
PRAXIS DER NATURWISSENSCHAFTEN

BIOLOGIE

Autoren- und Stichwortverzeichnis 1982

31. Jahrgang

Schriftleiter und Herausgeber: Dr. Karl-Heinz Scharf · Herausgeber: StDir. Prof. Klaus Dylla, StDir. Manfred Schuster,
Dr. Gerhard Trommer



AULIS VERLAG DEUBNER & CO KG

Autorenverzeichnis 1982

Autoren	Seite	Autoren	Seite
Bade, Lothar	304	Treitz, Peter	283, 350
Baer, H.-W.	359	Trommer, Gerhard, Dr.	29, 30, 200
Bässler, Ulrich, Prof. Dr.	257, 261	Ulbrich, Klaus Peter	1
Baumann, Kurt	90	Von der Dunk, Klaus, Dr.	144
Binder, Hans	118, 124	von Falkenhausen, E.	350
Birnbeck, Sigrid	154	von Hagen, Hans-H.	220
Boheim, Günther	112	Wegner, U.	268
Bolay, Eberhardt	46	Zöller, Beatrice	125
Cruse, H., Prof. Dr.	258	Zöller, Wolfgang W.	125
Denk, Dagmar	74	AULIS FÖRDERPREIS BIOLOGIE 1982	157
Diekjobst, Herbert, Dr.	238	BERICHTE	30, 90, 125, 285
Dittrich, Peter, Prof. Dr.	65	BÜCHER	31, 94, 127, 158, 191, 222, 255, 286, 319
Dylla, Klaus, Prof.	32, 39, 124, 178, 225, 228, 245, 246, 255, 284	DAS AKTUELLE UNTERRICHTSZIEL	200, 341, 373
Eulefeld, Günther Dr.	24	KURZE MITTEILUNGEN	23, 124, 159, 191, 221, 255, 282, 382
Falkenhan, Hans-Helmut Dr.	127, 221, 285	LESERBRIEFE	124, 157, 220, 285
Fischer, E. P., Dr.	97, 102	ÖKOLOGISCHE ARBEITSBLÄTTER	252, 253, 254, 280
Görlich, Frauke	314	PERSÖNLICHES	127, 381
Gottschalk, Reimund	341, 373	TAGUNGEN	96
Gotzler, Hannelore	353	TITELBILDHINWEIS	1
Gronbach, Herbert, Dr.	26		
Haußmann, Gerhard	368		
Hoppe, Hans-Joachim	278		
Kaplan, Hermann	364		
Koch, Wolfgang, Dr.	25		
Köhler, Heinrich, Dr.	161, 207		
Kölsch, A.	258, 261, 274		
Lethmate, Jürgen, Dr.	183		
Lindauer, Martin, Prof. Dr. Dr. h. c.	129		
Lowé, Bernd, Prof.	33		
Müller, Klaus	197		
Obwandner, Josef	154		
Otto, Manfred K.	106		
Poduschka, Walter, Dr.	247		
Reichart, Gerhard, Prof. Dr.	189, 193		
Reiß, Jürgen, Dr.	300		
Rolbitzki, Detlef	53		
Rösch, Roland	336		
Rost, Fritz	233		
Rüther, F., Prof. Dr.	381		
Schaefer, Gerhard, Prof. Dr.	289		
Scharf, K. H., Dr.	160		
Scheer, Hugo, Prof. Dr.	82		
Schilling, Norbert, Dr.	74		
Schmidt, Hubert	27		
Schneider, Dietrich, Prof. Dr.	138		
Schneider, Gerhard	197		
Schöne, Jürgen, Dr.	175		
Schröder, Peter, Dr.	293		
Schulte, Heinrich, Prof. Dr.	314		
Schulz, Wolfgang	197		
Schulz-Kühnel, Ute	17		
Sommer, Ulrich, Dr.	323		
Spanehl, Hans-Joachim	158		
Stabel, Hans-Henning, Dr.	330		
Stent, G. S.	102		
Storrer, Jürgen, Dr.	258, 261, 268, 274		

Stichwortverzeichnis 1982

Seite	Seite		
Abhängigkeit (Drogen)	353	Neurophysiologische Experimente	257
Alkohol	359	Neurophysiologische Schulversuche	261
Alkoholabbau	360	Nichtraucher-Aktion	371
Alkoholwirkung	361	Nistkästen (Insekten)	280
Artenschutz	228		
Assimilation (mikrobiell, Stickstoff)	161, 207	Ökologieunterricht	225
Attrappenversuche (Leuchtkäfer)	312	Ökosystem See (Stickstoffkreislauf)	15
Bienen	129	Oszillograph	263, 276
Biologiedidaktik	197		
Biologieunterricht	33, 53, 193, 289	Paarhufer (Evolution)	343
Biologische Schädlingsbekämpfung	200	Pflanzenschutz	25, 126, 282
Biomasse	301	Pheromone	138
Blinkspiel (Leuchtkäfer)	310	Phosphor	330
Delbrück, Max – Geburtstag	97, 102	Photosynthese	189, 314
Deubner, Karl August – Geburtstag	127	Physiologie (Muskelbewegung)	175
Dircksen, Rolf – Geburtstag	381	Phytochrom	82
Dissimilation (mikrobiell, Stickstoff)	161, 207	Phytoplankton (Periodizität)	323
Drogen	353	Primaten	183
Eiweißgewinnung	300	Protein	74
elektrophysiologischer Arbeitsplatz	258		
Ernährung	46	Ratten	43
Eutrophierung	336	Rauchen	364
Fließgewässer (Strömung)	293	Rauchen (Statistik)	366
Freßfeind	151	Rauchfreie Zone Schule	368
Gedächtnis	129		
Geweihtwicklung	341	Schmetterlings-Hege	252
Glühwürmchen (Blinkzeichen, Kommunikation)	304	Schülerinteressen	33
Hecke	178	Schwarzer Apollo	228
Hornentwicklung	341	Sauerstoffnachweis	314
Humanökologie	39	Seidenspinner (Entwicklung, Balzverhalten)	154
Igel (Biologie)	247	Selektionsdruck	152
Igeltod	245	Sexualverhalten (weiblich, Primaten)	183
Indigo-Methode	314	Spaltöffnungen (Funktion, Physiologie)	65
Induktion (Horn- und Geweihtwicklung)	341, 373	Stickstoff	161, 207
Insekten	138, 144, 261	Stickstoffkreislauf	1
Insektenverhalten	160	Stoffkreislauf (Bodensee)	330
Jagd	17	Stomata	65
Klob, Wolfgang, Dr. – Aulis-Preisträger	157	Sukzession	323
Kulturlandschaft (Hecke)	178		
Lebensraum Hecke	27	Tarnung	144, 151
Leistungsmotivation	53		
Lernen	129	Umwelterziehung	24
Lernmotivation	53	Umweltschutz	225
Leuchtmuster	309		
Lungenkapazität	365	Vergessen	129
Medien (Biologieunterricht)	193	Vogelgesang	29
Mediendidaktik	197		
Mehlmotten	200	Wahrnehmung	106
Mikroorganismen (Eiweißgewinnung)	300	Waldgesellschaften	238
Milbenforschung	124	Wurmkrankheiten	26
Mimese	144		
Mimikry	144	Zelle (Grenzen)	112
Molekulargenetik	118		
Muskelbewegung	175		
Mutationsgleichgewicht (Spiel)	278		
Naturschutz	17, 225		
Naturwaldzellen	233		
Neuroanatomie (Insektenmuskeln)	268		

