaginsäure, um die leichte Spaltung der Thioether-Bindung zu erklären; nach Modelluntersuchungen ist diese Aktivierung aber nicht erforderlich<sup>[54c, 58, 218]</sup>. Für ein Kryptophyten-Peptid wird außerdem eine Glutamat-Bindung beschrieben<sup>[215]</sup>.

Über die Sekundär- und Tertiärstrukturen ist bisher nur wenig bekannt. Obwohl insbesondere PC und PE leicht zu isolieren sind und gut kristallisieren, gibt es bisher keine hochaufgelöste Röntgen-Strukturanalyse<sup>[32, 193, 194, 219, 220]</sup>. Eine Erklärung dafür wäre die ungünstige Packung, welche zu einer Abschwächung von Reflexen durch Nachbarmoleküle führen kann<sup>[221]</sup>. Die Aminosäuresequenzen und die Löslichkeit sind typisch für globuläre Proteine, wobei APC einen höheren Anteil an hydrophoben Aminosäuren als PC (?) hat. Die Packung im Kristall<sup>[32, 193, 194]</sup> und Formuntersuchungen in Lösung<sup>[222]</sup> ergaben für das (αβ)-Monomer von PC eine längliche Gestalt (2.5–3.5 nm Durchmesser, 5–6 nm Länge); diese Größen lassen sich auch für andere Biliproteine aus elektronenmikroskopischen Messungen ableiten<sup>[223–225]</sup>. Nach Circulardichroismus-Messungen an mehreren Pigmenten beträgt der Helixgehalt ca. 60% in der α- und 40% in der β-Kette<sup>[144, 147]</sup>. Für PC und APC aus *M. laminosus* wurde die Sekundärstruktur aus der Sequenz abgeschätzt. Auch hier unterscheiden sich α- und β-Ketten, und es ergaben sich Hinweise auf eine unterschiedliche Flexibilität der Peptidkette in der Umgebung der Chromophore<sup>[205]</sup>.

Als zweite wesentliche Methode bestätigt die Immunochemie Verwandtschaftsbeziehungen der Phycobiliproteine. Die Pigmente gleichen Spektraltyps, APC<sup>[148b, 149, 187, 227–229]</sup>, PC<sup>[32, 72, 148b, 149, 187, 227–229]</sup> und PE<sup>[198, 227, 228, 230, 231]</sup>, sind immunochemisch eng verwandt, unabhängig davon, ob sie aus den

prokaryotischen Cyanobakterien oder den eukaryotischen Rotalgen stammen. Pigmente unterschiedlicher Spektraltypen geben dagegen keine Kreuzreaktionen, selbst wenn sie aus demselben Organismus stammen. Auf diese Weise ließen sich R-PC<sup>[72]</sup> und Phycoerythrocyanin<sup>[32, 230]</sup>, welche sowohl blaue (1a) als auch rote Chromophore (2) enthalten, als Phycocyanine klassifizieren, und APC-B als Allophycocyanin<sup>[148b]</sup>. Bei C-PE<sup>[231]</sup> und APC<sup>[149]</sup> – dessen Untereinheiten anderweitig nur schwer zu differenzieren sind – erwiesen sich die Untereinheiten als immunochemisch nicht verwandt; verwandt sind aber entsprechende Untereinheiten der Pigmente verschiedener Organismen.

Die Kryptophyten-Pigmente nehmen auch immunochemisch eine Sonderstellung ein. Erste Untersuchungen ergaben keine Verwandtschaft<sup>[227]</sup> mit Pigmenten aus Cyanobakterien und Rotalgen; dies wurde für PC bestätigt<sup>[228]</sup>, während sowohl PC als auch PE aus zwei Kryptophyten mit PE aus der Rotalge *Porphyridium cruentum* kreuzreagieren, nicht jedoch mit C-PE<sup>[198]</sup>. Demnach scheinen beide Kryptophyten-Pigmente mit PE aus Rotalgen verwandt zu sein. Bisher sind keine definierten immunologischen Determinanten bekannt. Die fehlende Kreuzreaktion von APC und PC wird als Hinweis angesehen, daß der Chromophor nicht determinierend ist, da beide (1a) enthalten<sup>[231]</sup>. Die unterschiedlichen Spektren von PC und APC deuten jedoch auf unterschiedliche Zustände dieses Chromophors in den nativen Pigmenten, bei denen immunologisch wichtige Kriterien wie Konformation und Ladung geändert sein können. Zudem gibt es mehrere Hinweise, daß der Chromophor von außen zugänglich ist (siehe Abschnitt 3.4). Immunochemische Verfahren sind prinzipiell für eine numerische Taxonomie geeignet. In einer quantitativen Studie konnte für C-PE aus sieben Arten von Cyanobakterien gezeigt werden, daß neben den typen- auch artspezifische Determinanten wichtig sind, und daß die Ergebnisse von der Methode (Phagen- bzw. Präzipitationstest) abhängen<sup>[230]</sup>.

#### 4.2. Phycobiliproteine: Quartärstruktur

Wesentlich eingehender untersucht als die Monomere wurden die Quartärstruktur und höhere Aggregate, da sie entscheidend für die biologische Funktion der Phycobiliproteine sind. Die meisten Pigmente haben eine (α,β)<sub>n</sub>-Struktur, wobei je nach Aggregationszustand und Herkunft (s. u.) n von 1 bis über 12 variiert (siehe Tabelle 3). In einigen Fällen wurde eine dritte Untereinheit gefunden, so im B-PE und R-PE (α<sub>6</sub>β<sub>6</sub>γ)<sup>[153, 193, 194]</sup>, im APC I (α<sub>3</sub>β<sub>3</sub>γ)<sup>[182]</sup> und im PC aus *Chroomonas spec.* mit αα'β<sub>2</sub>-Struktur<sup>[189]</sup>.

Das Molekulargewicht der α-Untereinheiten variiert zwischen 9200<sup>[189]</sup> und 20500<sup>[232]</sup>, das der β-Kette zwischen 16000 und 23500, wobei die α-Untereinheiten der Kryptophyten-Biliproteine im unteren Bereich liegen. Die γ-Ketten sind wesentlich schwerer. Die Zuordnung der Untereinheiten erfolgt definitionsgemäß nach dem Molekulargewicht (α < β), bei unterschiedlicher Chromophorzahl enthält die β-Untereinheit auch die meisten Chromophore. Eine alternative Zuordnung ist immunochemisch möglich und hat sich insbesondere bei APC bewährt<sup>[149]</sup>, dessen Untereinheiten je einen Chromophor aufweisen und sehr ähnliche Molekulargewichte haben können<sup>[11]</sup>.

Die Untereinheiten lassen sich nach partieller<sup>[139, 196]</sup> oder vollständiger Entfaltung<sup>[62–64, 147, 149, 233, 234]</sup> präparativ durch

Ionen austauschchromatographie trennen. Die getrennt renaturierten Untereinheiten aggregieren vorzugsweise zu Dimeren. Im Gemisch lassen sich die nativen  $(\alpha\beta)_n$ -Pigmente in guten Ausbeuten rekonstituieren. Für C-Phycocyanine aus einzelligen sowie fädeligen Cyanobakterien wurde eine glatte Hybridisierung in 40–60% Ausbeute gefunden<sup>[233]</sup>, beim APC gibt es sogar Hybride mit den Untereinheiten der Rotalge, *Cyanidium caldarium*<sup>[149]</sup>. Ein limitierender Faktor für die Ausbeuten ist sicherlich die große Empfindlichkeit der Chromophore (*1a*) im denaturierten Zustand.

Die kontrollierte Denaturierung monomerer Pigmente wurde bei PC<sup>[125]</sup> und PE<sup>[144]</sup> untersucht. In beiden Fällen wurden sequentielle Effekte beobachtet. Die Fluoreszenz nimmt als erstes ab<sup>[144, 176]</sup>, danach – bei PC stufenweise<sup>[125]</sup> – die Absorption der Chromophore, und erst zuletzt schmilzt die CD-spektroskopisch beobachtete Proteinstruktur<sup>[144]</sup>.

Entsprechend der engen Kopplung zwischen Chromophor und Protein sind die Fluoreszenzquantenausbeute und die Absorptionsspektren die empfindlichsten Indikatoren für den Zustand des Proteins (siehe Abschnitt 3.3 und 3.4), z. B. partielle Proteolyse oder Denaturierung.

Die Thermodynamik der Proteininfaltung wurde für Phycocyanine aus mehreren Biotopen untersucht. Ausgehend von nicht definierten Aggregaten liegt  $\Delta G^\circ$  für die Entfaltung mit 8 M Harnstoff für Pigmente aus meso-, psychro- und halophilen Organismen bei 10–22 kJ/mol<sup>[135]</sup>. Dieser Wert ist deutlich niedriger als für globuläre, disulfid-freie Proteine ähnlicher Größe<sup>[235, 236]</sup>; nur bei den Pigmenten thermophiler Organismen wurden ähnliche Werte gefunden<sup>[135]</sup>. Ein möglicher Faktor ist dabei die notwendige Energie zur Streckung der Chromophore der nativen Pigmente<sup>[129]</sup> (siehe Abschnitt 3.2). Die Kinetik der Rückfaltung für PC aus *Spirulina platensis* ist mehrphasig, mit einer schnellen ersten Phase ( $\tau_{1/2} = 110$  ms), welche sowohl durch Fluoreszenz- als auch durch Absorptionsmessung zugänglich ist<sup>[237]</sup>.

Phycobiliproteine aus Cyanobakterien und Rotalgen zeigen [mit Ausnahme der bereits im Monomer komplexen APC-I, B-PE und R-PE (Tabelle 3)] eine ausgeprägte Aggregation, welche vor allem *Berns et al.*<sup>[23]</sup> an C-Phycocyaninen systematisch untersuchten. Ausgehend vom Monomer bilden sich vorwiegend Tri- und Hexamere<sup>[238]</sup>. Dieses sind die Grundbausteine sowohl für kristalline Pigmente<sup>[32, 194, 219]</sup> als auch für Phycobilisomen<sup>[223, 225]</sup>, die Antennen-Superstrukturen dieser Organismen<sup>[5]</sup>. Je nach den Isolierungsbedingungen findet man auch höhere Aggregate<sup>[23, 239]</sup> und Heteroaggregate<sup>[223, 224, 240, 284]</sup> als Phycobilisomenfragmente, sowie intakte<sup>[5]</sup> oder sogar assoziierte Phycobilisomen<sup>[225]</sup>. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von *Mörschel et al.*<sup>[248]</sup> ergaben, daß die Hexamere von PC aus zwei aufeinanderliegenden torusförmigen  $(\alpha\beta)_3$ -Trimeren aufgebaut sind, und daß im B-PE die  $\gamma$ -Kette den zentralen Hohlraum des gebildeten Zylinders einnimmt.

