

Phytochrom, das Sehpigment der Pflanzen

Von Wolfhart Rüdiger* und Fritz Thümmeler

Professor Kurt Schaffner zum 60. Geburtstag gewidmet

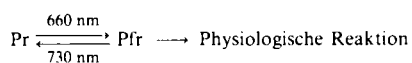
Pflanzen benötigen Licht für die Photosynthese. Zur Adaption an die Lichtverhältnisse ihres jeweiligen Standorts haben sie mehrere Photorezeptorsysteme entwickelt, darunter das Phytochrom, das ihnen sogar ein Zwei-Farben-Sehen im Bereich Hellrot-Dunkelrot ermöglicht. Mit dem Phytochrom beschäftigen sich nicht nur Botaniker, sondern auch Naturstoffchemiker, Photochemiker, Biochemiker, Photobiologen und neuerdings Molekularbiologen. Trotz umfangreicher Untersuchungen ist noch längst nicht alles über diesen Photorezeptor bekannt. Dieser Übersichtsartikel schildert zunächst die grundlegenden Strukturuntersuchungen am Tetrapyrrol-Chromophor des Phytochroms und dessen photochemische *cis,trans*-Isomerisierung, die zur Photochromie des Chromoproteins führt. Im Abschnitt über den Proteinanteil werden unter anderem die Struktur der Domänen des Phytochroms und Konformationsänderungen bei der Photoumwandlung diskutiert. Schließlich werden aus den bisher bekannten Phytochromgenen phylogenetische Zusammenhänge abgeleitet und mögliche Struktur-Funktions-Beziehungen aufgezeigt.

1. Einleitung

Höhere Pflanzen bleiben nach dem Auskeimen fest mit ihrem Standort verwurzelt. Sie haben daher Strategien entwickelt, um sich den jeweiligen Umweltbedingungen anzupassen. Ein wichtiger Umweltfaktor für Pflanzen ist Licht, das für die Photosynthese benötigt wird. Bekannt ist die Anpassung des Photosyntheseapparates an die Lichtqualität („Licht- und Schattenpflanzen sowie -blätter“). Daneben gibt es im Leben der Pflanzen von der Samenkeimung über Wachstum und Ergrünen bis zur Blütenbildung zahlreiche lichtgesteuerte Prozesse, die man unter dem Begriff „Photomorphogenese“ zusammenfaßt^[1]. Die Photomorphogenese wird über Photorezeptoren gesteuert. Je nach dem wirksamen Spektralbereich, der durch ein Wirkungsspektrum ermittelt werden kann und der der Absorption des jeweiligen Photorezeptors entspricht, unterscheidet man bei Pflanzen mindestens drei Photorezeptoren für die Bereiche UV-B, UV-A/Blauviolet und Hellrot/Dunkelrot. Während die Photorezeptoren für die beiden zuerst genannten Spektralbereiche bisher nur schlecht charakterisiert sind, konnte der Hellrot/Dunkelrot-Rezeptor „Phytochrom“ identifiziert und bereits eingehend untersucht werden.

Phytochrom wurde vor 40 Jahren in Beltsville (Maryland) entdeckt^[2]. Borthwick und Hendricks et al. beschäftigten sich mit der photoperiodischen Steuerung der Blütenbildung und der Lichtregulation der Samenkeimung. Die entscheidende Entdeckung war, daß in beiden Fällen – mit nahezu identischem Wirkungsspektrum – Hellrot ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$) einen induzierenden Effekt aufwies, der durch nachfolgendes Dunkelrot ($\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$) wieder aufgehoben wurde^[3, 4]. Das Postulat eines photochromen Photorezeptors, der in einer physiologisch inaktiven, Hellrot-absorbierenden Form (Pr, engl. „red“ absorbing form) und in einer physiologisch aktiven, Dunkelrot-absorbierenden Form (Pfr, engl. „far-red“ absorbing form) existieren sollte, wurde nachfolgend durch die Isolierung des Photorezeptors bestätigt. Es handelt

sich um ein Chromoprotein, das in Pflanzen nur in sehr geringer Menge vorkommt: Selbst in Keimpflanzen, die im Dunkeln angezogen wurden und die daher chlorophyllfrei sind, ist der Photorezeptor mit bloßem Auge nicht sichtbar. Dagegen läßt er sich aufgrund seiner Photochromie im Gewebe solcher Pflanzen spektroskopisch sehr wohl nachweisen.



Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Phytochrom wurden bevorzugt im Dunkeln gewachsene („etiolierte“) Haferkeimlinge verwendet, die in den Spitzen der Koeoptilen (Keimblattscheiden) relativ viel Phytochrom enthalten. Aufgrund von Proteasen, die beim Aufbrechen der Pflanzenzellen wirksam werden, konnten über viele Jahre hinweg nur Proteolyseprodukte („kleines Phytochrom“ 60 kDa, „großes Phytochrom“ 114–118 kDa) des nativen Photorezeptors isoliert werden. Erst 1982 gelang es, die Größe des intakten Moleküls (Monomergröße von Haferphytochrom: 124 kDa) festzustellen und dieses zu isolieren^[5, 6]. Die photochromen Eigenschaften bleiben bei der Isolierung erhalten: Sättigende

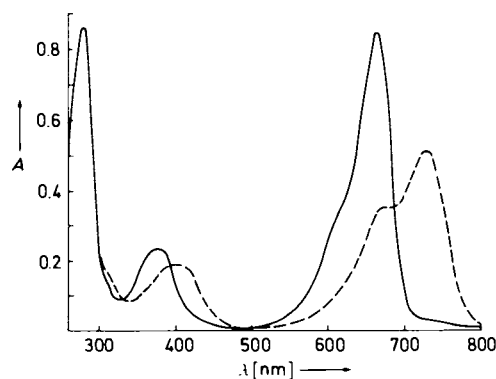


Abb. 1. Absorptionsspektren von 124 kDa-Phytochrom aus etioliertem Hafer in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7.8 (nach [7]). Die Spektren wurden bei 4 °C nach sättigender Bestrahlung mit Dunkelrot (—) und Hellrot (---) aufgenommen. Das Absorptionsverhältnis A_{660}/A_{730} der Pr-Form (hier: 0.99) ist ein Maß für die Reinheit des isolierten Phytochroms.

[*] Prof. Dr. W. Rüdiger, Dr. F. Thümmeler
Botanisches Institut der Universität
Menzinger Straße 67, W-8000 München 19

Bestrahlung mit dunkelrotem Licht ($\lambda_{\text{max}} = 730 \text{ nm}$) führt Phytochrom zu über 99 % in die Pr-Form über, während die sättigende Bestrahlung mit hellrotem Licht etwa 85 % Pfr neben 15 % Pr liefert. Die Absorptionsspektren der beiden Formen zeigt Abbildung 1. Natives Phytochrom ist ein Dimer, das aus zwei gleichen Untereinheiten aufgebaut ist. Jede Untereinheit besteht aus einer N-terminalen chromophorhaltigen Domäne und einer C-terminalen Domäne (N bzw. C in Abb. 2). Die Quartärstruktur des Phytochroms aus Erb-

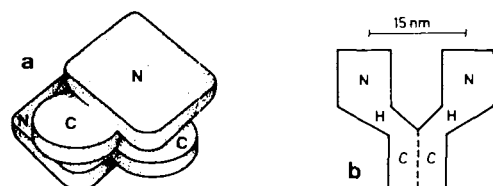


Abb. 2. Modelle des dimeren Phytochrom-Moleküls, die aus a) Röntgenkleinwinkelstreuung und Elektronenmikroskopie (nach [8], umgezeichnet) und aus b) Elektronenmikroskopie (nach [9]) abgeleitet wurden.

sen wurde aus Röntgenkleinwinkelstreuung und Elektronenmikroskopie abgeleitet (vgl. Abb. 2)^[8]. Für Phytochrom aus Hafer wurde elektronenmikroskopisch eine ganz ähnliche Y-Form ermittelt^[9].

2. Der Tetrapyrrol-Chromophor

2.1. Die Struktur von Phytochromobilin

Die Absorption von sichtbarem Licht deutete bereits frühzeitig auf einen Nicht-Proteinchromophor im Phytochrom hin. Über dessen chemische Natur gab es lange Zeit nur Spekulationen. Der Nachweis einer offenkettigen Tetrapyrrolstruktur gelang erst 1969^[10] durch oxidativen Abbau und Nachweis der Abbauprodukte.

Der oxidative Abbau mit Chromsäure oder Dichromat war bereits zu einer einfachen analytischen Mikromethode

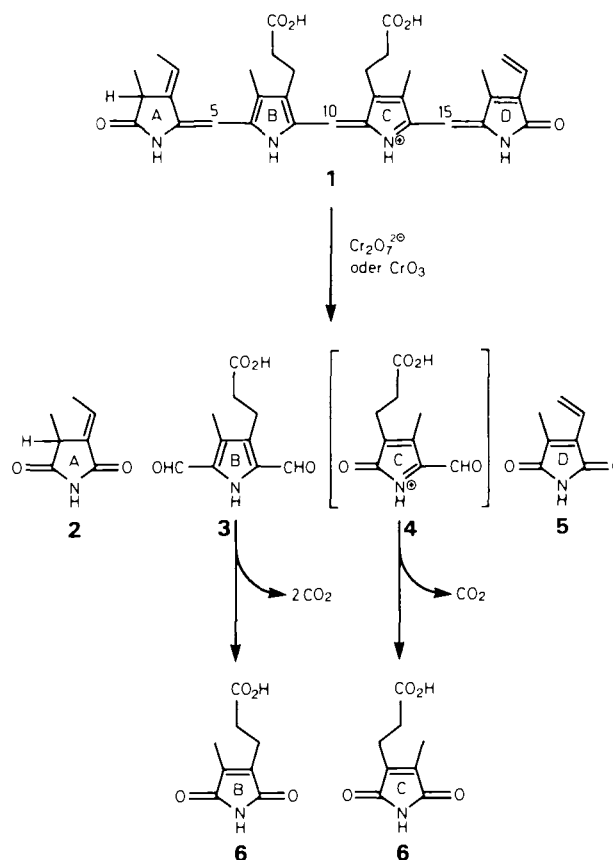
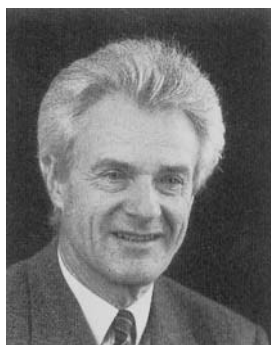


Abb. 3. Chrmsäure- und Dichromatabbau von Phytochromobilin 1. Der Abbau ist hier für synthetisches 1 gezeigt. Die analytischen Untersuchungen verliefen entsprechend den in Abbildung 4 gezeigten Reaktionen.

zur Strukturaufklärung von Gallenfarbstoffen ausgearbeitet worden, die mit ca. 1 nmol eines Tetrapyrrols auskommt^[11]. Dabei wurden sowohl die Kinetik der Entfärbung des Pigments bestimmt, die bei offenkettigen Tetrapyrrolen (Gallenfarbstoffen) erheblich schneller abläuft als bei Porphyrinen und Chlorophyllderivaten, als auch β -substituierte Pyrroldialdehyde, Maleinimide und Succinimide als charakteristische Abbauprodukte identifiziert, z. B. mittels Dünnschichtchromatographie und spezifischer Färbung. Die β -Substituen-



Wolfhart Rüdiger, geboren 1933 in Stolp/Pommern, studierte von 1953 bis 1959 Chemie an der Universität Würzburg. Nach seiner Promotion 1961 bei F. G. Fischer mit einer Arbeit auf dem Gebiet des Chlorophylls ging er für zwei Jahre an das Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung in Heidelberg und an die Meeresbiologische Station in Neapel. Er arbeitete dort über die Biochemie des Vanadiums, insbesondere Hämovanadin, bei einer Gruppe von Meerestieren (Tunicaten). Ab 1963 war er wissenschaftlicher Assistent am Institut für Biochemie der Universität Saarbrücken, wo er sich 1969 mit Arbeiten über offenkettige Tetrapyrrole bei Tieren und Pflanzen habilitierte. Seit 1971 ist er ordentlicher Professor für Phytochemie und Vorstand am Botanischen Institut der Universität München. Seine Arbeitsgebiete umfassen neben dem Phytochrom die Regulation der Chlorophyllbiosynthese sowie Struktur und Funktion neuer pflanzlicher Keimungshemmstoffe.

Fritz Thümmel, geboren 1953 in Rosenheim, studierte von 1975 bis 1981 Biologie an der Universität München. Nach seiner Promotion 1984 bei W. Rüdiger mit einer Arbeit auf dem Gebiet des Phytochroms ging er für zwei Jahre zu D. P. S. Verma an die McGill University in Montreal. Er arbeitete dort über Noduline (Pflanzenproteine, die durch Symbiose mit Knöllchenbakterien induziert werden). Seit 1987 ist er Assistent am Botanischen Institut der Universität München.

ten des Tetrapyrrols werden beim Abbau nicht abgespalten, treten also auch in den Abbauprodukten auf. Zahlreiche Tetrapyrrole sind mit dieser Methode untersucht worden^[12].

