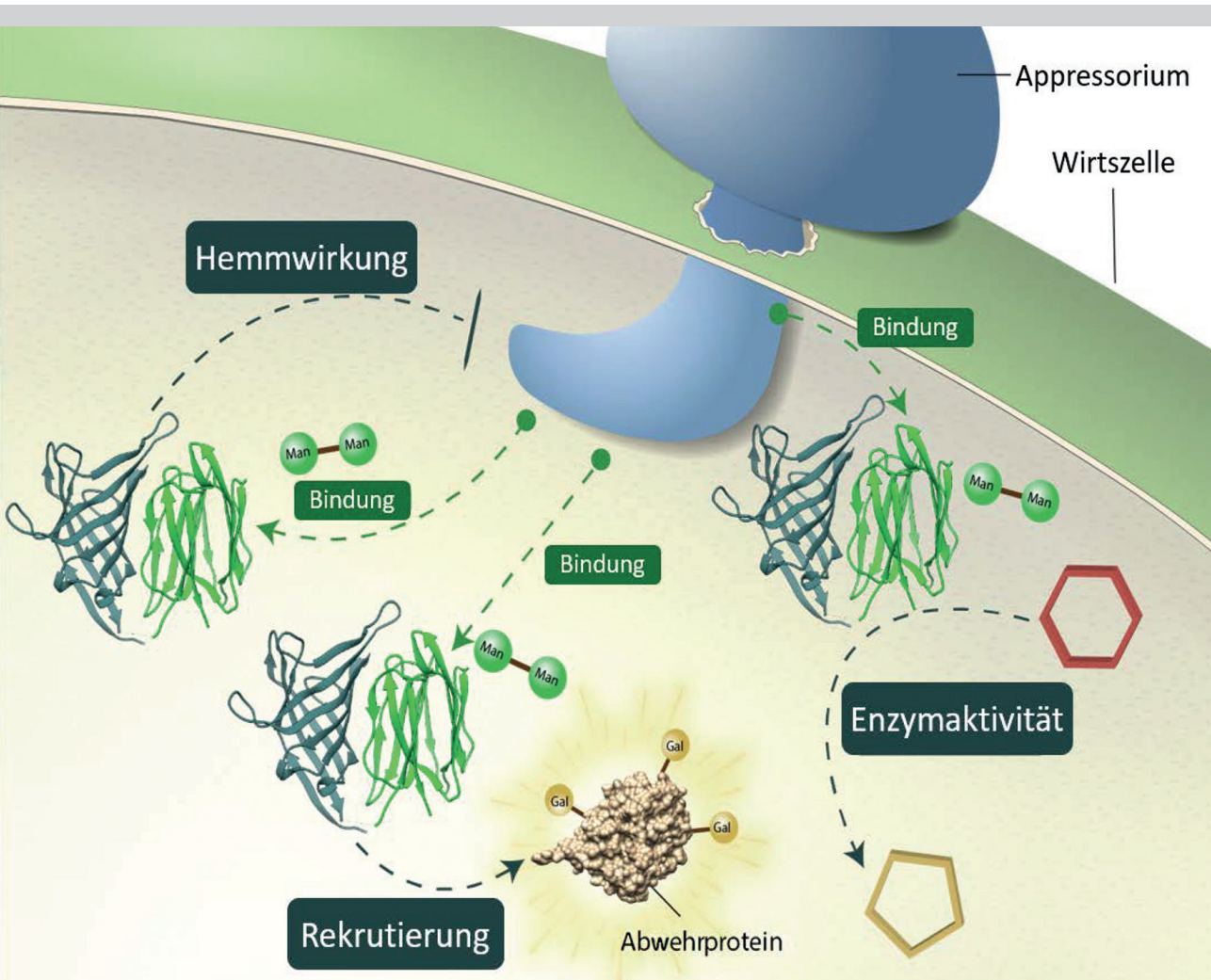


Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen

Nikolai Huwa



Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften
IBOC – Bioorganische Chemie

