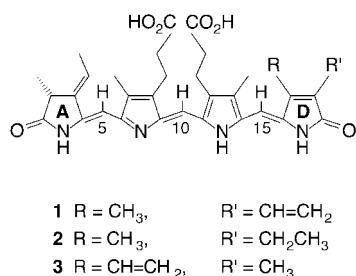


Modellstudien zum Photochromismus des Phytochroms – proteingesteuerte Photoisomerisierung eines nicht kovalent gebundenen offenkettigen Tetrapyrrols**

Ingo Lindner, Silvia E. Braslavsky, Kurt Schaffner und Wolfgang Gärtner*

Professor Günther Wilke zum 75. Geburtstag gewidmet

Offenkettige Tetrapyrrole wie Phytochromobilin **1** und Phycocyanobilin **2** dienen als Chromophore in einer Reihe von Chromoproteinen. Ihre Photoreaktivität wird zum großen Teil durch die Proteinumgebung gesteuert. Während **2** in den Lichtsammelpigmenten der Cyanobakterien einen der



Antennenchromophore darstellt,^[1] ist **1** der Chromophor des pflanzlichen Photorezeptors Phytochrom,^[2] der über eine reversible Photoisomerisierung der C₁₅-C₁₆-Doppelbindung zwischen der physiologisch inaktiven P_r-Form und der aktiven P_{fr}-Form wechselt.^[2, 3] Diese Art der photochromen Kontrolle, die über die Doppelbindungsphotoisomerisierung erfolgt, ist jedoch nicht allein auf **1** beschränkt. So dient **2**, ganz analog zu **1**, in dem Phytochrom der Alge *Mesotaenium caldarium* als photochemischer Schalter.^[4] Ebenso kann **2** diese Rolle in rekombinanten Phytochromen höherer Pflanzen übernehmen.^[5] In allen diesen Photorezeptoren ist der Chromophor über eine Thioether-Bindung zu einem Cysteinrest kovalent an das Protein gebunden.

In dieser Arbeit haben wir untersucht, ob die kovalente Bindung des Chromophors eine zwingend notwendige Voraussetzung für die Funktion als photochemisch gesteuerter Auslöser ist. Zum ersten Mal kann hier gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. Vielmehr kann das Apoprotein den Chromophor in die chromophorbindende Tasche einbetten und über Wirt-Gast-Wechselwirkungen den P_r-P_{fr}-Photozyklus steuern, ohne dass eine kovalente Bindung zwischen beiden besteht.

[*] Prof. Dr. W. Gärtner, Dipl.-Chem. I. Lindner,
 Prof. Dr. S. E. Braslavsky, Prof. Dr. K. Schaffner
 Max-Planck-Institut für Strahlenchemie
 Postfach 101365, 45413 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
 Fax: (+49) 208-306-3951
 E-mail: gaertner@mpi-muelheim.mpg.de

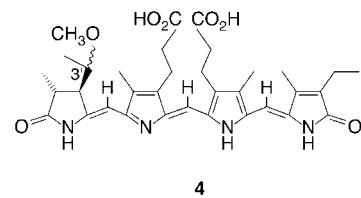
[**] Diese Arbeit ist Teil der Dissertation von I. Lindner, Max-Planck-Institut für Strahlenchemie, Mülheim an der Ruhr, und Gerhard-Mercator-Universität Duisburg, 2000. Unser Dank gilt Tanja Berndsen, Güls Koc und Helene Steffen für die technische Unterstützung.