Der oxidative Abbau des Phytochromchromophors wurde zunächst ohne Spaltung der kovalenten Bindung zum Protein ausgeführt^[10]. Dabei konnten nur die Abbauprodukte **3** und **6** aus den Ringen B und C identifiziert werden (Abb. 3). Für die Untersuchung der kovalenten Bindung an Ring A wurden Thioether wie **7** als Modellschubstanzen synthetisiert (Abb. 4a)^[13]. Die Spaltung der Thioether und der aus ihnen durch Chromsäureoxidation gebildeten Sulfone im alkalischen Medium wurde optimiert^[14]. So gelang es, das Abbauprodukt **2** aus Ring A des Tetrapyrrols in einer zwei-stufigen Reaktion freizusetzen und nachzuweisen (Abb. 4b). Dabei ergab sich über die röntgenographisch bestimmte Konfiguration der Modellsulfone **10** und **10a**^[15] und das Auftreten der *Z,E*-isomeren Abbauprodukte **2** bzw. **2a** (Abb. 4c) sogar ein Hinweis auf die absolute Konfiguration der Thioetherbindung im Phytochrom: Da bei der stereoselektiven

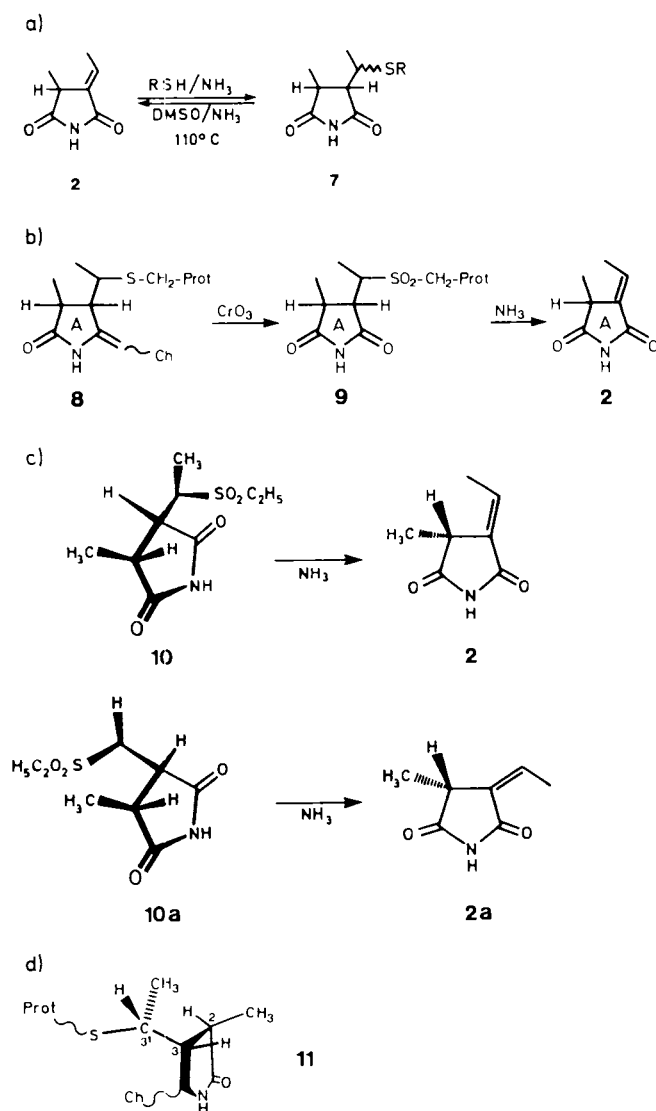
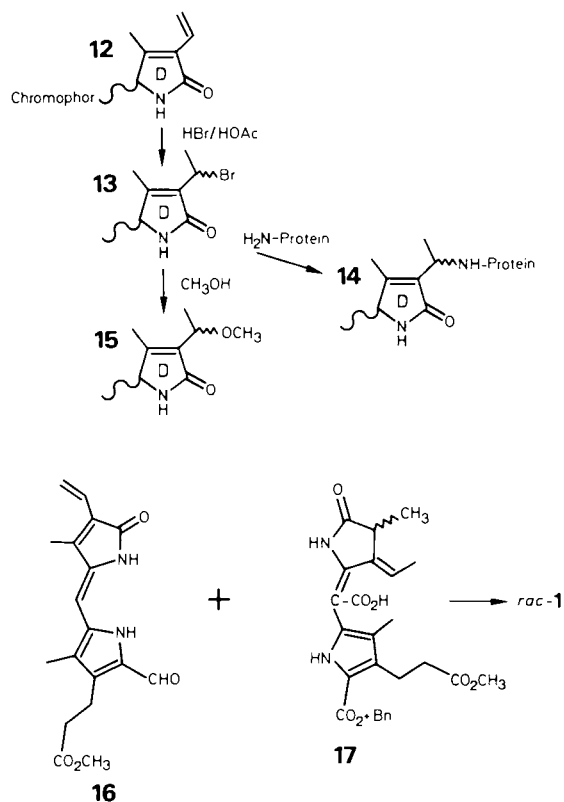


Abb. 4. Modellversuche und Abbaureaktionen zur Strukturermittlung von Ring A des Phytochromobilins. a) Modellsynthese von **7** aus **2** und Eliminierung des Thioethers **9** [13]. b) Gewinnung von **2** aus Phytochrom **8** über das protein-gebundene **9** [16]. c) Stereoselektivität der Eliminierungsreaktion der Sulfone **10** und **10a** zu den Olefinen **2** bzw. **2a** [14, 15]. d) Abgeleitete Konfiguration an Ring A des Tetrapyrrol-Chromophors [16]. DMSO = Dimethylsulfoxid. Prot = Protein, Ch = Chromophor.

Eliminierung aus Phytochrom nur **2** und nicht **2a** entsteht, wurde die 2*R*,3*R*,3'*R*-Konfiguration für Ring A und seine Substituenten im Phytochrom abgeleitet (**11** in Abb. 4d)^[16].

Die Abspaltung des intakten Tetrapyrrol-Chromophors vom Protein gelang unter den in Abbildung 4 angegebenen alkalischen Bedingungen nicht. Offensichtlich ist die Oxidation zum Succinimid und vor allem die Oxidation des Thioethers zum Sulfon die Voraussetzung für eine erleichterte Eliminierung. Dagegen gelang die Spaltung des Thioethers unter Erhaltung des Tetrapyrrols mit HBr in Eisessig (Schema 1)^[17]. Dabei ergab sich aber eine Komplikation an Ring D (**12** in Schema 1): Die Vinylgruppe addiert offensichtlich sehr leicht HBr; das entstehende Bromderivat **13** reagiert dann mit nucleophilen Gruppen des Proteins zu **14**. Diese Schwierigkeit wurde dadurch umgangen, daß zur Abspaltung des Chromophors nicht das intakte Chromoprotein verwendet wurde, sondern ein durch Proteolyse erhaltenes Chromopeptid, welches nur noch acht bis elf Aminosäuren neben dem Chromophor enthielt. Durch Aufarbeitung mit Methanol erhielt man dann hauptsächlich Verbindungen wie **15**, d. h. Methanoladdukte des Chromophors. Die Reaktionsschritte von **12** nach **15** wurden mit synthetischem **1** nachvollzogen^[17, 18]. Diese Reaktionsfolge und die Totalsynthese des racemischen **1** aus **16** und **17**^[18] darf als „klassisch-chemische“ Strukturaufklärung des Phytochromchromophors gelten.

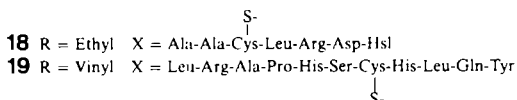
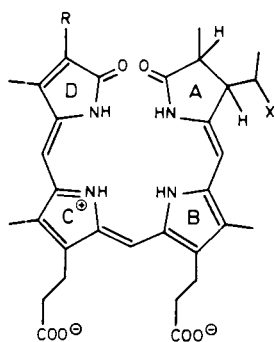


Schema 1.

Unabhängig von diesen Arbeiten in München untersuchten *Lagarias* et al. in Berkeley Chromopeptide aus Phycocyanin und Phytochrom mittels ¹H-NMR-Spektroskopie. Das Chromoprotein Phycocyanin ist ein Lichtsammelpigment der Photosynthese bei Cyanobakterien^[19]. Es enthält mehrere Phycocyanobilin-Chromophore (einen in der α-Unterein-

heit, zwei in der β -Untereinheit), die dem Phytochromobilin nahe verwandt sind. Da Phycocyanin leicht in großer Menge gewonnen werden kann, wurde es in mehreren Arbeitsgruppen als Modell für die Untersuchung von Phytochrom herangezogen. Lagarias et al. gingen bei ihren Untersuchungen von synthetischen Peptiden aus. Für die Zuordnung der ^1H -NMR-Signale der einzelnen Aminosäuren synthetisierten sie das Peptid Leu-Arg-Ala-Pro-His-(Ser,Cys)-His-Leu-Gln-Tyr, das bereits 1971 beschrieben worden war^[20]. Sie synthetisierten auch ein Heptapeptid, das einem Chromopeptid aus Phycocyanin entsprach.

Durch Vergleich mit dem bekannten ^1H -NMR-Spektrum von freiem Phycocyanobilin konnte zunächst der Strukturvorschlag für das gebundene Phycocyanobilin (**18** in Schema 2) bestätigt und die Thioetherbindung lokalisiert werden^[21].



Schema 2. Hsl = Homoserinlacton.

Die anschließende Untersuchung des Phytochrompeptids **19**^[22] ergab, daß sich beide Chromophore lediglich im Substituenten R des Ringes D unterscheiden: Im Phytochromobilin liegt ein Vinyl-, im Phycocyanobilin dagegen ein Ethylsubstituent vor.

2.2. Die Chromophorstruktur in der Pfr-Form

Für die Photochemie des Phytochroms ist die Wechselwirkung des Chromophors mit dem nativen Protein essentiell, da sich weder die spektralen Eigenschaften von freiem Phytochromobilin noch von in der Pr-Form denaturiertem Phytochrom bei Belichtung ändern. Einige Autoren^[22, 23] vermuteten, daß sich bei der Photoumwandlung des Phytochroms die chemische Struktur des Chromophors nicht bleibend verändert, sondern sich nur die Wechselwirkungen mit dem Protein oder Bindungen zu Aminosäuren ändern sollten. Das wurde jedoch durch unsere Beobachtung widerlegt, wonach aus der Pfr-Form und der Pr-Form bei der Denaturierung mit Harnstoff^[24] oder bei der Proteolyse mit Pepsin^[25] Produkte mit verschiedenen spektralen Eigenschaften zu erhalten sind, sofern die Reaktionen im Dunkeln ausgeführt werden (Abb. 5). Die Produkte aus der Pfr-Form sind lichtempfindlich; sie gehen bei Belichtung sofort in die Produkte über, die aus der Pr-Form gewonnen werden können. Diese Lichtempfindlichkeit könnte der Grund dafür sein, daß anderen Autoren^[20] der Unterschied zwischen Pr- und

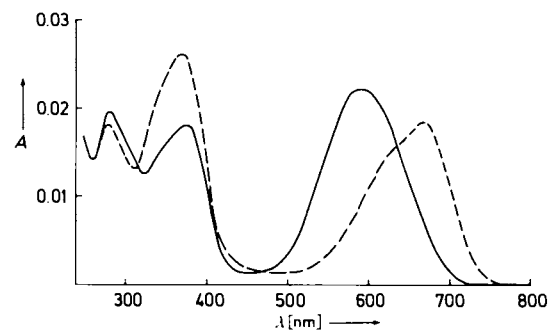


Abb. 5. Absorptionsspektrum des Chromopeptids aus Pfr in 1proz. wäßriger Ameisensäure. Das Spektrum wurde zunächst nach chromatographischer Isolierung des Peptids im Dunkeln (---) und dann nach 10 s Belichtung mit Weißlicht (—) aufgenommen. Das zweite Spektrum ist identisch mit dem Spektrum des Pr-Peptids (nach [28]).

