

Biochemische Untersuchungen
mit den prokaryotischen Phytochromen Cph1 aus
***Synechocystis* PCC6803 und**
Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens*

Dissertation

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

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Berta Esteban Fernández

Berlin, Juni 2004

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 1999 bis Juli 2003 am Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie der Freien Universität Berlin in der AG von Prof. Dr. Elmar Hartmann angefertigt. Die Arbeit wurde im Rahmen eines Sfb-Projektes unter Leitung des Priv. Doz. Dr. Tilman Lamparter durchgeführt.

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Tilman Lamparter
2. Gutachter: Prof. Dr. Elmar Hartmann

Datum der Disputation: 1. September. 2004



PCB-Cph1 nach 3 min Dunkelrot- (links) oder
Hellrotbestrahlung (rechts)

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Lamparter, T.; Esteban, B.; Hughes, J. (2001). Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Purification, assembly and quaternary structure. *Eur. J. Biochem.* 268, 4720-4730

Lamparter, T.; Michael, N.; Mittmann, F.; Esteban, B. (2002). Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *PNAS* 99, 11628-11633

DANKSAGUNG

Bei der Entstehung dieser Arbeit habe ich von verschiedenen Seiten und auf unterschiedliche Art und Weise Unterstützung bekommen.

Prof. Dr. Elmar Hartmann hat mir großzügig Freiraum bei meinen Forschungsprojekten gegeben und mich auch in kritischen Phasen unterstützt, wofür ich mich bedanken möchte.

Ganz besonderer Dank gebührt auch Priv. Doz. Dr. Tilman Lamparter, der mir als direkter Betreuer und Mentor zur Seite stand. Dabei soll nicht verschwiegen bleiben, dass auch durchaus Auseinandersetzungen über den Fortgang der Forschung stattfanden, die aber letztendlich immer zu einem konstruktiven Ergebnis und in Endeffekt unverzichtbar für das Gelingen der Arbeit waren.

Zu großem Dank bin ich auch Montserrat Carrascal und Dr. Joaquín Abián aus der Forschungsgruppe in Barcelona (Unidad de Espectrometría de Masas Estructural y Biológica, Barcelona, Spanien) verpflichtet. Die Kooperation mit ihnen hat mir zahlreiche Anregungen gebracht, die ich in meiner Arbeit weiter verfolgt habe.

Zu großem Dank bin ich auch Dr. Norbert Krauss, TA Claudia Ahlings und Prof. Dr. Wolfgang Säger vom Institut für Kristallographie verpflichtet. Ihre Unterstützung hat es mir ermöglicht, die kristallographischen Untersuchungen durchzuführen. In ganz besonders guter Erinnerung sind mir dabei die geduldigen Erläuterungen von Herrn Dr. Norbert Krauss und Frau Claudia Ahlings geblieben.

Danken möchte ich Prof. Dr. Regine Hengge-Aronis für ihre Erlaubnis, in ihrem Labor Messungen durchzuführen. Dr. Dieter Weichart und der wissenschaftlichen Mitarbeiterin Kunigunde Stephani sei dafür gedankt, dass sie mir stets mit Rat zur Seite standen.

Danken möchte ich auch Dr. Franz Mittmann für seine Bereitschaft, zu Beginn meiner Experimente im Bereich Molekulargenetik stets ein offenes Ohr für meine Fragen gehabt zu haben.

Dr. Gerhard Brückner und Alexander Repp danke ich für zahlreiche produktive Diskussionen, die den Fortgang meiner Arbeit begleitet haben.

Ganz besonders danken möchte ich TA Cornelia Görick. Frau Görick hat sich in aufopferungsvoller Weise der Korrektur meiner Arbeit angenommen. Als Muttersprachlerin hat sie mir, die ich hier „der Kinder Spiele nie gespielt“ habe, einen unschätzbaren Dienst erwiesen, indem sie mich auf große und kleine Ungenauigkeiten hinwies und so dazu beigetragen hat, dass die Arbeit in dieser Form erscheinen kann.

Zu großem Dank bin ich auch TA Norbert Michael, der mich bei vielen Arbeiten im Labor tatkräftig unterstützt hat.

Allen Kollegen der AG Hartmann möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, besonders Sabine Buchert, Sabine Artelt und Cornelia Görick für die technische Unterstützung sowie Doris Matzkuhn für Ihre administrative Hilfe.

