

Struktur- und Zellbiologie

Detaillierte Einblicke in die Umwandlung von Blaulichtsignalen

Jung, Astrid; Domratcheva, Tatiana; Schlichting, Ilme

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg

Abteilung - Biomolekulare Mechanismen

Korrespondierender Autor

Schlichting, Ilme, E-Mail: ilme.schlichting@mpimf-heidelberg.mpg.de

Zusammenfassung

Viele Organismen besitzen Photorezeptoren, um sich wechselnden Lichtverhältnissen anpassen zu können. Die Photorezeptorfamilie der Phototropine und die erst kürzlich entdeckten BLUF (sensor of **blue light using FAD**)-Photorezeptoren regulieren eine Reihe wichtiger zellulärer Prozesse in Abhängigkeit von Blaulichtsignalen. Durch quantenchemische und strukturelle Untersuchungen konnten am MPI für medizinische Forschung wichtige Einblicke in die Funktion dieser Lichtschalter gewonnen werden.

Abstract

*Many organisms exhibit photoreceptors in order to adapt to changing light conditions. The photoreceptor family of phototropins and the only recently identified BLUF (sensor of **blue light using FAD**) photoreceptors control a number of interesting cellular processes depending on blue light signals. By quantum chemical and structural investigations, important insights into the mechanism of function of these light switches have been gathered at the Max Planck Institute for Medical Research.*

Licht ist ein lebenswichtiger physikalischer Faktor und wird von Organismen über Photorezeptoren wahrgenommen

Licht dient nicht nur als Energiequelle für die Kohlenstoff-Fixierung (Photosynthese), sondern fungiert auch als Signal. Neben dem Sehsinn spielen Lichtsignale bei Säugern auch eine wichtige Rolle in weniger offensichtlichen Prozessen wie der Synthese von Vitamin D, der Schlafregulation oder dem Einstellen der inneren Uhr. Pflanzen und Mikroorganismen nutzen Lichtsignale, um ihre Umwelt zu erfassen und so ihren Stoffwechsel an wechselnde Bedingungen anzupassen.

Zur Lichtwahrnehmung hat die Natur eine Reihe von Photorezeptoren hervorgebracht, die auf Licht verschiedener Wellenlänge und Intensität reagieren (zur Übersicht siehe [1]). Funktionelle Photorezeptoren sind Proteine, die ein Chromophor als Kofaktor binden. Chromophore sind durch alternierende Einfach- und Doppelbindungen (π -Elektronensysteme) gekennzeichnet und absorbieren deshalb Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums. Die Aufgabe des Proteins besteht in der Modulation der Eigenschaften des gebundenen Chromophors und in der Weiterleitung des rezipierten Lichtsignals. Photorezeptoren sind Schaltermoleküle. Sie existieren in zwei Hauptzuständen (**Abb. 1**): einem dunkeladaptierten Grundzustand und einem lichtinduzierten Signalzustand, der stabil genug ist, eingegangene Lichtsignale an Effektoren weiterzuleiten, bevor das System wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Der gerichtete, lichtabhängige Wechsel zwischen diesen beiden Zuständen wird als Photozyklus bezeichnet.

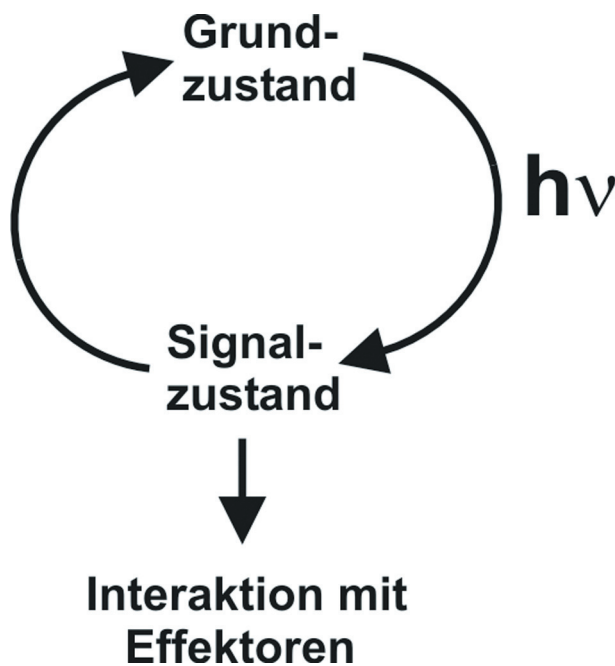


Abb. 1: Photozyklus: Ein funktioneller Photorezeptor kann zwischen zwei Hauptzuständen wechseln, einem dunkeladaptierten Grundzustand und einem lichtinduzierten Signalzustand. Letzterer ist für die Umwandlung des Lichtsignals in eine biologische Information verantwortlich. $h\nu$ bezeichnet die Energie eines Lichtteilchens.

Urheber: Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Quantenchemische Berechnungen erlauben eine Charakterisierung der initialen Prozesse der Lichtwahrnehmung bei Phototropinen

Die Photorezeptorforschung am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung konzentriert sich derzeit auf Systeme, die Flavine als Chromophor nutzen und daher spezifisch für Blaulicht sind. Die pflanzlichen Phototropin-Proteine bilden eine solche Familie von Blaulichtrezeptoren. Sie enthalten zwei unabhängige Rezeptoreinheiten, die sog. LOV (Light-Oxygen-Voltage)-Domänen. Jede dieser beiden Einheiten bindet ein FMN (Flavin-Mononukleotid)-Molekül als Chromophor.

In Photorezeptoren bewirkt die Lichtabsorption zunächst eine Veränderung des elektronischen Zustands des Chromophors und damit einen Übergang des Rezeptors in eine angeregte, reaktive Form. Letztere induziert dann weitere Änderungen im Proteinanteil des Photorezeptors, die zur Ausbildung des Signalzustands führen. Daher ist die Kenntnis sowohl der Raumstrukturen der verschiedenen funktionellen Zustände des Proteins [2] als auch der elektronischen Struktur des angeregten Chromophors ein wichtiger Schlüssel zum Verständnis der Lichtwahrnehmung. Zur Analyse lichtbedingter Veränderungen der elektronischen Struktur des Chromophors in Phototropinen wurden quantenchemische Berechnungen durchgeführt (Abb. 2). Das Wissenschaftlerteam um Ilme Schlichting konnte zeigen, dass bei der Ausbildung des Signalzustands in LOV-Domänen zwei Prozesse gleichzeitig stattfinden: die Bewegung eines Wasserstoffatoms (Proton und Elektron) und die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Chromophor und dem Proteinanteil des Photorezeptors [2, 3]. Durch diese Bindung steht der Photorezeptor im Signalzustand unter Spannung. Die Entspannung des Systems und damit seine Rückkehr in den Grundzustand wird entsprechend durch die Dissoziation der Bindung eingeleitet.

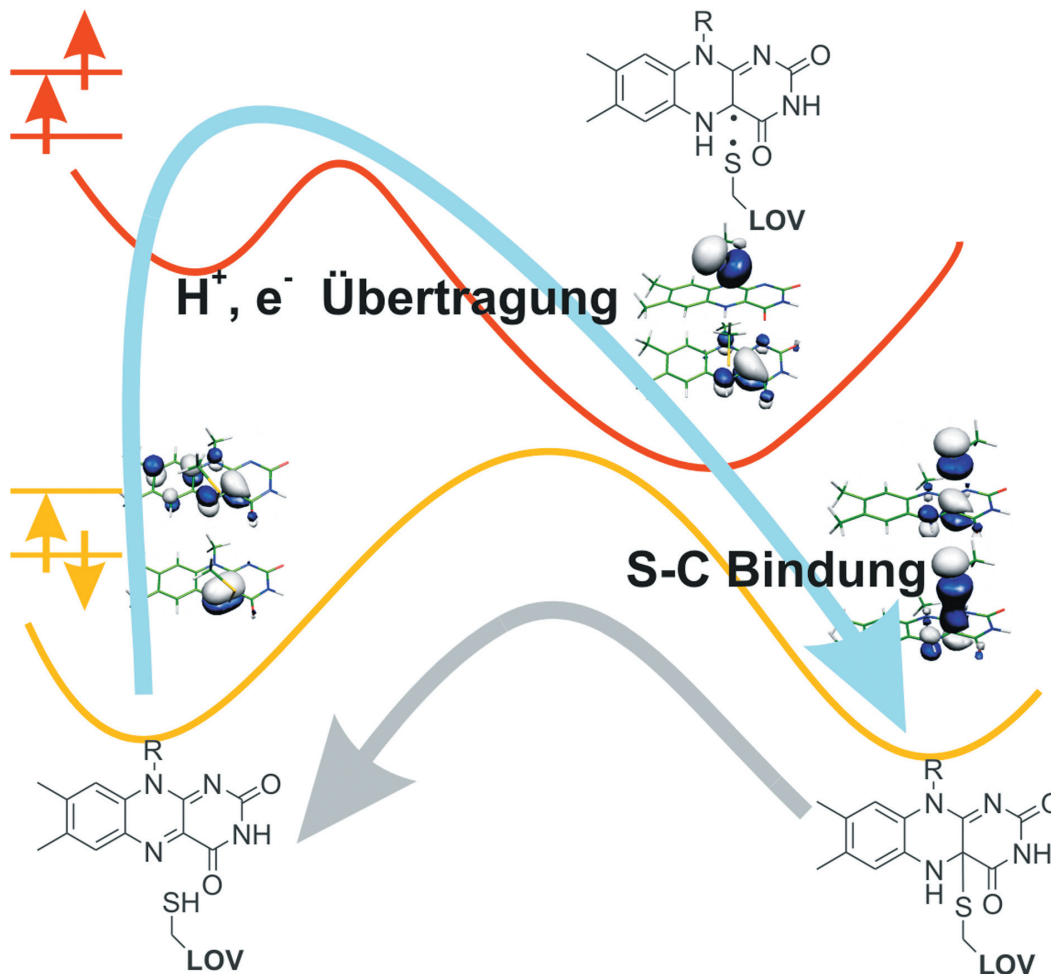


Abb. 2: Quantenchemische Berechnungen führen zum Energiediagramm und der elektronischen Struktur des Flavin-Kofaktors in Phototropin-LOV-Domänen. Die Photoreaktion zwischen dem Flavinring und einem benachbarten Cysteinrest (Proteinanteil des Photorezeptors) erfolgt über einen Radikal-Mechanismus (blauer Pfeil). Nach Absorption eines Blaulichtphotons übernimmt der angeregte Chromophor-Kofaktor ein Proton und ein Elektron vom Cysteinrest, was zur Ausbildung einer instabilen, biradikalen Struktur führt. Als Konsequenz gehen Flavinring und Cysteinrest eine kovalente Bindung ein, die den Signalzustand des Photorezeptors kennzeichnet. Der Proteinanteil erleichtert dann die Dissoziation dieses kovalenten Addukts, und der Photorezeptor kehrt in seinen Grundzustand zurück (grauer Pfeil).

Urheber: Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

In Bakterien und niederen Eukaryonten modulieren die erst kürzlich entdeckten BLUF-Photorezeptoren eine Reihe zellulärer Prozesse in Abhängigkeit von Blaulichtsignalen

BLUF (sensor of blue light using FAD)-Domänen enthaltende Proteine bilden eine weitere Blaulichtrezeptorfamilie, die erst kürzlich identifiziert wurde. Diese lichtempfindliche Domäne umfasst circa 120 Aminosäurereste und bindet FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) als Chromophor. BLUF-Proteine kontrollieren eine Reihe lichtabhängiger Prozesse in Prokaryonten und niederen Eukaryonten, darunter die Transkription von Photosynthesegenen, den Metabolismus zyklischer Nukleotide sowie die Motilität einiger pathogener Mikroorganismen wie *Salmonella typhimurium*. Man unterscheidet kurze BLUF-Proteine, die neben der lichtempfindlichen BLUF-Domäne einen kleinen zusätzlichen Abschnitt enthalten, über den möglicherweise die Interaktion mit unabhängigen Effektoren erfolgt (Abb. 3). Dagegen liegen bei sog. komplexen BLUF-Proteinen der Photosensor und die Effektoren auf derselben Polypeptidkette (Abb. 3). BLUF-Domänen kommen häufig in Verbindung mit Effektoren vor, die im Nukleotid-Stoffwechsel eine Rolle spielen.



kurzes BLUF-Protein



komplexes BLUF-Protein

Abb. 3: Zwei Klassen von BLUF-Proteinen: Kurze BLUF-Proteine besitzen neben der Rezeptoreinheit nur einen kleinen weiteren Abschnitt (gelb), während der BLUF-Lichtsensoren in komplexen BLUF-Proteinen mit Effektoren (weiße Formen) verknüpft ist.

Urheber: Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Die Interaktion von BLUF-Photorezeptoren mit ihren nachgeordneten Effektoren wird vom Chromophor vermittelt

Wie funktioniert nun die lichtabhängige Kommunikation zwischen BLUF-Lichtrezeptoren und ihren Effektoren oder mit anderen Worten, auf welche Weise überführen BLUF-Einheiten Blaulicht in biologische Information?

Erste Antworten auf diese Frage erlaubte die Ermittlung der dreidimensionalen Struktur eines BLUF-Proteins in seinem Grundzustand am Heidelberger Max-Planck-Institut für medizinische Forschung. Der Photorezeptor weist eine sehr kompakte Gestalt auf und zeigt einen neuartigen Modus der Bindung von Flavin-Adenin-Dinukleotid [4]. Während das lichtabsorbierende Ringsystem von FAD fest in einer Tasche zwischen zwei Helices der BLUF-Domäne bindet, ragt der Adenosin-Monophosphat-Teil (AMP) des FAD-Moleküls aus der Domäne heraus in das Lösungsmittel (**Abb. 4A**). Zusammen mit einer Reihe biochemischer Beobachtungen legt diese röntgenkristallographisch ermittelte Struktur folgendes Modell für die Weiterleitung von Blaulichtsignalen nahe: Der Chromophor vermittelt die Interaktion zwischen BLUF-Photorezeptor und seinem Effektor, indem er wie ein Anker wirkt (**Abb. 4B**). Und eingehende Blaulichtsignale modulieren diese BLUF-Effektor-Wechselwirkung.

Dieses Modell wird gestützt durch die Bestimmung der Struktur eines weiteren BLUF-Photorezeptors aus einem anderen Signalweg und durch intensive bioinformatische Analysen. So ergaben Untersuchungen der Primärsequenz einer Anzahl von BLUF-Einheiten, dass Aminosäurereste an der Oberfläche der BLUF-Domäne, dort wo der Chromophor hervortritt, an der Regulation der Interaktion mit Effektoren beteiligt sind (**Abb. 4B**).

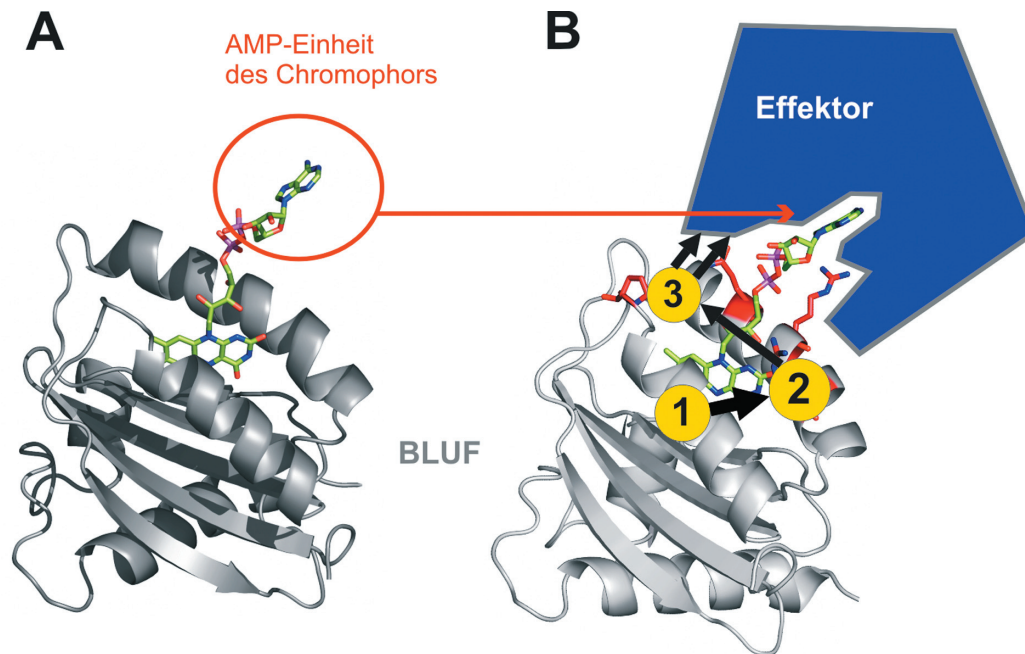


Abb. 4: Modell der Übertragung von Blaulichtsignalen zwischen BLUF-Lichtrezeptoren (grau) und Effektoren der BLUF-Signalkaskade (blau). Die vorangehende Signalweiterleitung innerhalb des Photorezeptors erfolgt über drei Stationen (gelb): dabei wird das Signal über den Chromophor (grün, FAD) aus dem Innern der BLUF-Einheit an die Oberfläche des Moleküls geleitet und dort vom Chromophor (AMP-Teil von FAD) an den Effektor übermittelt.