In der Nähe der isoelektrischen Punkte ( $\approx 5.3$ ) befindet sich das Gleichgewicht stark auf der Seite des Hexamers. Für mehrere C-Phycocyanine wurde in verdünnten Lösungen bei pH = 6 bis 5.4 im wesentlichen ein Monomer-Hexamer-Gleichgewicht mit einer Gleichgewichtskonstante von  $\approx 10^{30}$  zugunsten des Hexamers gefunden<sup>[239, 241]</sup>. Ebenso wurden Trimer-Hexamer<sup>[242]</sup> und bei höheren pH-Werten ein Monomer-Tetramer<sup>[243]</sup> sowie Monomer-Dimer-Gleichgewichte<sup>[244]</sup> durch Ultrazentrifugation untersucht. Bei C-PE liegt bei niedrigen Konzentrationen ein Monomer-Dimer-Gleich-

gewicht vor<sup>[139]</sup>. Die Aggregation wird bei Erhöhung der Temperatur<sup>[238]</sup> und der Ionenstärke<sup>[245]</sup> sowie durch Arene<sup>[246]</sup> und geringe Konzentrationen an Guanidiniumchlorid<sup>[247]</sup> begünstigt, durch chaotrope Salze<sup>[245]</sup> und H/D-Austausch<sup>[239, 249]</sup> verringert. Diese Ergebnisse, die auf einen hohen Anteil hydrophober Wechselwirkungen bei der Aggregat-Bildung deuten, wurden mit der Micellen-Bildung von Detergentien verglichen<sup>[238]</sup>. Die Rolle von geordneten Wasserstrukturen wurde kürzlich durch Assoziationsexperimente mit Tetraalkylammoniumsalzen studiert<sup>[250]</sup>. Da Cyanobakterien auch extreme Biotope besetzen, sind die Phycobiliproteine geeignete Objekte zum Studium dieser Adaptationen. C-PC aus einem psychrophen Organismus<sup>[251]</sup> aggregiert ähnlich wie die Pigmente aus mesophilen Organismen, dagegen zeigen Halophilen<sup>[252]</sup> und Thermophilen-Phycocyanine<sup>[253]</sup> deutlich abweichende Muster. Um die molekularen Ursachen dieser Adaptationen bei den Biliproteinen aufzuklären, wurden auch kalorimetrische Messungen der Proteininfaltung<sup>[135]</sup> und Sequenzierungsstudien durchgeführt<sup>[62]</sup>.

Im Gegensatz zu den Pigmenten der Rotalgen und Cyanobakterien zeigen die Pigmente der Kryptophyten keine ausgeprägte Aggregation.

#### 4.3. Phytochrom

Obwohl ubiquitär in grünen Pflanzen, ist Phytochrom erst aus wenigen Arten soweit gereinigt worden, daß eine proteinchemische Charakterisierung sinnvoll war.

Monomeres Phytochrom hat ein Molekulargewicht von  $\approx 120\,000$ <sup>[200, 201]</sup> und vermutlich eine hantelförmige Struktur<sup>[203, 204]</sup> (Übersichten siehe [1, 14, 18, 21]). Durch endogene Proteasen wird insbesondere das bisher wohl am besten charakterisierte Pigment aus Hafer leicht (an der Einschnürung?) gespalten, dabei entsteht ein weiterhin photochemisch aktives Fragment mit einem Molekulargewicht von 60000<sup>[255–257]</sup>. Dieses Fragment wird allgemein als „kleines“ Phytochrom bezeichnet; es wurde lange Zeit als das native Monomer angesehen. Beim Abbau ändern sich die Absorptionsspektren, die photochemische Quantenausbeute<sup>[262]</sup>, die Energieübertragung von Tryptophan auf den Chromophor<sup>[263]</sup> und die immunologischen Eigenschaften<sup>[264]</sup>. „Großes“ Phytochrom bildet Aggregate, deren dimere Struktur durch Gelfiltration<sup>[203, 256, 258]</sup>, Sedimentation<sup>[201, 254, 255]</sup> und Elektronenmikroskopie gesichert ist<sup>[254]</sup>. Für  $P_{fr}$  sind zusätzlich noch höhernmolekulare Formen beschrieben, deren Natur ungeklärt ist<sup>[256]</sup>. Phytochrom enthält etwa 35% hydrophobe Aminosäuren und inklusive der Chromophorbindungsstelle etwa 27 Cysteine<sup>[201, 203]</sup>. Daneben wurden in „kleinem“ Phytochrom 4% Zucker gefunden<sup>[111]</sup>, im „großen“ eine Phosphatgruppe<sup>[201, 202]</sup>.

Zur Symmetrie des „großen“ Phytochroms gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Dimeres „großes“ Phytochrom erscheint im Elektronenmikroskop als Tetramer ( $9 \times 9$  nm)<sup>[254]</sup>, und auch das Molekulargewicht<sup>[255–257]</sup> des „kleinen“ Phytochroms deutet auf zwei annähernd gleich große Teile. Zwei Arbeitsgruppen verglichen die durch tryptischen Abbau erhaltenen Peptide von „großem“ und „kleinem“ Phytochrom aus Hafer. *Stoker et al.*<sup>[259, 260]</sup> erhielten weitgehend gleiche Peptidkarten und schließen daraus auf eine hohe Symmetrie, während *Kidd et al.*<sup>[261]</sup> aufgrund deutlicher Differenzen bei unterschiedlicher Markierungstechnik zum entgegengesetzten Schluß kamen. Die verfügbaren Daten sprechen ebenfalls für eine asymmetrische Chromophorverteilung.

lung, d. h. nur eine Hälfte enthält einen Chromophor (vgl. [14, 18, 21]). Antiserum gegen „großes“ Phytochrom gibt Spornbildung mit „kleinem“ Phytochrom, aber nicht umgekehrt, was ebenfalls auf eine Asymmetrie in den determinanten Bereichen hindeutet<sup>[264]</sup>.

Die Phytochrome aus verschiedenen Quellen sind spektroskopisch nicht unterscheidbar. Auch nach immunochemischen Versuchen besteht eine enge Verwandtschaft zwischen den bisher untersuchten Phytochromen aus Hafer, Roggen, Mais, Gerste und Erbsen<sup>[203, 258, 264]</sup>. Die Analysenwerte sowie die Sequenz der N-Termini differieren für „großes“ Phytochrom aus Roggen und Hafer, doch ist dies möglicherweise durch die Aufarbeitung bedingt<sup>[201, 203]</sup>.

Für das Verständnis der Funktion (siehe Abschnitt 5.3) sind proteinchemische Unterschiede zwischen den beiden Formen entscheidend. Nach den Arbeiten von *Tobin* und *Briggs*<sup>[191]</sup>, welche einen Großteil der bis 1973 gefundenen Unterschiede stark relativierten, führten verbesserte Isolierungsmethoden<sup>[200, 265–267]</sup> und neue Techniken in letzter Zeit zu wesentlich vielversprechenderen Ergebnissen. So ergaben sich Hinweise auf eine bevorzugte Wechselwirkung von  $P_{fr}$  mit Cholesterin<sup>[268]</sup>, und *Smith* fand in der für  $P_{fr}$  bevorzugten Assoziation mit Dextranblau<sup>[269]</sup> eine auch präparativ nutzbare Methode zur Reinigung von Phytochrom durch Sorption in der  $P_{fr}$ -Form an Dextranblau-Agarose und Desorption nach Belichtung<sup>[269a]</sup>. Nach in-vivo-Umwandlung isoliertes  $P_{fr}$  hat einen größeren hochmolekularen ( $\geq 400000$ ) Anteil<sup>[256]</sup> und bindet sich in Gegenwart von zweiwertigen Ionen relativ unspezifisch an partikuläre Fraktionen („Pelletierbarkeit“, siehe [270, 271]). Immunochemisch sind  $P_r$  und  $P_{fr}$  ununterscheidbar<sup>[272]</sup>, und auch die Ergebnisse der isoelektrischen Fokussierung stimmen überein<sup>[113]</sup>, dagegen zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Titration leicht zugänglicher Aminosäuren<sup>[113]</sup>.  $P_{fr}$  enthält ein Cystein und ein Histidin mehr als  $P_r$ , und die Modifikation von zwei Tyrosinen inhibiert die photochemischen Reaktionen.

#### 4.4. Phycochrome

Phycochrome erhielten ihren Namen in Analogie zum Phytochrom als Lichtsinnespigmente von Cyanobakterien (neuere Übersicht siehe [10]). Als Phycochrome werden heute aber prinzipiell photoreversibel-photochrome Pigmente aus diesen Organismen bezeichnet, unabhängig von einer bekannten Funktion (vgl. [10]). Zur funktionellen Charakterisierung, die bisher wohl in keinem Fall gesichert ist, schlug *Bogorad*<sup>[1]</sup> den Begriff der Adaptachrome vor, entsprechend dem wichtigsten und offensichtlichen Effekt der Regulation durch Licht, der chromatischen Adaptation (siehe Abschnitt 5.3). Phycochrome wurden bereits früh mit Phycobiliproteinen in Zusammenhang gebracht. *Scheibe*<sup>[273]</sup> gelang erstmals die Anreicherung einer Fraktion mit photoreversibel-photochromen Eigenschaften. In der Folge charakterisierten die *Björns* vier entsprechende Pigmente als Fraktion der Phycobiliproteine aus verschiedenen Algen<sup>[274, 275]</sup>, welche sie als Phycochrome a, b, c und d bezeichneten. Dabei ist insbesondere Phycochrom c interessant, da sein lichtinduziertes Differenzspektrum den Aktionsspektren der chromatischen Adaptation mehrerer Cyanobakterien und der Photomorphogenese von *Nostoc* ähnelt. Die Phycochrome wurden durch isoelektrische Fokussierung angereichert; bei Phycochrom b gelang eine weitgehende Reinigung von den im

großen Überschuß vorhandenen, photochemisch inaktiven Phycobiliprotein-Antennenpigmenten. Die Proteine sind bisher nur in einem Fall näher charakterisiert worden. Danach handelt es sich bei Phycochrom b möglicherweise um die  $\alpha$ -Untereinheit von Phycoerythrocyanin<sup>[275a]</sup>.

Ein faszinierender Aspekt ergab sich durch neuere Untersuchungen von zwei Arbeitsgruppen an partiell denaturierten „gewöhnlichen“ Biliproteinen. PC und APC aus *Tolypothrix tenuis* erhielten durch Behandeln mit 0.5 M Guanidiniumchlorid<sup>[179]</sup> photoreversibel-photochrome Eigenschaften, die charakteristisch für Phycochrom a bzw. c sind<sup>[174]</sup>, und ebenso erhielt APC aus *Fremyella diplosiphon* durch Senken des pH-Werts auf 3.8 die photochromen Eigenschaften von Phycochrom c<sup>[180]</sup>. Anscheinend werden die Chromophore durch diese Behandlung so weit vom Protein entkoppelt, daß die Fluoreszenz bereits unterdrückt ist, die strahlungslose Desaktivierung aber noch nicht die Hauptrolle spielt. Die Quantenausbeuten der Photoreaktionen (ca. 10%) sind etwa ebenso groß wie beim Phytochrom. Unabhängig vom Beweis ihrer biologischen Relevanz werfen diese Ergebnisse ein neues Licht auf die chemisch-physikalischen Wechselbeziehungen zwischen Chromophor und Protein sowie auf die möglichen phylogenetischen Beziehungen zwischen Phycobiliproteinen und Phytochrom.

### 5. Biologische Funktionen

#### 5.1. Phycobiliproteine

Phycobiliproteine sind Antennen- oder Lichtsammlerpigmente von Cyanobakterien, Rotalgen und Kryptophyten. Die Absorptionsbanden der häufigsten Pigmente dieser Gruppe, der Phycoerythrine (PE) und Phycocyanine (PC) liegen im Spektralbereich von Grün bis Orange. Die Antennenpigmente grüner Pflanzen, Chlorophyll a und b, absorbieren dort nur wenig, was den Biliprotein-bildenden Organismen einen ökologischen Vorteil in tieferen Gewässern und unter einem Schirm grüner Pflanzen gewährt. Die Organisation der Biliproteine und der Mechanismus der Energieübertragung ist in den Cyanobakterien und Rotalgen sehr ähnlich, während bei den Kryptophyten größere Unterschiede bestehen. In ersteren sind die Phycobiliproteine in elektronenmikroskopisch sichtbaren Partikeln lokalisiert, den Phycobilisomen, welche „außen“ an den Thylakoidmembranen haften<sup>[5, 224, 276]</sup>. Die Phycobilisomen haben je nach Spezies unterschiedliche Größe und Feinstruktur, bisher am besten untersucht sind die von den Rotalgen *Porphyridium cruentum*<sup>[5, 279]</sup> und *Rhodella violacea*<sup>[223, 224]</sup> (siehe Abb. 3) sowie dem Cyanobakterium *Synechococcus sp.* 6301 („*Anacystis nidulans*“)<sup>[278]</sup>. Neben den eigentlichen Lichtsammlerpigmenten, PC und PE, enthalten sie geringe Mengen verschiedener Allophycocyanine<sup>[148b, 182]</sup>, welche für die Übertragung der Anregungsenergie auf Chlorophyll wesentlich sind. Zusätzlich sind geringe Mengen farbloser Proteine beschrieben, welche möglicherweise für die Organisation der Phycobilisomen eine Rolle spielen<sup>[223, 278, 280]</sup>.