Zuletzt möchte ich der Frauenförderung der Freien Universität danken, die es mir durch ein großzügiges Stipendium ermöglicht hat, in einer wichtigen Phase meiner Arbeit all meine Kräfte auf diese zu konzentrieren.

ABKÜRZUNGEN

A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cam	Chloramphenicol
CD	<i>Circular dichroism</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane sulfonate
C-HEGA-8	Cyclohexylethanoyl-N-hydroxyethylglucamide
C-HEGA-9	Cyclohexylpropanoyl-N-hydroxyethylglucamide
CIP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i> (Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm)
CMC	Kritische micellare Konzentration
Ct	Carboxiterminal eines Proteins (C-Terminus)
CYMAL-1	Cyclohexyl-methyl- β -D-maltoside
CYMAL-2	Cyclohexyl-ethyl- β -D-maltoside
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	Dunkelrot (<i>red</i>)
DTNB	<i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i> , Ellmans Reagenz
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> L.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
EtOH	Ethanol
ϵ_{280}	Extinktionskoeffizient bei 280 nm
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
g	Erdbeschleunigung
GAF	<u>G</u> MPC-spezifische Phosphodiesterase; <u>A</u> denylatcyclase; formatelyase Transkriptionsaktivator <u>F</u> h1A
GFC	Gelfiltrationschromatographie
<i>Gor</i>	<i>glutathione reductase gen</i>
h	Stunde(n)
HisK, H	Histidinkinase Domäne
HMW	High Molecular Weight
H ₂ O	Milli-Q-Wasser
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HR	Hellrot (<i>farred</i>)
Imi	Imidazol
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactosid
JAA	Jodacetamid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
l	Liter
LMP	<i>Low Melting Point</i>

LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MES	3-(N-morpholino)propane sulfonic acid
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
Ni-NTA	<i>Nickel-Nitrilotriacetic acid</i>
NGE	Native Gel Elektrophorese
nm	Nanometer
Nt	Aminoterminal eines Proteins (N-Terminus)
NTCH	Natriumcholat
O.D.	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Per-Arnt-Sim-Domäne
PCB	Phycocyanobilin
PCR	Polymerase chain Reaction
PEB	Phycoerythrobilin
PHY	Phytochrom Domäne
PMSF	Phenylmethylsulfonil Fluorid
PNK	Polynukleotide Kinase
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>
SDM	<i>Site Directed Mutagenesis</i>
SDS	Natriumdodecylsulphat
SLB	<i>Sample Loading Buffer</i> : Proben-Auftragspuffer für Gelelektrophorese
T _{an}	<i>Annealing</i> -Temperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>TrxB</i>	<i>thioredoxin reductase gen</i>
U	Unit ; Enzym...
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
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	14
1.1	Phytochrom in Eukaryonten	14
1.1.1	Molekulare Eigenschaften	14
1.1.1.1	Domänen.....	15
1.1.1.2	Interagierende Faktoren.....	17
1.1.2	Struktur	20
1.1.3	Spektrale Eigenschaften	21
1.1.4	Photomorphogenese	21
1.1.4.1	Phytochromfamilie und Photomorphogenese.....	22
1.1.4.2	Hormone und Phytochrom	24
1.2	Andere eukaryotische Photorezeptoren.....	24
1.2.1	Der Blaulichtphotorezeptor Cryptochrom.....	24
1.2.2	Phototropin und der Blau/Rotlichtphotorezeptor <i>Adiantum phy3</i>	25
1.2.3	Rhodopsin.....	27
1.3	Phytochrom in Prokaryonten: bakterielle Phytochrome.....	27
1.3.1	Molekulare Eigenschaften	28
1.3.2	Cyanobakterielle Phytochrome von <i>Synechocystis</i> und <i>Calothrix</i>	29
1.3.2.1	Cph1 aus <i>Synechocystis</i> PCC6803	29
1.3.2.2	Andere cyanobakterielle Phytochrome.....	31
1.3.3	Andere bakterielle Phytochrome	32
1.4	Andere prokaryotische Photorezeptoren	34
1.4.1	Cyanobakterielle Phytochrom-ähnliche Proteine: RcaE, PlpA, PisJ1 und CikA.....	34
1.4.2	Purpurbakterielles Phytochrom- <i>like protein</i> Ppr.....	35
1.4.3	Bakteriorhodopsin, PYP und Sensory Rhodopsin.....	36
1.5	Biline	36
1.6	Evolution	39
1.7	Ziele der Arbeit.....	41
2	Material und Methoden	43
2.1	Bilinchromophore.....	43
2.1.1	Reinigung von Phycocyanobilin.....	43
2.1.1.1	HPLC-Reinigung.....	44
2.1.2	Reinigung von Phycoerythrobilin.....	44
2.1.3	Biliverdin.....	45
2.1.4	Spektrale Messungen von PCB, PEB und BV	45
2.1.5	Bestimmung der PCB-, PEB- und BV-Extinktion	45
2.1.6	Test der Protein-Chromophor-Wechselwirkung	46
2.2	Bakterienstämme	46
2.3	Puffer und Lösungen	47

