

## 5. Zusammenfassung

Phytochrome sind Photorezeptoren mit einem Bilin-Chromophor, bei denen rotes Licht eine Konversion zwischen einer Rotlicht-absorbierenden Pr-Form und einer Dunkelrotlicht-absorbierenden Pfr-Form auslöst. Außer in niederen und höheren Pflanzen sind diese Rezeptoren in photosynthetischen und nicht photosynthetischen Bakterien, Pilzen und Algen zu finden. In dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* kommen zwei Phytochrome, Agp1 und Agp2, vor. Diese besitzen antagonistische Eigenschaften. Agp1 konvertiert im Dunkeln allmählich von Pfr zu Pr, während bei Agp2 die Pr-Form allmählich in eine Pfr-Form umgewandelt wird. Die Photokonversion wird durch eine stereochemische Änderung am Chromophor eingeleitet, die in mehreren Schritten zu einer Strukturveränderung des Proteins führt. Um die Stereochemie des Chromophors Biliverdin in der Pr- und Pfr-Form von Agp1 und Agp2 zu untersuchen, wurden 6 verschiedene arretierte Chromophore verwendet. Diese Derivate bildeten mit beiden Phytochromen kovalente Addukte mit charakteristischen spektralen Eigenschaften. Mit Hilfe Protein-analytischer Methoden wurde gezeigt, dass die Agp1- und Agp2-Apoproteine durch Assemblierung mit dem 15Za-Chromophor eine Pr- und durch Assemblierung mit dem 15Ea-Chromophor eine Pfr-Konformation einnehmen. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die C14-C15 Einfachbindung sowohl in der Pr- als auch in der Pfr-Form eine *anti*-Konformation besitzt. Es wurde gezeigt, dass in der Pr-Form von Biliverdin die C4=C5 Doppelbindung in einer Z-Konfiguration bzw. die C5-C6 Einfachbindung in einer *syn*-Konformation vorliegt. Die Untersuchungen mit den arretierten Chromophoren weisen außerdem darauf hin, dass sich die Stereochemie zwischen den Biliverdin-Ringen A und B nach Photokonversion verändert.

Diese Daten führten zu dem Ergebnis, dass der Agp1- und Agp2-Chromophor in der Pr-Form die Stereochemie 5Zs/10Zs/15Za und in der Pfr-Form die Stereochemie 5Ea/10Zs/15Ea oder 5Za/10Zs/15Ea besitzt. Die Tatsache, dass das mit dem 15Ea-Chromophor assemblierte Protein eine Pfr-Konformation einnimmt, eröffnet die Möglichkeit, eine lichtstabile Pfr-Form zu erzeugen. Dadurch kann die physiologische Bedeutung von Pfr *in vivo* untersucht und vom Pr-/Pfr-Zyklus und anderen Lichteffekten unterschieden werden.

Durch die strukturellen lichtinduzierten Veränderungen am Chromophor werden Konformationsänderungen am Protein eingeleitet. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Konformationsänderungen des Proteins während der Chromophor-Assemblierung und Photokonversion am vollständigen Agp1 Protein und verschiedenen Fragmenten von Agp1 untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Histidin-Kinase von Agp1 eine stabile Dimerisierung des Moleküls vermittelt. Diese Interaktion blieb auch nach starker Verdünnung erhalten. Das M15-Fragment, das nur aus dem Chromophor-Modul besteht und keine Histidin-Kinase besitzt, kann ebenfalls Dimere bilden, die nach Verdünnung aber dissoziieren. Es zeigte sich, dass die Interaktion der Dimeruntereinheiten von M15 in der Pfr-Form stärker war als in der Pr-Form.

Die Konstrukte M20 und M15 $\Delta$ 18N entstanden aus M15 durch die Entfernung der PHY-Domäne bzw. der ersten 18 N-terminalen Aminosäuren. Beide Fragmente assemblierten mit Biliverdin und bildeten photoaktive Produkte. Die Photoprodukte der beiden Konstrukte waren miteinander vergleichbar, aber verschieden von M15 und FL (Agp1 *full length*). Der ziemlich geringe Extinktionskoeffizient des Photoproduktes ist für eine unvollständige Photokonversion charakteristisch. Beide Konstrukte bildeten Dimere, aber die Assoziation der Untereinheiten war nur geringfügig von den Lichtbedingungen abhängig.

Zwischen den 9-19 N-terminalen Aminosäuren und der PHY-Domäne konnte ein intramolekulares „crosslinking“ nachgewiesen werden, was zu dem Schluss führt, dass diese beiden Teile des Moleküls miteinander interagieren. Außerdem zeigte sich, dass Agp1 und M15 Oligomere mit mehr als zwei Untereinheiten bilden. Bei M15 wird die Oligomerisierung durch die 9 N-terminalen Aminosäuren vermittelt, bei FL spielt die Histidin-Kinase dafür ebenfalls eine Rolle. Die Ergebnisse der Limitierten Proteolyse mit V8 und Trypsin führten zu der Erkenntnis, dass die *hinge* Region zwischen dem Chromophormodul und der Histidin-Kinase sowie ein Teil der PHY-Domäne in der Pfr-Form exponiert sind.