Innerhalb der Phycobilisomen sind die Pigmente in dichter Packung von „außen“ nach „innen“ in der Reihenfolge steigender Absorptionswellenlänge angeordnet. *Gantt* et al.<sup>[5]</sup> entwickelten für Phycobilisomen aus *Porphyridium cruentum* ein „Zwiebelschalen“-Modell, nach welchem eine äußere

PE-Schicht eine Zwischenschicht PC umgibt, und diese wiederum einen APC-Kern. Diese Reihenfolge wurde aus Dissoziationsversuchen in Puffern niedriger Ionenstärke abgeleitet, wobei die Pigmente nacheinander abgelöst werden<sup>[5]</sup>; sie wurden vor allem fluoreszenzspektroskopisch<sup>[281]</sup> und immun-elektronenmikroskopisch<sup>[281, 282]</sup> nachgewiesen. Mit der letzten Methode ließ sich ebenfalls zeigen, daß APC an der Membran zugewandten Seite lokalisiert ist<sup>[282]</sup>.

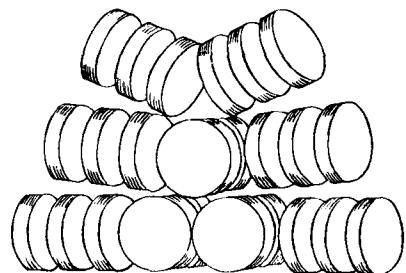


Abb. 3. Modell eines Phycobilisoms aus der einzelligen Rotalge *Rhodella violacea*. Der „Kern“ besteht aus drei APC-Hexameren, die angehefteten Stäbchen (Dreier-Einheiten, „Tripartite units“) vom Zentrum nach außen jeweils aus einem PC-Hexamer und zwei B-PE-Monomeren (nach E. Mörschel, W. Wehrmeyer, Ber. Dtsch. Bot. Ges. 92, 393 (1979)).

Prinzipiell ähnlich, aufgrund der abgeflachten Form morphologisch vielleicht sogar noch eindrucksvoller, ist der Aufbau von Phycobilisomen aus der einzelligen Rotalge *Rhodella violacea* (Abb. 3)<sup>[223, 224]</sup>. Auffällig sind die stäbchenförmigen Strukturen, die mit dem APC-Kern verbunden sind<sup>[224]</sup>. Diese Stäbchen können durch vorsichtige Dissoziation isoliert werden<sup>[223]</sup>. Im Elektronenmikroskop sind Stapel von drei Doppel-Scheibchen („Dreier-Einheiten“) zu erkennen, wobei die Doppel-Scheibchen nach Dimensionen und Molekulargewicht aus hexamerem C-PC ( $\alpha\beta$ )<sub>6</sub> oder aus dem im Prinzip ähnlichen B-PE ( $\alpha_6\beta_6\gamma$ ) bestehen. Erstere sind vermutlich mit den C-PC-Hexameren identisch, welche bei der in-vitro-Assoziation oder -Kristallisation beobachtet werden (Homoaggregate, siehe Abschnitt 4.3). Weitere Dissoziation der Stäbchen und Analyse der Bruchstücke zeigte ferner, daß vier benachbarte Scheibchen aus PE, zwei endständige aus PC bestehen, d. h. daß sie ein Heteroaggregat aus zwei Bilioproteinen sind<sup>[223]</sup>. Solche Heteroaggregate aus PC und PE wurden kürzlich auch aus *P.-cruentum*-Phycobilisomen und aus Cyanobakterien isoliert<sup>[240, 283a, 284]</sup>. Sie zeigen eine ausgezeichnete Energieübertragung von PE auf PC (zur reversiblen Dissoziation siehe<sup>[283a]</sup>). Eine Rekonstitution von Phycobilisomen aus den isolierten Bilioproteinen ist (bisher) nicht möglich. Hierzu sind vielleicht die erwähnten farblosen Proteine als Strukturelemente erforderlich<sup>[280]</sup>. In Einklang damit sind partiell in eine APC-Rohfraktion und einen PC-PE-Komplex dissozierte Phycobilisomen wieder rekonstituierbar<sup>[283b]</sup>. Da die Dreier-Einheiten aus *R. violacea* keine farblosen Proteine enthalten, sind diese wohl eher an der APC-PC-Verknüpfung oder der Membranbindung beteiligt<sup>[223]</sup>. Ein erster experimenteller Hinweis darauf ist der kürzliche Nachweis eines schweren farblosen Proteins (Mol.-Gew.  $\approx 80000$ ) sowohl aus isolierten Phycobilisomen, als auch aus Bilioprotein-befreiten Thylakoidmembranen<sup>[283b]</sup>.

Über Phycobilisomen aus Cyanobakterien ist vergleichsweise wenig bekannt; die Ergebnisse deuten auf ein ähnli-

ches Aufbauprinzip wie bei denen aus *R. violacea*. Im Elektronenmikroskop sind die Phycobilisomen nach Wildman und Bowen<sup>[277]</sup> in allen 27 untersuchten Cyanobakterien zum Teil ausgezeichnet zu erkennen, aber die Isolierung bereitet bis vor kurzem größere Probleme als bei Rotalgen. Eine saubere Abtrennung von anderen Pigmenten läßt sich zwar durch Immunchromatographie erreichen, doch gelingt die Elution der so gereinigten Phycobilisomen nur unter dissoziierenden Bedingungen<sup>[280]</sup>. Phycobilisomen sind aus einer *Nostoc*-Spezies<sup>[151a, 284]</sup>, aus *Synechococcus spec. 6301* („*Anacystis nidulans*“)<sup>[278]</sup> und aus anderen Spezies<sup>[285, 286]</sup> isoliert worden. Die Phycobilisomen von *S. spec. 6301* erscheinen im Elektronenmikroskop als Aggregate von Stäbchen. Auch hier scheint sich APC an den Verknüpfungsstellen zu befinden, da beim Dissoziieren die Energieübertragung von PC zu APC unterbrochen wird<sup>[278]</sup>. Kürzlich gelang die elektronenmikroskopische Charakterisierung von Phycobilisomen aus zwei anderen Cyanobakterien durch Verwendung zwitterionischer Detergentien, welche die Aggregation bei der Aufarbeitung verhindern sollen<sup>[225]</sup>. Diese Untersuchungen bestätigen das Strukturprinzip der Abbildung 3 mit Variationen in der Zahl der zentralen APC-Scheibchen sowie der Zahl und Länge der Äste<sup>[278]</sup>. Die Phycobilisomen chromatisch adaptierender Cyanobakterien zeigen geringe, aber definierter Unterschiede in ihrer Größe und Anordnung<sup>[287]</sup> sowie im Muster der farblosen Proteine<sup>[280]</sup>. Bei *Tolypothrix tenuis* verlängern sich die Äste im Grünlicht<sup>[288]</sup>. Dabei werden anscheinend nicht nur zusätzliche PE-Einheiten angebaut, sondern es wird auch PC abgebaut.

Phycobilisomen sind außerordentlich wirksame Antennen, welche Licht mit hohem Wirkungsquerschnitt absorbieren und die Anregungsenergie auf die Reaktionszentren übertragen. Diese Energieübertragung erreicht Quantenausbeuten bis 100%<sup>[142, 143, 289, 290]</sup> und ist nur unter Mangelbedingungen (Licht<sup>[291]</sup>, N<sup>[292]</sup>) entkoppelt. Die Übertragung erfolgt vorwiegend auf das Photosystem II (PS II), wie ursprünglich aus den bichromatischen Aktionsspektren<sup>[3, 4]</sup> geschlossen wurde. Heterocysten enthalten kein PS II und sind frei von Phycobilisomen<sup>[293]</sup> (siehe jedoch<sup>[323]</sup>). Kürzlich isolierten Katoh und Ganti<sup>[294]</sup> photosynthetische Vesikeln, die noch gebundene Phycobilisomen enthalten und PS-II-Aktivität zeigen. Diese Aktivität nimmt parallel mit der Dissoziation der Phycobilisomen ab (induziert durch Verringern der Ionenstärke). Dabei ist die Kopplung zwischen den Phycobilisomen und Reaktionszentren variabel und vom physiologischen Zustand abhängig<sup>[295]</sup>. Bei heterotroph im Dunkeln gezogener *Anabaena variabilis* wurde allerdings eine Energieübertragung auf PS I mitgeteilt, und kürzlich wurden in PS-I-Präparaten aus *Chloroglaea fritschii* fluoreszenzspektroskopische Hinweise auf APC erhalten<sup>[296]</sup>. APC fluoresziert ähnlich wie bestimmte Chlorophylle<sup>[294]</sup>; ein direkter Nachweis ergab sich jetzt aus den in<sup>[323]</sup> zitierten Ergebnissen.

Ein Faktor für die gute Übertragung ist die Organisation der Phycobilisomen. Diese bewirkt, daß der energetisch begünstigte „Bergab“-Transport der Anregungsenergie vom energiereichen PE zum energieärmeren APC zugleich gerichtet von der PE-Peripherie zum APC-Zentrum des Phycobilisoms führt. Zur weiteren Übertragung von dort zur Membran sowie zur Fixierung der Phycobilisomen dient möglicherweise eine kürzlich beschriebene „Füßchen“-Struktur<sup>[279]</sup>. Ein zweiter Faktor sind die intensiven Absorptionen der Bilioproteine ( $\approx 10^5 \text{ cm}^2 \times \text{mol}^{-1} \times \text{Chromophor}^{-1}$ ), wel-

che nahezu lückenlos den Bereich von 500–670 nm überdecken (vgl. [5]), verbunden mit hoher Fluoreszenz (=geringer strahlungsloser Desaktivierung) der Chromophore<sup>[142]</sup> und Abständen von 3.5–6 nm zwischen den Chromophoren<sup>[139, 142, 297]</sup>. Diese Abstände sind für den Energietransfer zwischen gleichartigen Chromophoren unterhalb des kritischen Radius für Energietransfer nach dem Förster-Mechanismus bereits bei regeloser Orientierung optimal. Die Fluoreszenz-Quantenausbeute steigt bei Aggregation isolierter Untereinheiten zum Monomer, wie kürzlich für C-PE gezeigt wurde<sup>[139]</sup>. Sie steigt weiter bei Aggregation der Monomere zu Tri- und Hexameren<sup>[141]</sup> sowie zum quasi-Hexamer B-PE<sup>[142]</sup>. Zugleich sinkt die Fluoreszenz-Polarisation<sup>[139, 142, 297]</sup> und die Halbwertszeit für den Energietransfer<sup>[297]</sup>.