2.3.1	Chemikalien.....	47
2.3.2	Antibiotika.....	47
2.3.3	Bakterienmedien.....	48
2.3.3.1	Luria-Bertani (LB) Medium.....	48
2.3.3.2	Liquid Rose Bengal (RB) Medium.....	48
2.3.3.3	SOC-Wachstumspuffer.....	48
2.3.4	Lösungen für die Extraktion von PEB aus <i>Porphyridium cruentum</i>	48
2.3.5	Lösungen für die Phytochromextraktion aus Bakterien.....	49
2.3.6	Lösungen für die Affinitäts-Chromatographie.....	50
2.3.7	Detergenzien.....	50
2.3.8	Lösungen für analytische Gel-Filtration.....	50
2.3.9	Lösung für preparative Gel-Filtration.....	50
2.3.10	Lösung für Proteinquantifizierung.....	50
2.3.11	Lösungen für Proteolyse.....	51
2.3.12	Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.....	51
2.3.12.1	Lösungen für die NuPAGE-Gelelektrophorese.....	52
2.3.13	Lösungen für Elektroelution.....	52
2.3.14	Lösungen für die Präparative-Gelelektrophorese (<i>Prep Cell</i>).....	52
2.3.15	Lösungen für die Phosphorylierung.....	52
2.3.16	Lösungen für das <i>Blotting</i>	53
2.3.17	Lösungen für die Extraktion von DNA aus <i>Agrobacterium</i>	53
2.3.18	Lösungen für Agarose-Gelelektrophoresen.....	53
2.4	Computer unterstützte Datenverarbeitung.....	54
2.5	DNA-Isolierung aus <i>Agrobacterium</i>	54
2.5.1	<i>Agrobacterium</i> -DNA-Miniprep für PCR.....	54
2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	55
2.6.1	Präparation von Plasmid-DNA.....	56
2.6.2	PCR.....	56
2.6.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	57
2.6.4	Reinigung, Ligation und Restriktionsverdau von DNA.....	57
2.6.5	Sequenzierung.....	58
2.6.6	Klonierungen für Expressionskonstrukte in <i>E.coli</i>	59
2.6.6.1	Verwendete Konstrukte.....	59
2.6.6.2	Konstruktion eines Expressionsplasmids für <i>Agrobacterium</i> - Phytochrom.....	60
2.6.6.3	Expressionsplasmide für die agrobakteriellen Responsregulatoren Rap1, ExsF und VirG bzw. die Kinase ExsG.....	61
2.6.6.4	Konstruktion eines Expressionsplasmid für Deletionen aus Cph1.....	62
2.6.7	<i>Site Directed Mutagenesis</i> über PCR.....	63
2.6.8	Transformation von Bakterien.....	64
2.6.8.1	Elektrokompetente Zellen.....	64
2.6.8.2	Elektroporation.....	64
2.6.8.3	<i>Screening</i> von <i>E.coli</i> -Kolonien.....	64
2.6.9	Verwendete Primer.....	65
2.7	Expression, Extraktion und Reinigung.....	66
2.7.1	Expression von den Phytochromen Cph1 und Agp1.....	66