Pfr-Peptiden entgangen war. Der Unterschied ist nicht nur auf die spektralen Eigenschaften beschränkt: Pr- und Pfr-Peptide lassen sich chromatographisch voneinander trennen, obwohl sie aus den gleichen Aminosäuren zusammengesetzt sind. Der Unterschied muß also im Chromophor liegen. Da das Tetrapyrrol aus dem Pr- und Pfr-Peptid dieselben Oxidationsprodukte liefert^[25], sollte der Unterschied in den Methinbrücken lokalisiert sein, die beim Chromsäureabbau zerstört werden. Mehrere Modellverbindungen^[26] gaben die Verhältnisse nicht richtig wieder, da sie nicht die Lichtempfindlichkeit des Pfr-Peptids hatten. Als geeignete Modellreak-

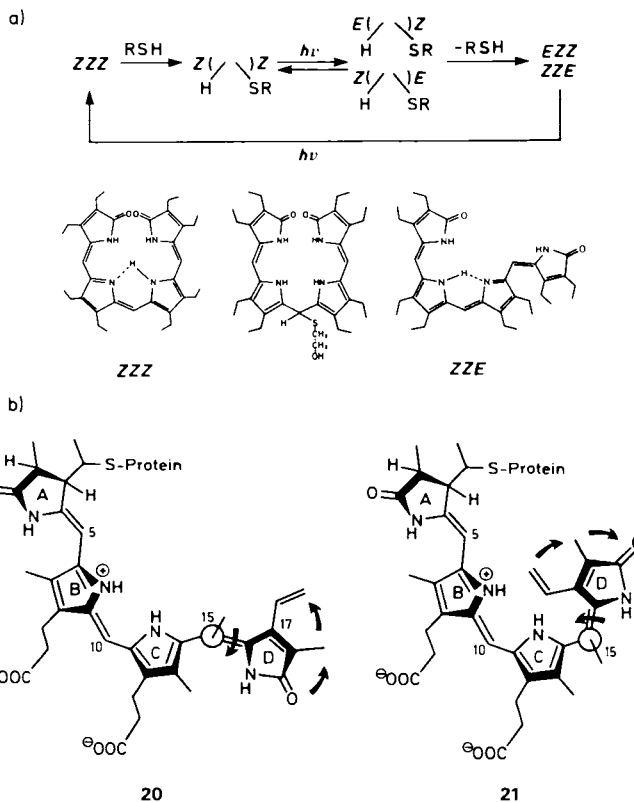


Abb. 6. Z,E-Isomerie bei offenkettigen Tetrapyrrolen. a) Gewinnung eines E-konfigurierten Bilatriens nach [27] am Beispiel des Octaethylbiliverdins. b) Struktur des Phytochromobilins in der Pr-Form **20** und in der Pfr-Form **21**. Die Konformation **20** entspricht der durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten Konformation des Phycocyanobilins im nativen Phycocyanin [54]. Durch Pfeile ist die Verschiebung von Ring D durch Conrotation der C14-C15- und C15-C16-Bindungen von **20** (Z,syn) nach **21** (E,anti) und zurück angedeutet (vgl. auch Abschnitt 2.3).

tion erwies sich schließlich die *Z,E*-Isomerisierung von Tetrapyrrolen, die nach einer Methode von Falk et al. (Abb. 6a)^[27] auch bei Chromopeptiden aus Phycocyanin und Phytochrom ausgeführt werden konnte^[28]. Die Isomerisierung findet beim Pfr-Peptid nach ¹H-NMR-spektroskopischen Befunden an der C15-C16-Doppelbindung statt (Abb. 6b)^[29]. Damit kann dem Pr-Chromophor die 5*Z*,10*Z*,15*Z*-Konfiguration **20** und dem Pfr-Chromophor die 5*Z*,10*Z*,15*E*-Konfiguration **21** zugeordnet werden.

Ein möglicher Einwand gegen diese Schlußfolgerung ist, daß die 15*E*-Konfiguration ein Artefakt der Proteolyse von Pfr sein könnte. Hintergrund dieser Überlegung ist z. B. die beachtliche Verschiebung des langwelligen Absorptionsmaximums von 730 nm nach 600 nm bei der Proteolyse (vgl. Abb. 1 und 5). Auf diese spektrale Verschiebung wird in Abschnitt 2.3 eingegangen. Der Einwand berücksichtigt jedoch nicht, daß das 15*E*-Isomer in exergonischer Reaktion in das 15*Z*-Isomer übergeht (ΔG° beträgt mindestens -20 kJ mol^{-1} ^[30]). Die umgekehrte Reaktion ist mit freiem Phytochromobilin nicht möglich. Das hängt mit der Raumerfüllung der β -Substituenten zusammen, die nur bei *E*-Isomeren zu einem beträchtlichen Torsionswinkel, d. h. zu einer partiellen Entkopplung des π -Systems und damit zu einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsbanden führt. Bei den an N21 und N24 methylierten Bilatrienen tritt aufgrund ähnlicher sterischer Hinderung eine Torsion sowohl in der *Z*- als auch in der *E*-Konfiguration auf; dementsprechend verläuft hier die Photoisomerisierung ($Z \rightleftharpoons E$) in beiden Richtungen zu einem meßbaren Gleichgewicht, z. B. bei einem 21,24-Dimethylbilatrien zu *Z,Z*,*Z* \rightleftharpoons *E,Z*,*Z* \rightleftharpoons *E,Z*,*E*^[31].

Unterschiede zwischen nativem Pr und Pfr wurden nun auch durch Resonanz-Raman-Spektroskopie^[32] und SERSS (Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering Spectroscopy)^[33] bestimmt. In beiden Fällen wurden die gemessenen Unterschiede im Sinn einer 15*Z*-Konfiguration des Chromophors in der Pr-Form und einer 15*E*-Konfiguration des Chromophors in der Pfr-Form interpretiert und somit die bereits vorliegenden Daten und Schlußfolgerungen bestätigt. Differenz-Fourier-Transform(FT)-IR-Spektren^[34] zeigen zumindest Ähnlichkeiten zwischen *Z,E*-isomeren Modellchromophoren und den beiden Phytochromformen. Nach den IR-Spektren ist der Chromophor sowohl in der Pr- als auch in der Pfr-Form protoniert.

Die *Z,E*-Isomerisierung des Chromophors wurde von uns bereits 1985 als mögliche photochemische Primärreaktion des Phytochroms diskutiert^[35]. Eine *Z,E*-Isomerisierung des Chromophors Retinal wird auch beim Sehpigment des Menschen und der Säuger als photochemische Primärreaktion angesehen. Durch Konvergenz der Evolution scheint demnach für chemisch ganz verschiedene Chromophore (beim Phytochrom ein Tetrapyrrol, beim Rhodopsin ein Isoprenoid) dasselbe Prinzip verwirklicht zu sein: Die eigentliche Photoreaktion besteht in der Isomerisierung einer C-C-Doppelbindung, die, ausgehend von einem angeregten Zustand, nur eine minimale Aktivierungsenergie benötigt. Die Rückreaktion im Dunkeln ist aufgrund der höheren thermischen Aktivierungsenergie für die Isomerisierung (beim Tetrapyrrol ca. 108 kJ mol^{-1} ^[30]) blockiert, so daß ein stabiles Photoprodukt entsteht. Aufgrund von Wechselwirkungen mit dem Protein folgen dann schrittweise Dunkelreaktionen, deren Intermediate man sowohl beim Rhodopsin als auch beim Phytochrom beobachten kann.

2.3. Intermediate

Als Intermediate bezeichnet man Relaxationsprodukte auf den Wegen $\text{Pr} \rightarrow \text{Pfr}$ oder $\text{Pfr} \rightarrow \text{Pr}$, die sich anhand ihrer Absorptionsspektren voneinander unterscheiden lassen. Das Absorptionsverhalten linearer Tetrapyrrole kann man durch sehr viele verschiedenartige Faktoren verändern^[36]; beim Phytochrom kommen dafür Wechselwirkungen des Apoproteins mit Phytochromobilin in Betracht. Es ist auffällig, daß sowohl bei Phytochrom als auch bei Rhodopsin diskontinuierliche Änderungen der spektralen Eigenschaften zu beobachten sind, so daß einzelne Intermediate deutlich voneinander abgrenzbar sind. Auf dem Weg von Pr nach Pfr sind mindestens vier^[37], auf dem Weg von Pfr nach Pr mindestens zwei Intermediate zu erkennen^[38]. Das Reaktionsschema der Photoumwandlung (Abb. 7) wurde zunächst aus Ab-

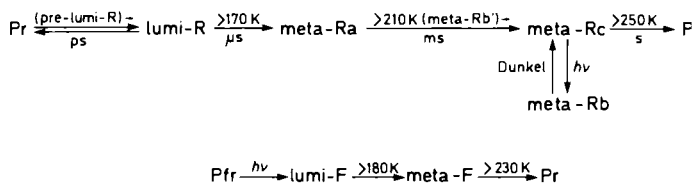


Abb. 7. Schematische Wiedergabe der Photoumwandlung der beiden Phytochromformen ineinander über mehrere Intermediate (nach [38], ergänzt). Die angegebenen Temperaturen sind Mindestwerte für die einzelnen Relaxationsschritte, die Zeiten geben die Größenordnung der Relaxationszeiten bei Raumtemperatur an.

sorptionsmessungen bei tiefen Temperaturen abgeleitet, bei denen die einzelnen Intermediate „eingefroren“ wurden (Tabelle 1). Für die Absorptionsmessungen war ein klares Glas erforderlich, welches aus Pufferlösung mit 66% Glycerin erhalten wurde. Alle Daten in Abbildung 7 und Tabelle 1 beziehen sich auf dieses Lösungsmittelgemisch. So erhält man unterhalb 170 K durch Belichtung von Pr nur lumi-R (als Intermediat mit $\lambda_{\text{max}} \approx 700 \text{ nm}$, von einigen Autoren I_{700} genannt); dieses geht beim Erwärmen ohne weitere Belichtung über die nachfolgenden Intermediate schließlich in Pfr über. Bei entsprechend höherer Temperatur erhält man sofort die Intermediate meta-Ra oder meta-Rc; meta-Rb entsteht im nativen Phytochrom nur im Dauerlicht und relaxiert im Dunkeln zu meta-Rc. Mit fortschreitender Proteolyse zu Phytochromfragmenten der Größe 114/118 kDa, 60 kDa, 39 kDa nimmt der Anteil an meta-Rb immer mehr zu. Viele

Tabelle 1. Elektronenspektroskopische Daten von Phytochromformen, gemessen bei -140°C in Glycerin-Pufferlösung (nach [38]). f_1 und f_2 = relative Oszillatorstärken der ersten bzw. zweiten Absorptionsbande.

Phytochromform	erste Absorptionsbande		zweite Absorptionsbande		f_2/f_1
	λ_{max} [nm]	ϵ [dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{max} [nm]	ϵ [dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹]	
Pr	667	140 000	380	50 000	1.10
Pfr	741	119 000	403	41 000	1.10
a) Weg Pr \rightarrow Pfr					
lumi-R	693	190 000	384	47 000	0.86
meta-Ra	663	86 000	386	52 000	1.37
meta-Rb (P ₆₀)	665	40 000	380	57 000	2.29
meta-Rc	725	80 000	387	50 000	1.45
b) Weg Pfr \rightarrow Pr					
lumi-F	673	105 000	388	44 000	1.02
meta-F	660	133 000	381	55 000	1.15

Autoren fassen die Produkte meta-Ra, meta-Rb und meta-Rc zum Intermediat Ibl (= gebleichtes Phytochrom) zusammen, jedoch sind durchaus unterschiedliche Absorptionsspektren erkennbar (Tabelle 1).

Dieselben (oder zumindest sehr ähnliche) Intermediate treten auch bei Raumtemperatur auf und können durch zeit-aufgelöste Elektronenspektroskopie untersucht werden^[39]. Dabei wurden die Intermediate pre-lumi-R^[40] und meta-Rb^[137] beschrieben, die von anderen Autoren bisher nicht gefunden worden waren. Die in Abbildung 7 aufgeführten Zeiten geben nur die Größenordnungen für die Dauer der Übergänge in die verschiedenen Intermediate an. Sowohl die Pr-Fluoreszenz^[41, 42] als auch Absorptionsänderungen der frühen Intermediate^[43] lassen sich nur mit mindestens zwei parallelen, aber kinetisch unterscheidbaren Komponenten erklären. Allerdings können komplexe Kinetiken bei Absorptionmessungen auch auftreten, wenn aufeinanderfolgende Intermediate sich in ihrer Absorption stark überlagern^[37, 44].

Über die Chemie der Intermediate liegen bisher noch keine direkten experimentellen Befunde vor. Folgende allgemeine Überlegungen lassen sich anstellen: Die photochemische Primärreaktion, die selbst in einer Eismatrix unter 170 K möglich ist, muß in einer Proteintasche ablaufen, die den Chromophor von außen abschirmt. Gegenüber dem Angriff chemischer Agentien von außen ist der Chromophor in der Pr-Form noch besser abgeschirmt als in der Pfr-Form^[45]. Die Proteintasche muß groß genug sein, um z. B. die *Z,E*-Isomerisierung des Chromophors zu ermöglichen; aber nicht so groß, daß die Isomerisierung völlig frei, d. h. ohne nennenswerte Wechselwirkung mit der Proteinumgebung abläuft. Eine vollständige Rotation von Ring D mit zwischenzeitlich großem Raumbedarf senkrecht zur Ringebene ist – zumindest im Pikosekundenbereich – sehr schlecht vorstellbar. Den geringsten Raumbedarf hat eine conrotatische Bewegung der C14-C15-Einfachbindung mit der C15-C16-Doppelbindung (Abb. 6). Dabei verschiebt sich Ring D gegenüber dem Rest des Moleküls nur innerhalb der Ringebene, ohne eine Rotation auszuführen. Dieses von uns bereits 1985 vorgestellte Modell^[135] wird durch neue Resonanz-Raman-Untersuchungen gestützt^[32]: Danach nimmt der Chromophor in der Pr-Form die C15-*Z*,*syn*- und in der Pfr-Form die C15-*E*,*anti*-Konformation ein.