Aufgrund der schnellen Energiewanderung und der höheren Wahrscheinlichkeit für den „Bergab“-Transport der Energie erfolgt die Fluoreszenz in allen Aggregaten praktisch ausschließlich<sup>[139]</sup> von den jeweils längstwellig absorbierenden Chromophoren, welche dementsprechend als „f“-Chromophore klassifiziert wurden<sup>[140]</sup>, während die kürzerwellig absorbierenden „s“-Chromophore sensibilisierend wirken und nur in Ausnahmefällen eine messbare Fluoreszenz zeigen<sup>[139]</sup>. Beim Aufbau der Phycobilisomen verlängert sich diese Übertragungskette sukzessive, und es bilden sich „Förster-Kaskaden“. Dabei sorgt die Anordnung der Pigmente bei den nächsten Nachbarn jeweils für eine optimale Überlappung der Emissionsbande des Donors mit der Absorptionsbande des Acceptors (Abb. 4). Dieser Prozeß wurde

Tabelle 4. Schematische Darstellung des Energietransfers anhand des Phycobilisomemodells aus Abb. 3 (nur eine Dreier-Einheit und ein zentrales APC zeigt) und der Absorptions- und Emissionsspektren der Phycobiliproteine (gemittelte Werte; die Emissionsmaxima der „s“-Chromophore der isolierten Pigmente wurden aus ihren Absorptionsmaxima unter Annahme einer Stokes-Verschiebung von 15 nm abgeschätzt).

Pigment	Chromophor	Absorption [nm]	Fluoreszenz [nm]
B-PE	PUB [a]	500	515
	„s“ (2)	545	560
	„f“ (2)	570	585
C-PC	„s“ (1a)	590	605
	„f“ (1a)	620	635
APC	(1a)	650	665
Chl a <sub>11</sub>		686	
			↓ Photochemie

[a] PUB = Phycourobilin-Chromophor.

für Biliproteine mit verschiedenartigen Chromophoren<sup>[140, 142, 297]</sup>, für Heteroaggregate<sup>[223, 253]</sup> und für ganze Phycobilisomen gesichert<sup>[143, 289, 290]</sup>. Im intakten Phycobilisom führt dieser Prozeß schließlich dazu, daß nur noch die Chromophore des mengenmäßig geringsten Biliproteins, APC, fluoreszieren, und die restlichen Chromophore als Sensibilisatoren wirken, mit einer Übertragungswahrscheinlichkeit von „mindestens 99%“ in Phycobilisomen aus *P. cruentum*<sup>[290]</sup>.

Auch Kryptophyten haben Biliproteine als Antennenpigmente, aber diese sind deutlich von denen der Cyanobakterien und Rotalgen unterschieden (neuere Übersicht siehe [298]). Diese Biliproteine sind an der Innenseite der Thylakoidmembran lokalisiert<sup>[299]</sup>. Phycobilisomen konnten bisher

nicht isoliert werden, aber kürzlich fanden Wehrmeyer et al.<sup>[300]</sup> elektronenmikroskopisch Hinweise auf partikuläre Strukturen, welche möglicherweise Biliproteine enthalten. Auch der Energietransfer muß bei Kryptophyten unterschiedlich verlaufen, da bisher kein APC nachgewiesen werden konnte und in ihnen im allgemeinen nur PC oder PE vorkommen. Wie bei den Biliproteinen aus Cyanobakterien und Rotalgen fluoresziert jeweils nur der energetisch niedrigste Chromophor<sup>[34, 297, 300]</sup>. Kobayashi et al.<sup>[297]</sup> fanden extrem schnellen Transfer ( $\leq 8$  ps) in PC aus *Chroomonas*, in Einklang mit der von Jung et al.<sup>[34]</sup> postulierten Exciton-Kopplung zwischen den Chromophoren. Die Übertragung von K-PC auf Chlorophyll a erscheint unproblematisch, insbesondere beim vergleichsweise langwellig absorbierenden und emittierenden PC-645 aus *Chroomonas*<sup>[34, 189, 300]</sup> und PC-641 aus *Hemiselmis virescens*<sup>[33]</sup>. Die Emissionsbande von PE fällt dagegen in einen Bereich minimaler Absorption von Chlorophyll a, so daß entweder nur eine unvollkommene Energieübertragung möglich ist oder aber ein weiteres Pigment zwischengeschaltet sein muß<sup>[301]</sup>. Tatsächlich enthalten Kryptophyten mit Chlorophyll c mögliche Kandidaten.

Nach diesen Daten scheinen die Morphologie der Antenne und der Aufbau der Biliproteine eng miteinander verknüpft zu sein. In Cyanobakterien überdeckt jedes Biliprotein nur einen vergleichsweise kleinen Teil des Spektrums. Dabei bietet nur APC günstige Voraussetzungen für einen Energietransfer zum Chlorophyll; einen Energietransfer von PE zum Chlorophyll erfordert die Aggregation mehrerer Pigmente. Dieser Nachteil wird durch die ausgefeilte Architektur der Phycobilisomen ausgeglichen, welche eine vektorielle Energieleitung, möglicherweise direkt zum Reaktionszentrum von PS II, ermöglicht. In den Kryptophyten-Phycocyaninen ist diese Energieübertragungskette bereits in den einzelnen Biliproteinen realisiert. So enthält z. B. *Chroomonas*-PC Chromophore, welche im Bereich von 573–652 nm absorbieren<sup>[32, 189]</sup>, so daß auf eine höhere Organisation verzichtet werden kann. In den Rotalgen schließlich sind beide Strategien vereinigt. Sie enthalten Phycobilisomen, aber zugleich die Pigmente R-PC, R-PE und B-PE, in denen mehrere Chromophortypen zu einer kurzen Energieübertragungskette zusammengefaßt sind.

Zusätzlich zur Lichtsammlung werden für Phycobiliproteine auch andere Funktionen diskutiert. Unter N-<sup>[11]</sup> oder S-Mangelbedingungen<sup>[302]</sup> werden Phycobiliproteine als Proteinreserven (?) abgebaut. Sie machen insbesondere in Cyanobakterien einen erheblichen Anteil des Gesamtproteins aus und sind prinzipiell für die Photosynthese weniger wichtig als die Reaktionszentren. Daneben könnten sie auch eine Lichtschutz-Funktion haben, da Biliprotein-freie Mutanten lichtempfindlicher sind als die Wildtypen.

Schließlich gibt es gute Hinweise darauf, daß Phycobiliproteine auch Funktionen bei der Elektronenübertragung haben können oder früher einmal hatten<sup>[303, 304]</sup>. Eine entsprechende Funktion konnte allerdings in vivo bisher nicht nachgewiesen werden.

Mit Biliproteinen belegte Elektroden geben Photopotentiale<sup>[171, 305]</sup>, außerdem katalysiert PC den Elektronentransfer durch synthetische Lipidmembranen<sup>[173, 304]</sup>. In beiden Fällen stimmen Aktions- und Absorptionsspektren überein. Ebenso zeigt PC spezifische Wechselwirkungen mit  $\text{Fe}^{3+}$ , aber nicht mit  $\text{Fe}^{2+}$ , und einen asymmetrischen Effekt auf den Elektronentransfer von einseitig beladenen synthetischen

schen Membranen<sup>[306]</sup>. Die Redox-Potentiale freier Gallenfarbstoffe wurden theoretisch berechnet<sup>[95,307]</sup>, und die Chromophore nativer Biliproteine erwiesen sich als wesentlich stabiler gegen Redoxreagentien als die der denaturierten Pigmente<sup>[35,129]</sup>.

## 5.2. Phytochrom

Die Funktion des Phytochroms ist die eines Lichtsinnespigments grüner Pflanzen. Beim Umstimmen des Wachstums höherer Pflanzen vom heterotrophen, etiolierten Wachstum, z. B. als Keimling unter der Erde, zum autotrophen, photosynthetisierenden Wachstum wirkt es als Sensor für Licht an sich, in den „Hochenergiereaktionen“ als Sensor für die Lichtintensität, und schließlich ermöglicht es aufgrund des Wellenlängen-abhängigen Gleichgewichts zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$ , insbesondere im photosynthetisch wichtigen roten Spektralbereich, ein „Farbensehen“ bei Pflanzen. Während einige physiologische und strukturelle Aspekte des Phytochroms eingehend untersucht worden sind<sup>[9,14,16,18]</sup>, ist der Mechanismus der Informationsübertragung und -wandlung bisher nur in Ansätzen bekannt. Die Modelle sind entsprechend schwer zu bewerten und sollen hier nur skizziert werden.

Phytochrom wird als physiologisch inaktives  $P_r$  synthetisiert; am Anfang jeder physiologischen Reaktionskette steht die photochemische Umwandlung in  $P_{fr}$ . Die Bildung von  $P_{fr}$  ist durch Licht  $\geq 740$  nm grundsätzlich und praktisch vollständig umkehrbar; das gilt jedoch nicht für alle Schritte der nachfolgenden Reaktionskette. Ein einfaches Beispiel dafür ist, daß  $P_{fr}$  oder der  $P_{fr}$ -Rezeptor-Komplex in vivo abgebaut wird (vgl. z. B. <sup>[14,18]</sup>). Je nach der Laufzeit der Reaktion ( $\tau_{rev}$ ) bis zum Erreichen eines irreversiblen Schrittes ist dadurch auch die physiologische Antwort für bestimmte Zeiten umkehrbar (oder annullierbar). Da die Zeit ( $\tau_{rev}$ ) zum Entkommen aus der Reversibilität für die verschiedenen physiologischen Antworten über mehrere Größenordnungen schwankt, führte dies zu einer Klassifizierung der Phytochrom-Antworten in Modulationsprozesse (großer  $\tau_{rev}$ -Wert = „reversibel“) und Differenzierungsprozesse (kleiner  $\tau_{rev}$ -Wert = „irreversibel“) (neuere Diskussionen siehe <sup>[18,308]</sup>). Eine Reihe von biochemischen und physiologischen Befunden, welche *Marme*<sup>[309]</sup> kritisch zusammengestellt hat, deuten zumindest bei den Modulationsreaktionen auf reversible Änderungen von Membraneigenschaften.

Basierend auf den bisher bekannten Unterschieden zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  (siehe Abschnitt 4.4) und der Photochemie von Modellsystemen (siehe Abschnitt 3.3) wurden mehrere Hypothesen für die Primärreaktionen entwickelt. *Song* et al.<sup>[263]</sup> postulierten eine lichtinduzierte Photoisomerisierung<sup>[40]</sup> unter Beteiligung von Protonentransfer, durch die eine im  $P_r$  durch den Chromophor verdeckte Rezeptor-Bindungsstelle freigelegt wird. *Hunt* und *Pratt*<sup>[113]</sup> argumentieren, daß eine chemische Modifikation der dabei freigelegten Aminosäuren die Photoreversibilität beeinträchtigen sollte. Da dies nicht der Fall ist<sup>[113]</sup>, betrachten sie diesen Befund als Stütze für die von *Smith*<sup>[9a]</sup> diskutierte Konformationsänderung des Proteins als Primärsignal. Eine dritte Hypothese postuliert schließlich eine reversible Redoxreaktion zwischen Protein und Chromophor unter Bildung einer neuen Chromophor-Protein-Bindung<sup>[106]</sup>. Alle drei Hypothesen können Änderungen von Membraneigenschaften erklären, bei Re-

dox- und Protonierungs-Deprotonierungs-Prozessen direkt, bei Konformationsänderungen und Freilegung von Rezeptor-Bindungsstellen indirekt, aber eine Unterscheidung ist bisher nicht möglich.

## 5.3. Phycocrome und Phycobiliprotein-Biosynthese

Die Biosynthese der Phycobiliprotein-Chromophore verläuft in großen Zügen ähnlich wie die wesentlich besser untersuchte Bildung der tierischen Gallenfarbstoffe.  $\delta$ -Aminolävulinsäure wird zu einem cyclischen Tetrapyrrol, sehr wahrscheinlich Protoporphyrin, kondensiert, welches anschließend oxidativ unter Verlust von C-5 als Kohlenmonoxid zum Gallenfarbstoff geöffnet wird<sup>[311,313]</sup>. Die Ringöffnung verläuft ähnlich<sup>[314]</sup> wie bei der Häm-Oxygenierung<sup>[315]</sup>, aber aufgrund chemischer Indizien ist auch die Ringöffnung eines Mg-Porphyrins über ein 7,8-Dihydrophosphinato-magnesium denkbar<sup>[161]</sup>. Ebenfalls ungeklärt ist, ob sich das Apoprotein nach (und nicht vor) der Ringöffnung an den Chromophor bindet, und ob es sich dabei an die 3-Ethylidengruppe des Bilindions (4) (und nicht an die Vinylgruppe einer Vorstufe) anlagert. Ein Hinweis für die hier nicht in Klammern aufgeführten Alternativen ist der Befund<sup>[312]</sup>, daß *Cyanidium caldarium* im Dunkeln (4) sowie ein Additionsprodukt von (4)<sup>[54c,316]</sup> ausscheidet. Ein weiterer Hinweis ist die leichte und reversible Addition von Nucleophilen an (4) und (6)<sup>[54c,58,59]</sup>.

In den meisten Cyanobakterien und zumindest in einigen Rotalgen ist die Biliprotein-Synthese durch Licht reguliert. Interessant ist dabei vor allem die Anpassung der Antennenpigmente an die jeweilige Lichtqualität („chromatische Adaptation“). Im vorherrschenden Rotlicht werden überwiegend die blauen Phycocyanine, im Grünlicht, z. B. unter einem Blätterdach oder im tieferen Wasser, werden eher die roten Phycoerythrine gebildet<sup>[1,11,287,317]</sup>. Der Effekt wurde besonders bei *Tolypothrix tenuis*<sup>[12,318]</sup> und *Fremyella diplosiphon*<sup>[319,320]</sup> untersucht. Aufgrund der Aktionsspektren wurde die chromatische Adaptation durch photochrome Pigmentsysteme als Rezeptoren erklärt, die funktionell als Adaptachrome oder mechanistisch, entsprechend dem Phytochrom, als Phycocrome bezeichnet werden. Daneben gibt es auch photomorphogenetische Effekte bei Rotalgen, welche mit entsprechenden Rezeptoren in Verbindung gebracht werden. Über die Rezeptoren (siehe Abschnitt 4.4) ist wenig, über die Wirkungsweise fast nichts bekannt.

## 6. Schlußbemerkungen

Phycobiliproteine waren lange Zeit als Opfer des „mammalian chauvinism“ und aufgrund ihrer Proteinbindung weit weniger untersucht als die anderen tetrapyrrolischen Photosynthese pigmente, die Chlorophylle. Gegenüber den Chlorophyllen haben die Phycobiliproteine jedoch den Vorteil, nicht membrangebunden zu sein. Diese Eigenschaft und die Erkenntnis der zentralen Funktion eines anderen Biliproteins, des Phytochroms, bei der pflanzlichen Entwicklung führte in letzter Zeit zu einem Aufblühen der Biliprotein-Forschung. Kein photosynthetisches Antennensystem ist so gut untersucht wie die Phycobilisomen, und – mit Ausnahme des Rhodopsins – ist auch kein Lichtsinnespfeigment so weit charakterisiert wie das Phytochrom.

Im vorliegenden Beitrag wurde versucht, einen Bogen von den Eigenschaften der isolierten Chromophore zur Funktion der Pigmente *in vivo* zu spannen. Dieser Bogen ist willkürlich und stellenweise lückenhaft, aber in den letzten Jahren doch in großen Teilen hinreichend gestützt. Einige der offensichtlichen Lücken sind beim Phytochrom die Struktur von  $P_f$  und die damit verbundene Frage nach der Natur des Primärsignals, sowie die Rolle spezifischer Wechselwirkungen von Phytochrom mit bestimmten Membranen und Organellen. Ein Fortschritt auf diesem Gebiet wird sicher auch die Arbeiten an den verwandten Phycochromen befruchten.

Bei den Phycobiliproteinen ergibt sich aus dem funktional und morphologisch beeindruckenden Modell der Phycobilisomen eine Fülle von Fragen, die sich nur in enger Zusammenarbeit von Biophysikern und Biochemikern untersuchen lässt. Die Details der Chromophor-Protein-Wechselwirkungen und der Beziehungen der Biliprotein-Chromophore untereinander und zu den Chlorophyllen innerhalb der Photosynthesemembran sind entscheidend für das Verständnis der Energieübertragung auf molekularer Ebene. Die zunehmende Differenzierung der Phycobilisomen-Struktur wirft die Frage nach ihren Organisationselementen, ihrer Biogenese und deren Regulation auf. Die Antworten werden nicht nur für den Neugierigen interessant sein, sondern vielleicht auch grundsätzlich zum Verständnis der Lichtsammlung und Informationswandlung beitragen.

Die zitierten Arbeiten des Autors wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Münchener Universitätsgesellschaft gefördert.

Eingegangen am 29. Mai 1980 [A 355]

- [1] L. Bogorad, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 26, 369 (1975).
- [2] Th. W. Engelmann, *Bot. Z.* 42, 81 (1884).
- [3] F. T. Haxo in M. B. Allen: *Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems*. Academic Press, New York 1960, S. 339.
- [4] R. Emerson, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 9, 1 (1958).
- [5] E. Gantt, *BioScience* 25, 781 (1975); *Photochem. Photobiol.* 26, 685 (1977).
- [6] R. Lemberg, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 461, 46 (1928).
- [7] M. W. Parker, S. B. Hendricks, H. A. Borthwick, N. J. Scully, *Science* 102, 152 (1945).
- [8] W. L. Butler, K. H. Norris, H. W. Siegelman, S. B. Hendricks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 1703 (1959).
- [9] a) H. Smith: *Phytochrome and Photomorphogenesis*. McGraw-Hill, London 1975; b) K. Mitrakos, W. Shropshire, Jr.: *Phytochrome*. Academic Press, New York 1972; c) H. Mohr: *Lectures on Photomorphogenesis*. Springer, Berlin 1972.
- [10] L. O. Björn, *Q. Rev. Biophys.* 12, 1 (1979).
- [11] a) N. G. Carr, B. A. Whitton: *The Biology of Blue-Green Algae*. Blackwell, Oxford 1973; b) N. Lazaroff in [11a], S. 279.
- [12] S. Diakoff, I. Scheibe, *Plant Physiol.* 51, 382 (1973).
- [13] a) W. Rüdiger, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 29, 60 (1971); b) *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 88, 125 (1975); c) *ibid.* 92, 413 (1979); d) B. Deutch, B. I. Deutch, A. O. Gyldenholm: *Plant Growth and Light Perception*. University of Aarhus, 1978; e) W. Rüdiger in [13d], S. 53.
- [14] L. H. Pratt, *Photochem. Photobiol.* 27, 81 (1978).
- [15] A. N. Glazer, *Mol. Cell. Biochem.* 18, 125 (1977).
- [16] a) T. W. Goodwin: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. 2. Aufl. Academic Press, New York 1976; b) H. Smith, R. E. Kendrick in [16a], S. 378.
- [17] K. M. Hartmann, W. Haupt in W. Hoppe, W. Lohmann, H. Mark, H. Ziegler: *Biophysik*. Springer, Berlin 1978, S. 449.
- [18] a) W. Rüdiger, *Struct. Bonding (Berlin)* 40, 101 (1980); b) W. Rüdiger, H. Scheer in W. Shropshire, Jr., H. Mohr: *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Series, Springer, Berlin, im Druck.
- [19] H. Scheer in [13d], S. 25.
- [20] R. T. Troxler in P. D. Berk, N. I. Berlin: *Chemistry and Physiology of Bile Pigments*. U. S. Dept. of Health, DHEW Publ. No. (NIH) 77-1100, Washington, D. C. 1977, S. 431.
- [21] W. R. Briggs, H. V. Rice, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 23, 293 (1972).
- [22] P. O'Carra, C. O'hEocha in [16a], S. 328.
- [23] a) D. S. Berns in S. N. Timasheff, G. D. Fasman: *Subunits in Biological Systems*. Dekker, New York 1971, Part A, S. 105; b) R. McColl, D. S. Berns, *Trends Biochem. Sci.* 4, 44 (1979).
- [24] a) D. Dolphin: *The Porphyrins*. Academic Press, New York; b) A. Bennett, H. W. Siegelman in [24a], Vol. VI, 1979, S. 493.
- [25] B. J. Chapman in [11a], S. 162.
- [26] G. Blauer, *Struct. Bonding (Berlin)* 18, 69 (1974).
- [27] a) M. Choussy, M. Barbier, *Helv. Chim. Acta* 58, 2651 (1975); b) M. Bois-Choussy, M. Barbier, *Heterocycles* 9, 677 (1978).
- [28] W. H. Bannister, J. V. Bannister, H. Micaleff, *Comp. Biochem. Physiol.* 35, 237 (1970).
- [29] a) W. Rüdiger, *Naturwissenschaften* 57, 331 (1970); b) Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 348, 129 (1967).
- [30] T. Ogata, N. Fusetani, K. Yamaguchi, *Comp. Biochem. Physiol. B* 63, 239 (1979).
- [31] A. N. Glazer, C. S. Hixson, *J. Biol. Chem.* 252, 32 (1977).
- [32] D. A. Bryant, A. N. Glazer, F. A. Eisinger, *Arch. Microbiol.* 110, 61 (1976).
- [33] A. N. Glazer, G. Cohen-Bazire, *Arch. Microbiol.* 104, 29 (1975).
- [34] J. Jung, P.-S. Song, R. J. Paxton, M. S. Edelstein, R. Swanson, E. E. Hazen, Jr., *Biochemistry* 19, 24 (1980).
- [35] S. Grombein, W. Rüdiger, H. Zimmermann, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 356, 1709 (1975).
- [36] H. Scheer, *Z. Naturforsch. C* 31, 413 (1976).
- [37] a) G. Klein, S. Grombein, W. Rüdiger, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 358, 1077 (1977); b) J.-P. Weller, A. Gossauer, *Chem. Ber.* 113, 1603 (1980); c) W. Rüdiger, T. Brandlmeier, I. Blos, A. Gossauer, J. P. Weller, *Z. Naturforsch. C* 35, 763 (1980).
- [38] J. C. Langarias, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 4821 (1980).
- [39] H. Lehner, T. Brandlmeier, W. Rüdiger, *persönliche Mitteilung* (1980).
- [40] H. Falk, K. Grubmayr, E. Haslinger, T. Schlederer, K. Thirring, *Monatsh. Chem.* 109, 1451 (1978).
- [41] C. Krauss, C. Bubenzier, H. Scheer, *Photochem. Photobiol.* 30, 473 (1979).
- [42] P. O'Carra, C. O'hEocha, *Photochemistry* 5, 993 (1966).
- [43] E. Fu, L. Friedman, H. W. Siegelman, *Biochem. J.* 179, 1 (1979).
- [44] B. L. Schram, H. H. Kroes, *Eur. J. Biochem.* 19, 581 (1971).
- [45] G. Klein, W. Rüdiger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1978, 267.
- [46] A. Gossauer, J.-P. Weller, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 5928 (1978).
- [47] H. Scheer, C. Bubenzier, *unveröffentlicht*.
- [48] H. L. Crespi, U. Smith, J. J. Katz, *Biochemistry* 7, 2232 (1968).
- [49] H. L. Crespi, L. J. Boucher, G. D. Norman, J. J. Katz, R. C. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3642 (1967).
- [50] W. J. Cole, D. J. Chapman, H. W. Siegelman, *Biochemistry* 7, 2929 (1968).
- [51] D. J. Chapman, W. J. Cole, H. W. Siegelman, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5976 (1967).
- [52] a) W. Rüdiger, P. O'Carra, C. O'hEocha, *Nature* 215, 5109 (1967); b) W. Rüdiger, P. O'Carra, *Eur. J. Biochem.* 7, 509 (1969).
- [53] W. Rüdiger, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 350, 1291 (1969).
- [54] a) A. Gossauer, W. Hirsch, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1974, 1496; b) A. Gossauer, R. P. Hinze, *J. Org. Chem.* 43, 283 (1978); c) A. Gossauer, R.-P. Hinze, R. Kutsch, *Chem. Ber.* 114, 132 (1981).
- [55] T. Brandlmeier, I. Blos, W. Rüdiger, in J. A. de Greef: *Photoreceptors and Plants Development*. Antwerpen University Press, 1979, S. 47 ff.
- [56] H. Brockmann Jr., G. Knobloch, *Chem. Ber.* 106, 803 (1973).
- [57] W. J. Cole, C. O'hEocha, A. Moscovitz, W. R. Krueger, *Eur. J. Biochem.* 3, 202 (1967).
- [58] S. Schoch, G. Klein, U. Linsenmeier, W. Rüdiger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1976, 549.
- [59] H. Lotter, G. Klein, W. Rüdiger, H. Scheer, *Tetrahedron Lett.* 1977, 2317.
- [60] R. F. Troxler, A. S. Brown, H. P. Köst, *Eur. J. Biochem.* 87, 181 (1978).
- [61] G. Muckle, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 32, 957 (1977).
- [62] F. Frank, W. Sidler, H. Widmer, H. Zuber, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 359, 1491 (1978).
- [63] R. Troxler, *noch unveröffentlicht*.
- [64] P. Freidenreich, G. S. Apell, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* 253, 212 (1978).
- [65] J. C. Langarias, A. N. Glazer, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 101, 5030 (1979).
- [66] H. Scheer, U. Linsenmeier, C. Krauss, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 358, 185 (1977).
- [67] C. Krauss, H. Scheer, *teilweise vorgetragen auf der Chemiedozententagung*, Erlangen 1980.
- [68] P. Ehrlich, *Zentralbl. Klin. Med.* 45, 721 (1883).
- [69] K. P. M. Heirwegh, J. Fevery, J. A. T. P. Neuwissen, F. Compernolle, V. Desmet, F. P. van Roy, *Methods Biochem. Anal.* 22, 205 (1974).
- [70] W. Kufer, H. Scheer, *teilweise vorgetragen auf der Chemiedozententagung*, Erlangen 1980.
- [71] H. P. Köst, W. Rüdiger, D. J. Chapman, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1975, 1582.
- [72] A. N. Glazer, C. S. Hixson, *J. Biol. Chem.* 250, 5487 (1975).
- [73] G. Struckmeier, U. Thewaldt, J.-H. Fuhrhop, *J. Am. Chem. Soc.* 98, 278 (1976).
- [74] G. R. Anderson, E. L. Jenner, F. E. Mumford, *Biochemistry* 8, 1182 (1969).
- [75] R. E. Kendrick, C. J. P. Spruit, *Photochem. Photobiol.* 26, 201 (1977).