2.7.2	Extraktion und Reinigung von den Phytochromen Cph1 und Agp1	66
2.7.2.1	Ammoniumsulfat Fällung.....	67
2.7.2.2	Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie.....	67
2.7.2.3	Präparative Gel-Filtrationschromatographie	68
2.7.2.4	Dokumentation der Extraktion und Reinigung.....	68
2.8	Analytische Gel-Filtration	69
2.9	Präparative Native Elektrophorese: <i>Prep Cell</i>	70
2.10	Proteolyse von Cph1	71
2.10.1	Enzymvorbereitung	71
2.10.2	Verdau des prokaryotischen Phytochrom Cph1	71
2.11	Elektroelution	72
2.12	Micro-HPLC angeschlossen an ein Ion Trap Tandem Massenspektrometer	73
2.13	Phosphorylierung.....	74
2.14	Kristallisationstest	76
3	Ergebnisse	77
3.1	Reinigung, Assemblierung und Quartärstruktur des Holophytochroms Cph1 aus <i>Synechocystis</i> PCC6803	77
3.1.1	Assemblierungsreaktionen bei Einbindung der Chromophore PCB und PEB	77
3.1.2	Extinktionskoeffizient des Holoproteins von Cph1.....	78
3.1.3	Aggregation	79
3.1.4	Optimierung der Reinigung.....	81
3.1.5	Gelfiltrationschromatographie: Konformationsänderung des Holoproteins bei der Photokonversion	84
3.1.6	Native Gelelektrophorese (NGE)	85
3.1.7	Gelfiltration bei verschiedenen pH-Werten.....	87
3.1.8	Kristallisationsversuchen.....	88
3.2	Autophosphorylierung von Cph1	89
3.3	Limitierte Proteolyse von Cph1	90
3.3.1	Proteolytische Muster nach Verdau mit Trypsin.....	91
3.3.2	Proteolytische Muster nach Verdau mit der Endoprotease V8.....	93
3.3.3	Proteolytische Muster nach Verdau mit Subtilisin und Thermolysin	94
3.3.4	Spektrale Änderungen von Cph1 während des Verdau: UV/VIS Spektroskopie bei der limitierten Proteolyse	96
3.3.4.1	Photokonversion nach Trypsinverdau	97
3.3.4.2	Photokonversion nach V8-Verdau.....	99
3.3.5	Limitierte Proteolyse nach NGE	101
3.4	Massenspektrometrische Analyse von proteolytischen Fragmenten.....	102
3.5	<i>Site-directed</i> Mutagenese	105
3.5.1	Spektraleigenschaften der verschiedenen punktuell mutierten Cph1	105
3.5.2	Mutantenverdau durch Trypsin oder V8 Behandlung	105

3.6	Mutantenanalyse: Autophosphorylierung und GFC.....	108
3.6.1	Autophosphorylierung.....	108
3.6.2	Analytische GFC nach Dunkelrotbestrahlung aller Mutanten	110
3.7	Rekombinante Cph1-Deletionsproteine	111
3.8	Versuche mit dem proteobakteriellen Phytochrom Agp1 aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	113
3.8.1	Reinigung und spektrale Eigenschaften	114
3.8.1.1	Assemblierung <i>in vitro</i>	114
3.8.1.2	Photokonversionsverhältnis und Dunkelreversion	116
3.8.2	Bindung des Chromophors	117
3.8.3	Phosphorylierung.....	119
3.8.3.1	Autophosphorylierung des Apoproteins und des Phycocyanobilinadduktes	119
3.8.3.2	Autophosphorylierung des Biliverdinaddukts und Transphosphorylierung des Responsregulator Rap1 aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	120
3.8.4	Phosphorylierung von ExsF	122
4	Diskussion.....	125
4.1	Eigenschaften des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 aus <i>Synechocystis</i> PCC6803	125
4.1.1	Assemblierung, Photokonversion und Kinaseaktivität.....	125
4.1.2	Analytische GFC mit gereinigtem Cph1	125
4.1.3	Optimierung der Reinigung und Löslichkeit.....	125
4.2	Cph1-Konformationsanalyse durch limitierte Proteolyse	125
4.2.1	Unterschiede zwischen Pr und Pfr.....	126
4.2.2	Spektrale Änderungen	128
4.2.3	Mutanten-Analyse und Phosphorylierung.....	130
4.2.4	Deletionsproteine aus Cph1	131
4.3	Eigenschaften des Phytochroms Agp1 aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	133
4.3.1	Assemblierung, Photokonversion und Dunkelreversion	133
4.3.2	Chromophorbindung.....	134
4.3.3	Kinaseaktivität und Signaltransduktion.....	135
	Zusammenfassung.....	137
5	Literaturverzeichnis.....	141
6	Anhang.....	161
6.1	Anhang 1: Chemikalien.....	161
6.2	Anhang 2	163
6.3	Anhang 3	164
6.4	Anhang 4	165
6.4.1	Reziprozitätsgesetz	165
6.4.2	CCA (<i>Complementary Chromatic Adaptation</i>).....	165

7	Publikationen	166
7.1	Konferenzbeiträge während der Promotion.....	166
8	Curriculum vitae	167

