

**Biochemische Untersuchungen mit dem
prokaryotischen Phytochrom Agp1 aus
*Agrobacterium tumefaciens***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Steffi Noack
geboren in Bergen

Februar, 2007

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Tilman Lamparter
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Tina Romeis

Disputation am 27.03.07

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Iomata, K.; Hammam, M. A. S.; Kinoshita, H.; Murata, Y.; Khwan, H.; Noack, S.; Michael, N.; Lamparter, T. (2005). Sterically Locked Synthetic Bilin Derivatives and Phytochrome Agp1 from *Agrobacterium tumefaciens* Form Photoinsensitive Pr- and Pfr-like Adducts. *J. Biol. Chem.* 280, 24491-24497

Inomata, K., Noack, S., Hammam, M. A. S., Khwan, H., Kinohita, H., Murata, Y., Michael, N., Scheerer, P., Krauss, N.; Lamparter, T. (2005). Assembly of synthetic locked chromophores with *Agrobacterium* phytochromes Agp1 and Agp2. *J. Biol. Chem.* 281, 28162-28173

Noack, S., Michael, N., Rosen, R., Lamparter, T. (2006). Protein conformational changes of *Agrobacterium* phytochrome Agp1 during chromophore assembly and photoconversion. (in press bei *Biochemistry*)

Danksagung

Ich danke der AG Hartmann für die Möglichkeit, meine Dissertationsarbeit am Institut für Pflanzenphysiologie der FU Berlin anzufertigen.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Tilman Lamparter für die umfangreiche fachliche Betreuung, die konstruktiven Ratschläge und ein offenes Ohr für Fragen und Probleme während der Anfertigung der Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Norbert Michael für die umfangreiche Unterstützung in der Einarbeitungszeit und viele hilfreiche Ratschläge.

Inga Oberpichler danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei vielen fachlichen, labortechnischen und organisatorischen Fragen des Doktorandenalltags.

Dr. Ran Rosen danke ich für die Peptid-Analysen mit LC/MS/MS.

Ein großer Dank gilt Frau Prof. Tina Romeis für ihre Tätigkeit als Gutachterin

Gedankt sei auch Conny Görick, Berta Esteban, Sabine Artelt, Sabine Buchert und Viola Eckel für die Hilfe den Laboralltag mit nützlichen und praktischen Tipps zu erleichtern, sowie Doris Matzkuhn für ihre administrative Hilfe.

Ein herzlicher Dank gilt Conny Görick und Isabel Molina für die Mühe beim Korrigieren meiner Dissertationsarbeit.

Allen Kollegen der AG Hartmann danke ich für die gute Zusammenarbeit und eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meinen Freunden für die vielen anregenden Diskussionen, fürs geduldige Zuhören und viele nette Erlebnisse, durch die die Zeit in Berlin sehr schön wurde.

Abkürzungen

A	Ampere
A _x	Absorption bei x nm
Abb.	Abbildung
Agp1	<i>Agrobacterium</i> Phytochrom 1
Agp2	<i>Agrobacterium</i> Phytochrom 2
Amp.	Ampicilin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BLD	Bilin Lyase Domäne
Bp	Basenpaar(e)
BphP	Bakterielle Phytochrome
Bq	
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Biliverdin
bzw.	Beziehungsweise
Cam	Chloramphenicol
CBD	Chromophor-Binde-Domäne
CD	<i>Circular dichroism</i>
Cph1	Cyanobakterielles Phytochrom 1
Cry	Cryptochrome
C-Terminus	Carboxylende einer Polypeptidkette
Da	Einheit für Molekülmasse (Dalton)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNTP	Gemisch aus 2`-Desoxyribonukleotiden dATP, dCTP, dGTP, dTTP
DR	Dunkelrot (<i>red</i>)
DTNB	<i>5,5`-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i> , Ellmans Reagenz
DTT	1,4-Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> L.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EtOH	Ethanol
E	Extinktionskoeffizient
G	Erdbeschleunigung
GAF	<u>G</u> MPc-spezifische Phosphodiesterase; <u>A</u> denylatcyclase; formatylase Transkriptionsaktivator <u>F</u> hlA
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
GFC	Gelfiltrationschromatographie
GFP	<i>Green Fluoreszent Protein</i>
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
GUS	β-Glucuronidase
H	Stunde(n)
HisK, H	Histidinkinase Domäne

