

Heterologe Expression, Kristallisation und Untersuchungen zur Struktur

von

Bos taurus **b-Arrestin**

und

Rattus norvegicus **PAR-4**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Heinrich-Heine-Universität

zu

Düsseldorf

vorgelegt von

Ulf Benno Eidhoff

aus Siegburg

Jülich, September 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Die in dieser Dissertation beschriebenen Arbeiten wurden
in der Zeit vom 1.10.1997 bis 20.9.2000
am Institut für Biologische Strukturfrorschung
des Forschungszentrums Jülich GmbH durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. G. Büldt

Koreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2000



**At pius Aeneas per noctem plurima volvens,
Ut primum lux alma data est, exire locosque
Explorare novos, quas vento accesserit oras
Qui teneant (nam inculta videt) hominesne feraene,
Quaerere constituit sociisque exacta referre.**

*Publius Vergilius Maro
Aeneis I 305-309, 29 v. Chr.*



*Aber in Ehrfurcht erwog in der Nacht Aeneas gar manches,
Macht sich auf, als der freundliche Tag sich erhob, um die neuen
Gegenden auszuforschen, an deren Gestad er geworfen,
Wer es bewohne, ob Menschen, ob Tiere, denn Wüste nur sieht er.
Das beschließt er zu sehen und den Freunden Nachricht zu bringen.*

Meiner Mutter

1.	EINLEITUNG	
1.1	G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren	1
1.1.1.	Regulation des β -adrenergen Systems auf molekularer Ebene	1
1.1.2.	Desensibilisierung β_2 -adrenerger Rezeptoren	2
1.1.3.	Die Familie der Arrestine	3
1.1.4.	β -Arrestin als Mediator der Internalisierung von GPCRs	5
1.1.5.	Regulation von β -Arrestin durch Phosphorylierung, Phosphoinositide und andere Bindungspartner	6
1.1.6.	Interaktion von β -Arrestin mit anderen Clathrin-Adaptorproteinen	7
1.2.	Das PAR-4 Protein "Prostate Apoptosis Response 4"	7
1.2.1	Die Apoptose	7
1.2.2.	PAR-4 als proapoptotischer Faktor in Tumoren und bei der Regulation neurodegenerativer Krankheiten	8
1.2.2.1	Apoptose-Sensibilität von Karzinomzellen durch PAR-4	8
1.2.2.2.	Die Rolle von PAR-4 bei neurodegenerativen Erkrankungen	9
1.2.3.	Interaktionspartner von PAR-4 und die Regulation der Apoptose	10
1.2.4.	Strukturelle Eigenschaften des PAR-4 Proteins	11
1.3.	Zielsetzung der Arbeiten	13
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.1.	Geräte und Zubehör	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3.	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	17
2.2	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	18
2.2.1.1.	Verwendete Organismen	18
2.2.1.2.	Medien und Stammlösungen	19
2.2.1.3.	Stammhaltung	19
2.2.1.4.	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	19
2.2.1.5.	Transformation von <i>E.coli</i>	19
2.2.2.	Allgemeine Bedingungen für die Expression von PAR-4 in <i>E.coli</i>	20
2.2.2.1.	Zellaufschlußmethoden für <i>E.coli</i>	20
2.2.2.2.	Herstellung geklärter Zellysate für die Affinitätschromatographie	20
2.3.	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
2.3.1.1.	Hefemedien	21
2.3.1.2.	Verwendete Organismen	21
2.3.1.3.	Stammhaltung	21
2.3.1.4.	Herstellung transformationskompetenter Hefezellen	21
2.3.1.5.	Transformation von <i>S.cerevisiae</i>	22
2.3.2.	Allgemeine Bedingungen für die Protein-Expression in <i>S. cerevisiae</i>	22
2.3.3.	Zellaufschluß von <i>S. cerevisiae</i>	23
2.3.3.1.	Herstellung von Gesamtzellysaten für analytische Zwecke	23
2.3.3.2.	Differentielle Analyse von Zellysaten	23
2.3.3.3.	Präparativer Zellaufschluß und Klärung des Zellysats	23
2.4.	Arbeiten mit DNA	24
2.4.1.	Verwendete Plasmide	24
2.4.2.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.4.2.1.	Allgemeine PCR-Bedingungen	24
2.4.2.2.	PCR mit modifizierten Primern	25
2.4.2.3.	Modifizierung von Genen durch PCR	25

2.4.2.4.	PCR-Primer	26
2.4.3.	Molekularbiologische Standardmethoden	27
2.4.4.	Sequenzierung von DNA	27
2.5.	Proteinbiochemische Arbeiten	28
2.5.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.5.2.	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE)	29
2.5.3.	Westernblotanalyse	29
2.5.3.1.	Immunochemische Detektion	29
2.5.3.2.	"Strippen" von Membranen und Rehybridisierung	30
2.5.3.3.	Verwendete Antikörper und Konjugate	30
2.5.4.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	31
2.5.5.	Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen	31
2.6.	Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen	31
2.6.1.	Proteinpurifikation mit dem StrepTag II System	32
2.6.2.	Proteinpurifikation mit dem Nickel-IMAC System	33
2.7.	Funktionalitätstests für b-Arrestin und PAR-4	33
2.7.1.	<i>In vitro</i> Kinase-Test zur funktionalen Integrität heterolog exprimierten PAR-4	33
2.7.2.	Funktionalitätstests für heterolog expremiertes β -Arrestin	34
2.7.2.1	Zeitabhängige Absorptionsmessung der Meta II-Entstehung (Extra-MII Test)	34
2.7.2.2.	Zeitabhängige Lichtstreuemessungen von Rhodopsin- β -Arrestin Komplexen	35
2.8.	Methoden zur Kristallisation von Proteinen	35
2.8.1.1.	Die Methode des "Sparse-Matrix-Screen"	36
2.8.1.2.	Dampfdiffusionsmethode	38
2.8.1.3.	Die Methode des Batch-Ansatzes	38
2.8.1.4.	Mikrodialyse-Methode	38
2.8.2.	Färbung und proteinbiochemische Analyse von Kristallen	39
2.8.3.	Quervernetzung von Kristallen durch Glutaraldehyd	39
2.8.4.	Bestimmung der Zusammensetzung von Kristallen	39
2.8.4.1.	Bestimmung der Kristalldichte und des Solvenzgehaltes der Kristalle	39
2.8.5.	Biochemische Analyse der Asymmetrischen Einheit im Kristall	40
2.9.	Röntgendiffraktionsexperimente an b-Arrestin-Kristallen	41
2.9.1.	Analyse von Proteinkristallen bei RT in Glaskapillaren	41
2.9.1.1.	Analyse von Proteinkristallen unter Kryobedingungen	41
2.9.2.	Aufnahme kristallographischer Datensätze mit Synchrotronstrahlung	42
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	Heterologe Expression von b-Arrestin	43
3.1.1.	Überexpression von β -Arrestin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.1.1.1.	Eigenschaften des pYEX BX -Expressionssystems	44
3.1.1.2	Konstruktion von β -Arrestin mit 6HIS-Tag und StrepTagII in pYEX BX	44
3.1.1.3.	Evaluierung verschiedener Hefestämme und Bedingungen für die Expression von bovinem β -Arrestin 1	45
3.1.1.4.	Die Hefestämme F11 α und BJ2168 exprimieren β -Arrestin	45
3.1.1.5.	Löslichkeit der exprimierten β -Arrestins	46
3.1.2.1.	Reinigung des rekombinanten β -Arrestins durch IMAC	46
3.1.2.2.	Reinigung des rekombinanten β -Arrestins über Strep-Tactin	47

3.1.3.	Optimierung der Reinigungsbedingungen	48
3.1.3.1.	Optimierung der Kultur- und Expressionsbedingungen	48
3.1.3.2.	Optimierung von Zellaufschluß und Aufschlußpuffer	49
3.1.3.3.	Konzentrierung und Lagerung des gereinigten Proteins	50
3.1.4.	Weitere β -Arrestin-Konstrukte für eine effizientere Reinigung und erhöhte Proteinstabilität	51
3.1.4.1.	Konstruktion von β -Arrestin mit 6HIS-Tag plus StrepTag II und sequenzielle Affinitätschromatographie	51
3.1.4.2.	β -Arrestine mit 10HIS-Tag: Konstruktion und Reinigung	52
3.1.5.	Sekretion von β -Arrestin	53
3.1.5.1.	Die Sekretionsvektoren pYEX BX SS und pYEX BX SSB	53
3.1.5.2.	Expression von β -Arrestin mit dem pYEX BS SS Vektor	54
3.1.6.	Mutagenese an β -Arrestin: Ersatz von vier Cysteinen gegen Serine	55
3.1.7.	Expression von humanem β -Arrestin 2	57
3.1.8.	Funktionalitätstests für rekombinantes β -Arrestin	57
3.1.8.1.	Bindungsstudien von β -Arrestin an Rhodopsin	58
3.1.9.	Kristallisation von β -Arrestin	60
3.1.9.1.	Erste Kristallisationsversuche	60
3.1.9.2.	Evaluierung geeigneter Präzipitanten mittels "Sparse-Matrix Screen"	60
3.1.9.3.	β -Arrestin bildet Kristallnadeln in 30% MPD	61
3.1.9.4.	β -Arrestin bildet "hexagonale" Kristalle in 720 mM Tartrat	61
3.1.9.5.	Geringe Stabilität der Proteine mindert die Qualität der Kristalle	63
3.1.9.6.	Kristallisation weiterer Varianten von β -Arrestin	64
3.1.9.7.	Optimierung der Kristallqualität	64
3.1.9.8.	Kristallisation der Cystein-Austauschmutante von β -Arrestin	65
3.1.9.9.	Instabilität von β -Arrestinkristallen	66
3.1.9.10.	Kristallisation unter Glycerinbedingungen	67
3.1.10.	Aufnahme erster kristallographischer Datensätze	68
3.1.10.1.	Etablierung neuer Kristallisationsbedingungen	68
3.1.10.2.	Zusatz von Cofaktoren für die Kristallisation	69
3.1.10.3.	IP ₆ vermindert die Löslichkeit von β -Arrestin	70
3.1.11.	Kristallisation von β -Arrestin in Gegenwart von IP ₆	70
3.1.11.1.	IP ₆ verbessert die Diffraktionseigenschaften	72
3.1.12.	Untersuchungen zur Kristallstabilität	72
3.1.13.	Herstellung von Quecksilberderivaten	72
3.1.14.	Kristallographische Datensätze von β -Arrestinkristallen	73
3.1.14.1.	Erste kristallographische Charakterisierung der Kristalle	75
3.1.15.	Die asymmetrische Einheit der Kristalle wird aus zwei Molekülen β -Arrestin gebildet	77
3.1.15.1.	Bestimmung der Kristalldichte und des Solvenzgehaltes	77
3.1.15.2.	Direkte Bestimmung der Proteinmasse im Kristall	78
3.1.16.	Weitere Auswertung der Datensätze und Ermittlung der dreidimensionalen Proteinstruktur	79
3.2.	Heterologe Expression und Kristallisation von PAR-4	80
3.2.1.	Expression von PAR-4 in <i>S.cerevisiae</i>	80
3.2.1.1.	PAR-4 wird in <i>S.cerevisiae</i> exprimiert	80
3.2.1.2.	Reinigung von 6HIS-PAR-4-Strep aus <i>S. cerevisiae</i>	81
3.2.2.3.	Sekretion von PAR-4 ins Kulturmedium	82
3.2.3.	Expression von PAR-4 in <i>E. coli</i>	83
3.2.3.1.	Das pET 11a Expressions-System in Verbindung mit <i>E.coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)	84

3.2.3.2.	Klonierung von PAR-4 in pET 11a	84
3.2.3.3.	PAR-4 wird in <i>E.coli</i> effizient exprimiert	85
3.2.3.4.	Erhöhung der Stabilität des exprimierten PAR-4	86
3.2.4.	Isolierung von PAR-4 aus <i>E.coli</i>	87
3.2.5.	Untersuchungen zum Faltungszustand von PAR-4	89
3.2.5.1.	PAR-4 wird von Dlk phosphoryliert	89
3.2.5.2.	Charakterisierung von PAR-4 durch NMR	90
3.2.5.3.	Sekundärstrukturbestimmung durch CD-Spektroskopie	92
3.2.5.4.	Sekundärstrukturbestimmung von PAR-4 durch FTIR-Spektroskopie	93
3.2.5.5.	Sekundärstruktur von PAR-4	95
3.2.6.	Kristallisation von 6HIS-PAR-4-Strep	95
3.2.6.1.	PAR-4 scheidet sich als Flüssigphase ab	95
3.2.6.2.	Weitere Reihenexperimente zur PAR-4-Kristallisation	96
3.2.6.3.	Löslichkeit von PAR-4 in der Nähe des isoelektrischen Punktes	96
3.2.6.4.	PAR-4 kristallisiert aus Präzipitat	97
4.	DISKUSSION	
4.1	<i>Bos taurus</i> b-Arrestin 1	99
4.1.1.	Heterologe Expression und Purifikation von β -Arrestin	99
4.1.2.	Funktionalität und Modifikation des exprimierten β -Arrestins	100
4.1.3.	Kristallisation von β -Arrestin	101
4.1.4.	Kristallographische Analyse von β -Arrestin	102
4.1.5.	Interaktion der Moleküle im Kristall	103
4.1.6.	Differenzdichte-Analyse der Kristalle	104
4.1.7.	Charakterisierung der IP ₆ -Bindestelle	105
4.1.8.	Arrestine und Inositolphosphatderivate	106
4.1.8.1.	IP ₆ -Bindung an β -Arrestin im Vergleich zu Arrestin	107
4.1.8.2.	Regulatorische Bedeutung von Phosphoinositiden	108
4.1.9.	Weitere Auswertung der kristallographischen Daten	109
4.1.10.	Ausblick auf weitere Experimente zu β -Arrestin	110
4.2	<i>Rattus norvegicus</i> PAR-4	111
4.2.1.	Heterologe Expression und Reinigung von PAR-4	112
4.2.2.	Funktionalität und Faltung des isolierten PAR-4	112
4.2.3.	Kristallisation von PAR-4	113
4.2.4.	Die putative Struktur des C-Terminus von PAR-4	113
4.2.5.	Ausblick auf weitere Studien mit und zu PAR-4	115
5.	ZUSAMMENFASSUNG	116
6.	LITERATUR	117
7.	ANHANG	
7.1	Sequenz von <i>Bos taurus</i> b-Arrestin 1	128
7.2	Sequenz von <i>Homo sapiens</i> b-Arrestin 2	129
7.3.	Sequenz von <i>Rattus norvegicus</i> PAR-4	
7.4.	Abkürzungen	
	Danksagung	130
	Lebenslauf	131

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abbildung 1.1: Sequenzvergleich verschiedener Arrestin-Proteine
 Abbildung 1.2: Kristallstruktur von visuellem Arrestin
 Abbildung 1.3: Internalisierung und Resensitisierung von GPCRs
 Abbildung 1.4: Modell des apoptotischen Einflusses von PAR-4
 Abbildung 1.5: Putative strukturelle Domänen von PAR-4
 Abbildung 1.6: Co-Lokalisation von Dlk und Par-4 am Cytoskelett
 Tabelle 2.1: Verwendete Stämme von *E. coli*
 Tabelle 2.2: Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*
 Abbildung 2.1: Wachstum der verschiedenen Hefestämme auf SG-Minimalmedium
 Tabelle 2.3: PCR-Primer
 Tabelle 2.4: Antikörper und Konjugate
 Abbildung 2.2: Vereinfachtes Phasendiagramm der Proteinlöslichkeit als Funktion der Präzipitantkonzentration
 Abbildung 2.3: Dampfdiffusionsmethode
 Abbildung 2.4: Kristallisation im Batch-Ansatz
 Abbildung 2.5: Kristallisation durch Mikro dialyse
 Abbildung 2.6: Eichgerade zur Kristalldichte-Bestimmung
 Abbildung 2.7: Kristallsymmetrie
 Abbildung 2.8: Meßaufbau für Röntgenkristallographische Analysen
 Tabelle 3.1: β -Arrestinkonstrukte in pYEX BX
 Abbildung 3.1.: Expression von β -Arrestin in *S. cerevisiae*
 Abbildung 3.2: Löslichkeit des exprimierten β -Arrestins
 Abbildung 3.3: IMAC-Reinigung von β -Arrestin-6HIS
 Tabelle 3.2: Stabilität des exprimierten β -Arrestins
 Tabelle 3.3: Doppeltag-Konstrukte von β -Arrestin
 Abbildung 3.4: Sequenzielle Aufreinigung von „Doppeltag β -Arrestin“
 Tabelle 3.4: β -Arrestine mit 10HIS-Tag
 Tabelle 3.5: Konstrukte zu Sekretion von β -Arrestin
 Abbildung 3.5: Sekretion von β -Arrestin
 Abbildung 3.6: Klonierungsschema zur β -Arrestin-Mutagenese
 Abbildung 3.7: Reinigung des mutierten β -Arrestins
 Tabelle 3.6: Konstrukte von β -Arrestin
 Abbildung 3.8: Extra Meta II-Assay von 10HIS- β -Arrestin (4Cys-Ser)-Strep
 Abbildung 3.9: Lichtstreuungsmessungen am β -Arrestin-Rhodopsin-Komplex
 Abbildung 3.9: Zur Kristallisation verwendete β -Arrestin Varianten
 Abbildung 3.10: „Hexagonale“ Kristalle von β -Arrestin in Tartrat-Puffer
 Abbildung 3.11: Immunochemische Analyse der β -Arrestinkristalle
 Abbildung 3.12: Instabilität von β -Arrestinkristallen
 Abbildung 3.13: Anormaler Kristallhabitus unter Glycerinbedingungen
 Abbildung 3.14: Morphologische Varianten von β -Arrestin-IP₆-Co-Kristallen
 Abbildung 3.15: Diffraktionsaufnahme eines β -Arrestin-IP₆-Kristalls mit dem Drehanodengenerator:
 Abbildung 3.16: Diffraktionsaufnahme eines β -Arrestin-IP₆-Kristalls mit Synchrotronstrahlung
 Tabelle 3.7: Qualitätsparameter der β -Arrestin-Datensätze
 Abbildung 3.17: Auslöschung der Achsenreflexe
 Tabelle 3.8: Bestimmung von Dichte und Solvenzgehaltes der Kristalle
 Abbildung 3.18: Densitometrische Proteinbestimmung von Kristallen

- Tabelle 3.9: PAR-4 Konstrukte in pYEX BX
- Abbildung 3.19: Expression von PAR-4 in *S. cerevisiae*
- Abbildung 3.20: IMAC-Reinigung von PAR-4
- Abbildung 3.21: DNA-Konstrukte zur Sekretion von PAR-4 ins Kulturmedium
- Abbildung 3.22: Segregation von PAR-4 ins Kulturmedium
- Abbildung 3.23: Expression von PAR-4 in *E. coli*
- Abbildung 3.24: Optimierung der Zellaufschlußbedingungen
- Abbildung 3.25: Isolierung von 6HIS-PAR-4-Strep aus *E. coli*
- Abbildung 3.26: *In vitro* Phosphorylierung von PAR-4 durch Dlk:
- Abbildung 3.27: Eindimensionale NMR-Spektren von ungelabelten Protein in Lösung
- Abbildung 3.28: FTIR-Spektrum und Sekundärstrukturanalyse von PAR-4
- Tabelle 3.10: Bestimmung der Sekundärstrukturelemente von PAR-4 durch FTIR
- Abbildung 3.29: Flüssigphasentrennung von PAR-4
- Abbildung 3.30: Kristalline Proteinstrukturen von PAR-4
- Abbildung 4.1: Position und Orientierung der β -Arrestinmoleküle in der Elementarzelle
- Abbildung 4.2: Solvenzkanäle des β -Arrestin-Kristalls
- Abbildung 4.3: Packung symmetrieäquivalenter Moleküle im Kristall
- Abbildung 4.4: Position des gebundenen IP₆
- Abbildung 4.5: Koordination von IP₆ durch β -Arrestin
- Abbildung 4.6: Leucin-Zipper und Death Domain

1. Einleitung

1.1 G-Protein gekoppelte Membranrezeptoren

Perzeption äußerer Reize und Reaktion hierauf ist eine der grundlegenden Eigenschaften lebender Organismen. Jede Zelle eines vielzelligen Organismus wird während ihrer Entwicklung darauf programmiert, auf spezifische Signale spezifisch zu reagieren. Die Natur der Reize ist dabei ebenso vielfältig wie die Mechanismen, die Zellen für die Perzeption und Verarbeitung von extrazellulären Signalen entwickelt haben. Ein Prinzip ist die Aufnahme von Signalen durch membranständige Rezeptorproteine, die chemische oder physikalische Reize auf der extrazellulären Seite der Membran spezifisch registrieren und in das Cytoplasma der Zelle weiterleiten. Zu diesen Transmembransensoren zählt neben Ionenkanalgekoppelten Rezeptoren und Rezeptoren mit eigener katalytischen Aktivität auch die große Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), welche die Plasmamembran mit sieben α -Helices durchspannen.

Das GPCR-Signaltransduktionssystem besteht im Wesentlichen aus einem Rezeptor, der durch eine Aktivierungskaskade das extrazelluläre Signal über (hetero-) trimere G-Proteine an membranständige Effektorproteine weiterleitet. In der Natur ist dieses Prinzip in vielen Variationen verwirklicht. Schätzungen gehen von weit mehr als 1000 verschiedenen GPCR-Genen (etwa 1% aller Gene) aus, was mögliche Splice-Varianten nicht einmal beinhaltet (Watson und Arkinstall, 1994). Für die G-Proteine sind Gene von 20 verschiedenen α -Untereinheiten (Conklin & Bourne, 1993; Rens-Domiano & Hamm, 1995), sechs β -Untereinheiten und 12 γ -Untereinheiten (Clapham & Neer, 1997) und zusätzliche Splice-Varianten bekannt. Aus der Beobachtung, daß alleine die Untereinheiten der G-Proteine verschieden kombinierbar, und Rezeptoren mit mehreren verschiedenen G-Proteinen interagieren können, verdeutlicht die Vielfalt an Signaltransduktions- und Verarbeitungsmöglichkeiten, die der Zelle mit diesen Systemen zur Verfügung stehen (Wess, 1998).

Von den über 1000 bekannten GPCRs zählen Rhodopsin (Opsin) und der β_2 -adrenerge Rezeptor, die als erste GPCRs isoliert wurden, zu den am besten charakterisierten (Nathans, et al., 1983 und Dixon et al., 1986). Alleine für das β -adrenerge System sind drei verschiedene Rezeptoren (β_1 , β_2 und β_3) mit variierenden Eigenschaften bekannt (Kurosa et al., 1998; Bylund et al., 1994).

1.1.1. Regulation des β -adrenergen Systems auf molekularer Ebene

Das β -adrenerge System kann als ein Paradigma für Signaltransduktion über GPCRs angesehen werden, da an ihm viele Erkenntnisse über die molekulare Funktion und Regulation der Signalkaskade gewonnen wurden, die auf viele andere GPCR-Systeme übertragbar sind. Das β -adrenerge System vermittelt unter anderem Signale, die in Form des in der Nebennierenrinde produzierten Hormons Adrenalin (Catecholaminderivat) an die Zelle heran getragen werden. Adrenalin, das auch als Kampf- und Fluchthormon bezeichnet wird, wird in Stressituationen ausgeschüttet und versetzt den Körper in die Lage, schnell auf Energiereserven zurückgreifen zu können. Adrenalin bewirkt unter anderem in den Muskeln den enzymatischen Abbau von Glykogen zu Glukosephosphat, es erhöht den Herzschlag und die Herzmuskelkontraktion und führt in Fettzellen zum Abbau von Triglyzeriden.

Die Mechanismen, mit denen diese Reaktionen ausgelöst werden, sind im Wesentlichen schon seit längerem bekannt. Adrenalin und auch Noradrenalin binden als Agonisten an die extrazelluläre Domäne der β -adrenergen Rezeptoren. Dieser durchläuft eine

Konformationsänderung (Isomerisierung), wodurch auf der cytoplasmatischen Seite Bindestellen für das trimere G-Protein (G_s) zugänglich werden.

Das G-Protein selbst setzt sich als Komplex aus drei verschiedenen Polypeptidketten, α , β und γ , zusammen. Die α -Kette (α_s) besitzt GTPase-Aktivität und aktiviert die Adenylatcyclase. Die β -Kette ist über die γ -Kette, die einen kovalent gebundenen Prenylrest trägt, an der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran verankert.

Durch Bindung an den agonist-aktivierten Rezeptor durchläuft die α_s -Untereinheit eine Konformationsänderung, tauscht GDP gegen GTP aus und löst sich daraufhin von der β/γ -Untereinheit des G-Proteins. In dieser nun aktiven Form bindet α_s an die membranständige Adenylatcyclase und aktiviert diese. (Übersicht in Ford et al., 1998). Über die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch die Adenylatcyclase wird das durch Adrenalin vermittelte Signal an die Zelle weitergegeben. Zur schnellen Reaktion auf Konzentrationsänderungen von beispielsweise Adrenalin muß diese Aktivierung schnell terminierbar sein. Dies geschieht durch die Stimulation der GTPase-Aktivität von α_s durch die Adenylatcyclase. α_s hydrolysiert GTP, löst sich von der Adenylatcyclase, die damit inaktiviert wird, und assoziiert wieder mit der β/γ -Untereinheit. Somit ist das System erneut für die Transduktion eines Signals bereit (aus Alberts et al., 1995 und Referenzen daraus).

1.1.2. Desensibilisierung β_2 -adrenerger Rezeptoren

Wie beschrieben, vermitteln β_2 -adrenerge Rezeptoren nach Ligandenbindung ein Signal an die Adenylatcyclase. Es konnte beobachtet werden, daß die enzymatische Antwort der Adenylatcyclase bei intensiver und lang andauernder Stimulation oder bei Restimulation des Rezeptors durch Agonisten vermindert wird. Dies bedeutet, die Empfindlichkeit des Signaltransduktionssystems wird durch die Exposition mit dem Liganden herabgesetzt.

Zu dieser als Desensibilisierung bezeichneten Adaptation des Signalweges tragen neben der schnellen Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein durch inhibitorische Faktoren (binnen Sekunden) auch das Entfernen des Rezeptors von der Membranoberfläche (Internalisierung binnen weniger Minuten) und lysosomale Degradation sowie die Herunterregulierung der RNA- und Proteinsynthese des Rezeptors bei (binnen Stunden) (Ferguson et al., 1998). Einige dieser Adaptationsmechanismen sind inzwischen gut charakterisiert und werden im weiteren Verlauf genauer beschrieben.

Die binnen Sekunden nach Rezeptoraktivierung stattfindende Desensibilisierung erfolgt unabhängig von der Aktivität des G-Proteins auf die Adenylatcyclase (Strulovici et al., 1984) über Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors durch die β -adrenergen Rezeptorkinasen β ARK und β ARK2 (Benovic et al., 1989 und 1991). Die Phosphorylierungsstellen werden in Serin- und Threonin-Seitengruppen vermutet, die sich im C-Terminus des Rezeptors befinden (Fredericks et al., 1996). Der Mechanismus der Entkopplung vom G-Protein durch Phosphorylierung ist in der Familie der GPCRs weit verbreitet. Bisher sind sechs verschiedene Rezeptorkinasen (GRK) beschrieben worden, die die unterschiedlichsten GPCRs evtl. synergistisch phosphorylieren können (zusammengefaßt in Krupnick & Benovic, 1998).

Die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors alleine inhibiert die Bindung und Aktivierung des G-Proteins noch nicht, es wird lediglich dessen Affinität zum Rezeptor verringert bei gleichzeitiger Erhöhung der Affinität eines anderen regulatorischen Proteins, des β -Arrestins. β -Arrestin konkurriert mit dem trimeren G-Protein G_s um die Bindungsstellen an den ligandaktivierten β -adrenergen Rezeptoren. Durch die Phosphorylierung wird die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor favorisiert und damit die Signalweiterleitung über G_s blockiert (Ferguson et al., 1996).

1.1.3. Die Familie der Arrestine

β -Arrestin 1 (418 AS; 47,1 kDa) aus *Bos taurus* wurde 1990 kloniert und als Faktor beschrieben, der die Signalweiterleitung von β ARK-phosphoryliertem β -adrenergem Rezeptor um mehr als 75 % vermindert (Lohse et al., 1990). Es zeigt 59 % Homologie zu Arrestin, das bereits mit analoger Funktion für das Rhodopsin-Transducin-System beschrieben wurde (Shinohara et al., 1987). Darüber hinaus wurden weitere Mitglieder der Arrestin-Genfamilie kloniert und beschrieben: β -Arrestin 2, visuelle Arrestine aus Retina-Zapfen sowie einige Splicevarianten dieser Proteine (zusammengefaßt in Sterne-Marr et al., 1993 und Attramadal, 1992). Während die visuellen Arrestine fast ausschließlich in der Retina vorkommen, werden die β -Arrestine, wenn auch in unterschiedlichen Maßen, ubiquitär exprimiert (detailliert beschrieben in Palczewski, 1994 und Ferguson, 1996). Die folgende Abbildung zeigt einen Sequenzvergleich der in dieser Arbeit relevanten Arrestine.

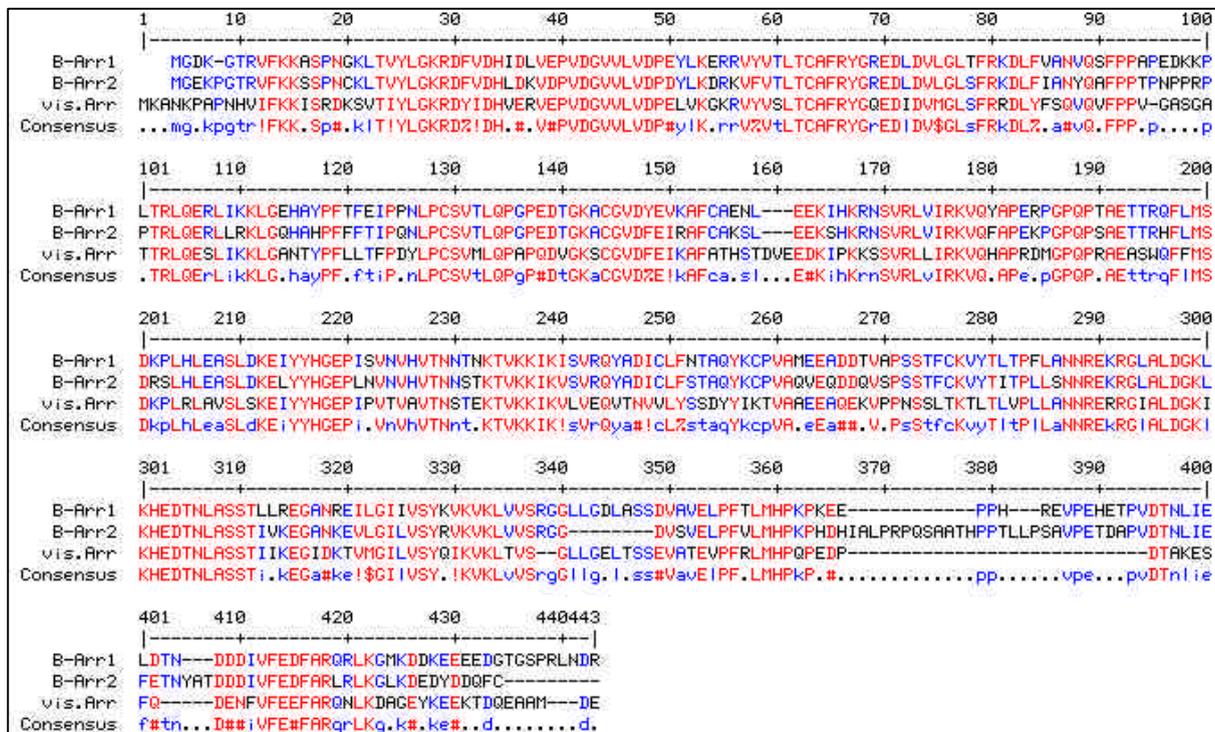


Abbildung 1.1: Sequenzvergleich verschiedener Arrestin-Proteine: Die Proteinsequenzen von β -Arrestin 1 (B-Arr1), β -Arrestin 2 (B-Arr2) und Arrestin (vis. Arr) (alle aus *Bos taurus*) wurden mit der Multialign Software Version 5.4.1 (I.N.R.A. Frankreich) (Corpet, 1988) gegenübergestellt. Folgende Zeichen wurden in der Consensus-Sequenz verwendet: ! ≡ I oder V, \$ ≡ L oder M, % ≡ F oder Y, # ≡ N, D, Q, E, B oder Z

Man erkennt klar die hohe Homologie unter den verschiedenen Arrestinen. Diese spiegelt sich auch darin wieder, daß beispielsweise β -Arrestin *in vitro* an Rhodopsin bindet und umgekehrt Arrestin an den β -adrenergen Rezeptor (Lohse, 1992 und zusammengefaßt in Krupnic & Benovich, 1998).

Durch Mutationsstudien mit chimären und partiell deletierten Arrestinen konnten einige der Proteinfunktionen speziellen Bereichen der Proteine zugeordnet werden. So scheinen Bereiche innerhalb der Aminosäuren 45 bis 367 des β -Arrestins für die Erkennung des aktivierten Zustandes sowie der Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors verantwortlich zu sein. Über diese Region des Proteins wird auch die Arrestin/Rezeptor-Bindung vermittelt. Die C- und N-Termini scheinen hierfür ohne Bedeutung zu sein. (Gurevich, 1993 und 1995).

Der wesentliche Unterschied zwischen visuellem Arrestin und den β -Arrestinen besteht darin, daß sich, im Gegensatz zu Arrestin, im C-Terminus der β -Arrestine eine Domäne befindet, mit der sie an Clathrin binden können (AS 367 bis 385) (Krupnick et al., 1997 und Goodman et al. 1997). Über diese Interaktion wird ein weiterer, wichtiger Mechanismus der Desensibilisierung von GPCRs vermittelt: die Internalisierung aktivierter Rezeptoren. (siehe Abschnitt 1.1.4.)

1998 gelang es J. Granzin und Mitarbeitern aus unserer Arbeitsgruppe, die dreidimensionale Struktur des visuellen Arrestins aus Rinderaugen kristallographisch zu bestimmen (Wilden et al., 1997 und Granzin et al., 1998)

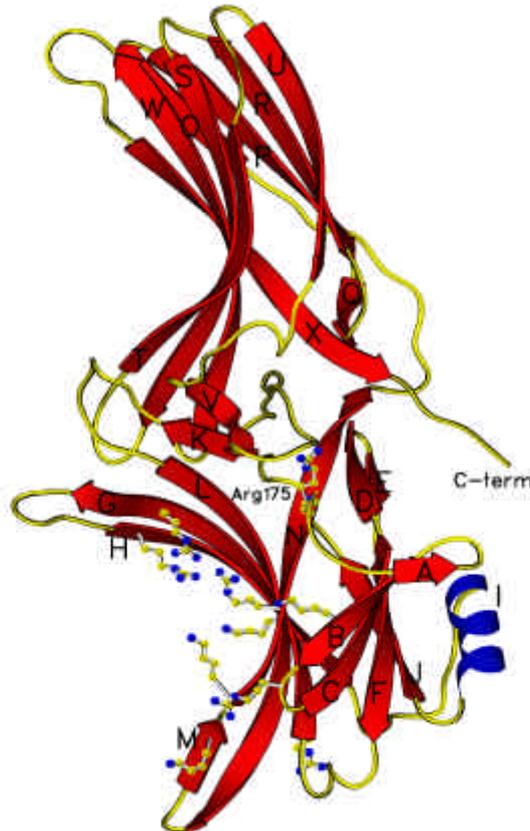


Abbildung 1.2 : Röntgen-Struktur von visuellem Arrestin: Nach Granzin et al., 1998

Das Arrestin-Molekül hat eine Größe von etwa $90 \times 39 \times 50 \text{ \AA}$ und ist aus zwei Domänen, bestehend aus antiparallelen β -Faltblattstrukturen und einer kurzen N-terminalen α -Helix, aufgebaut. Diese beiden Domänen sind verknüpft durch einen flexiblen Bereich, der als Scharnier- oder "hinge"-Region bezeichnet wird. Das in der Abbildung hervorgehobene Arginin 175 soll die Phosphorylierungs-Sensitivität in Bezug auf die Rhodopsinbindung vermitteln (Gurevich, 1998). Die Interaktion mit aktiviertem Rhodopsin erfolgt vermutlich über Bindung des Photorezeptors in die "Kuppel-Struktur" der N-terminalen Domäne. Die Struktur von Arrestin ist in Bezug auf den C-Terminus unvollständig, da in den entsprechenden kristallographischen Datensätzen keine verwertbare Elektronendichte ab Aminosäure 368 vorhanden war. Auch spätere kristallographische Analysen mit rekombinantem Arrestin führten zu keiner Verbesserung der C-terminalen Struktur (J. Granzin, pers. Mtlg.). Unter Berücksichtigung der hohen Sequenzhomologie zwischen Arrestin und β -Arrestin (vergleiche Abbildung 1.1) kann die Arrestin-Struktur als Modell für die Molekülstruktur des β -Arrestin dienen.

1.1.4. β -Arrestin als Mediator der Internalisierung von GPCRs

Neben der Entkopplung des Liganden-aktivierten Rezeptors vom G-Protein (vergl. 1.1.2.) fungiert β -Arrestin auch als Vermittler einer weiteren Ebene der Rezeptordesensibilisierung. Es wurde beobachtet, daß β_2 -adrenerge Rezeptoren eine Minute nach Liganden-Stimulation mit einer Halbwertszeit von ca. zwei Minuten von der Zelloberfläche in intrazelluläre Kompartimente transportiert werden (Chuang & Costa, 1979; von Zastrow & Kobilka, 1992; Ferguson 1998b und Waldo et al., 1983). Vermittelt wird diese Rezeptorinternalisierung durch die sog. "Clathrin Coated Pits". Diese setzen sich aus einem Netzwerk aus Clathrin-Triskelien zusammen, die sich unterhalb der Membran assoziieren, sich als Membranvesikel einstülpen und abschnüren. β -Arrestin, welches an aktivierte GPCRs gekoppelt ist, bindet über die C-terminale Clathrin-Bindedomäne an eine β -Faltblatt-Propeller Struktur des N-Terminus von Clathrin (ter Haar, 2000). β -Arrestin dient hier also als Adapter-Molekül für die Internalisierung von GPCRs.