Diese Bewegung müßte im Pikosekundenbereich nur bis über die Aktivierungsschwelle für die *Z,E*-Isomerisierung erfolgen; das Tetrapyrrol würde dann anschließend weiter in der durch die Pfeile angegebenen Richtung relaxieren. Falls die Proteintasche eng genug ist, müßte das Protein dieser Relaxation folgen. Die Konsequenz wären die Konformationsänderungen, die über die Intermediate letztlich zum physiologisch aktiven Pfr führen. Dabei könnten neben diesen rein sterischen aber auch elektrostatische Wechselwirkungen des protonierten, positiv geladenen Chromophors mit geladenen Aminosäureresten sowie Wechselwirkungen über Wasserstoffbrücken für Konformationsänderungen des Proteins, die letztlich durch den Chromophor erzwungen werden, eine Rolle spielen.

Beim Vergleich der Oszillatorstärken (Tabelle 1) fällt auf, daß der Quotient f_2/f_1 beim Intermediat meta-Rb besonders groß ist. Dieser hohe Wert entspricht eher einem protein-freien Tetrapyrrol in cyclisch-helicale Konformation, während Pr, Pfr und die anderen Intermediate aufgrund der Oszillatorstärken eher in durch das Protein gestreckten

Konformationen vorliegen sollten. Falk hat zwar darauf hingewiesen^[36], daß aufgrund vielfältiger Einflüsse auf die Elektronenspektren von offenkettigen Tetrapyrrolen solche Daten allein keine Aussagen über Konformationen ermöglichen; eine besonders geringe Wechselwirkung zwischen Chromophor und Protein in belichtetem Phytochrom, in dem bevorzugt meta-Rb akkumuliert wird, läßt sich jedoch auch aus anderen Daten ableiten: Der Chromophor und/oder seine Bindungsstelle sind während der Belichtung für chemische Agentien besser zugänglich als im Dunkeln in der Pr- oder der Pfr-Form^[45, 46].

Aus den Daten der Tabelle 1 geht auch hervor, daß die charakteristische langwellige Absorptionsbande der Pfr-Form erst bei den letzten Relaxationsschritten auftritt, d. h. mit der photochemischen Primärreaktion direkt nichts zu tun hat. Daß die *Z,E*-Isomerisierung bereits vor Auftreten der Pfr-Bande erfolgt, konnten wir durch Säure-Denaturierung des Intermediats meta-Rb und Aufnahme der Elektronenspektren nachweisen^[47]. In einem 39 kDa-Fragment, welches noch photoreversibel ist und prinzipiell dieselben Intermediate bildet wie Pr, fehlt die langwellige Absorption vollständig^[48]. Offensichtlich ist in diesem Fragment der Teil der Peptidkette, der zur Erzeugung der langwelligen Absorptionsbande mit dem Chromophor wechselwirken muß, nicht vorhanden. Ursache einer solchen Wechselwirkung könnte eine Punktladung sein, die eine bathochrome Verschiebung bewirken kann, sofern sie in eine definierte Lage zum π -Elektronensystem gebracht wird^[49].

3. Untersuchungen am Protein

3.1. Struktur der Domänen

Durch Elektronenmikroskopie und Röntgenkleinwinkelstreuung konnte die Gestalt des Phytochrom-Moleküls nur in groben Umrissen erkannt werden (Abb. 2); biochemische Untersuchungsmethoden lieferten ergänzend Hinweise auf die Struktur der Domänen des Phytochroms. Nach partieller Proteolyse, elektrophoretischer Trennung der Fragmente und deren Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern oder monospezifischen Antisera^[50, 51] ergab sich das Bild einer relativ kompakten, chromophorhaltigen, 64 kDa-großen Domäne, die gegenüber einem weiteren proteolytischen Abbau relativ inert ist. Diese Domäne liegt in der *N*-terminalen Hälfte der Peptidkette (Abb. 8a). Sie entspricht dem zu Beginn der Phytochromforschung isolierten „kleinen“ Phytochrom. Auf dieser Domäne sind die Peptidregionen lokalisiert, die direkt mit dem Chromophor wechselwirken und damit die Photochromie verursachen. Dabei ist der Bereich der Aminosäuren 65 bis 400 und 200 bis 400^[52, 53] für die spektralen Eigenschaften des Pr-Chromophors und der Bereich der Aminosäuren 420 bis 600^[53] für die langwellige Absorption des Pfr-Chromophors essentiell. Von den für die Wechselwirkung mit dem Tetrapyrrol essentiellen Aminosäuren in diesem Bereich sei Arginin-316 (fünf Reste *N*-terminal von chromophorbindenden Cystein-321) hervorgehoben, das in allen bisher bekannten Phytochromsequenzen konserviert ist und auch in allen Phycocyaninsequenzen an entsprechender Stelle gefunden wird. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung mit einer Propionsäure-Seitenkette

des Chromophors verursacht Arginin-316 (zusammen mit dem chromophorbindenden Cystein) im Phycocyanin eine gestreckte Konformation des Tetrapyrrols^[54]. Wir nehmen eine entsprechend gestreckte Konformation auch für den Phytochrom-Chromophor an (Abb. 6 b). Die C-terminale, chromophorfrem Domäne (ca. 55 kDa groß) ist dagegen durch Proteasen leicht angreifbar und wird daher rasch zu kleinen, schlecht definierten Peptiden abgebaut. Besonders schnell wird aber die Verbindung zwischen der chromophorhaltigen und der chromophorfreien Domäne („hinge region“) durch Proteasen angegriffen. Ein proteolytischer Angriff kann auch an einer ganzen Reihe von Stellen im äußersten N-terminalen Bereich des Phytochroms, der ca. 10 kDa umfaßt, erfolgen (Abb. 8 a).

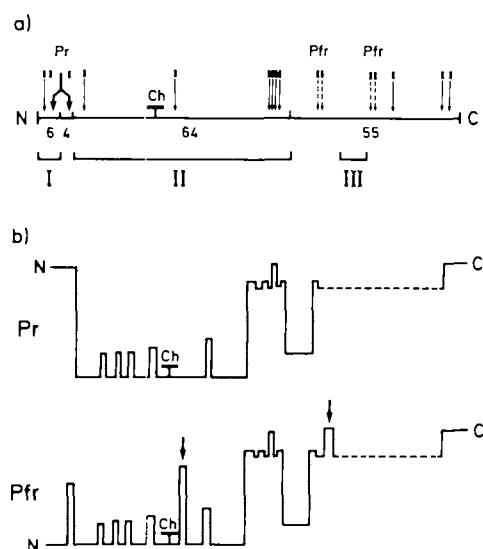


Abb. 8. Domänenstruktur von Phytochrom A aus etioliertem Hafer. Die Peptidkette ist als durchgehende Linie vom N- (N) zum C-Terminus (C) angegeben. Ch = Tetrapyrrol-Chromophor. a) Die römischen Ziffern bezeichnen drei Klassen von Antikörpern, deren Epitope in den angegebenen Bereichen lokalisiert wurden. Die arabischen Zahlen geben die Größe der entsprechenden Domänen in kDa an (nach [50]). Die Pfeile kennzeichnen Stellen des proteolytischen Angriffs bei der partiellen Proteolyse. Pfr = bevorzugt in der Pfr-Form, Pr = bevorzugt in der Pr-Form (nach [51]). b) Durch kinetische Messungen der partiellen Proteolyse erhaltenes Bild der Konformation der Peptidkette in der Pr- und der Pfr-Form. Exponierte Teile der Peptidkette, die frühe Spaltstellen der Proteolyse enthalten, sind nach oben gezeichnet. Nach unten gezeichnete, im Inneren des globulären Proteins liegende Bereiche der Peptidkette enthalten potentielle Spaltstellen der Proteolyse, die erst sehr spät angegriffen werden. Der gestrichelte Bereich der Peptidkette wird rasch und häufig gespalten und ergibt daher keine definierten Fragmente. Zwei durch Pfeile gekennzeichnete Bereiche sind nur in der Pfr-Form exponiert (nach [54]).

Nach Aufklärung der Primärstruktur von Haferphytochrom (vgl. Abschnitt 4.1) war es möglich, durch Bestimmung der N-terminalen Sequenzen der Peptidfragmente diese innerhalb der Gesamtsequenz einzuordnen und damit die Angriffsorte der Proteasen auf die Aminosäuren genau zu bestimmen^[53, 55]. Da der N-Terminus der gesamten Peptidkette blockiert ist, kann ein Edman-Abbau nicht am Phytochrom direkt erfolgen. Durch massenspektrometrische Untersuchungen N-terminaler Peptide konnten Acetylserin als N-Terminus von Haferphytochrom ermittelt werden; das nach der DNA-Sequenz vor dem Serin stehende Methionin wird offensichtlich vor der Acetylierung abgespalten^[56]. Nach der Kinetik des proteolytischen Angriffs an bestimmten Schnittstellen lassen sich besonders exponierte Regionen der

Peptidkette von den im Inneren des Moleküls liegenden, gegen den proteolytischen Angriff besser geschützten Regionen unterscheiden (Abb. 8 b). Man erkennt den bevorzugten Angriff von Proteasen in der „hinge region“, nahe am C-Terminus und – nur in der Pr-Form – nahe am N-Terminus.

Der 6–10 kDa große, N-terminale Bereich der Peptidkette spielt eine besondere Rolle: Wird er durch Proteolyse entfernt^[57] oder durch Bindung von Antikörpern blockiert^[58], so wird das Absorptionsmaximum der Pfr-Form von 730 nm nach ca. 722 nm verschoben, die Dunkelreversion von Pfr nach Pr um mindestens den Faktor zehn erhöht, der Chromophor in der Pfr-Form empfindlicher gegenüber äußeren chemischen Einflüssen und das Circular dichroismus (CD)-Spektrum von Pfr im Bereich 200–230 nm dem Spektrum der Pr-Form angenähert. Es ist daher naheliegend, eine direkte Interaktion dieses Teils der Peptidkette mit dem Chromophor in der Pfr-Form anzunehmen^[59]; ein indirekter Einfluß dieser Region auf die Protein-Chromophor-Wechselwirkung kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Die C-terminale 55 kDa-Domäne ist nicht an Chromophor-Protein-Wechselwirkungen beteiligt; dagegen ist sie für die Dimerisierung von Phytochrom entscheidend. Bei der Gelchromatographie ergibt sich für Phytochrom eine scheinbare Molmasse von 320–360 kDa^[51], bei der Gleichgewichtszentrifugation von 253 kDa^[60]. Die Daten sprechen für ein Dimer von nichtglobulärer Gestalt (vgl. Abb. 2). Nach partieller Proteolyse wandern nur die Fragmente, die die C-terminale Domäne enthalten, bei der Gelchromatographie mit dem 2–3fachen Wert ihrer durch Natriumdodecylsulfat (SDS)-Gelelektrophorese bestimmten Molmasse; N-terminale, chromophorhaltige Fragmente zeigen bei Gelchromatographie und SDS-Gelelektrophorese dieselbe Molmasse^[60]. Auch Versuche zur Quervernetzung der Peptidketten mit Glutaraldehyd oder „Dimethylsuberimidat“ (Octandimidäuredimethylester)^[60] sprechen für Kontaktstellen der C-terminalen Domäne im Phytochromdimer. Das Modell des Phytochromdimers (Abb. 2) wurde zum Teil aus diesen Versuchen hergeleitet.

3.2. Unterschiede zwischen Pr und Pfr

Obwohl Konformationsänderungen des Proteins als Folge der Photoumwandlung bereits lange postuliert worden waren, treten deutliche Änderungen der Gestalt^[8] oder der Proteinkonformation^[61, 62] nicht auf. Selbst die aus der Messung des Circular dichroismus im UV abgeleitete Zunahme des α -Helix-Anteils um 3% bei der Photoumwandlung^[58, 59] ließ sich durch Differenz-FT-IR-Spektroskopie nicht bestätigen^[34]; wahrscheinlich trägt der Tetrapyrrol-Chromophor auch im UV-Bereich zum CD-Spektrum bei. Auch der Unterschied der Retentionszeiten von Pr und Pfr bei der Gelchromatographie, der zunächst als Formänderung des Moleküls gedeutet wurde^[51], geht auf andere Ursachen, vermutlich eine Veränderung der Oberflächenladung^[63], zurück.

Lokale Veränderungen der Oberflächenstruktur von Phytochrom bei der Photoumwandlung sind mit mehreren Methoden nachgewiesen worden. Dazu gehören z. B. die bevorzugte Phosphorylierung der Pr-Form im N-terminalen Bereich^[64], eine stärker negative Oberflächenladung der Pfr-Form, die mit der exponierten Lage von Aspartat- und Glutamatresten im Bereich der Aminosäuren 340–355 zusam-

menhängt^[63], die bessere Zugänglichkeit des Chromophors in der Pfr-Form^[45], Unterschiede in der Affinität verschiedener Antikörper zu Pr und Pfr^[58, 65], unterschiedlich exponierte aromatische Aminosäuren^[66] und Unterschiede bei der bereits im vorigen Abschnitt diskutierten partiellen Proteolyse. Wie in Abbildung 8b zu sehen, ist der N-terminale Bereich (ca. 10 kDa) in der Pr-Form der Proteolyse gut zugänglich, in der Pfr-Form dagegen nicht. Besonders auffällig sind zwei Bereiche um die Aminosäuren 354 und 753, die bevorzugt in der Pfr-Form zugänglich sind^[55]. Solche Regionen sind als potentielle Bestandteile eines „aktiven Zentrums“ an der Oberfläche der Pfr-Form von Interesse. Allerdings konnte ein aktives Zentrum oder eine damit zusammenhängende Funktion bisher nicht nachgewiesen werden.