Biochemische Charakterisierung von modularen dirigierenden Proteinen

Nikolai Huwa

Bioorganische Chemie an der Heinrich-Heine-Universität
im Forschungszentrum Jülich

Band 47

ISBN 978-3-95806-745-5

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	VII
ABSTRACT	IX
A. STUDIEN ZUR HETEROLOGEN PRODUKTION DER DIRIGENT-PROTEINE ATDIR6 AUS ARABIDOPSIS THALIANA UND FIDIR1 AUS FORSYTHIA X INTERMEDIA	1
A.1 Einführung in die Thematik	2
A.1.1 Dirigent- (DIR-) Proteine	4
A.1.2 Unterfamilien von DIR-Proteinen	4
A.1.2.1 DIR-a verantwortlich für enantioselektive phenolische Kopplungsreaktionen	5
A.1.2.2 DIR-b/d beteiligt in Stress- und Abwehrreaktionen	9
A.1.2.3 DIR-c kommen nur in einkeimblättrigen Pflanzen vor	12
A.1.2.4 DIR-e treten vermehrt in der Wurzel auf	13
A.1.2.5 DIR-f/g/h/i – bisher wenig untersucht	15
A.1.3 Proteinstruktur	16
A.1.4 Phenolische Naturstoffe – Sekundärmetaboliten	18
A.1.4.1 Lignan und Neolignan	18
A.1.4.2 Terpenoide	20
A.1.4.3 Flavonoide	21
A.2 Projektbeschreibung	22
A.3 Ergebnisse und Diskussion	23
A.3.1 Löslichkeitsstudien von heterolog produzierten DIR-Proteinen	23
A.3.1.1 Fusionsprotein aus einem Löslichkeits-Tag und einem DIR-Protein	24
A.3.1.2 Einfluss von co-exprimierten Chaperonen	25
A.3.1.3 Proteinextraktion aus <i>inclusion bodies</i>	26
A.3.1.4 Einfluss des Zellkulturadditivs - Ethanol	28
A.3.1.5 Zusammenfassung der Löslichkeitsstudien	30
A.3.1.6 Proteinisolation von heterolog produzierten DIR-Proteinen	31
A.3.2 Pinoresinol Assay	33
A.3.2.1 Assay-Optimierung mittels <i>Design of Experiment (DoE)</i>	33
A.3.2.2 Enantioselektivität von heterolog produzierten DIR-Proteinen	34
A.4 Ausblick	36
A.4.1 Löslichkeit der rekombinanten DIR-Proteine	37
A.4.2 Enantioselektivität von rekombinanten DIR-Proteinen	40
A.4.3 Untersuchung von putativen pinoresinolbildenden DIR-Proteinen	40
B. BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES REISPROTEINS OSJAC1	45
B.1 Einleitung in die Thematik	46
B.1.1 Lektine – mehr als kohlenhydratbindende Proteine	48
B.1.1.1 Die Vielseitigkeit der Jacalin-ähnlichen Lektine (JRL)	50
B.1.1.2 Monocot chimäre Lektine (MCJ) bestehen aus zwei Domänen	52
Unterteilung und Funktionen von MCJs in der Pflanze	52
Zuckeraffinität der JRL-Domäne in MCJs	55
Dirigent-Domäne in MCJ – wenige physiologische Funktionen sind bekannt	60
B.2 Projektbeschreibung	61