HKRD	Histidinkinase-verwandte-Domäne
HMW	<i>High Molecular Weight</i>
H ₂ O	Milli-Q-Wasser
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HR	Hellrot (<i>farred</i>)
Imi	Imidazol
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactosid
Kb	Kilobase(n)
KDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LC	Liquid Chromatography
LMP	<i>Low Melting Point</i>
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
μ	Mikro
M	Milli
M	Molar
Mes	2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid
Mops	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
Mg	Milligramm
Min	Minute
Mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic acid</i>
NGE	Native Gel Elektrophorese
NLS	Kernlokalisationsaktivität
Nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoende einer Polypeptidkette
OD _x	Optische Dichte bei x nm
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim-Domäne
PCB	Phycocyanobilin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEB	Phycoerythrobilin
P Φ B	Phytochromobilin
Pfr	Dunkelrotlicht-absorbierende Form des Phytochroms
Phot	Phototropine
PHY	Phytochrom Domäne
PLD	PAS like Domäne
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluorid
PNK	Polynukleotide Kinase
Pr	Rotlicht-absorbierende Form des Phytochroms
PSM	<i>Prestained Marker</i>
PVDF	Poly(vinylidene difluoride)
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

s.	Siehe
SAR	<i>Specific absorbance ratio</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SLB	<i>Sample Loading Buffer</i> : Proben-Auftragspuffer für Gelelektrophorese
TAE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T _{an}	<i>Annealing</i> -Temperatur
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphinehydrochloride
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGM-Puffer	Transfer-Puffer zum Blotten
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	Unit ; Enzym...
ü.N.	Über Nacht
UV	<i>Ultra Violet</i>
V	Volt
V/v/v	<i>Volume per volume</i>
W/v	<i>weight per volume</i>
W/w	<i>weight per weight</i>

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	11
1.1.	Cryptochrome.....	11
1.2.	Phototropine.....	13
1.3.	Andere Blaulichtphotorezeptoren.....	14
1.4.	Rhodopsin.....	15
1.5.	Bakteriorhodopsin.....	16
1.6.	Photoactive Yellow Protein (Xanthopsine).....	16
1.7.	Phytochrome.....	17
1.7.1.	Phytochrom Chromophore.....	17
1.7.2.	Pflanzliche Phytochrome.....	19
1.7.2.1.	Signalübertragung und interagierende Moleküle.....	22
1.7.3.	Bakterielle Phytochrome.....	24
1.7.3.1.	Cyanobakterielle Phytochrome.....	25
1.7.3.2.	Andere bakterielle Phytochrome.....	27
1.7.3.3.	<i>Agrobacterium</i> -Phytochrome Agp1 und Agp2.....	28
1.7.4.	Kristallstruktur von Phytochrom.....	30
1.7.5.	Strukturelle Veränderungen während der Photokonversion.....	31
1.8.	Ziele der Arbeit.....	36
2.	Material und Methoden.....	38
2.1.	Bilinchromophore.....	38
2.1.1.	Bestimmung der Chromophorkonzentration durch spektrale Messungen.....	38
2.1.2.	Test der Protein-Chromophor-Wechselwirkung.....	39
2.1.2.1.	Test der kovalenten Protein-Chromophor-Wechselwirkung.....	39
2.1.2.2.	Test der nicht-kovalenten Protein-Chromophor-Wechselwirkung.....	40
2.2.	Agp1-Konstrukte.....	40
2.2.1.	Computer unterstützte Datenverarbeitung.....	41
2.2.2.	Klonierungen.....	41
2.2.2.1.	Expressionsplasmid für <i>Agrobacterium</i> -Phytochrom Agp1.....	41
2.2.2.2.	Isolation des pAG1 Plasmids für Klonierungen.....	42
2.2.2.3.	PCR.....	42
2.2.2.4.	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.2.2.5.	Reinigung, Ligation und Restriktionsverdau von DNA.....	45
2.2.2.6.	Sequenzierung.....	46
2.2.3.	Kultivierung der Bakterien.....	46
2.2.3.1.	Antibiotika und Medien.....	47
2.2.3.2.	Transformation von Bakterien.....	47
2.2.3.3.	Anlegen von Stammkulturen.....	48
2.2.4.	Auswahl positiver Klone durch Proteinexpressions- und Spektrenkontrolle.....	48
2.2.4.1.	SDS-Gelelektrophorese.....	48
2.2.4.2.	NuPAGE-Gelelektrophorese.....	49
2.2.4.3.	Expressionstest.....	50
2.2.4.4.	Löslichkeit.....	50
2.2.4.5.	Spektrale Kontrolle.....	51
2.2.5.	Expression, Extraktion und Reinigung.....	51
2.2.5.1.	Expression der Agp1 Deletionskonstrukte.....	52

