

Spektroskopische und kinetische Untersuchungen der Photokonversion der bakteriellen Phytochrome Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* und Ppr aus *Rhodospirillum centenum*

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

Sven Seibeck

geboren in Berlin

Mai 2008

Diese Arbeit entstand in der Zeit zwischen Juni 2004 und Mai 2008 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maarten P. Heyn an der Freien Universität Berlin

1. Gutachter: Prof. Dr. Maarten P. Heyn
2. Gutachter: Prof. Dr. Ruppert Mutzel

Disputation am 26.6.2008

Ich möchte mich herzlich bedanken...

...bei Dr. Berthold Borucki für die Möglichkeit in der Biophysik Forschung betreiben zu können und neue Methoden und Verfahren zu erlernen, für die Einarbeitung in die Methoden, für die fachliche Betreuung während meiner Arbeit, die gute Zusammenarbeit und das stets offene Ohr für Fragen und Probleme die im Laufe der Zeit anfielen

...bei Prof. Dr. Maarten P. Heyn für die Möglichkeit meine Dissertation am Institut für Physik anzufertigen und für seinen Einsatz der zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat

...bei Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten

...bei Prof. Dr. Tilmann Lamparter und seiner Arbeitsgruppe für die Präparation der Agp1 Proben, die konstruktiven Beiträge bei der Interpretation der Daten und den steten Nachschub an Proben ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre

...bei der AG von Prof. Dr. Michael Cusanovich der Universität von Arizona für die Präparation der Ppr Proben, dabei im Besonderen John Kyndt und John C. Fitch

...bei der AG von Prof. Dr. Katsuhiko Inomata der Graduate School of Science in Japan für die Synthese der arretierten Bilinanaloga und die konstruktive Mitarbeit am Manuskript Seibeck 2007

...bei Dr. Harald Otto und Ingrid Wallat für die technische und präparative Unterstützung

... bei Marion Badow für die administrative Unterstützung und für das immer offene Ohr

...bei allen Mitarbeitern der AG Heyn, Chandra P. Joshi, Dirk Opitz und Daniel Hörsch für die weiterführenden Diskussionen im Alltag

... sowie bei allen nicht namentlich genannten, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meiner Frau Antje bedanken, dafür dass sie meine Launen ertragen hat, wenn es im Labor mal nicht so gut lief und bei meiner Mutter für die Korrektur meiner Arbeit und das ich so bin wie ich bin.

Diese Arbeit wurde durch Personal- und Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (BO 1911/1 und HE 1382/14) gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
1.1 Photorezeptoren.....	12
1.2 Tetrapyrrole und Biliproteine.....	14
1.2.1 Optische Eigenschaften von Biliproteinen und beeinflussende Faktoren.....	17
1.3 Phytochrome.....	18
1.3.1 Domänenstruktur von Phytochromen.....	20
1.3.2 Chromophor und Chromophorbindestelle.....	22
1.3.3 Kristallstruktur von Phytochrom.....	24
1.3.4 Photozyklus	27
1.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
1.4.1 Allgemeines.....	29
1.4.2 Die Phytochrome Agp1 und Agp2 aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
1.5 Ppr aus <i>Rhodospirillum centenum</i>	30
1.6 Ziele der Arbeit	31
2. Theoretische Grundlagen und Methoden	33
2.1 Theoretische Grundlagen	33
2.1.1 Wechselwirkung zwischen Licht und Materie	33
2.1.2 Elektronische Energieniveaus	34
2.1.3 Absorption von Licht	34
2.1.4 Lambert-Beersches-Gesetz und Oszillatorstärke	36
2.1.5 Desaktivierung des angeregten Zustandes	36
2.1.6 Zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie	37
2.1.7 Reaktionskinetik.....	39
2.1.8 Singulärwertzerlegung (SVD).....	40
2.1.9 CD-Spektroskopie	41
2.1.10 Ursachen der optischen Aktivität	42
2.2 Methoden.....	43
2.2.1 Probenpräparation	43
2.2.2 Spektrophotometrische Messungen.....	43
2.2.3 Zeitaufgelöste Messungen.....	44
2.2.3.1 Aufbau	44
2.2.3.2 Steuerung und Datenaufnahme	45
2.2.3.3 Zeitaufgelöste Absorptionsmessungen.....	46
2.2.4 Die Protonenstöchiometrie	46
2.2.5 Die Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit	49
2.2.6 CD-Messungen.....	50
2.2.7 pH-Elektroden Messungen.....	50
2.2.8 Stopped-Flow Messungen.....	50
2.2.9 Stationäre Fluoreszenzmessungen.....	51
2.2.10 Bestimmung des pK-Wertes des protonierten Chromophors.....	51