Urheber: Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Die strukturelle Analyse eines BLUF-Systems im aktiven Zustand erlaubte die Identifikation funktioneller Aminosäurereste

Die Struktur von BLUF-Modulen in ihrem dunkeladaptierten Grundzustand gaben also Aufschluss darüber, wie Lichtsignale von der Oberfläche der Photorezeptoren auf nachgeschaltete Effektoren übertragen werden könnten. Am Max-Planck-Institut in Heidelberg gelang es, auch den lichtinduzierten Signalzustand eines BLUF-Photorezeptors strukturell zu charakterisieren. Dies ermöglichte die Identifikation von Aminosäureresten, die lichtabhängige Veränderungen erfahren und daher an der Weiterleitung des Lichtsignals innerhalb der Photorezeptor-Domäne beteiligt sind [4, 5]. Insgesamt wurden drei Gruppen solcher funktioneller Aminosäurereste ermittelt, die einen Pfad für die Signaltransduktion vorzeichnen. Dieser Pfad reicht von einer aktiven Stelle des Chromophors, dem Ort der Lichtabsorption, entlang des Halses der Chromophor-Tasche bis zur Domänenoberfläche (Abb. 4B).

Untersuchungen von Blaulicht-Photorezeptoren in ihrem natürlichen Kontext ermöglichen künftig die Überprüfung der entwickelten Modelle für die Signaltransduktion

Die biochemische und strukturelle Charakterisierung von isolierten LOV- und BLUF-Photorezeptoreinheiten erlaubten somit einen umfassenden Einblick in die Signaltransduktion von Blaulicht ausgehend von der Lichtabsorption bis zur lichtabhängigen Modulation der Interaktion mit Effektoren.

In der Abteilung Biomolekulare Mechanismen werden in Zukunft komplexere LOV- und BLUF-Systeme untersucht, die die Wirkungsweise der Photorezeptoren in ihrem natürlichen Kontext wiedergeben können. Von besonderem Interesse sind dabei die Effektorenzyme der beiden Signalkaskaden und ihre lichtregulierte Aktivität. Auf diese Weise sollen die abgeleiteten Modelle der Signaltransduktion überprüft und Einblicke in die physiologischen Antworten auf Blaulichtsignale gewonnen werden.

Literaturhinweise

- [1] van der Horst, M.A., Hellingwerf, K.J.:
Photoreceptor proteins, „star actors of modern times”: a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families.
Accounts of Chemical Research **37(1)**, 13-20. Review (2004).
- [2] Fedorov, R., Schlichting, I., Hartmann, E., Domratcheva, T., Fuhrmann, M., Hegemann, P.:
Crystal structures and molecular mechanism of a light-induced signaling switch: The Phot-LOV1 domain from Chlamydomonas reinhardtii.
Biophysical Journal **84(4)**, 247-82 (2003).
- [3] Domratcheva, T., Fedorov, R., Schlichting, I.:
Analysis of the primary photocycle reactions occurring in the light, oxygen, and voltage blue-light receptor by multiconfigurational quantum-chemical methods.
Journal of Chemical Theory and Computation **2(6)**, 1565-1574 (2006).
- [4] Jung, A., Domratcheva, T., Tarutina, M., Wu, Q., Ko, W.H., Shoeman, R.L., Gomelsky, M., Gardner, K.H., Schlichting, I.:
Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction.
Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America **102(35)**, 12350-5 (2005).
- [5] Jung, A., Reinstein, J., Domratcheva, T., Shoeman, R.L., Schlichting, I.:
Crystal structures of the AppA BLUF domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction.
Journal of Molecular Biology **362(4)**: 717-32 (2006).

Drittmittelfinanzierung

Dieses Projekt wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Forschergruppe 526) und den Boehringer Ingelheim Fonds.