Inhaltsverzeichnis

B.3 Ergebnisse und Diskussion	64
B.3.1 Klonierung und Konstruktdesign	64
B.3.2 Heterologe Produktion und Isolation von <i>OsJAC1</i> und der Einzeldomänen (DIR und JRL) aus <i>E. coli</i>	66
B.3.2.1 Beobachtete Schwierigkeiten im Handling der Proteine	67
Expressionsprobleme zurückzuführen auf kryokonservierte <i>E. coli</i> Kulturen	67
Wahl des Isolations-Tags: Strep-Tag® oder His-Tag	68
Doppelbanden im SDS-PAGE aufgrund der Probenvorbereitung	70
Verfärbung der Proteinlösung von <i>OsJAC1</i> und der individuellen DIR-Domäne	71
Identifizierung der Proteinverunreinigung in <i>OsJAC1</i> -Proben	73
Zusammenfassung der optimierten Expressionsbedingungen	74
B.3.2.2 Größenausschlusschromatographie von <i>OsJAC1</i> und seinen zwei Domänen	74
B.3.3 Biochemische und strukturelle Charakterisierung	80
B.3.3.1 Schmelzpunktbestimmung als Maß der Proteinstabilität	80
B.3.3.2 Pinoresinol Assay	86
B.3.3.3 Erstes Modell für das Volllängenprotein <i>OsJAC1</i>	87
B.3.3.4 Strukturbestimmung	88
Fern-UV-Zirkulardichroismus-Spektroskopie zur Bestimmung des Sekundärstrukturgehalts	88
Röntgenkristallographie – Proteinstrukturbestimmung	89
B.3.3.5 Untersuchung der Oligomerisierung von <i>OsJAC1</i>	106
Bestimmung der apparenten Molekularmasse mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS)	106
Protein-Protein Docking der Einzeldomänen von <i>OsJAC1</i>	107
B.3.4 Interaktionsanalyse	113
B.3.4.1 <i>Protein-Liganden-Interaktionsbestimmung mittels DSF</i>	113
B.3.4.2 Nah Zirkular-Dichroismus (CD) Spektroskopie	120
B.3.4.3 Hämagglutinations-Assay	122
B.3.4.4 Docking von Laminaribiose an der <i>OsJAC1</i> -JRL	126
B.3.4.5 Co-Kristallisation von Galactobiose und der DIR-Domäne	131
B.3.4.6 <i>Pull-down-Assay</i> als Nachweis für Protein-Protein-Interaktionen (PPI)	134
B.4 Ausblick	139
B.4.1 Die DIR-Domäne von <i>OsJAC1</i>	139
B.4.2 Die JRL-Domäne von <i>OsJAC1</i>	141
B.4.3 Das Volllängenprotein <i>OsJAC1</i>	143
C. EXPERIMENTALTEIL	150
C.1 Allgemeines	151
C.1.1 Geräte	151
C.1.2 Software	153
C.2 Materialien	153
C.2.1 Verbrauchsmaterialien	153
C.2.2 Nährmedien und Puffer	154
C.2.3 Stammlösungen und Standards.	155
C.2.4 Zuckerverbindungen	155
C.2.5 Plasmide und Mikroorganismen	156
C.2.6 Oligonukleotide	157
C.3 Methoden	158
C.3.1 Molekularbiologische Methoden	158
C.3.1.1 Konstrukte und Klonierung	158
<i>Round-the-horn</i> PCR	158
<i>Gibson-Assembly</i>	160
C.3.1.2 Plasmid-Isolation und Sequenzierung	162
C.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	162
C.3.2 Mikrobiologische Methoden	163
C.3.2.1 Kultivierung von Vorkulturen und Anfertigung der Glycerinkulturen	163