Die Grenzbedingungen, die für den Einfluss der Proteinumgebung auf die spektralen und photochemischen Eigenschaften des Phytochromchromophors maßgebend sind, sind bisher noch nicht gründlich untersucht worden. Die regioselektive Isomerisierung der Doppelbindung an C-15 von Chromophoren wie **1** und **2** in der Protein-gebundenen Form wird der Steuerung durch die sie umgebende Proteinmatrix zugeschrieben. In homogenen organischen Lösungen wird dagegen eine Photoisomerisierung bevorzugt an der Doppelbindung an C-10 angenommen.^[6] Zudem ist das 10E-Isomer von **2** thermisch labil und wandelt sich bei Raumtemperatur innerhalb von Nanosekunden in die Z-Form um.^[6, 7]

Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Photochromie des Phytochroms A (PhyA) durch einige wenige Aminosäuren beeinflusst wird^[8] und, wie auch der Einbau von **2** in das Apoprotein, entscheidend von den beiden Propionsäureresten des Chromophors abhängt, mit deren Hilfe sich der Chromophor vor der Bildung der kovalenten Thioether-Bindung entsprechend zu positionieren und seine endgültige Konformation einzunehmen scheint.^[8a] Wir konnten ebenfalls zeigen,^[9] dass eine Veränderung des Substitutionsmusters im Ring D des Phytochromobilin-Isomers **3** im P_r-P_{fr}-Photozyklus von der Proteinumgebung toleriert wird, wobei allerdings selektiv das Absorptionsmaximum der P_{fr}-Form zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist.

Schließlich wird die Bedeutung dieser Untersuchung eines phytochromähnlichen Proteins mit einem nicht kovalent gebundenen Chromophor hervorgehoben durch den Befund,^[10] dass in einem *Bakteriophytochrom* die kovalente Anbindung an einen Histidinrest anstelle des herkömmlichen Cysteins erfolgt und sich damit die natürliche Strukturvielfalt der Phytochromfamilie noch erweitert.

Bei der Inkubation von rekombinantem Hafer-ApophyA65^[11] mit **4**, einem Methanoladdukt von **2**,^[12] wurde dieser Chromophor spontan in das Apoprotein eingebettet.



Der resultierende ApophyA/**4**-Komplex zeigte eine dem Photozyklus des Phytochroms ähnliche photoreversible Transformation, mit im Vergleich zu den P_r und P_{fr}-Formen von rekombinantem PhyA65-**2** analogen, aber leicht hypsochrom verschobenen Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{max}} = 643$ und 705 nm; Abbildung 1A), obwohl die Methanoladdition an die Bindungsstelle (C-3') des Chromophors eine kovalente Bindung von **4** mit dem Apoprotein blockiert (Schema 1^[14]).^[15] Auch bei wiederholter Belichtung mit entsprechenden Wellenlängen ($\lambda = 614$ und 714 nm für die Anregung der P_r bzw. P_{fr}-ähnlichen Formen) nahmen die Absorptionsmaxima bei 643 und 705 nm nicht ab.

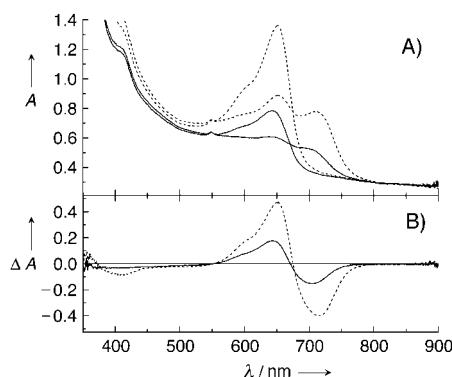
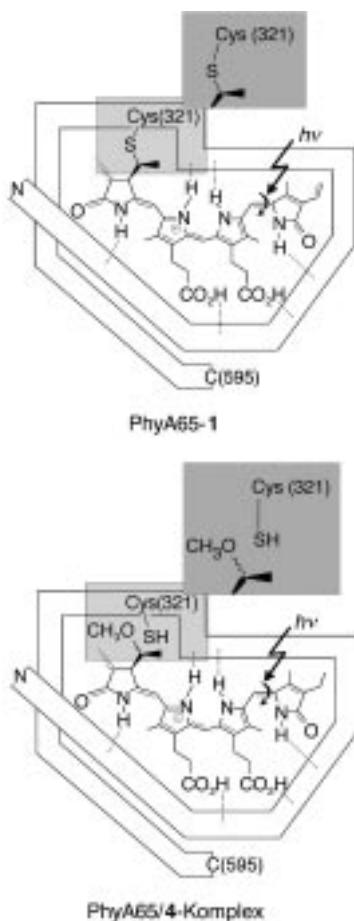