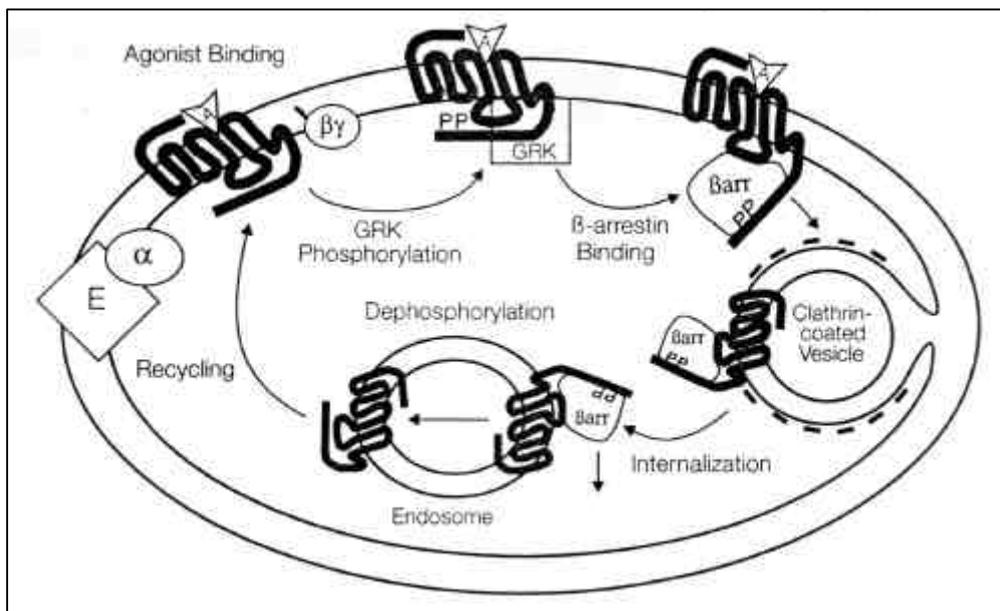


Abbildung 1.3: Internalisierung und Resensibilisierung von GPCRs: Schematisch dargestellt sind die Mechanismen der Desensibilisierung von aktivierten GPCRs nach Bindung eines Agonisten, an denen β -Arrestine beteiligt sind. α, β, γ \equiv Untereinheiten des G-Proteins, E \equiv Effektor enzym (z.B. Adenylatcyclase), GRK \equiv Rezeptor-Kinase, β arr \equiv β -Arrestin, P \equiv Phosphat (nach: Ferguson, 1996).

In der obigen Abbildung sind die Mechanismen zusammengefaßt, mit denen β -Arrestine eine Desensibilisierung von GPCRs bewirken. Nach Aktivierung des Rezeptors durch die Bindung des Agonisten wird über das G-Protein ein Effektorenzym (E) aktiviert. Durch die konzertierte Aktion der Rezeptorkinase und β -Arrestin wird der Rezeptor vom G-Protein entkoppelt. Darüber hinaus bewirkt β -Arrestin die Verknüpfung des Rezeptors mit Clathrin und den "Coated Pits", sowie die Internalisierung. Neben der Desensibilisierung ermöglicht die Internalisierung auch die Rekonstitution der phosphorylierten Rezeptoren. Im Endosom wird der Rezeptor dephosphoryliert und erneut zurück zur Plasmamembranoberfläche transportiert (Resensibilisierung).

Es konnte für viele GPCRs gezeigt werden, daß sie in β -Arrestin-abhängiger Weise über "Clathrin coated Pits" internalisiert und "recycled" werden (zusammengefaßt in Ferguson et al., 1996, 1996b und 1998, Krupnick & Benovic, 1998).

Für einige GPCRs (z.B. Vasopressin-Rezeptor, Neurotensin-Rezeptor 1, Angiotensin II-Typ 1A-Rezeptor; Zhang et al., 1999) konnte gezeigt werden, daß β -Arrestin zusammen mit dem

gebundenen Rezeptor ins Endosom internalisiert wird (wie in Abb. 1.3 dargestellt). Dagegen löst sich β -Arrestin von dem β_2 -adrenergen Rezeptor aber auch anderen GPCRs vor der Internalisierung an der Plasmamembran bzw. in den "coated pits" und wird nicht internalisiert (z.B. Dopamin D1A-Rezeptor und Endothelin-Typ A-Rezeptor; Oakley et al., 1999 und Shiina et al., 2000).

Hierdurch kann β -Arrestin die Dephosphorylierung und damit das weitere Schicksal verschiedener Rezeptoren nach der Internalisierung unterschiedlich beeinflussen. Darüber hinaus implizieren diese Ergebnisse, daß der zu internalisierende Rezeptor in den "coated pits" vom β -Arrestin an andere Rezeptor/Clathrin-Adaptoren "weitergereicht" werden muß.

In den letzten Jahren wurde die regulatorische Rolle, die β -Arrestin bei dieser Internalisierung einnimmt, genauer untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Bedeutung von β -Arrestin weit über die Funktion als Adapterprotein hinausgeht.

1.1.5. Regulation von β -Arrestin durch Phosphorylierung, Phosphoinositide und andere Bindungspartner

Lin und Mitarbeiter konnten 1997 zeigen, daß die Fähigkeit, die Internalisierung und demnach auch die Resensibilisierung von Rezeptoren zu vermitteln, von der Phosphorylierung des Serin-412 am C-Terminus von β -Arrestin abhängt. Cytoplasmatisches β -Arrestin ist fast vollständig an Ser-412 phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt in einer negativen Rückkopplungsschleife mit der "extracellular-signal regulated kinase" ERK: Phosphoryliertes β -Arrestin kann zwar an den Rezeptor binden und ihn vom G-Protein entkoppeln, es ist aber nicht in der Lage, an Clathrin zu binden und damit die Internalisierung des Rezeptors einzuleiten (Kovoor et al., 1998). Dephosphoryliertes β -Arrestin fördert die Internalisierung des β -adrenergen Rezeptors. Die Internalisierung aktiviert ERK, welches wiederum β -Arrestin phosphoryliert. Durch Aktivierung des β -adrenergen Rezeptors wird β -Arrestin an die Plasmamembran rekrutiert, wo es, wahrscheinlich durch wieder andere Faktoren reguliert, dephosphoryliert wird.

Mit NSF (n-ethylmaleimid-sensitive fusion protein), einer ATPase, wurde ein direkter Interaktionspartner von β -Arrestin gefunden, der die Internalisierung des β_2 -adrenergen Rezeptors stimuliert und sogar den dominant negativen Effekt einer β -Arrestin-Mutante (S412D) kompensiert, die den phosphorylierten Zustand von β -Arrestin imitiert (Mc Donald et al., 1999).

Des Weiteren stellte sich heraus, daß β -Arrestin in der Lage ist, das Protoonkogen c-Src als Adapter an den β -adrenergen Rezeptor zu binden und zu regulieren (Luttrell et al., 1999). Neben der Rolle in der mitogenen Signaltransduktion wird c-Src durch die Bindung an β -Arrestin an die Membran rekrutiert, wo sie als Tyrosinkinase andere Faktoren phosphoryliert, die für die Rezeptorinternalisierung von Bedeutung sind (z.B. Dynamin) (Miller et al., 2000). Über diese Regelkreise ist β -Arrestin auch an der Regulation mitogener Signalkaskaden beteiligt. Dies wird besonders durch die Beobachtung deutlich, daß β -Arrestin auch die Internalisierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren fördert, die nicht zur Gruppe der GPCRs zählen (Lin et al., 1998 und Referenzen darin). Die spezifische Rolle, die β -Arrestin hier einnimmt, ist allerdings noch wenig untersucht.

Gaidarov und Mitarbeiter (1999) konnten für β -Arrestin 2 (implizit auch für β -Arrestin 1) eine Bindestelle für Phosphoinositide (AS 223-285) lokalisieren und in Bezug auf Rezeptor- und Clathrinbindung charakterisieren. Phosphoinositide stimulieren die Internalisierung β_2 -adrenerger Rezeptoren *in vivo*, beeinflussen jedoch *in vitro* das Bindungsverhalten von β -Arrestin an Clathrin oder den Rezeptor nicht signifikant. Bindung von Inositolhexaphosphat

hingegen inhibiert sowohl die Rezeptor- als auch die Clathrinbindung, wobei die Autoren hier einen Effekt vermuten, der unabhängig von der Phosphoinositid-Bindungsstelle ist. Die genaue physiologische Bedeutung und die molekularen Mechanismen dieser Beobachtung bleiben aber zunächst ungeklärt.

1.1.6. Interaktion von β -Arrestin mit anderen Clathrin-Adapterproteinen

Wie in Abschnitt 1.1.4. beschrieben, zeigt β -Arrestin ein rezeptorabhängiges Internalisierungsverhalten. Für den β -adrenergen Rezeptor wurde gezeigt, daß für die Konzentrierung der Rezeptor/ β -Arrestin-Komplexe in den "Coated Pits" das Adapter Protein 2 (AP2) erforderlich ist. Obwohl β -Arrestin selbst an Clathrin binden kann, wird der β -adrenerge Rezeptor offenbar über AP2 an das Clathringerüst gebunden. Die Bindung von β -Arrestin an die β_2 -Untereinheit von AP2 wird über die Arginine 394 und 396 des β -Arrestin vermittelt (Laporte et al., 1999 und 2000).

Es deutet sich an, daß an der Regulation der Internalisierung und Resensibilisierung von GPCRs weitere Faktoren und Adaptorproteine beteiligt sind, die in einem konzertierten Netzwerk interagieren und somit eine Vielfalt von teilweise kompensatorischen Regelkreisen aufbauen.

Die Kristallstruktur der β_2 -Untereinheit von AP2 wurde im August 2000 veröffentlicht (Owen et al., 2000). Ebenfalls bekannt ist die Struktur einiger weiterer Adapterproteine sowie die der N-terminalen Domäne von Clathrin als Komplexstruktur mit Peptiden aus der Clathrin-Bindedomäne von β -Arrestin und AP3, einem weiteren Adapterprotein (ter Haar et al., 1998, 2000; Neer & Smith, 2000).

Die dreidimensionale Struktur von β -Arrestin könnte nicht nur in Bezug auf Clathrin-Adaptoren sondern auch in Hinblick auf die anderen hier beschriebenen Interaktionen und Regulationen zu weiterem Verständnis erheblich beitragen. Von besonderem Interesse sind hierbei die Rezeptorbindungsdomäne, die Clathrin-Bindungsdomäne, die "receptor phosphorylation recognition site" sowie die Bindungsstellen für Phosphoinositide.

1.2. Das PAR-4 Protein "Prostate Apoptosis Response Gene 4"

1.2.1 Die Apoptose

Die Apoptose ist eine in der Evolution konservierte, komplex organisierte Form des Zelltodes. Dieser programmierte Zelltod spielt eine entscheidende Rolle während der Entwicklung und der Homöostase von Geweben und Organen. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zellen durch Verletzung unkontrolliert absterben und das umgebende Gewebe durch Entzündungsreaktionen schwer schädigen können, wird eine apoptotische Zelle von den Nachbarzellen internalisiert, ohne diese zu beeinträchtigen.

Besonders deutlich wird die Rolle der Apoptose bei neurodegenerativen Krankheiten und vor allem bei Tumorerkrankungen. Eine Tumorzelle kann im einfachen Fall als Zelle angesehen werden, die sich aufgrund genetischer Veränderungen von den Wachstumskontrollinstanzen der Zelle und des umgebenden Gewebes entkoppelt hat und unkontrolliert proliferiert. Durch Apoptosemechanismen werden solche Zellen in der Regel erkannt und beseitigt. Ist auch diese Regulationsinstanz außer Kraft gesetzt, kann sich aus einer solchen, transformierten Zelle ein Tumor bilden.

Bei vielen neurodegenerativen Krankheiten, wie zum Beispiel Alzheimer, ist die Apoptose, da sie hier nicht einzelne Zellen sondern ganze Gewebe betrifft, selbst das Symptom der Krankheit, wenn auch nicht die eigentliche Ursache. Durch die Krankheit geschädigte Zellen werden in ausdifferenzierten neuronalen Geweben, wenn überhaupt, nur sehr langsam ersetzt. Apoptose kann durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren induziert werden, die entweder von außen auf die Zelle einwirken (z.B. Entzug von Wachstumsfaktoren, toxische Substanzen) oder zellinterner Natur sind (z.B. DNA-Schädigung oder oxidativer Streß). Teilweise ziehen exogene Apoptosestimuli auch Reaktionen in den Zellen nach sich, die selbst wieder als apoptotisches Signal dienen und somit die Wirkung verstärken (Ronai, 1999; Strambolic et al., 1999).

Wird in einer Zelle Apoptose induziert, so lassen sich physiologisch und morphologisch eindeutige Merkmale erkennen. Hierzu zählen (in chronologischer Reihenfolge) zunächst Veränderungen an den Mitochondrien, was sich im Zusammenbruch des Membranpotentials, dem Efflux von Cytochrom c und Störung der Calciumhomöostase manifestiert. Etwa zur gleichen Zeit wird die Aktivierung verschiedener Cysteinproteasen (Caspasen) beobachtet, die sich in Form einer "Caspase-Aktivierungskaskade" gegenseitig aktivieren (zusammengefaßt in Song & Steller, 1999). Mit dem anschließenden Schrumpfen der Zelle sowie DNA-Kondensation und der Fragmentierung des Genoms wird der apoptotische Zustand der Zelle auch mikroskopisch erkennbar.

Die Regulationsmechnismen, die diese Reaktionen vermitteln, sind vielschichtig, bisher nur teilweise verstanden und werden ob ihrer medizinischen Bedeutung intensiv erforscht (Page, 2000; Kumi, 2000 und Camandola, 2000).

1.2.2. PAR-4 als proapoptotischer Faktor in Tumoren und bei der Regulation neurodegenerativer Krankheiten

Das 38 kDa (332 AS) große cytosolische Protein PAR-4 wurde 1994 durch einen "differential hybridization screen" einer Ratten-Prostatakrebs-Zelllinie, die zur Apoptose angeregt worden war, entdeckt und kloniert (Sells et al., 1994). Unabhängig wurde es auch durch eine "Two-hybrid"-Untersuchung als Interaktionspartner der Kinase Dlk entdeckt (Page et al., 1999).

Als strukturelle Merkmale wurden zunächst ein "Leucin-Zipper"-Motiv am C-Terminus sowie eine "Death domain" beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.4.).

Es zeigte sich, daß PAR-4 für einige Formen der Apoptose unentbehrlich, alleine allerdings nicht ausreichend ist.

Durch einige, meist immunohistologische und phänotypische Untersuchungen konnte PAR-4 als proapoptotisches Protein im Zusammenhang mit einer Reihe von Krankheitsbildern beschrieben werden.

1.2.2.1 Apoptose-Sensibilisierung von Karzinomzellen durch PAR-4

Es konnte gezeigt werden, daß PAR-4 sowohl auf m-RNA- als auch auf Protein-Ebene in Prostatakrebszellen, die durch äußere Stimuli zur Apoptose angeregt wurden, hochreguliert wird (Boghaert et al., 1997). Ein solcher, apoptoseinduzierender Stimulus, kann im Entzug von Testosteron (Kastration von Versuchstieren) und Wachstumsfaktoren aber auch dem Einsatz von Proteasominhibitoren liegen. Die Heraufregulation von PAR-4 korreliert mit der Herabregulation von Bcl-2, einem antiapoptotischen Protein, und scheint unabhängig von der Aktivität von p53 zu sein, dem prominentesten Tumorsuppressorprotein (Herrmann et al., 1998; Qiu et al., 1999).

In Kolon-Karzinomzellen konnte Apoptose und eine Erhöhung des PAR-4-Spiegels durch entzündungshemmende Mittel (Cyclooxygenase-Inhibitoren) induziert werden (Zhang & DuBois, 2000; Kumi-Diaka & Butler, 2000).

Cook und Mitarbeiter zeigten 1999, daß PAR-4 unterdurchschnittlich in Nierenzell-Tumoren exprimiert wird, während Biopsie-Proben aus humanen Neuroblastomen, Prostatatumoren sowie Kopf- und Nackentumoren im Vergleich zu gesunden Geweben durchschnittliche Expressionsraten aufwiesen. Primäre Zellkulturen dieser Nierentumore ließen sich durch transfektionsinduzierte Expression von PAR-4 (ektopische Expression) für apoptotische Stimuli resensibilisieren.

Diese Befunde deuten an, daß Par-4 Zellen für Apoptose sensibilisiert, bzw. die Suppression von PAR-4 (in Nierenzellkarzinomen) Bestandteil der Tumorgenese ist.

Dadurch wird die Möglichkeit eröffnet, durch externe Stimulation mittels zu entwickelnder Medikamente die Apoptose in hierfür suszeptiblen Tumorzellen zu induzieren bzw. diese Sensitivität durch ektopische Expression von PAR-4 einzuleiten.

1.2.2.2. Die Rolle von PAR-4 bei neurodegenerativen Erkrankungen

In den letzten zwei bis drei Jahren wurden Verbindungen von PAR-4 zu einer Reihe neurodegenerativer Krankheiten hergestellt. Viele dieser Krankheiten manifestieren sich in einem Absterben von differenzierten Neuronen und ganzen Regionen des Gehirns. Die Rolle, die PAR-4 bei diesen Krankheiten spielt, wurde sowohl an humanem Biopsie-Gewebe als auch an entsprechenden Tiermodellen studiert.

Bei allen weiter unten beschriebenen Krankheiten scheint PAR-4 für die Auslösung von Apoptose als Reaktion auf toxische Substanzen und/oder oxidativen Streß unentbehrlich zu sein. PAR-4 scheint in der phänotypischen Signalkaskade an einer sehr frühen Stelle zu operieren und könnte als eine Art "Hauptschalter" für neuronale Apoptose angesehen werden (Chan et al., 1999; Mattson 2000).

Bei der **Alzheimer-Krankheit** bilden sich im Parenchymgewebe der Gehirns sog. "Plaques" aus amyloidem β -Protein, gefolgt vom Absterben der Neuronen in den befallenen Hirnregionen. Es konnte gezeigt werden, daß amyloides β -Protein Apoptose induziert und PAR-4 in diesen Zellen hochreguliert ist (Mattson & Goodman, 1995). Ferner stellte sich heraus, daß amyloides β -Protein die Expression von PAR-4 und Apoptose direkt oder indirekt induziert. Durch Expression einer dominant negativen Mutante von PAR-4, die nur noch den C-terminalen Bereich des Proteins und vor allem den "Leucin-Zipper" beinhaltet, konnte der apoptoseinduzierende Einfluß von amyloidem β -Protein aber auch von Presilinin 1, das für eine vererbare Form von Alzheimer verantwortlich ist, blockiert werden (dominant negativ bedeutet, daß diese Mutante auch die Wirkung von Wildtyp-PAR-4 kompetitiv inhibiert). Offenbar wird die Bindung von PAR-4 an andere apoptoserelevante Proteine über den C-terminalen Leucin-Zipper vermittelt, während der effektorische Bereich N-terminal liegt.

In der apoptotischen Signalkaskade entfaltet PAR-4 seine Wirkung an einem Punkt, bevor Veränderungen an den Mitochondrien und die Aktivierung von Caspasen meßbar werden (Guo et al., 1998; Mattson et al., 1999) (siehe Abschnitt 1.2.1.).

Die Ursache der **Parkinson-Krankheit**, bei der "dopaminerge Neuronen" degenerieren, sind weitgehend ungeklärt. Es ist aber bekannt, daß die Degeneration mit oxidativem Stress korreliert, der durch Störungen der mitochondrialen Komplex I-Aktivität verursacht wird (Mattson et al., 1999 und Referenzen darin). Es konnte gezeigt werden, daß das Absterben der Neuronen ein apoptotischer Prozeß ist, an dem PAR-4 beteiligt ist. In Tiermodellen und Zellkulturexperimenten konnte der Einfluß degenerationsfördernder Substanzen und Stimuli mit einer Erhöhung der PAR-4 Mengen in den Zellen korreliert werden, während dieser

Einfluß durch PAR-4 antisense-RNA und dominant negatives PAR-4 kompensiert wurde (Duan et al., 1999, 1999b, Mattson et al., 1999b).

Als ein Symptom der **Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)** degenerieren, durch oxidativen Streß induzierte Apoptose, Motor-Neuronen, was zur schweren Lähmungen und schließlich zum Tod des Patienten führt. Oxidativer Streß wird in einigen vererbaren Formen der ALS durch Mutationen in Superoxid-Dismutase-Proteinen ausgelöst. Die Degeneration der Neuronen scheint PAR-4 abhängig zu sein. (Pedersen et al., 1999 und 2000; Mattson et al. 1999 und Referenzen darin).

Anhand von post-mortem Biopsien und Tiermodellen konnte die für Alzheimer und Parkinson beschriebene Rolle von PAR-4 auch auf die **Huntington-Krankheit** übertragen werden. Morbus Huntington wird als Erbkrankheit durch Trinukleotidexpansion innerhalb des Huntingtin-Gens und damit einer Polyglutaminexpansion des Huntingtin-Proteins ausgelöst und führt wie ALS zu einer Degeneration von motorischen Neuronen im Gehirn (Pedersen et al., 1999b).

Aktuelle Studien zeigen des Weiteren die Beteiligung von PAR-4 vermittelter Apoptose bei der Pathogenese von **HIV-Encephalitis**, die durch das neurotoxische HIV-Protein Tat ausgelöst wird (Kruman et al., 1999), sowie bei **Schlaganfällen** und **Epileptischen Anfällen** (Mattson et al., 1999 und 2000).

Es ist davon auszugehen, daß die Rolle von PAR-4 in Zukunft auch bei weiteren neuronalen Krankheiten bestätigt wird, die mit Apoptose der geschädigten Zellen verbunden sind.

1.2.3. Interaktionspartner von PAR-4 und die Regulation der Apoptose

Als erste direkte Interaktionspartner von PAR-4 wurden eine untypische Isoform der Proteinkinase C, die PKC ζ , sowie das Wilms Tumor Suppressorprotein WT1 identifiziert. (Diaz-Meco et al., 1996 bzw. Johnstone et al., 1996). PAR-4 interagiert mit der regulatorischen Domäne der PKC ζ und inhibiert deren Kinaseaktivität. Die Bindung erfolgt zwischen dem "Leucin-Zipper" von PAR-4 und einem "Zink-Finger"-Motif der Kinase (Berra et al., 1997; Sanchez et al., 1998). PKC ζ ist als antiapoptotisches Protein bekannt, dessen Inhibierung durch PAR-4 evtl. Bestandteil der Apoptoseinduzierung ist (Berra et al., 1997; Wang et al., 1999 und zusammengefaßt in Mattson et al., 1999).

WT1 ist ebenfalls als antiapoptotisches Protein beschrieben, daß als Tumorsuppressor Wachstumsarretierung in bestimmten Tumorzellen auslöst. PAR-4 bindet an WT1 (erneut Leucin-Zipper mit Zink-Finger) und inhibiert die WT1-vermittelte Transkription von "Response"-Genen. In Prostatakarzinom-"Modellzellen" konnte die wachstumsarretierende Wirkung von WT1 durch PAR-4 aufgehoben werden (unter Induzierung von Apoptose), Überexpression von WT1 hingegen minderte die Sensibilität der Zellen für apoptotische Stimuli. Über die Rolle von WT1 in differenzierten neuronalen Zellen liegen noch keine klaren Ergebnisse vor (Sells et al., 1997; Kim et al., 1998).

Eine indirekte Wirkung von PAR-4 wurde auf die Aktivität der antiapoptotischen Proteine NF κ B und Bcl-2 festgestellt. Überexpression von PAR-4 führte in Prostatakarzinomzellen zu einer Verminderung der Bcl-2 Menge in den Zellen und reduzierte die DNA-Bindungsaktivität von NF κ B (Qiu et al., 1999). NF κ B wird durch die Wirkung von PKC ζ aktiviert, indem diese den Inhibitor I- κ B α phosphoryliert, der sich daraufhin von NF κ B löst, wodurch dieses wiederum in den Kern transloziert und als Transkriptionsfaktor u.a. die Expression von Bcl-2 aktiviert (Diaz-Meco et al., 1999; Mattson et al., 1999). Für neuronale Zellen konnte eine analoge Wirkung von PAR-4 beschrieben werden (Camandola & Mattson, 2000). Die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 wird in einem stabilisierenden Einfluß auf die Mitochondrienmembran vermutet.

In welchem Zusammenhang Bcl-2 und die Mitochondrien zu der beobachteten, PAR-4 abhängigen Aktivierung von Caspase-8 stehen, ist unklar (Mattson, 1999).

NFκB wird positiv reguliert durch das Protoonkogen Ras, eine Wirkung, die durch PAR-4 inhibiert wird. Überexprimiertes PAR-4 kann die Ras-abhängige Transformation von Zellen über den Raf-MAP-Kinase-“Pathway” verhindern. Gleichzeitig reguliert Ras über diesen Regulationspfad offenbar auch die Expression von PAR-4 herunter. Diese Inhibierung wird wahrscheinlich durch die MAP-Kinase ERK vermittelt. PAR-4 und ERK inhibieren sich offenbar gegenseitig in ihren diametralen Wirkungsweisen. Reduktion von PAR-4 scheint einer der Mechanismen zu sein, mit denen Ras seine transformationsfördernde Wirkung vermittelt (Barradas et al., 1999; Nalca et al., 1999; Qiu et al., 1999).

Die genauen Regulationsmechanismen der genannten Proteine und die Übertragbarkeit der gemachten Beobachtungen auf andere Zellsysteme ist Gegenstand aktueller Forschung. Das Schema in Abbildung 1.4. kann aus diesem Grunde nur als vorläufiges Modell dienen.

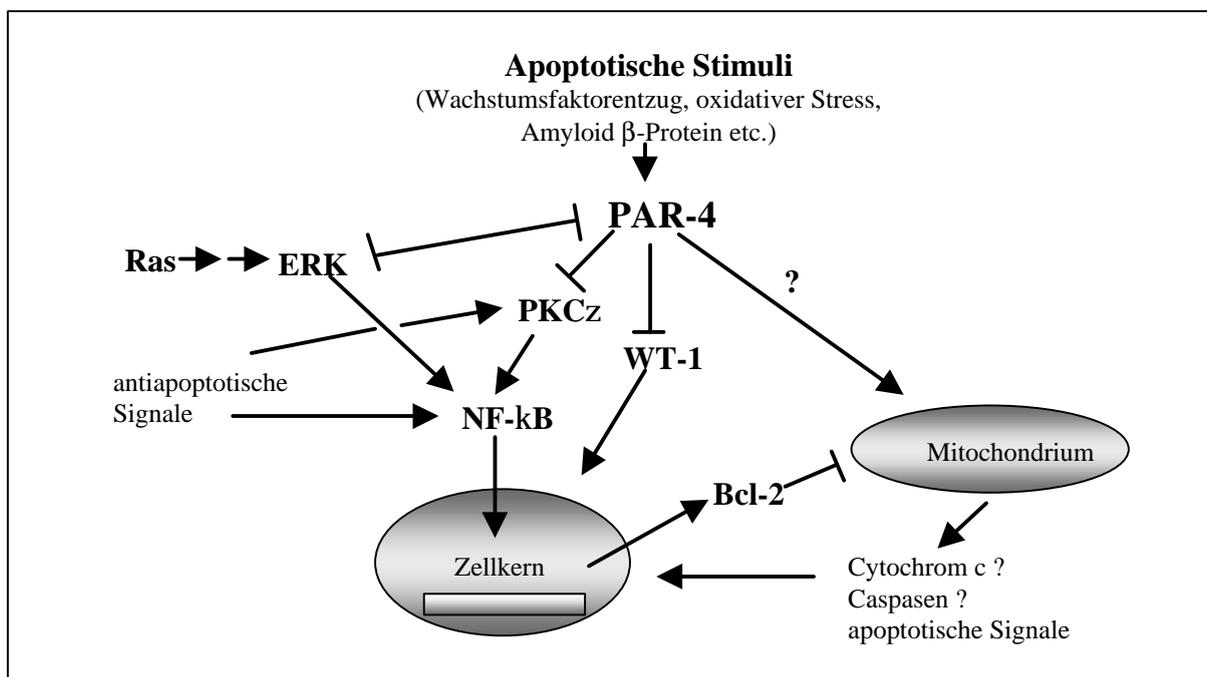


Abbildung 1.4.: Modell des apoptotischen Einflusses von PAR-4: Die Abbildung faßt die im Text beschriebenen Mechanismen zusammen. (teilweise aus Mattson, 1999 und Camandola, 2000)

1.2.4. Strukturelle Eigenschaften des PAR-4 Proteins

Als signifikanteste Eigenschaften des Proteins besitzt PAR-4 einen C-terminal gelegenen Leucin-Zipper sowie eine sogenannte “Death domain” (siehe Abb. 1.5.). Die Leucin-Zipper-Domäne (Heptad-Repeat-Motif) fungiert in der Regel als Dimerisierungsdomäne mit anderen Leucin-Zipper-Proteinen. (Homo- oder Heterodimere). Diese Domäne ist essentiell für die Funktion von PAR-4, da Deletionsmutanten ohne Leucinzipper nicht in der Lage sind, die Apoptose zu vermitteln. Gleichzeitig wirkt der C-Terminus des Proteins alleine dominant negativ, d.h. er verhindert auch in Gegenwart vollständigen PAR-4 Proteins die apoptotische Wirkung durch Konkurrenz um Bindungspartner. Der Leucinzipper liegt innerhalb der sog. Death domain, die ein Merkmal vieler Proteine ist, die in Apoptose involviert sind. Daß beide Domänen zusammenfallen, ist allerdings auffällig und bisher bei keinem anderen Protein beobachtet worden. (zusammengefaßt in Rangnekar, 1998).

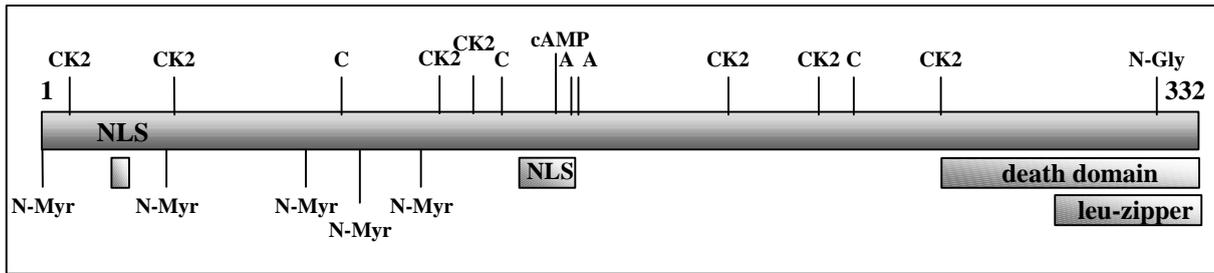


Abbildung 1.5.: Putative strukturelle Domänen von PAR-4: Dargestellt sind funktionelle Domänen und potentielle Modifizierungsstellen des PAR-4-Moleküls (aus *Rattus norvegicus*) gemäß Datenbankvorhersagen. **Leucin-Zipper:** AS 290 bis 332; **Death Domain:** AS 258-332; **CK2** Kaseinkinase II Phosphorylierungsstelle (AS 11, 38, 115, 124, 197, 223, 258); **C** Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle (AS 96, 135, 236); **A** Proteinkinase A Phosphorylierungsstelle (AS 154, 155); **NLS** Kernlokalisierungssignal (AS 20 bis 25 und 137 bis 153); **N-Myr** N-Myristoylierungsstelle (AS 4, 36, 78, 92, 111); **N-Gly** N-Glykosylierungsstelle (AS 320). (nach Rangnekar, 1998 und "Prosite Motif Search": Hofman et al., 1999)

PAR-4 enthält zwar Konsensussequenzen von Kernlokalisierungssignalen (NLS), es wurde aber gezeigt, daß PAR-4 im Cytoplasma lokalisiert ist und in apoptotischen neuronalen Zellen nicht in nachweisbaren Mengen in den Nukleus transloziert (Sells et al., 1997 und Guo et al., 1998). In Verbindung mit Dlk induziert PAR-4 Apoptose und transloziert zusammen mit Dlk an Actin-Filamente (Abb. 1.6.), wobei die Ursache und Funktion dieser Reaktion nicht exakt geklärt ist (Page et al., 1999).

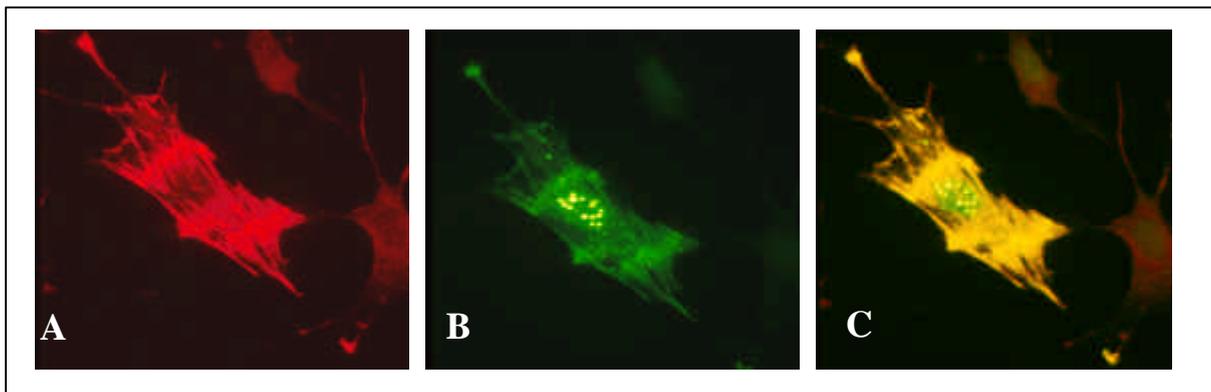


Abbildung 1.6: Co-Lokalisation von Dlk und Par-4 am Cytoskelett. Co-transfizierte REF52.2-Zellen wurden 24h nach der Transfektion fixiert und für GFP direkt visualisiert. Die Färbung von Par-4 erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz (anti-Par-4, anti-rabbit-Cy3). (A) Par-4-Cy3-Fluoreszenz, (B) GFP-Dlk-Fluoreszenz, (C) Doppelbelichtung. (aus Grit Page, Dissertation 2000)

PAR-4 besitzt einige potentielle Phosphorylierungsstellen. Für Dlk konnte gezeigt werden, daß diese Kinase tatsächlich in der Lage ist, PAR-4 in vitro zu phosphorylieren (Page, 2000). Welche Seitengruppen phosphoryliert werden, ist nicht bekannt.

Eine Aussage, ob und in welchem Maße das PAR-4 Protein glykosyliert ist, kann ebenso wenig gemacht werden.

In Anbetracht der Ergebnisse zur Rolle von PAR-4, die in den wenigen Jahren seit seiner Entdeckung gemacht wurden, kann vermutet werden, daß weitere Studien zu PAR-4 in Zukunft neue Ergebnisse mit großer medizinischer Relevanz bringen werden. Schon jetzt deutet sich an, daß PAR-4 aus medizinischer und pharmazeutischer Sicht großes Potential in Zusammenhang mit Krebs und neurodegenerativen Krankheiten besitzt.

Strukturelle Informationen zum PAR-4 Molekül und vor allem die dreidimensionale Struktur kann ein Ausgangspunkt für rationale Ansätze in der Entwicklung von Medikamenten gegen diese Krankheiten sein.

1.3. Zielsetzung der Arbeiten

Die dreidimensionale Struktur des visuellen Arrestins ist durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe gelöst worden (Granzin et al., 1998). Visuelles Arrestin stellt allerdings einen auf die Sehkaskade beschränkten Spezialfall dar. β -Arrestine hingegen besitzen ein breiteres Wirkungsspektrum sowie eine unterschiedliche Struktur in Bezug auf den C-Terminus des Proteins.

Ziel der Arbeit war es, die dreidimensionale Struktur des bovinen β -Arrestin1 zu bestimmen. Hierzu sollte das etablierte System für die heterologe Expression von visuellem Arrestin in *S.cerevisiae* (Krafft, 1999) auf β -Arrestin1 adaptiert und ausgebaut werden. Durch verschiedene Modifikationen des β -Arrestin-Gens und affinitätschromatographische Reinigungsverfahren galt es, große Mengen des rekombinanten Proteins in reiner Form zu gewinnen. Die Funktionalität des Proteins sollte untersucht, sowie Bedingungen und Methoden, durch die das exprimierte Protein kristallisiert werden kann, entwickelt werden. Durch röntgenkristallographische Methoden sollte anhand dieser Kristallen die β -Arrestin-Struktur gelöst werden. Hierzu kann die vorhandene Struktur des visuellen Arrestins als Modell für die Technik des molekularen Ersatzes verwendet werden.

Als zusätzliches Projekt wurde zu einem späteren Zeitpunkt begonnen, das "Prostate Apoptosis Response 4" - Protein (PAR-4) heterolog zu exprimieren, zu reinigen und strukturell zu charakterisieren. Da zu diesem Protein kaum biochemisch relevante Literaturdaten vorlagen, galt es, ein geeignetes heterologes Expressionssystem (*E. coli* und *S. cerevisiae*) für PAR-4 zu evaluieren und zu etablieren. Ebenso sollten Bedingungen für die Isolierung und Konzentrierung des Proteins gefunden werden, mit dem Ziel, PAR-4 zu kristallisieren oder es dreidimensionalen strukturellen NMR-Methoden zugänglich zu machen. Als Kontrolle der strukturellen Integrität und physiologischen Aktivität von PAR-4 waren biologische wie auch biophysikalische Untersuchungsmethoden geplant.