- [76] H. Linschitz, V. Kasche, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1059 (1967).
- [77] W. L. Butler, L. H. Pratt, Photochem. Photobiol. 11, 361 (1970).
- [78] S. E. Braslavsky, J. J. Matthews, H. J. Herbert, J. de Kok, C. J. P. Spruit, K. Schaffner, Photochem. Photobiol. 31, 417 (1980).
- [79] C. J. P. Spruit, R. E. Kendrick, Photochem. Photobiol. 26, 133 (1977).
- [80] M. J. Burke, D. C. Pratt, A. Moscowitz, Biochemistry 11, 4025 (1972).
- [81] a) D. R. Cross, H. Linschitz, V. Kasche, J. Tenenbaum, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 1095 (1968); b) A. P. Balangé, Dissertation, Université Rouen 1973.
- [82] H. H. Kroes, Meded. Landbouwhoges. Wageningen 70-181 (1970).
- [83] E. Tobin, W. R. Briggs, P. K. Brown, Photochem. Photobiol. 18, 497 (1973).
- [84] C. J. P. Spruit, R. E. Kendrick, R. J. Cooke, Planta 127, 121 (1975).
- [85] S. E. Ostrov, Biochim. Biophys. Acta 463, 91 (1977).
- [86] D. A. Lightner, Photochem. Photobiol. 26, 427 (1977).
- [87] a) A. Gossauer, H. H. Inhoffen, Justus Liebigs Ann. Chem. 1970, 18; b) A. Gossauer, M. Blacha, W. S. Sheldrick, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1976, 764.
- [88] H. Falk, K. Grubmayr, G. Höllbacher, O. Hofer, A. Leodolter, N. Neufingerl, J. M. Ribo, Monatsh. Chem. 108, 1113 (1977).
- [89] a) H. Falk, K. Grubmayr, Angew. Chem. 89, 487 (1977); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 470 (1977); b) H. Falk, N. Müller, T. Schlederer, Monatsh. Chem. 111, 159 (1980).
- [90] a) A. Gossauer, M. Blacha-Puller, R. Zeisberg, V. Wray, noch unveröffentlicht; b) M. Blacha-Puller, Dissertation, Technische Universität Braunschweig 1979.
- [91] H. Falk, G. Höllbacher, Monatsh. Chem. 109, 1429 (1978).
- [92] H. Falk, K. Grubmayr, Monatsh. Chem. 110, 1237 (1979).
- [93] H. Falk, K. Thürring, Z. Naturforsch. B 34, 1448 (1979); B 35, 376 (1980).
- [94] H. Scheer, H. Formanek, W. Rüdiger, Z. Naturforsch. C 34, 1085 (1979).
- [95] B. Pullman, A.-M. Perault, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45, 1476 (1959).
- [96] A. R. Holzwarth, H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, Justus Liebigs Ann. Chem. 1978, 2002.
- [97] W. Kufer, H. Scheer, Z. Naturforsch. C 34, 776 (1979).
- [98] H. Falk, T. Schlederer, Monatsh. Chem. 109, 1013 (1978).
- [99] P. Manitto, D. Monti, Experientia 35, 1418 (1979).
- [100] F. E. Mumford, E. L. Jenner, Biochemistry 10, 98 (1971).
- [101] R. M. Klein, P. C. Edsall, Plant Physiol. 41, 949 (1966).
- [102] L. H. Pratt, S. C. Cundiff, Photochem. Photobiol. 21, 91 (1975).
- [103] H. Scheer in [24a], Vol. II, 1978, S. 45.
- [104] I. B. C. Matheson, M. M. Toledo, Photochem. Photobiol. 25, 243 (1977).
- [105] H. Scheer, C. Krauss, Photochem. Photobiol. 25, 311 (1977).
- [106] C. Krauss, Dissertation, Universität München 1980.
- [107] a) G. Löber, L. Kittler, Photochem. Photobiol. 25, 215 (1977); b) E. R. Lochmann, A. Michler in J. Duchesnel: Physico Chemical Properties of Nucleic Acids. Academic Press, New York 1973.
- [108] F. Eivazi, W. M. Lewis, K. M. Smith, Tetrahedron Lett. 1977, 3083.
- [109] C. Krauss, H. Scheer, Tetrahedron Lett. 1979, 3553.
- [110] J. V. Bonfiglio, R. Bonnett, M. B. Hursthouse, K. M. A. Malik, S. C. Naithani, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1977, 829.
- [111] S. J. Roux, S. G. Lisansky, B. M. Stoker, Physiol. Plant 35, 85 (1975).
- [112] G. Gardner, W. F. Thompson, W. R. Briggs, Planta 117, 367 (1974).
- [113] R. E. Hunt, L. H. Pratt, Biochemistry, im Druck; teilweise vorgetragen auf dem Eur. Symp. Photomorphogenesis, Antwerpen 1979.
- [114] A. Moscowitz, W. C. Krueger, I. T. Kay, G. Skews, S. Bruckenstein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52, 1190 (1964).
- [115] W. S. Sheldrick, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 1976, 1457.
- [116] H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, Angew. Chem. 90, 1012 (1978); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 17, 948 (1978).
- [117] H. Lehner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, Justus Liebigs Ann. Chem. 1978, 1990.
- [118] H. Falk, K. Grubmayr, K. Thürring, Z. Naturforsch. B 33, 924 (1978).
- [119] S. E. Braslavsky, A. R. Holzwarth, E. Langer, H. Lehner, J. J. Matthews, K. Schaffner, Isr. J. Chem. 20, 196 (1980).
- [120] H. Lehner, W. Riemer, K. Schaffner, Justus Liebigs Ann. Chem. 1979, 1798.
- [121] G. Wagnière, G. Blauer, J. Am. Chem. Soc. 98, 7806 (1976).
- [122] D. L. Cullen, F. E. Meyer, Jr., F. Eivazi, K. M. Smith, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 1978, 259.
- [123] H. Lehner, H. Scheer, noch unveröffentlicht.
- [124] H. Scheer, P. Bartholmes, H. Lehner, noch unveröffentlicht.
- [125] H. Scheer, W. Kufer, Z. Naturforsch. C 32, 513 (1977).
- [126] I. M. Tegmo-Larsson, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, persönliche Mitteilung (März 1980).
- [127] I. M. Tegmo-Larsson, S. E. Braslavsky, C. Nicolau, K. Schaffner, noch unveröffentlicht.
- [128] R. Bonnett, J. E. Davies, M. B. Hursthouse, G. M. Sheldrick, Proc. R. Soc. Ser. B 202, 249 (1978).
- [129] W. Kufer, H. Scheer, Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 360, 935 (1979).
- [130] W. Kufer, A. R. Holzwarth, H. Scheer, unveröffentlicht.
- [131] T. Sugimoto, K. Ishikawa, H. Suzuki, J. Phys. Soc. Jpn. 40, 258 (1976).
- [132] Q. Chae, P. S. Song, J. Am. Chem. Soc. 97, 4176 (1975).
- [133] R. Pasternak, G. Wagnière, J. Am. Chem. Soc. 101, 1662 (1979).
- [134] J.-H. Fuhrhop, P. K. W. Wasser, J. Subramanian, U. Schrader, Justus Liebigs Ann. Chem. 1974, 1450.
- [135] C. H. Chen, D. S. Berns, Biophys. Chem. 8, 191 (1978).
- [135a] T. Brandlmeier, H. Lehner, W. Rüdiger, Photochem. Photobiol., im Druck; siehe auch [18b].
- [136] D. Frackowiak, J. Grabowski, Photosynthetica 5, 146 (1971).
- [137] D. Frackowiak, K. Fiksinski, J. Grabowski, Photosynthetica 9, 185 (1975).
- [138] J. Friedrich, H. Scheer, B. Zickendrah-Wendelstadt, D. Haarer, J. Am. Chem. Soc., im Druck; J. Chem. Phys., im Druck.
- [139] B. Zickendrah-Wendelstadt, J. Friedrich, W. Rüdiger, Photochem. Photobiol. 31, 367 (1980).
- [140] a) F. W. J. Teale, R. E. Dale, Biochem. J. 116, 161 (1970); b) R. E. Dale, F. W. J. Teale, Photochem. Photobiol. 12, 99 (1970).
- [141] C. Vernoit, Photochem. Photobiol. 14, 163 (1971).
- [142] J. Grabowski, E. Gant, Photochem. Photobiol. 28, 39 (1978).
- [143] J. Grabowski, E. Gant, Photochem. Photobiol. 28, 47 (1978).
- [144] E. Langer, H. Lehner, W. Rüdiger, B. Zickendrah-Wendelstadt, Z. Naturforsch. C 35, 367 (1980).
- [144a] P. S. Song, persönliche Mitteilung.
- [145] L. J. Boucher, H. L. Crespi, J. J. Katz, Biochemistry 5, 3796 (1966).
- [146] D. Frackowiak, J. Grabowski, H. Manikowski, Photosynthetica 10, 204 (1976).
- [147] A. S. Brown, J. A. Foster, P. V. Voynow, C. Franzblau, R. F. Troxler, Biochemistry 14, 3581 (1975).
- [148] a) E. Fujimori, J. Pecci, Biochim. Biophys. Acta 221, 132 (1970); b) A. C. Ley, W. L. Butler, D. A. Bryant, A. N. Glazer, Plant. Physiol. 59, 974 (1977).
- [149] G. Cohen-Bazire, S. Beguin, S. Rimon, A. N. Glazer, D. M. Brown, Arch. Microbiol. 111, 225 (1977).
- [150] R. McColl, K. Csatorday, D. S. Berns, E. Traeger, Biochemistry 19, 2817 (1980).
- [151] a) B. H. Gray, E. Gant, Photochem. Photobiol. 21, 121 (1975); b) B. H. Gray, J. Cosner, E. Gant, ibid. 24, 299 (1976).
- [152] E. Gant, O. Canaani, Biochemistry 19, 2950 (1980).
- [153] E. Gant, C. A. Lipschultz, Biochemistry 13, 2960 (1974).
- [154] A. Bennett, L. Bogorad, Biochemistry 10, 3625 (1971).
- [155] a) C. Petrier, P. Jardon, C. Dupuy, R. Gautron, J. Chim. Phys. 76, 97 (1979); b) C. Petrier, C. Dupuy, P. Jardon, R. Gautron, persönliche Mitteilung; c) R. Gautron, P. Jardon, C. Petrier, M. Choussy, M. Barbier, M. Vuillaume, Experientia 32, 1100 (1976).
- [156] H. Falk, K. Grubmayr, F. Neufingerl, Monatsh. Chem. 110, 1127 (1979).
- [157] P. S. Song, Q. Chae, D. A. Lightner, W. R. Briggs, D. Hopkins, J. Am. Chem. Soc. 95, 7892 (1973).
- [158] E. J. Land, Photochem. Photobiol. 29, 483 (1979).
- [159] E. Falk, F. Neufingerl, Monatsh. Chem. 110, 987 (1979).
- [160] A. F. McDonagh in [24a], Vol. VI, 1979, S. 294.
- [161] M. F. Hudson, K. M. Smith, Chem. Soc. Rev. 4, 363 (1975).
- [162] P. Manitto, D. Monti, Experientia 28, 379 (1972).
- [163] G. Calzaferri, H. Gugger, S. Leutwyler, Helv. Chim. Acta 59, 1969 (1976).
- [164] W. Windhager, S. Schneider, F. Dörr, Z. Naturforsch. A 32, 876 (1977).
- [165] C. Petrier, W. Kufer, H. Scheer, R. Gautron, unveröffentlicht.
- [166] A. R. Holzwarth, E. Langer, H. Lehner, K. Schaffner, Photochem. Photobiol. 32, 17 (1980).
- [167] In Porphyrinen wurden ausgeprägte Isotopeneffekte auf die Lebensdauer angeregter Zustände beobachtet: A. T. Gradyushko, M. P. Tsvirko, Opt. Spektrosk. 31, 391 (1971); R. P. Burgner, A. M. Ponte-Goncalves, J. Chem. Phys. 60, 2942 (1974).
- [168] C. O'hEocha, P. O'Carra, J. Am. Chem. Soc. 83, 1091 (1961).
- [169] C. O'hEocha, Biochemistry 2, 375 (1963).
- [170] B. Zickendrah-Wendelstadt, Dissertation, Universität München 1980.
- [171] D. Frackowiak, A. Skowron, Photosynthetica 12, 76 (1978).
- [172] W. Kufer, H. Scheer, Z. Naturforsch. C 34, 776 (1979).
- [173] S. S. Chen, D. S. Berns, J. Membrane Biol. 47, 113 (1979).
- [174] G. Blankenhorn, E. G. Moore, J. Am. Chem. Soc. 102, 1092 (1980).
- [175] R. Troxler, persönliche Mitteilung (1980).
- [176] W. Kufer, Diplomarbeit, Universität München 1977.
- [177] A. Abieliovich, M. Shilo, Biochim. Biophys. Acta 283, 483 (1972).
- [178] J. S. Bellin, C. A. Gergel, Photochem. Photobiol. 13, 399 (1971).
- [179] K. Ohki, Y. Fujita, Plant Cell Physiol. 20, 483 (1979).
- [180] I. Ohad, R. K. Clayton, L. Bogorad, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5655 (1979).
- [181] J. Gysi, H. Zuber, FEBS Lett. 68, 49 (1976).
- [182] B. A. Zilinskas, B. K. Zimmermann, E. Gant, Photochem. Photobiol. 27, 587 (1978).
- [183] J. Gysi, H. Zuber, FEBS Lett. 48, 209 (1974).
- [184] A. N. Glazer, D. A. Bryant, Arch. Microbiol. 104, 15 (1975).
- [185] B. T. Cope, U. Smith, H. L. Crespi, J. J. Katz, Biochim. Biophys. Acta 133, 446 (1967).
- [186] P. A. Torjesen, K. Sletten, Biochim. Biophys. Acta 263, 258 (1972).
- [187] A. N. Glazer, G. Cohen-Bazire, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1398 (1971).
- [188] D. J. Chapman, W. J. Cole, H. W. Siegelman, Biochem. J. 105, 903 (1967).
- [189] E. Mörschel, W. Wehrmeyer, Arch. Microbiol. 105, 153 (1975).
- [190] P. O'Carra, Biochem. J. 119, 2P (1970).
- [191] E. Tobin, W. R. Briggs, Photochem. Photobiol. 18, 487 (1973).
- [192] H. H. van de Velde, Biochim. Biophys. Acta 303, 246 (1973).