Abbildung 1. P_r - und P_{fr} -Absorptions (A) und P_r - P_{fr} -Differenzspektren (B) von ApophyA65/4-Komplex (durchgezogene Linien) und rekombinanter Hafer-PhyA65-2 (gestrichelt), jeweils nach sättigender Rot- und Dunkelrotbelichtung. Die hier gezeigten Spektren von PhyA65-2 waren im Anschluss an das Verdrängungsexperiment von ApophyA65/4 mit 2 aufgenommen worden.



Schema 1. Schematische Darstellung der Chromophortasche des P_r -Phytochroms^[14] (oben) und des P_r -ähnlichen ApophyA65/4-Komplexes (unten). Die Pfeile markieren die $Z \rightarrow E$ -Photoisomerisierung der Doppelbindung, die zu den jeweiligen P_{fr} -Formen führt.

Die nicht kovalente Einbindung des Methanoladdukts in den ApophyA/4-Komplex konnte durch ein Verdrängungsexperiment schlüssig nachgewiesen werden: Bei der Zugabe von **2** zur P_r -ähnlichen Form des Komplexes unter den für eine spontane kovalente Bindung von **2** an das Apoprotein bewährten Bedingungen^[11b,c] wurde das Methanoladdukt **4**

aus der Bindungstasche prompt verdrängt. Stattdessen bildete sich die P_{fr} -Form des bekannten Chromoproteins PhyA65-2^[11] (Abbildung 1), welches den charakteristischen P_r - P_{fr} -Photozyklus durchlief (rekombinantes PhyA65-2: $\lambda_{max} = 653$ und 718 nm für P_r bzw. $P_{fr}^{[11c]}$).

Die Absorptionsintensität der P_{fr} -Form des ApophyA65/4-Komplexes relativ zur P_r -Form ist etwas geringer, als es für den P_{fr} -Zustand kovalent gebundener Chromophore (**1** oder **2**) üblich ist, und die Form der Absorptionsbanden lässt auf mehr als bloß zwei absorbierende Komponenten schließen (Abbildung 1 A). Im Differenzspektrum von ApophyA/4 jedoch sind die Intensitäten der den P_r und P_{fr} -Formen der Wildtyp-Phytochrome entsprechenden Amplituden vergleichbar (Abbildung 1 B). Die im Vergleich zu P_r und P_{fr} stärkere Verbreiterung der Absorptionsbanden von ApophyA/4 spiegelt möglicherweise eine größere Population an konformeren Chromophoren in der Bindungstasche wider, als dies bei Phytochromen anzutreffen ist. Dies lässt darauf schließen, dass die kovalente Bindung an Cys 321 (die Chromophor-Bindungsstelle im Hafer-Phytochrom) essentiell für eine konformativ einheitliche Einbindung des Chromophors in das Protein ist. Zweifellos wird diese Anordnung noch zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen und dipolare Wechselwirkungen unterstützt. In Abwesenheit einer kovalenten Bindung dürften diese nicht bindenden Kräfte nicht völlig ausreichen, um selektiv die Einstellung einer optimalen Konformation zu ermöglichen. Ihr Einfluss genügt jedoch für eine ausreichend stabile Anordnung, um gleichzeitig zwei Funktionen zu gewährleisten: Sie wirkt einerseits als Photoschalter, indem sie den die Photochromie des Phytochroms imitierenden Photozyklus zu durchlaufen vermag, andererseits aber lässt sie auch den Austausch des Methanoladdukts **4** durch das an Position 3,3' ungesättigte Phycocyanobilin **2** zu.