2. Material und Methoden

2.1.1. Geräte und Zubehör

Agarosegelelektrophorese:

Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Laufkammer Bio Max (QS710), Kodak,
Laufkammer GMA 200, Pharmacia, Uppsala, Schweden

DNA-Sequenzierung:

LI-COR 4200 Automatic Sequencer, MWG-Biotech, Ebersberg

Geldokumentationssystem:

Gel Doc 1000, Molecular Analyst, BioRad, München

pH-Meter:

pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin
mit pH-Elektrode von Schott Geräte, Hofheim a. Ts.

Photometer:

UV-120-02, Shimadzu, Japan
UV2101PC, Shimadzu, Japan

SDS-Gelelektrophorese:

Model 1000/500 Power Supply, BioRad, München
Power Supply 2301 Macrodrive 1, LKB, Bromma, Schweden
Protean II xi Cell, BioRad, München
2050 Midget, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, U.S.A.

Thermocycler:

PTC-200, MJ Research, Watertown, U.S.A.

Ultraschallgeräte:

Labsonic L mit Nadel 40TL, Braun, Melsungen
Ultraschallbad Transsonic Digital, Elma, Singen

UV-Tisch:

TFL20M, Biometra, Göttingen
Mini-Transilluminator mit UV-Weißlicht-Konvertierungsplatte, BioRad, München

Zellaufschlußgeräte:

French Press Hydraulikpresse, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.
French Press Zelle 20K mit Schnellfüllstand, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.
French Press Zelle 40K, handbefüllbar, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.

Zentrifugen:

Optima TL Ultrazentrifuge mit Rotor TLA 45, Beckman, Palo Alto, U.S.A.
Optima L-70K Ultrazentrifuge mit Rotor Ti70, Beckman, Palo Alto, U.S.A.
Amicon Mikrozentrifuge MC-13, Heraeus, Osterode
Zentrifuge 5414, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Kühlzentrifuge Biofuge 13 R mit Rotor HFA 14.2, Heraeus, Osterode
Megafuge 1.0 R mit Rotor BS4402/A, Heraeus, Osterode
Centricon H-401 mit Rotor A8.24, Kontron, Hermle, Gosheim
Kühlzentrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Sorvall RC5C mit Rotoren SS34, GS, KA-9000, DuPont, Wilmington, U.S.A.
Beckman J2-21 mit den Rotoren JA20 und JS-13, Palo Alto, U.S.A.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Reagenzien:

Sofern nicht anders angegeben, haben alle Chemikalien die Qualität "p.a." oder "reinst". Die Lösungen werden mit hochreinem Wasser (Millipore-Qualität) angesetzt.

Acrylamid-Bisacrylamid (Gel 30)	Roth
Adeninsulfat	Sigma
Agar	Difco, ICN
Agarose (Standard)	Sigma, Biozym
Agarose, Metaphor	Biozym
L-Alanin	Merck, Fluka
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Ampicillin	Boehringer Mannheim
L-Arginin	Sigma
L-Asparagin	Sigma, Fluka
L-Asparaginsäure	Sigma
Bacto Pepton	Difco
Brain Heart Infusion (BHI) Broth	Difco
Brain Heart Infusion (BHI) Agar	Difco
Bromphenolblau	Bio-Rad
BSA	Serva
Calciumchlorid	Merck
Citronensäure	Merck
Complete™, EDTA-free	Boehringer Mannheim
Complete™	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
L-Cystein	Sigma, Merck
Desthiobiotin	Sigma
Dimethylformamid	Merck
DMSO	Merck
DTT	Merck, Sigma
dNTPs	New England Biolabs
EDTA	Merck
Essigsäure	Riedel de Haen
Ethanol, absolut	Riedel de Haen
Ethanol, vergällt	Hoffmann
Ethidiumbromid	Sigma
D (+) Galaktose	Sigma, Aldrich,
D (+) Glukose	Sigma
L-Glutamin	Sigma
L-Glutaminsäure	Sigma
Glycerin	Sigma
L-Glycin	Sigma
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
HABA	Sigma
Harnstoff	Merck
HEPES	Sigma
Hefe-Extrakt (Yeast Extract)	Difco
L-Histidin	Sigma
Imidazol	Sigma
Inositol	Sigma
IPTG	Eurogentech
L-Isoleucin	Sigma
Isopropanol	Riedel de Haen
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck

Kalium-Natrium-Tartrat	Merck
Kanamycin-monosulfat	Sigma
Kupfersulfat	Merck
L-Leucin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
L-Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Riedel de Haen
L-Methionin	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
tri-Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Nickelsulfat-hexahydrat	Sigma
Paraffinöl	Merck
Pepton	Oxoid
L-Phenylalanin	Sigma
PMSF	Sigma
Ponceau S	Sigma
L-Prolin	Sigma
Rubidiumchlorid	Merck
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel de Haen
L-Serin	Sigma
SDS	BioRad
D-Sorbitol	Sigma
TEMED	BioRad
L-Threonin	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris (Base)	Sigma
Tris (HCl)	Sigma
Tris-Acetat	Sigma
Trypton	Difco
L-Tryptophan	Sigma, Aldrich
Tween 20	Sigma
L-Tyrosin	Sigma
Uracil	Sigma, Aldrich
L-Valin	Sigma
X-Gal	AGS
YNB, ohne Aminosäuren	Difco

Enzyme:

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Boehringer Mannheim
Klenow Fragment der DNA-Polymerase aus <i>E. coli</i>	Boehringer Mannheim
Mung Bean Nuklease	New England Biolabs, Schwalbach
Taq Expand High Fidelity	Boehringer Mannheim
Taq-DNA Polymerase	Promega
T4 DNA-Ligase	Gibco/BRL, Karlsruhe New England Biolabs, Schwalbach

Restriktionsenzyme werden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Gibco/BRL (Karlsruhe), Boehringer Mannheim und Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

Filtereinheiten:

Supor Acrodisc 32, 0,2 µm oder 0,45 µm, Gelman Sciences, Ann Arbor, U.S.A.
Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm PES, Nalgene, Rochester, U.S.A.
Bottle Top Filter, 0,2 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.
Bottle Top Filter, 0,45 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.
Bottle Top Filter, PES 0,45 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.
VacuCap 60, 0,2µm, Gelman Sciences, Roßdorf

Gelfiltrationssäulen zur Probenentsalzung:

Column PD-10, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Econo-Pac 10DG Columns, BioRad, München

Molekulargewichts-Standards für die Elektrophorese:

Protein:

Rainbow, high molecular weight	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE, Molecular Weight Standard, Broad Range	BioRad, München
10 kDa-Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
BenchMark™, Protein Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
BenchMark™, Prestained Protein Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
Wide Range, multicolored	NEN™ Life Science, Boston, U.S.A.

DNA:

1 kb Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
Längenmarker VII	Boehringer Mannheim
Längenmarker 100bp-Ladder	Boehringer Mannheim

Säulenmaterialien für die Chromatographie:

Chelating Sepharose Fast Flow Media, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
StrepTactin Sepharose, IBA, Göttingen

Ultrafiltrationseinheiten:

Fugisep-Maxi 10.000, 30.000; Sevatec, Witten oder Membrapure, Bodenheim
Fugisep-Midi 10.000, 30.000; Sevatec, Witten oder Membrapure, Bodenheim
Fugisep-Mini 10.000, 30.000; Sevatec, Witten oder Membrapure, Bodenheim
Centricon-10, -30; Amicon, Beverly, U.S.A.
Microcon-10, -30; Amicon, Beverly, U.S.A.
Centriplus-10, -30; Amicon, Beverly, U.S.A.

2.1.3. Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

Agarosegelelektrophorese:

Ethidiumbromidlösung:	10 mg/ml Ethidiumbromid
TAE:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
DNA-Probenpuffer:	50 % Saccharose, 1x TAE, 0,25 % Bromphenolblau

Lösen von DNA:

TE:	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0
Trispuffer:	10 mM Tris, pH 8,5

Polyacrylamidgelelektrophorese:

2x SDS-Probenpuffer: 125 mM Tris, 4 % (w/v) SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
 5x Harnstoffprobenpuffer: 8 M Harnstoff, 0,2 M Tris/HCl, 2 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 M DTT
 Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8
 Trenngelpuffer: 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8
 Laufpuffer : 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
 Coomassie-Färbelösung: 0,05 % (w/v) Coomassie R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Ethanol
 Entfärber: 10 % (v/v) Essigsäure

Transformation von *S. cerevisiae*:

TE-LiAc: 10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA pH 7,6, 100 mM LiAc
 TE-LiAc-PEG: 10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA pH 7,6, 100 mM LiAc, 40 % (w/v) PEG3350

Westernblotanalyse:

Blot-Puffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris (Base), 20 % (v/v) Methanol
 Ponceau S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure
 TBS: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6
 TBS-T: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6, 0,1 % (v/v) Tween 20
 Stripping-Lösung: 60 mM Tris, 100 mM β -Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, pH 6,8

2.2 Arbeiten mit *E. coli*

2.2.1.1. Verwendete Organismen

Stamm	relevante genetische Marker	Verwendung	Referenz	Herkunft
DH5 α	<i>F endA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 I⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR [lacZYA-argF]-U169 (j80dlacZDM15)</i>	Klonierung von DNA	Hanahan, 1985	ITC Biotechnology GmbH
XL1-Blue	<i>recA1 gyrA96 endA1 thi-1 hsdR17 lac [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10(Tetr)] supE44 relA1</i>	Klonierung von DNA	Bullock et al., 1987	Stratagene
Top10	<i>FmcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) deoR j80dlacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i>	Klonierung von DNA	Invitrogen	Invitrogen
BL21Codon Plus(DE3)RIL	<i>E.coli B F ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm⁻ Tet^r gal I (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam^r</i>	Expression von Protein	Weiner et al., 1994	Stratagene

Tabelle 2.1: Verwendete *E. coli* Stämme

2.2.1.2. Medien und Stammlösungen

Soweit nicht anders angegeben, werden Medien autoklaviert (120°C, 2,1 bar, 20 min). Zusätze wie Antibiotika oder Induktoren werden sterilfiltriert (0,22µm)

dYT-Medium: 1,6% (w/v) Trypton, 1% (w/v) Hefe-Extract, 0,5 % (w/v) NaCl

BHI-Medium: 52 g/l (Komplexmedium, Fa. Difco)

Kulturplatten der entsprechenden Medien (ca. 20ml) enthalten 1,5% (w/v) Agar.

Medienzusätze:

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

IPTG-Stammlösung: 1M in H₂O, sterilfiltriert

X-gal-Stammlösung: 40 mg/ml in Dimethylformamid

2.2.1.3. Stammhaltung

Die kurz- bis mittelfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgte auf entsprechenden Agar-Platten. Für eine langfristige Archivierung von Stämmen und Bakterienklonen wurden 500 µl einer möglichst frischen ÜN-Kultur mit 500 µl Kryoprotektant (BHI-Medium, 80% (w/v) Glycerin) versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.2.1.4. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Die Herstellung der hier verwendeten transformationskompetenten Bakterien (DH5α, TOP 10 und XL1 blue) erfolgte, in abgewandelter Form, nach der Methode von Hanahan, 1983.

Eine ÜN-Kultur des entsprechenden Bakteriums (aus Einzelkolonie, 37°C, 120 rpm) wird 1:100 in 100ml BHI oder DYT überimpft und nach Inkubation bei einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 auf 4°C abgekühlt und pelletiert (3000g, Megafuge, 10 min, 4°C). Alle weiteren Schritte erfolgten bei 0 bis 4°C. Das Pellet wurde zunächst in 20 ml TFB I-Puffer (30 mM NaAc, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH 6,0) aufgenommen, erneut pelletiert und in 4 ml TFB II-Puffer (10 mM MOPS, pH 7,0, 75 mM CaCl₂, 10 mM NaCl, 15% Glycerin) resuspendiert. Aliquots zu 100 µl dieser transformationskompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.1.5. Transformation von *E.coli* (nach Hanahan, 1983)

5 bis 20 µl eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA wurden zu 100 µl kompetenter Bakterien gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt der Hitzeschock für 90 bis 120 s bei 42 °C. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden die Zellen in 1ml BHI-Medium bei 37°C für 30 bis 60 min geschüttelt. Nach Pellettierung (10 s bei 10000 g) wurden die Zellen auf entsprechenden Antibiotikanährböden ausgestrichen.

2.2.2. Allgemeine Bedingungen für die Expression von PAR-4 in *E.coli*

Proteinexpression wurde in Kulturen von 100 ml bis 10 l (max. Volumen: 750 ml pro Zwei-Liter-Erlenmeyerkolben) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in allen Stadien des Experimentes unter Selektionsbedingungen.

Aus einer ÜN-Vorkultur wurde die Expressionkultur in dYT-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,3 inokuliert und bei 37°C und 120 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,7 inkubiert. Die Induktion erfolgte mit 0,5 bis 1,0 mM IPTG bei gleichzeitiger Zugabe zusätzlichen Antibiotikums (100 mM Ampicillin). Unter Induktionsbedingungen wurde die Kultur für weitere 2 bis 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000rpm, 10 min pellettiert, in H₂O resuspendiert (50 ml), erneut pellettiert und ggf. nach Aliquotierung bei -70°C gelagert. Spezielle Expressionsbedingungen sind im Ergebnisteil dargestellt.

2.2.2.1. Zellaufschlußmethoden für *E.coli*

Die Art des Aufschlusses der *E.coli*-Zellen ist abhängig von der Intention des Experimentes. Für eine erste qualitative Kontrolle der heterologen Proteinexpression wurde ein Zellpellet äquivalent zu ca. 10 ml Ausgangskultur in 1 ml Protein-Probenpuffer resuspendiert, 10 min bei 99°C erhitzt und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Somit standen die Proben direkt für SDS-PAGE und Western-Blot-Untersuchungen zur Verfügung.

Zur Etablierung der optimalen Puffer- und Reinigungsbedingungen wurden die Zellen eines 4 Liter-Expressionsansatzes pellettiert und zu 50 ml-Fractionen aliquotiert. Der Zellaufschluß dieser Aliquots erfolgte in verschiedenen zu testenden Aufschlußpuffern mittels einer Ultraschallnadel (Labsonic L, Fa. Braun, kleine Nadel TL40). Die resuspendierten Zellen wurden auf Eis drei mal für 30 sek. dem Ultraschall ausgesetzt. Eine Kontrolle des Aufschlußgrades erfolgte mittels eines Durchlichtmikroskopes (Phasenkontrast, Zeiss). Das entstandene Zellysat wurde durch Zentrifugation (14000 g, 5 min) in Pellet und Überstandfraktion getrennt. Für präparative Zwecke wurden *E.coli*-Pellets von bis zu 10 g Feuchtgewicht mittels einer French-Press (20K bzw. 40K-Zelle) bei 4°C aufgeschlossen. Der Aufschlußdruck lag für *E.coli* bei 10000 bis 15000 psi. Um bereits freigesetztes Protein zu schonen, wurden nach jedem Durchgang noch nicht geöffnete Zellen abzentrifugiert (1 min, 20000 rpm, SS34-Rotor), in 10 bis 20 ml Aufschlußpuffer resuspendiert (Ultraschallnadel) und erneut in der French-Press aufgeschlossen. Insgesamt wurden ca 10 g Zellen in 70 bis 100 ml Puffer aufgeschlossen. Die genauen Pufferbedingungen sind im einzelnen im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.2.2. Herstellung geklärter Zellysate für die Affinitätschromatographie

Für die Affinitätsreinigung der exprimierten Proteine ist es erforderlich, daß nur die lösliche Fraktion des Zellysates auf die Chromatographiesäule aufgetragen wird. Zelltrümmer sowie präzipitiertes Protein würden die Säule irreversibel blockieren und somit unbrauchbar machen. Das mittels der French-Press hergestellte Zellrohlysat wird zunächst in einer Ultrazentrifuge (Beckman Optima L-70K, Rotor: Ti 70) bei 35000rpm für 60 min zentrifugiert. Der klare Überstand wird durch einen 0,45 µm Filter (PES, Bottle Top Filter Fa. Nalgene, Rochester, USA) von letzten unlöslichen Bestandteilen und Proteinaggregaten getrennt und steht somit für die Chromatographie bereit.

2.3. Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.3.1.1. Hefemedien

Minimalmedium SC: 0,67 % (w/v) YNB ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Galaktose, 0,1 % (w/v) DROP-OUT-MIX ohne Uracil bzw. ohne Leucin (Isoleucin)

Vollmedium YPD: 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Glucose bzw. Galaktose

Für Agarplatten wird dem Medium 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

DROP-OUT-MIX (je nach Bedarf ohne Uracil bzw. ohne Leucin angesetzt):

Adenin 0,5 g, Alanin 2,0 g, Arginin 2,0 g, Asparagin 2,0 g, Asparaginsäure 2,0 g, Cystein 2,0 g, Glutamin 2,0 g, Glutaminsäure 2,0 g, Glycin 2,0 g, Histidin 2,0 g, Inositol 2,0 g, Isoleucin 2,0 g, Leucin 10,0 g, Lysin 2,0 g, Methionin 2,0 g, Phenylalanin 2,0 g, Prolin 2,0 g, Serin 2,0 g, Threonin 2,0 g, Tryptophan 2,0 g, Tyrosin 2,0 g, Uracil 2,0 g, Valin 2,0 g

2.3.1.2. Verwendete Organismen

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz/Herkunft	Paarungstyp
F11 α	<i>leu2-3, 112, ura3-52, his3-D200, suc2-D9</i>	F.Becker, U.S.A.	Mat α
SEY6210	<i>leu2-3, 112, ura3-52, his3-D200, trp1-D901, lys2-801, suc2-D9</i>	F.Becker, U.S.A. (Wilsbach & Payne, 1993)	Mat α
YPH500	<i>leu2-D1, ura3-52, his3-D200, trp1-D63, lys2-80, ade2-106</i>	Fa. Stratagene	Mat α
DY 150	<i>ura-3-52, leu2-3, 112, trp1-1, ade2-1, his3-11, can1-100</i>	Fa. Clonetech	Mat a
BJ2168	<i>prc1-407, prb1-1122, pep4-3, leu2, trp1, ura3-52, gal2</i>	YGSC, U.S.A. (Jones, 1990)	Mat a

Tabelle 2.2: Verwendete *S. cerevisiae* Stämme

2.3.1.3. Stammhaltung

Die kurz- bis mittelfristige Aufbewahrung von Hefezellen erfolgte auf entsprechenden Agar-Platten unter Selektionsbedingungen. Für eine langfristige Archivierung von Stämmen und Hefeklonen wurden 500 μ l einer möglichst frischen ÜN-Kultur mit 500 μ l Kryoprotektant (YPD -Medium, bzw. SC^{leu-}, 80% (w/v) Glycerin) versetzt und bei -70°C eingefroren.

2.3.1.4. Herstellung Transformationskompetenter Hefezellen

Die Herstellung transformationskompetenter Hefezellen erfolgte in abgewandelter Form nach Schiestel und Gietz 1989. Mit einer ÜN-Kultur des entsprechenden Stammes wurden 100 ml YPD-Medium inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden

bei RT sedimentiert (5 min, 3000g), zunächst zweifach in sterilem H₂O (50 ml und 1 ml) dann zweifach in je 1 ml TFH I-Puffer (10 mM TrisHCl; 0,1 mM EDTA pH 7,6; 100 mM LiAc) gewaschen. Die derart behandelten Zellen wurden bei RT gelagert und behielten ihre Transformationskompetenz für 24 bis 48 h.

2.3.1.5. Transformation von *S.cerevisiae*

Für die Transformation wurden ca. 100 µg der entsprechenden Plasmid-DNA in einem Volumen von maximal 20µl zu 50 µl der oben beschriebenen kompetenten Zellen pipettiert, mit 300µl TFH II-Puffer (10 mM TrisHCl; 0,1 mM EDTA pH7,6; 100 mM LiAc; 40% PEG 3350; frisch angesetzt aus entsprechenden Stammlösungen) versetzt und kurz durchmischt. Der Transformationsansatz wurde dann bei 30°C für 30 min und anschließend bei 42°C für 20min inkubiert. Nach Zugabe von 500µl H₂O, Pellettierung und zweimaligem Waschen mit je 500 µl H₂O wurden die Zellen auf SC^{ura-}-Platten bei 30°C inkubiert bis sich Kolonien bildeten. Als Kontrolle auf die Präsenz beider plasmidkodierten Resistenzen wurden die Kolonien auf SC^{leu-}-Platten überimpft.

2.3.2. Allgemeine Bedingungen für die Protein-Expression in *S. cerevisiae*

Expressionsexperimente erfolgten in Ansätzen von 5 ml (im Reagenzglas zur ersten Kontrolle auf Proteinexpression eines Hefeklones) bis 15l (Produktion von Protein in 2l Erlenmeyerkolben) in SC^{leu-}-Medium mit 2% Galaktose (SG-Medium) als Kohlenstoffquelle.

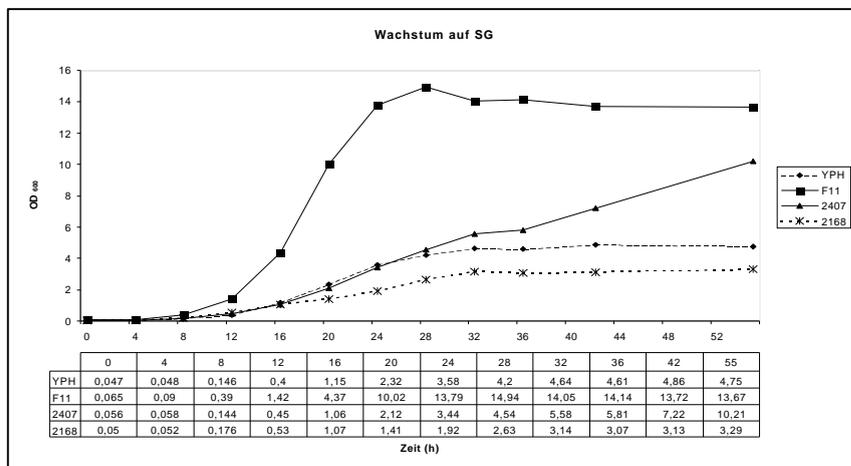


Abbildung 2.1: Wachstum der verschiedenen Hefestämme auf SG-Minimalmedium: Tabellarisch dargestellt sind die aus Doppelbestimmungen gemittelten Meßwerte der OD₆₀₀. Graphisch ist die OD₆₀₀ linear in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. (aus: B. Krafft, Dissertation 1999)

Zellen einer Einzelkolonie bzw. einer Vorkultur wurden solange passagiert bis das gewünschte Kulturvolumen mit einer OD₆₀₀ von ca. 3 bis 5 vorlag. Alternativ wurden stationäre ÜN-Kulturen (OD₆₀₀ von 10 bis 12) auf eine OD₆₀₀ von 3 bis 5 expandiert. Nach einer Regenerationszeit von 1 bis 2 Stunden erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,5mM (Endkonz.) CuSO₄. Expression wurde induziert zu Beginn bis zur Mitte der exponentiellen Wachstumsphase des Stammes F11α bei einer OD₆₀₀ von ca. 5. Nach 3 bis 8 Stunden, je nach Experiment, wurden die Zellen mittels Zentrifugation (10 min, 7000 rpm, Rotor KA-9000) geerntet, mit H₂O gewaschen, und nach Aliquotierung und erneuter Pellettierung bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3.3. Zellaufschluß von *S. cerevisiae*

2.3.3.1. Herstellung von Gesamtzellsaten für analytische Zwecke

Eine erste qualitative Kontrolle auf Expression der gewünschten Proteine erfolgte bei neuen Klonen mittels TCA und Glasperlen in einem Eppendorfgefäß. Hierzu wurde ein Zellpellet einer Expressionskultur, äquivalent zu 2 ml Kultur (OD₆₀₀ von 3 bis 5) in 500 µl 5% (w/v) Trichloressigsäure resuspendiert, mit ca. 250 µl Glasperlen (Glassbeads, 0,425 - 0,6 mm Durchmesser, Fa. Sigma) versetzt und 15 min bei RT geschüttelt (Eppendorf-Mixer 5432). Die Glassbeads wurden entfernt, und die ausgefällten Proteine nach 15 minütiger Inkubation auf Eis mittels Zentrifugation (13000rpm, 10 min) sedimentiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 500µl eiskaltem Aceton gewaschen, in 10µl 3M Tris; pH8,8 und 100µl Harnstoffprobenpuffer resuspendiert und stand somit nach Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation und Inkubation bei 96°C (10min) für die SDS-PAGE-Analyse zur Verfügung.

Vergleichbare Ergebnisse in kürzerer Zeit ließen sich erzielen, indem ein Zellpellet aus 10ml Kultur in 200µl Harnstoffprobenpuffer und 150µl Glassbeads resuspendiert und bei 95°C für 20 min geschüttelt wird. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile und der Glassbeads steht die Probe direkt für weiteren Analysen zur Verfügung.

2.3.3.2. Differentielle Analyse von Zellsaten

Zu einer vorläufigen Evaluierung, ob das exprimierte Protein in den Zellen gelöst vorliegt, wurden wiederum die Zellen aus 10ml Expressionskultur mit Glassbeads und unterschiedlichen Aufschlußpuffern resuspendiert und bei 4°C in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren 30min "gevortext". Nach Entfernung der Glassbeads und Zentrifugation (13000rpm, 4°C, 15min) wurde die löslichen Proteinfraction von Zelltrümmern und unlöslichem Protein getrennt. Beide Proben wurden in je 200µl Harnstoffprobenpuffer aufgenommen und getrennt analysiert.

2.3.3.3. Präparativer Zellaufschluß und Klärung des Zellsats

Der Aufschluß von Hefezellen zur Gewinnung großer Mengen exprimierten Proteins erfolgte analog der Methode, wie sie für *E.coli* beschrieben ist. *S.cerevisiae*-Pellets von bis zu 30 g Feuchtgewicht wurden mittels French-Press (40K-Zelle) bei 4°C aufgeschlossen. Der Aufschlußdruck lag hier bei 15000 bis 23000 psi. Die Klärung des Lysates erfolgte ebenfalls wie für *E.coli*-Proteine beschrieben. Für den finalen Filtrierungsschritt wurden über den 0,45µm-Membranfilter zusätzlich zwei bis drei Tiefenfilter aus Borosilikatglasfasern gelegt, da ansonsten der Membranfilter sehr schnell blockiert war.

2.4. Arbeiten mit DNA

2.4.1. Verwendete Plasmide

Folgende Plasmide fanden in dieser Arbeit Anwendung:

<u>Plasmid:</u>	<u>Marker:</u>	<u>Herkunft/Referenz:</u>
PCR-BLUNT	Kan ^r , Zeo ^r	Invitrogen, Groningen, Holland
pCR 2.1 TOPO	Kan ^r , Amp ^r	Invitrogen, Groningen, Holland
pCR 2.1	Kan ^r , Amp ^r	Invitrogen, Groningen, Holland
pET11a	Amp ^r	
pYEX-BX	Amp ^r , leu2d, ura3	Clontech, Heidelberg
pYEX-S1	Amp ^r , leu2d, ura3	Clontech, Heidelberg
pYEX-BX-SS	Amp ^r , leu2d, ura3	Eidhoff, 1999 unpublished
pYEX-BX-SSB	Amp ^r , leu2d, ura3	Eidhoff, 1999 unpublished

2.4.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion stellt eine schnelle und effiziente Methode sowohl zur Amplifikation als auch zu Modifikation in geringer Kopienzahl vorhandener DNA-Moleküle dar. In dieser Arbeit wurde sie angewendet zur Erstellung neuer Gen-Konstrukte sowie als Test auf Anwesenheit bestimmter DNA-Moleküle in Organismen. Des Weiteren diente sie, in abgewandelter Form, der Sequenzverifizierung neuer DNA-Konstrukte.

2.4.2.1. Allgemeine PCR-Bedingungen

Reaktionsansatz:

Primer 1 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Template (Plasmid)	etwa 20,0 ng
dNTP Mix (je 5 mM)	5,0 µl
10 x Reaktionspuffer	10,0 µl
Enzymgemisch	1,0 µl
H ₂ O	ad 100,0 µl

(Bei zu amplifizierenden DNA-Molekülen mit sehr hohem GC-Anteil wurde dem Reaktionsansatz noch 5 bis 10% DMSO zugegeben, um evtl. auftretende Kompressionsereignisse zu vermindern.)

Reaktionsbedingungen:

1. 2 min 96 °C (Denaturierung, ohne Polymerase; Hot-start)
2. 1 min 80 °C (Zugabe des Enzyms)
3. 45 sek. 92°C (Denaturierung)
4. 45 sek. T_m -2 bis 4°C (Annealing)
5. 30 bis 90 sek 72°C (Synthese, ca. 1000 bp / min)
30 bis 40 Wiederholungen der Schritte 3. bis 5.
6. 5 min 72 °C (Vollständige Komplementation evtl. vorhandener Einzelstränge)
7. ad infinito 4 °C

$$T_m = (\text{Anzahl Basenpaare A:T zwischen Template und Primer}) \times 2 + (\text{Anzahl Basenpaare G:C zwischen Template und Primer}) \times 4$$

2.4.2.2. PCR mit modifizierten Primern

Zur Herstellung neuer Gen-Konstrukte wurde zumeist mit der Expand-High-Fidelity-Polymerase (Taq/Pwo-Gemisch; Boehringer Mannheim) gearbeitet, die sich durch eine hohe Präzision (geringe Fehlerrate) auszeichnet. Für Kontroll-PCRs auf „ganzen Zellen“ wurde Taq-Polymerase (Promega) verwendet, die gegenüber suboptimalen Reaktionsbedingungen (Zellysate) unempfindlicher ist.

2.4.2.3. Modifizierung von Genen durch PCR

In dieser Arbeit wurden die kodierenden Sequenzen zweier Gene durch PCR verändert. So wurden durch entsprechend gewählte Primer Sequenzen für Protein-"tags" an die Enden der Gene angefügt. Hierzu werden Primer konstruiert, die neben dem Gen-komplementären Bereichen Überhänge für die Tags sowie ggf. zusätzlich noch Restriktionsschnittstellen zur Vereinfachung der weiteren Klonierung enthielten. Das erwünschte DNA-Konstrukt kann hierdurch in einer einzigen PCR hergestellt werden.

Zur Veränderung einzelner Positionen innerhalb der kodierenden Sequenz (Aminosäureaustausch u.ä.) wurde die sog. Trans-PCR-Methode angewendet. Hierbei wird zunächst die Mutation durch einen entsprechenden Primer eingeführt und ein PCR-Produkt generiert, das von der Mutationstelle bis zu einem Ende des Gens reicht. Dieses Produkt wird, nach Reinigung, als Primer für eine zweite PCR eingesetzt, der neben dem Template noch der, dem anderen Ende des Gens komplementäre, Primer beigefügt wird. Auf diese Weise wird in zwei Schritten ein PCR Produkt erstellt, das das komplette Gen mit der Mutation darstellt. Für mehrere Mutationen muß das Prozedere entsprechend modifiziert werden. Eine andere Möglichkeit der Trans-PCR ist es zunächst zwei PCR-Produkte herzustellen, die zum einen vom Genanfang (START-Primer) zum Mutationsort (mut-ANTISENSE-Primer) zum anderen von der zu mutierenden Position (mut-SENSE-Primer) zum Genende (STOP-Primer) reichen. Diese PCR-Produkte können nach Reinigung in einer dritten PCR im Bereich der Mutation hybridisieren und in Verbindung mit den beiden „Außen-Primern“ das vollständige PCR-Produkt liefern.

2.4.3. Molekularbiologische Standardmethoden

Die eingesetzten Standardtechniken wie Restriktion, Klenow-Reaktion und Ligation erfolgten gemäß Ausubel et al. 1989 oder nach Anweisung des jeweiligen Enzym-Herstellers. Zumeist wurden vollständige PCR-Produkte in die Klonierungs-Vektoren pCR 2.1-TOPO, pCR 2.1, oder pCR-Blunt ligiert und mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Fehlerhafte Konstrukte wurden ggf. aus bereits vorhandenen Konstrukten zusammengesetzt. Anschließend erfolgte die Umklonierung in entsprechende Expressionsplasmide.

Plasmidisolierung bis 20 µg DNA aus transformierten *E.coli*-Zellen (Minipräp) erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen), größere Mengen bis 200 µg wurden manuell isoliert (Alkalische Lyse, Neutralisation mit Fällung von Proteinen, Präzipitation der DNA mit Ethanol, nach Ausubel et al. 1989)

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) oder unter gleichen Bedingungen mit Silicagel durchgeführt.

Für die Reinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen bzw. Umpufferung und Konzentrierung von DNA wurde das QIAquick Nukleotide Removal Kit oder das QIAquick PCR Purification Kit (beide Qiagen) verwendet.

Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgten entweder estimativ anhand eines Agarosegels oder quantitativ, photometrisch mittels eines GeneQuant-Photometers nach Anweisung des Herstellers (Pharmacia).

Die Qualitative und semiquantitative Analyse von DNA und Restriktionsansätzen wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt mit Agarosekonzentrationen von 0,75 - 2% Agarose in TAE-Puffer. Die Visualisierung der DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht durchgeführt.

2.4.4. Sequenzierung von DNA

Mit dem LI-COR-System können DNA-Abschnitte von über 1200 bp mit einer Reaktion sequenziert werden.

Durchgeführt wurde das „Cycle Sequencing“ mit einer Thermosequenase (Amersham). Die Markierung der DNA erfolgte durch Verwendung von IRD800-gekoppelten Oligonukleotiden (dyed primer method). Über die Fluoreszenzmarkierung erfolgt die Detektion der DNA-Stränge. Gelelektrophorese und Detektion wurden mit dem LI-COR 4200 Gene ReadIR (MWG-Biotech) durchgeführt. Die Reaktionen wurden nach Herstellerangaben angesetzt und mit Chill-Out-Wax (Biozym) überschichtet. 5,7 µl Plasmid in Trispuffer (100 ng-150 ng DNA pro 1000 Nukleotide) wurden mit 0,7 µl 50% DMSO und 0,6 µl Primer (2 pmol/µl) versetzt, dieser Ansatz auf 4 Reaktionsgefäße à 1,5µl verteilt und weitere 1,5µl des jeweiligen Reaktionsmix (G, A, T, C; 1 : 1 mit H₂O verdünnt) zugegeben.

Die Sequenzreaktionen wurden in 0,2 ml Gefäßen im Thermocycler in der Regel mit folgenden Parametern inkubiert:

Denaturierung:	2 Minuten 94 °C
30 Zyklen:	40 Sekunden 94 °C
	40 Sekunden 50 °C (je nach Primer)
	60 Sekunden 70 °C
Bis zur manuellen Beendigung	4 °C

Nach Zugabe von 3 µl Stoppuffer (Amersham) wurde die Probe für 2 min bei 70 °C denaturiert, und je 1,5 bis 2.5 µl werden auf das Gel (4,6 %iges Acrylamidgel, 66 cm lang) nach 30 min Vorlaufzeit aufgetragen.

Sequenziergel:

21 g Harnstoff
 32 ml H₂O
 5 ml 10 TBE-Puffer
 500 µl DMSO
 4,3 ml 40% Acrylamid-Bis-Acrylamid Lsg.

nach Entgasen:

50 µl TEMED
 350 µl 10% APS

10x TBE-Puffer:

162 g Tris-Base
 27,5 g Borsäure
 9,3 g EDTA Na₂-Salz
 pH 8,3 - 8,7 nicht einstellen!!!

Die Lösung wurde sterilfiltriert und das Gel gegossen (Polimerisation abgeschlossen nach 1 Stunde).

Die Detektion erfolgte zeitgleich mit der Elektrophorese mittels eines Infrarotlasers bei 800 nm. Es wird mit der Software Base ImageIR 4.0 ausgewertet (nach Angaben des Herstellers).

2.5. Proteinbiochemische Arbeiten

2.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende, diskontinuierliche SDS-PAGE dient dem Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht und ihrer durch das angelagerte SDS erzeugten Nettoladung, wobei die Eigenladung der Proteine zu vernachlässigen ist (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel lag bei 3,8%, die im Trenngel bei 10 bis 15 % je nach Molekulargewicht der relevanten aufzutrennenden Proteine.

Im Allgemeinen wurden vertikal laufende Gele von 11 x 8 cm in Verbindung mit der Apparatur 2050 Midget (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Ca,USA) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 100 bis 220 V (konst. Spannung) bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

Trenngel:

12/15,0 % (w/v) Acrylamid
 0,4 % (w/v) Bisacrylamid
 0,1 % (v/v) TEMED
 0,1 % (w/v) APS
 in Trenngelpuffer

Sammelgel:

3,8 % (w/v) Acrylamid
 0,1 % (w/v) Bisacrylamid
 0,1 % (v/v) TEMED
 0,1 % (w/v) APS
 in Sammelgelpuffer

Nach Beendigung des Gellaufs wurden die Gele entweder gefärbt oder für Western-Blot-Analysen weiterverarbeitet.

Die Visualisierung der Proteinbanden im Gel erfolgte durch Färben des Gels in einer Lösung von 0,05% (w/v) Coomassie R250, 25 % (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure. Nach fünfzehn minütiger Färbung wurden die Gele, ggf. ÜN in 10% Essigsäure entfärbt, so daß nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren. Die Dokumentation und Archivierung der Ergebnisse erfolgte zum einen durch Einschweißen der Gele in Plastikfolie, durch Einlesen als Computerdatei oder durch Trocknen der Gele auf Filterpapier.

2.5.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native-PAGE)

Bei der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird das Laufverhalten der Proteine durch ihre Größe, ihre Ladung, ihren Faltungszustand und die umgebenden Pufferbedingungen bestimmt. In dieser Arbeit wurde sie u.a. verwendet, um die Integrität aufgereinigten Proteins zu überprüfen. Die Durchführung erfolgte mit dem Phast-System (Control Unit 220VAC, Pharmacia). Es wurden vorgefertigte "Pre-cast"-Gele nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Färbung und Entfärbung der Gele erfolgte analog zur SDS-PAGE.