2.2.11	Verwendete Software	51
3.	Das Biliverdin Addukt von Agp1 (Agp1-FL-BV).....	53
3.1	UV-Vis Spektren	53
3.2	CD-Spektren des Chromophorbereiches von Agp1-FL-BV	54
3.3	Kinetik der P _r /P _{fr} -Photokonversion bei pH 7,8	55
3.4	Temperaturabhängigkeit der P _r /P _{fr} -Kinetik von Agp1-FL-BV	59
3.5	Protonierungsänderung während der P _r /P _{fr} -Photokonversion	59
3.5.1	Das transienten Protonensignal der P _r /P _{fr} -Photokonversion	59
3.5.2	Das stationäre Protonensignal der P _r /P _{fr} -Photokonversion	61
3.6	pH-Abhängigkeit der Kinetik der P _r /P _{fr} -Photokonversion	63
3.7	Kinetischer Isotopeneffekt des H/D-Austausches der P _r /P _{fr} -Photokonversion	64
3.8	Diskussion	65
3.8.1	Absorptionsspektren von Phytochromen und ihre Absorptionsmaxima	65
3.8.2	CD-Spektren von Phytochromen	67
3.8.2.1	CD-Spektren des P _r -Zustandes von Phytochrom	67
3.8.2.2	CD-Spektren des P _{fr} -Zustandes von Phytochrom	67
3.8.3	Die Kinetik der P _r /P _{fr} -Photokonversion	70
3.8.3.1	Die frühen Absorptionsänderungen (initial bleach)	70
3.8.3.2	Zuordnung der gefundenen Übergänge	71
3.8.3.3	Vergleich mit Cph1 und Evolution von Phytochromen	73
3.8.4	Protonentransferschritte bei Phytochrom	74
3.8.4.1	Kinetik und molekulare Ursachen der Protonentransferschritte bei Agp1 ..	75
4.	Einfluss bestimmter Regionen des Proteins auf die P_r/P_{fr}-Photokonversion von Agp1 ...	77
4.1	Agp1-M15-BV: Einfluss der Histidinkinase	77
4.2	Agp1-M20-BV: Einfluss der PHY-Domäne	82
4.3	M15Δ18N: Einfluss der ersten 18 Aminosäuren	87
4.4	Diskussion	92
4.4.1	Die Histidinkinase	93
4.4.2	Die PHY-Domäne	95
4.4.2.1	Einfluss auf den Dunkelzustand	95
4.4.2.2	Einfluss auf die Photokonversion	96
4.4.3	Die N-terminalen Aminosäuren	98
5.	Spektroskopische Untersuchungen mit Bilin-Analoga	101
5.1	Einfluss der C18 Substituenten des Chromophors	101
5.2	Stereochemie der C/D-Methinbrücke des Chromophors	105
5.3	Stereochemie der A/B-Methinbrücke des Chromophors	108
5.4	Diskussion	111
5.4.1	Bedeutung des C18 Substituenten des Chromophors	111
5.4.2	Konformations- und Konfigurationsänderungen des Chromophors	114
5.4.2.1	Konformation und Konfiguration der C/D-Methinbrücke	114
5.4.2.2	Photochemie und Fluoreszenz des 15Za Adduktes	116