Die Daten dieser Arbeit resultieren in dem folgenden Modell für die Photokonversion von Agp1: Die lichtinduzierte Veränderung der Stereochemie des Chromophors bewirkt eine stärkere Assoziation der N-terminalen Dimeruntereinheiten und eine Exposition der *hinge* Region, womit eine größere Entfernung der Histidin-Kinase-Untereinheiten voneinander und eine geringere Phosphorylierungsaktivität von Agp1 nach Bestrahlung einhergeht.

## Abstract

Phytochromes are photoreceptors with a bilin chromophore in which light triggers the conversion between the red-absorbing form Pr and the far-red-absorbing form Pfr. They exist in lower and higher plants and moreover in photosynthetic and non-photosynthetic bacteria, fungi and algae. The soil bacterium *Agrobacterium tumefaciens* has two phytochromes, Agp1 and Agp2, with antagonistic properties: in darkness, Agp1 converts slowly from Pfr to Pr, whereas Agp2 converts slowly from Pr to Pfr. Photoconversion is initiated by a change of the stereochemistry of the chromophore which induces structural changes of the protein. To understand the chromophore stereochemistry in the Pr- and Pfr-form of Agp1 and Agp2 six different synthetic locked chromophores were used.

All locked BV-derivatives formed covalent adducts with Agp1 and Agp2. These adducts had characteristic spectral properties. As shown by protein analytical methods the Agp1- and Agp2-apoproteins adopt a Pr-conformation after assembly with the 15Za-chromophore and a Pfr-conformation after assembly with the 15Ea-chromophore.

It was also shown that the C14-C15 single bond is in the anti conformation in the Pr- and Pfr-form.

The data also showed that the C4=C5 double bond is in the Z configuration and the C5-C6 single bond is in the *syn* conformation in the Pr-form of Agp1 and Agp2. The stereochemistry between the ring A and the ring B changes during photoconversion.

The measurements with locked chromophores led to the conclusion that the Agp1 and Agp2 chromophore has a 5Zs/10Zs/15Zs stereochemistry in the Pr-form and a 5Ea/10Zs/15Ea or 5Za/10Zs/15Ea stereochemistry in the Pfr-form.

Since the protein adopts a Pfr-conformation after assembly with 15Ea, it is possible to produce a stable Pfr-form. In this way, physiological action of Pfr can be studied *in vivo* and separated from Pr/Pfr cycling and other light effects.

Stereochemical changes of the chromophore induce conformational changes of the protein. In the second part of this work the conformational changes of the protein during chromophore assembly and photoconversion were analyzed with full-length Agp1 and several truncation fragments thereof. I found that the C-terminal histidine kinase module of Agp1 mediates dimerisation and that the interaction is stable during dilution. The fragment Agp1-M15, which comprises the chromophore module but lacks the histidine kinase module, can also form dimers, but these

dimers may dissociate during dilution. Subunit interaction was stronger for the far-red absorbing form Pfr than for the red absorbing form Pr. The fragments Agp1-M20 and Agp1-M15 $\Delta$ 18N are derived from Agp1-M15 by truncation of the PHY-domain or 18 amino acids from the N-terminus of the protein, respectively. Both fragments incorporate the chromophore and the adducts are photoactive. The photoproducts of Agp1-M20 and Agp1-M15 $\Delta$ 18N are similar to each other, but distinct from Agp1-M15 and the full-length protein. The rather low extinction coefficient of the photoproducts is characteristic for incomplete photoconversion. Both constructs formed dimers, but the subunit association was only weakly dependent on the light conditions. An intramolecular crosslink which is apparently formed between the region 9-19 and the PHY-domain shows that both parts of the protein interact with each other. For full length Agp1 and Agp1-M15, formation of oligomers with more than 2 subunits was also observed. In Agp1-M15, oligomer formation is apparently mediated by the N-terminal 9 amino acids but the histidine kinase is also important for oligomerisation of Agp1-FL. With limited proteolysis it was found that the hinge region between the chromophore module and the histidine kinase and a part of the PHY-domain are exposed in the Pfr-form.

The data of this work result in the following model for photoconversion of Agp1: Light induces stereochemical changes of the chromophore, which lead to a stronger association of the N-terminal subunits of the dimer and the exposition of the hinge region. This results in an increased distance of the histidine kinase subunits and a lower phosphorylation activity of Agp1 after irradiation.