2.5.3. Westernblotanalyse

Die immunochemische Detektion von Proteinen diente in dieser Arbeit zur qualitativen und quantitativen Identifizierung und Analyse exprimierter und aufgereinigter Proteine. Diese Detektion erfolgte nach dem sog. Westernblotverfahren (Kyhse-Anderson, 1984). Hierbei werden zu analysierende Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und elektrophoretisch auf eine Membran übertragen, auf der der immunochemische Nachweis mit Antikörpern bzw. Konjugaten erfolgt.

Für die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Fa. Millipore und Poly Screen, Fa. NEN) wurde das "semi-dry-blot"-Verfahren angewendet (Transferkammer der Fa. Hoelzel). Zwischen die beiden Elektroden der Blot-Apparatur wurde folgendes "Sandwich" gelegt:

Anode

4 Lagen Whatman Papier (getränkt in Blotpuffer)
Acrylamidgel ohne Sammelgel (getränkt in Blotpuffer)
PVDF-Membran (aktiviert in 100% Methanol für 10 s)
4 Lagen Whatman Papier (getränkt in Blotpuffer)

Kathode

Der Transfer der Proteine erfolgte bei konstantem Stromfluß von $1\text{mA} / \text{cm}^2$ Membranfläche für 90 min. Anschließend wurde das Gel zur Kontrolle der Bloteffizienz mit Coomassie und die Membran mit Ponceau S-Lsg. gefärbt. Ggf. wurde die Lage der Längenmarker-Banden mit einem Kugelschreiber direkt auf der Membran markiert und die gefärbte Membran photokopiert, um die spätere Zuordnung von Signalen zu erleichtern.

Die Membran wurde anschließend mit TBS-Puffer entfärbt und stand für die immunochemische Detektion zur Verfügung.

2.5.3.1. Immunochemische Detektion

Je nach verwendetem Antikörper variierte die Detektionsmethode. Die folgende Beschreibung gilt für alle Antikörper und Konjugate mit Ausnahme des SA-AP-Konjugates zu Detektion des StrepTag II.

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden bei RT für 1h bzw. ÜN bei 4°C mit 10% (w/v) Milchpulver in TBS abgesättigt. Die Bindung des Primärantikörpers bzw. des Konjugates erfolgte in 5% Milchpulver in TBS bei RT für 1h bzw. ÜN bei 4°C. Überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges, fünfzehnminütiges Waschen (TBS-T, TBS-T, TBS) entfernt.

Wurde ein Sekundärantikörper verwendet, wurde die beschriebene Prozedur (Blocken, Binden, Waschen) mit dem zweiten Antikörper wiederholt. Die verwendeten Antikörper sind mit Peroxidase gekoppelt. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz. Als Peroxidase-substrat wurde "Super Signal" oder "Super Signal Ultra" (Fa. Pierce) gemäß Herstellerangaben verwendet. Chemolumineszenz wurde über Röntgenfilme (XAR oder Biomax-ML, Fa. Kodak) nachgewiesen, die je nach Intensität zwischen 2 Sekunden und 16 Stunden der Membran exponiert wurden.

Für den immunochemischen Nachweis des StrepTag II wurde das SA-AP-Konjugat verwendet, das sowohl den Strep-Tag erkennt als auch direkt mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Anstelle von Milchpulver wurde die Membran mit Roti-Block (Fa. Roth) abgesättigt. Das SA-AP-Konjugat wurde anschließend in TBS für 30 min eingesetzt. Nach den Waschschritten (s.o.) erfolgte die Detektion kolorimetrisch direkt auf der Membran. Hierzu wurden 55µl 7,5% (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70% (v/v) Dimethylformamid, 55 µl 5% (w/v) 5-Brom-4-Chlo-3-Indoyl-Phosphat in Dimethylformamid in 20 ml Detektionspuffer (5mM MgCl, 100mM NaCl, 100mM Tris pH8,8) auf die Membran gegeben und solange unter Lichtabschluß inkubiert, bis die Intensität der Signale ausreichend war. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran mit Wasser gestoppt, die Membran getrocknet und zu Archivierungszwecken als Computerdatei "eingescannt" bzw. photokopiert.

2.5.3.2. "Strippen" von Membranen und Rehybridisierung

Um die Blotmembran nach erfolgter Chemolumineszenz-Detektion erneut mit einem zweiten Antikörper zu inkubieren, wurde die Membran zwei mal für 30 min bei 50°C in Stripping-Lsg. (60 mM Tris, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, pH 6,8) unter leichter Agitation inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBS bzw. TBS-T stand die Membran für weitere Versuche zur Verfügung.

2.5.3.3. Verwendete Antikörper und Konjugate

Name	Antigen / Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
S6H8	AS 40-50 aus Arrestin (α-Arr)	monoklonal aus Maus	B.Krafft, Jülich	1:1000
anti Maus	IgG und IgM aus Maus	polyklonal, Ig aus Ziege, Peroxidase konjugiert	Pierce	1:10000 1:20000
SA-AP-Konjugat	StrepTag / Biotin (α-Strep)	Streptavidin an alkalischer Phosphatase	GATC	1:4000
Anti-poly-Histidin	poly-Histidin (α-HIS)	monoklonal, IgG2a aus Maus, Peroxidase Konjugat	Sigma	1:5000
Anti-par-4	PAR-4 (α-PAR-4)	polyklonal aus Kaninchen	Grit Page, Bonn	1:10000
anti Rabbit	anti-Kaninchen	aus Ziege Peroxidase Konjugat	Grit Page, Bonn	1:2000

Tabelle 2.4: Antikörper und Konjugate

2.5.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Ein erster Überblick über den Proteingehalt, beispielsweise einer Eluatfraktion, brachte eine estimative Bestimmung anhand von SDS-PAGE-Gelen.

Nach der Methode von Bradford (1976) wurde mit Hilfe des BioRad-Microassay nach Herstellerangaben die Proteinkonzentration einer Probe photometrisch bestimmt. Als Referenz diente eine Eichkurve, die mit einer BSA-Eichlösung (2 mg/ml, Pierce) erstellt wurde.

Eine präzisere, allerdings mit Verlusten an Protein verbundene Methode zur Proteinquantifizierung stellt die UV-Spektroskopie dar. Zur Bestätigung, daß die BSA-Werte zur Bestimmung der Konzentration von β -Arrestin herangezogen werden können, wurde der molare Extinktionskoeffizient für 10HIS- β Arr-Strep errechnet.

Bezieht man 1 Tryptophan ($\epsilon_{280}=5600$ l / mol / cm) und 13 Tyrosine ($\epsilon_{280}=1400$ l / mol / cm) des β -Arrestin-Moleküls in die Kalkulation ein, so ergibt sich für 10HIS- β Arr-Strep ein molarer Extinktionskoeffizient von 23800 l / mol / cm.

Mit dem Lambert-Beer'schen Gesetz ($c = A / \epsilon * d$) läßt sich so aus einer gemessenen OD_{280} die Konzentration des Proteins in der Probe berechnen. Es zeigte sich, daß diese Werte um nicht mehr als 5% von den Werten abwichen, die im Allgemeinen mit dem Bradford-Assay (BSA) bestimmt wurden.

2.5.5. Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen

Um Proteine in einen neuen Puffer zu überführen, wurden Gelfiltrationssäulen verwendet (PD-10 Säulen, Pharmacia oder Econo-Pac 10 DG-Säulen, BioRad). Das zugrundeliegende Prinzip dieser Säulen besteht darin, daß die rel. großen Proteinmoleküle fast ungehindert durch die Säule laufen, während Salze und Puffersubstanzen in den Kanälen des Matrix-Materials (Sepharose) retardiert werden. Die Säulen wurden nach Angaben der Hersteller verwendet.

Konzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrafiltrationseinheiten (siehe Material). Volumen und Ausschlußgröße dieser Konzentratoren richtete sich nach dem Probenvolumen und dem zu konzentrierenden Protein. Durch Zugabe definierter Volumina neuer Lösungen ließ sich während des Konzentrierens gleichzeitig die Pufferzusammensetzung in bestimmten Maßen verändern.

2.6. Affinitätschromatographische Reinigung von Proteinen

Im Gegensatz zu anderen chromatographischen Methoden, wie Gelfiltration oder Ionenaustausch-Chromatographie, ermöglichen die in dieser Arbeit verwendeten affinitätschromatographischen Techniken eine Purifikation der entsprechenden Proteine mit hoher Homogenität in einem einzigen Reinigungsschritt. Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf der starken "biologischen" oder chemischen Interaktion eines matrix-fixierten Liganden mit einer, in diesem Fall dem Protein angehängten, Aminosäuresequenz.

Chromatographien wurden in Säulenvolumina von 0,5 ml bis 20 ml durchgeführt (Econo-säulen, BioRad) unter Überdruck von 0 bis 0,05 bar.

Der Ablauf der Reinigung rekombinanten Proteins besteht im Wesentlichen aus folgenden Schritten:

- Aktivieren des Säulenmaterials (nur für IMAC-Säulen)
- Äquilibrieren der Säule mit entspr. Aufschlußpuffer (siehe dort)
- Auftrag des geklärten Zellysates auf die Säule
- Entfernen unspezifisch gebundener Proteine durch Waschen
- Elution des rekombinanten Proteins durch kompetitive Verdrängung
- vollständiges Entfernen aller noch verbliebenen Proteine von der Säule mit Harnstoff
- Entfernen der gebundenen Metallionen (Strippen), nur bei IMAC
- Regeneration der Säule

Die genauen Abläufe der Reinigung sind jeweils im Ergebnisteil wiedergegeben.

2.6.1. Proteinpurifikation mit dem StrepTag II System

Das StrepTag II-System nutzt die sehr hohe Affinität von StrepTactin (Voss & Skerra, 1997) zu dem Oktapeptid des StrepTag II (NH₂-WSHPQFEK-COOH) (Schmidt et al., 1996), welches mittels molekularbiologischer Techniken N-terminal oder C-terminal an ein zu exprimierendes Protein angehängt werden kann. Abgeleitet ist es von dem System Biotin-Avidin, wobei die einzelnen Bestandteile auf ihre Bindungseigenschaften hin molekularbiologisch optimiert wurden.

Der entscheidende Vorteil gegenüber anderen affinitätschromatographischen Techniken besteht darin, daß die hier relevante Bindung biologischer Natur ist, was bedeutet, daß die gesamte Reinigung unter physiologischen und reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden kann.

In dieser Arbeit wurde Strep-Tactin Sepharose (Institut für Biolanalytik, Göttingen) verwendet.

Das Zellysat und damit das StrepTagII-Protein (10 bis 100 ml) wurde dreimal mit einer Flußrate von 3-5ml / min auf die voräquilibrierte Säule (3 bis 15 ml) appliziert und mit 50 bis 100 ml Aufschlußpuffer gewaschen. Ggf. wurde das Millieu durch weiteres Waschen mit Elutionspuffer ohne Desthiobiotin den Bedingungen angepaßt, in denen das Protein später konzentriert und weiterverarbeitet werden sollte. Die Elution erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin in Elutionspuffer. Desthiobiotin bindet ebenfalls mit hoher Affinität an Streptactin und verdrängt aufgrund seiner höheren Konzentration das StrepTagII-Protein von den Bindungsstellen auf dem Säulenmaterial. Desthiobiotin wurde mit 2,5 bis 5 mM HABA ebenfalls kompetitiv von der Säule entfernt. Eine intensive Rotfärbung des Materials zeigt den Erfolg der Verdrängung an. Nach dem Entfernen von denaturiertem und präzipitiertem Protein mit 50 ml 8M Harnstoff und dem Entfernen von HABA durch intensives Waschen mit H₂O oder 100mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) stand die so regenerierte Säule für weitere Versuche zur Verfügung.

Die Eluatfraktionen wurden durch SDS-PAGE qualitativ und quantitativ analysiert und die entsprechenden Fraktionen entweder direkt für die Kristallisation konzentriert oder zunächst, wie oben beschrieben, umgepuffert (zur Entfernung des Desthiobiotins).

2.6.2. Proteinpurifikation mit dem Nickel-IMAC System

Die IMAC (**I**mmobilisierte **M**etallionen **A**ffinitäts-**C**hromatographie) nutzt die chemische Affinität komplexgebundener elektropositiver Übergangsmetallionen wie Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} oder Zn^{2+} zu elektronenreichen Liganden wie Histidin, aber auch Tryptophan oder Cystein. Die Metallionen sind hierzu reversibel, koordinativ an einen hydrophilen Spacer gebunden, der selbst wiederum kovalent an eine feste Matrix (hier Sepharose) gekoppelt ist. Dies ermöglicht eine Reinigung von Proteinen, denen beispielsweise eine Hexahistidinsequenz C-terminal oder N-terminal angehängt wurde. Je zwei bis drei Histidine können von einem Metallion komplexiert werden. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit Chelating Sepharose Fast Flow Media (Amersham) und NiSO_4 bzw. CuSO_4 gearbeitet.

Die Reinigungsprozedur entspricht im Wesentlichen der, die bereits für das StrepTagII System beschrieben wurde. Die Säule (1 bis 30 ml) wird mit den entsprechenden Metallionen beladen und mit Aufschlußpuffer äquilibriert. Nach Auftrag des Zelllysates wurde die Säule mit Aufschlußpuffer gewaschen, dem eine steigende Konzentration von Imidazol (5 bis 50 mM) zugegeben wurde. Imidazol ähnelt chemisch dem Histidin und verdrängt kompetitiv unspezifisch gebundenes Protein. Eine grundsätzliche Veränderung der Pufferzusammensetzung erfolgte ggf. während dieser Waschschrte. Rekombinantes Protein wurde durch Elutionspuffer (inkl. 500 mM Imidazol) von der Säule gelöst.

Die Metallionen wurden durch Zugabe von „Strip“-Puffer (100 mM EDTA, 500 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,9) komplexiert und entfernt. Präzipitiertes Protein wurde durch 8 M Harnstoff aus der Säule gelöst, die nach Waschen mit H_2O damit regeneriert war.

Die Eluate wurden entweder direkt umgepuffert (zur Entfernung des teilweise proteinschädigenden Imidazols) und konzentriert oder, wenn an dem Protein zusätzlich noch ein StrepTagII vorhanden war, über eine Strep-Tactin-Säule weiter aufgereinigt.

2.7. Funktionalitätstests für b-Arrestin und PAR-4

2.7.1. *In vitro* Kinase Test zur funktionalen Integrität von heterolog exprimiertem PAR-4

Es ist bekannt, daß die "DAP-like-Kinase" Dlk in der Lage ist, an Par-4 zu binden und es zu phosphorylieren (Page et al, 1999). Die spezifische Bindung von Dlk an Par-4 setzt zumindest teilweise strukturelle Integrität beider Proteine voraus. Von daher kann die Phosphorylierung von Par-4 durch Dlk als Hinweis auf Funktionalität des exprimierten PAR-4 gewertet werden.

Die Durchführung dieses Kinase-Tests ist mit kleinsten Proteinmengen möglich. Jeweils geringe Mengen an gereinigten Proteinen (Dlk und PAR-4) werden zusammen mit radioaktiv markierten γ -ATP für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12 μl Probenpuffer (2x) mit 50 mM EDTA gestoppt. Die Proben wurden für die SDS-PAGE aufbereitet und anschließend autoradiographisch analysiert. Hierzu wurde das Gel getrocknet und einem Röntgenfilm so lange exponiert, bis eine hinreichende Intensität der Signale erreicht war.

In vitro Kinase-Tests wurden im Labor von Prof. Dr. K.H. Scheidtmann an der Universität Bonn durchgeführt. Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,5 µl Dlk (ca. 1ng)
- 1 µl PAR-4 (verschiedener Herkunft)
- 9 µl Kinasepuffer
- 1 µl γ -ATP (3000 Ci / mmol)

Mitunter wurde den Ansätzen auch 1 ng Myosin Light Chain sowie die Histonproteine H3 und H4 zugefügt, deren Phosphorylierung neben der Autophosphorylierung der Dlk als Positivkontrolle Verwendung fand.

Kinasepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM NaCl
8 mM MgCl₂
2 mM MnCl₂
1 mM DTT
1 mM PMSF

2.7.2. Funktionalitätstests für heterolog exprimiertes β -Arrestin

In dieser Arbeit wurde als Test auf funktionelle und strukturelle Integrität des β -Arrestins seine Fähigkeit ausgenutzt, spezifisch an phosphoryliertes Rhodopsin zu binden. Diese Tests wurden von Dr. Alexander Pulvermüller vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik am Universitätsklinikum Charité in Berlin durchgeführt.

2.7.2.1 Zeitabhängige Absorptionsmessung der MetaII-Entstehung (Extra-MII Test)

Dieser Test beruht im Wesentlichen auf der Beobachtung, daß β -Arrestin, analog zum visuellen Arrestin und Transducin, in der Lage ist, nach Bindung den MII-Zustand im Photozyklus von Rhodopsin zu stabilisieren (Hofman, 1985 und Pulvermüller et al., 1997).

Für die Absorptionsdifferenzmessungen wird ein modifiziertes Zweiwellenlängen Spektrometer (Shimadzu UV300; Schleicher et. al., 1989) verwendet, bei dem die Probe durch einen spektral definierten Lichtblitz (500±20 nm) photolysiert und die zeitliche Veränderung des entstehenden Photoproduktes gemessen wird. Diese Blitzlichtphotolyseapparat mißt die Differenzen zwischen der Absorptionsänderung bei 380 nm (A_{\max} von Meta II) und 417 nm (isosbestischer Punkt des Meta I / Meta II Überganges). Durch diese Normierung können Absorptionsdifferenzmessungen als direktes Maß der Meta II-Entstehung betrachtet werden. Der durch den Blitz ausgelöste Umsatz von Rhodopsin (R) zu aktiviertem Rhodopsin (R^{*}) wird mit Hilfe von Graufiltern eingestellt und bei 500 nm bestimmt.

Die Gleichgewichtsreaktion von Meta I nach Meta II ist mit einer Absorptionsverschiebung des Rhodopsins von 478 nm nach 380 nm verbunden und damit der spektroskopischen Untersuchung zugänglich. Die Interaktion mit Transducin oder

Arrestin (respektive β -Arrestin) stabilisiert das 380 nm Photoprodukt Meta II auf Kosten seiner tautomeren Formen, die im Bereich von 460-480 nm absorbieren. Die beiden Photoprodukte Meta I und Meta II stehen in einem Gleichgewicht, dessen Lage im Wesentlichen von der Temperatur und dem pH-Wert abhängig ist. Bei niedrigem pH-Wert ($< \text{pH } 8$) wird das Meta I/Meta II-Gleichgewicht stark auf die Seite des 478 nm Photoproduktes Meta I verschoben. Die spezifische Interaktion von Transducin oder Arrestinen mit Meta II bzw. phosphoryliertem Meta II verschiebt das Meta I / Meta II-Gleichgewicht in Richtung des 380 nm Photoproduktes Meta II. Diese induzierte Meta II-Bildung wird als extra Meta II bezeichnet stellt einen kinetischen und stöchiometrischen Monitor für den Komplex zwischen photoaktivem Rhodopsin und den genannten Interaktionspartnern dar. (aus: Dissertation A. Pulvermüller)
Die Experimente wurden in 100mM HEPES-Puffer, pH 8,0 durchgeführt.

2.7.2.2. Zeitabhängige Lichtstremessungen von Rhodopsin-b-Arrestin-Komplexen

Durch die Bindung von Arrestinen oder Transducin an Rhodopsin wird das Volumen der Membranpartikel mit eingelagertem Rhodopsin vergrößert. Die Intensität des Lichtes, das an diesen Partikeln gestreut wird, ist in erster Näherung proportional dem Quadrat des Partikelvolumens. Die Änderung der Streulichtintensität ist direkt proportional zur Massenänderung der Partikel.

Zeitabhängige Änderungen der Lichtstreuintensitäten wurden mit einer, von Hofmann & Emeis (1981) entwickelten, Apparatur gemessen. Als Meßlicht dient eine im nahen Infrarot emittierende Leuchtdiode (820 nm, Hitachi HLP 60R), deren Licht mit Hilfe eines Linsensystems auf die Probe, in einer 10mm Küvette, fokussiert wird. Das durch die Probe gestreute Licht wird mit einer Ringblende in einem Winkelbereich von 16° über Fresnellinsen auf den Detektor fokussiert. Die Signale werden durch einen Spannungsverstärker amplifiziert und aufgezeichnet.

Die Induktion der Bindung von β -Arrestin an Rhodopsin wurde auch hier durch einen Lichtblitz (500 nm) ausgelöst. Die Messungen wurden in 100 mM HEPES, pH 7,0 bei RT und Dunkelheit durchgeführt (nach: A. Pulvermüller, Dissertation und persönlicher Kommunikation sowie Heck et al., 2000).

2.8 Methoden zur Kristallisation von Proteinen

Bei der Kristallisation scheidet sich ein Stoff (hier Protein) nach initialer Keimbildung aus einer übersättigten Lösung so lange aus, bis das thermodynamische Löslichkeitsprodukt erreicht ist. Die Schwierigkeit besteht bei Proteinen allerdings darin, diesen Abscheidungsprozeß so zu kontrollieren, daß das Protein nicht mehr oder minder ungeordnet als Präzipitat ausfällt sondern, seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften entsprechend, geordnete, periodische Strukturen ausbildet, also kristallisiert.

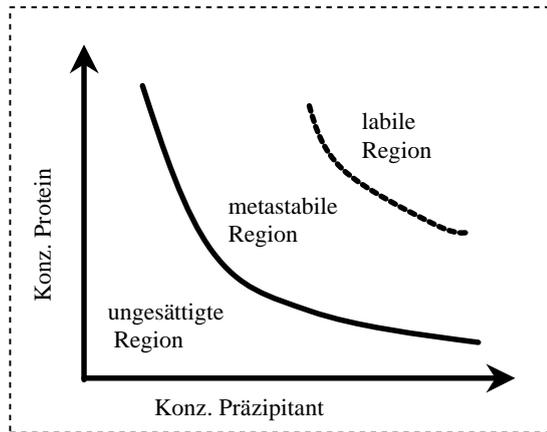


Abbildung 2.2 : Vereinfachtes Phasendiagramm der Proteinlöslichkeit als Funktion der Präzipitantkonzentration: Aufgetragen ist die Proteinkonzentration einer Lösung gegen die Konzentration des Fällungsmittels. Unterhalb der durchgezogenen Linie bleibt die Lösung über die Zeit unverändert. In der metastabilen Region liegt das Protein als übersättigte Lösung vor, wohingegen es in der labilen Region fast unverzüglich als Präzipitat ausfällt. Keimbildung und damit Kristallisation findet in der metastabilen Region statt. Die Keimbildungsrate (Keime / Zeit / Volumen) erhöht sich, je mehr sich der Zustand der Lösung der labilen Region annähert.

Die Parameter, über die die Kristallisation von Proteinen beeinflusst werden kann, sind u.a die Konzentration des Proteins, der umgebende Puffer und der pH-Wert. Entscheidend für die Größe und Anzahl an Kristallen (verhält sich meist umgekehrt proportional) ist die Kristallisationskeimbildungsrate im Kristallisationsansatz sowie die Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle.

In der Praxis wird zumeist eine hochkonzentrierte oder bereits überkonzentrierte, metastabile Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt. Dies geschieht entweder in einem Schritt als „Batch“-Versuch oder mittels Methoden, die über eine langsame Äquilibrierungsphase die Bedingungen für die Kristallisation schaffen. (siehe Abschnitt 2.8.1.2. bis 2.8.1.5.)

2.8.1.1. Die Methode des "Sparse-Matrix-Screen"

Als erster Schritt in der Bestimmung initialer Kristallisationsbedingungen der in dieser Arbeit behandelten Proteine wurde der "Sparse-Matrix-Screen" (Jancarik & Kim, 1991; Cudney et al., 1994) durchgeführt. Hierzu wurden Sets von je 50 verschiedenen Fällungsmittel-Puffern verwendet, die in ihrer Zusammensetzung verschiedenste, bereits erfolgreiche Kristallisationsbedingungen repräsentieren.

Folgende „Screening-Kits“ (Hampton Research) fanden Anwendung:

Crystal Screen I

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.02 M Calcium Chloride 2. 0.4 M K, Na Tartrate 3. 0.4 M Ammonium Phosphate 4. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5 5. 30% MPD, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Na Citrate 6. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Mg Chloride 7. 1.4 M Na Acetate, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5 8. 30% 2-Propanol, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5, 0.2 M Na Citrate 9. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate 10. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Acetate 11. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6 12. 30% 2-Propanol, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Mg Chloride 13. 30% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Na Citrate 14. 28% PEG 400, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Ca Chloride 15. 30% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Ammonium Sulfate 16. 1.5 M Li Sulfate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5 17. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Li Sulfate 18. 20% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5, 0.2 M Mg Acetate 19. 30% 2-Propanol, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Ammonium Acetate 20. 25% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Sulfate 21. 30% MPD, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Mg Acetate 22. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Na Acetate 23. 30% PEG 400, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Mg Chloride | <ol style="list-style-type: none"> 24. 20% 2-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ca Chloride 25. 1.0 M Na Acetate, 0.1 M Imidazole pH 6.5 26. 30% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate 27. 20% 2-Propanol, 0.1 M Na HEPES pH 7.5, 0.2 M Na Citrate 28. 30% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5, 0.2 M Na Acetate 29. 0.8 M K, Na Tartrate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5 30. 30% PEG 8000, 0.2 M Ammonium Sulfate 31. 30% PEG 4000, 0.2 M Ammonium Sulfate 32. 2.0 M Ammonium Sulfate 33. 4.0 M Na Formate 34. 2.0 M Na Formate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6 35. 1.6 M Na, K Phosphate, 0.1 M Na- HEPES pH 7.5 36. 8% PEG 8000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5 37. 8% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6 38. 1.4 M Na Citrate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5 39. 2% PEG 400, 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Na HEPES pH 7.5 40. 20% 2-Propanol, 20% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6 41. 10% 2-Propanol, 20% PEG 4000, 0.1 M Na HEPES pH 7.5 42. 20% PEG 8000, 0.05 M K Phosphate 43. 30% PEG 1500 44. 0.2 M Mg Formate 45. 18% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Zn Acetate 46. 18% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Ca Acetate 47. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6 48. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5 49. 2% PEG 8000, 1.0 M Li Sulfate |
|---|--|

50. 15% PEG 8000, 0.5 M Li Sulfate

Crystal Screen II

1. 10% PEG 6000, 2.0 M Na chloride
2. 0.5 M NaCl, 0.01 M CTAB, 0.01 M Mg chloride
3. 25% Ethylene glycol
4. 35% Dioxane
5. 5% Isopropanol, 2.0 M Ammoniumsulfate
6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. 10% PEG 1000, 10% PEG 8000
8. 10% Ethanol, 1.5 M Na chloride
9. 2.0 M Na chloride, 0.1 M Na acetate pH 4.6
10. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M NaCl
11. 1.0 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.01 M Co chloride
12. 30% PEG 400, 0.1 M Na acetate pH 4.6, 0.1 M Cd chloride
13. 30% PEG MME 2000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium sulfate
14. 2.0 M Ammonium sulfate, 0.1M Na Citrate pH 5.6 0.2 M K/Na Tartrate
15. 1.0 M Li sulfate, 0.1M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M Ammonium sulfate
16. 2% Polyethyleneimine, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M Na chloride
17. 35% tert-butanol, 0.1 M Na citrate pH5.6
18. 10% Jeffamine M-600, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.01M Ferric chloride
19. 2.5 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Na citrate pH 5.6
20. 1.6 M Mg sulfate, 0.1 M MES pH 6.5
21. 2.0 M Na chloride, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Na/K Phosphate
22. 12% PEG 20,000, 0.1 M MES pH 6.5
23. 10% Dioxane, 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M Ammonium sulfate
24. 30% Jeffamine M-600, 0.1 M MES pH6.5, 0.05 M Cs chloride
25. 1.8 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M Co chloride
26. 30% PEG MME 5000, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Ammonium sulfate
27. 25% PEG MME 550, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M Zn sulfate
28. 1.6 M Sodium citrate pH 6.5
29. 30% MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.5 M Ammonium sulfate
30. 10% PEG 6000, 0.1 M Hepes pH 7.5, 5% MPD
31. 20% Jeffamine M-600, 0.1 M Hepes pH 7.5
32. 1.6 M Ammonium sulfate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.1 M Na chloride
33. 2.0 M Ammonium formate, 0.1 M Hepes pH 7.5
34. 1.0 M Na acetate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.05 M Cd sulfate
35. 70% MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5
36. 4.3 M Na chloride, 0.1 M Hepes pH 7.5
37. 10% PEG 8000, 0.1 M Hepes pH 7.5, 8% Ethylene glycol
38. 20% PEG 10,000, 0.1 M Hepes pH 7.5
39. 3.4 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M Mg chloride
40. 25% tert-butanol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M Ca chloride
41. 1.0 M Li sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.01 M Ni chloride
42. 12% Glycerol, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.5 M Ammonium sulfate
43. 50% MPD, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M Ammonium phosphate
44. 20% Ethanol, 0.1 M Tris pH 8.5
45. 20% PEG MME 2000, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.01 M Ni chloride
46. 30% PEG MME 550, 0.1 M Bicine pH 9.0, 0.1 M Na chloride
47. 2.0 M Mg chloride, 0.1 M Bicine pH 9.0
48. 10% PEG 20,000, 0.1 M Bicine pH 9.0, 2% Dioxane

MemFac Screen

1. 12% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Sodium Chloride
2. 12% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Zinc Acetate
3. 10% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Sulfate
4. 12% iso-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Sodium Chloride
5. 12% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
6. 1.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
7. 1.0 M Magnesium Sulfate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
8. 18% PEG 400, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Magnesium Chloride
9. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Lithium Sulfate
10. 12% PEG 6000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Sodium Chloride
11. 12% PEG 6000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.1 M Magnesium Chloride
12. 18% PEG 400, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Sodium Chloride
13. 12% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Lithium Sulfate
14. 10% iso-Propanol, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Sodium Citrate
15. 12% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Sodium Chloride
16. 1.0 M Magnesium Sulfate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
17. 12% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Sodium Chloride
18. 12% PEG 6000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Lithium Sulfate
19. 4% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Magnesium Chloride
20. 0.1 M Sodium Chloride, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
21. 4% PEG 400, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.1 M Lithium Sulfate
22. 1.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M ADA pH 6.5
23. 12% PEG 4000, 2% iso-Propanol, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M Lithium Sulfate
24. 1.0 M di-Ammonium Phosphate, 0.1 M ADA pH 6.5
25. 12% PEG 6000, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M Magnesium Chloride
26. 12% MPD, 0.1 M ADA pH 6.5
27. 1.0 M Magnesium Sulfate, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.1 M Lithium Sulfate
28. 4% PEG 400, 0.1 M ADA pH 6.5, 0.3 M Lithium Sulfate
29. 1.0 M di-Na/K Phosphate, 0.1 Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Ammonium Sulfate
30. 10% PEG 4000, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Sodium Chloride
31. 18% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Magnesium Chloride
32. 1.0 M K/Na Tartrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
33. 18% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Ammonium Sulfate
34. 10% PEG 4000, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Ammonium Sulfate
35. 12% MPD, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Sodium Citrate
36. 1.0 M Sodium Citrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
37. 4% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.6 M Magnesium Sulfate
38. 4% MPD, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.6 M Magnesium Sulfate
39. 0.1 M K/Na Tartrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.1 M Lithium Sulfate
40. 12% MPD, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.1 M Lithium Sulfate
41. 1.0 M di-Na/K Phosphate, 0.1 Tris HCl pH 8.5, 0.1 M di-Ammonium Phosphate
42. 0.1 M Sodium Acetate, 0.1 Tris HCl pH 8.5
43. 0.1 M Sodium Chloride, 0.1 Tris HCl pH 8.5
44. 12% PEG 6000, 0.1 Tris HCl pH 8.5, 0.1 M di-Ammonium Phosphate
45. 0.4 M Magnesium Sulfate, 0.1 Tris HCl pH 8.5, 0.1 M K/Na Tartrate
46. 0.2 M Lithium Sulfate, 0.1 Tris HCl pH 8.5
47. 0.5 M Ammonium Sulfate, 0.1 Tris HCl pH 8.5
48. 5% PEG 400, 0.1 Tris HCl pH 8.5, 0.1 M Sodium Citrate

Alle Kristallisationsansätze wurden in „24-well“-Titerplatten (Fa. Falcon) durchgeführt. Die Ansätze wurden mit mittelviskosem Silikonfett (Fa. Bayer) und Deckgläschen (18mm, Fa. Hampton) abdichtet, die bei „Hanging drop“-Experimenten silikonisiert waren. Kristallisationsexperimente wurden bei RT angesetzt und bei 17°C, 13 °C oder 4°C gelagert.

2.8.1.2. Dampfdiffusionsmethode

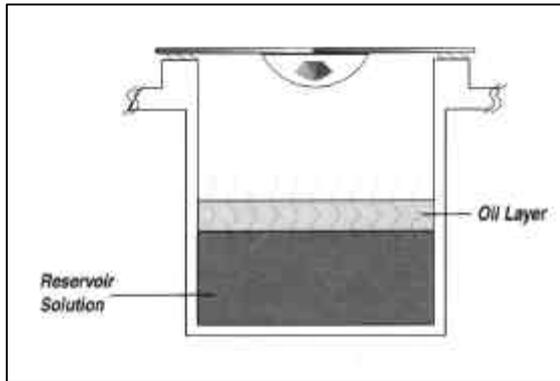
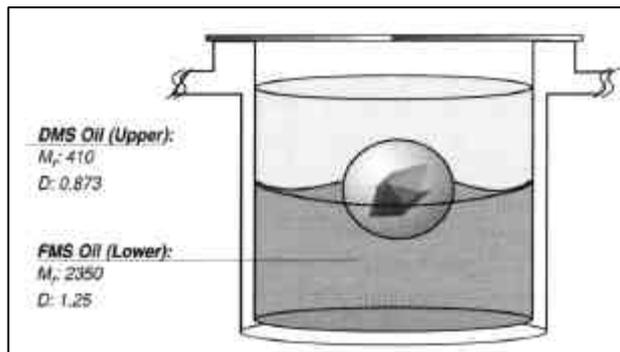


Abbildung 2.3 : Dampfdiffusionsmethode
(aus Katalog Fa. Hampton Research)

Bei dieser Methode wird eine Proteinlösung mit dem Fällungsmittel vermischt, welches dadurch verdünnt wird. Dieser Ansatz mit einem kleinen Volumen (2 bis 20 μ l) steht in einem abgeschlossenen System über dem Dampfdruck mit einem großen Reservoir des unverdünnten Fällungsmittels in Verbindung (meist 1 ml). Die hygroskopische Äquilibrierung des Systems, d.h. der Zustand in dem kein weiterer Netto-Austausch über die Gasphase stattfindet, vollzieht sich in der Regel binnen 24 bis 48 Stunden. Diese Zeit kann durch eine "Isolationsschicht" über dem

Reservoir, z.B. Silikonöl, verlängert werden. Nach Äquilibrierung sollte das Protein überkonzentriert vorliegen, damit sich in Abhängigkeit von der Keimbildungsrate Kristalle ausbilden können.

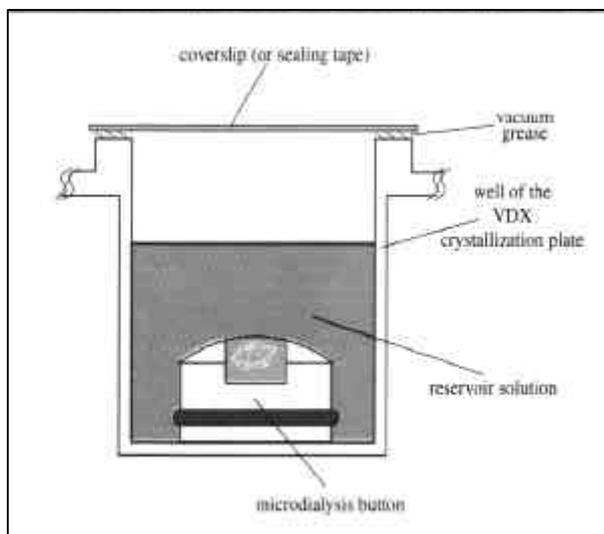
2.8.1.3. Die Methode des „Batch“-Ansatzes



Im Batch-Verfahren wird Proteinlösung und Fällungsmittellösung gemischt und in der Regel durch Überlagerung des Ansatzes mit Öl gegen Austrocknung geschützt. Eine langsame, schonende Äquilibrierung des Systems findet nicht statt.

Abbildung 2.4 :Kristallisation im „Batch“-Ansatz
(aus Katalog Fa. Hampton Research)

2.8.1.4. Mikrodialyse-Methode



Bei der Mikrodialyse ist Proteinlösung zunächst durch eine Dialysemembran von einem Reservoir an Fällungsmittel getrennt, welches, während der Äquilibrierungsphase langsam in die Proteinlösung diffundiert. Auf diese Weise kann das Fällungsmittel sehr schonend appliziert werden. Die Mikrodialyse bietet darüber hinaus den Vorteil, daß die Reservoirlösung während des Experiments beliebig verändert werden kann, ohne die metastabile Proteinlösung direkt zu beeinflussen.

Abbildung 2.5 :Kristallisation durch Mikrodialyse
(aus Katalog Fa. Hampton Research)

2.8.2. Färbung und proteinbiochemische Analyse von Kristallen

Um zu verifizieren, daß in den Ansätzen Protein kristallisiert ist und nicht Salz aus dem Puffer, wurden Kristalle mit verschiedenen Farbstoffen behandelt, die spezifisch an Protein binden. Hierzu wurde i.A. 0,5 µl des Farbstoffs zu dem Ansatz gegeben. Als Farbstoffe dienten Coomassie (blau) (Lz It, Fa. Hampton), Mercurochrom (rot) und Sulphorhodamin B (rosa).

Um die Identität der kristallisierten Proteine zu kontrollieren, wurden Kristalle zunächst aus dem Ansatz entnommen und mehrfach in Reservoirolösung gewaschen. Dies geschah entweder durch manuelles Umsetzen einzelner Kristalle oder durch Zentrifugation (mit gefärbten Kristallen). Die Kristalle wurden dann in 8M Harnstoff bei 95°C aufgelöst und mittels SDS-PAGE und ggf. Westernblots analysiert. Die Lösung des letzten Waschschrittes wurde ebenfalls untersucht, um auszuschließen, daß Reste an gelöstem Protein aus dem Ansatz die Probe kontaminieren.

2.8.3. Quervernetzung von Kristallen durch Glutaraldehyd

Um die strukturelle Integrität von Kristallen zu stärken, wurden Kristalle in Reservoirolösungen umgesetzt, die zusätzlich 0,25% oder 1% Glutaraldehyd enthielten. Glutaraldehyd kann Kristalle stabilisieren, indem es als bifunktionales Molekül Lysinreste kovalent verbindet und damit die Proteinmoleküle der Kristalle quervernetzt (Quiocho & Richards, 1964).

Nach unterschiedlichen Zeiten (1 min bis 30 min) wurden die Kristalle aus der Glutaraldehydlösung, die zudem noch Kryoprotektant enthielt, entnommen und eingefroren.

2.8.4. Bestimmung der Zusammensetzung von Kristallen

Für die spätere kristallographische Analyse ist es wichtig, Informationen über die Verteilung von Protein und Solvenz (meist Reservoirolösung) im Kristall zu haben. Aus dem Volumenanteil, den das Protein in der lockeren Packung des Kristalls einnimmt, läßt sich mit Kenntnis der Gitterkonstanten und der Raumgruppe die Anzahl an Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit bestimmen. Zudem ist der Gehalt an Solvenz im Kristall wichtig bei einer späteren Verfeinerung einer errechneten Proteinstruktur.

2.8.4.1. Bestimmung der Kristalldichte und des Solvenzgehaltes der Kristalle

Mit Hilfe eines Gradientenmischers wird in einem 200 ml Standzylinder ein Dichtegradient aus Xylol ($\rho=0,869$) und Brombenzol ($\rho=1,492$) hergestellt. Zur Eichung des Gradienten wurden 10µl-Tropfen von Cäsiumchloridlösung verschiedener Dichte verwendet. Die Tropfen werden oben auf den Gradienten gegeben und es wird anhand der Skalierung des Meßzylinders der Abstand vom Boden bestimmt, an dem der Tropfen zum stehen kommt (Bereich gleicher Dichte). Anschließend werden verschiedene Kristalle weitestgehend von umgebender Reservoirolösung befreit (unter Silikonöl) und ihre Dichte im Gradienten bestimmt. Darüber hinaus wird die Dichte der Reservoirolösung sowie von Lysozymkristallen, deren Zusammensetzung bekannt ist, gemessen.

Der Solvenzgehalt (G_S) eines Kristalls der Dichte (ρ_K) ergibt sich aus der Summe der Partialdichten des Solvens ($G_S \cdot \rho_S$) und des Proteins ($G_P \cdot \rho_P$).

$$r_K = (G_S \cdot r_S) + (G_P \cdot r_P) \quad \text{aus} \quad G_P = 1 - G_S \quad \text{folgt:} \quad G_S = (r_K - r_P) / (r_S - r_P)$$

Als Literaturwert für Proteindichte wird ein Wert von 1,314 verwendet (Matthews, 1968).

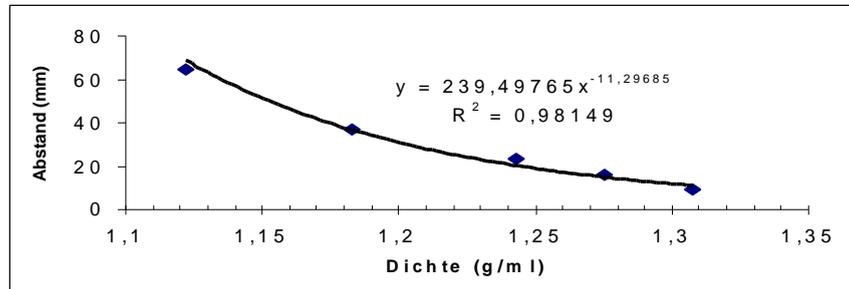


Abbildung 2.6 : Eichgerade zur Kristalldichte-Bestimmung: Erläuterung siehe Text

2.8.5. Biochemische Analyse der asymmetrischen Einheit im Kristall

Um den Gehalt an Protein im Kristall zu bestimmen, wurde eine Methode entwickelt, die nicht auf Literaturwerten von Proteineigenschaften basiert. Kristalle wurden vermessen und ihr Volumen berechnet. Anschließend wurde über ein SDS-PAGE-Gel die Proteinmenge in den Kristallen densitometrisch bestimmt. Mit Wissen über die Raumgruppe und Elementarzelle des Kristalls läßt sich die Anzahl an Proteinmolekülen in einer asymmetrischen Einheit des Kristalls errechnen. Im einzelnen ist diese neue Methode im Ergebnisteil beschrieben. Die untere Abbildung verdeutlicht die symmetrischen Zusammenhänge in einem Kristall.

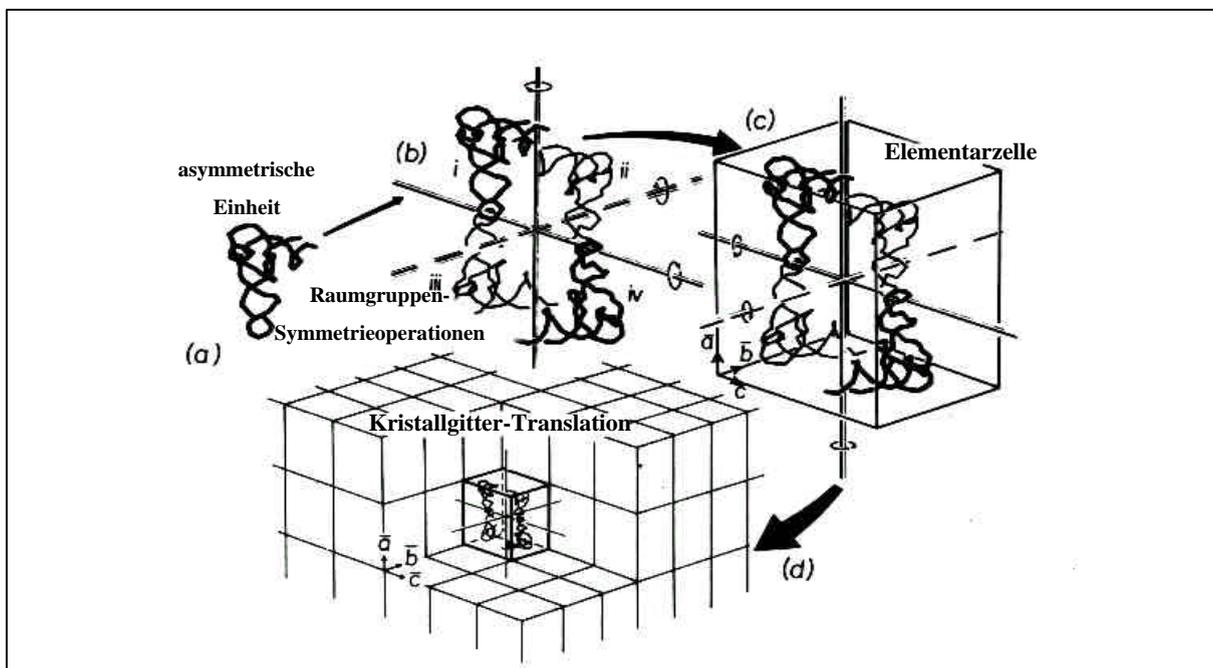
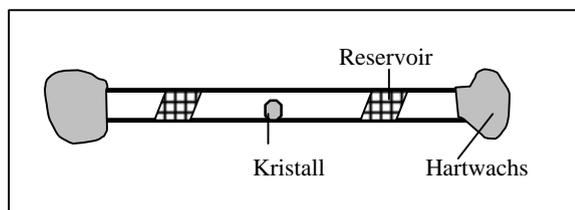


Abbildung 2.7 **Kristallsymmetrie:** Die kleinste "Einheit" eines Kristalls, die sich nicht weiter durch kristallographische Symmetriebeziehungen zerlegen läßt, ist die "asymmetrische Einheit" (a). Diese kann aus einem aber auch mehreren Molekülen bestehen. Durch die Raumgruppensymmetrie-Operationen (b) wird aus asymmetrischen Einheiten die "Elementarzelle" (c) aufgebaut. Der Kristall (d) besteht aus translationssymmetrischen Elementarzellen. Abgebildet sind die Symmetrieverhältnisse eines orthorhombischen Kristalls aus Phe-tRNA mit der Raumgruppe P222 (aus McPherson, 1989).

2.9. Röntgendiffraktionsexperimente an β -Arrestin-Kristallen

Erste kristallographische Untersuchungen an β -Arrestinkristallen erfolgte entweder unter Kryobedingungen bei $T=100\text{K}$ oder in Glaskapillaren (Durchmesser 0,1 bis 2 mm, Fa. Hampton) bei 17°C . mit einem Drehanoden-Röntgengenerator, (Typ GX21, Fa. Elliot Marconi Avionics). Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung lag im Intensitätsmaximum bei $1,542 \text{ \AA}$ (Cu $K\alpha$). Bei 2 W Generatorleistung (40 kV, 55 mA) besaß der Röntgenstrahl nach Austritt aus dem Collimator eine Leistung von ca. 1-10 mW bei einer Strahlbreite von ca. $100 \mu\text{m}$ mal $150 \mu\text{m}$. Zur Detektion wurde ein „Image-Plate Detektor MAR 2000“ (Fa. MAR Research) verwendet. Kryobedingungen wurden durch Einsatz eines Laminar-Kaltluftgebläses (Fa. Oxford Cryosystems) eingestellt.

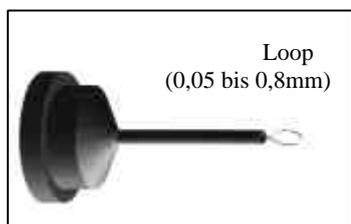
2.9.1. Analyse von Proteinkristallen bei RT in Glaskapillaren



Kristalle wurden in dünnwandige Kapillaren aus Spezialglas gesaugt (Fa. Hampton) und mittels ausgezogener Pasteurpipetten und Papierspitzen trockengelegt. Die Enden der Kapillare wurden mit Reservoirlösung gefüllt und mit Hartwachs abgedichtet. Hierdurch liegt

der Kristall in einer Atmosphäre, deren Dampfdruck dem im Kristallisationsansatz entspricht. Nachteil dieser Methode ist, daß der Kristall zum einen mechanisch manipuliert werden muß und zum anderen, zumindest kurzfristig, einer anderen Umgebung ausgesetzt wird, was beides die strukturelle Integrität und das Beugungsverhalten des Kristalls verändern oder dieser gar zerstören kann. Darüber hinaus ist der Kristall bei RT suszeptibler gegenüber Strahlenschäden, die das Beugungsverhalten während einer Messung verändern können. Ein Vorteil gegenüber der Kryo-Kristallographie ist, daß der Kristall nicht in ein neues Milieu mit einem Kryoprotektant umgesetzt werden muß.

2.9.1.1. Analyse von Proteinkristallen unter Kryobedingungen



Für die Analyse von Kristallen unter Kryobedingungen ($T=100\text{K}$) müssen die Kristalle vor Schäden geschützt werden, die durch die Bildung von Eiskristallen während des Schockgefrierens entstehen können. Hierzu wird der Kristall mit Hilfe eines "Cryo-loops" aus dem Ansatz "gefischt" (Teng, 1990) und in ein entsprechendes kryoprotektanthaltiges Medium

umgesetzt. Nach 2 sek bis 2 min wird der Kristall erneut mit dem Cryo-Loop entnommen und in einem Kryostrom von $T=100\text{K}$ schockgefroren. Alternativ wurden Kristalle auch direkt in flüssigen Stickstoff (-296°C), Isopropanol/Trockeneis (-79°C) oder flüssiges Butan (-296°C) getaucht und später in den Kryostrom gebracht. Als Kryoprotektant diente zumeist Glycerin (5 bis 35%) aber auch Polyethylenglykole (MW von 400 bis 20000). Um Schäden durch das Umsetzen der Kristalle zu minimieren wurden auch Kristallisationsexperimente durchgeführt, bei denen ein entsprechendes Kryoprotektant bereits Teil des Ansatzes war, so daß die Kristalle direkt aus dem Ansatztropfen heraus schockgefroren werden konnten.

Die Lagerung von eingefrorenen Kristallen erfolgte in flüssigen Stickstoff.

2.9.2. Aufnahme Kristallographischer Datensätze mit Synchrotronstrahlung

Für die Aufnahme vollständiger Datensätze ist die Intensität und die Qualität der Röntgenstrahlung des Drehanodengenerators bzw. das Beugungsverhalten der Kristalle nicht ausreichend. Um höher aufgelöste Beugungsdaten zu erhalten, wurden eingefrorene Kristalle an der EMBL Outstation des Deutschen Synchrotron (DESY) in Hamburg oder an der European Synchrotron Radiation Facility in Grenoble vermessen (Beamline BM14 und ID14-3). Synchrotronstrahlung bietet mehrere Vorteile. Die Intensität der Strahlung etwa ist etwa ein bis zwei Größenordnungen höher, die Strahlung ist monochromatisch bei geringerer Wellenlänge ($< 1\text{\AA}$) und überdies regulierbar, was die Vermessung von Schwermetallderivaten vereinfacht. Hierdurch werden MAD-Experimente aber auch Experimente Isomorphem Ersatz bei der Strukturlösung leichter ermöglicht. Die genauen Meßparameter und Detektionsverfahren sind im Ergebnisteil bei den einzelnen Experimenten beschrieben.

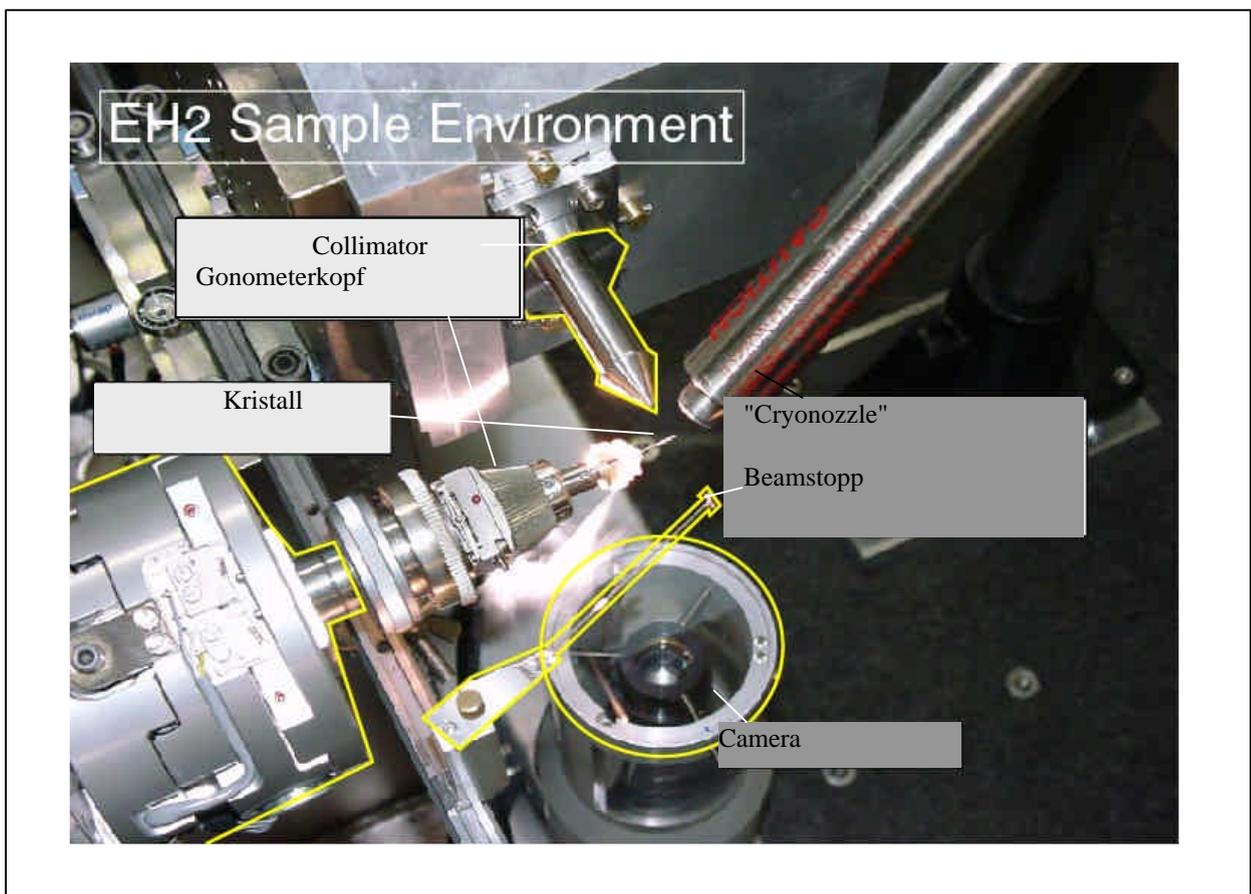


Abbildung 2.8 : Meßaufbau für röntgenkristallographische Analysen: Gezeigt ist die Apparatur einer "Beamline" an der ESRF in Grenoble. Dieser entspricht in seinen wesentlichen Bestandteilen dem Aufbau mit einem Drehanodengenerator. Durch den Collimator tritt die parallele monochromatische Röntgenstrahlung auf den Kristall, der auf einen Goniometerkopf montiert über eine Motorik ferngesteuert manövrierbar ist. Durch das Kameramikroskop kann der Kristall über einen angeschlossenen Monitor exakt positioniert und zentriert werden. Durch den laminaren Stickstoffstrom aus dem "Cryonozzle" wird der Kristall bei einer Temperatur von 100K gehalten. Auf der Abbildung nicht zu erkennen ist der Detektor, der in einem Abstand von 10 bis 40 cm hinter dem Kristall aufgebaut ist. Durch den Beamstopp wird verhindert, daß die nicht gestreute Röntgenstrahlung auf den Detektor trifft und diesen schädigt. (aus: Internet Homepage ESRF)

3. Ergebnisse

Ziel der folgenden Experimente war es, β -Arrestin und PAR-4 heterolog zu exprimieren, zu reinigen und zu kristallisieren. Hierzu mußten zunächst bereits etablierte Expressionssysteme für diese Proteine optimiert werden bzw. andere Systeme evaluiert werden. Des Weiteren galt es, Reinigungsstrategien zu etablieren, die Funktionalität bzw. native Faltung der Proteine zu überprüfen und Bedingungen für die Kristallisation zu finden. Die Beschreibung der Experimente zu den genannten Proteinen erfolgt im Weiteren aus Gründen der Übersichtlichkeit getrennt voneinander.

3.1. Heterologe Expression von β -Arrestin

Generell stehen zur heterologen Überexpression von Proteinen, in einem Maßstab, der, ökonomisch sinnvoll, für die Kristallisation hinreichende Ausbeuten liefert, zwei Organismen zur Verfügung: *Escherichia coli* und verschiedene Hefen.

Zur heterologen Expression von visuellem Arrestin, welches strukturell und physiologisch dem β -Arrestin ähnlich ist, wurden von Bianca Krafft bereits weitgehende Studien in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (B. Krafft, Dissertation, 1999). Es hatte sich gezeigt, daß die Expression von Arrestin in *E.coli* nicht zu ausreichenden Mengen löslichen Proteins führte. Durch Expression in *Saccharomyces cerevisiae* hingegen konnten für die Kristallisation ausreichende Mengen an Arrestin gewonnen werden. Aus diesem Grunde wurde zunächst versucht, dieses bereits etablierte Hefe-Expressionssystem auf β -Arrestin zu adaptieren.

3.1.1. Überexpression von β -Arrestin in *Saccharomyces cerevisiae*

Als Produzent heterologer Proteine bietet *S. cerevisiae* viele Vorteile. Diese Hefe ist einer der am besten untersuchten Organismen überhaupt. Ihr Genom ist stabil, vollständig sequenziert und es stehen bereits seit langem viele molekularbiologische Werkzeuge und Techniken zur Verfügung. Die Zellen lassen sich leicht zu hohen Biomassen kultivieren, es stehen Plasmidvektorsysteme für die heterologe Expression zur Verfügung und es konnte gezeigt werden, daß die Expressionsraten fremder Proteine in Hefe denen in *E. coli* entsprechen. Es wurden bereits viele lösliche, cytoplasmatische Proteine sowie auch integrale Membranproteine und sekretorische Proteine erfolgreich in *S. cerevisiae* überexprimiert (Ausubel et al, 1989 und Referenzen darin). Ein Vorteil gegenüber prokaryotischen Expressionssystemen besteht darin, daß der Hefe der Apparat zur posttranslationalen Modifikation und Faltung von Proteinen zur Verfügung steht, was besonders bei der Expression eukaryotischer Proteine von entscheidender Bedeutung sein kann, wenngleich posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen bei späteren Kristallisationsversuchen ein Problem darstellen können.

Vorraussetzung für erfolgreiche Expression in Hefe ist, daß das Protein im Millieu des Hefecytosols stabil ist, nicht spezifisch von endogenen Proteasen erkannt und abgebaut wird und für die Hefe nicht toxisch ist. Einige dieser Einschränkungen können durch die Wahl eines induzierbaren Expressionssystems umgangen werden. Hierdurch kann die Produktion des Zielproteins zeitlich von der Erzeugung von Biomasse getrennt werden.

Ein Nachteil der Hefen gegenüber z.B. *E.coli* ist die rigide Zellwand, die den schonenden Zellaufschluß im Labormaßstab erschwert. Durch den Einsatz von Systemen, die die Sekretion des exprimierten Proteins ins Medium bewirken, kann dieser Nachteil und das Risiko der Degradation durch Proteasen überwunden werden. Dies setzt allerdings voraus, daß das Protein in der Umgebung des Hefemediums stabil ist.

3.1.1.1. Eigenschaften des pYEX BX -Expressionssystems



Der *S.cerevisiae-E.coli*-Shuttlevektor pYEX BX diente in dieser Arbeit der cytosolischen Expression von β -Arrestin und PAR-4. Neben den gängigen *E.coli*-Eigenschaften des β -Lactamase-Gens und des pBR322-ori zeichnet sich dieser Vektor durch den induzierbaren Promotor pCUP1 aus. pYEX basiert auf dem natürlichen 2 μ -Plasmid der Hefe, der eine stabile autonome Propagation des Vektors in hoher Kopienzahl (10 bis 40 Kopien) gewährleistet. Als Selektionsmarker fungieren die Auxotrophiegene URA 3 und leu2-d. Das Gen leu2-d (Erhard & Hollenberg, 1983) zeichnet sich dadurch aus, daß es aufgrund eines verkürzten aber funktionalen Promotors eine geringere Transkriptionsrate besitzt.

Unter Leucinmangelbedingungen hat dies zur Folge, daß das Plasmid durch eine erhöhte Replikationsrate in einer Kopienzahl von 200 bis 300 pro haploiden Genom vorliegt. Dies bedingt nicht nur eine höhere Stabilität des Vektors sondern erhöht auch die Gendosis des zu transkribierenden heterologen Gens und damit die Expressionsrate des Proteins. Der CUP1-Promotor (Macreadie et al., 1989) stammt von dem Methallothioneingen CUP1 (Hamer, 1985) und ist durch Cu^{2+} -Ionen induzierbar. In seiner ursprünglichen Funktion dient er der Zelle dazu, cytotoxische Konzentrationen von Schwermetallionen abzufangen (Szczycka & Thiele, 1989; Fürst et al., 1988; Evans et al., 1990).

3.1.1.2 Konstruktion von β -Arrestin mit 6HIS-Tag und StrepTagII in pYEX BX

Zunächst wurden verschiedene β -Arrestin-Konstrukte mittels PCR hergestellt. Als „Template“ diente die c-DNA des bovinen β -Arrestin 1-Gens, die von Prof. Dr. Martin Lohse (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurde.

Protein	Primer	Schnittstellen	Klon-Bezeichnung in pCR 2.1 / in pYEX BX
HIS- β Arr	BArr HIS for / BArr Stop rev	Ssp I / Sal I	170498D2 / 240498D1
β Arr-HIS	BArr Start for / BArr HIS rev	Ssp I / Sal I	170498B1 / 240498B1
Strep- β -Arr	BArr Strep for / BArr Stop rev	Ssp I / Sal I	170498C1 / 240498C2
β Arr-Strep	BArr Start for / BArr Strep rev	Ssp I / Sal I	170498A1 / 240498A1
β Arr (ohne Tags)	BArr Start for / BArr Stop rev	Ssp I / Sal I	170498E1 / 240498E1

Tabelle 3.1.: β -Arrestinkonstrukte in pYEX BX: Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR 2.1 TOPO zwischenkloniert (in *E.coli* XL 1 blue), nachdem sie durch Taq-Polymerase terminal mit dATP versehen waren. Korrekt amplifizierte Konstrukte wurden mit Ssp I (blunt) und Sal I aus dem Vektor geschnitten und in pYEX BX ligiert (Transformation in XL 1 blue), der zunächst mit Bam HI geschnitten, mit Klenow-Enzym "geblundet" und anschließend mit Sal I geschnitten worden war. Positive Klone wurden durch Restriktionsverdau ermittelt und später durch Sequenzierung bestätigt.

3.1.1.3. Evaluierung verschiedener Hefestämme und Bedingungen für die Expression von bovinem b-Arrestin 1

Es wurden bereits von Bianca Krafft in unserer Arbeitsgruppe umfangreiche Studien zu den verwendeten Stämmen, in Bezug auf Wachstum, Medien- und Kohlenstoffquelle sowie Induktionsbedingungen im Zusammenhang mit der heterologen Expression von visuellem Arrestin durchgeführt. Es zeigte sich, daß der Stamm F11 α die höchsten Expressionsraten aufweist und bevorzugt in SC^{leu}-Medium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle zu kultivieren ist. Mit Glukose koagulieren die Zellen, was sich nachteilig auf Wachstum und Expression auswirkt. Die optimale Konzentration an Cu²⁺-Ionen zur Induktion der Expression wurde bei 0,5 mM ermittelt. Höhere Konzentrationen wirken cytotoxisch.

3.1.1.4. Die Hefestämme F11a und BJ2168 exprimieren b-Arrestin

Zunächst wurden die verschiedenen β -Arrestin-pYEX BX-Konstrukte in die Hefestämme F11 α und BJ2168 transformiert. Der Stamm F11 α zeichnet sich dadurch aus, daß er zu hohen Zelldichten wächst. Er wurde durch Ethylmethansulfonat-Mutagenese aus dem Stamm Stamm SEY6210 entwickelt (Wilsbach & Payne, 1993; B. Krafft, pers. Mtlg.).

BJ2168 (Yeast Genetics Stock Center, University of California, Berkeley) wurde verwendet, da er aufgrund seiner multiplen Proteasedefizienz das Risiko mindert, daß das exprimierte Protein bereits in der Zelle bzw. nach dem Zellaufschluß degradiert wird.

Jeweils 100 ml-Kulturen von Hefeklonen aller fünf verschiedenen pYEX-Konstrukte wurden in SC^{leu}-Medium angezogen, wobei für F11 α 2% Galaktose und für BJ2168 2% Glukose eingesetzt wurde. Bei einer OD₆₀₀ von 4,5 bis 5 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,5mM CuSO₄. Nach weiteren vier Stunden wurden je 10 ml der Kulturen pellettiert. Mittels TCA und Glasperlen wurden Gesamtzelllysate hergestellt und durch Western-Blots analysiert.

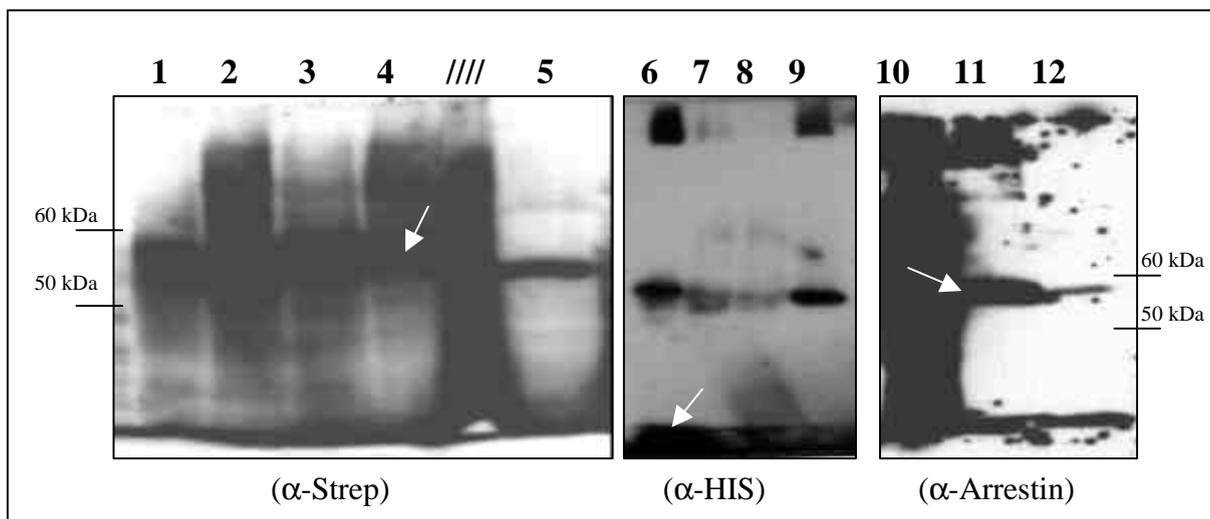


Abbildung 3.1.: Expression von b-Arrestin in *S. cerevisiae*: Western-Blot-Analyse von Gesamtzelllysaten der verschiedenen β -Arrestin-Konstrukte in F11 α und BJ2168. Drei 12%ige SDS-Gele wurden "geblotet" und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz. Spuren: **1.** 240498A1 in BJ2168; **2.** 240498A2 (β Arr-Strep) in F11 α ; **3.** 240498C1 in BJ2168; **4.** 240498C2 (Strep- β Arr) in F11 α ; **5.** pos.Kontr: bov.Arrestin; **6.** 240298B2 in F11 α ; **7.** 240498B1 (β Arr-HIS) in BJ2168; **8.** 240298D2 in BJ2168; **9.** 240498D1 (HIS- β Arr) in F11 α ; **10.** pos. Kontr.: bov. Arrestin; **11.** 240498E1 (β Arr) in F11 α ; **12.** 240498E2 (β Arr) in BJ2168

Die Westernblotanalyse zeigt, daß alle fünf verschiedenen β -Arrestin-Konstrukte exprimiert werden. Es fällt jedoch auf, daß das apparente Molekulargewicht bei etwa 55 kDa liegt und nicht, wie errechnet, bei 48 bis 49 kDa (Markierung Abbildung 3.1, Spuren 4 und 11). Ferner wird deutlich, daß, bei gleicher eingesetzter Biomasse, der Stamm F11 α fünf bis zehn mal mehr rekombinantes Protein exprimiert als BJ2168. Bei allen Klonen werden Abbauprodukte detektiert, die teilweise in der Lauffront der Geles liegen (Markierung in Spur 6). Bei den hochmolekularen Signalen (beispielsweise Spuren 6 bis 9) dürfte es sich um Proteinaggregate handeln.

Ausgehend von der Quantität der Proteinexpression ist F11 α eher zum Expressionsstamm geeignet als BJ2168.

3.1.1.5. Löslichkeit des exprimierten β -Arrestins

Eine erste, qualitative Analyse der exprimierten β -Arrestin-Proteine wurde ebenfalls durch immunologische Untersuchungen durchgeführt.

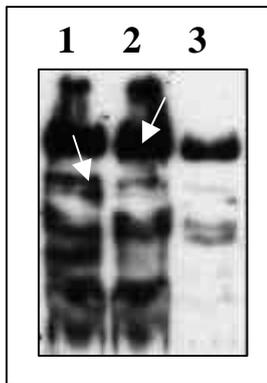


Abbildung 3.2 : Löslichkeit des exprimierten β -Arrestins:

(Westernblot) Zellpellets aus je 100 ml Expressionskultur wurden in 20 ml Aufschlußpuffer (400 mM NaCl; 10 mM HEPES pH 7,5; Proteaseinhibitoren) resuspendiert und mit der French-Press aufgeschlossen (5 Durchgänge). Das Totallysate wurde durch Ultrazentrifugation in lösliche und unlösliche Bestandteile getrennt. Äquivalente Mengen an Totallysate, Überstand und Pellet wurden analysiert. Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse von Klon 240489B1 (β Arr-HIS). Der Nachweis erfolgte mit dem α -6HIS-AK und Chemolumineszenz. Spur 1. Totallysate (15 μ l ex 30 ml); 2. Pellet (10 μ l ex 20 ml); 3. Überstand (15 μ l ex 30 ml); Markierung Spur 1: ca.35 kDa; Markierung Spur 2: ca. 55 kDa

In Abbildung 3.2 ist zu erkennen, daß sich ein Großteil des β -Arrestin-Proteins in der Pelletfraktion befindet. Dennoch sind ca 30% des Proteins in dem beschriebenen Aufschlußpuffer löslich. Auch fällt die starke Degradation des Proteins durch Proteasen auf, wobei aber die meisten Abbauprodukte nicht mehr löslich sind. Der hohe Anteil an unlöslichem β -Arrestin könnte auf mehrere Faktoren, wie Zusammensetzung und pH-Wert des Aufschlußpuffers, Hitzedenaturierung während der Passagen durch die French-Press sowie Oxidation des Proteins zurückzuführen sein.

3.1.2.1. Reinigung des rekombinanten β -Arrestins durch IMAC

Zunächst wurde versucht, die β -Arrestine zu reinigen, die mit einem 6HIS-tag versehen waren. Die folgende Abbildung repräsentiert den ersten Versuch einer Reinigung von 7,65 g F11 α -Zellen (Feuchtwicht) des DNA-Konstruktes 240299 B1, also β -Arrestin mit C-terminalem HIS-tag. Die genauen Bedingungen der Reinigung sind in der Bildunterschrift angegeben.

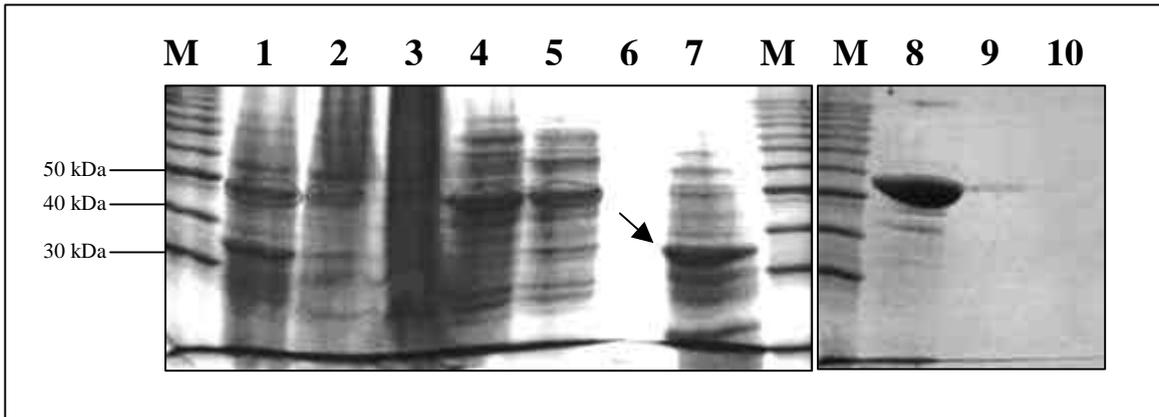


Abbildung 3.3 : IMAC-Reinigung von b-Arrestin-6HIS:

(SDS-PAGE-Gel): 7,65 g F11 α -Zellen wurden in 30 ml Aufschlußpuffer (400 mM NaCl; 10 mM HEPES pH 7,5; plus 1 Tablette Proteaseinhibitoren Complete w/o EDTA) mit der French-Press (6 Zyklen, ca. 70 % Aufschlußrate) aufgeschlossen. Nach mehrmaliger Extraktion des Pellets wurden 120 ml klares Lysat drei mal auf 25 ml Ni²⁺-beladener und mit Aufschlußpuffer äquilibrierter Chelating-Sepharose aufgetragen. **Waschschritte:** Wash I: 250 ml Aufschlußpuffer; Wash II: 250 ml 800 mM NaCl; 10 mM HEPES pH 7,9; Wash III: 60 mM Imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,9; **Elution:** 75 ml 0,5x Elutionspuffer EB (500 mM Imidazol; 250 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,9) in drei Fraktionen; 75 ml 1x Elutionspuffer (1 M Imidazol; 500 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,9) in drei Fraktionen. **Regeneration:** 50 ml Strippuffer (100 mM EDTA; 500 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7,9)
Spuren: M 10 kDa-Marker; **1.** Lysat (5 μ l ex 120 ml); **2.** erstes Pellet (5 μ l ex 50 ml); **3.** zweites Pellet (5 μ l ex 6 ml); **4.** Durchfluß (15 μ l ex 120 ml); **5.** Wash I (30 μ l); **6.** Wash II (30 μ l); **7.** Wash III (30 μ l); **8.** Eluat 0,5EB/1 (30 μ l ex 25 ml); **9.** Eluat 0,5EB/2 (30 μ l ex 25 ml); **10.** Eluat 0,5EB/3 (30 μ l ex 25 ml).

Die Abbildung zeigt zunächst den Erfolg der Reinigung. Insgesamt konnten, gemäß Bradford-Test, aus 7,65 g Zellen 9,9 mg β -Arrestin-6HIS mit einer geschätzten Reinheit von 90 % isoliert werden (1,3 mg/g). Eine genauere Betrachtung durch Westernblot-Analyse ergab, daß sich ca. 70 % des Proteins in der Pelletfraktion, dem Durchfluß und den Waschfraktionen befanden oder bereits proteolytisch abgebaut waren (Markierung in Spur 7). Zudem war auch präzipitiertes Protein nachweisbar, das auf dem Säulenmaterial ausgefallen war (Daten nicht gezeigt).

Da für Arrestin bekannt war, daß der hohe Anteil an Imidazol im Elutionspuffer schädigend auf das Protein wirkt (B. Krafft, pers. Mtlg.), wurde die Eluatfraktion 0,5EB/1 über 10 DG-Säulen gegen 100 mM NaCl / 10 mM HEPES pH 7,9 umgepuffert und in Centriprep 10-Konzentratoren bei 9°C ÜN konzentriert. Hier zeigte sich, daß das Protein fast vollständig ausgefallen war bzw. sich als zähflüssige Phase auf der Konzentratormembran abgeschieden hatte.

Die Proteinaliquots in 0,5x Elutionspuffer waren nach Lagerung bei 4°C ÜN bzw. bei -20°C (mit und ohne Zusatz von 25% Glycerin) ebenfalls ausgefallen.

Es galt also, die Bedingungen für Reinigung, Konzentrierung und Lagerung zu optimieren, um die Stabilität des Proteins deutlich zu erhöhen.

3.1.2.2. Reinigung rekombinanten b-Arrestins über Strep-Tactin

Versuche, rekombinantes β -Arrestin über den StrepTag II zu reinigen, verliefen zunächst erfolglos. Unter Bedingungen, die denen der IMAC-Reinigung ähnelten, wurde versucht, N-terminal markiertes β -Arrestin (Strep- β Arr; Klon 240489 D1 in F11 α) und C-terminal markiertes β -Arrestin (β Arr-Strep, Klon 240489A1 in F11 α) zu isolieren (Daten nicht gezeigt).

Es mußte festgestellt werden, daß das Strep-Tactin-Sepharose-Material eine deutlich geringere Bindungskapazität besitzt als die Chelating-Sepharose. Bis zu 90% des Proteins ging während der Reinigung verloren. Zudem zeigte sich, daß das Säulenmaterial durch ausgefallenes Protein und evtl. auch Lipide aus dem Hefecytosol irreversibel verunreinigt wurde (verbunden mit weiterem Verlust an Bindungskapazität), wodurch die Wiederverwendbarkeit des Materials auf fünf bis zehn Anwendungen limitiert wurde. Die Affinität des Proteins zum Säulenmaterial schien ebenfalls geringer zu sein als bei der IMAC-Reinigung, da sich während der Waschschriffe bis zu 50% des Proteins von der Säule löste. Die Probleme durch proteolytischen Abbau und Präzipitation des Proteins auf der Säule traten in diesen Versuchen unverändert auf. Durch intensives Waschen ließ sich jedoch eine geringe Menge des β -Arrestins mit hoher Reinheit isolieren, welches sich aber in Hinblick auf seine Stabilität nicht von dem IMAC-gereinigten Protein unterschied. Aus diesen Gründen wurde zunächst auf eine weitere Evaluierung des StrepTag II-Systems verzichtet und die Bedingungen für die IMAC-Chromatographie optimiert.

3.1.3. Optimierung der Reinigungsbedingungen

Im Folgenden werden die Experimente beschrieben, mit denen versucht wurde, die Stabilität, die Reinheit und die Ausbeute an rekombinantem β -Arrestin zu erhöhen. Die Abfolge der Versuche ist nach Optimierungsparametern gegliedert und nicht chronologisch. Rückschlüsse, die zur Veränderung von Bedingungen führten, ergaben sich teilweise aus aufeinander folgenden Experimenten, teilweise aber auch aus Kristallisationsarbeiten und kristallographischen Befunden.

3.1.3.1. Optimierung der Kultur- und Expressionsbedingungen

Es wurde bereits gezeigt, daß der Hefestamm F11 α eine höhere Expressionsrate für β -Arrestin aufweist als BJ2168. Zusätzlich wurden noch die Stämme YPH 500, SEY6210 und DY 150 getestet. Während DY 150 keine und SEY6210 nur minimale Expression zeigten, konnte mit YPH 500 eine ähnliche Expressionsrate erzielt werden wie mit F11 α . Reinigungsversuche mit diesem Stamm brachten qualitativ und quantitativ keine Verbesserung gegenüber F11 α . Allerdings wuchs YPH 500 deutlich langsamer und zu geringerer Zelldichte heran (größeres Kulturvolumen bei gleicher Ausbeute) und wurde deshalb im Folgenden nicht mehr verwendet.

Eine Änderung des Induktionszeitpunktes der Kultur (zwischen OD₆₀₀ von 3 bis 6) sowie der Induktionsdauer (3 bis 8 Stunden) führte nicht zu signifikant differierender Proteinexpression. Auch ließ sich hierdurch der Anteil an proteolytisch degradiertem Protein nicht mindern.

Es wurde festgestellt, daß die Ausbeute an Protein auch unter gleichen Kulturbedingungen stetig abnahm. Expressionskulturen wurden nicht jeweils frisch von Einzelkolonien angezogen sondern aus der jeweils letzten Kultur inokuliert, die bei 4°C gelagert wurde. Der Rückgang an Expression war darauf zurückzuführen, daß die Hefezellen auch unter Leucinmangel das klonierte β -Arrestingen verlieren. Teilweise war das Gen selbst mittels PCR nicht mehr nachweisbar. Offenbar finden Rekombinationsereignisse zwischen Plasmid und genomischer DNA statt. Zellen, die zwar das leu2 d-Gen enthalten, nicht aber das β -Arrestingen, überwachsen nach und nach die Kultur. Um mit "frischen" Zellen inokulieren zu können ohne zeitaufwendig von einer Einzelkolonie ausgehen zu müssen, wurde eine frische Kultur in Aliquots zu 50ml bei -70°C eingefroren, mit denen neue Expressionskulturen stabil und effizient angeimpft werden konnten.

3.1.3.2. Optimierung von Zellaufschluß und Aufschlußpuffer

Zum Aufschluß von Zellen wurde die French-Press bei einem Arbeitsdruck von 20000 bis 25000 psi verwendet. Auch bei diesen Drücken verhält sich die Zellwand von F11 α sehr "renitent", so daß die Zellen mehrfach der Aufschlußprozedur unterzogen werden mußten. Es zeigte sich, obwohl der Aufschluß im Kühlraum bei 4°C durchgeführt wurde, daß die Zellsuspension beim Durchgang durch die Presse kurzfristig stark erwärmt wurde. Um schädigenden Einfluß auf bereits in Lösung gegangenes Protein zu vermindern, wurden ungeöffnete Zellen nach jedem Durchgang abzentrifugiert, resuspendiert und erneut aufgeschlossen, so daß freigesetztes Protein in Lösung nur einmal der kurzen Erwärmung ausgesetzt war. Diese Vorgehensweise führte unabhängig vom dem verwendeten Aufschlußpuffer zu einer deutlichen Verminderung an präzipitiertem Protein.

Aufgrund der Erfahrungen mit der Reinigung visuellen Arrestins wurde zunächst mit 400 mM NaCl / 10 mM HEPES pH 7,9 (400/10) als Aufschlußpuffer gearbeitet. Veränderung der NaCl-Konzentration auf 100 mM bzw. 800 mM sowie Verwendung von KCl brachte keine Verbesserung der Löslichkeit von β -Arrestin. Zusätze von β -Oktylglykosid (10 mM), Glycerin (5 bis 20%) oder Glukose zeigten ebenfalls keine signifikante Wirkung. β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol als Reduktionsmittel konnten nicht eingesetzt werden, da sie die Nickelionen auf der Säule reduzieren.

Eher zufällig wurde später festgestellt, daß der pH-Wert des geklärten Zellysates nicht dem des Aufschlußpuffers (pH 7,9) entsprach sondern zwischen pH 4 und pH 5 lag. Offenbar ist die Pufferkapazität von 10 mM HEPES zu gering, um den niedrigen pH-Wert des Hefecytosols und vor allem der Hefe-Vakuolen abzufangen. Bei niedrigem pH wird der Imidazol-Stickstoff des Histidinrestes protoniert (pKa 5,97), und das entstehende positiv geladene Ammoniumion verhindert eine Bindung an das ebenfalls positiv geladene Nickel-Ion an der Säule. Nachträgliches Einstellen des pH-Wertes vor dem Auftrag auf die Säule auf pH 8,0 bewirkte eine erhebliche Verbesserung der Bindungseigenschaften des 6HIS-Tags an das Säulenmaterial.

Es wurde ebenfalls der Einfluß des Übergangsmetallions an der Chelating-Sepharose auf die Effizienz der β -Arrestin-Reinigung evaluiert. Versuche wurden unter gleichen Bedingungen mit Nickel, Cobalt und Kupfer-Ionen durchgeführt, ohne daß sich ein signifikanter Unterschied zeigte.

Der Anteil an unlöslichem β -Arrestin nach Zellaufschluß konnte durch Einsatz von 100 mM HEPES im Aufschlußpuffer (stabiler pH-Wert beim Zellaufschluß) zwar vermindert werden, lag aber nach wie vor sehr hoch (schätzungsweise 30%). Eine deutlich höhere Stabilität bzw. Löslichkeit des Proteins konnte durch den Einsatz von **Phosphatpuffer** (200mM KH₂PO₄ pH 8,0) als Aufschlußpuffer erreicht werden. Diese Wirkung beruht nicht nur auf der hohen Pufferkapazität sondern offenbar auch auf den Phosphat- bzw. Hydrogenphosphationen selbst (siehe Abschnitt 3.1.11 und 4.1.1.).

Befunde aus Kristallisierungsversuchen mit β -Arrestin ergaben, daß das Protein sehr sensibel gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff ist. Diese Eigenschaft äußert sich zum einen in der geringen Stabilität bei Lagerung des gereinigten Proteins bei 4°C sowie dem Präzipitieren während des Konzentrierens. Vor allem bedingt sie aber die hohen Verluste im Lysatpellet und auf der Säule. Die erstgenannten Probleme konnten durch Zugabe von 10 mM **DDT** zu bereits gereinigtem Protein vermindert werden. Während des Zellaufschlusses und der Reinigung über die IMAC-Säule konnte aus Gründen der Inkompatibilität mit dem Reinigungsmaterial aber weder DTT noch β -Mercaptoethanol eingesetzt werden.

Für die Reinigung über den StrepTag II hingegen ist DTT geeignet. In Verbindung mit dem Phosphatpuffer war es möglich, das exprimierte β -Arrestin fast vollständig aus den Zellen in

Lösung zu bringen. Gegen eine Reinigung über den StrepTag II alleine sprach aber, wie bereits erwähnt, die geringe Bindungskapazität des Säulenmaterials und die co-purifizierten Abbauprodukte bzw. die hohen Verluste an Protein während der Waschschriffe.

3.1.3.3. Konzentrierung und Lagerung des gereinigten Proteins

Ohne Zusatz von DTT war das Protein nicht reproduzierbar konzentrierbar. Unter starken Verlusten durch Präzipitation auf der Konzentratormembran war es dennoch möglich, das Protein bis 19 mg/ml zu konzentrieren. Durch den Einsatz von Phosphatpuffer sowie 20 mM DTT und Elution bzw. Umpuffern in 100 mM Na-Citrat pH 8,0 ließ sich die Konzentration auf bis zu 40 mg/ml steigern, wobei der Anteil ausgefallenen Proteins deutlich gemindert werden konnte. Auch unter den verbesserten Bedingungen war β -Arrestin nicht über längere Zeit bei 4°C lagerungsfähig. Nach ein bis zwei Tagen war das Protein fast vollständig ausgefallen. Aus diesem Grunde wurden verschiedene andere Lösungen und Zusätze auf ihre Eignung getestet, β -Arrestin bei 4°C und konzentriert stabil in Lösung zu halten, bzw. reversibles Einfrieren bei -20°C zu ermöglichen. Die Versuche erfolgten ohne Zusatz von DTT. Die verschiedenen Bedingungen und Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt.

Puffer-Zusammensetzung	4°C	-20°C	Konzentrator
10 mM HEPES pH 8,0	---	-	--
10 mM HEPES pH 5,92	---	-	---
50 mM Phosphatpuffer pH 5,98	+	+	+
50 mM Phosphatpuffer pH 8,0	+	+++	+++
10 mM HEPES pH 7,52 ; 400 mM NaCl	---	+	+
10 mM HEPES pH 7,52 ; 100 mM NaCl ; 5% Glukose	---	+	+
10 mM HEPES pH 7,5 ; 100 mM NaCl ; 10% Glycerin	---	+	++
10 mM HEPES pH 7,51 ; 100 mM NaCl ; 200 mM β -OG	---	+	++
10 mM HEPES pH 7,52 ; 800 mM NaCl	---	+	+
50 mM Ammoniumbicarbonat pH 8,0	---	+	++
20 mM Tris pH 8,0 ; 5M NaCl	---	---	---
100 mM Na-Citrat pH 8,0 (Citratpuffer)	+	+++	+++

Tabelle 3.2 : Stabilität des exprimierten β -Arrestins:

Die Eluatfraktion einer IMAC-Reinigung wurde in Aliquots zu je 4 ml über 10 DG-Säulen in die verschiedenen Lösungen umgepuffert. Je ein Milliliter wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Lagerung bei -20°C) oder bei 4°C für ca. 48 Stunden inkubiert. Die verbleibenden zwei Milliliter wurden auf ein Volumen von 300 μ l konzentriert. Die -20°C und 4°C-Proben wurden bei 4°C 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Angegeben ist die Stabilität des Proteins in der jeweiligen Lösung, beurteilt anhand der Menge an abzentrifugierbaren Präzipitat.

Als Folge dieser Versuche wurde gereinigtes Protein entweder in Phosphatpuffer oder in Citratpuffer von der Säule eluiert und konzentriert. Es ließ sich ohne nennenswerte Verluste und ohne Zusatz von Glycerin bei -20°C einfrieren und wieder auftauen. Mit derartigem Protein wurden später erfolgreich Kristallisationsexperimente durchgeführt.

Mit Ammoniumbicarbonatpuffer wurde versucht, das Protein zu lyophilisieren, da die Salzkomponenten in CO₂ und Ammoniak zerfallen und somit flüchtig sind. Eluate wurden in 50mM Ammoniumbicarbonat pH 8,0 umgepuffert, in 50ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert. Hierbei zeigte sich, daß die Qualität des Umpufferns über die 10 DG Säulen schlecht ist, da immer noch Reste des ursprünglichen Elutionspuffers vorhanden waren. Dies wurde bestätigt durch Umpuffern und Lyophilisieren reinen Wassers. Das lyophilisierte Protein (Protein-Salzgemisch) ließ sich nur minimal wieder in Lösung bringen. Weitere Versuche zur Lyophilisation wurden daher zunächst nicht durchgeführt.

3.1.4. Weitere b-Arrestin-Konstrukte für eine effizientere Reinigung und erhöhte Proteinstabilität

Obwohl durch DTT und Phosphatpuffer die Stabilität und Quantität des gereinigten Proteins erheblich verbessert werden konnte, waren die aufgereinigten Proteine immer noch kontaminiert durch Abbauprodukte, unabhängig davon, ob über den 6HIS-Tag oder den StrepTag II gereinigt wurde. Diese ließen sich nur durch intensives und stringentes Waschen unterdrücken, was sich negativ auf die Ausbeuten auswirkte.

Die Sauerstoffresistenz des Proteins wurde durch DTT zwar erhöht, es konnten auch Kristalle mit diesem Material hergestellt werden, die aber in Größe und Qualität unzureichend waren.

3.1.4.1. Konstruktion von b-Arrestin mit 6HIS-Tag plus StrepTag II und sequenzielle Affinitätschromatographie

Aus Versuchen der Kristallisation konnte geschlossen werden, daß kontaminierende Abbauprodukte von β -Arrestin sowohl die Kristallisation des Proteins behindern als auch die Qualität der Kristalle herabsetzen. Zur Eliminierung der co-isolierten Abbauprodukte von β -Arrestin wurden DNA-Konstrukte hergestellt, durch die dem Protein an beiden Termini verschiedene Affinitätstags angehängt werden. Hierdurch wird eine sequentielle Reinigung über IMAC und die Strep-Tactin-Säule möglich. Abbauprodukte besitzen maximal einen der Tags und werden bei einer der beiden Chromatographien entfernt.

Die Konstruktion der entsprechenden Plasmidvektoren erfolgte mit Hilfe der bereits vorhandenen pYEX BX -Konstrukte des β -Arrestin-Gens.

Konstrukt	Fragmente	Plasmid (in DH5 α)
6HIS- β Arr-Strep	240498 A2 (3'-Strep insert)	180698 A1
	240498 D2 (5'-6HIS-Vektor)	(pYEX-BX)
Strep- β Arr-6HIS	240498 B2 (3'-6HIS insert)	180698 B1
	240498 C3 (5'-Strep-Vektor)	(pYEX-BX)

Tabelle 3.3 : Doppeltag-Konstrukte von b-Arrestin: Aus den Vektoren 240498 D2 und 240498 C3 wurden die 3'-Enden des β -Arrestin-Gens, die keine kodierenden Sequenzen für Tags enthielten, mit Sal I und Bam HI entfernt und gegen korrespondierende Bereiche aus 240498 A2 und 240498 B2 ersetzt, die kodierende Sequenzen für die zweiten Tags trugen. (Transformation in DH5 α , Bestätigung durch Sequenzierung)

Beide resultierenden Vektoren, codierend für HIS- β Arr-Strep und Strep- β Arr-HIS, wurden in die Hefestämme F11 α und YPH 500 transformiert. Eine erste Analyse durch Westernblot bestätigte die Präsenz beider Tags.

Die Reinigung erfolgte in Bezug auf Zellaufschluß und Applikation auf die IMAC-Säule, wie beschrieben. Die IMAC-Säule wurde nur wenig und mit geringer Stringenz gewaschen und mit 2/3-Elutionspuffer eluiert. Um evtl. negativen Einfluß des Imidazols auf das Protein zu minimieren, wurde das Eluat direkt auf die Strep-Tactin-Säule aufgetragen.

Da das Eluat von der IMAC-Säule erwartungsgemäß stark verunreinigt war, reichte die Bindungskapazität der Strep-Tactin-Säule nicht aus, so daß sich ein Großteil des Proteins in der Durchflußfraktion befand. Diese konnte aber erneut auf die Strep-Tactin-Säule aufgetragen werden, um wieder die gleiche Menge Protein zu binden. Insgesamt waren in dem unten gezeigten Experiment acht Durchläufe über die Strep-Tactin-Säule erforderlich, um das rekombinante β -Arrestin vollständig aus dem IMAC-Eluat zu isolieren.

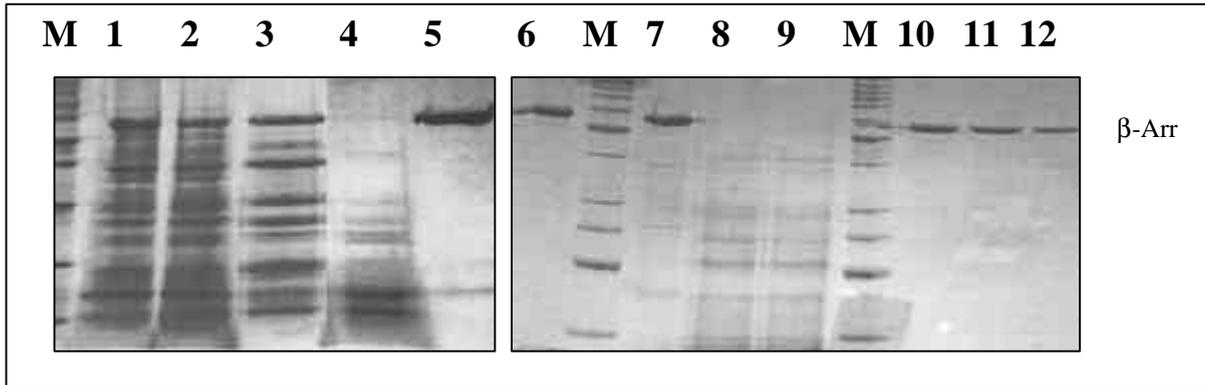


Abbildung 3.4 : Sequenzielle Reinigung von "Doppeltag b-Arrestin"

(SDS-PAGE) 26 g F11 α -Zellen des Klons 180698 B2 (6HIS-barr-Strep) wurden in insgesamt 70 ml Phosphatpuffer aufgeschlossen und auf die IMAC-Säule aufgetragen. Nach Waschschrinen mit 50 ml Puffer 400/10 pH 8,0 und 100 ml 1/3-Waschpuffer (20 mM Imidazol; 170 mM NaCl; 12,7 mM Tris pH 7,9) wurde mit 50 ml 2/3 Elutionspuffer (750 mM Imidazol; 375 mM NaCl; 15 mM Tris pH7,9) eluiert (1.). Das Eluat wurde langsam auf die Strep-Tactin-Säule aufgetragen und versehentlich ohne vorherigen Waschschrin eluiert (3.) (100 mM Na-Citrat, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8,0). Der Durchfluß der Strep-Tactin-Säule (2.) wurde erneut aufgetragen, mit 25 ml gewaschen (4.) (100 mM Na-Citrat, pH 8,0), und erneut eluiert (5.). Dies wurde insgesamt acht mal wiederholt (I bis VIII). Alle Puffer (inkl. "HIS-Flow") enthielten 20 mM DTT. Weitere Spuren: M 10 kDa-Marker (leicht proteolytisch degradiert); 6. Eluat III; 7. "Flow" III; 8. "Flow" VI; 9. "Flow" VII; 10. Eluat V; 11. Eluat VI; 12. Eluat VII

Spur 3 läßt erkennen, daß sehr viel Protein unspezifisch an das Säulenmaterial bindet. Hierdurch wird offenbar der Raum für die spezifische Bindung des β -Arrestins an das Strep-Tactin reduziert. Durch intensiveres Waschen der IMAC-Säule ließ sich dieser Effekt stark reduzieren, so daß nur noch zwei Durchgänge über die Strep-Tactin-Säule nötig waren, um das β -Arrestin vollständig zu isolieren. Durch frisches Säulenmaterial und größere Säulenvolumina kann die Reinigung auch in einem einzigen Schritt durchgeführt werden, wobei diese Alternative sehr kostenintensiv ist. Die Reinheit des Proteins betrug annähernd 100%, wobei auf eine genauere Analyse durch Silberfärbung des Geles verzichtet wurde. Ungeachtet der Verluste an rekombinantem Protein durch Oxidation beim Zellaufschluß und während der Reinigung konnten bis zu 2 mg Protein pro Gramm Zellen in einer Konzentration von bis zu 40 mg / ml gewonnen werden.

3.1.4.2. b-Arrestine mit 10HIS-Tag: Konstruktion und Reinigung

Um die Verluste an β -Arrestin während der Reinigung über den 6HIS-Tag abzufangen, wurden Konstrukte mit 10 Histidinresten hergestellt, um damit die Bindungsstärke des Proteins an die Säule zu erhöhen. Die Konstruktion erfolgte durch PCR analog den ersten Konstrukten (Abschnitt 3.1.1.3.)

Protein	Primer	Schnittstellen	Plasmide pCRblunt / pYEX BX
β Arr-10HIS	BArr 10HIS for / BArr Stop rev	Ssp I / Sal I	150198 H1 / 021198 A1
10HIS- β Arr	BArr Start for / BArr 10HIS rev	Ssp I / Sal I	Sequenzfehler, verworfen!
10HIS- β Arr-Strep	BArr 10HIS for / BArr Strep rev	Ssp I / Sal I	151098 I1 / 021198 B1
Strep- β Arr-10HIS	BArr Strep for / BArr 10HIS rev	Ssp I / Sal I	151098 J1 / 021198C6

Tabelle 3.4 : b-Arrestine mit 10HIS-Tag: Die PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert, in DH5 α transformiert, sequenziert und über Sal I / Bam HI in pYEX BX umklont.

Die beschriebenen Konstrukte wurden in F11 α und YPH 500 transformiert. Die Präsenz der "Tags" wurde durch Westernblot-Analyse untersucht. Die Reinigung über die IMAC-Säule erfolgte, wie bereits beschrieben. Eine deutliche Verminderung der Verluste an Protein war nicht zu erkennen. Im Westernblot war nach wie vor β -Arrestin im Durchlauf und den Waschfraktionen nachweisbar. Ob, und in wie weit die Bindung an das Säulenmaterial im Vergleich zu den 6HIS-Konstrukten erhöht wird, ist nur schwer determinierbar, da zu viele Parameter von einer Reinigung zur nächsten variieren können.

Es wurde dennoch zunächst mit dem 10HIS- β Arr-Strep-Konstrukt weiter gearbeitet.

3.1.5. Sekretion von β -Arrestin

Durch Sekretion des exprimierten Proteins ins Kulturmedium ließe sich die Reinigungsprozedur vereinfachen. Für die Proteinsekretion mit Hilfe des pYEX S1-Vektors (Fa. Clontech) wurden für andere Proteine Ausbeuten von bis zu 300 mg/L Kulturvolumen erreicht (Castelli et al., 1994). Die erfolgreichsten Reinigungen von β -Arrestin mit dem pYEX BX-System ergaben bisher Ausbeuten von 2,7 mg/g Zellen. Rechnet man dies auf das Kulturvolumen bei einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 3 um, so ergibt sich daraus eine Ausbeute von ca. 10 mg/L Kulturmedium.

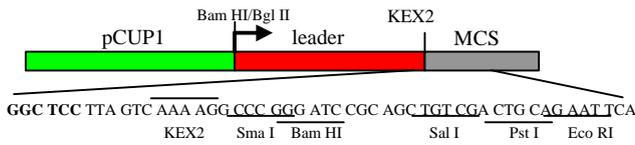
3.1.5.1. Die Sekretionsvektoren pYEX BX SS und pYEX BX SSB

Für die direkte Sekretion der exprimierten Proteine ins Medium stand lediglich der Vektor pYEX S1 (Fa. Clontech, Heidelberg; Kerstin Böngler, Universität Bochum) zur Verfügung. Neben dem Nachteil, daß seine "MCS" nur eine SacI-Schnittstelle besitzt, in welche das zu exprimierende Gen im Leseraster einkloniert werden muß, steht die Expression unter Kontrolle des nicht induzierbaren Promotors des Phosphoglyceratkinase-Gens. Als Sekretionssignal besitzt pYEX S1 die 30 AS lange "leader"- Sequenz aus *Kluyveromyces lactis*, welche zwischen Promotor und Sac I-Schnittstelle gelegen ist. Vor dieser Sac I-Stelle befindet sich eine Schnittstelle für die endogene Hefeprotease KEX2, die während des Sekretionsvorganges an der Membran die "leader"-Sequenz proteolytisch entfernt. Um zu exprimierende Gene ohne zusätzliche, klonierungstechnisch bedingte AS induzierbar exprimieren und sekretieren zu können, wurde die "leader"-Sequenz in leicht veränderter Form hinter den CUP1-Promotor in die MCS von pYEX BX kloniert.

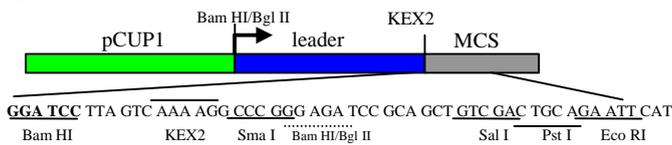
Für den Vektor pYEX BX SS wurde mit den Primern "S1 ss Start Bgl II" und "S1 SS Stop Sma/Bam" die 90 bp des "Leaders" amplifiziert, in pCR-Blunt kloniert und sequenziert. Die Leadersequenz wurde als Bgl II/Bam HI-Fragment (mit Primern eingeführt) in die komplementäre Bam HI Schnittstelle von pYEX BX ligiert und die richtige Orientierung des Inserts bestätigt. Somit lag der Vektor pYEX BX SS für die induzierbare Sekretion von Proteinen vor.

Um diesen Vektor universeller einsetzen zu können und gleichzeitig überschüssige Aminosäuren am maturen Protein zu vermeiden, die durch die Klonierung zwangsläufig eingeführt werden (minimal zwei AS bei Klonierung in die Sma I Schnittstelle), wurde mit den Primern "S1 ss Start Bgl II" und "S1 SS Bam/Sma/BglII" ein weiteres PCR-Produkt der Signalsequenz erstellt, welches sich dadurch auszeichnet, daß kurz vor der KEX2-Schnittstelle eine stille Mutation in die Sequenz eingeführt wurde, welche zur Entstehung einer Bam HI-Schnittstelle führt (GGG TCC in oberer Abbildung wurde zu GGA TTC mutiert).

pYEX BX SS



pYEX BX SSB



KEX2	
AGA GGC TCC	TTA GTC AAA AGG : CCC original
AGA GGA TCC	TTA GTC AAA AGG : ATG Bam HI/Bam HI
AGA GGC TCA	TTA GTC AAA AGG : ATG Bam HI/Bcl I
AGA GGC TCT	TTA GTC AAA AGG : ATG Bam HI/Bgl II
arg gly ser leu val lys arg	AS-Sequenz

Der 3'-Primer "S1 SS Bam/Sma/BglII" enthält hierbei nicht eine Bam HI- Schnittstelle wie oben sondern eine Bgl II-Schnittstelle, wodurch nach Klonierung des PCR-Produktes die ursprüngliche Bam HI-site aus pYEX BX zerstört wird. Somit besteht mit diesem Vektor, pYEX BX SSB, die Möglichkeit, über die neue Bam HI-Schnittstelle ein Gen im Leseraster in diesen Vektor zu klonieren, ohne zusätzliche AS in das mature Protein zu bringen. Hierzu muß das Gen lediglich mittels PCR derart modifiziert werden, daß die Sequenz an 5'-Ende des Inserts dem Vektor von der Bam HI-site bis zu KEX2-site entspricht. Die Klonierung dieses Konstruktes über die Bam HI-site von pYEX BX SSB

erfordert aber nicht zwangsläufig eine Bam HI-Schnittstelle am Ende des Inserts. Erfolgt die Klonierung des Inserts über eine angehängte Bcl I-site oder Bgl II-site (für den Fall, daß Bam HI auch innerhalb des Gens schneidet), so wird weder das Leseraster noch die AS-Sequenz des Sekretionssignales verändert. Die verbleibenden Restriktionsschnittstellen in der MCS (Sal I, Pst I und Eco RI) liegen in den beiden beschriebenen Vektoren in verschiedenen Leserastern, wodurch ohne größeren Aufwand fast jede beliebige c-DNA inkloniert werden kann, wenn auch unter Inkaufnahme zusätzlicher Aminosäuren.

3.1.5.2. Expression von b-Arrestin mit dem pYEX BX SS Vektor

Um zu evaluieren, ob sich β -Arrestin auch mittels Sekretion isolieren läßt, wurden DNA-Konstrukte mit nur einem Affinitätstag zunächst in den Vektor pYEX BX SS kloniert. Folgende Tabelle zeigt die erstellten Plasmide. Die Klonierungsstrategie ist der Tabellenunterschrift zu entnehmen.

Konstrukt (Protein)	Ausgangsplasmid	Plasmid pYEX BX SS
β Arr-6HIS	170498B1	010998 B1
β Arr-Strep	170498A1	010998 A2
β Arr (ohne Tags)	170498E1	010998 E2

Tabelle 3.5 : Konstrukte zu Sekretion von b-Arrestin: Der Vektor pYEX BX SS wurde mit Sma I und Sal I geschnitten. Die verschiedenen β -Arrestin-DNA-Inserts wurden mit Ssp I und Sal I aus pCR-Blunt entnommen, in den vorbereiteten Vektor ligiert und in DH5 α transformiert. (Sma I und Ssp I bilden stumpfe Enden). Das β -Arrestin-Gen wird somit im Leseraster des Sekretionssignals hinter die KEX 2-Schnittstelle gebracht. Diese Klonierungsmethode hat zur Folge, daß sich zwischen der KEX 2-site des Vektors und dem Startcodon ATG des Gens noch die Sequenz "CCC ATT" also ein Prolin-Isoleucin-Duplett befindet.

Die pYEX BX SS-Konstrukte wurden in die Stämme YPH500 und F11 α transformiert. Zellanzucht und Induktion erfolgten, wie für das pYEX BX-System beschrieben. Eine erste Analyse erfolgte mittels Westernblot:

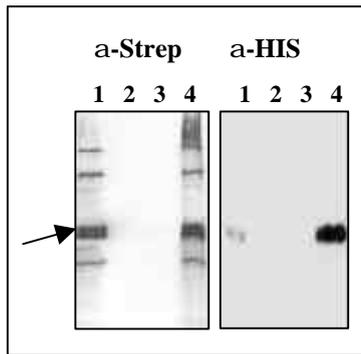


Abbildung 3.5: Sekretion von b-Arrestin: (Westernblot) Je zwei Milliliter einer Expressionskultur von Klon 010999 A2 und Klon 010999 B1 (siehe Tabelle 2.5) wurden vor und nach der Induktion entnommen und pelletiert. **Spur 1.** Zellpellet vor Induktion; **Spur 4.** Zellpellet nach Induktion. Das Kulturmedium wurde direkt analysiert (**Spur 2.** je 25 μ l Medium) oder mit TCA gefällt. (**Spur 3.** entspricht 500 μ l Medium)

Analyse dankenswerterweise durchgeführt von Bianca Krafft.

Es ist deutlich zu erkennen, daß die rekombinanten Proteine exprimiert wurden. Im Medium allerdings läßt sich kein Protein nachweisen. Es fällt auf, daß die Expression auch ohne Induktion abläuft. Dies ist entweder darauf zurückzuführen, daß der CUP1-Promotor "durchlässig" ist, oder daß die geringe Konzentration an Cu^{2+} -Ionen im Medium (40 μM) bereits ein geringes Maß an Expression induziert. Es ist erkennbar, daß durch die jeweiligen Konjugate hauptsächlich zwei Banden detektiert werden, die nahe zusammen liegen (Markierung in Spur 1). Hierbei könnte es sich um die Praform des Proteins mit der Leader-Sequenz und dem maturen Protein handeln. Eine genaue Größenbestimmung wurde allerdings nicht durchgeführt. Zu der Frage, ob das Protein generell nicht sekretiert wird oder im Medium wieder abgebaut wird bzw. präzipitiert, wurden vorläufig keine weiteren Versuche durchgeführt.

3.1.6. Mutagenese an b-Arrestin: Ersatz von vier Cysteinen durch Serine

Mit den bisher beschriebenen Veränderungen konnte die Stabilität und Ausbeute an β -Arrestin deutlich erhöhet werden. Verschiedene β -Arrestin-Konstrukte konnten kristallisiert werden (siehe Abschnitt 3.1.9.6.). Die Kristalle zeigten allerdings keinerlei Diffraktion. Es wurde die naheliegende Hypothese aufgestellt, daß das Protein in den Kristallen trotz Einsatz von DTT nach einiger Zeit durch Sauerstoff oxidativ geschädigt wird, was zu einem Verlust von Diffraktionseigenschaften führen könnte. Ähnliche Effekte wurden schon bei anderen Proteinen beobachtet. (J. Labahn, pers. Mtlg.). Die Schädigung wird vermutlich durch Oxidation von Cystein-Seitenketten und/oder Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken bedingt. Ein Vergleich der AS-Sequenz von β -Arrestin und visuellem Arrestin zeigt neben den drei Cysteinen des Arrestins (dort Positionen 63, 128 und 143), die an homologer Position auch im β -Arrestin vorhanden sind (Positionen 59, 125 und 140), vier zusätzliche Cysteinbausteine im β -Arrestin (Pos. 150, 242, 251 und 269) (siehe Abbildung 1.1), die unter Annahme ähnlicher dreidimensionaler Molekularstruktur keine intramolekularen Disulfidbrücken ausbilden sollten (J. Granzin, pers. Mtlg.). Die drei ersten, homologen Cysteine liegen im Arrestin (respektive in der putativen β -Arrestin-Struktur) im Kern des Proteins.

Um die Sensibilität gegen oxidativen Streß zu mindern, wurden diese vier C-terminalen Cysteine gegen Serine ausgetauscht.

Die Mutagenese erfolgte nach der Methode der Trans-PCR.

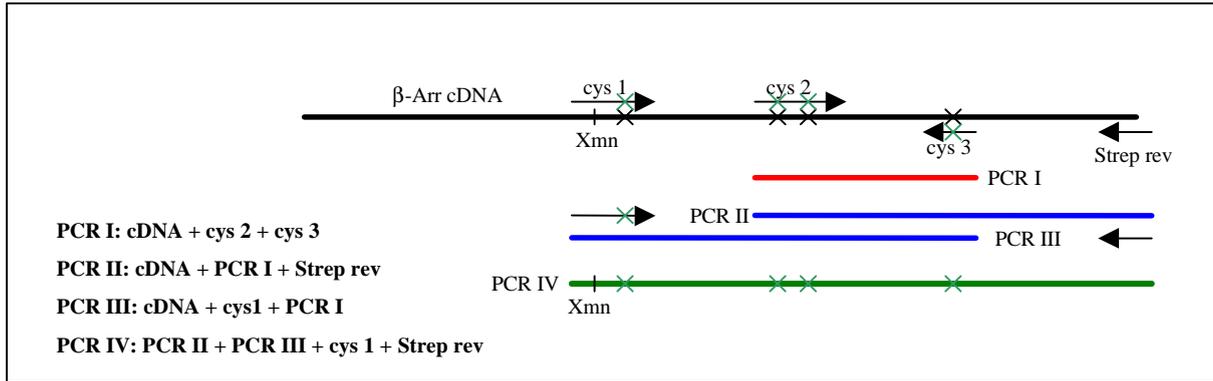


Abbildung 3.6. : Klonierungsschema zur b-Arrestin-Mutagenese: Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Trans-PCR, die zu dem 883 bp langen PCR-Produkt "PCR IV" führten. Der Text links gibt die Zusammensetzung der Einzel-PCR-Reaktionen an. Cys 1 bis cys 3 stehen für die Primer "barr_cysweg1 bis "barr_cysweg3". Eine allgemeine Beschreibung der Methode ist Abschnitt 2.4.2.3. gegeben. Das PCR IV-Produkt wurde in pCR-Blunt kloniert (TOP 10-Zellen) und als Vektorfragment über die Xmn I Schnittstelle des PCR-Produkts und eine Sac II Schnittstelle aus der MCS von pCR-Blunt mit dem gleich behandelten Insert aus 151098 II (10HIS β -Arr-Strep in pCR-Blunt) ligiert (TOP10-Zellen). Dieser Klon, **160399 A1** (10HIS cysw Strep) wurde wie bereits beschrieben über Ssp I / Sal I in pYEX BX umklontiert. Dieses Endkonstrukt (**180399 A1**) wurde nach Sequenzierung in den Hefestamm F11 α transformiert.

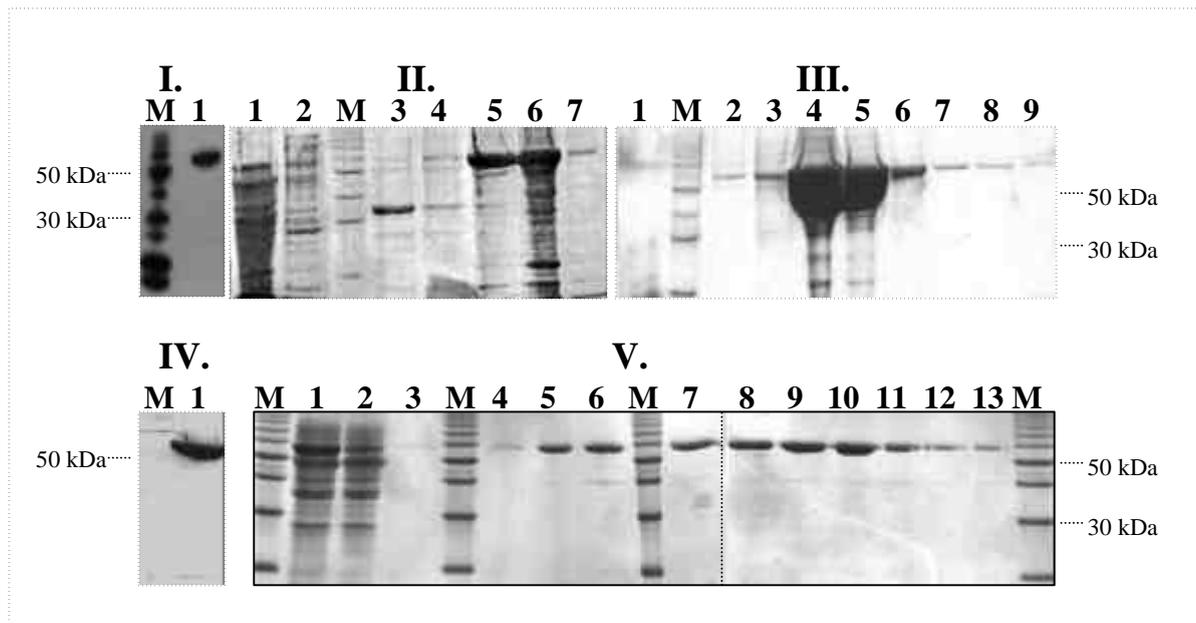


Abbildung 3.7.: Reinigung des mutierten b-Arrestins: Dargestellt sind die Ergebnisse verschiedener Reinigungsstrategien für 10HIS- β Arr(4C-S)-Strep (Klon 180399A1). **I.:** α -HIS-Westernblot gegen Zellysat (F11 α): **M.** Benchmark protein Marker (mit α -HIS Ak detektierbar); **II.:** IMAC-Reinigung: (SDS-PAGE) 6 g F11 α -Zellen wurden in 40ml Phosphatpuffer (inkl. zwei Complete-Tabletten, 1mM PMSF, 150 μ g / ml Benzamidin) aufgeschlossen. **1.** Zellysat (5 μ l ex 40 ml); **2.** Durchfluß (5 μ l ex 60 ml); Waschschritte: 100 ml Phosphatpuffer, 50 ml 1/2 Waschpuffer (nicht gezeigt); **M.** 10 kDa-Marker; **3. bis 7.** Eluatfraktionen 1 bis 6 (je 20 μ l ex 15 ml in 1/2 Elutionspuffer); **III.:** Strep-Reinigung: (SDS-PAGE) 18 g Zellen (F11 α) wurden in 50 ml Phosphatpuffer (pH 8,3 inkl. PMSF, Complete, Benzamidin) aufgeschlossen, mit 50 ml Phosphatpuffer und 50 ml Citratpuffer gewaschen (100mM Na-Citrat, pH 8,0) und in diesem Puffer eluiert (Citratpuffer plus 2,5 mM Desthiobiotin); **1.** Durchfluß (5 μ l ex 50ml); **2. bis 9.** Eluatfraktionen 1 bis 8 (je 20 μ l ex 5 ml); **IV.:** α -Strep-Westernblot gegen Zellysat; **V.:** Strep-Reinigung von IMAC-Eluaten: (SDS-PAGE) Die Elatfraktionen 3 bis 6 (Spuren II/4 bis II/7) wurden im Batch-Verfahren auf die Strep-Säule aufgetragen (30 ml Säulenvolumen), mit 50 ml Citratpuffer gewaschen und in Citratpuffer eluiert. **1.** vereinigte IMAC-Eluate; **2.** Durchfluß; **3. bis 13.** Eluatfraktion 1 bis 11 (je 20 μ l ex 10 ml).

Die Expressionsversuche zeigten, daß das mutierte β -Arrestin eine höhere Stabilität aufwies. Über sequenzielle Reinigung konnten Ausbeuten bis zu 2,7 mg/g Zellen mit einer Reinheit von ca. 97% realisiert werden (siehe Abbildung 3.7). Mit Strep-Tactin-Säulen (20 ml Säulenvolumen) alleine konnten sogar Ausbeuten von 3,2 mg/g erreicht werden, die aber nur einen β -Arrestin-Gehalt von 90 bis 95% aufwiesen. Der Vorteil der Strep-Tactin-Reinigung liegt darin, daß der Zellaufschluß unter reduzierenden Bedingungen stattfinden kann (50 mM DTT, oder 10 mM β -Mercaptoethanol). Während der Reinigung braucht der Puffer nicht verändert zu werden und es wird kein Imidazol benötigt, welches für β -Arrestin einen schädigenden Einfluß zu haben scheint.

Durch die Verwendung der Cystein-Mutante 10HIS- β Arr(4C-S)-Strep konnten nun reproduzierbar große Mengen an relativ stabilem und reinem β -Arrestin gewonnen werden, die für weitere Kristallisationsexperimente verwendet wurden.

3.1.7. Expression von humanem b-Arrestin 2

Um zu prüfen, ob die gewonnenen Erkenntnisse über bovines β -Arrestin 1 auch auf andere Mitglieder der Arrestinfamilie übertragen werden können, wurde das humane β -Arrestin 2 Gen (NID g4092782) aus einer cDNA-Bank amplifiziert, mit StrepTag II versehen und in den Vektor pYEX BX kloniert.

Als Template für die PCR-Reaktionen wurden je 0,2 μ l der "Human Brain Thalamus" H25009B eingesetzt (zur Verfügung gestellt von Wolfgang Boenick, IBI-1 Forschungszentrum Jülich). Folgende Konstrukte wurden erstellt:

Konstrukt (Protein)	Primer	Plasmid pCRblunt	Plasmid pYEX BX
Barr 2	HS Barr2 for / HS Barr 2 rev	080699 A2	140899 C1
Strep-Barr 2	HS Barr2 Strep for / HS Barr2 rev	150699 G3	140899 E1
Barr 2-Strep	HS Barr2 for / HS Barr2 Strep rev	150699 R3	140899 D1

Tabelle 3.6 : Konstrukte von b-Arrestin 2: Die PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert (TOP10-Zellen) und sequenziert. Die Barr 2-Gene wurden über Bam HI und Eco RI in pYEX BX umklontiert und erneut sequenziert. Die Plasmid DNA wurde in F11 α transformiert.

Die Westernblotanalyse von Testexpressionskulturen ergab, daß die Zellen keine nachweisbaren Mengen an β -Arrestin 2 exprimieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine genauere Untersuchung der Ursache hierfür wurde bis auf Weiteres zurückgestellt.

3.1.8. Funktionalitätstests für rekombinantes b-Arrestin

Das Kristallisieren und die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist in der Regel nur dann sinnvoll, wenn dieses in gereinigter Form auch seine native Faltung einnimmt. Ein erster wichtiger Hinweis darauf, daß das isolierte β -Arrestin in einer weitgehend korrekt gefalteten Form vorliegt, ist allein schon die Tatsache, daß es in löslicher Form isoliert und zu sehr hohen Konzentrationen angereichert werden konnte. Nicht oder falsch gefaltetes Protein wird häufig von dem Protease-Apparat des Expressionsorganismus erkannt und degradiert. Ein Beispiel hierfür ist die Ubiquitin-abhängige Proteolyse in eukaryotischen Zellen.

Entfaltetes bzw. denaturiertes Protein neigt dazu, sich über die "freigelegten" hydrophoben Bereiche des Proteininneren aneinander zu lagern und zu präzipitieren. Dies was bei β -Arrestin unter reduzierenden Bedingungen (DTT) nicht zu beobachten. Ein weiterer Hinweis darauf, daß das exprimierte Protein in homogener Form vorliegt, gab die native-PAGE-Analyse, bei der sich zeigte, daß das Protein als einzelne Bande im Gel migriert (Gel nicht gezeigt). Teilweise denaturiertes Protein würde sich entweder als "Schmier" oder mehrere distinkte Banden auftrennen.

Die signifikanteste Methode, die korrekte Faltung eines Proteins zu überprüfen, ist es, seine bereits bekannten biologischen und physiologischen Eigenschaften zu überprüfen. Hierzu wurde die Bindung von Arrestin an Rhodopsin untersucht.

3.1.8.1. Bindungsstudien von β -Arrestin an Rhodopsin

Die Ergebnisse und Interpretationen der Messungen wurden von Dr. Alexander Pulvermüller vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik am Universitätsklinikum Charité in Berlin zur Verfügung gestellt. Hintergrund der Meßmethode und die Durchführung der Experimente sind im Methodenteil (Abschnitt 2.7.2) beschrieben.

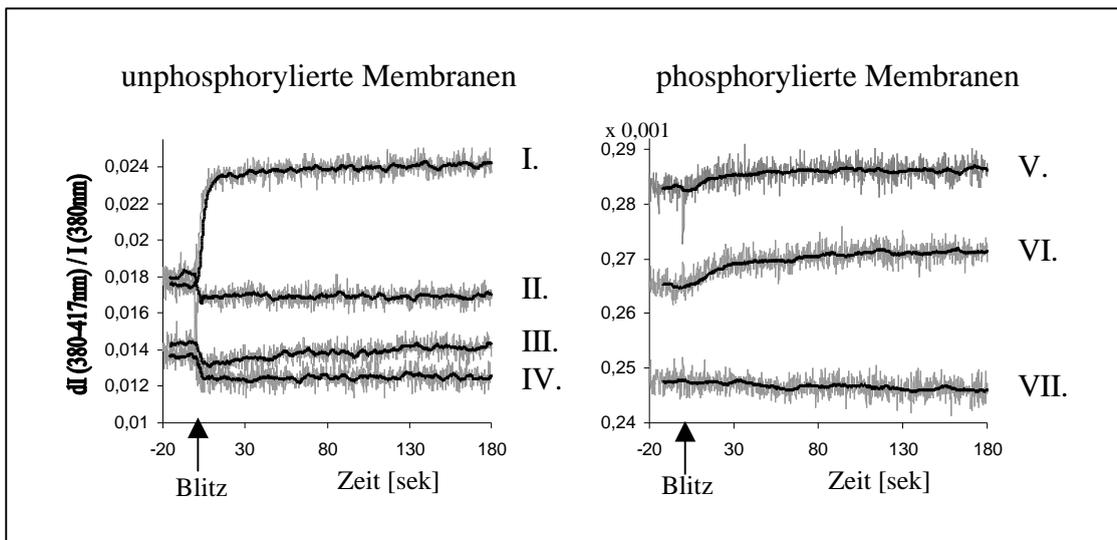


Abbildung 3.8 : Extra Meta II-Assay von 10HIS- β -Arrestin (4Cys-Ser)-Strep: Gezeigt sind die zeitabhängigen Absorptionmessungen von phosphoryliertem und unphosphoryliertem Rhodopsin (Disk-Membranen) mit β -Arrestin. Zum Zeitpunkt $t=0$ wird die Probe belichtet (500nm). Die Effizienz der Blitzbleichung betrug bei beiden Proben 20%. Die schwarze Kurve gibt jeweils den gleitenden Durchschnitt über 40 Punkte der Messdaten (grau) wieder.

- | | | | |
|------|---|------------------|-----------------------------------|
| I. | 15 pM Rhodopsin, 3 pM Transducin, | Positivkontrolle | |
| II. | 15 pM Rhodopsin, | Negativkontrolle | |
| III. | 15 pM Rhodopsin, 6 pM β -Arrestin | | alle Proben in 100mM HEPES pH 8,0 |
| IV. | 15 pM Rhodopsin, 3 pM Arrestin | Positivkontrolle | |
| V. | 15 pM Rhodopsin, 6 pM β -Arrestin | | |
| VI. | 15 pM Rhodopsin, 3 pM Arrestin | Positivkontrolle | |
| VII. | 15 pM Rhodopsin, | Negativkontrolle | |

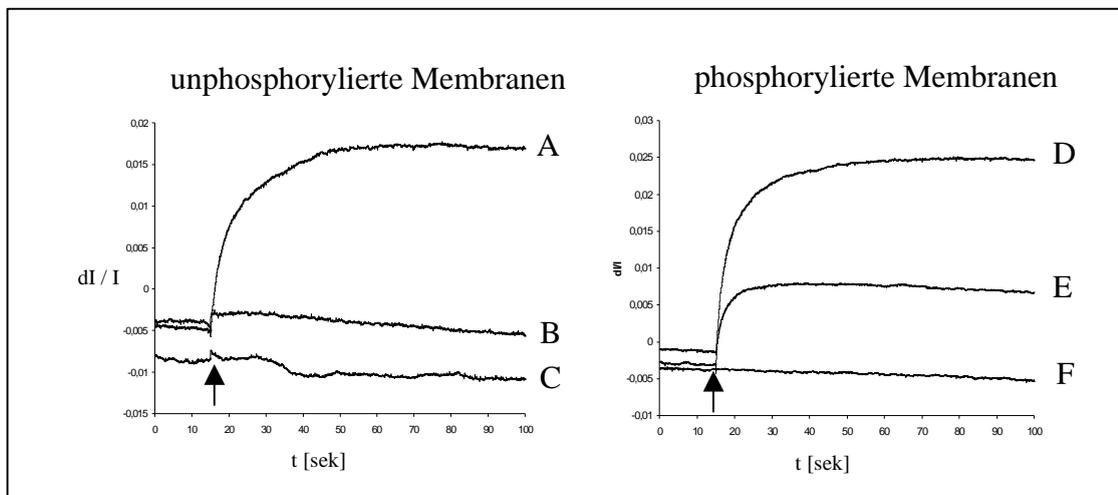


Abbildung 3.9 : Lichtstreuungen am b-Arrestin-Rhodopsin-Komplex: Dargestellt sind die Kinetiken der Komplexbildung zwischen 10HIS-β-Arrestin-(4Cys-Ser)-Strep und Rhodopsin. Der Zeitpunkt der Blitzbleichung ist durch einen Pfeil markiert. Die Effizienz der Lichtbleichung lag bei 32%. Eingesetzt wurden je Ansatz 3 pM Rhodopsin in 100 mM HEPES pH 7,0

A	plus 1 pM Transducin	Positivkontrolle
B	ohne Zusatz	Negativkontrolle
C	plus 3,3 pM β-Arrestin	
D	plus 1 pM Arrestin	Positivkontrolle
E	plus 3,3 pM β-Arrestin	
F	ohne Zusatz	Negativkontrolle

Die Experimente zeigen deutlich, daß β-Arrestin an phosphorylierte "Rhodopsinmembranen" bindet, nicht aber an unphosphorylierte (Spuren 3 / 5 / C / E). Besonders deutlich wird dies durch die Ergebnisse der Lichtstreuungen. Auffällig ist allerdings, daß bei annähernd gleicher Größe der Proteine etwa die dreifache Menge an β-Arrestin benötigt wird, um ein Singal zu generieren, daß einem Drittel des Arrestinwertes entspricht. Die Bedeutung dieses Befundes ist nicht geklärt. Mögliche Ursachen werden im Rahmen des Diskussions-Kapitels erörtert. Der scheinbare Anstieg der β-Arrestin-Probe im Extra-MII-Test mit unphosphorylierten Membranen erklärt sich durch die in einigen Proben erkennbare, allgemeine Steigerung des Signals über die Zeit. Korrekterweise müßte die Kurve anhand einer Regressionsgerade, ermittelt aus der Steigung der Kurve vor der Blitzbleichung, korrigiert werden.

Im Wesentlichen zeigen die Experimente, daß zumindest ein Teil des exprimierten Proteins (10HIS-βArr (4C-S)-Strep), gemessen an der Rhodopsin-Bindungsfähigkeit, funktional ist.

Faßt man die bisherigen Ergebnisse zur Expression und Purifikation des Proteins zusammen, so stehen nun für die Kristallisation ausreichende Mengen an stabilem, reinen und funktionalem β-Arrestin zur Verfügung.

3.1.9. Kristallisation von β -Arrestin

Die Experimente zur Kristallisation von β -Arrestin erfolgten zeitlich parallel zur Optimierung der Proteinexpression und Purifikation. Eine Einführung sowie die Beschreibung der angewandten Techniken ist in Abschnitt 2.8. gegeben. Kristallisationsversuche wurden mit folgenden β -Arrestin-Varianten durchgeführt:

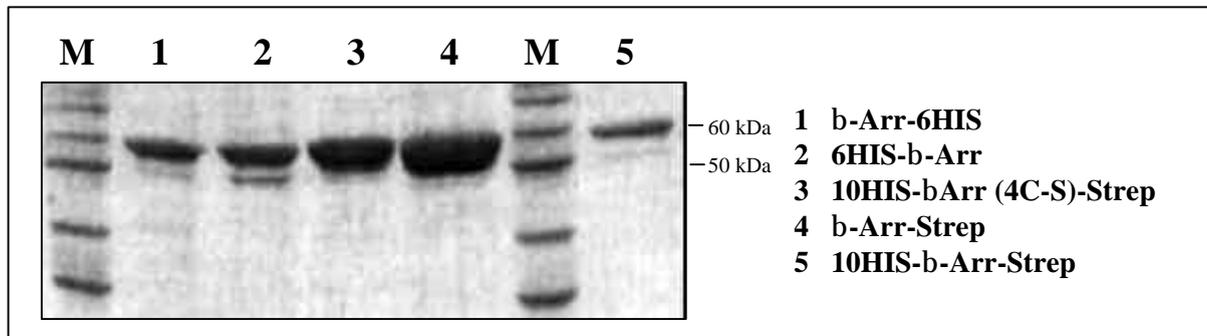


Abbildung 2.9 : Zur Kristallisation verwendete β -Arrestin Varianten

3.1.9.1. Erste Kristallisationsversuche

Mit den ersten geringen Quantitäten gereinigten Proteins wurden zunächst Kristallisationsversuche gemäß den Bedingungen durchgeführt, unter denen bovines visuelles Arrestin erfolgreich kristallisiert werden konnte (Wilden et al., 1997; Krafft, pers. Mtlg.). Diese Experimente wurden mit β Arr-HIS, später auch mit 10HIS- β Arr-Strep-Protein durchgeführt. Als Fällungsmittel dient bei dieser Methode ein Gemisch von PEGs verschiedenen Molekulargewichtes. Es zeigte sich schnell, daß die Kristallisationsbedingungen für Arrestin nicht auf β -Arrestin übertragbar sind. Unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration, des pH-Wertes und der Fällungsmittel-Konzentration präzipitierte β -Arrestin binnen weniger Stunden. Problematisch war zum damaligen Zeitpunkt die geringe, zur Verfügung stehende Menge an Protein und die stark schwankende Qualität des Proteins innerhalb verschiedener Reinigungschargen. Die Befunde konnten später bei verbesserter Proteinqualität allerdings auch bestätigt werden.

3.1.9.2. Evaluierung geeigneter Präzipitanten mittels "Sparse-Matrix Screen"

Aufgrund der Tatsache, daß die Kristallisationsbedingungen für Arrestin nicht auf β -Arrestin übertragbar waren, mußten neue Bedingungen und Kristallisationssysteme entwickelt werden. Um erste Erkenntnisse zu erlangen, in welchem Millieu sich das gereinigte Protein stabil verhält, wurde ein "Sparse matrix screen" mit den Puffer-Sets "Crystal Screen I und II" im "Batch"- Verfahren durchgeführt. Je 2 μ l der Proteinlösung (17,2 mg/ml 10HIS- β Arr-Strep, in 200 mM Na-Citrat; 2,5 mM dTB; pH 8,0) wurden mit 2 μ l des jeweiligen Kristallisationspuffers in einer Mikrotiterplatte vermischt und mit 50 μ l Silikonöl überschichtet. Nach zwei und 16 Stunden wurden die Ansätze untersucht. Es zeigte sich klar, daß das β -Arrestin in Gegenwart von PEGs abhängig von deren Konzentration (>10%) und Molekulargewicht (>1000) schnell präzipitiert. Eine Halbierung der Proteinkonzentration im Batch-Versuch änderte dieses Verhalten generell nicht. Auf eine weitere Verwendung von PEG-Puffern

wurde daher zunächst verzichtet. Mit den Puffern bzw. den Ansätzen, die über 48 Stunden hinweg klar blieben und denen, die sich erst nach drei bis sieben Tagen trübten, wurden weitere Versuche sowohl im "Batch"-Verfahren als auch mit der "Hanging-Drop"-Methode durchgeführt. Es galt, für diese, zunächst 23, Puffer die Grenzen des Mischungsverhältnisses von Protein und Fällungsmittel zu finden, innerhalb derer der Ansatz zunächst klar bleibt und erst nach einigen Tagen eine Veränderung zeigt. Durch weitere Einengung dieser Intervalle (zur Vereinfachung wurde hier das Produkt aus Proteinkonzentration und Fällungsmittelkonzentration verwendet) sollte das, für die Kristallisation optimale Verhältnis ermittelt werden.

Neben der Unverträglichkeit des Proteins mit PEGs ergaben sich aus diesem ersten Experimenten keine weiteren allgemeinen Tendenzen der Proteinkompatibilität in Bezug auf Zusammensetzung und pH-Wert der Fällungsmittel. Mit folgenden Puffern des "Crystal Screen I" wurden weitere Kristallisationsversuche angesetzt: 1, 2, 3, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 19, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 35, 36, 37, 44 und 49. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Puffer ist in Abschnitt 2.8.1.1. angegeben.

3.1.9.3. b-Arrestin bildet Kristallnadeln in 30% MPD

Aus den ersten Versuchen verblieben zunächst zwei vielversprechende Puffer: Mit Puffer No. 5 (30% MPD; 0,1M HEPES pH 7,5; 0,2 M Na-Citrat) konnten im "Hanging-Drop"-Verfahren Proteinnadeln von 5 x 50 µm beobachtet werden. Später bildeten sich mit Puffer No. 29 (0,8 M K,Na-Tartrat; 0,1 M HEPES pH 7,5) Mikrokristalle aus, die eindeutig von Präzipitat zu unterscheiden waren. Die Differentialdiagnose gegenüber Salzkristallen erfolgte durch Anfärben der Ansätze.

Mehrere Versuchsreihen mit MPD als Fällungsmittel führten nicht zu einer Verbesserung der Kristallform oder Größe. Es wurden acht verschiedene Proteinkonzentrationen (0,5 bis 3% 10HIS-βArr-Strep in 200 mM Na-Citrat) gegen vier verschiedene pH-Werte (7,0 bis 8,5) bei 30% und 40% MPD, jeweils mit und ohne Zusatz von 50 mM DTT getestet, (insgesamt 128 Ansätze; je 3µl Protein plus 3µl Puffer). Im gesamtem pH-Bereich von 7,0 bis 8,5 konnten bei Proteinkonzentrationen von 0,5 bis 2,5% und 30% MPD nach 7 bis 14 Tagen Proteinnadeln und Nadelbündel beobachtet werden. Es zeigte sich, daß die jeweiligen Ansätze ohne DTT deutlich mehr Präzipitat aufwiesen, während die Lösung nach DTT-Zugabe abgesehen von Proteinnadeln weitgehend klar blieb. Es konnte zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen werden, daß das Protein eine gewisse Sensitivität gegenüber Sauerstoff aufweist. Weitere Versuchsreihen mit 0,5% und 1% Protein gegen acht verschiedene MPD-Konzentrationen (10% bis 35%) im "Hanging-Drop"-Verfahren (100 mM Na-Citrat pH 7,5; 100 mM DTT) führte ebenso wenig zu größeren Kristallen wie Mikrodialyse-Experimente, bei denen langsam die MPD-Konzentration erhöht wurde. Aus diesem Grunde und der Tatsache, daß unter anderen, parallel getesteten Bedingungen bereits größere Kristalle gezogen werden konnten, wurde MPD als potentiell geeignetes Fällungsmittel nicht weiter evaluiert.

3.1.9.4. b-Arrestin bildet "hexagonale" Kristalle in 720mM Tartrat

Bei den ersten "Screenings" hatte sich Puffer I/29 (800 mM K,Na-Tartrat, 100 mM HEPES pH 7,5) als vielversprechend herausgestellt. Bei vielen anderen Puffern war eine klare Differenzierung zwischen Mikrokristallen und Präzipitat nicht möglich. Bei Puffer I/29

hingegen konnten eindeutig reproduzierbar Mikrokristalle beobachtet werden (ca. 5 bis 10 μm Größe), die zusammen mit Präzipitat auftraten.

Ein erster Optimierungsversuch der Kristallisationsbedingungen bestand darin, 15 Proteinkonzentrationen (10HIS- β Arr-Strep in 200 mM Na-Citrat pH 7,5) von 0,9 bis 3,5% und 7% (Endkonzentration nach Äquilibrierung) gegen drei verschiedene pH-Werte (7,2; 7,5 und 7,8) in An- bzw. Abwesenheit von 50 mM DTT auf Kristallwachstum und Größe zu testen (hanging drop; 3 μl Protein + 3 μl Puffer; bei 7%: 6 μl Protein + 3 μl Puffer)

Nach 16 Stunden konnten bereits hexagonale Kristalle von 150 μm Durchmesser in den Proben mit der höchsten Proteinkonzentration (7,0%) bei pH 7,2 beobachtet werden. Nach zwei bis drei Tagen bildeten sich kleinere Kristalle auch in Ansätzen mit geringerer Proteinkonzentration. Eine untere Grenze war etwa bei 1,9 % Protein auszumachen ($t=7$ Tage). Alle Ansätze zeigten Bildung von Präzipitat, deren Menge zum einen von der Präsenz von DTT zum anderen von der Proteinkonzentration abhing. Ansätze ohne DTT zeigten, wenn überhaupt, nur Mikrokristalle. Der Anteil an Präzipitat erhöhte sich mit der Zeit, was offenbar die Bildung von Kristallen zu einem späteren Zeitpunkt verhinderte.

Obwohl die Kristalle (an den Kanten) eine starke Lichtbrechung aufweisen, was in der Regel ein Merkmal von Salzkristallen ist (J. Granzin, FZ-Jülich, pers. Mtlg.), ließen sie sich sowohl mit Mercuriochrom, Sulforhodamin B und Ponceau S anfärben. Färbeversuche mit "Iz it", welches Coomassie entspricht, schlugen fehl, da der Coomassie-Farbstoff als Kaliumsalz ausfiel.

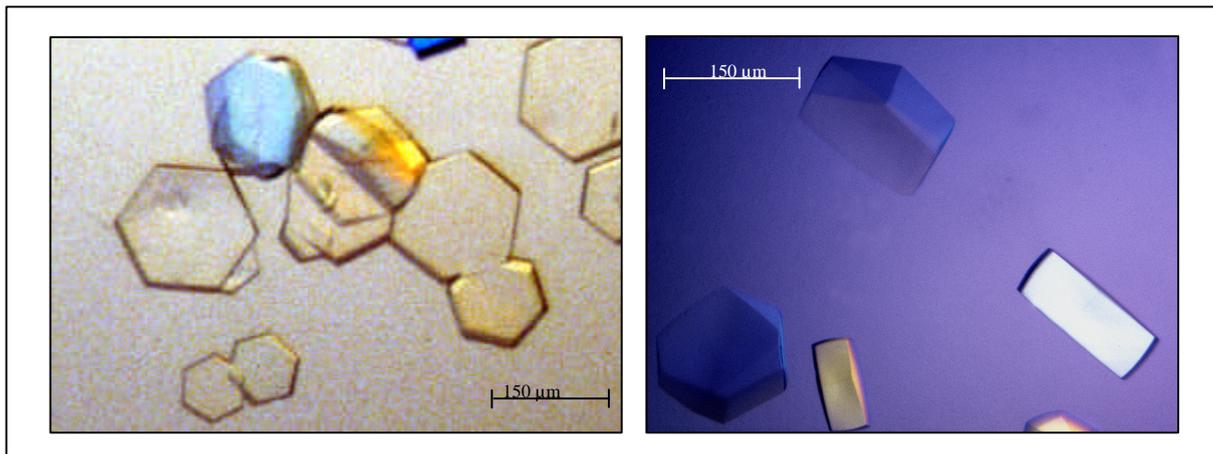


Abbildung 3.10 : „Hexagonale“ Kristalle von b-Arrestin in Tartrat-Puffer: Gezeigt sind Aufnahmen von „Hanging-Drop“-Ansätzen mit 10HIS- β Arr-Strep. Links: Enkonzentration im Tropfen nach Äquilibrierung: 3,5% Protein in 200 mM Na-Citrat, 100 mM DTT; 720 mM Tartrat, 90 mM HEPES pH 7,2;. Rechts: gleiche Bedingungen mit 7% Protein. Die Aufnahmen wurden nach 48 bzw. 16 Stunden gemacht.

Die Kristalle weisen einen hexagonalen Habitus auf und entsprechen im Verhältnis von Durchmesser zu Stärke der Form einer "Schraubenmutter". Im polarisierten Licht zeigen die Kristalle in der Durchsicht durch die hexagonale Fläche keinen Polarisations-Effekt (Abbildung 3.10 links). Senkrecht hierzu wird Drehung der Polarisationsrichtung um ca. 90° beobachtet (Abbildung 3.10 rechts, unten rechts). Die Farbeffekte in der oberen Abbildung entstehen durch die optischen Eigenschaften des Kristallisationsschalen-Materials, da die parallele Orientierung der Polypropylenmoleküle im thermoplastischen Kunststoff den Effekt eines heterogenen Polarisationsfilters bewirkt (Interferenzeffekte).

Eine eindeutige Bestätigung der Authentizität der β -Arrestinkristalle erfolgte durch Western-Blot. Wie in Abbildung 3.11 klar zu erkennen ist, handelt es sich bei der kristallisierten Substanz eindeutig um 10HIS- β Arr-Strep. Beide Affinitätstags werden bei dem erwarteten Molekulargewicht erkannt.

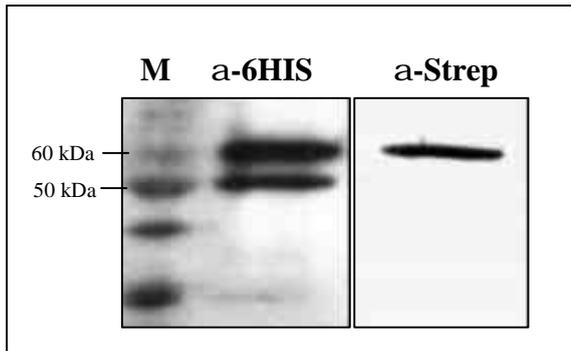


Abbildung 3.11 : Immunochemische Analyse der β -Arrestinkristalle: Zehn Kristalle (ca. 100 μm) wurden mit Mercurochrom rot angefärbt, zwei mal in 1 ml Tartrat-Puffer (1 M) gewaschen, abzentrifugiert und in Probenpuffer bei 95°C aufgelöst. Nach SDS-PAGE und Westernblot erfolgte der immunochemische Nachweis zunächst mit dem α -6HIS-AK und Immunfluoreszenz. Nach Strippen des Blots erfolgte die Detektion mit dem SA-AP-Konjugat kolorimetrisch. Ebenfalls untersucht wurden 20 μl der letzten Waschlösung (Befund: negativ, nicht gezeigt) M. Benchmark Protein Standard

Als Kontrolle wurden ebenfalls die letzte Waschlösung immunochemisch untersucht, um auszuschließen, daß Protein aus der "Mutterlauge" die Signale generiert. Die Identität des zusätzlichen Signals bei 50 kDa im α -HIS-Blot ist zunächst auffällig. Da dieses Signal im α -Strep Blot nicht erscheint, kann ausgeschlossen werden, daß verschiedene modifizierte β -Arrestinmoleküle kristallisiert wurden. Es handelt sich offenbar um ein Abbauprodukt des Proteins. Ob dieser Abbau während des Waschens und Auflöserns der Kristalle stattgefunden hat, oder bereits spezifisch degradiertes Protein kristallisiert war, blieb zunächst unklar. Spätere Untersuchungen zeigten aber eindeutig, daß das kristallisierte Protein homogen ist (siehe Abschnitt 3.1.15.2), der beobachtete Abbau demnach nachträglich erfolgt sein mußte.

3.1.9.5. Geringe Stabilität des Proteins mindert die Qualität der Kristalle

Bei Ansätzen mit hoher Proteinkonzentration zeigte sich Kristallwachstum binnen 16 Stunden. Es entstanden zunächst wenige Kristalle gleicher Größe, die nach ein bis zwei Tagen kein weiteres Wachstum mehr zeigten. Statt dessen bildeten sich nach dieser Zeit in diesen Ansätzen viele neue Kristalle, die allerdings wesentlich kleiner waren (siehe Abbildung 3.10, links), teilweise sogar als "Kristallgries" auftraten. Dieses Verhalten war nicht eindeutig reproduzierbar sondern hing unter anderem von der Handhabung der Kristallisationsschalen ab. Kurzfristige Veränderung der Temperatur und Konvektionsphänomene im Tropfen, wie sie zwangsläufig bei der Beobachtung der Ansätze unter dem Mikroskop auftreten, sowie mechanische Erschütterung der Schalen schien diese sekundäre Kristallbildung zu fördern. Offenbar werden von den bereits vorhandenen Kristallen im Tropfen Kristallisationskeime abgeschilfert. Daß diese Keime zu neuen Kristallen heranwachsen können, bedeutet zum einen, daß die ersten, großen Kristalle ihr Wachstum nicht aufgrund der Tatsache eingestellt haben, daß die thermodynamische Löslichkeit des Proteins im Ansatz erreicht worden ist sondern aufgrund von Gitterdefekten im Kristall. Zum anderen legt das frühe Einsetzen und das schnelle Wachstum der Kristalle die Vermutung nahe, daß die erste Keimbildung während und nicht nach Abschluß der Äquilibrierungsphase gegen das Reservoir stattgefunden hat.

Für erste Versuche, kristallographische Daten der Kristalle zu erhalten, wurden sie entweder in Kapillaren umgesetzt oder in die jeweilige Reservoirolösung mit 30% Glycerin getaucht (2sek bis 10 min) und im Kryostrom schockgefroren. Es konnte keine Beugung der Röntgenstrahlung am Kristall nachgewiesen werden, unabhängig von Bestrahlungsdauer und unterer Auflösungsgrenze. Diese Beobachtung läßt sich nur dadurch erklären, daß der Kristall nach seiner Bildung eine Veränderung durchlaufen hat. Während des Kristallwachstums mußten die Proteinmoleküle noch periodisch geordnet im Kristall vorgelegen haben also eine gewisse Fernordnung aufgewiesen haben. Diese ging entweder nach Abschluß des Wachstums oder durch die Manipulation während der Meßvorbereitungen bzw. durch das Einfrieren verloren.

3.1.9.6. Kristallisation weiterer Varianten von β -Arrestin

Zur Klärung der Frage, ob und welchen Einfluß die verschiedenen Affinitätstags auf das Kristallisationsverhalten des Proteins hat, wurden analog zum 10HIS- β Arr-Strep weitere β -Arrestin-Varianten isoliert und für Kristallisationsexperimente verwendet. Mit den Varianten β Arr-6HIS, 6HIS- β Arr und β Arr-Strep wurden unter den gleichen Bedingungen wie für 10HIS- β Arr-Strep Kristallisationsansätze vorbereitet. Die Tartratkonzentration wurde über einen Bereich von 500 mM bis 1 M, der pH-Wert von 6,5 bis 7,8 und die Proteinkonzentration von 2 bis 6% untersucht.

Alle Proteine kristallisierten unter annähernd gleichen Bedingungen und mit der gleichen Kristallmorphologie. Die geringen Unterschiede in Bezug auf optimale Protein- und Tartratkonzentration waren durch die unterschiedliche Qualität der einzelnen Proteinchargen verursacht. Bezüglich der Labilität (Präzipitation) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Varianten festgestellt werden. Die Kristalle der "Single-Tag"-Varianten zeigten ebenfalls keine Röntgenbeugung. Allerdings läßt die Tatsache, daß alle Varianten unabhängig von der Präsenz oder Art des Affinitätstags mit gleicher Morphologie kristallisieren, den Schluß zu, daß die Interaktion der Proteinmoleküle innerhalb des Kristalls nicht über die Affinitätstags vermittelt wird.