Phytochrom

Molekulare Eigenschaften eines pflanzlichen Licht-Sinnespigments

Von Hugo Scheer

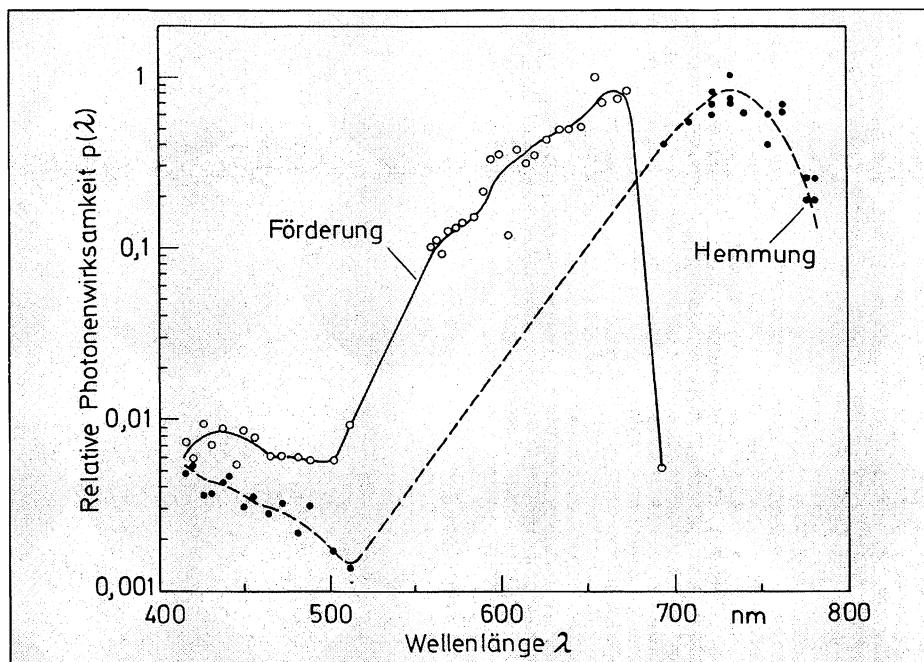
1. Einleitung

Grüne Pflanzen beziehen mittels der Photosynthese ihre Energie aus dem Sonnenlicht. Bestimmt man die Wirksamkeit der verschiedenen Wellenlängen des sichtbaren Lichts für die Photosynthese, so zeigen sich Maxima im roten (~ 680 nm) und blauen Spektralbereich (~ 430 nm), eine breite Schulter um 480 nm und eine Lücke im Bereich zwischen

etwa 500 und 600 nm (siehe Heft Nr. 4, 1980). Dieses *Aktionsspektrum* ähnelt im wesentlichen dem *Absorptionsspektrum* der Pflanzen, wobei die beiden Maxima auf die Chlorophylle zurückzuführen sind, die breite Schulter auf die Carotinoide. Diese mengenmäßig wichtigsten Blattfarbstoffe dienen damit der Photosynthese.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts mehrten sich die Hinweise, daß Pflanzen auch Lichteffekte zeigen,

Abb. 1. Logarithmische Aktionsspektren einer „klassischen“ Phytochrom-Reaktion (Keimung von Salatachänen, nach K. M. Hartmann in: „Biophysik“, Hrgb. Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H., Springer Verlag, 1978). Diese zeichnen sich dadurch aus, daß sie durch geeignete Rückbelichtung zumindest prinzipiell revertierbar sind. Die Maxima der Quantenwirksamkeit liegen im sichtbaren Bereich um 660 nm, bzw. im nahen Infrarot bei etwa 730 nm für die Rückreaktion. Diese Wellenlängen entsprechen den Absorptionsmaxima der beiden Formen P_{660} und P_{730} des Phytochroms, welche durch Licht reversibel ineinander umwandelbar sind (Abb. 3).



die von der Photosynthese unabhängige sind. Es handelt sich dabei um lichtgesteuerte Entwicklungsprozesse (Photomorphosen) und Bewegungen (Phototropismen, Photonastien, Phototaxis).

In einer großangelegten Versuchsserie gelang es vor allem Borthwick und Mitarbeitern zwischen 1945 und 1950 zu zeigen, daß viele dieser unterschiedlichen lichtgesteuerten Effekte einige auffallende Gemeinsamkeiten hatten: Rotes Licht war (wie bei der Photosynthese) besonders aktiv. Anders als bei der Photosynthese war jedoch blaues Licht vergleichsweise inaktiv. Weiterhin waren die meisten Effekte umkehrbar, wenn die rote Belichtung von einer dunkelroten Belichtung gefolgt wurde. Und schließlich war diese Hin- und Rückreaktion durch abwechselnde Belichtung mit hellrotem (hr) und dunkelrotem (dr) Licht beliebig oft wiederholbar, so daß nur die Farbqualität des zuletzt gegebenen Lichts für die physiologische Antwort entscheidend war. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wurde vermutet, daß alle Effekte durch einen gemeinsamen Rezeptor-Farbstoff gesteuert werden. Die Bedeutung dieses Rezeptor-Farbstoffs – es ist das bei

Pflanzen bisher am besten untersuchte Licht-Sinnespigment – zeigt die Vielfalt der von ihm beeinflußten pflanzlichen Reaktionen (Tabelle 1).

Obwohl dieser Farbstoff in grünen Pflanzen nur in Spuren vorkommt und erst mehr als ein Jahrzehnt später in spektroskopisch meßbaren Mengen zur Verfügung stand, wurden aufgrund der beschriebenen Befunde eine Reihe charakteristischer Eigenschaften für ihn postuliert. Das als *Phytochrom* bezeichnete Pigment sollte in zwei Formen vorkommen: Die eine absorbiert maximal bei ~ 660 nm und wurde deshalb mit P_{660} oder $P_{hr}^1)$ abgekürzt, die andere entsprechend ihrer maximalen Absorption bei ~ 730 nm mit P_{730} oder $P_{dr}^1)$. Beide Formen sollten durch Licht der geeigneten Wellenlängen reversibel ineinander überführbar sein.

Insbesondere die letzte Eigenschaft war der wichtigste Anhaltspunkt bei der folgenden schwierigen Isolierung des Phytochroms. Bei Belichtung mit 660 nm müßte die Absorption bei 660 nm ab-, die bei 730 nm zunehmen; bei anschließender Belichtung mit 730 nm sollten sich diese Änderungen wieder umkehren. Differenzmessungen dieser Art sind technisch wesentlich einfacher als die Messung der Absorptionspektren (s. Abb. 3).

Um Störungen durch Chlorophylle zu vermeiden, konzentrierten sich die Isolierungsversuche zusätzlich auf im Dunkeln gewachsene chlorophyllfreie Pflanzen, aus denen schließlich 1964 die Reindarstellung des Phytochroms gelang. Im folgenden soll ein Überblick über unser heutiges Wissen zur Struktur des Phytochroms und seiner ersten photochemischen Reaktionen gegeben werden.