5.4.2.3 Änderungen der Stereochemie der A/B-Methinbrücke des Chromophors	117
6. Funktionelle Gruppen der Bindungstasche	121
6.1 Substitution des Aspartatrestes D197 durch Alanin	121
6.2 Substitution des Histidinrestes H250 durch Alanin	128
6.3 Substitution des Tyrosinrestes Y166 durch Histidin	132
6.4 Diskussion	138
6.4.1 Bedeutung der Aminosäure D197	138
6.4.1.1 Bildung und Stabilität des Holoproteins	138
6.4.1.2 Molekulare Bedeutung von D197	138
6.4.1.3 Das Photoprodukt von D197	139
6.4.1.4 Die transienten Änderungen nach Anregung des P _r -Zustandes	140
6.4.1.5 Strukturelle und mechanistische Implikationen	141
6.4.2 Bedeutung der Aminosäure H250	142
6.4.2.1 Auswirkungen der Substitution auf den Dunkelzustand (P _r)	142
6.4.2.2 Das Photoprodukt von H250A	143
6.4.2.3 Die transienten Absorptionsänderungen von H250A	144
6.4.2.4 Strukturelle und mechanistische Implikationen	144
6.4.3 Bedeutung der Aminosäure Y166	145
6.4.3.1 Die Photokonversion von Y166H	145
6.4.3.2 Kinetik von Y166H nach Anregung des P _r -Zustandes	146
6.4.3.3 Strukturelle Implikationen	147
7. Das Hybrid Ppr aus <i>Rhodospirillum centenum</i>	149
7.1 Expression, Stabilität und Absorptionsspektrum von Holo-Holo-Ppr	149
7.2 Einfluss von blauem und rotem Licht auf das Absorptionsspektrum	150
7.3 CD-Spektren von Holo-Holo-Ppr	153
7.4 Transiente Absorptionsänderungen von Ppr nach Anregung der Phytochromdomäne	155
7.5 Einfluss von blauem Licht auf die Kinetik	156
7.6 Das transiente Protonensignal der Phytochromdomäne	158
7.7 Die Photoreversion der PYP-Domäne	160
7.8 Diskussion	161
7.8.1 Die spektralen Eigenschaften des Dunkelzustandes von Holo-Holo-Ppr	161
7.8.2 Anregung der Phytochrom-Domäne	162
7.8.3 Die fehlende P _{fr} -Bildung bei Ppr	163
7.8.4 Das Photoprodukt der PYP-Domäne	164
7.8.5 Interaktion der beiden photochromen Domänen	165
7.8.6 Strukturelle Unterschiede von Ppr-PYP und E-PYP	165
8. Zusammenfassung	167
9. Literaturverzeichnis	173
10. Publikationen	191
11. Curriculum Vitae	192

Abkürzungen

Agp1	<i>Agrobacterium</i> Phytochrom 1
Agp2	<i>Agrobacterium</i> Phytochrom 2
AO's	<u>A</u> tom <u>O</u> orbitale
AS	Aminosäure
BLUF	<u>b</u> lue <u>l</u> ight <u>u</u> sing <u>F</u> AD
BV	<u>B</u> iliyerdin
CBD	<u>C</u> hromophor <u>b</u> inding <u>d</u> omain (-binde Domäne)
CD	<u>C</u> ircular <u>d</u> ichroism
CHS	<u>C</u> halkonsynthesen
Cph1	Cyanobakterielles Phytochrom 1
C-Terminus	Carboxylende einer Polypeptidkette
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribinukleinsäure)
DR	Dunkelreversion
DrBpP	<i>Deinococcus radiodurans</i> <u>b</u> acterio <u>p</u> hytochrome
DTNB	5,5'- <i>Dithiobis</i> (2-nitrobenzoic acid), Ellmans Reagenz
DTT	1,4- <i>Dithiotreitol</i>
E _A	Aktivierungsenergie
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> L.
FAD	Flavinadenin-Dinukleotid
FL	“Full length”
FMN	Flavin-Mononukleotid
FT-IR	FOURIER-Transform-infrared
FR	Far red (dunkelrotes Licht)
GAF	<u>c</u> GMP spezifische Phosphodiesterase, cyanobakterielle <u>A</u> denylatcyclase und <u>F</u> ormatylase Transkriptionsfaktor Fh1A
HOMO	Highest occupied molecular orbital
kJ	kilo Joule
LD	Laser diode
LED	Light emitting diode
LHC	light harvesting complex
LOV-Domäne	Light-Oxygen-Voltage-Domäne
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MO's	Molekül Orbitale
MTHF	Methenyl-tetrahydrofolat
NMR	Nuclear magnetic resonance
N-Terminus	Aminoende einer Polypeptidkette
ORF	„Open reading frame“
PAS	<u>P</u> ER-period clock protein, <u>A</u> RNT- aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator und <u>S</u> IM-single minded von Drosophila
PCB	Phycocyanobilin
PDB	Protein data bank
PEB	Phycoerythrobilin
PΦB	Phytochromobilin
P _{fr}	Phytochrome far-red absorbing
PLD	PAS like domain
P _r	Phytochrome red absorbing
PhyA	Phytochrom A
PhyB	Phytochrom B
PHY	Phytochrom-Domäne

Abkürzungen

PKS	<u>P</u> olyketid <u>S</u> ynthase
Ppd	„ <u>P</u> YP-phytochrome- <u>d</u> iguanylate cyclase
Ppr	„ <u>P</u> YP-phytochrome- <u>r</u> elated“
PVB	Phycoviolobilin
PUB	Phycourobilin
PYP	„Photoactive <u>y</u> ellow <u>p</u> rotein“
R	Rotes Licht (red light)
R/B	Verhältnis von roter (Q-Bande) zu blauer (Soret-Bande) Bande
RR	Resonance Raman
RT	Raumtemperatur
SAR	Specific absorbance ratio
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp