

spezial: systemmedizin

ab seite 22

icgc – das internationale
krebsgenom-konsortium

seite 22

interviews mit
Ute Krämer und Ulrike Gaul

seite 70 und seite 18

vom fluch und segen
der robustheit unserer zellen

seite 87

evolutionäre anpassung
ans schattendasein

seite 12

evolutionäre anpassung ans schattendasein

Die enge Kombination aus Experimenten und Modellierung zeigt, wie Pflanzen dunkelrotes Licht wahrnehmen können

von Julia Rausenberger, Eberhard Schäfer, Jens Timmer, Andreas Hiltbrunner und Christian Fleck

Zur Wahrnehmung von Licht haben Menschen und Tiere in den Sinneszellen der Retina lichtempfindliche Proteine. Analog hierzu besitzen auch Pflanzen solche Proteine, sogenannte Photorezeptoren, um Veränderungen ihrer Lichtumgebung zu perzipieren. Phytochrome sind Photorezeptoren, die durch Rotlicht aktiviert werden und somit den Rot-Anteil des Lichts optimal detektieren können. Pflanzen verwenden aber auch für die Wahrnehmung von dunkelrotem Licht Phytochrome, obwohl diese aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften schlecht dafür geeignet sind. Durch die Kombination experimenteller Ansätze und mathematischer Modellierung haben wir eine Erklärung für dieses seit langem bekannte Paradoxon gefunden (Rausenberger *et al.*, 2011).

Photorezeptoren helfen, eine adäquate Entwicklungsstrategie zu wählen

Licht beeinflusst den Lebenszyklus einer Pflanze auf vielfältige Weise. Über den Prozess der Photosynthese gewinnen Pflanzen aus Licht die für das Überleben notwendige Energie. Im Gegensatz zu Tieren, die bei widrigen Verhältnissen einfach wegziehen und einen besseren Ort suchen können, sind Pflanzen ortsgebunden und müssen sich an die am Standort der Keimung herrschenden Bedingungen anpassen. Verschiedene Aspekte der Lichtumgebung wie die Tageslänge, die Richtung, aus der das Licht kommt oder dessen spektrale Zusammensetzung, liefern Pflanzen wichtige Informationen über ihre Umwelt. Kürzer werdende Tage veranlassen Pflanzen zum Beispiel, sich auf den heranahenden Winter vorzubereiten, oder über eine Veränderung des Lichtspektrums können Pflanzen Konkurrenten erkennen, bevor diese zu einer existenziellen Gefahr werden.

Zur Wahrnehmung von Licht verwenden Pflanzen verschiedene lichtempfindliche Proteine, sogenannte Photorezeptoren. Mit der Familie der Phytochrome, der Cryptochrome und der Phototropine besitzen Pflanzen die Möglichkeit, wichtige Parameter ihrer Umgebung zu erfassen. Für die Absorption von Licht sind alle drei Photorezeptor-Familien auf Chromophore angewiesen.

Phytochrome enthalten Phytochromobilin, ein lineares Tetrapyrrol, als Chromophor (Abb. 1a), während Cryptochrome und Phototropine Flavin-basierte Chromophore haben (Abb. 1b). Schon sehr junge Keimlinge wählen lichtabhängig zwischen zwei Entwicklungsstrategien (Abb. 1c): In Abwesenheit von Licht werden die begrenzten Vorräte an Speicherstoffen für ein erhöhtes Streckungswachstum eingesetzt, um nach der Keimung im Boden ans Licht zu gelangen, so dass Photosynthese und somit ein photoautotrophes (*gr.* photos = Licht, *gr.* autotroph = „sich selbst ernährend“) Wachstum der kleinen Pflanze möglich wird. Diese Strategie wird als Skotomorphogenese bezeichnet. Sobald Licht vorhanden ist, wird auf die zweite Entwicklungsstrategie, die sogenannte Photomorphogenese, umgestellt, bei der ein vermehrtes Blattwachstum und die Optimierung des Photosynthese-Prozesses im Vordergrund stehen. Die Entwicklung eines Keimlings kann damit – wohlgemerkt bei gleichem genetischem Hintergrund – je nach Umwelt- und Lichtbedingungen sehr unterschiedlich sein. Mit dem im Laufe der Erdgeschichte immer dichter werdenden Pflanzenbewuchs wurde eine weitere pflanzliche Eigenschaft wichtig, die Fähigkeit im Schatten anderer Pflanzen überleben zu können. Unter einer dichten Vegetationsdecke ist der Dunkelrot-Anteil im Licht stark erhöht, da die blauen und roten Farbanteile des Sonnenlichts durch das Chlorophyll in den Blättern der beschattenden Pflanzen herausgefiltert werden. Unter diesen Bedingungen ist die Wahrnehmung von dunkelrotem Licht unabdingbar, um nach der Keimung den Übergang von der Skoto- zur Photomorphogenese und damit das photoautotrophe Wachstum zu ermöglichen.