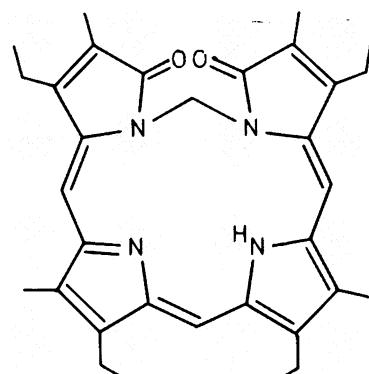
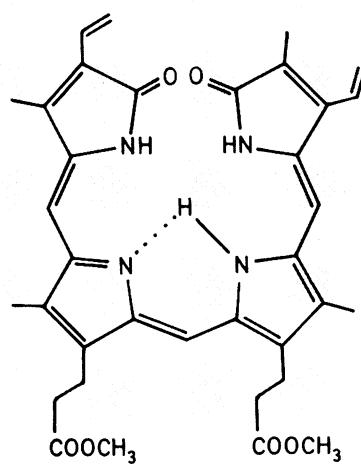
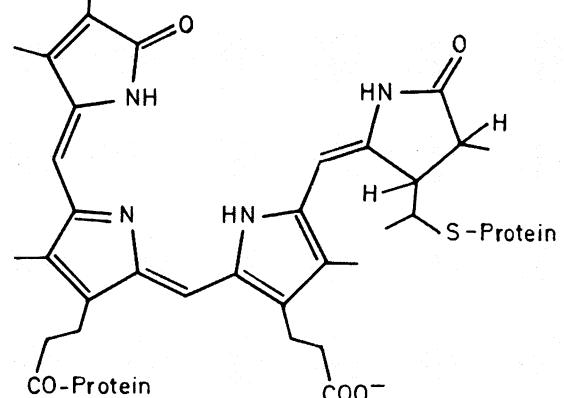
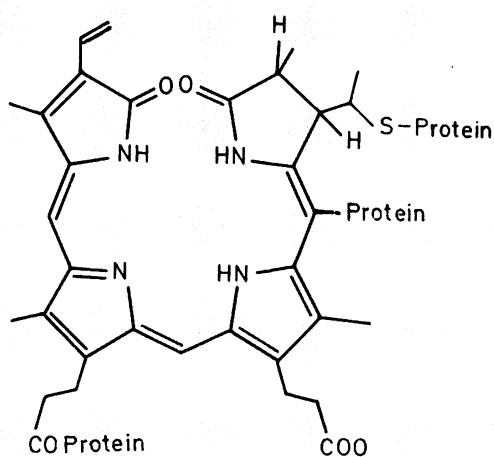
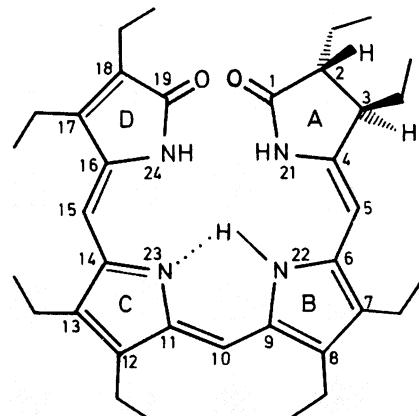
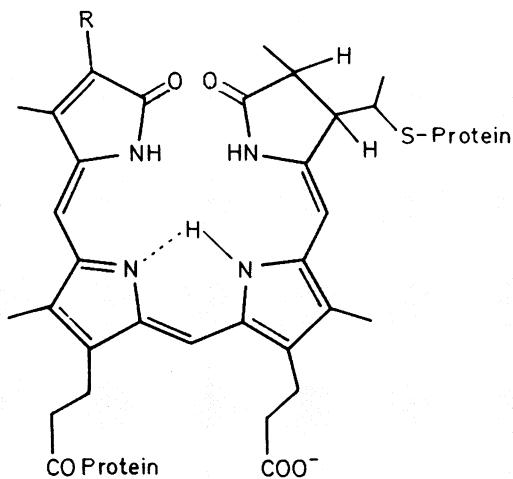
2. Struktur des Phytochroms

Phytochrom ist ein Chromoprotein. Seine farbge-

Tab. 1. Zusammenstellung einiger lichtabhängiger Reaktionen in Pflanzen, welche durch Phytochrom als Rezeptor-Pigment beeinflußt werden

Elektrische Potentialänderungen
Adhäsion von Wurzeln an Glas
Durchlässigkeit von Membranen
Chloroplasten-Orientierung
Blattbewegungen
Synthese von Enzymen
Synthese von Hormonen
Synthese von „sekundären“ Inhaltsstoffen
Längenwachstum des Sprosses
Blattflächenwachstum
Beeinflussung der geotropen Empfindlichkeit
Tageslängen-Messung und -Anpassung
Samenkeimung
Coleoptilen-Wachstum
Hakenöffnung
Einsetzen der Blütenbildung

¹⁾ „hr“ und „dr“ entsprechend der Absorption im hellroten bzw. dunkelroten Spektralbereich. In der englischen Literatur erfolgt die Bezeichnung als P_r und P_{fr} .



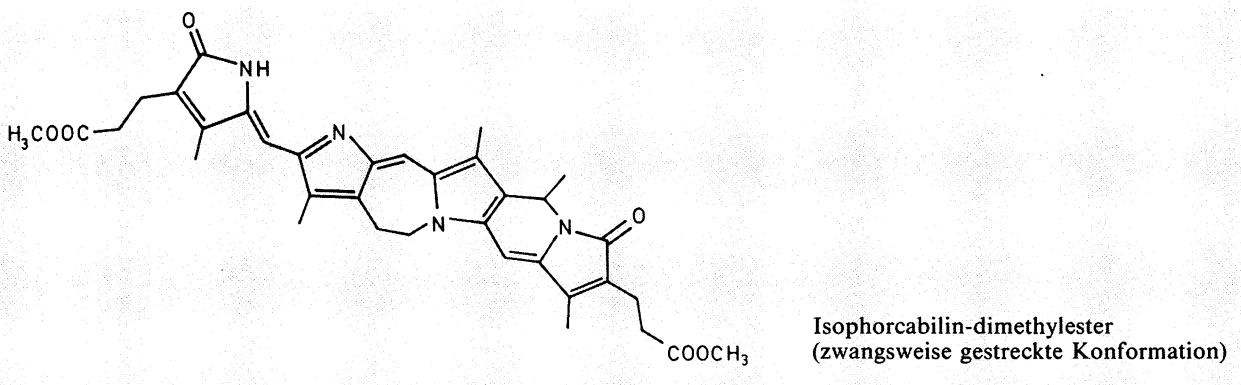


Abb. 2. Strukturformeln der Chromophore von Phytochrom in der P₆₆₀-Form, der zwei diskutierten Möglichkeiten des Chromophors der P₇₃₀-Form, und von verschiedenen Modellpigmenten. Biliverdin ist ein Abbauprodukt des Häms in Säugetieren, Phycocyanin ist ein photosynthetisches Lichtsammlerpigment in bestimmten Algen, Isophorobilin ist strukturell mit verschiedenen Schmetterlingspigmenten verwandt, und das 2,3-Dihydrooktaethylbilindion und das N₂₁, N₂₄-Methanobilindion sind synthetische Pigmente.

bende Gruppe, der *Chromophor*, ist dem des Gallenfarbstoffs *Biliverdin* strukturell ähnlich. Der sogenannte Ring A (siehe Formeln in Abb. 2) ist über ein Schwefel-Atom mit der Aminosäure Cystein des Proteins verknüpft, eine weitere Bindung besteht möglicherweise am Ring C. Die Thioäther-Bindung am Ring A ist recht stabil und lässt sich bis heute nicht ohne Veränderung des Chromophors und des Proteins spalten. Die Struktur des P₆₆₀-Chromophors wurde durch die kombinierte Anwendung von chemischen und spektroskopischen Methoden gesichert. Von entscheidender Bedeutung war dabei, daß der P₆₆₀-Chromophor große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Chromophor eines anderen Pigments hatte, welches man leicht und in großen Mengen aus Blau- und Rotlaugen isolieren kann. Dieses als *Phycocyanin* bezeichnete Pigment hat eine gänzlich andere Funktion, es ist ein Lichtsammlerpigment im Photosyntheseapparat dieser Algen. Es erwies sich jedoch als ein ideales Modell, um daran verschiedene Methoden zur Strukturuntersuchung des Chromophors auszuarbeiten.

Zu den chemischen Methoden gehört dabei vor allem der Chromsäureabbau, bei dem die vier pyrrolartigen Ringe des Chromophors voneinander gespalten werden, aber auch die Synthese von Gallenfarbstoffen mit ähnlicher Struktur. Dabei erwies sich insbesondere der Ring A, der keine Doppelbindung enthält, und die Vinylgruppe am Kohlenstoff Nummer 18 als problematisch. Die wichtigste spektroskopische Methode war lange Zeit die Absorptionsspektroskopie mit sichtbarem Licht, welche durch Vergleich mit Gallenfarbstoffen bekannter Struktur das Doppelbindungssystem festlegte. Die so ermittelten Strukturen (Abb. 2) für die Chromophore von Phycocyanin und von P₆₆₀ wurden vor kurzem durch Kernresonanzspektroskopie bestätigt. Der einzige noch nicht völlig gesicherte Punkt ist die Stereochemie an Ring A, d. h. die räumliche Anordnung der Substituenten an den Kohlenstoff-Atomen 2, 3 und 3¹.

Die gleichen Methoden, angewandt auf P₇₃₀, ergaben bisher noch keine so eindeutige Antwort. Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Untersuchung von P₇₃₀ ist, daß es sich außerordentlich leicht wie-

der in P₆₆₀ umwandelt. Es gelang jedoch kürzlich, das Protein weitgehend abzubauen, ohne dabei den P₇₃₀-Chromophor zu zerstören, so daß berechtigte Hoffnung zu einer baldigen Klärung besteht. Die einzige Veränderung gegenüber dem P₆₆₀-Chromophor scheint die Doppelbindung zwischen den Kohlenstoff-Atomen 4 und 5 zu betreffen. Sie ist entweder überhaupt nicht mehr vorhanden, oder aber weit aus der Ebene der anderen Doppelbindungen herausgedreht. Solch eine Verdrillung hat man an Gallenfarbstoffen beobachtet, die eine sorgige Gruppe an C-5 tragen. Als eine Möglichkeit für die Struktur des P₇₃₀-Chromophors wurde deshalb vorgeschlagen, daß an dieser Stelle eine Aminosäure aus dem Proteinteil des Phytochroms angelagert wird (Abb. 2). Eine solche Verdrillung findet man aber auch bei geometrischen (cis oder besser E) Isomeren von Gallenfarbstoffen, bei denen das N₂₁ nicht mehr auf der gleichen, sondern auf der entgegengesetzten Seite der Doppelbindung zwischen den Kohlenstoff-Atomen 4 und 5 steht wie das Kohlenstoff-Atom 6. Insbesondere durch die Isolierung von P₇₃₀-Peptiden ergaben sich in letzter Zeit gute Hinweise für eine solche Isomerisierung bei der Phytochrom-Umwandlung. Der Chromophor von P₇₃₀ wäre dann das E-Isomere von P₆₆₀ (Abb. 2).

Der Proteinanteil des Phytochroms hat ein Molekulargewicht von etwa 120 000. Im isolierten Phytochrom sind zwei solche Moleküle eng miteinander assoziiert, wobei zumindest eine der Polypeptidketten einen einzigen Chromophor trägt. Bei der Behandlung dieses sogenannten „großen“ Phytochroms mit Eiweiß-verdauenden Enzymen (Proteasen) zerfällt Phytochrom in zwei etwa gleich große Hälften, von denen die eine den Chromophor trägt und noch photochemisch aktiv ist, das heißt, die oben beschriebene reversible Änderung des Absorptionsspektrums zeigt. Weiterer Abbau dieses „kleinen“ Phytochroms führt sehr schnell zum Verlust der photochemischen Aktivität. Da alle Pflanzen Proteasen enthalten, erfolgt häufig bereits während der Isolierung die Spaltung zum „kleinen“ Phytochrom.

Die Struktur des Proteins ist bisher nur bruchstück-

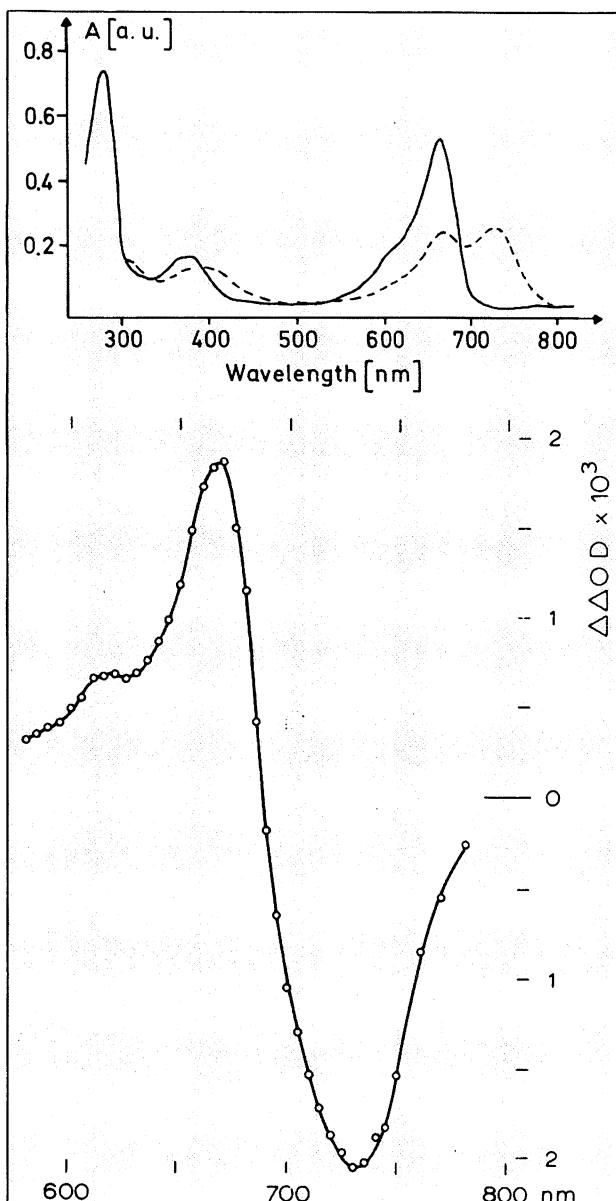


Abb. 3. Absorptionsspektren von extrahiertem Hafer-Phytochrom (nach Mumford und Jenner, Biochemistry 5, 3657 (1966)) und Absorptionsdifferenzspektrum (nach Spruit, C. J. P., in „Phytochrome“, Hrgb. Mitrakos, K., Shropshire, W. Jr., Academic Press, New York, 1972). Das Spektrum von P_{660} wurde nach saturierender Bestrahlung bei 740 nm aufgenommen (durchgezogene Linie) und entspricht im wesentlichen der Absorption von reinem P_{660} . Das Spektrum von P_{730} wurde nach saturierender Bestrahlung bei 600 nm aufgenommen (gestrichelte Linie). Da sowohl P_{660} als auch P_{730} bei 600 nm absorbieren, bildet sich ein photostationäres Gleichgewicht, welches neben P_{730} noch etwa 20% P_{660} enthält.

haft bekannt. Man kennt die Aminosäuresequenz an einem, dem N-terminalen Ende der Peptidkette, und auch die Sequenz in der Umgebung des Chromophors. Wichtig ist, daß auch von dieser Seite die Bindung des Chromophors an Cystein über ein Schwefel-Atom nachgewiesen werden konnte. Das „große“ Phytochrom hat nach elektronenmikroskopischen Daten vermutlich eine hantelförmige Gestalt, wobei die dünne Verbindung wahrscheinlich von den Proteasen durchtrennt wird. Der Chromo-

phor liegt in einer der beiden Hälften, die sich auch in ihrer Peptid-Sequenz zu unterscheiden scheinen. Er ist für wasserlösliche Substanzen zugänglich, d. h. er liegt entweder an der Oberfläche des Proteins oder aber in einer hydrophilen Tasche. Im Zusammenhang mit dem „Primärsignal“ (s. u.) gibt es eine Hypothese, nach der bei der Umwandlung von P_{660} zu P_{730} ein bisher vom Chromophor abgedecktes Stück der Proteinoberfläche frei wird, welches dann als Bindungsstelle für einen Rezeptor dient.

3. Chromophor-Protein-Wechselwirkungen

Die molekulare Struktur der Chromophore von P_{660} und – zumindest partiell – von P_{730} (Abb. 2) ist mit den oben beschriebenen Techniken eindeutig gesichert, sie gibt jedoch nur einen Teilaspekt wieder. Das wird klar, wenn man die Eigenschaften des Phytochrom-Chromophors mit denen von Gallenfarbstoffen vergleicht, die eine sehr ähnliche Struktur besitzen (Tabelle 2). Das Absorptionsspektrum (Abb. 3), die photophysikalischen und photochemischen Eigenschaften und die chemische Reaktivität unterscheiden sich so deutlich voneinander, daß man zunächst geneigt ist, an der angegebenen Struktur zu zweifeln. Dies ändert sich jedoch sofort, wenn man die dreidimensionale Struktur der Peptidkette des Phytochroms zerstört, z. B. durch Entfalten mit Harnstoff oder durch Abbau mit Proteasen. Nach dieser Behandlung ähnelt der P_{660} -Chromophor in seinen Eigenschaften weitgehend dem eines Modellpigments, 2,3-Dihydrooktaethylbilindion (DOEBD), mit einem dem P_{660} sehr ähnlichen Konjugationssystem. Obwohl er weiterhin kovalent an das Protein gebunden ist, verhält er sich dennoch jetzt wie ein freier Gallenfarbstoff. Offenbar bestehen in dem nativen Protein mit intakter dreidimensionaler Struktur sehr spezifische Wechselwirkungen mit dem Chromophor. Eine Störung dieser Raumstruktur führt zu einer drastischen Veränderung der Eigenschaften.

Auch bei der Untersuchung dieser Wechselwirkungen halfen vergleichende Untersuchungen mit dem Phycocyanin. Bei diesem bestehen ganz ähnliche

Tab. 2. Vergleich der Chromophor-Eigenschaften von nativen Biliproteinen (Phytochrom, Phycocyanin) mit denen der denaturierten Pigmente und freier Gallenfarbstoffe mit vergleichbarer Struktur

	Freie Gallenfarbstoffe, denaturierte Biliproteine	Native Biliproteide
Absorptions-spektrum	Breite Banden, intensive UV-Bande, weniger intensive sichtbare Bande	Scharfe Banden, UV-Bande wenig intensiv, sichtbare Bande intensiv
Photochemie	Vorwiegend strahlungslose Desaktivierung, geringe Quantenausbeute und der photochemischen Reaktionen	Hohe Quantenausbeute der Fluoreszenz bzw. der Phototransformationen
Komplexie-rung mit Me-tallen (Zn^{++})	Augenblickliche Inert-Komplexierung bei RT und neutralem pH	