Experimentelles

4: 2 und **4** wurden bei der Methanolysen von *Spirulina platensis* gewonnen, die routinemäßig für die Präparation von **2** durchgeführt wird.^[16] Nachdem die lyophilisierten Cyanobakterien (500 g) während 16 h in siedendem Methanol im Dunkeln unter Argon gerührt worden waren, wurde der Bilinextrakt durch Umkehrphasen-Chromatographie gereinigt. Mittels präparativer HPLC (Chromasil RP-18, 1 mL min⁻¹, MeCN/Phosphatpuffer (7.5 mM, pH 7.6) 7:18) wurden **2** und **4** getrennt (12:1). Die zweite Fraktion wurde im Vakuum vom Acetonitril befreit und mit $\text{CH}_3\text{Cl}/\text{MeOH}$ 19:1 extrahiert. Bei -70°C ließ sich **4** aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n$ -Hexan kristallisieren. UV/Vis (100 mM Tris, 200 mM NaCl, 10% Glycerin, 0.2% DMSO, pH 8.0): $\lambda_{max} = 348, 593$ nm. ¹H-NMR (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, ¹H/¹H-COSY): $\delta = 1.24$ (t, ³J(H,H) = 7.52 Hz, 3H; $\text{H}_3\text{C}-18^2$), 1.31 (d, ³J(H,H) = 6.30 Hz, 3H; $\text{H}_3\text{C}-3^2$), 1.43 (d, ³J(H,H) = 7.35 Hz, 3H; $\text{H}_3\text{C}-2^1$), 1.97, 2.07, 2.12, 3.30 (4 s, je 3H; $\text{H}_3\text{C}-7^1$, -17¹, -13¹ bzw. $\text{H}_3\text{CO}-3^1$), 2.49 (m, 2H; $\text{H}_2\text{C}-18^1$), 2.78, 3.06 (2 m, je 1H; $\text{HC}-2$ bzw. -3), 2.85 (m, 4H; $\text{H}_2\text{C}-8^2$ und -12²), 3.10, 3.18 (2 t, ³J(H,H) = 7.42, 7.23 Hz, je 2H; $\text{H}_2\text{C}-8^1$ bzw. -12¹), 3.75 (m, 1H; $\text{HC}-3^1$), 5.68, 6.06, 7.30 (3 s, je 1H; $\text{HC}-5$, -15, bzw. -10); die chemischen Verschiebungen wurden durch selektive Entkopplung und NOESY-Experimente zugeordnet. HR-MS (ESI, Positionenmodus): $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_4\text{Na}$ [M+Na]⁺: ber.: 641.2951, gef.: 641.2999.

Die Struktur von **4**^[12] wurde durch MS und Vergleich mit den ¹H-NMR-Spektren von **2** (eigene Messungen) und den Dimethylestern von **2**^[17] und **4**^[13] sowie Addukten von **2** mit kurzen, cysteinhaltigen Peptiden^[18] bestätigt. Die Probe von **4**, die für die Assemblierung mit ApophyA65 eingesetzt wurde, war gemäß HPLC, MS und ¹H NMR homogen. Insbesondere konnte keine Verunreinigung mit anderen Tetrapyrrolen, z. B. **2**, festgestellt werden.

Assemblierung von ApophyA65 mit **4** und Belichtung: Rekombinantes HaferApophyA65^[11] (Rohlysat aus *Hansenula-polymorpha*-Hefezeilen; ^[11a] 4.5 nmol in 600 µL Phosphatpuffer, pH 7.6) wurde mit **4** (5 nmol in 1 µL DMSO) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Apoprotein-Konzentration wurde separat vor der Inkubation durch Assemblierung eines Protein-Aliquots mit einem Überschuss an **2** bestimmt.