3.3. Untersuchungen mit Antikörpern

Phytochrom ist wohl dasjenige pflanzliche Protein, das am eingehendsten mit monoklonalen Antikörpern abgetastet worden ist^[67]. Von den zahlreichen Untersuchungen seien hier nur einige herausgegriffen.

Phytochrom kann mit Antikörpern quantitativ bestimmt werden. Als eine Anwendung sei hier die Bestimmung der Verteilung von Phytochrom innerhalb einer Keimpflanze genannt (Abb. 9)^[67, 68]. Die Konzentration des Photorezeptor

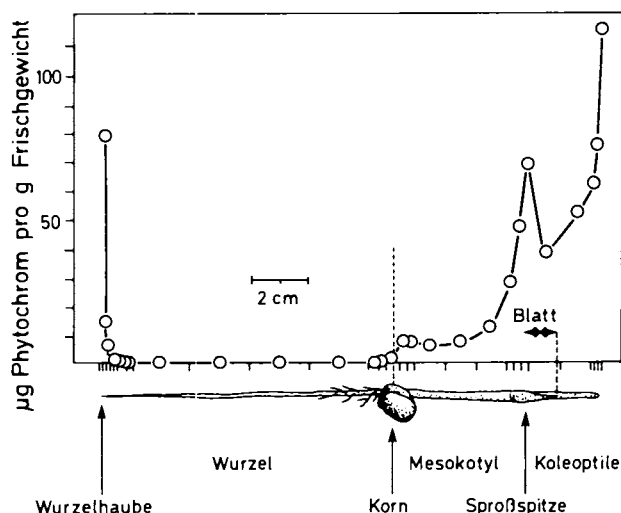


Abb. 9. Verteilung von Phytochrom in einem etiolierten, fünf Tage alten Maiskeimling. Die Pflanze wurde in Sektionen geteilt, die dann einzeln extrahiert und im Extrakt mit Antikörpern auf Phytochrom untersucht wurden. Die Abschnitte auf der Abszisse geben die Länge der jeweils analysierten Sektionen an (nach [68]).

tors ist am höchsten in der Koleoptil- und Sproßspitze und in der Wurzelhaube. Eine derartige Verteilung war auch spektralphotometrisch^[69] und immunocytochemisch^[70] gefunden worden. Bei der Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung von Phytochrom in etiolierten Keimpflanzen ergab sich eine gleichmäßige Verteilung der Pr-Form im Cytoplasma, aber eine rasche Bindung an diskrete, bis heute nicht identifizierte Stellen der Plasmamembran (Plasmalemma) nach Umwandlung in die Pfr-Form^[71]. In grünen, niederen Pflanzen, z. B. dem Farn *Adiantum*^[72] und der Alge *Mougeotia*^[73] scheint Phytochrom aber permanent in dichroitischer Anordnung in oder nahe der Plasmamembran lokalisiert zu sein.

Es ist bereits lange bekannt, daß das photoreversible Phytochrom etiolierter Pflanzen bei Belichtung bis auf einen kleinen Rest (1–5% der Anfangsmenge) verschwindet^[11]. Mit Antikörpern wurde festgestellt, daß nicht nur der Chromophor, sondern auch das Phytochrom-Protein dabei abgebaut wird^[74]. Das verbleibende Phytochrom erwies sich als immunologisch heterogen^[75–78]. Der in etiolierten Pflanzen vorherrschende Photorezeptor wurde zunächst Phytochrom Typ I genannt; inzwischen hat sich die von Molekularbiologen eingeführte Bezeichnung Typ A (*phyA*) durchgesetzt. Das in belichteten, grünen Pflanzen vorherrschende Phytochrom (zunächst Typ II genannt^[79]) erwies sich ebenfalls als heterogen^[80]. Wahrscheinlich handelt es sich um *phyB* und *phyC* (vgl. Abschnitt 4), obwohl Unterschiede durch posttranslationale Modifikationen bisher nicht ausgeschlossen werden können.

3.4. Verbreitung von Phytochrom im Pflanzenreich

Das operationale Kriterium für die Anwesenheit von Phytochrom ist ein durch Hellrot induzierbarer physiologischer Effekt, der durch Dunkelrot umgekehrt werden kann. Aufgrund derartiger Beobachtungen bei zahlreichen Pflanzen wird angenommen, daß Phytochrom in höheren Pflanzen (Samenpflanzen) generell, in niederen Pflanzen (Farne, Moose, Algen) dagegen nur sporadisch vorkommt. Der direkte Nachweis von Phytochrom durch Isolierung oder partielle Reinigung und Nachweis der Proteinbande gelang ohnehin erst in wenigen Fällen, so z. B. für etiolierte Keimpflanzen von Hafer, Roggen, Erbse, Zucchini, Reis^[81, 82] und für einige grüne Pflanzen wie Hafer^[75, 78], Erbse^[76], das Moos *Atrichum undulatum*^[83], die Grünalgen *Mesotaenium caldariorum*^[84] und *Chaetomorpha linum*^[85].

Mit monoklonalen Antikörpern, die gegen Phytochrom aus etioliertem Hafer^[65, 87], Mais^[65], Roggen oder Erbse^[86, 88] gerichtet sind und die eine gute Kreuzreaktion mit dem Phytochrom anderer Pflanzen zeigen, wurde die Verbreitung von Phytochrom untersucht (Tabelle 2). Auch hier ergab sich eine generelle Verbreitung bei den untersuchten höheren Pflanzen, während viele der untersuchten niederen Pflanzen eine negative Reaktion zeigten. Dies muß nicht notwendigerweise die Abwesenheit von Phytochrom bedeuten. Falls aber Phytochrom vorhanden wäre, muß die Peptidkette so verschieden

Tabelle 2. Nachweis von Phytochrom durch „Western Blotting“ [a].

Abteilung der Pflanzen	N [b]	Lit.
Samenpflanzen		
Monokotyledonen	17	[86–89]
Dikotyledonen	21	[86–89]
Farne	3	[89]
Moose	5	[83, 86, 89]
Rotalgen	2	[85, 90]
Braunalgen	2	[85, 90]
Grünalgen	7	[83, 85, 86, 90]

[a] Pflanzenextrakte wurden durch SDS-Gelelektrophorese getrennt, die Proteine auf eine geeignete Membran (meist Nitocellulose) transferiert und mit monoklonalen anti-Phytochrom-Antikörpern behandelt. Als positives Ergebnis galt die spezifische Reaktion einer Proteinbande im Größenbereich 120–130 kDa. Die monoklonalen Antikörper waren gegen Phytochrom aus Hafer [85–87, 89, 90], Mais [83, 85, 89, 90], Roggen [88] oder Erbse [86, 88] gerichtet. Epitope der kreuzreagierenden Antikörper, soweit bisher ermittelt, liegen entweder im N- oder C-terminalen Bereich der Peptidkette. [b] Zahl der Spezies, in denen Phytochrom bisher nachgewiesen wurde.

von derjenigen des Phytochroms aus höheren Pflanzen sein, daß sie kein von den verwendeten Antikörpern erkennbares Epitop enthält. Interessant ist das Vorkommen von Phytochrom bei einigen Algen, bei denen bisher keine phytochromabhängige physiologische Reaktion bekannt war. Bei der Grünalge *Ulvax rigida* fanden wir in anschließenden Versuchen eine phytochromabhängige Proteinsynthese, die wahrscheinlich mit der Phytochrom-regulierten Aufnahme und Reduktion von Nitrat zusammenhängt^[91, 92].

4. Phytochromgene

4.1. Struktur der Phytochromgene, Phylogenie

Informationen über die Primärstruktur von großen Proteinen erhält man am einfachsten durch die Analyse der Gene, die für die entsprechenden Proteine codieren. Das *phyA*-Protein aus Hafer war das erste Phytochrom-Molekül, dessen Primärstruktur in der Arbeitsgruppe von *Quail* auf diese Weise aufgeklärt wurde^[93, 94].

Mit den Informationen aus dieser grundlegenden Arbeit war es nun möglich, weitere Phytochromgene zu isolieren und zu charakterisieren. Durch heterologes Screening konnten cDNA-Klone, die für *phyA* aus Zucchini^[95], Mais^[96] und *Arabidopsis thaliana*^[97] codieren, identifiziert werden. Mit synthetischen Oligonucleotidprimern gelang es *Kay* et al.^[98], cDNA-Klone, die für Reisphytochrom codieren, zu isolieren. Unabhängig davon wurde von *Tomizawa* et al.^[99] ein cDNA-Klon für Erbsen-*phyA* aus einer Expressionsbank durch Immunscreening mit einem spezifischen Antikörper identifiziert.

Wiederum waren es *Quail* et al., denen es als erste gelang, die Primärstruktur von lichtstabilem, „grünem“ Phytochrom der höheren Pflanzen aufzuklären. Mit einer *phyA*-DNA-Sonde aus Zucchini „screenen“ sie ein cDNA-Bank, hergestellt mit poly(A)⁺-RNA aus grünen *A. thaliana*-Blättern, bei niedriger Stringenz und konnten so die entsprechenden cDNA-Klone (für *phyB* und *phyC*) isolieren^[97]. Weitere Gene, die für lichtstabiles Phytochrom codieren, sind inzwischen auch aus Reis, Erbse und Tabak isoliert worden^[100]. Ein Fragment für ein viertes Phytochromgen aus *A. thaliana* (*phyD*) wurde ebenfalls kloniert und sequenziert^[101, 102].

Thümmler et al.^[103a] gelang es vor kurzem, erstmals aus einer niederen Pflanze, dem Laubmoos *Ceratodon purpureus*, dessen Pfr-abhängiger Phototropismus gut untersucht ist^[103b], Phytochromsequenzen (*phyCer*) mit der Polymerase-Kettenreaktion zu erhalten. Dazu wurden Oligonucleotidprimer verwendet, die gegen konservierte DNA-Sequenzen im Chromophorbindungsereich der Phytochromgene der höheren Pflanzen (siehe Tabelle 3) gerichtet sind. Inzwischen wurde auch aus dem Farn *Selaginella martensii* ein Phytochrom-cDNA-Klon durch Immunscreening einer λ gt11-Expressionsbank mit dem kreuzreagierenden Antikörper Z3B1, der gegen Maisphytochrom gerichtet ist, isoliert^[104].

Für *phyA* aus Hafer^[107], Reis^[98], Mais^[96], Erbse^[105] und für *phyCer* aus dem Moos *Ceratodon*^[106, 108] wurde die Primärstruktur der entsprechenden Gene ermittelt. In Abbildung 10 ist die Organisation dieser Gene schematisch wiedergegeben. Vom Zucchini-phytochrom und den beiden lichtstabilen Phytochromtypen *phyB* und *phyC* aus *A. thaliana* ist nur

Tabelle 3. Prozentualer Anteil identischer Aminosäuresequenzen bei verschiedener Phytochrom-Proteinen. Die von den Exons I bis IV codierten Peptidbereiche (Abb. 10) sind getrennt aufgelistet [a].

		Mais		Erbse		A		B		Ara C		D		Selag		Cerat	
Hafer	I	90	69	69	52	55	53	[b]	57								
	II	82	60	58	47	43	[b]	55	47								
	III	85	49	45	29	33	[b]	33	[c]								
	IV	79	56	60	46	39	[b]	43	[c]								
Mais	I	-	70	70	53	56	56	[b]	58								
	II		59	57	46	43	[b]	51	47								
	III		44	40	27	30	[b]	29	[c]								
	IV		57	57	36	34	[b]	37	[c]								
Erbse	I			84	56	58	55	[b]	60								
	II			77	52	45	[b]	62	50								
	III			63	31	35	[b]	40	[c]								
	IV			67	40	41	[b]	47	[c]								
Ara A	I				56	58	63	[b]	61								
	II				52	44	[b]	60	47								
	III				30	37	[b]	41	[c]								
	IV				44	41	[b]	49	[c]								
Ara B	I					57	64	[b]	61								
	II					46	[b]	64	49								
	III					42	[b]	41	[c]								
	IV					52	[b]	60	[c]								
Ara C	I						53	[b]	58								
	II						[b]	46	38								
	III						[b]	40	[c]								
	IV						[b]	51	[c]								
Ara D [d]	I												[b]				64
Selag [e]	I																[b]
	II																53
	III																[c]
	IV																[c]

[a] Die paarweisen Homologievergleiche wurden mit dem FASTA-Programm durchgeführt [119]. Abkürzungen: Selag = *S. martensii*, Cerat = *C. purpureus*, Ara = *Arabidopsis thaliana*. [b] Die abgeleiteten Polypeptidsequenzen überlappen sich nicht in den entsprechenden Bereichen. [c] Das FASTA-Programm findet innerhalb der vorgegebenen „cutoff“-Einstellung keine Homologie zwischen den entsprechenden Aminosäuresequenzen. [d] Für *phyD* ist nur ein rund 500 Basenpaare langes DNA-Fragment bekannt, das in Exon I lokalisiert ist. [e] Das Phytochromgen aus *S. martensii* ist nur im 3'-terminalen Bereich sequenziert, und zwar ab ca. 130 Basenpaare nach dem Beginn von Exon II. Literaturangaben für die Phytochromgene: Mais [96], Erbse [105], Ara A, B, C = *A. thaliana phyA*, *phyB* und *phyC* [97], Ara D = *A. thaliana phyD* [102], Selag [104], Cerat [108].

die cDNA-Sequenz bekannt. Von *S. martensii* wurde bislang nur eine partielle, 3'-terminale cDNA-Sequenz veröffentlicht.