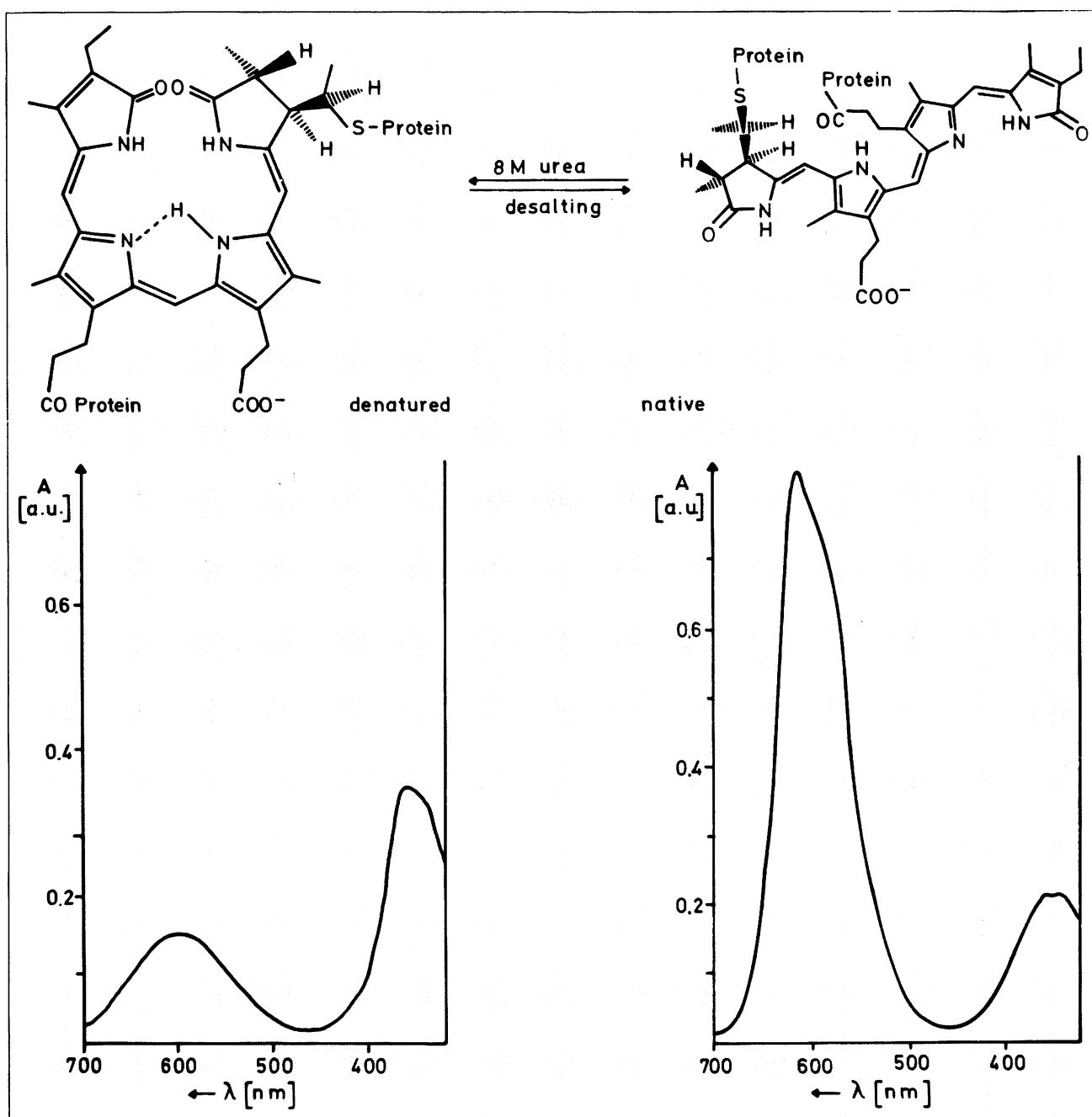


Abb. 4. Absorptionsspektren von denaturiertem und nativem Phycocyanin (nach Scheer, H., Angew. Chem. 93, 230 (1981)). Die Denaturierung erfolgte durch Zugabe von Harnstoff bei pH 7,5 bis zu einer Endkonzentration von 8 M, sie ist umkehrbar durch entfernen des Harnstoffs. Die entsprechenden Spektren von Phytochrom in der P₆₆₀-Form sind sehr ähnlich, aber um 20–40 nm rotverschoben. Die gezeigten Formeln zeigen schematisch die Geometrie des Tetrapyrrol-Chromophors in dem nativen bzw. denaturierten Pigment.

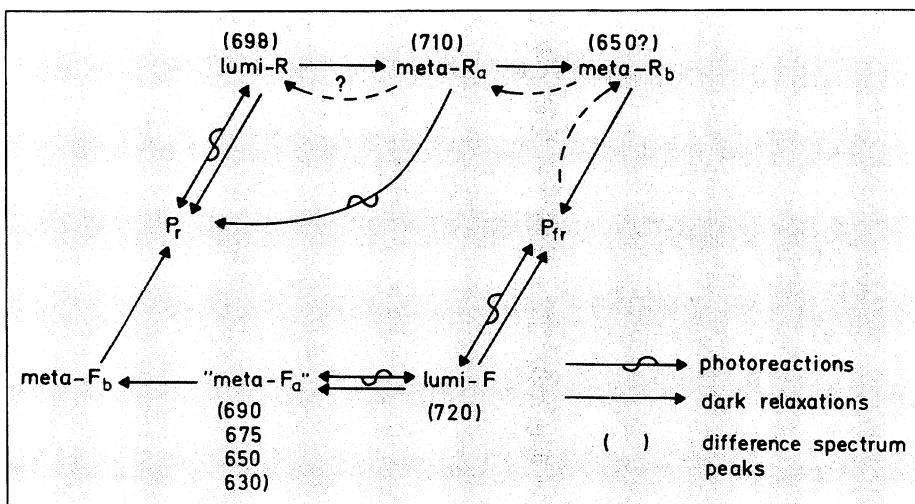
Unterschiede zwischen den Eigenschaften der Chromophore in den nativen und den denaturierten Pigmenten. Von Vorteil ist dabei, daß diese Entfaltung reversibel ist und das rückgefaltete Pigment in allen Eigenschaften mit nativem Phycocyanin identisch ist.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den denaturierten und nativen Pigmenten besteht in der Geometrie der Chromophore (Abb. 4). Freie Gallenfarbstoffe vom Typ der P₆₆₀- und Phycocyanin-Chromophore bevorzugen eine geschlossene Geometrie. Sie ähnelt der der cyclischen Tetrapyrrole wie z. B. Häm und Chlorophyll und zeichnet sich durch ein charakteristisches Absorptionsspektrum

aus. Diese Geometrie nehmen auch die Chromophore von P₆₆₀ und Phycocyanin ein, wenn sie vom Protein entkoppelt sind. In den nativen Pigmenten ist der Chromophor dagegen gestreckt. Das dafür charakteristische Absorptionsspektrum (Abb. 4) wurde ursprünglich nur durch theoretische Berechnungen mit einer gestreckten Geometrie korreliert. Die spätere experimentelle Bestätigung zeigt die Bedeutung solcher Computer-Simulationen. Diese Bestätigung gelang durch die Untersuchung von Gallenfarbstoffen, in denen bestimmte Geometrien des ansonsten sehr beweglichen Gallenfarbstoffgerüsts durch zusätzliche Ringe stabilisiert sind. Interessanterweise sind Verbindungen vom Typ des Iso-

Abb. 5. Reaktionsschema der Phytochrom-Umwandlung mit den Zwischenprodukten und ihren Absorptionsmaxima im sichtbaren Spektralbereich (nach W. Rüdiger, H. Scheer in „Handbuch der Pflanzenphysiologie“, Hrgb. W. Shropshire, jr., H. Mohr, Springer Verlag, im Druck). Die Nomenklatur der Zwischenprodukte entspricht denjenigen des Sehpigments Rhodopsin. Die Zwischenprodukte auf dem Weg von P_{660} ($= P_R$) nach P_{730} werden mit „R“ gekennzeichnet, diejenigen auf dem Weg von P_{730} ($= P_{fr}$) nach P_{660} mit „F“. Häufig werden die Zwischenprodukte auch nur durch ihr Absorptionsmaximum gekennzeichnet, z. B. P₆₉₂

für lumi-R. Es sei an dieser Stelle nur darauf hingewiesen, daß sich P_{730} auch im Dunkeln in P_{660} umwandelt („Dunkelrevision“), und daß sich an die in Abb. 5 gezeigten schnellen Reaktionen noch eine Reihe langamerer Schritte anschließen können. Schließlich ist die genaue Lage der Absorptionsmaxima, auch derer von P_{660} und P_{730} , noch von einer Reihe von „Umweltfaktoren“ (pH, Ionenkonzentration, Pflanzenmaterial und -zustand u. v. a.) abhängig.



phorobilins, welches eine gestreckte Geometrie hat, ebenfalls Naturprodukte und wurden aus Raupen und Schmetterlingen, z. B. des Kohlweißlings, isoliert.

Eine funktionelle Bedeutung dieser Streckung von P_{660} und Phytochrom liegt wohl darin, daß dadurch ihre Lichtabsorption im physiologisch wichtigen sichtbaren Spektralbereich auf etwa das Fünffache erhöht wird.

Auch die zweite wesentliche Änderung der Eigenschaften der nativen Chromophore ist von funktioneller Bedeutung. Sie besteht in der Stabilisierung des nach Lichtabsorption erreichten angeregten Zustands. In freien Gallenfarbstoffen wird die darin enthaltene Energie zum allergrößten Teil in Molekülschwingungen und/oder Verschiebungen beweglicher Wasserstoff-Atome (NH) umgesetzt. Die Lichtenergie wird damit letztlich in Wärme umgewandelt, ohne die auch für ein Sinnespigment notwendige nützliche Arbeit geleistet zu haben. Im Phytochrom sind diese „nutzlosen“ Desaktivierungskanäle verstopft, und statt dessen erfolgt in guter Ausbeute eine photochemische Reaktion als erster in der langen Reihe von Reaktionsschritten, die schließlich zur physiologischen Antwort führen. Ein Weg zum „Verstopfen der nutzlosen Kanäle“ besteht darin, die Beweglichkeit des Chromophors und der aciden NH-Atome einzuschränken. Auch hier ließ sich an freien Gallenfarbstoffen zeigen, daß solche Einschränkungen die Lebensdauer angeregter Zustände zum Teil drastisch erhöhen, ohne daß die Details bisher vollständig verstanden sind.