Phytochrome absorbieren maximal stark im Rotlichtbereich, können aber eine maximale Wirkung im Dunkelrotlicht erreichen

Im Rot- und Dunkelrotlichtbereich (625-740 nm) erfolgt die Wahrnehmung der Lichtqualität und -quantität über das photo-reversible Phytochrom-System. Ein Phytochrom besteht dabei aus einer Proteinkomponente und einem lichtabsorbierenden



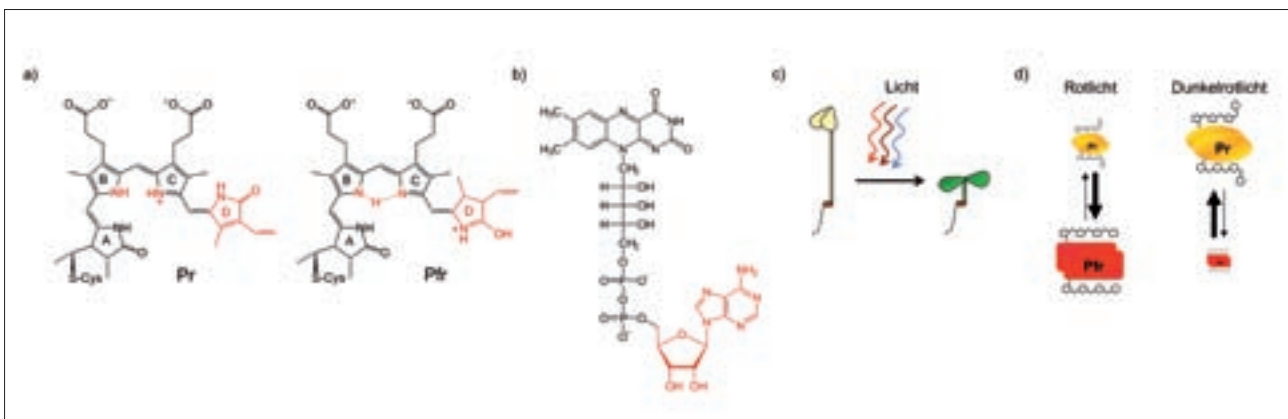
Erforschen die Lichtwahrnehmung bei Pflanzen: v.l.n.r. Christian Fleck, Florian Wüst, Eberhard Schäfer, Julia Rausenberger, Andreas Hiltbrunner und Jens Timmer (Bild: Christian Fleck).

Bestandteil, dem Chromophor. Dieses Chromophor, das Phytochromobilin und mit ihm die Phytochrommoleküle existieren in zwei spektroskopisch unterscheidbaren Formen, der Pr- und der Pfr-Form (Abb. 1a und 1d). Die Pfr-Form gilt als die physiologisch aktive Form, während die Pr-Form inaktiv ist. Durch Absorption von Licht können die beiden Formen ineinander überführt werden, wobei die Übergangsrate von der Pr- zur Pfr-Form im Rotlicht am größten ist, während die Übergangsrate von der Pfr- zur Pr-Form im dunkelroten Licht maximal ist (Abb. 1d). Daraus ergibt sich, dass im Rotlicht 85% der Phytochrom-Moleküle in der physiologisch aktiven Pfr-Form vorliegen, wogegen der Pfr-Anteil im dunkelroten Licht nur 3% beträgt. Entsprechend würde man erwarten, dass Phytochrom-abhängige Antworten durch Rotlicht aktiviert und durch dunkelrotes Licht inaktiviert werden, d. h. dass sich Phytochrome wie „Lichtschalter“ verhalten,

die durch Rotlicht an- und durch dunkelrotes Licht ausgeschaltet werden.

In Pflanzen gibt es verschiedene Typen von Phytochromen, die sich bezüglich der photophysikalischen Eigenschaften kaum unterscheiden. Die beiden wichtigsten Phytochrome sind das Phytochrom A und das Phytochrom B. Phytochrom B verhält sich, wie man es für ein Phytochrom erwarten würde: Seine Wirkung ist am größten im Rotlicht, wo auch der Pfr-Anteil maximal ist. Im Gegensatz dazu hat sich gezeigt, dass die Wirkung von Phytochrom A im dunkelroten Licht maximal ist. Phytochrom A ist derjenige Photorezeptor, der Pflanzen das Überleben unter einer dichten Vegetationsdecke ermöglicht, indem es den Übergang zu photoautotrophem Wachstum in dunkelrotem Licht stimuliert. Das Paradoxon, dass die Wirkung von Phytochrom A

Abbildung 1:



- a) Struktur von Phytochromobilin, einem linearen Tetrapyrrol, in der Pr- und der Pfr-Form (Unterschiede in rot). In Phytochromen ist Phytochromobilin kovalent an ein Cystein (Cys) gebunden (Quelle: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Phytochrom&oldid=92061197>).
- b) Cryptochrome und Phototropine, beides Blaulicht-Rezeptoren in Pflanzen, enthalten im Gegensatz zu Phytochromen ein Flavin-basiertes Chromophor. Cryptochrome haben ein FAD (gesamte Struktur), während Phototropine ein FMN haben (schwarz) (Quelle: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Flavin-Adenin-Dinukleotid&oldid=92551360>).
- c) Skotomorphogenese vs. Photomorphogenese: Keimlinge, die im Dunkeln gewachsen sind (links), nutzen ihre Reserven für erhöhtes Streckenwachstum, wohingegen im Licht gewachsene Keimlinge (rechts) durch vermehrtes Blattwachstum eine Optimierung der Photosynthese anstreben (Quelle: J. Rausenberger, A. Hiltbrunner).
- d) Das photoreversible Phytochromsystem – die Pr-Form wird durch Einfluss von rotem Licht in die physiologisch aktive Pfr-Form überführt, welche durch dunkelrotes Licht wieder in die Pr-Form zurückgeht. Unter Rotlichtbestrahlung liegen etwa 85% Phytochrom in der Pfr-Form vor, wohingegen es nur ca. 3% im Dunkelrotlicht sind (Quelle: J. Rausenberger, A. Hiltbrunner).



Abbildung 2: Keimlinge der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), die 4 Tage in Dunkelrot-Licht gewachsen sind. Die Keimlinge in der Mitte enthalten geringere, diejenigen ganz rechts höhere Mengen des Proteins FHY1 als in Wildtyp-Keimlingen vorhanden ist (links) (Bild: A. Hiltbrunner).

im dunkelroten Licht am größten ist, obwohl unter diesen Lichtbedingungen nur 3% der gesamten Phytochrom A-Menge in der aktiven Pfr-Form vorliegen, hat die Pflanzenforschung seit über 50 Jahren beschäftigt. Eine überzeugende Antwort für dieses Phänomen, das auch als „Hochintensitätsreaktion“ (High Irradiance Response = HIR) bezeichnet wird, konnte aber in all der Zeit nicht gefunden werden.

Erste mathematische Analysen dieses Problems führten Schäfer 1975 zu einem zyklischen Reaktionsschema, welches die bis dato bekannte Kinetik des Phytochroms deuten konnte. Obwohl dieses Model ein wichtiger Schritt in Richtung eines Verständnisses der HIR darstellte, blieb der eigentliche Mechanismus auf zellulärer und molekularer Ebene aber unverstanden.

Es folgten weitere Untersuchungen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die das einfache Bild von Phytochrom als „Lichtschalter“ grundlegend änderten: Am Beginn stand die Entdeckung, dass Phytochrome im Dunkeln im Cytosol der Zelle lokalisiert sind und erst nach Aktivierung durch Licht, d. h. nach Übergang in die aktive Pfr-Form, in den Zellkern transportiert werden (Kircher *et al.* 1999, 2002; Yamaguchi *et al.* 1999). Dann folgte die Entdeckung, dass für den Kerntransport von Phytochrom A die beiden Helferproteine FHY1 und FHL benötigt werden (Hiltbrunner *et al.*, 2006; Genoud *et al.*, 2008). Die Proteine FHY1/FHL interagieren spezifisch mit der Pfr-Form von Phytochrom A, lösen sich aber von diesem nach dessen Übergang in die Pr-Form. Überraschenderweise ist die Menge FHY1/FHL weit geringer als die von ihnen in den Kern transportierte Menge Phytochrom A. Deshalb wurde postuliert, dass diese nach getaner Arbeit wieder aus dem Zellkern zurück ins Cytosol transportiert werden, so dass sie für mehrere Transportzyklen zur Verfügung stehen. Pflanzen, die erhöhte Mengen FHY1 enthalten, zeigen eine verstärkte Hemmung des Streckungswachstums im dunkelroten Licht, während diese geringer ist, wenn die FHY1-Menge reduziert ist (Abb. 2). Dieser experimentelle Befund ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass die Menge von FHY1/FHL limitierend ist für den Kerntransport und die Wirkung von Phytochrom A.

Ein Problem vieler bisheriger Lösungsansätze zur HIR war, dass sie das Phytochrom-System mit einem einfachen „Lichtschalter“-Modell

erklären wollten und die eigentliche Dynamik des Photorezeptors sowie dessen Kerntransport und die Interaktion mit anderen Proteinen unberücksichtigt ließen. Ein erfolgreicher theoretischer Ansatz musste daher zusätzlich zu der spezifischen Phytochrom-Dynamik sowohl den lichtabhängigen Kerntransport als auch die spezielle Dynamik von FHY1/FHL berücksichtigen. Genau in dieser Betrachtungsweise lag die Chance, das ungelöste Problem der HIR entschlüsseln und auf molekularer Ebene erklären zu können (Abb. 3a).

Enge Kombination von Experiment und Theorie entschlüsselt die kontraintuitive Hochintensitätsreaktion

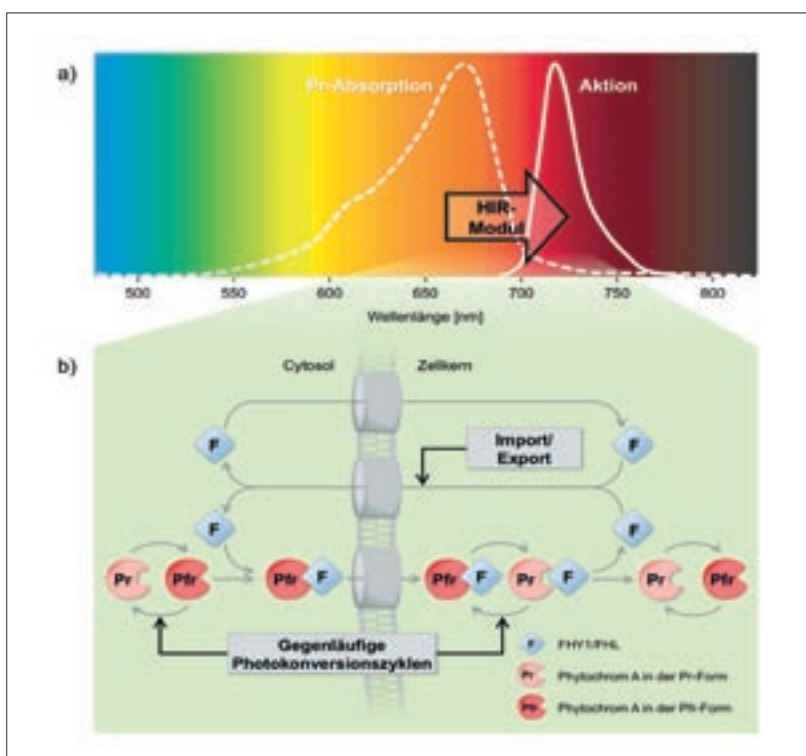
In Labor-Experimenten mit transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen konnten wir zeigen, dass sich die für den Kerntransport von Phytochrom A benötigten Helferproteine FHY1/FHL im Zellkern von diesem lösen und zurück in das Cytosol wandern, um dort für den weiteren Transport zur Verfügung zu stehen. Darüber hinaus konnten wir eine mutierte Form von Phytochrom A identifizieren, die konstitutiv in der physiologisch aktiven Pfr-Form vorlag und deshalb permanent FHY1/FHL bindet. Überraschenderweise war die Wirkung dieser Mutante im Vergleich zum Wildtyp aber nicht erhöht, sondern deutlich verringert. Weitere Experimente zeigten, dass diese Mutante einen reduzierten Kerntransport aufwies. Aufbauend auf diesen experimentellen Befunden stellten wir ein mathematisches Reaktionsmodell für die Wirkung von Phytochrom A auf. Ziel war es, herauszufinden, ob dieses Modell die HIR widerspiegelt und welche Reaktionen in diesem Netzwerk grundlegend sind, damit Phytochrom A im dunkelroten Licht wirksam ist.