2.2.5.2.	Extraktion von Phytochrom	52
2.2.5.3.	Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie.....	53
2.2.5.4.	Präparative Gel-Filtrationschromatographie	54
2.2.6.	Dokumentation der Extraktion und Reinigung	55
2.2.7.	Analytische Gelfiltration.....	56
2.2.8.	Limitierte Proteolyse.....	58
2.2.9.	Massenspektrometrische Untersuchungen	58
2.2.10.	„Crosslinking“.....	59
2.2.11.	Phosphorylierung	60
3.	Ergebnisse	63
3.1.	Bedeutung arretierter Bilin Derivate für die Untersuchung der Photokonversion bei Agp1 und Agp2	63
3.1.1.	Assemblierung von Agp1 mit synthetischen Chromophoren	65
3.1.2.	Photokonversion der Addukte.....	70
3.1.3.	Kovalente Bindung synthetischer Chromophore durch Agp1	73
3.1.4.	Stärke der nicht-kovalenten Interaktion synthetischer Chromophore mit Agp1 ...	75
3.1.5.	Proteinstrukturelle Untersuchungen von Addukten aus Agp1 und synthetischen Chromophoren	76
3.1.5.1.	Limitierte Proteolyse	76
3.1.5.2.	Ermittlung der Proteinkonformation durch Gelfiltration	78
3.1.6.	Phosphorylierungsaktivität der Addukte aus Agp1 und arretierten Chromophoren	80
3.1.7.	Assemblierung von <i>Agrobacterium</i> Phytochrom Agp2 mit arretierten Chromophoren	81
3.1.8.	Photokonversion von Agp2-Addukten	86
3.2.	Photokonversion von Agp1 und Bedeutung der Proteindomänen	88
3.2.1.	Einfluss der Proteindomänen auf die Assemblierung des Chromophors durch Agp1	90
3.2.2.	Einfluss der Proteindomänen auf die Photokonversion von Agp1	93
3.2.3.	Bedeutung der Agp1 Domänen für die Stabilität der Pfr-Form.....	96
3.2.4.	Gelfiltration mit FL und den Deletionskonstrukten.....	97
3.2.5.	Dimerisierung von FL und Deletionskonstrukten.....	101
3.2.5.1.	Vorversuche	101
3.2.5.2.	Lichtabhängige Interaktion der Moleküle von Agp1 und Agp1 Deletionskonstrukten	102
3.2.6.	Kombination von Gelfiltration und „crosslinking“.....	106
3.2.7.	Limitierte Proteolyse mit FL und den Deletionskonstrukten M15, M20 M15Δ18N und M15Δ9N.....	111
4.	Diskussion.....	117
4.1.	Konformation des Chromophors	117
4.1.1.	Assemblierung und Spektrale Eigenschaften von Agp1 mit 15Za, 15Ea, 15Zs und 15Es.....	118
4.1.2.	Proteinchemische Untersuchung der Agp1-Chromophor-Addukte.....	121
4.1.3.	Assemblierung und Spektrale Eigenschaften von Agp2 mit 15Za, 15Ea, 15Zs, 15Es.....	123
4.1.4.	Eigenschaften der Addukte aus Agp1 und Agp2 mit 5Zs und 5Za.....	123
4.1.5.	Stereochemie des Chromophors von <i>Agrobacterium</i> Phytochrom.....	125
4.2.	Diskussion Photokonversion von Agp1 und Bedeutung der Proteindomänen.....	126

4.2.1.	Histidinkinase	126
4.2.2.	<i>hinge</i> Region	127
4.2.3.	PHY-Domäne.....	127
4.2.4.	PAS- und GAF-Domäne	129
4.2.5.	N-terminale Aminosäuren.....	130
4.2.6.	Modell für die Proteinkonformationsänderungen während der Photokonversion von Agp1	131
5.	Zusammenfassung.....	134
6.	Literaturverzeichnis.....	138
7.	Publikationen.....	154
8.	Curriculum Vitae.....	156