- [193] C. Abad-Zapatero, J. L. Fox, M. L. Hackert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 266 (1977).
- [194] R. M. Sweet, H. E. Fuchs, R. G. Fisher, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* 252, 8258 (1977).
- [195] A. N. Glazer, G. Cohen-Bazire, R. Y. Stanier, *Arch. Microbiol.* 80, 1 (1971).
- [196] R. McColl, D. S. Berns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 849 (1979).
- [197] E. Mörschel, W. Wehrmeyer, *Arch. Microbiol.* 113, 83 (1977).
- [198] R. McColl, D. S. Berns, O. Gibbons, *Arch. Biochem. Biophys.* 177, 265 (1976).
- [199] K. T. Fry, F. E. Mumford, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1466 (1971).
- [200] H. V. Rice, W. R. Briggs, C. J. Jackson-White, *Plant Physiol.* 51, 917 (1973).
- [201] R. E. Hunt, L. H. Pratt, *Biochemistry* 19, 390 (1980).
- [202] P. H. Quail, W. R. Briggs, L. H. Pratt, *Carnegie Inst. Yearbook* 77, 252 (1978).
- [203] H. V. Rice, W. R. Briggs, *Plant Physiol.* 51, 927 (1973).
- [204] S. Shimura, Y. Fujita, *Mar. Biol.* 31, 121 (1975).
- [205] H. Zuber, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 91, 459 (1978).
- [206] J. U. Harris, D. S. Berns, *J. Mol. Evol.* 5, 153 (1975).
- [207] P. G. H. Byfield, H. Zuber, *FEBS Lett.* 28, 36 (1972).
- [208] E. Köst-Reyes, H. P. Köst, W. Rüdiger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1973, 1594.
- [209] G. Muckle, J. Otto, W. Rüdiger, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 359, 345 (1978).
- [210] D. A. Bryant, C. S. Hixson, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* 253, 220 (1978).
- [211] V. P. Williams, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* 253, 202 (1978).
- [212] T. Fujiwara, *J. Biochem. (Tokyo)* 43, 195 (1956).
- [213] S. D. Killilea, P. O'Carra, *Biochem. J.* 110, 14P (1968).
- [214] H. L. Crespi, U. H. Smith, *Phytochemistry* 9, 205 (1970).
- [215] C. Brooks, D. J. Chapman, *Phytochemistry* 11, 2663 (1972).
- [216] E. Köst-Reyes, H. P. Köst, *Eur. J. Biochem.* 102, 83 (1979).
- [217] A. N. Glazer, C. S. Hixson, R. J. DeLange, *Anal. Biochem.* 92, 489 (1979).
- [218] G. Klein, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 34, 192 (1979).
- [219] S. D. Dobler, K. Dover, K. Laves, A. Binder, H. Zuber, *J. Mol. Biol.* 71, 785 (1972).
- [220] M. L. Hackert, C. Abad-Zapatero, S. E. Stevens, Jr., J. L. Fox, *J. Mol. Biol.* 111, 365 (1977).
- [221] J. L. Fox, persönliche Mitteilung (1979).
- [222] A. Kotera, T. Saito, N. Iso, H. Mizuno, N. Taki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 1176 (1975).
- [223] K. P. Koller, W. Wehrmeyer, E. Mörschel, *Eur. J. Biochem.* 91, 57 (1978).
- [224] E. Mörschel, K. P. Koller, W. Wehrmeyer, H. Schneider, *Cytobiology* 16, 118 (1977).
- [225] A. N. Glazer, R. C. Williams, G. Yamanaka, H. K. Schachman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6162 (1979).
- [226] M. A. Raftery, C. O'hEocha, *Biochem. J.* 94, 166 (1965).
- [227] D. S. Berns, *Plant Physiol.* 42, 1569 (1967).
- [228] A. N. Glazer, G. Cohen-Bazire, R. Y. Stanier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 3005 (1971).
- [229] L. Bogorad, *Rec. Chem. Prog.* 26, 1 (1965).
- [230] J. Eder, R. Wagenmann, W. Rüdiger, *Immunochemistry* 15, 315 (1978).
- [231] J. Takemoto, L. Bogorad, *Biochemistry* 14, 1211 (1975).
- [232] S. Boussiba, A. E. Richmond, *Arch. Microbiol.* 120, 155 (1979).
- [233] A. N. Glazer, S. Fang, *J. Biol. Chem.* 248, 663 (1973).
- [234] G. Frank, H. Zuber, W. Lergier, *Experientia* 31, 23 (1975).
- [235] A. Salahuddin, C. Tanford, *Biochemistry* 9, 1342 (1970).
- [236] J. A. Knapp, C. N. Pace, *Biochemistry* 13, 1289 (1974).
- [237] P. Bartholmes, H. Scheer, noch unveröffentlicht.
- [238] R. McColl, J. J. Lee, D. S. Berns, *Biochem. J.* 122, 421 (1971).
- [239] J. J. Lee, D. S. Berns, *Biochem. J.* 110, 465 (1968).
- [240] J. Grabowski, C. A. Lipschultz, E. Gannt, *Plant Physiol.*, im Druck.
- [241] T. Saito, N. Iso, H. Mizuno, I. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 51, 3471 (1976).
- [242] R. McColl, M. R. Edwards, M. H. Mulks, D. S. Berns, *Biochem. J.* 141, 419 (1974).
- [243] N. Iso, H. Mizuno, T. Saito, N. Nitta, K. Yoshizaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56, 2892 (1977).
- [244] G. J. Neufeld, A. F. Riggs, *Biochim. Biophys. Acta* 181, 234 (1969).
- [245] R. McColl, D. S. Berns, N. L. Koven, *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 477 (1971).
- [246] R. McColl, D. S. Berns, *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 161 (1973).
- [247] D. S. Berns, A. Morgenstern, *Arch. Biochem. Biophys.* 123, 640 (1968).
- [248] a) E. Mörschel, W. Wehrmeyer, K.-P. Koller, *Eur. J. Cell Biol.* 21, 319 (1980); b) E. Mörschel, K.-P. Koller, W. Wehrmeyer, *Arch. Microbiol.* 125, 43 (1980).
- [249] A. Hattori, H. L. Crespi, J. J. Katz, *Biochemistry* 4, 1225 (1965).
- [250] C. H. Chen, D. S. Berns, *J. Phys. Chem.* 82, 2781 (1978).
- [251] S. M. Adams, O. H. W. Kao, D. S. Berns, *Plant Physiol.* 64, 525 (1979).
- [252] O. H. W. Kao, D. S. Berns, W. R. Town, *Biochem. J.* 131, 39 (1973).
- [253] O. H. W. Kao, M. R. Edwards, D. S. Berns, *Biochem. J.* 147, 63 (1975).
- [254] D. L. Correll, E. Steers, Jr., K. M. Towe, W. Shropshire, Jr., *Biochim. Biophys. Acta* 168, 46 (1968).
- [255] G. Gardner, C. S. Pike, H. V. Rice, W. R. Briggs, *Plant Physiol.* 48, 686 (1971).
- [256] S. Grombein, W. Rüdiger, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 357, 1015 (1976).
- [257] C. S. Pike, W. R. Briggs, *Plant Physiol.* 49, 521 (1972).
- [258] L. H. Pratt, *Plant Physiol.* 51, 503 (1973).
- [259] B. M. Stoker, K. McEntire, S. J. Roux, *Photochem. Photobiol.* 27, 597 (1978).
- [260] B. M. Stoker, S. J. Roux, W. E. Brown, *Nature* 271, 180 (1978).
- [261] G. H. Kidd, R. E. Hunt, M. L. Boeshore, L. H. Pratt, *Nature* 276, 733 (1978).
- [262] L. H. Pratt, *Photochem. Photobiol.* 22, 33 (1975).
- [263] P. S. Song, Q. Chae, J. D. Gardner, *Biochim. Biophys. Acta* 576, 479 (1979).
- [264] S. C. Cundiff, L. H. Pratt, *Plant Physiol.* 55, 212 (1975).
- [265] R. E. Hunt, L. H. Pratt, *Plant Physiol.*, im Druck.
- [266] A. P. Balangé, P. Rollin, *Plant. Sci. Lett.* 1, 59 (1973).
- [267] D. Marmé, J. Boisard, W. R. Briggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3861 (1973).
- [268] N. Roth-Bejerano, R. E. Kendrick, *Proc. Eur. Symp. Photomorphogenesis*, Aarhus (1978).
- [269] W. O. Smith, *Eur. Symp. Photoreceptors and Plant Development*, Antwerpen (1979).
- [269a] S. Daniels, W. O. Smith, persönliche Mitteilung.
- [270] P. H. Quail, *Photochem. Photobiol.* 27, 147 (1978).
- [271] L. H. Pratt, D. Marmé, *Plant Physiol.* 58, 686 (1976).
- [272] L. H. Pratt, persönliche Mitteilung (1979).
- [273] J. Scheibe, *Science* 176, 1037 (1972).
- [274] G. S. Björn, L. O. Björn, *Physiol. Plant.* 26, 297 (1976).
- [275] G. S. Björn, *Physiol. Plant.* 42, 321 (1978).
- [275a] G. S. Björn, noch unveröffentlicht.
- [276] E. Gannt, S. F. Conti, *J. Cell Biol.* 29, 423 (1966).
- [277] R. B. Wildman, C. C. Bowen, *J. Bacteriol.* 117, 866 (1974).
- [278] G. Yamanaka, A. N. Glazer, R. C. Williams, *J. Biol. Chem.* 253, 8303 (1978).
- [279] G. Wanner, H.-P. Köst, *Protoplasma* 102, 97 (1980).
- [280] N. Tandeau de Marsac, G. Cohen-Bazire, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1635 (1977).
- [281] E. Gannt, B. A. Zilinskas, *Biochim. Biophys. Acta* 430, 375 (1976).
- [282] E. Gannt, C. A. Lipschultz, *J. Phycol.* 13, 185 (1977).
- [283] a) O. Canaani, C. A. Lipschultz, E. Gannt, *FEBS Lett.* 115, 225 (1980); b) T. Redlinger, E. Gannt, *5th Int. Congr. Photosynthesis*, Halkidiki 1980.
- [284] M. Rigbi, J. Rosinski, H. W. Siegelman, J. C. Sutherland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, im Druck.
- [285] B. H. Gray, C. A. Lipschultz, E. Gannt, *J. Bacteriol.* 116, 471 (1973).
- [286] E. Gannt, C. A. Lipschultz, J. Grabowski, K. Zimmerman, *Plant Physiol.* 63, 615 (1979).
- [287] R. Wagenmann, *Dissertation*, Universität München 1977.
- [288] H. W. Siegelman, persönliche Mitteilung (1980).
- [289] G. Porter, C. J. Tredwell, G. F. W. Searle, J. Barber, *Biochim. Biophys. Acta* 501, 232 (1978).
- [290] G. F. W. Searle, J. Barber, G. Porter, C. J. Tredwell, *Biochim. Biophys. Acta* 501, 246 (1978).
- [291] K. Ohki, Y. Fujita, *Plant Cell Physiol.* 20, 1341 (1979).
- [292] K. Csاتорai, *Biochim. Biophys. Acta* 504, 341 (1978).
- [293] P. Fay in [21a], S. 238.
- [294] T. Katoh, E. Gannt, *Biochim. Biophys. Acta* 546, 383 (1979).
- [295] G. Harnischfeger, G. A. Codd, *Biochim. Biophys. Acta* 502, 507 (1978).
- [296] C. A. Pullin, R. G. Brown, E. H. Evans, *FEBS Lett.* 101, 110 (1979).
- [297] T. Kobayashi, E. O. Degenkolb, R. Behrson, P. M. Rentzepis, R. McColl, D. S. Berns, *Biochemistry* 18, 5073 (1979).
- [298] E. Gannt in M. Levandowski, S. H. Husner: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 2. Aufl. Academic Press, New York 1979, S. 12.
- [299] a) W. Wehrmeyer, *Arch. Microbiol.* 71, 367 (1979); b) E. Gannt, M. R. Edwards, L. Provasoli, *J. Cell. Biol.* 48, 280 (1971).
- [300] W. Wehrmeyer, persönliche Mitteilung (1979).
- [301] R. McColl, D. S. Berns, *Photochem. Photobiol.* 27, 343 (1978).
- [302] A. Schmidt, noch unveröffentlicht.
- [303] V. B. Eustigne in K. Dose, S. W. Fox, G. A. Deborin, T. E. Pavlovskaya: *The Origin of Life and Evolutionary Biochemistry*, Plenum, New York 1974, S. 97.
- [304] D. S. Berns, *Photochem. Photobiol.* 24, 117 (1976).
- [305] V. B. Eustigne, O. D. Bekasova, *Biofizika* 17, 997 (1972).
- [306] A. Ilani, D. S. Berns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1423 (1971).
- [307] M. Kumbar, R. McColl, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 11, 627 (1975).
- [308] H. Mohr, P. Schopfer: *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, 3. Aufl. Springer, Berlin 1978.
- [309] D. Marmé, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28, 173 (1977).
- [310] H. W. Siegelman, D. J. Chapman, W. J. Cole in [16a], S. 107.
- [311] R. F. Troxler, A. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* 215, 503 (1970).
- [312] R. F. Troxler, *Biochemistry* 11, 4235 (1972).
- [313] R. F. Troxler, J. M. Dokos, *Plant Physiol.* 51, 72 (1973).