Wie schon bei der Struktur, ist auch bei den Protein-Wechselwirkungen die zweite Form des Phytochroms, P_{730} , noch nicht so gut verstanden wie P_{660} . Die Änderungen scheinen hier noch wesentlich tiefgreifender zu sein, und der labilere P_{730} -Chromophor erschwert wiederum die Untersuchungen. Besonders auffallend ist die extreme langwellige Verschiebung der Absorption von nativem im Vergleich zum denaturiertem P_{730} , welche mehr als 120 nm beträgt. Immerhin gibt es auch hier eine Beob-

achtung an freien Gallenfarbstoffen, die das Absorptionsspektrum des nativen P_{fr} erklären kann. Entfernt man durch Behandeln mit Basen eines der NH-Protonen (vermutlich aus dem Ring A), so ist das Absorptionsmaximum des entstehenden Anions um etwa 170 nm weit in den längerwelligen Spektralbereich verschoben. Es ist deshalb möglich, daß im nativen P_{fr} der Chromophor in deprotonierter Form vorliegt (Abb. 2).

4. Von P_{660} zu P_{730} und zurück

Die Umwandlung von P_{660} in P_{730} ist eine Mehrstufigenreaktion. Nur der erste Teilschritt oder die ersten beiden Teilschritte sind dabei lichtabhängig. Die folgenden Schritte erfolgen bei Raumtemperatur spontan, nicht jedoch bei tiefen Temperaturen. Dies ermöglicht eine Untersuchung der Zwischenprodukte: Die eingefrorene Probe wird bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs belichtet, das entstehende sogenannte lumi-R als das primäre Photoprodukt kann bei dieser Temperatur mangels ausreichender thermischer Aktivierung nicht weiterreagieren und sammelt sich so – im Gleichgewicht mit P_{660} – an. Wird die Probe jetzt langsam erwärmt, so erfolgt oberhalb von -70° die Umwandlung in das zweite Zwischenprodukt $meta-R_a$. Beim weiteren Erwärmen entsteht daraus $meta-R_b$, welches schließlich oberhalb $-5^\circ C$ das Endprodukt P_{730} bildet.

Von P_{730} ausgehend erreicht man auf die gleiche Weise bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs photochemisch erst lumi-F, welches beim Erwärmen nacheinander $meta-F_a$, $meta-F_b$ und schließlich wieder P_{660} bildet. Bei Raumtemperatur sind die im ersten photochemischen Schritt folgenden Reaktionen nur durch Kurzzeit-Spektroskopie zu erfassen, die bisherigen Ergebnisse bestätigen aber prinzipiell die oben angegebene Reihenfolge der Produkte (Abb. 5).

Die oben angegebene Benennung der Zwischenprodukte darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß ihre Strukturen bisher nur sehr unvollständig bekannt

sind. An dieser Stelle sollen nur zwei Ansätze zu ihrer Untersuchung angedeutet werden. Der erste befaßt sich mit Proben, denen Wasser entzogen wurde. Ein natürliches System dieser Art sind z. B. die Samen vieler Arten. Künstlich läßt sich Phytochrom mehr oder minder stark entwässern, wenn man es in Gelatine einbettet und diese dann teilweise oder vollständig trocknet. Unter solchen Bedingungen zeigt Phytochrom auch in lebenden Organismen wie den erwähnten Samen recht ungewöhnliche Eigenschaften, die man aber im Prinzip alle dadurch erklären kann, daß die oben beschriebene Reaktionsfolge nur unvollständig ablaufen kann und bereits bei den Zwischenstufen stehengebliebt. Die Entwässerung wirkt damit ähnlich wie tiefe Temperaturen. Man hat daraus geschlossen, daß die ersten Teilschritte in einer alleinigen Reaktion des Chromophors bestehen, daß an den Folgereaktionen jedoch auch das Protein beteiligt ist. Das wird verständlich, wenn man an die beschriebene starke Kopplung zwischen Chromophor und Protein denkt. Jede Veränderung des Chromophors führt zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen beiden, auf die das Protein mit einer Strukturänderung reagiert – wenn es kann. Bei Temperaturen wesentlich unter Null oder im entwässerten Pigment ist dies nicht mehr möglich, und so kommt die Reaktionsfolge zum Stillstand. Dies macht gleichzeitig verständlich, daß häufig nicht die trockenen, wohl aber gewässerte und gequollene Samen phytochromabhängige Lichteffekte zeigen.

Die zweite Untersuchungsmethode befaßt sich mit der optischen Aktivität des Chromophors. Das Molekülgerüst der Gallenfarbstoffe ist prinzipiell sehr flexibel, im nativen Phytochrom sind aber nur eine oder wenige der vielen prinzipiell möglichen geometrischen Formen durch die Wechselwirkungen mit dem Protein quasi eingefroren. Eine wichtige und leicht zugängliche – wenn auch nicht immer leicht interpretierbare – Eigenschaft, die dabei verändert wird, ist die optische Aktivität der Chromophore. Viele der möglichen Anordnungen des Tetrapyrrol-Gerüsts sind chiral, d. h. sie können – wie die beiden Hände = griechisch cheiros – nicht mit ihrem Spiegelbild zur Deckung gebracht werden. Ein Beispiel dafür ist die in Abb. 2 gezeigte cyclische Form des Biliverdins. Da sich die beiden endständigen Sauerstoff-Atome gegenseitig behindern, wird eines von ihnen unter oder über die Papierebene gedrängt, und es entsteht ein schraubenförmig gewundenes Molekül. Mit gewöhnlichem (d. h. nicht polarisiertem) Licht ist nicht zu entscheiden, ob sich dabei eine rechts- oder linksgängige Schraube gebildet hat. Dies ist jedoch mit polarisiertem Licht möglich, welches selbst chiral ist. So wird je nach Schraubensinn entweder rechts- oder links-circular polarisiertes Licht stärker als das andere absorbiert. Die Messung des resultierenden Circulardichroismus ermöglicht somit Aussagen zur räumlichen Struktur des Chromophores.

Nun sind selbstverständlich beim Biliverdin im allgemeinen beide helicalen Formen – die rechts- und linksgängige – gleich wahrscheinlich, und der Circulardichroismus ist gleich Null. Dies ändert sich jedoch in einer chiralen Umgebung, z. B. beim Auflösen in einem optisch aktiven Lösungsmittel. Der

Phytochrom-Chromophor ist asymmetrisch substituiert, und er befindet sich zusätzlich in einer chiralen Umgebung, dem Protein. Es ist deshalb nicht überraschend, daß Phytochrom einen ausgeprägten Circulardichroismus zeigt.