Auf Grund der Fülle der freien Parameter, die experimentell nicht bestimmt werden konnten, wählten wir einen qualitativen Ansatz, der sich von folgender Frage leiten ließ: Gibt es Kombinationen von Parametern, bei denen das aufgestellte Reaktionsmodell (Abb. 3b) alle Bedingungen erfüllt, die zuvor aufgrund experimenteller Beobachtungen definiert wurden? Ein systematisches Testen von 1.000.000 Parameterkombinationen ergab etwa 6.000 Kombinationen, die sämtliche die vordefinierten Bedingungen erfüllten. Obwohl eine maximale Wirkung im dunkelroten Licht nicht zu den Bedingungen gehörte, nach denen die 6.000 Parameterkombination selektiert wurden, resultieren fast alle dieser

Kombinationen in einem Wirkungsmaximum im dunkelroten Licht – und nicht im Rotbereich des Lichtspektrums, wie man aufgrund der photophysikalischen Eigenschaften von Phytochromen erwarten würde. Die maximale Wirkung im dunkelroten Licht – die entscheidende Eigenschaft der HIR – ist damit eine intrinsische Eigenschaft des in Abb. 3b gezeigten Reaktionsmodells. Verstanden war die HIR mit diesen Computersimulationen jedoch noch nicht. Denn obwohl das mathematische Reaktionsnetzwerk die gewünschte Eigenschaft zeigte, war unklar, welches die Schlüsselkomponenten sind und wie diese miteinander verknüpft sein müssen, um das Wirkungsmaximum aus dem Rotlicht ins dunkelrote Licht zu verschieben. Um dies herauszufinden, wechselten wir zu einer abstrakten Betrachtungsweise des Problems, die von der Synthetischen Biologie inspiriert wurde, und entwarfen theoretische Netzwerke mit Phytochromen. Wenn wir mit dem kleinstmöglichen Netzwerk beginnen und dieses durch systematisches Hinzufügen immer weiterer Komponenten ergänzen würden, müssten wir irgendwann das einfachste Netzwerk finden, welches das erforderliche Wirkungsmaximum im

dunkelroten Licht zeigt. Dieses kleinste Netzwerk, das wir auch als „HIR-Modul“ bezeichneten, müsste sich dann als Untereinheit im Phytochrom A-Reaktionsnetzwerk von Abb. 3b wiederfinden lassen. Interessanterweise zeigte bereits ein lineares Netzwerk mit drei Zuständen das für die HIR geforderte Wirkungsmaximum bei einer Wellenlänge von 720 nm, d. h. im dunkelroten Licht. Die mathematische Analyse dieses Netzwerks brachte eine überraschend einfache Erkenntnis: Zwei gegenläufige Photokonversionszyklen (d. h. $Pr \rightarrow Pfr$ und $Pfr \rightarrow Pr$) in Kombination mit einem System, in dem kontinuierlich Synthese und Abbau stattfindet, das also nicht im Gleichgewicht ist, sind die lang gesuchten essenziellen Netzwerkelemente. Diese Schlüsselkomponenten konnten im Weiteren im in Abb. 3b gezeigten, umfangreicheren Phytochrom A-Reaktionsnetzwerk als strukturelles Element identifiziert werden. In Laborexperimenten konnten wir außerdem nachweisen, dass in der Pflanze die für den Kerntransport von Phytochrom A verantwortlichen Proteine, FHY1 und FHL, die zwei gegeneinander geschalteten Phytochrom A-Photokonversionszyklen miteinander koppeln (Abb. 3b).

Abbildung 3:



- a) Ein bisher ungelöstes Phänomen: Wie kann ein Photorezeptor, dessen maximale Absorption im Rotlichtbereich liegt, eine maximale Wirkung in dunkelrotem Licht erreichen?
- b) Hauptbestandteile des HIR-Moduls: Zwei gegenläufige Photokonversionszyklen sowie nukleärer Transport

(Quelle: A. Hiltbrunner, modifiziert nach Rausenberger et al., Cell 2011).