Die Lösung des ApophyA65/**4**-Komplexes wurde mit dem Licht eines Diaprojektors bestrahlt (250 W; Abstand der Probe vom Projektor ca. 20 cm; die Anregungswellenlängen von $\lambda = 614 \pm 7$ und 714 ± 7 nm für $P_r \rightarrow P_{fr}$ bzw. $P_{fr} \rightarrow P_r$ wurden mit Hilfe von Interferenzfiltern erzeugt). Für vollständige Umsätze (maximale Absorptionswerte) der jeweiligen Form waren Belichtungszeiten von ≥ 10 min erforderlich. Die Absorptionspektren wurden mit einem Shimadzu-UV2102PC-Spektrometer aufgenommen.

Verdrängungsexperiment mit ApophyA65/**4**-Komplex und Phycocyanobilin **2**: Zu einer Probe (600 µL) der P_r -ähnlichen Form des ApophyA65/**4**-Komplexes wurde eine Lösung von **2** (1.7 nmol in 1 µL DMSO) hinzugegeben. Die Mischung wurde für einige Minuten im Dunkeln stehen gelassen, bevor erst mit Licht der Wellenlänge 653 ± 7 nm (Interferenzfilter; $P_r \rightarrow P_{fr}$) und darauf mit > 720 nm (Kantenfilter; $P_{fr} \rightarrow P_r$) bestrahlt wurde. Vor der ersten und darauf nach jeder Belichtung wurden UV/Vis-Spektren aufgenommen.

Eingegangen am 11. April 2000 [Z14972]

- [1] W. M. Schluchter, A. N. Glazer in *The Phototrophic Prokaryotes* (Eds.: G. A. Peschek, W. Löffelhardt, G. Schmetterer), Kluwer, New York, **1999**, S. 83–95.
- [2] S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Plant Cell Environ.* **1997**, 20, 700–706.
- [3] W. Rüdiger, F. Thümmler, E. Cmiel, S. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 6244–6248, zit. Lit.
- [4] S.-H. Wu, M. T. McDowell, J. C. Lagarias, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 25700–25705.
- [5] a) J. C. Lagarias, D. M. Lagarias, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5778–5780; b) T. D. Elich, J. C. Lagarias, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 12902–12908; c) T. Kunkel, K.-J. Tomizawa, R. Kern, M. Furuya, N.-H. Chua, E. Schäfer, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 215, 587–594; d) C. Hill, W. Gärtner, P. Towner, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 69–77; e) A. Ruddat, P. Schmidt, C. Gatz, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Biochemistry* **1997**, 36, 103–111.
- [6] S. E. Braslavsky, D. Schneider, K. Heihoff, S. Nonell, P. F. Aramendia, K. Schaffner, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7322–7334.
- [7] Eine $Z \rightarrow E$ Isomerisierung einer der lateralen Doppelbindungen (C-5 und C-15) wird initiiert durch eine reversible Addition eines Nucleophils an die zentrale C-10-Methingruppe vor der Photoisomerisierung: H. Falk, *The Chemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments*, Springer, New York, **1989**, S. 462–463.
- [8] a) S. H. Bhoo, T. Hirano, H.-Y. Jeong, J.-G. Lee, M. Furuya, P.-S. Song, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 11717–11718; b) A. Remberg, P. Schmidt, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 266, 201–208.
- [9] I. Lindner, B. Knipp, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 1943–1946; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1843–1846.
- [10] S. J. Davis, A. V. Vener, R. D. Vierstra, *Science* **1999**, 286, 2517–2520.
- [11] a) D. Mozley, A. Remberg, W. Gärtner, *Photochem. Photobiol.* **1997**, 66, 710–715; b) W. Gärtner, C. Hill, K. Worm, S. E. Braslavsky, K. Schaffner, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 236, 978–983; c) A. Remberg, A. Ruddat, S. E. Braslavsky, W. Gärtner, K. Schaffner, *Biochemistry* **1998**, 37, 9983–9990.
- [12] Die Methanoladdition an **2** sollte zwei C-3'-Epimere von **4** liefern.^[13] Jedoch ergaben weder das ^1H -NMR-Spektrum noch eine HPLC-Analyse einen Hinweis auf eine Heterogenität, die auf ein Epimerengemisch in der für diese Arbeit verwendeten kristallinen Probe von **4** schließen ließe. Eine Zuordnung der 3'-Konfiguration auf der Basis der vorhandenen analytischen Daten war nicht möglich.
- [13] A. Gossauer, R.-P. Hinze, R. Kutschan, *Chem. Ber.* **1981**, 114, 132–146.
- [14] Für eine Diskussion der 5Z,10Z,15Z-Konfiguration des Chromophors im P_r -Phytochrom siehe C. Kneip, P. Hildebrandt, W. Schlamann, S. E.