Ähnlich wie die Absorption kann nun der Circulardichroismus herangezogen werden, um die räumliche Struktur der Zwischenprodukte zu analysieren, wobei auch hier theoretische Rechnungen Hilfestellungen leisten können. P_{660} und P_{730} zeigen dabei entgegengesetzte optische Aktivität, offenbar erfolgt bei der Umwandlung der beiden Formen auch einen deutlichen geometrischen Veränderung des Chromophores. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ist, daß alle untersuchten Zwischenreaktionen von einer Änderung des Circulardichroismus begleitet sind und daß bei einem Zwischenprodukt keine oder nur geringe optische Aktivität beobachtet wird, d. h. daß diese Form möglicherweise planar ist.

5. Von der Photochemie zur Physiologie

Ursache und Wirkung sind bei den klassischen Phytochrom-Effekten eindeutig über das Wirkungsspektrum korreliert. Auch eine Reihe anderer – der sogenannten Hochenergie – Reaktionen mit deutlich verschiedenen Wirkungsspektren ließen sich nach einer detaillierten Analyse im wesentlichen auf dieses Pigment zurückführen. Da es bis jetzt keine Hinweise auf unterschiedliche Phytochrom-Formen in einem Organismus gibt, erhebt sich die Frage, wie die Fülle der physiologischen Antworten ursächlich mit der photochemischen Umwandlung dieses einen Pigments verknüpft sind.

Die gebildeten Signalübertragungs- und Reaktionsketten können dabei sehr lang und tiefgreifend sein. In exemplarischen Fällen wurden sie bis zur Ebene des genetischen Materials verfolgt, wobei Phytochrom in noch ungeklärter Weise die Gen-Expression reguliert. Eine solche Reaktion erfordert Zeiten im Bereich von Stunden oder länger. Andererseits erfolgt in vielen Fällen die physiologische Antwort so schnell, daß andere Regulationsmechanismen vorliegen müssen. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, daß die Änderung bestimmter Membraneigenschaften wie z. B. ihre Durchlässigkeit für Metallionen oder organische Säuren an solchen schnellen Reaktionen beteiligt sind. Zudem konnte auch für viele der „langsam“ physiologischen Antworten gezeigt werden, daß sie bereits kurze Zeit (u. U. wenige Sekunden) nach der Umwandlung des Phytochroms nicht mehr durch eine Rückbelichtung in die Ausgangsform revertierbar sind. Offenbar erfolgt dabei eine sehr schnelle Ableitung des Signals vom Entstehungsort, die zu irreversiblen Änderungen führt.

Für die hier im Vordergrund stehende Frage nach den molekularen Eigenschaften des Phytochroms ist der erste Ansatzpunkt zu einer Analyse dieser Reaktionsketten die Untersuchung von P_{660} und P_{730} auf unterschiedliche Eigenschaften (Tab. 3). Der augenfälligste Unterschied zwischen beiden ist das Absorptionsspektrum, welches aber für die Signalübertragung wohl kaum in Frage kommt. Überraschenderweise dauerte es lange Zeit, weitere Unterschiede zwischen P_{660} und P_{730} eindeutig nachzu-

Tab. 3. Zusammenstellung einiger physikalisch-chemischer Unterschiede zwischen isoliertem Phytochrom in der P₆₆₀ bzw. der P₇₃₀ Form

	P ₆₆₀	P ₇₃₀
Absorptionsspektrum	$\lambda_{\max} = 660 \text{ nm}$	730 nm
Circulardichroismus	negativ bei 660 nm (im Proteinbereich < 280 nm fast unverändert)	positiv bei 730 nm
Chromophor-Ladung	neutral	negativ
leicht modifizierbare Aminosäuren	ein leicht zugängliches Cystein und Histidin mehr in P ₇₃₀	
Molekulargewicht	240 000 (Dimer)	zusätzlich höhermolekulare Anteile
Adsorption an Cibachrom-Blau Membranbindung	mäßig	gut
	mäßig	gut, unspezifisch (?)

weisen, und bis heute gelang es nicht, auch nur eine dieser Eigenschaften direkt mit der Signalübertragung zu korrelieren. Immerhin ergaben sich einige erfolgversprechende Ansätze, die abschließend kurz diskutiert werden sollen.

Die weiter oben beschriebenen Experimente zur Struktur der Zwischenprodukte bei der Phytochrom-Umwandlung legen nahe, daß in den Endprodukten neben dem Chromophor auch bereits das Protein geändert ist. Solche Änderungen ließen sich vor kurzem durch die Titration mit spezifischen Modifizierungsreagentien direkt nachweisen. Im P₇₃₀ sind jeweils ein leicht zugänglicher Cystein- und Histidin-Rest mehr als im P₆₆₀ enthalten. Daneben ändert sich, wie bereits beschrieben, möglicherweise auch der Ladungszustand des Chromophors. Diese Änderungen führen allerdings weder zu meßbaren Unterschieden von P₆₆₀ und P₇₃₀ bei der Elektrophorese, noch beeinflußt die chemische Modifizierung der bei der P₇₃₀-Bildung „freiwerdenden“ Aminosäuren die photochemische Reaktion. Dagegen ändert sich deutlich die Affinität zu verschiedenen Substraten, was auch bereits präparativ genutzt wird. Insbesondere scheint P_f bevorzugt an Mem-

branen zu binden. Die Bindungsstelle im Protein könnte dabei durch eine geometrische Änderung des Chromophors bei der P_f-Bildung freigelegt werden.

Der oder die genaue(n) Bindungspartner in der Membran sind noch nicht bekannt, und es ist nicht klar, ob diese Bindung in allen Fällen funktionell von Bedeutung ist. Eine Bindung an so komplexe Systeme wie Membranen könnte jedoch gut die „schnellen“ Phytochrom-Antworten, die Signalverstärkung und – über unterschiedliche Bindungsorte – die Vielzahl der Reaktionen erklären. Der derzeit vielleicht beste Hinweis auf eine Primärwirkung auf Membranen ist die Beobachtung, daß isoliertes Phytochrom beim Zusatz zu isolierten Mitochondrien an diese bindet und bei Belichtung den Ca⁺⁺-Ionenfluß durch deren innere Membran erhöht. Da der Ca⁺⁺-Spiegel bei vielen Regulationen eine Rolle spielt, hat man damit vielleicht erstmals ein wesentliches Bindeglied der phytochromgesteuerten Regulationsketten in der Hand. Der nächste Schritt wäre dann die Identifizierung des bzw. der Rezeptoren(en) in der Membran, z. B. durch die Isolierung von Phytochrom-Rezeptor-Komplexen. In vivo in P₇₃₀ umgewandeltes Phytochrom enthält neben dem „Dimeren“ noch einen Anteil mit wesentlich höherem Molekulargewicht. Die Möglichkeit, daß es sich dabei um einen solchen Rezeptor-Komplex handelt, könnte ein Ausgangspunkt für solche Untersuchungen sein.

Literatur

- [1] Hartmann, K. M., Haupt, W. in Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H., Biophysik, Springer, Berlin 1978, S. 449
- [2] Rüdiger, W., Struct. Bonding (Berlin) 40, 101 (1980)
- [3] Rüdiger, W., Scheer, H., in Shropshire, W. Jr., Mohr, H., Encyclopedia of Physiology, New Series, Springer, Berlin, im Druck
- [4] Mohr, H., Schopfer, P., Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 3. Aufl. Springer, Berlin 1978
- [5] Smith, H., Phytochrome and Photomorphogenesis. McGraw-Hill, London 1975

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Hugo Scheer, Bot. Inst. der Universität München, Menzinger Str. 67, 8000 München 19