

STRUKTUR-FUNKTIONS-UNTERSUCHUNGEN AN
CYANOBAKTERIELLEM PHYTOCHROM 1

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Holger M. Strauss

aus Stuttgart

Berlin, November 2005

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von November 2000 bis November 2005 in der Arbeitsgruppe von Dr. Peter Schmieder in der Abteilung von Prof. Dr. Hartmut Oschkinat am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin/Buch angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Oschkinat (Freie Universität Berlin)

2. Gutachter: Prof. Dr. J. Hughes (Justus Liebig Universität Gießen)

Disputation am: 10.4.2006

Il est bien vrai pourtant
Que la matière n'obéit pas toujours
Aux exigences de l'art.
Car elle sourde à sa réponse.

L'être humain
Qui garde la liberté
De s'incliner ailleurs.

Dante, La Comédie divine

Danksagung

Viele Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, wissentlich und teilweise unwissentlich. Ihnen allen sei an dieser Stelle von Herzen gedankt. Bei einigen Personen möchte ich mich besonders bedanken:

Prof. Dr. Hartmut Oshkinat für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Begutachtung der Arbeit.

Dr. Peter Schmieder für seine Betreuung, die geduldigen Erklärungen von NMR-Experimenten und seine Bereitschaft, mir finanzielle Unterstützung bei meinen wissenschaftlichen Eskapaden zu gewähren.

Prof. Dr. Jon Hughes für seine Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft, die die meine bei weitem übersteigt, seine wissenschaftliche Exaktheit, seine Einführung und Begleitung in die Welt der Photobiologie.

Christoph Brockmann und Jens Lättig für die vielen Diskussionen und Gespräche über Wissenschaft, den ganzen Rest, für geteilte Freude, für geteiltes und nicht geteiltes Leid.

David von Stetten für seine Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der RR-Messungen, seine vielen erklärenden Worte und die Bereitschaft, Wissen und Nichtwissen zu teilen.

Dr. Anne Diehl für die Unterstützung im Labor und ihre konstante Diskussionsbereitschaft.

Norbert Michael, ohne den die Präparation von Cph1 nicht so funktioniert hätte, wie sie es am Ende tat und seine vielen laborpraktischen Hinweise und Empfehlungen.

Hans-Werner Pizarz, Stephanie Wendt und Günter Neubauer für ihre staunenswerten Fähigkeiten, ihre Bereitschaft, sich in die technischen Probleme Anderer einzudenken und dann genau das Richtige aus allem möglichen zu bauen.

Allen, die ich während dieser Zeit vernachlässigt habe, möchte ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Historischer Hintergrund.....	8
1.2	Biosynthese von Bilinen	10
1.3	Optische Eigenschaften von Biliproteinen und beeinflussende Faktoren.....	12
1.3.1	Konjugierte Doppelbindungen (DB).....	12
1.3.2	Protonierung	12
1.3.3	Konformation und Konfiguration.....	13
1.3.4	Proteinumgebung.....	13
1.4	Phycobiliproteine: Lichtsammelpigmente für die Photosynthese	14
1.5	Phytochrom: ein sensorisches Biliprotein.....	17
1.6	Aufbau & Eigenschaften von Phytochromen.....	21
1.7	Das cyanobakterielle Phytochrom 1, Cph1.....	24
1.8	Bisherige Strukturuntersuchungen an Phytochromen	26
1.8.1	Röntgenstrukturanalyse und kernmagnetische Resonanz	26
1.8.2	Schwingungsspektroskopische Methoden.....	27
1.8.3	Chemische Modellverbindungen.....	28
1.8.4	Weitere Methoden	31
1.9	Zielstellung.....	32
2	Ergebnisse und Diskussion.....	34
2.1	Herstellung von isotoopenmarkiertem PCB.....	34
2.2	Analytische Ultrazentrifugation.....	41
2.3	Resonanz-Raman Spektroskopie.....	51
2.3.1	Zuordnung der Banden aufgrund ihrer Isotopenverschiebungen	55
2.3.2	Pr-Form	57
2.3.3	Pfr-Form.....	66
2.3.4	Vergleich der gemessenen mit berechneten Spektren.....	74
2.3.5	Pr-Form	77

2.3.6	Pfr-Form	80
2.4	NMR-Spektroskopie.....	86
2.4.1	Gemessene Spektren.....	87
2.4.2	Zuordnungsstrategien.....	95
3.1	Zusammenfassung	102
3.2	Summary.....	103
3.3	Abschließende Diskussion	105
4	Material und Methoden.....	108
4.1	Proteinherstellung und Reinigung.....	108
4.1.1	Expressionssysteme	108
4.1.2	Medien und Puffer.....	109
4.1.3	Proteinexpression und Reinigung	110
4.2	Chromophorherstellung und Reinigung	111
4.2.1	Photoautotrophe Medien.....	112
4.3	Aufreinigung von PBS und Isolierung von PCB.....	113
4.4	Probenpräparation für NMR.....	114
4.5	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	115
4.6	NMR-Spektroskopie.....	118
4.7	Fourier-Transform Resonanz-Raman (FT-RR) Spektroskopie	119
4.8	Quantenchemische Berechnung	120
5	Abkürzungen.....	121
6	Abbildungen.....	126
7	Tabellen	128
8	Literatur	129
9	Anhang.....	141
9.1	Eigene Publikationen	141

9.2	Modenzusammensetzung.....	142
9.2.1	ZZZasa, $^{14}\text{N}/^1\text{H}$	142
9.2.2	ZZEssa, $^{14}\text{N}/^1\text{H}$	143
9.3	Hermann Zapf & Palatino.....	144