Wie Abbildung 10 zeigt, bestehen die Phytochromgene aus mehreren Exons, die durch kürzere Introns unterbrochen sind. Das Hafer-*phyA*-Gen beispielsweise ist 5.94 Kilobasen (KB) lang und besteht aus sechs Exons und fünf Introns. Als Besonderheit weisen die *phyA*-Gene auch in den 5'- und 3'-flankierenden, nicht translatierten Genabschnitten längere Intronsequenzen auf. In Reis ist das 5'-terminale Intron sogar 2585 Basenpaare lang und ist damit eines der längsten Introns, die bisher in einem Pflanzengen gefunden wurden. Im Gegensatz zu den Phytochromgenen der monokotylen Pflanzen fehlt dem Erbsengen das 3'-terminale Intron vollständig. Damit besteht das Erbsenphytochromgen nur aus fünf Exons und vier kurzen Introns. Im Falle des Maisphytochromgens wurde nicht überprüft, ob ein 3'-terminales Intron vorliegt. In den *phyA*-Genen von Reis und Hafer ist die Nucleotid-Sequenz am Übergang von Exon 5 zu Intron 5 (5'TCAAATG/gtat 3') konserviert, und das Auftreten dieser Sequenz an entsprechender Stelle im Maisphytochromgen ist ein starker Hinweis auf die Existenz dieses Introns auch im Maisgen. Das *phyCer*-Gen ist deutlich anders aufgebaut als die *phyA*-Gene. Im Gegensatz zu diesen besteht es nur aus zwei großen codierenden Exons, die ein kurzes zentrales Exon

einschließen. Ob sich auch im *phyCer* in den 5'- und 3'-flankierenden, nicht translatierten Genabschnitten Introns befinden, ist nicht bekannt. Die *phyA*-Gene in Hafer, Mais, Reis und Erbse enthalten Sequenzmotive, die in den Promotorbereichen vieler eukaryotischer Gene gefunden werden und die für die Expressionsregulation dieser Gene eine wichtige Rolle spielen. Dazu gehören ein TATA-Motiv, ein CCAAT-Motiv und ein GC-Element^[109]. Ebenso weisen diese Gene (einschließlich des *S. martensii*- und des *C. purpureus*-Gens) AA-TAAA- oder davon abgeleitete Motive in den 3'-nicht translatierten Bereichen auf, die für die Polyadenylierung der entsprechenden Transkripte verantwortlich sind.

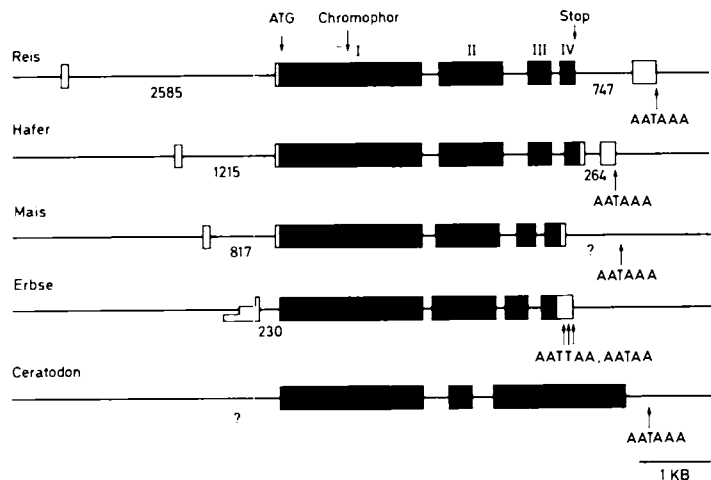


Abb. 10. Vergleichende schematische Darstellung der Phytochromgene von Reis, Hafer, Mais, Erbse und *C. purpureus*. Intron- und flankierende Sequenzen; die Zahlen geben die Längen des Introns in den nicht translatierten Exons in Basenpaaren (Bp) an; □ nicht translatierte Exonsequenzen; ■ translatierte Exonsequenzen I, II, III und IV; Literaturangaben für die entsprechenden Gene: Reis [98], Hafer [107], Mais [96], Erbse [105] und *C. purpureus* [108].

Die Gene für Multidomänen-Proteine sind durchweg aus mehreren Exons aufgebaut. Die Stellen, die den Exon-Intron-Verbindungen entsprechen, scheinen oft an der Oberfläche dieser Proteine zu liegen und sind somit einem proteolytischen Angriff besonders ausgesetzt^[110]. Beim Phytochrom A entspricht das codierende Exon I der chromophorhaltigen, N-terminalen Domäne, wahrscheinlich unter Einschluß der „hinge region“, so daß mehrere „frühe Spaltstellen“ (Aminosäurereste 600–700) in diesen Sequenzbereich

fallen (vgl. Abb. 8). Die Exons II, III und IV codieren für die C-terminale, chromophorfrem Domäne. Vielleicht hängt die bevorzugte proteolytische Spaltung dieser Domäne (vgl. Abschnitt 3.1) mit den zahlreichen Exon-Intron-Übergängen in diesem Bereich zusammen. Es ist nicht bekannt, ob die 3'-Exons für unterschiedliche, funktionelle Subdomänen im C-Terminus der Phytochromproteine codieren. Interessanterweise finden *Schneider-Poetsch et al.*^[111] im 250 Aminosäuren langen C-terminalen Polypeptid von *Selaginella*-Phytochrom, das im *phyA*-Gen aus Hafer von den letzten beiden Exons codiert wird, Strukturhomologien zu bakteriellen Sensorproteinen.

In Tabelle 3 sind die Aminosäuresequenz-Homologien der Phytochromproteine aufgeführt nach einzelnen Exons wiedergegeben und in Abbildung 11 die Aminosäuresequenzen an den Exon-Intron-Übergängen. Die große Sequenzhomologie an den Übergängen der Exons zu den Introns läßt vermuten, daß die Phytochromgene der höheren Pflanzen und des Farns die in Abbildung 10 gezeigte Exon-Intron-Struktur aufweisen. Beim *phyB*-Gen aus *Arabidopsis* konnte dies für den Übergang von Exon I zu Exon II bestätigt werden^[108].

In diesem Zusammenhang ist das Phytochromgen aus dem Moos *Ceratodon* eine Ausnahme. Der Übergang von Exon I zu Exon II ist wie bei allen anderen *phy*-Genen konserviert. Exon II aber, das in diesem Bereich eine hohe Homologie zu den anderen Phytochromen aufweist, bricht nach rund 100 Aminosäuren ab; es folgt ein Intron von unbekannter Größe (wahrscheinlich 300 Basenpaare (Bp)). Dann schließt sich ein langer offener Leserahmen von etwa 530 Aminosäuren an^[108]. Dieses vermutete Protein weist keine Homologie zu den C-terminalen Peptidsequenzen der bekannten Phytochromproteine auf.

4.2. Expression der Phytochromgene

Die Expression vieler lichtregulierter Gene wird durch Phytochrom moduliert^[112]. Für die meisten dieser Gene besteht eine Stimulation der Expression durch Licht, im Falle der Protochlorophyllidreduktase^[113] und den *phyA*-Genen selbst^[114, 115, 98] wird die Expression negativ von Pfr beeinflusst. Der regulatorische Wirkungsort ist dabei hauptsächlich die Transkription. In monokotylen Pflanzen wie Hafer^[114, 115] und Reis^[98] ist diese Negativkontrolle sehr drastisch, in Mais^[96] und den dikotylen Pflanzen aber wesentlich schwächer ausgeprägt. In Hafer oder Reis wird die

	I				II				III				IV				
	<	AS	>	< Bp >	<	AS	>	< Bp >	<	AS	>	< Bp >	<	AS	>	AS	
Hafer	MSSS	666	LALQ	203	GKEE	273	DSITEK	341	SSCLDL	99	DLELR	137	IKHQG	71	*	1129	
Reis	MSSS	692	LALQ	222	GKEE	269	DSVMNK	281	SSCLDL	99	DLELR	102	IKHQG	68	*	1128	
Mais	MSSS	669	LALQ	144	GREE	273	DNITDK	189	SSCLDL	99	DFELR	106	IKHRG	71	*	1132	
Erbse	MSTT	665	LALQ	82	GEE	272	DGIID	78	GYLDL	98	NLELS	136	ITHGG	69	*	1124	
Zucc	MSTS	664	LALQ	?	GQEE	272	DKIID	?	GFIDL	98	HLEFR	?	ITYAG	70	*	1124	
Ara A	MSGG	666	NALE	?	GTEE	272	ESIIE	?	GCLDL	98	NLEIR	?	LTHTG	66	*	1122	
Ara B	MVSG	721	RALR	90	GDEE	269	ESIED	?	GSFVL	98	RTEFR	?	MACPG	84	*	1172	
Ara C	MSSN	672	LALQ	?	GSEE	273	EGIEE	?	GYVEL	100	ELEFR	?	IIHPA	66	*	1111	
Selag	?	?	?	?	--	>229	ESIED	?	GYLEL	98	HLEFR	?	ITHPG	79	*	406	
Cer	MSAT	678	LALQ	303	GEEE	≈100	?	?	?	?	?	≈530	AS	*		≈1300	

Abb. 11. Vergleich der Aminosäuresequenzen an den bekannten Exon-Intron-Übergängen der *phyA*-Gene aus Hafer, Reis, Mais und Erbse mit den Aminosäuresequenzen an den vermuteten Exon-Intron-Übergängen der *phyA*-Gene aus Zucchini und *A. thaliana*, der *phyB*- und *phyC*-Gene aus *A. thaliana* und mit dem Phytochromgen aus *C. purpureus* und *S. martensii*. AS = Zahl der Aminosäuren, die von Exon I, II, III und IV kodiert werden oder die Zahl der Aminosäuren des gesamten Phytochrom-Polypeptids; Bp = Länge der entsprechenden Introns in Basenpaaren; Literaturangaben für die Phytochromgene: Hafer [107], Reis [98], Mais [96], Erbse [105], Zucc = Zucchini [95], Ara A, B, C = *A. thaliana phyA*, *phyB* und *phyC* [97], Selag = *S. martensii* [104] und Cer = *C. purpureus* [108].

phyA-Transkription bereits fünf Minuten nach der Bildung von Pfr auch in Abwesenheit einer funktionierenden Proteinsynthese unterdrückt; demnach sind alle für die entsprechende Signalübermittlung notwendigen Faktoren bereits vorhanden^[11-51]. In *Arabidopsis* kann die Regulation von *phyA*-mRNA nur in Dauerweißlicht beobachtet werden^[97], während in Hafer oder Reis eine kurze induktive Rotlichtbestrahlung ausreichend ist.

Im Vergleich zu den monokotylen Pflanzen ist in dikotylen Pflanzen die Pfr-abhängige *phyA*-Expression komplex. In *Arabidopsis* hybridisieren *phyA*-spezifische Gensonden zu zwei, in Erbse zu drei unterschiedlich langen *phyA*-Transkripten. Dies hat seine Ursache in mehreren Transkriptionsstartstellen innerhalb des komplexen *phy*-Promotors (Abb. 10)^[105, 116]. Eines dieser Transkripte wird stark lichtabhängig transkribiert, während die anderen mehr oder weniger lichtunabhängig exprimiert werden^[97, 105, 116]. Eine weitere Besonderheit bei den dikotylen Pflanzen sind nicht identifizierte offene Leserahmen (URFs), die „in frame“ mit den langen Leserahmen der Phytochrompolypeptide orientiert sind und für kurze Peptide codieren. Auch in *phyB* und *phyC* von *Arabidopsis* treten diese URFs auf, ihre Funktion ist unbekannt^[97, 105]. Im Gegensatz zu *phyA* werden *phyB* und *phyC* in *Arabidopsis* nur sehr schwach und nahezu lichtunabhängig exprimiert^[97]. Welcher Phytochromtyp die Expression von *phyA* beeinflusst, ist unklar, in Erbse ist jedenfalls auch der lichtstabile Phytochromtyp an diesem Effekt beteiligt^[117]. In mehreren *phyA*-Promotoren der höheren Pflanzen wurden konservierte Sequenzmotive beobachtet^[112]. Diese Motive, die vermutlich eine funktionelle Rolle bei der Expression der *phyA*-Gene spielen, sind heute ein Gegenstand intensiver Forschung^[112, 118].

4.3. Mögliche Struktur-Funktions-Beziehungen und Signalketten

Da mit biochemischen Methoden bisher keine detaillierten Kenntnisse über die Funktion von Phytochrom und die davon ausgehende Signalkette gewonnen werden konnten, seien hier einige Überlegungen zusammengefaßt, die auf der Struktur der bisher bekannten Phytochromgene basieren. Alle bekannten Phytochromgene lassen sich auf ein gemeinsames „Urphytochromgen“ zurückführen, das zumindest im 5'-terminalen Bereich eine ähnliche Struktur hat wie in Abbildung 10 dargestellt. In der Chromophordomäne (Exon I) weisen alle Phytochrome (*phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD*, *phyCer*) eine Aminosäuresequenz-Homologie von 50 bis 60% zueinander auf (die *phyA*-Typen untereinander von 70 bzw. 90%; siehe Tabelle 3). Dies zeigt, daß die lichtregulatorische Domäne des Phytochrom-Moleküls einem starken Evolutionsdruck ausgesetzt ist. Die Funktion dieser Domäne, nämlich die Wechselwirkung mit dem Tetrapyrrol-Chromophor zur Ermöglichung der reversiblen Photokonversion, dürfte in allen Phytochromen dieselbe sein.

