



Universiteit
Leiden

The Netherlands

MAS NMR study of the photoreceptor phytochrome

Rohmer, T.

Citation

Rohmer, T. (2009, October 13). *MAS NMR study of the photoreceptor phytochrome*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14203>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14203>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Het eiwit phytochroom is verantwoordelijk voor de licht-geïnduceerde fysiologische veranderingen (fotomorfogenese) in planten. Dit chromo-eiwit wordt ook in bacteriën, cyanobacteriën en schimmels gevonden. De activiteit van phytochroom is afkomstig van een open-keten tetrapyrrole chromofoor, die covalent gebonden is aan een cysteïne residu *via* een thio-ether-verbinding, op de zijketen van ring **A**. In het geval van Cph1 Δ 2 nemen de drie methine bruggen van de PCB-chromofoor een *ZZZssa* geometrie in de biologisch inactieve Pr toestand aan. Tijdens de absorptie van rood licht ondergaat de C15=C16 dubbele binding een $Z \rightarrow E$ fotoisomerisatie, wat leidt tot de conversie naar de actieve Pfr toestand *via* drie intermediären. De thermische stabiele Pfr toestand converteert terug naar Pr tijdens absorptie van ver-rood licht. De terugreactie presenteert twee intermediären, genaamd Lumi-F en Meta-F. De eerste stap van de terugreactie is de $E \rightarrow Z$ isomerisatie van de C15=C16 dubbele binding. Het doel van dit proefschrift is om de licht-geïnduceerde mechanica van de chromofoor en zijn koppeling met het proces van intramoleculaire signaaltransductie te begrijpen.

Het onderzoek van de vrije PCB kan helpen om zijn complex gedrag in het eiwit te begrijpen. In **Hoofdstuk 2** wordt de vrije PCB in de microkristalachtige toestand onderzocht. ^1H , ^{13}C en ^{15}N magische hoek rotatie (MAS) en vaste-stof nucleaire magnetische resonantie (NMR) experimenten tonen aan dat twee vormen van PCB, genaamd A en B, in gelijke verhouding in het kristal aanwezig zijn. De ^{15}N NMR data verder wijzen aan dat alleen de stikstof van ring **B** ongeprotoneerd is. De structuur van PCB in zijn microkristalachtige toestand wordt met behulp van een combinatie van vaste-stof-NMR en kwantummechanica berekeningen bepaald. Het blijkt dat de PCB moleculen **D–D'** dimmeren vormen, die door waterstofbrug interacties tussen

de stikstof van de ring **D** en de carbonylgroep van de ring **D'** en *vice versa* verbonden zijn.

In **Hoofdstuk 3** worden beide stabiele toestanden Pr en Pfr in de Cph1Δ2 en *phyA65* phytochromen met een uniform ^{13}C - en ^{15}N -, $^{13}\text{C}5$ - of $^{15}\text{N}21$ -gelabelde ingebouwde PCB-chromofoor, met ^1H , ^{13}C en ^{15}N 1D en 2D vastestof-NMR experimenten bestudeerd. Met behulp van 2D homo- en heteronucleaire pulstechnieken worden de ^{13}C en ^{15}N chemische verschuivingen van de PCB-chromofoor beschreven. De chromofoor in de cyanobacterieel en plant phytochromen vertonen erg gelijk patronen in haar respectievelijke Pr en Pfr toestanden. De ^{15}N NMR data bewijzen dat alle vier stikstofatomen geprotoneerd zijn. Het verschil in chemische verschuiving reflecteert de verandering van de elektronische structuur van de chromofoor op het atomische niveau en de interacties tussen het eiwit en de PCB-chromofoor. De ^{13}C data worden als een versterkte waterstofbrug aan de carbonylgroep van ring **D** in het Pfr toestand geïnterpreteerd. De rode verschuiving van het optische absorptiemaximum in het Pfr toestand wordt verklaard door een toenemende lengte van het geconjugeerde systeem boven de ring **C** met de gehele ring **D** inbegrepen. De toegenomen conjugatie van het π -systeem stabiliseert de gespannen chromofoor in het Pfr toestand. De veranderingen aan de propionische zijketen van de ring **C** en aan de carbonylgroep van ring **D** worden als een verandering van de waterstofbrug met His-290 geïnterpreteerd. Dit en andere conformationele veranderingen kunnen tot een modificatie van de interacties aan de oppervlakte leiden.

Hoofdstuk 4 beschrijft de fotochemische geïnduceerde Pfr $\rightarrow$ Pr terugreactie. De licht-geïnduceerde Pfr $\rightarrow$ Pr conversie wordt met behulp van lage-temperatuur MAS NMR spectroscopie gevolgd. Beide Lumi-F en Meta-F intermediairen worden thermisch gevangen in de magneet. Alle vier toestanden, Pfr, Lumi-F, Meta-F en Pr worden gekarakteriseerd. Het mechanische proces van de terugreactie betreft de binding rotatie rond de C15 methine brug, dat in twee verschillende stappen omgezet wordt: (i) de C15=C16 dubbele binding is foto-geïsomereerd naar de Lumi-F toestand, (ii) een rotatie rond de C14–C15 enkele binding vindt plaats tijdens de transformatie naar Meta-F. De structuuranalyse toont aan dat de chromofoor een verdraaide geometrie in Lumi-F aanneemt. De Meta-F intermediair vertoont een gelijk patroon als Pr, maar de waterstofbinding aan de stickstof van ring **D** moet nog gevormd worden en een aanpassing van de ring **A**/eiwit interacties moet nog plaatsvinden.

Een model voor de terugreactie wordt voorgesteld.

Verscheidene groepen hebben tetrapyrrolische verbindingen met behulp van vloeistof-NMR bestudeerd. Leden van de 2,3-dihydrobilindione familie zijn in het bijzonder goede modelverbindingen voor de chromofoor in phytochroom. In **Hoofdstuk 5** zijn de chemische verschuivingen van deze verbindingen vergeleken met die van PCB in zijn vrije toestand en als chromofoor in phytochroom. Hierdoor wordt informatie verkregen over de chromofoor/eiwit interacties, die plaatsvinden tijdens de inbouw van PCB in het eiwit en tijdens de $\text{Pr} \rightarrow \text{Pfr}$ conversie. Ten eerste tonen de veranderingen in ^{13}C chemische verschuiving, ten gevolge van de inbouw in het eiwit, aan dat de ringen **B** en **C** symmetrisch zijn in de eiwit matrix. Dit suggereert dat de positieve lading over de twee binnenste ringen in het Pr toestand gedeelokaliseerd is. Ten tweede, de incorporatie van PCB in het eiwit dringt andere verstoringen op aan de chromofoor. De sterkste invloed van de proteïne is gelokaliseerd op de C15 methine brug, die een (*Z*, *anti*) geometrie in het eiwit aanneemt. Het patroon van het verschil in ^{13}C chemische verschuiving door $Z \rightarrow E$ isomerisatie in de phytochroom en in de protoneerde modelverbinding in oplossing is volledig anders. Dit laat zien dat het isomeratie proces in phytochroom anders is dan in oplossing en dat de elektronische structuur door de chromofoor/eiwit interacties sterk beïnvloed wordt. Tenslotte worden toekomstige NMR experimenten besproken. Afstand- en hoekmetingen door MAS NMR kunnen informatie verstrekken over verandering in geometrie van de chromofoor in de fotocyclis. MeLoDi-type NMR experimenten kunnen gebruikt worden om de chromofoor/eiwit interacties op verschillende stadia van de fotocyclis te onderzoeken. Op deze wijze kan de licht-geïnduceerde activiteit van de chromofoor met de signaaltransductie in phytochroom verbonden worden.