Modellrechnungen zeigen, dass mehrere HIR-Module, die in Serie geschaltet sind, zu einer Verengung des Wirkungsspektrums von Phytochrom A führen, und dass man mit vier HIR-Modulen ein Wirkungsspektrum erhält, das maximale Übereinstimmung zeigt mit einem experimentell bestimmten Wirkungsspektrum für Phytochrom A. Aus ökologischer Sicht macht eine solche Verengung des Wirkungsspektrums durchaus Sinn, da dies der Pflanze erlaubt, Antworten auf dunkelrotes Licht viel präziser von solchen auf Rotlicht zu trennen, die von Phytochrom B vermittelt werden. Laborexperimente bestätigen, dass es tatsächlich mehrere HIR-Module in der Pflanze geben muss. In zukünftigen Studien wollen wir diese durch die Modellrechnung vorhergesagten HIR-Module experimentell identifizieren.

Frühere Erklärungsversuche für die HIR kamen zum Schluss, dass weder die Pr- noch die Pfr-Form für die Perzeption von dunkelrotem Licht durch Phytochrom A verantwortlich seien, sondern eine „unbekannte, intermediäre Form“. Unser Ansatz zeigt jedoch, dass sehr wohl die Pfr-Form für die Signaltransduktion ausreicht – vorausgesetzt, es werden zuvor zwei gegeneinander geschaltete Konversionszyklen durchlaufen. Unser Ansatz liefert damit eine mechanistische Erklärung, wie die HIR – und damit die Wahrnehmung von dunkelrotem Licht – auf molekularer und zellulärer Ebene funktionieren kann. Für die Wahrnehmung von dunkelrotem Licht haben Pflanzen im Laufe der Evolution also nicht einen völlig neuen Photorezeptor entwickelt. Vielmehr verwenden sie einen Photorezeptor, der eigentlich optimal ist, um Rotlicht zu detektieren und integrieren diesen in ein Netzwerk. Dieses Netzwerk erzielt als Ganzes eine maximale Wirkung im dunkelroten Licht und ermöglicht Pflanzen so das Überleben unter einer dichten Vegetationsdecke.

Steckbrief Forschungsprojekt:

Titel: Light Perception of Plants

Förderung: DFG (SFB592, GRK1305, EXC294); BMBF - Freiburg Initiative in Systems Biology 0313921 (FRISYS)

Beteiligte Personen: Julia Rausenberger, Anke Tscheuschler, Wiebke Nordmeier, Florian Wüst, Jens Timmer, Eberhard Schäfer, Christian Fleck, Andreas Hiltbrunner

Referenzen:

- Genoud T, Schweizer F, Tscheuschler A, Debrieux D, Casal JJ, Schäfer E, Hiltbrunner A, Fankhauser C (2008) FHY1 mediates nuclear import of the light-activated phytochrome A photoreceptor. *PLoS Genet.* 4, e1000143.
- Hiltbrunner A, Tscheuschler A, Viczian A, Kunkel T, Kircher S, Schäfer E (2006) FHY1 and FHL act together to mediate nuclear accumulation of the phytochrome A photoreceptor. *Plant Cell Physiol.* 47, 1023-1034.
- Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schäfer E, Nagy F (1999) Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *Plant Cell* 11, 1445-1456.
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schäfer E, Nagy F (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *Plant Cell* 14, 1541-1555.
- Rausenberger J, Tscheuschler A, Nordmeier W, Wüst F, Timmer J, Schäfer E, Fleck C, Hiltbrunner A (2011) Photoconversion and nuclear trafficking cycles determine phytochrome A's response profile to far-red light. *Cell* 146, 813-825.
- Rösler J, Klein I, Zeidler M (2007). *Arabidopsis fhl/fhy1* double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10737-10742.
- Schäfer E (1975). A new approach to explain the „high irradiance responses“ of photomorphogenesis on the basis of phytochrome. *J. Math. Biol.* 2, 41-56.
- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A (1999). Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *J. Cell Biol.* 145, 437-445.

Kontakt:

Dr. Christian Fleck

Center for Biological Systems Analysis
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br.
christian.fleck@fdm.uni-freiburg.de

Dr. Andreas Hiltbrunner

Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
andreas.hiltbrunner@zmbp.uni-tuebingen.de