Die Ähnlichkeit der Hydropathieprofile (die ein Maß für die Hydrophobizität der einzelnen Aminosäuren entlang der Sequenz sind) von *phyA*, *phyB*, *phyC* und *Selaginella*-Phytochrom^[97, 111] läßt prinzipielle Ähnlichkeiten auch im C-terminalen Bereich vermuten. Von den Exons, die für die C-terminale Domäne von Phytochrom codieren, sind die Exons II und IV etwas stärker konserviert; Exon III ist am variabel-

sten. Dagegen grenzt sich das Phytochrom aus *Ceratodon* stark von dieser Phytochromgruppe ab. Das Fehlen auffälliger Homologien in der C-terminalen Proteinhälfte und der abweichende Genaufbau in diesem Bereich sprechen für eine andere regulatorische Funktionsweise des Phytochroms im Moos. Es ist allerdings auch möglich, daß ein verwandter Phytochromtyp in den höheren Pflanzen oder in Farnen noch nicht entdeckt wurde.

Die Existenz vieler unterschiedlicher phytochromabhängiger Reaktionen, die von schnellen Änderungen von Membraneigenschaften bis hin zur komplexen Regulation der Genexpression reichen, legt, ebenso wie das Vorhandensein verschiedener Phytochromtypen, verschiedene Signalketten für ein und denselben Lichtstimulus nahe.

Die Signalübertragung in tierischen Zellen ist gut untersucht. Viele tierische Hormonwirkungen beruhen auf der Bindung der Hormonmoleküle an Hormonrezeptoren in der Plasmamembran, die zu einer Aktivierung von G-Proteinen führt. Die G-Proteine aktivieren Enzyme wie die Phospholipase C, ein Effektorenzym der Phosphoinositidkaskade, oder die Adenylatcyclase. Diese Aktivierung führt schließlich zur Öffnung von Calciumkanälen und zur kurzzeitigen Erhöhung der cytosolischen Calciumkonzentration, die aber sofort über eine Calcium/Calmodulin-abhängige Calcium-ATPase wieder auf die Ausgangskonzentration abgesenkt wird. Die kurzzeitige Änderung der Calciumkonzentration ist dann über eine Phosphorylierungskaskade angekoppelt, die über membrangebundene, calciumregulierte Kinasen eingeleitet wird. Die Signalkette führt schließlich zu der entsprechenden Antwort der Zielzellen. Es mehren sich die Hinweise, daß analoge Signalketten auch in Pflanzenzellen existieren. Für viele phytochromabhängige Reaktionen konnten die Beteiligung von Calcium nachgewiesen werden^[125]; so spielt z. B. das Calcium/Calmodulin-System bei der lichtabhängigen Expression der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine^[122] als auch bei der Pfr-abhängigen Chloroplastendrehung in der Alge *Mougeotia* eine Rolle^[73, 120]. Ebenso wurden Hellrot/Dunkelrot-abhängige Phosphorylierungsvorgänge und Änderungen in den zellulären Konzentrationen von Phosphatidylinositolen beobachtet^[126, 123]. Versuche mit spezifischen Inhibitoren und Aktivatoren lassen die Beteiligung von regulatorischen Proteinen wie G-Proteine, Calmodulin, Phospholipase C, Proteinkinase C oder Adenylatcyclase an der phytochromabhängigen Schwellung von Weizenprotoplasten vermuten^[121]. Eine phytochromabhängige Phospholipase C wurde in Moosen gefunden^[123] und für die rotlichtabhängige Proteinphosphorylierung in Haferprotoplasten wird die Beteiligung einer Proteinkinase C vermutet^[127]. Für die Wachstumsregulation der tierischen Gewebe spielen Rezeptormoleküle mit Tyrosinkinaseaktivität eine zentrale Rolle. Die Beteiligung ähnlicher Signalketten bei der Vermittlung von phytochromabhängigen Reizen in der Pflanzenzelle wurde noch nicht untersucht.

Die Hormonwirkungen im Tierreich beruhen durchweg auf Transmembran-Signalübertragungen. Da in den Pflanzen das aktivierte Phytochrom in den Zielzellen selbst gebildet wird, ist für Phytochromreaktionen die Signalübertragung über Membranbarrieren hinweg nicht erforderlich. Deshalb ist die kritiklose Übertragung der tierischen Signalwege auf die Pflanzenzellen äußerst problematisch. Man sollte die phytochromabhängige Signalübertragung im Licht der intrazellulären Signalübertragung betrachten. Interessant ist die von Schneider-Poetsch et al. festgestellte Homologie von *phyA*,

phyB, *phyC* und *Selaginella*-Phytochrom zu bakteriellen Sensorenproteinen^[11]. Sie impliziert Signalketten für Phytochromreaktionen, die der für die Signaltransduktion für chemische Reize in Bakterien ähnlich sind^[128]. Für die Existenz solcher Signalketten in Pflanzen gibt es aber noch keine experimentellen Beweise. Einen Hinweis, daß die Regulation der Genexpression durch Phytochrom auf verschiedenen Wegen beruht, geben die Versuche von Lam et al.^[129]. Sie konnten zeigen, daß für die Pfr-abhängige Expression der Gene der Chlorophyll a/b-bindenden Proteine und der Gene für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase die cytoplasmatische Proteinsynthese notwendig ist, während für die Pfr-abhängige Hemmung der Expression des Protochlorophyllidreduktase-Gens und des *phyA*-Gens keine Proteinsynthese notwendig ist. Anhaltspunkte für unterschiedliche Funktionen der verschiedenen Phytochromtypen ergaben sich aus Versuchen mit Phytochrom-Mutanten^[124]. Die Fortsetzung und Vertiefung dieser Versuche dürfte zu weiteren wichtigen Erkenntnissen führen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Der aus einem Tetrapyrrol-Chromophor und einem Proteinteil aufgebaute pflanzliche Photorezeptor Phytochrom hat sich als lohnendes Objekt für die interdisziplinäre Forschung auf Teilgebieten der Chemie, Physik und Biologie erwiesen. Für Naturstoffchemiker standen dabei Struktur und Synthese des Tetrapyrrol-Chromophors im Vordergrund. Interessant ist nach wie vor die Frage, ob man die Chromophor-Protein-Wechselwirkung durch Anknüpfen des Tetrapyrrols an geeignete Modellstrukturen nachahmen kann. Als wichtige Kriterien für solche Wechselwirkungen kann man das Fixieren bestimmter Konformationen des flexiblen Tetrapyrrols und die Photochromie heranziehen. Für den Biochemiker sind definierte, reversible Konformationsänderungen des Proteins, die sich durch Belichtung erzeugen lassen, nach wie vor von Interesse. Das Phytochrom eignet sich als Modell zum Studium einiger Aspekte der Proteinfaltung. Das Auffinden verschiedener Phytochromgene und die Möglichkeit der Rekonstitution des Chromoproteins aus Apoprotein und Chromophor haben neue Fragestellungen für Spektroskopiker und Biologen aufgeworfen. So sind die neu entdeckten Phytochrome bisher weder spektroskopisch genauer charakterisiert noch im Hinblick auf ihre spezifische biologische Wirksamkeit untersucht worden. Die vom Phytochrom ausgehende Signalkette ist nach wie vor unbekannt. Die alte Frage, ob es für das Phytochrom nur eine einzige Primärwirkung oder eine Vielzahl von direkten Reaktionen mit anderen Komponenten in der Pflanzenzelle gibt, muß im Licht der verschiedenen Phytochrome erneut untersucht werden.

Ohne die vertrauensvolle Kooperation mit Fachkollegen und ohne den engagierten Einsatz zahlreicher Mitarbeiter, die in den Literaturzitationen als Coautoren genannt sind, hätten unsere Ergebnisse nicht erzielt werden können. Wir danken all denen, die mit uns an der Erforschung des Phytochroms beteiligt waren. Die Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Eingegangen am 17. April 1991 [A 836]

- [1] W. Shropshire, Jr., H. Mohr (Hrsg.): *Photomorphogenesis* (Encycl. Plant Physiol. New Ser. 16 A, B), Springer, Berlin 1983.
- [2] H. A. Borthwick in K. Mitrakos, W. Shropshire, Jr., (Hrsg.): *Phytochrome*, Academic Press, London 1972, S. 3–23.
- [3] H. A. Borthwick, S. B. Hendricks, M. W. Parker, E. H. Toole, V. K. Toole, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38 (1952) 662–666.
- [4] H. A. Borthwick, S. B. Hendricks, M. W. Parker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38 (1952) 929–934.
- [5] L. Kersch, S. Nowitzki, *FEBS Lett.* 146 (1982) 173–176.
- [6] R. D. Vierstra, P. H. Quail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 5272–5276.
- [7] R. Grimm, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 41 (1986) 988–992.
- [8] M. Nakasako, M. Wada, S. Tokutomi, K. T. Yamamoto, J. Sakai, M. Kataoka, F. Tokunaga, M. Furuya, *Photochem. Photobiol.* 52 (1990) 3–12.
- [9] A. M. Jones, H. P. Erickson, *Photochem. Photobiol.* 49 (1989) 479–483.
- [10] W. Rüdiger, D. L. Correl, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 723 (1969) 208–212.
- [11] W. Rüdiger, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 350 (1969) 1291–1300.
- [12] W. Rüdiger, *Angew. Chem.* 82 (1970) 527–534; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 9 (1970) 473–480; *Naturwissenschaften* 57 (1970) 331–337.
- [13] S. Schoch, G. Klein, U. Linsenmeier, W. Rüdiger, *Tetrahedron Lett.* 1974, 2465–2468.
- [14] S. Schoch, G. Klein, U. Linsenmeier, W. Rüdiger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1976, 549–558.
- [15] H. Lotter, G. Klein, W. Rüdiger, H. Scheer, *Tetrahedron Lett.* 1977, 2317–2320; G. Klein, W. Rüdiger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1978, 267–279.
- [16] G. Klein, S. Grombein, W. Rüdiger, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 358 (1977) 1077–1079.
- [17] W. Rüdiger, T. Brandlmeier, I. Blos, A. Gossauer, J.-P. Weller, *Z. Naturforsch. C* 35 (1980) 763–769.
- [18] J.-P. Weller, A. Gossauer, *Chem. Ber.* 113 (1980) 1603–1611.
- [19] H. Scheer, *Angew. Chem.* 93 (1981) 230–250; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 20 (1981) 241–260; A. N. Glazer, A. Melis, *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 38 (1987) 11–45.
- [20] K. T. Fry, F. E. Mumford, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45 (1971) 1466–1473.
- [21] J. C. Lagarias, A. N. Glazer, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 5030–5037.
- [22] J. C. Lagarias, H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 4821–4828.
- [23] P.-S. Song in D. J. Cosens, D. Vince-Price (Hrsg.): *The Biology of Photo-reception*, Soc. Exp. Biol. 1983, S. 181–206.
- [24] S. Grombein, W. Rüdiger, H. Zimmermann, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 356 (1975) 1709–1714.
- [25] F. Thümmel, T. Brandlmeier, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 36 (1981) 440–449.
- [26] W. Rüdiger, H. Scheer in [1], S. 119–151.
- [27] H. Falk, N. Müller, T. Schladerer, *Monatsh. Chem.* 111 (1980) 159–175.
- [28] F. Thümmel, W. Rüdiger, *Tetrahedron* 39 (1983) 1943–1951.
- [29] W. Rüdiger, F. Thümmel, E. Cmiel, S. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 6244–6248; F. Thümmel, W. Rüdiger, E. Cmiel, S. Schneider, *Z. Naturforsch. C* 38 (1983) 359–368.
- [30] H. Falk, K. Grubmayr, *Monatsh. Chem.* 110 (1979) 1237–1242.
- [31] H. Falk, K. Thirring, *Z. Naturforsch. B* 34 (1979) 1448–1453; *ibid.* 34 (1979) 1600–1605; *ibid.* 35 (1980) 376–380.
- [32] S. P. A. Fodor, J. C. Lagarias, R. A. Mathies, *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 129–136; *Biochemistry* 29 (1990) 11141–11146.
- [33] D. L. Farrens, R. E. Holt, B. N. Rospendowski, P.-S. Song, T. M. Cotton, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 9162–9169.
- [34] F. Siebert, R. Grimm, W. Rüdiger, G. Schmidt, H. Scheer, *Eur. J. Biochem.* 194 (1990) 921–928.
- [35] W. Rüdiger, P. Eilfeld, F. Thümmel in G. Blauer, H. Sund (Hrsg.): *Optical Properties and Structure of Tetrapyrroles*, de Gruyter, Berlin 1985, S. 349–366.
- [36] H. Falk: *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, New York 1989.
- [37] Y. Inoue, W. Rüdiger, R. Grimm, M. Furuya, *Photochem. Photobiol.* 52 (1990) 1077–1083.
- [38] P. Eilfeld, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 40 (1985) 109–114.
- [39] Zusammenfassungen: K. Schaffner, S. E. Braslavsky, A. Holzwarth, *Pure Appl. Chem.* 62 (1990) 1421–1426; *Adv. Photochem.* 15 (1990) 229–277.
- [40] M. E. Lippitsch, H. Riegler, F. R. Aussenegg, G. Hermann, E. Müller, *Biochem. Physiol. Pflanz.* 183 (1988) 1–6.
- [41] H. Brock, B. P. Ruzsicska, T. Arai, W. Schlamann, A. R. Holzwarth, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Biochemistry* 26 (1987) 1412–1417.
- [42] G. Hermann, M. E. Lippitsch, H. Brunner, F. R. Aussenegg, E. Müller, *Photochem. Photobiol.* 52 (1990) 13–18.
- [43] B. P. Ruzsicska, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Photochem. Photobiol.* 41 (1985) 681–688.
- [44] P. Eilfeld, P. Eilfeld, J. Vogel, R. Maurer, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 825–830.
- [45] F. Thümmel, P. Eilfeld, W. Rüdiger, D. K. Moon, P.-S. Song, *Z. Naturforsch. C* 40 (1985) 215–218.
- [46] P. Eilfeld, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 39 (1984) 742–745.