- [314] R. F. Troxler, A. S. Brown, S. B. Brown, J. Biol. Chem. 254, 3411 (1979).  
 [315] S. B. Brown, R. F. G. J. King, Biochem. J. 170, 297 (1978).  
 [316] R. J. Beuhler, R. C. Pierce, L. Friedman, H. W. Siegelman, J. Biol. Chem. 251, 2405 (1976).  
 [317] N. Tandeau de Marsac, J. Bacteriol. 130, 82 (1977).  
 [318] K. Ohki, Y. Fujita, Plant Cell Physiol. 19, 7 (1978).  
 [319] S. Gendel, I. Ohad, L. Bogorad, Plant Physiol. 64, 786 (1979).  
 [320] J. F. Haury, L. Bogorad, Plant Physiol. 60, 835 (1977).  
 [321] H. Falk, K. Thirring, Tetrahedron, im Druck.  
 [322] H.-P. Köst, G. Wanner, H. Scheer, Photochem. Photobiol., im Druck.  
 [323] Das Vorkommen von Biliproteinen und ein Energietransfer auf PSI in Heterocysten wurde kürzlich mitgeteilt: R. B. Petterson, E. Dolan, H. E. Calvin, B. Ke, Biochim. Biophys. Acta 634, 237 (1981).

## Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Zielenzyme für eine rationale Arzneimittelentwicklung

Von Friedrich von der Haar, Hans-Joachim Gabius und Friedrich Cramer<sup>(\*)</sup>

Professor Hans Herloff Inhoffen zum 75. Geburtstag gewidmet

Das „maßgeschniederte“ Arzneimittel ist ein alter Traum seit *Paracelsus*: „Dosis sola facit venenum“. Ein ideales Pharmakon sollte den pathologischen Vorgang oder den parasitären Organismus maximal inhibieren und dabei den menschlichen Körper minimal schädigen. Um dieses Ziel zu erreichen, muß man versuchen, metabolische Unterschiede zwischen dem pathologischen bzw. parasitären und dem normalen menschlichen Stoffwechsel gezielt auszunutzen. Dies erscheint heute aufgrund der vertieften Kenntnisse enzymatischer Vorgänge ein möglicher, sogar vielversprechender Weg. Das Pharmakon sollte dabei an einem zentral wichtigen Prozeß eingreifen. Ein solcher Prozeß ist die Proteinbiosynthese, bei der die erforderliche Genauigkeit im Zusammenbau der Makromoleküle durch den Vorgang des „Korrekturlesens“ erreicht wird. Es zeigt sich, daß dieser Mechanismus je nach Spezies verschieden verläuft.

### 1. Einleitung: Ist eine rational zielorientierte Arzneimittelsynthese möglich?

„...hier handelt es sich um das Problem, einen von bestimmten Parasiten infizierten Organismus dadurch zu heilen, daß man die Parasiten innerhalb des lebenden Organismus zur Abtötung bringt, also den Organismus sterilisiert, mit Hilfe von Substanzen, die in der Retorte des Chemikers entstanden sind“<sup>[1]</sup>.

„Will man experimentell an das Studium der Frage herantreten, so muß man zunächst Substanzen suchen, die 1. im Reagenzglas stark entwicklungshemmend oder abtötend auf Bakterien wirken, 2. praktisch ungefährlich für den Organis-

mus sind, die schließlich 3. die Desinfektionswirkung auch im Organismus beibehalten“<sup>[2]</sup>.

So schrieb *Paul Ehrlich* vor 75 Jahren, im selben Jahre, als der Forscher geboren wurde, dem dieser Beitrag gewidmet ist. Die damals weit vorausschauenden Forderungen sind bis heute nur zum geringsten Teil erfüllt worden. Zwar hat die pharmazeutische Forschung eine große Anzahl hervorragend wirksamer Mittel geschaffen, dies jedoch auf recht wenig rationale Weise. Die meisten Pharmaka wurden durch gewaltige „Screening“-Programme unter Tausenden von Verbindungen herausgefunden oder verdanken ihre Entdeckung dem Zufall<sup>[3]</sup>. Auch die Wirkungsweise vieler Pharmaka war zunächst unbekannt und ist es zum Teil heute noch. Ein gutes Beispiel hierfür ist Aspirin (Acetylsalicylsäure), das mit Abstand am meisten verwendete Arzneimittel. Aspirin wurde 1899 registriert; seine Wirkungsweise, die Inhibition der Synthese der Prostaglandine bzw. der Prostaglandin-Cyclooxygenase, wurde aber erst 1971 bzw. 1975 aufgeklärt<sup>[4, 5]</sup>.

Die biochemische und molekularbiologische Forschung hat in den letzten Jahren wesentliche Reaktionsabläufe in

[\*] Priv.-Doz. Dr. F. von der Haar, Dipl.-Biochem. H.-J. Gabius,  
 Prof. Dr. F. Cramer  
 Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie  
 Hermann-Rein-Straße 3, D-3400 Göttingen