Inhaltsverzeichnis

C.3.2.2	Herstellung chemischer kompetenter <i>E. coli</i> -Stämme	163
C.3.2.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Stämmen	164
C.3.2.4	Heterologe Expression	164
	Allgemeine Expressionsbedingung	164
	Optimierte Expressionsbedingungen	166
C.3.3	Proteinbiochemische Methoden	166
C.3.3.1	Zellaufschluss	167
C.3.3.2	Affinitätschromatographie für die Proteinisolation	167
	Isolation mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie	167
	Isolationsbedingung mittels IMAC	168
C.3.3.3	Größenausschlusschromatographie	168
C.3.3.4	Konzentrierung von Proteinfractionen und Pufferaustausch	168
C.3.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	169
C.3.3.6	Proteinkonzentrationsbestimmung	170
C.3.3.7	Proteolytischer Verdau	170
	Spaltung des Fusionsproteins	170
	Spaltung des Affinitäts-Tags (His ₆)	170
	Proteom-Verdau	171
C.3.3.8	Proteinextraktion aus <i>inclusion bodies</i>	171
C.3.4	Pinoresinol Assay	171
C.3.5	Interaktionsanalysen	172
C.3.5.1	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	172
C.3.5.2	Differential Scanning Fluorimetrie (DSF)	172
C.3.5.3	Hämagglutinations-Assay	173
C.3.5.4	<i>Pull-down-Assay</i>	173
C.3.6	Strukturbiologische Methoden	175
C.3.6.1	Zirkulardichroismus- (CD) Spektroskopie	175
C.3.6.2	Kristallisation, <i>Soaking</i> -Experimente und Datensammlung	177
C.3.6.3	Strukturbestimmung und -verfeinerung	178
C.3.6.4	Liganden-Protein und Protein-Protein-Docking	178
C.3.7	Analytische Methoden	178
C.3.7.1	Photometer	178
C.3.7.2	Chirale-LC	179
C.3.7.3	MALDI-ToF-MS Analyse	180
D.	ANHANG	182
D.1	Studien zur heterologen Produktion der Dirigent-Proteine AtDIR6 aus <i>A. thaliana</i> und FiDIR1 aus <i>F. intermedia</i>	183
D.1.1	Pinoresinol Assay	185
D.1.2	MALDI-ToF-MS Analyse	187
D.2	Biochemische Charakterisierung des Reisproteins OsJAC1	188
D.2.1	DLS-Daten	188
D.2.2	DSF-Daten	191
D.2.3	<i>In silico</i> Daten	193
D.2.4	Hämagglutinations-Assay	195
D.3	Vektorkarten, Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	196
D.3.1	Expressionsvektoren	196
D.3.1.1	Vektorkarten – Pflanzliche DIR-Proteine im pET51b(+) Vektor	198
D.3.1.2	Vektorkarten – OsJAC1 und die Einzeldomänen (DIR und JRL)	205
	EIGENANTEILE AN DEN VERÖFFENTLICHTEN PUBLIKATIONEN	213
	LITERATURVERZEICHNIS	215

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	233
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	235

Pflanzen haben im Laufe der Evolution verschiedene Abwehrstrategien gegen Angriffe aus der Umwelt entwickelt. Dazu gehören sogenannte stressinduzierbare Lektine, wie z.B. die *monocotylen-chimeric Jacaline* (MCJ), deren Gene als Reaktion auf verschiedene abiotische und biotische Stimuli exprimiert werden. Das Verständnis solcher Resistenzmechanismen und ihre Übertragung in moderne Züchtungsprogramme könnte den Weg zu einer umweltfreundlicheren Landwirtschaft unterstützen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der biochemischen Charakterisierung eines chimären Jacalins OsJAC1 aus der Monokotylen (einkeimblättrigen) Pflanze Reis (*Oryza sativa*). Dieses Protein ist modular aus einer Dirigent- (DIR) und einer Jacalin-ähnlichen Lektin- (JRL) Domäne aufgebaut. Durch die erfolgreiche heterologe Expression in *E. coli* mit hohen Ausbeuten für das Volllängeprotein OsJAC1 und seine Einzeldomänenproteine (DIR und JRL) konnten die Proteine systematisch hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer putativen Interaktionspartner untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die JRL-Domäne eine hohe Selektivität für Mannose und Glukose aufweist. Für die DIR-Domäne konnte erstmals eine Selektivität für Galaktose nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte durch die Kristallisation des DIR-Domänenproteins im Komplex mit Galactobiose das neue Kohlenhydratbindemotiv ergründet werden. Durch verschiedene *in silico* Untersuchungen, kombiniert mit weiteren biochemischen Untersuchungen konnte ein erstes Modell für das Volllängeprotein erstellt werden. Die Ergebnisse in dieser Arbeit geben Aufschluss über die Struktur und die Bindungseigenschaften von OsJAC1 und seine mögliche Funktion in der Pathogenresistenz.