- [47] F. Thümmeler, W. Rüdiger, *Physiol. Plant.* 60 (1984) 378–382.
- [48] U. Reiff, P. Eilfeld, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 40 (1985) 693–698.
- [49] C. Scharrnagl, *Dissertation*, Technische Universität München 1986; S. Schneider, C. Scharrnagl, M. Duerring, T. Schirmer, W. Bode in H. Scheer, S. Schneider (Hrsg.): *Photosynthetic Light-Harvesting Systems, Organization and Functions*, de Gruyter Berlin 1988, S. 483–490.
- [50] S. M. Daniels, P. H. Quail, *Plant Physiol.* 76 (1984) 622–626.
- [51] J. C. Lagarias, F. M. Mercurio, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 2415–2423.
- [52] A. M. Jones, P. H. Quail, *Planta* 178 (1989) 147–156.
- [53] R. Grimm, F. Lottspeich, H. A. W. Schneider, *Z. Naturforsch. C* 41 (1986) 993–1000.
- [54] T. Schirmer, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* 195 (1987) 677–695; T. Schirmer, W. Bode, R. Huber in H. Scheer, S. Schneider (Hrsg.): *Photosynthetic Light-Harvesting Systems Organization and Functions*, de Gruyter, Berlin 1988, S. 195–199.
- [55] R. Grimm, C. Eckerskorn, F. Lottspeich, C. Zenger, W. Rüdiger, *Planta* 174 (1988) 396–401.
- [56] R. Grimm, J. Kellermann, W. Schäfer, W. Rüdiger, *FEBS Lett.* 234 (1988) 497–499.
- [57] A. M. Jones, R. D. Vierstra, S. M. Daniels, P. Quail, *Planta* 164 (1985) 501–506.
- [58] M. M. Cordonnier, H. Greppin, L. H. Pratt, *Biochemistry* 24 (1985) 3246–3253; Y.-G. Chai, P. S. Song, M.-M. Cordonnier, L. H. Pratt, *ibid.* 26 (1987) 4947–4952.
- [59] P. S. Song, I. Yamazaki in M. Furuya (Hrsg.): *Phytochrome and Photoregulation in Plants*, Academic Press, New York 1987, S. 139–156.
- [60] A. M. Jones, P. H. Quail, *Biochemistry* 25 (1987) 2987–2995.
- [61] L. H. Pratt, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33 (1982) 557–582.
- [62] W. O. Smith in [1], S. 96–118.
- [63] R. Schendel, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 44 (1989) 12–18.
- [64] a) Y.-S. Wong, H. C. Cheng, D. A. Walsh, J. C. Lagarias, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 12089–12097; b) R. W. McMichael, Jr., J. C. Lagarias, *Biochemistry* 29 (1990) 3872–3878.
- [65] H. A. W. Schneider-Poetsch, B. Braun, W. Rüdiger, *Planta* 177 (1989) 511–514.
- [66] B. R. Singh, P.-S. Song, P. Eilfeld, W. Rüdiger, *Eur. J. Biochem.* 184 (1989) 715–721.
- [67] H. A. W. Schneider-Poetsch, *Naturwissenschaften* 75 (1988) 132–139; M.-M. Cordonnier, *Photochem. Photobiol.* 49 (1989) 821–831.
- [68] H. Schwarz, H. A. W. Schneider-Poetsch, *Planta* 170 (1987) 152–160.
- [69] N. Kondo, Y. Inoue, K. Shibata, *Planta Sci. Lett.* 1 (1973) 165–168.
- [70] L. H. Pratt, R. A. Coleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68 (1971) 2431–2435.
- [71] J. M. Mackenzie, Jr., R. A. Coleman, W. R. Briggs, L. H. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 799–803.
- [72] M. Wada, K. Kadota, M. Furuya, *Plant Cell Physiol.* 24 (1983) 1441–1447.
- [73] W. Haupt in K. Mitrakos, W. Shropshire, Jr. (Hrsg.): *Phytochrome*, Academic Press, London 1972, S. 553–569; *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 99 (1986) 251–262.
- [74] R. A. Coleman, L. H. Pratt, *Planta* 121 (1974) 119–131.
- [75] J. G. Tokuhisa, S. M. Daniels, P. H. Quail, *Planta* 164 (1985) 321–332.
- [76] H. Abe, K. T. Yamamoto, A. Nagatani, M. Furuya, *Plant Cell Physiol.* 26 (1985) 1387–1399.
- [77] Y. Shimazaki, L. H. Pratt, *Planta* 164 (1985) 333–344; *ibid.* 168 (1986) 512–515.
- [78] M.-M. Cordonnier, H. Greppin, L. H. Pratt, *Biochemistry* 25 (1986) 7657–7666.
- [79] A. Nagatani, P. J. Lumsden, K. Konomi, H. Abe in M. Furuya (Hrsg.): *Phytochrome and Photoregulation in Plants*, Academic Press, New York 1987, S. 95–115.
- [80] L. H. Pratt, Vortrag auf dem NATO-Workshop „Phytochrome, Properties and Biological Action“ Chichester (England), Juli 1990.
- [81] R. E. Kendrick, G. H. M. Kronenberg (Hrsg.): *Photomorphogenesis in Plants*, Nijhoff, Dordrecht 1986.
- [82] R. Schendel, Z. Tong, W. Rüdiger, *Z. Naturforsch. C* 44 (1989) 757–764.
- [83] P. Lindemann, S. E. Braslavsky, E. Hartmann, K. Schaffner, *Planta* 178 (1989) 436–442.
- [84] D. G. Kidd, J. C. Lagarias, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7029–7035.
- [85] F. López-Figueroa, P. Lindemann, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, H. A. W. Schneider-Poetsch, W. Rüdiger, *J. Plant. Physiol.* 136 (1990) 84–87.
- [86] M.-M. Cordonnier, H. Greppin, L. H. Pratt, *Plant Physiol.* 80, 982–987; *ibid.* 74 (1984) 123–127.
- [87] G. C. Whitelam, M. L. Anderson, E. E. Billett, H. Smith, *Photochem. Photobiol.* 42 (1985) 793–796.
- [88] H. Saji, A. Nagatani, K. T. Yamamoto, M. Furuya, T. Fukumoto, A. Yamashita, *Plant Sci. Lett.* 37 (1984) 57–61.
- [89] H. A. W. Schneider-Poetsch, H. Schwarz, R. Grimm, W. Rüdiger, *Planta* 173 (1988) 61–72.
- [90] F. López-Figueroa, P. Lindemann, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, H. A. W. Schneider-Poetsch, W. Rüdiger, *Bot. Acta* 102 (1989) 178–180.
- [91] F. López-Figueroa, W. Rüdiger, *Photochem. Photobiol.* 52 (1990) 111–114.
- [92] F. López-Figueroa, W. Rüdiger, *J. Phycol.* 27 (1991) 389–394.
- [93] H. P. Hershey, J. T. Colbert, J. L. Lissimore, R. F. Baker, P. H. Quail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2332–2337.
- [94] H. P. Hershey, R. F. Baker, K. B. Idler, J. L. Lissimore, P. H. Quail, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 8543–8559.
- [95] R. A. Sharrock, J. L. Lissimore, P. H. Quail, *Gene* 47 (1986) 287–295.
- [96] A. H. Christensen, P. H. Quail, *Gene* 85 (1989) 381–390.
- [97] R. A. Sharrock, P. H. Quail, *Genes Dev.* 3 (1989) 1745–1757.
- [98] S. A. Kay, B. Keith, K. Shinozaki, M.-L. Chye, N.-H. Chua, *Plant Cell* 1 (1989) 351–360.
- [99] K.-I. Tomizawa, Y. Komeda, N. Sato, A. Nagatani, T. Iino, M. Furuya, *Plant Cell Physiol.* 27 (1986) 1101–1108.
- [100] a) S. A. Kay, Rockefeller University, New York und M. Furuya, RIKEN-Institut, Wako/Japan, persönliche Mitteilung; b) K. Dehesh, J. Tepperman, A. H. Christensen, P. H. Quail, *MGG, Mol. Gen. Genet.* 255 (1991) 305–313.
- [101] S. Fiedel, *Diplomarbeit*, Universität München 1990.
- [102] W. Rüdiger, F. Thümmeler in B. Thomas (Hrsg.): *Phytochrome, Properties and Biological Function*, NATO Workshop Chichester 1990, Academic Press, New York 1991, S. 57–70.
- [103] a) F. Thümmeler, A. Beetz, W. Rüdiger, *FEBS Lett.* 275 (1990) 125–129; b) E. Hartmann, E. Weber, *Planta* 175 (1988) 39–49.
- [104] H. A. W. Schneider-Poetsch, B. Braun, *J. Plant Physiol.* 137 (1991) 576–580.
- [105] N. Sato, *Plant Mol. Biol.* 11 (1988) 697–710.
- [106] A. Beetz, *Diplomarbeit*, Universität München 1990.
- [107] H. P. Hershey, R. F. Barker, K. B. Idler, M. G. Murray, P. H. Quail, *Gene* 61 (1987) 339–348.
- [108] F. Thümmeler, unveröffentlicht.
- [109] C. Kuhlemeier, P. J. Green, N.-H. Chua, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38 (1987) 221–257.
- [110] W. Gilbert, *Science (Washington DC)* 228 (1985) 823–827.
- [111] H. A. W. Schneider-Poetsch, B. Braun, S. Marx, A. Schaumburg, *FEBS Lett.* 281 (1991) 245–249.
- [112] P. M. Gilmartin, L. Sarokin, J. Memelink, N.-H. Chua, *Plant Cell* 2 (1990) 369–378.
- [113] E. Mössinger, A. Batschauer, E. Schäfer, K. Apel, *Eur. J. Biochem.* 147 (1985) 137–142.
- [114] P. H. Quail, J. T. Colbert, N. K. Peters, A. H. Christensen, R. A. Sharrock, J. L. Lissimore, *Philos. Trans. R. Soc. London B* 314 (1986) 469–480.
- [115] J. L. Lissimore, P. H. Quail, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 4840–4850.
- [116] K.-I. Tomizawa, N. Sato, M. Furuya, *Plant Mol. Biol.* 12 (1989) 295–299.
- [117] M. Furuya, N. Ito, K.-I. Tomizawa, E. Schäfer, *Planta* 183 (1991) 218–221.
- [118] K. Dehesh, W. B. Bruce, P. H. Quail, *Science (Washington DC)* 250 (1990) 1397–1399.
- [119] W. R. Pearson, D. J. Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 2444–2448.
- [120] F. Grolig, G. Wagner, *Planta* 177 (1989) 169–177.
- [121] M. E. Bossen, R. E. Kendrick, W. J. Vredenberg, *Physiol. Plant* 80 (1990) 55–62; A. Tretyn, R. E. Kendrick, M. E. Bossen, *ibid.* 78 (1990) 230–235.
- [122] E. Lam, M. Benedyk, N.-H. Chua, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 4819–4823.
- [123] E. Hartmann, H. Pfaffmann in D. J. Morré, W. F. Boss, F. A. Loewus (Hrsg.): *Inositol Metabolism in Plants*, Wiley-Liss, New York 1990, S. 259–275.
- [124] P. Adamse, R. E. Kendrick, M. Koorneef, *Photochem. Photobiol.* 48 (1988) 833–841.
- [125] S. J. Roux, R. O. Wayne, N. Datta, *Physiol. Plant* 66 (1986) 344–348.
- [126] B. R. Singh, P. S. Song, *Photochem. Photobiol.* 52 (1990) 249–254.
- [127] M.-H. Park, Q. Chae, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 169 (1990) 1185–1190.
- [128] C. W. Ronson, B. T. Nixon, F. M. Ausubel, *Cell* 49 (1987) 579–581.
- [129] E. Lam, P. J. Green, M. Wong, N.-H. Chua, *EMBO J.* 8 (1989) 2777–2783.