Braslavsky, F. Mark, K. Schaffner, *Biochemistry* **1999**, 38, 15185–15192.

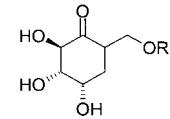
- [15] Für die Induktion von P_r - und P_{fr} -analogen In-vitro-Verschiebungen der Absorptionsbanden linearer Tetrapyrrole in organischen Lösungen siehe a) M. Stanek, K. Grubmayr, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1653–1659; b) M. Stanek, K. Grubmayr, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1660–1666.
- [16] W. Kufer, H. Scheer, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1979**, 360, 935–956.
- [17] W. J. Cole, D. J. Chapman, H. W. Siegelman, *Biochemistry* **1968**, 7, 2929–2935.
- [18] J. E. Bishop, H. Rapoport, A. V. Klotz, C. F. Chan, A. N. Glazer, P. Fuglistaller, H. Zuber, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 875–881.

Hexacyclinsäure, ein Polyketid mit neuartigem Grundgerüst aus *Streptomyces***

Regina Höfs, Martina Walker und Axel Zeeck*

Wie aus früheren Untersuchungen bekannt, bildet *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* (Stamm S1013) in Schüttelkulturen mit einem Haferflockenmedium lediglich die Carbazucker Gabosin D, **1**, und **2**.^[1] Mit Hilfe des OSMAC-Ansatzes (OSMAC=one strain/many compounds)^[2] und des chemischen Screenings^[3] sollte untersucht werden, ob sich bei diesem Stamm die Produktion neuer Metabolite induzieren lässt.

Der OSMAC-Ansatz geht von der Beobachtung aus, dass einzelne Sekundärstoffproduzenten mehr Metabolite bilden können, als sich bei der Untersuchung von Standard-Rohextrakten erkennen lässt.^[2]



1 : R=H
2 : R=COCH₃

So ist es bei den für die Sekundärstoffbildung besonders begabten Actinomyceten und Pilzen leicht, auch bei gut untersuchten Stämmen neue Naturstoffe zu entdecken, deren Biosynthese letztlich durch eine Variation der Kultivierungsparameter induziert oder gefördert wird. Dabei gibt es einen fließenden Übergang zwischen der Ausbeutesteigerung einzelner im Prinzip vorhandener und dem erstmaligen Auftreten vorher nicht nachweisbarer Metabolite. Wirkungsvoll variieren lassen sich beim OSMAC-Ansatz neben Nährmedium und Kultivierungsgefäß unter anderem Temperatur, Belüftung, pH-Wert und/oder Belichtung. Im Nährmedium spielen die Auswahl der C- und der N-Quelle sowie die Zugabe von anorganischen Salzen, Enzyminhibitoren oder

[*] Prof. Dr. A. Zeeck, Dr. R. Höfs, Dr. M. Walker
Institut für Organische Chemie, Universität Göttingen
Tammannstraße 2, 37077 Göttingen (Deutschland)
Fax: (+49) 551-399660
E-mail: azeeck@gwdg.de

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken der Hoechst AG (Frankfurt) für die Überlassung des Stammes S1013, Herrn M. Decke für die experimentelle Mitarbeit und Herrn Prof. Dr. W. Beil für die Durchführung der Zelltests.

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