3.1.9.7. Optimierung der Kristallqualität

Als Ursachen für die schlechten Beugungseigenschaften der Kristalle kommen mehrere Faktoren in Frage. Schnelles Wachstum kann eine Häufung von Fehlstellen und Dislokationen innerhalb des Kristallgitters bewirken. Solche Fehlstellen terminieren nicht nur das Wachstum eines Kristalls sondern können auch die maximal erreichbare Auflösung kristallographischer Daten limitieren (McPherson, 1999). Sowohl schnelles Wachstum als auch vorzeitige Wachstumsarretierung wurden bei den β -Arrestinkristallen beobachtet. Hinzukommt, daß die Kristalle wahrscheinlich während der Äquilibrationsphase des Tropfens wachsen. Dies bedeutet, das sich die Millieubedingungen während und nach Beendigung des Wachstums weiter ändern. Unter den finalen Bedingungen nach Äquilibration könnten sich in den Kristallen Spannungen und Scherungen aufbauen, die äußerlich zwar nicht erkennbar sind aber auswertbare Röntgenbeugung verhindern. Ebenfalls könnten diese Spannungen innerhalb des Kristallgitters den Kristall sensibler gegenüber dem Einfrieren oder anderen äußeren Einflüsse machen.

Wie bereits geschildert, konnte Kristallwachstum entweder binnen drei Tagen beobachtet werden oder überhaupt nicht, da das Protein im Tropfen mit der Zeit präzipitierte. Diese Labilität des Protein war wahrscheinlich entweder in der Kristallisationstemperatur von 16°C oder in der oxidativen Schädigung des Proteins begründet. Es wurden deshalb Kristallisationsexperimente parallel bei 4°C, 13°C und 16°C durchgeführt und die DTT-Konzentration wurde auf 100 mM erhöht, da hierdurch evtl. vorhandene intermolekulare Disulfidbrücken geöffnet werden können. Es ergab sich hieraus allerdings keine Verbesserung der Kristallqualität bzw. Größe. Bei 4°C bildeten sich im Gegenteil nur noch wenige kleine Kristalle. Es wurden sogar Ansätze unter Sauerstoffabschluß in einer mit Stickstoff gefüllten "Glove-Box" (Fa. Sigma) durchgeführt, ebenfalls ohne positive Ergebnisse.

Das Hauptproblem schien darin zu bestehen, daß Kristalle, die zu schnell wachsen, keine Röntgenbeugung zeigen, daß aber das Protein in Ansätzen, in denen die Bedingungen so eingestellt werden, daß theoretisch langsames Wachstum nach Äquilibration auftreten müßte, instabil war und präzipitierte. Dies lies den Schluß zu, daß die eigentliche Schädigung

des Proteins entweder schon während der Reinigung und/oder der Lagerung eingetreten war, sich aber erst im Kristallisationsansatz manifestierte, oder dem Protein die Noxe im Kristallisationsansatz selbst gesetzt wurde. Aufgrund der Befunde mit DTT blieb Sauerstoff das wahrscheinlichste, schädigende Agens. Für die *E.coli* DNA-Helikase repA wurde beobachtet, daß Kristalle schon bei kürzester Exposition mit Sauerstoff ihre Beugungseigenschaften vollständig verloren (J. Labahn, FZ-Jülich, pers. Mtlg.). Da eine geringe Exposition mit Sauerstoff ohne immensen Aufwand allerdings kaum zu vermeiden ist, wurden die vier putativ sauerstoffsensiblen Cysteine aus dem β -Arrestin gegen Serine ausgetauscht (siehe Abschnitt 3.1.6.).

3.1.9.8. Kristallisation der Cystein-Austauschmutante von β -Arrestin

Wie bereits beschrieben, wies das 10HIS- β Arr (4C-S)-Strep bereits während der Reinigung eine höhere Stabilität gegen Präzipitation auf als die Wildtypproteine. Mit diesem Protein wurden zunächst die bisherigen Befunde in Bezug auf die Kristallisation überprüft. Es wurden Proteinkonzentrationen von 1,5 bis 3% gegen Tartratkonzentrationen von 400 mM bis 1 M in An- bzw. Abwesenheit von 100 mM DTT über einen pH-Bereich von 6,5 bis 7,8 im "Hanging Drop"-Verfahren getestet. Im Wesentlichen unterschieden sich die Ergebnisse nicht von denen, die mit dem Wildtyp-Protein erreicht worden waren. Es konnten Kristalle hexagonaler Form mit einem Durchmesser von bis zu 300 μ m gezogen werden. Zu beobachten war aber, daß die Menge an Präzipitat deutlich geringer war. Die Notwendigkeit der DTT-Zugabe bestand allerdings weiterhin. Die Tatsache, daß Kristalle auch schon bei geringeren Konzentrationen von Protein bzw. Fällungsmittel auftraten, läßt sich durch den nun geringeren Anteil an "verdorbenen" Protein erklären. Nach wie vor bildeten sich nach ein bis zwei Tagen, abhängig von der Konzentration, große Kristalle, denen nach weiteren fünf bis 7 Tagen eine Vielzahl von kleinen Kristallen und Mikrokristallen folgten. Der optimale pH-Wert für die Kristallisation mit Tartrat lag bei dem mutierten Protein bei 6,8 (im Gegensatz zu 7,2 beim Wildtyp). Schnelle Bildung großer Kristalle fand zumeist bei einer Proteinkonzentration von 3% und einer Tartratkonzentration von 600 bis 700 mM statt.

Erste röntgenkristallographische Untersuchungen zeigten allerdings, daß auch diese Kristalle nicht diffraktieren. Dieses Verhalten könnte nach wie vor mit der Tatsache in Verbindung stehen, daß das Kristallwachstum während der Äquilibrationsphase des Systems stattfand.

Durch die Verwendung der Cystein-Mutante konnte aber die Stabilität des Proteins so weit erhöht werden, daß das Protein in den Ansätzen zwar zu einem geringen Anteil binnen 16 Stunden präzipitierte in den weiteren Tagen allerdings kein weiteres Ausfallen des Proteins stattfand. Hieraus kann geschlossen werden, daß ein Teil des Proteins schon während der Reinigung geschädigt war. Die Stabilitätserhöhung ermöglichte Kristallisation in Ansätzen mit geringerer Protein- und Tartratkonzentration. Diese Ansätze blieben zunächst klar, bildeten aber nach 7 bis 28 Tagen Kristalle bis zu einer Größe von 350 μ m aus. In einem Ansatz konnten nach sechs Wochen vier Kristalle mit einer Größe von bis zu 800 μ m mal 300 μ m beobachtet werden (2,5% Protein, 500 mM Tartrat, 100 mM DTT, 100 mM HEPES pH 6,8).

Einer dieser Kristalle wurde in eine Kapillare umgesetzt und röntgenkristallographisch untersucht. Zum ersten Male konnte an diesem Kristall Diffraktion bis zu einer Auflösung von 20 Å beobachtet werden. Die Diffraktionsreflexe waren intensiv allerdings in ihren Konturen sehr unscharf und schlecht definiert. Unterhalb von 20 Å waren keine Reflexe zu beobachten (scharfe Auflösungsgrenze), was darauf schließen läßt, daß die Fernordnung der Moleküle im Kristall relativ schlecht war. Der Kristall wurde anschließend aus der Kapillare für 3 min in Reservoirolösung plus 30% Glycerin umgesetzt und in einem Kryoloop schockgefroren.

Die Auflösung der Diffraktion änderte sich hierdurch nicht, allerdings verschlechterte sich die Qualität der Reflexe weiter. Hierdurch konnte aber gezeigt werden, daß zum einen Diffraktion mit β -Arrestinkristallen möglich ist, und daß zum anderen Glycerin als Kryoprotektant eingesetzt werden kann.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, daß die verbliebenen drei Kristalle aus diesem Ansatz zwei Tage nach dem ersten Öffnen des Ansatzes trüb geworden waren und Risse aufwiesen. Diffraktion konnte mit diesen Kristallen nicht mehr nachgewiesen werden.

3.1.9.9. Instabilität von β -Arrestinkristallen

Es hatte sich gezeigt, daß Kristalle eines Ansatzes, der bereits einmal geöffnet worden war, nach wenigen Tagen trüb und bräunlich wurden, Risse aufwiesen und sogar zerbrachen. Dieses Phänomen konnte auch bei zwei bis vier Wochen alten Kristallen beobachtet werden, deren Ansätze nicht geöffnet worden waren.

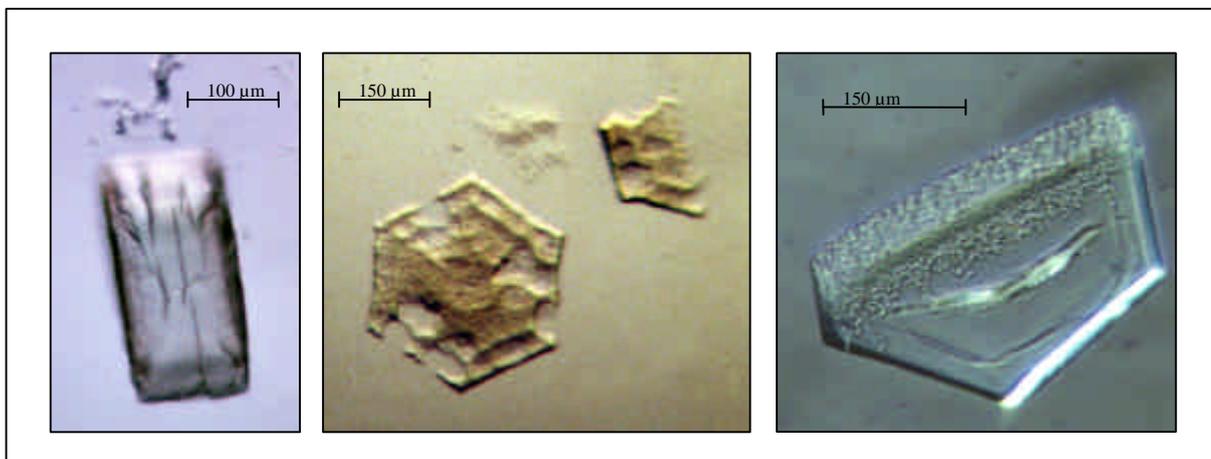


Abbildung 3.12 : Instabilität von β -Arrestinkristallen: Gezeigt sind verschiedene Stadien der Degradation von β -Arrestinkristallen (10HIS- β Arr (4C-S)-Strep) in ungeöffneten Ansätzen (400 bis 800 mM Tartrat, 2,5 bis 3,5% Protein, 100 mM DTT). Meist treten zunächst Risse parallel zur hexagonalen Fläche des Kristalls auf (links). Später zersetzen sich die Kristalle von den Kanten her und wandeln sich in Präzipitat um (Mitte und rechts).

Diese Instabilität wurde besonders deutlich bei Kristallen, die während der Äquilibrierungsphase gewachsen waren. Sie trat aber auch bei kleineren Kristallen auf, die in einem äquilibrierten System entstanden und gewachsen waren. Mit Wildtypproteinkristallen trat dieser Effekt noch deutlicher auf, was darauf schließen läßt, daß die Instabilität zumindest teilweise sauerstoffbedingt ist. Bereits kristallisiertes Protein ist im Vergleich zu dem Protein in der Tropfenlösung vorübergehend stabiler gegenüber Sauerstoff. Mit der Zeit scheint Sauerstoff langsam durch den Kunststoff oder die Silikonfettabdichtung in den Ansatz einzudringen. Das dort vorhandene DTT wird mit der Zeit oxidiert und anschließend das Protein im Kristall geschädigt.

Aus diesem Grunde wurden Kristalle röntgenkristallographisch untersucht, die nach zwei Tagen gewachsen und dann sofort eingefroren worden waren. Hierdurch wurde versucht, dem schädlichen Einfluß des Sauerstoffs zuvorzukommen. Diffraktion konnte aber auch mit diesen Kristallen nicht nachgewiesen werden.

3.1.9.10. Kristallisation unter Glycerinbedingungen

Um unnötige Belastung der Kristalle durch die Prozedur des Umsetzens in glyzerinhaltigen Puffer für das Einfrieren zu vermeiden, wurde versucht, das Tartrat-System so anzupassen, daß die Kristalle direkt in einer Lösung wachsen, die Glycerin als Kryoprotektant enthält. Glycerin kann über seine Wirkung als Kryoprotektant hinaus auch stabilisierend auf Protein einwirken (McPherson, 1999).

Es wurden Versuchsreihen mit 0,5 bis 3,5% Glycerin in Tartrat-Puffer (pH 6,8) von 400 bis 900 mM Tartrat und verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Es zeigte sich, daß Glycerin generell die Kristallisation von β -Arrestin nicht beeinflusst. Allerdings mußte für optimales Kristallwachstum die Tartratkonzentration vermindert werden, da Glycerin auch als Fällungsmittel wirkt, da es hygroskopisch ist. Bei 2,5% Protein, 460 mM bis 550 mM Tartrat und 30% Glycerin wurden die besten Ergebnisse erzielt. Die Bildung von sichtbarem Präzipitat konnte durch das Glycerin vermindert werden, allerdings wuchsen die Kristalle langsamer, weniger reproduzierbar und im Allgemeinen kleiner (max 350 μm). Das Phänomen der Sekundärkeimbildung trat auch bei diesen Versuchen weiterhin auf.

Neben den "hexagonalen" Kristallen ("Schraubenmutterform") traten gelegentlich auch Kristalle mit unterschiedlichem Habitus auf. Teilweise kristallisierte das Protein in Form sehr vieler langer Kristallnadeln (5 μm mal 500 μm) oder Büscheln von Nadeln. Darüber hinaus wurden Kristalle erhalten, die eine "Faßform" mit rechteckiger Grundfläche aufwiesen.

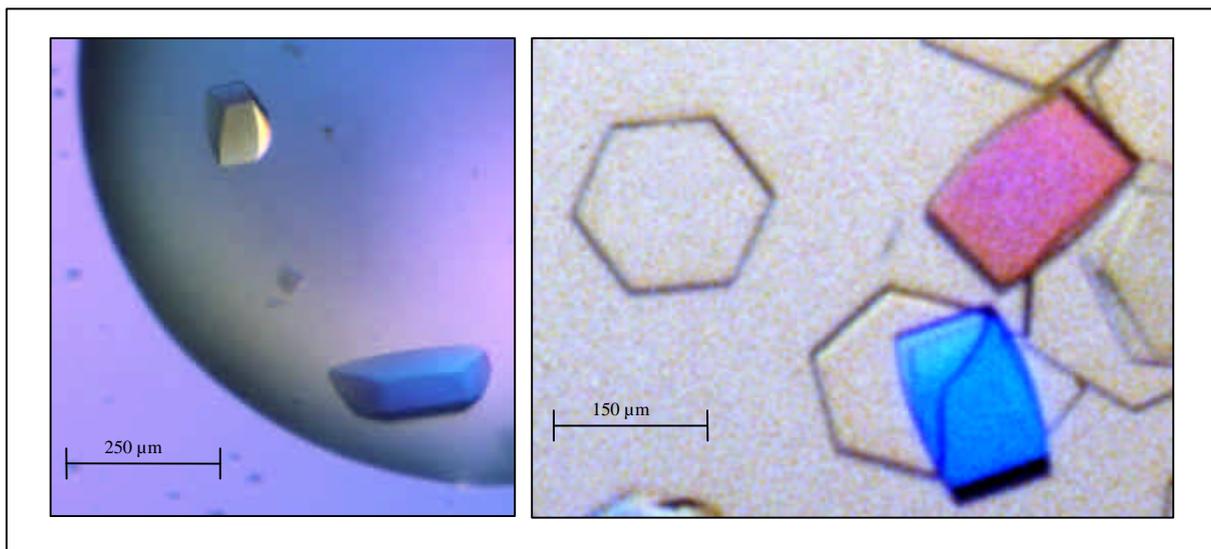


Abbildung 3.13 : Anormaler Kristallhabitus unter Glycerinbedingungen: Gezeigt sind „Polarisations-aufnahmen“ zweier Ansätze von 10HIS- β Arr (4C-S)-Strep (2,5%) in 500 mM Tartrat, 100 mM HEPES pH 6,8 100 mM DTT, 30% Glycerin nach fünf Tagen. Die Farbeffekte sind Artefakte der Kunststoffschalen. Zu beachten ist, daß beide Kristallformen gemeinsam in einem Ansatz auftreten können.

Eine genauere Betrachtung in polarisiertem Licht ergab, daß die rundlichen Flächen kristallographisch den Seitenflächen der hexagonalen Prismen entsprechen. Die "Faßform" entspricht der "Schraubenmutterform", allerdings weisen die einzelnen Kristallflächen bzw. Kanten unterschiedliche Wachstumsraten auf. Beide Formen hätten demnach die gleiche Raumgruppe. Die "Faßform" gibt darüber hinaus einen Hinweis darauf, daß keine hexagonale Raumgruppe vorliegt, wie bisher aufgrund der Kristall-Habiti angenommen werden konnte (J. Granzin, FZ-Jülich, pers. Mtlg.).

Für die röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden die Ansätze im Generatorraum geöffnet, die Kristalle direkt mit Kryoloops entsprechender Größe aus der Mutterlauge genommen und binnen zwei Sekunden im Kryostrom schockgefroren. Auch mit diesen Kristallen konnte allerdings zunächst keine Diffraktion beobachtet werden.

3.1.10. Aufnahme erster kristallographischer Datensätze

Um auszuschließen, daß die Kristalle während des Transports vom Kristallisationslabor in den Generatorraum geschädigt werden, wurden die Kristalle (30% Glycerin-Tartrat-Puffer) in weiteren Versuchsreihen nach kurzem Wachstum (3 Tage) im Kristallisationslabor in Cryoloops überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine intensive Evaluierung dieser Kristalle ergab, daß einer aus etwa 20 Kristallen Röntgendiffraktion zeigt (ca. 10 bis 12 Å Auflösung bei Verwendung des Drehanodengenerators). Zwei dieser Kristalle wurden im DESY- Synchrotron in Hamburg kristallographisch untersucht. Die Ergebnisse sind detailliert in Abschnitt 3.1.14. wiedergegeben. Es konnten Datensätze mit auswertbaren Auflösungen von 4,5 Å und 7,0 Å erreicht werden. Weitere Kristalle, darunter auch solche mit "Faßform" zeigten unter Synchrotronbedingungen ebenfalls ein geringes Maß an Diffraktion (10 bis 15Å). Ein allgemeines Muster in Bezug auf Kristallisationsbedingungen und Kristallhandhabung ließ sich aus diesen Ergebnissen allerdings nicht ableiten. Die Meßdaten zeigten, daß die Kristalle generell, wenn überhaupt, nur sehr schwach diffraktieren. Durch die hierdurch nötige lange Exposition der Kristalle mit hohen Dosen von Röntgenstrahlung ging die Qualität der Meßdaten über die Dauer des Experiments zurück (Strahlenschäden).

Durch die Anzucht der Kristalle in Anwesenheit von Glycerin als Kryoprotektant konnten die Diffraktionseigenschaften der Kristalle deutlich erhöht werden.

Dennoch war die Qualität der Kristalle bzw. die Reproduzierbarkeit der Kristallisationsergebnisse nach wie vor unzureichend.

Es folgten Kristallisationsexperimente unter anderen im "Batch"-Verfahren als schwebender Tropfen unter Öl, bei verschiedenen Temperaturen, mit TECEP (Fa. Peirce) als Antioxidanz und mit Protein, das nur über die Strep-Tactin-Säule aufgereinigt war und somit vom Zellaufschluß an unter reduzierenden Bedingungen bearbeitet wurde. Mit keiner der angewendeten Methoden konnten Kristalle mit besseren Diffraktionseigenschaften gezogen werden. (Von der Konsultation eines haitianischen Voodoo-Priesters und der rituellen Opferung von Hühnern neben den Kristallisationsansätzen wurde aus Kosten- bzw. Tierschutzgründen unter Bedauern abgesehen.)

3.1.10.1. Etablierung neuer Kristallisationsbedingungen

Mit den Erfahrungen in Bezug auf die Proteinstabilität wurde mit dem 10HIS-βArr (4C-S)-Strep-Protein erneut ein "Screen" der Puffer-Sets "Hampton Crystal Screen I und II" durchgeführt. Ziel war es, Bedingungen zu finden, unter denen das Protein in einer anderen evtl. stabileren Anordnung kristallisiert. In der ersten "Screen-Runde" mit 10HIS-βArr-Strep war das Protein in vielen Ansätzen schnell präzipitiert (siehe Abschnitt 3.1.9.1.). Die Cystein-Mutante hingegen weist eine höhere Stabilität auf und müßten von daher im Allgemeinen leichter kristallisieren. Da die verschiedenen Puffer verschiedene Arten der Protein-Protein-Interaktion fördern bzw. schwächen, sollten auch verschiedene und ggf. stabilere Packungsformen favorisiert werden.

In einem ersten Versuch wurden je 5µl 10HIS-βArr (4C-S)-Strep (11 mg/ml in 100 mM Na-Citrat pH 8,0) mit je 2,5 µl der 96 verschiedenen Puffer im "Hanging-Drop"-Verfahren untersucht (inkl. 100 mM DTT). Die Ansätze wurden auf dem Deckgläschen gemischt und dann auf drei bis fünf kleinere Tropfen auf dem Deckglas verteilt. Es hatte sich gezeigt, daß sich diese Tropfen, obwohl theoretisch identisch, unterschiedlich verhalten können.

Im Wesentlichen verhielt sich das Protein in Bezug auf die Pufferzusammensetzung ähnlich wie zu Beginn der Kristallisationsversuche. In Gegenwart von PEGs fiel das Protein instantan

aus, die meisten Ansätze blieben aber abgesehen von Salzkristallen aus Schwermetallcitratun zunächst klar. Nach zwei Tagen konnten in vielen Ansätzen putative Mikrokristalle beobachtet werden. Mit diesen Puffern und denen, die nach zwei Tagen immer noch klar waren wurde analog eine zweite Versuchsreihe mit geringerer, respektive höherer Proteinkonzentration durchgeführt (mit und ohne 100 mM DTT). Von diesen 41 Puffern bildeten sich bei 14 binnen 5 Tagen eindeutig Mikrokristalle:

- I/4. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
- I/25. 1.0 M Na Acetate, 0.1 M Imidazole pH 6.5**
- I/32. 2.0 M Ammonium Sulfate
- I/33. 4.0 M Na Formate
- I/34. 2.0 M Na Formate, 0.1 M Na Acetate pH 4.6
- I/35. 1.6 M Na, K Phosphate, 0.1 M Na- HEPES pH 7.5**
- I/39. 2% PEG 400, 2.0 M Ammonium Sulfate, 0,1 M HEPES pH 7,5
- I/48. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 Tris HCl pH 8.5
- II/14. 2.0 M (NH₄)₂SO₄ , 0.1M Na Citrate pH 5.6 0.2 M K/Na Tartrate
- II/15. 1.0 M Li sulfate, 0.1M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M (NH₄)₂SO₄
- II/20. 1.6 M Mg sulfate, 0.1 M MES pH 6.5
- II/21. 2.0 M Na chloride, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Na/K Phosphate**
- II/32. 1.6 M Ammonium sulfate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.1 M Na chloride
- II/42. 12% Glycerol, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.5 M Ammonium sulfate

Durch weitere Optimierung der Bedingungen (Fällungsmittelkonzentration, pH-Wert etc.) konnten mit den Puffern I/25, I/35 und II/21 erneut "hexagonale" Kristalle mit einer Größe von bis zu 200 µm Durchmesser gezogen werden. Keiner der untersuchten Kristalle zeigte Diffraktion. Analog zum Tartrat-System wurden die Kristallisationsbedingungen auf die Präsenz von Glycerin im Tropfen umgestellt. Die so erhaltenen Kristalle zeigten allerdings auch keine Beugung. In Bezug auf Stabilität und Präzipitat ergab sich ebenfalls keine Verbesserung. Es fällt auf, daß Kristallisation anscheinend nur unter "Hochsalzbedingungen" stattfindet. Mit organischen Fällungsmitteln konnten nicht einmal Mikrokristalle beobachtet werden.

Da auch mit den neuen Fällungsmitteln nur die bereits bekannten "hexagonalen" Kristalle entstanden, wurde zunächst auf eine weitere Untersuchung dieser Systeme verzichtet.

3.1.10.2. Zusatz von Cofaktoren für die Kristallisation

Die meisten Proteine sind in ihrer Konformation flexibel und können in Lösung als Mischung verschiedener Konformationen vorliegen. In einigen Fällen ist eine bestimmte Konformation abhängig von der Anwesenheit eines reversibel gebundenen Liganden oder Kofaktors. Bindung an einen Kofaktor kann die Löslichkeit eines Proteins stark ändern. Darüber hinaus kann die Präsenz eines Kofaktors die Mikroheterogenität eines Konformer-Gemisches dadurch vermindern, daß das ligandgebundene Konformer angereichert wird (aus McPherson, 1999).

Für β -Arrestin ist bekannt, daß u.a. Inositolhexaphosphat (IP₆) an des Protein bindet. Es wird vermutet, daß IP₆ an die Region des β -Arrestin-Moleküls bindet, der die phosphorylierten Seitengruppen des β -adrenergen Rezeptors erkennt (Lin et al., 1997 und Abschnitt 1.1.5.).

3.1.10.3. IP₆ vermindert die Löslichkeit von β -Arrestin

Zur Klärung der Frage, ob IP₆ in der Lage ist, β -Arrestin in Lösung und im Kristall zu stabilisieren, wurden Kristallisationsansätze geplant, für die dem Protein (10HIS- β Arr (4C-S)-Strep) 2 mM IP₆ zugegeben werden sollte. Als die Proteinstammlösung (28 mg/ml in 100 mM Na-Citrat pH 8,0) allerdings mit 100mM-IP₆-Stammlösung versetzt wurde, fiel das Protein binnen Sekunden fast vollständig aus. Eine genauere Analyse dieses Niederschlages unter dem Mikroskop ergab, daß das Protein nicht präzipitiert war, sondern sich Mikrokristalle gebildet hatten. Offenbar interagiert IP₆ mit β -Arrestin und bewirkt eine Verminderung der Löslichkeit bei gleichzeitiger Verbesserung der Kristallisationseigenschaften. Genauere Untersuchungen mit verdünnteren Lösungen von β -Arrestin ergaben, daß die Löslichkeit in etwa um einen Faktor drei vermindert wird.

3.1.11. Kristallisation von β -Arrestin in Gegenwart von IP₆

In einer Serie von 240 Ansätzen wurden die Kristallisationsbedingungen auf die Präsenz von IP₆ und die verminderte Löslichkeit von β -Arrestin eingestellt. Da sich das Protein in Anwesenheit von IP₆ nicht höher als 1,5% konzentrieren ließ, wurde das IP₆ erst über den Reservoirpuffer mit β -Arrestin in Kontakt gebracht. Die Kristallisationsmatrix erstreckte sich von 0,1% bis 2,8% Protein (10HIS- β Arr (4C-S)-Strep in 100 mM Na- Citrat, pH 8,0 oder 50 mM K-Phosphat pH 8,0), 400 mM bis 800 mM Tartrat (pH 6,8), 0% bis 30% Glycerin und 2 mM bzw. 100 mM DTT.

Eine erste Beobachtung war, daß in den Ansätzen mit 100mM DTT unabhängig von der Proteinkonzentration auch über Wochen hinweg kein Präzipitat mehr auftrat. Ohne DTT wurden, wenn überhaupt, nur noch minimale Mengen an Präzipitat beobachtet. Offenbar ist die IP₆-gebundene Form deutlich stabiler gegen Denaturierung und/oder Oxidation als das "Apoprotein". Über fast den gesamten Bereich der angewendeten Kristallisationsmatrix wurden die bekannten "hexagonalen" Kristalle gebildet. Die untere Grenze, bei der noch wenige kleine Kristalle (ca. 30 μ m) beobachtet wurden, lag bei einer Proteinkonzentration von 0,25% in 500 mM Tartrat und 30% Glycerin). Diese Kristalle bildeten sich nach ca. 14 Tagen. Bei hohen Protein- und Tartratkonzentrationen (700/20 bis 800/30) schieden sich binnen 16 Stunden zunächst Kristalle aus der Lösung ab, die in ihrer Morphologie eher Öltröpfchen entsprachen als Kristallen. Diese Tropfen waren aber von fester Konsistenz und bildeten nach weiteren drei bis zehn Tagen "Ecken und Kanten" aus. Auch zeigten sich bei hohen Tartrat-, Protein und Glycerinkonzentrationen Kristalle mit bisher unbekanntem Habitus. Neben der "Faßform" traten auch langgestreckte Prismen (50 mal 300 μ m) und Nadeln auf (siehe Abbildung 3.14). Die optimalen Bedingungen für die Kristallisation von β -Arrestin in Gegenwart von 2 mM IP₆ unter Glycerinbedingungen lagen bei einer Proteinkonzentration von 0,5% in 600 mM Tartrat, 30% Glycerin und 100 mM DTT. Hier wuchsen nach vier bis sechs Tagen, also nach Äquilibration des Systems, wenige (1 bis 15) "hexagonale" Kristalle mit einer Größe von bis zu 400 μ m x 150 μ m.

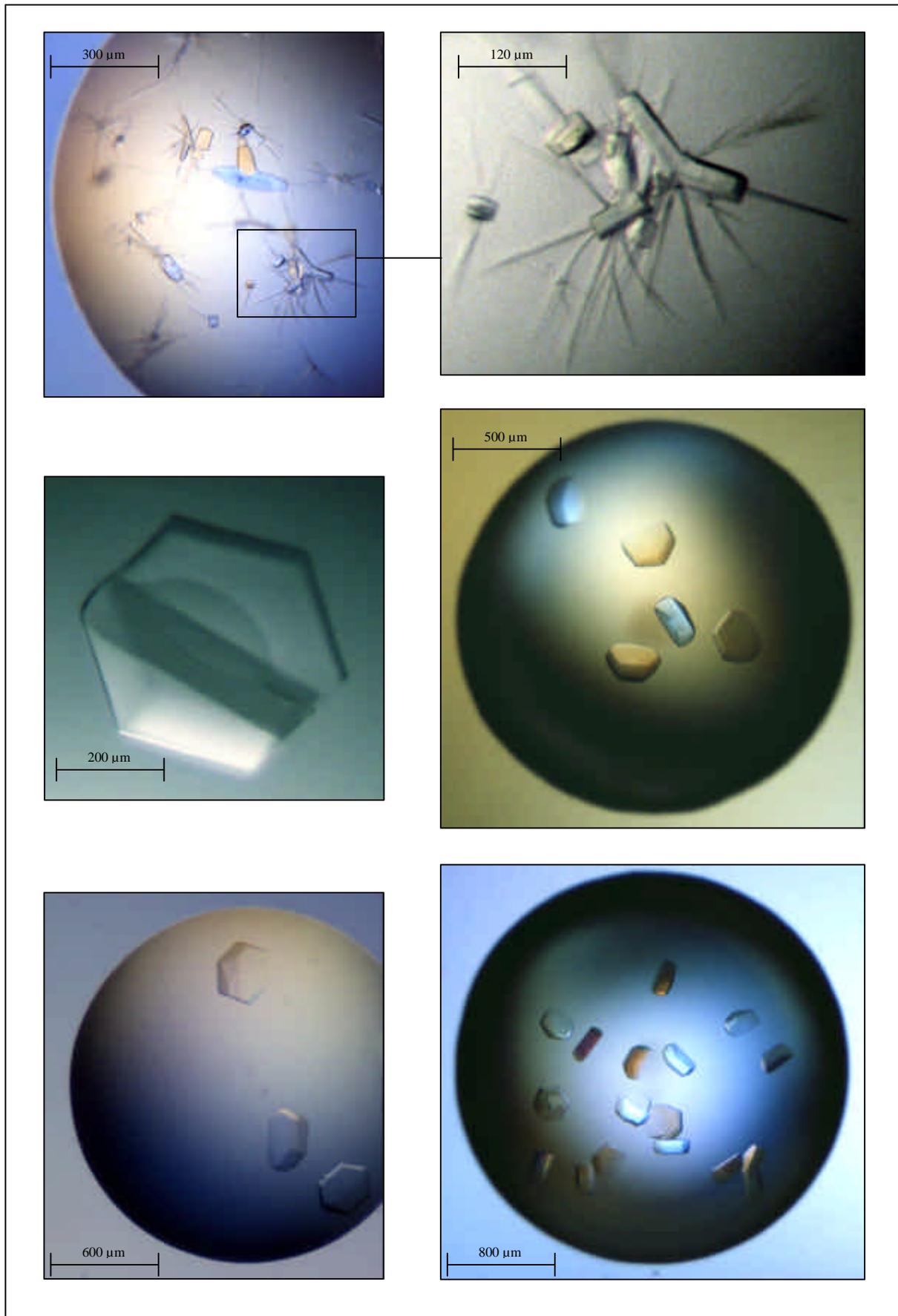


Abbildung 3.14 : Morphologische Varianten von b-Arrestin-IP₆-Co-Kristallen: Gezeigt sind Kristalle bei verschiedenen Protein und Pufferkonzentrationen (10HIS-βArr (4C-S)-Strep). Oben: 800 mM Tartrat, 30% Glycerin, 1,25 % Protein; Mitte links: Zwillingsbildung tritt unter verschiedenen Bedingungen nicht reproduzierbar auf; Mitte rechts und unten: typische Ansätze nach sieben Tagen (600 mM Tartrat, 30% Glycerin, 0,5% Protein)

3.1.11.1. IP₆ verbessert die Diffraktionseigenschaften

Beugungsexperimente am Drehanodengenerator zeigten, daß ca. 80% aller untersuchten Kristalle Diffraktion mit einer maximal erkennbaren Auflösung zwischen 12 und 6,5 Å aufwiesen (siehe Abbildung 3.15). Die Auflösungsgrenze stieg weitgehend mit der Kristallgröße an, wobei die Signale mit höherer Auflösung gleichmäßig schwächer wurden. Ein Abbrechen der Signale bei einer bestimmten Auflösungsgrenze wie bei den Kristallen ohne IP₆ war nicht zu beobachten (vergleiche Abschnitt 3.1.9.8).

3.1.12. Untersuchungen zur Kristallstabilität

Ein weiterer Effekt von IP₆ zeigte sich in Ansätzen, die geöffnet und wieder verschlossen worden waren. Die Kristalle und Proteinlösungen blieben nicht nur äußerlich stabil, es konnten sogar über mehrere Wochen hinweg mehrfach Kristalle entnommen werden, die nach wie vor Diffraktion zeigten. Dadurch, daß mit IP₆ nun ein System zur Verfügung stand, welches reproduzierbar diffraktierende Kristalle hervorbrachte, war es möglich, die Handhabung der Kristalle in Bezug auf Diffraktionsqualität und Auflösung zu optimieren. Mit über 100 Kristallen wurden weitere, geeignete Kryoprotektanten gesucht und "Cross-linking" Experimente durchgeführt. Es hatte sich bereits gezeigt, daß die Kristalle, die langsam aus einer äquilibrierten Mutterlauge gewachsen waren, meist eine höhere Auflösung aufwiesen als schnell gewachsene aus höherkonzentrierten Protein- und Tartratlösungen (siehe auch Abschnitt 3.1.9.5.). Kristalle, die direkt in 30% Glycerin entstanden waren, beugten geringfügig besser als solche, die kurz vor dem Einfrieren in glyzerinhaltigem Puffer (inkl. DTT) inkubiert wurden. Neben Glycerin wurde auch Umsetzpuffer mit 20 bis 35 % PEG400 (1 bis 15 min Inkubationszeit) getestet. Diese Kristalle beugten im Durchschnitt allerdings schlechter als solche, die in Glycerinpuffer umgesetzt wurden.

Cross-linking Experimente mit Glutaraldehyd erfolgten, wie in Abschnitt 2.8.3 beschrieben. Die Kristalle verloren aber bei allen getesteten Glutaraldehydkonzentrationen (0,25% und 1%) und Inkubationszeiten (0,5 bis 30 min) ihre Diffraktionseigenschaften vollständig. Versuche, die Kristalle in flüssigem Propan oder Butan einzufrieren brachten ebenso keine Verbesserung der Diffraktion wie die Verwendung von Silikonöl oder Paraton N (Fa. Hampton) als Kryoprotektant.

Die besten Ergebnisse wurden nach wie vor mit Kristallen erzielt, die in Glycerinpuffer gewachsen waren und direkt aus dem Ansatz heraus im Kryostrom oder flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

3.1.13. Herstellung von Quecksilberderivaten

Schwermetallderivate eines Kristalls werden benötigt, um das Phasenproblem bei der Strukturbestimmung zu lösen. Im Falle des β -Arrestins stand zwar die homologe Struktur des visuellen Arrestins für einen "Molecular Replacement"-Ansatz zur Verfügung, für den keine Schwermetallderivate erforderlich sind, allerdings können "Schwermetalldaten" ein späteres Strukturmodell aus dem "Molekularen Ersatz" verifizieren helfen, indem die Methode des "Isomorphen Ersatzes" angewendet wird.

Derivate werden in der Regel dadurch hergestellt, daß man die bereits gewachsenen Kristalle für mindestens 30 min in einen entsprechenden Puffer umsetzt, der das jeweilige Schwermetallsalz enthält. Durch die Solvenzkanäle im Kristall kann das Metallion an die

spezifischen Positionen am Protein gelangen. Da die β -Arrestinkristalle auf jede Manipulation außerhalb des Kristallisationsansatzes sensibel reagieren, wurde den entsprechenden Ansätzen direkt 2 mM HgCl_2 zugegeben. Da die Quecksilberionen allerdings durch das vorhandene DTT von Hg^{2+} zu Hg_2^{2+} und sogar zu elementarem Quecksilber reduziert werden können, wurde das DTT räumlich von den Quecksilberionen im Kristallisationstropfen dadurch getrennt, daß das DTT erst nach Mischen des Tropfens mit Reservoirpuffer (mit 2 mM HgCl_2) dem Reservoir zugegeben wurde. Hierdurch sollte im gesamten Ansatz ein reduzierendes Milieu herrschen, da der molekulare Sauerstoff vom DTT im Reservoir "verbraucht" wird. Auch bei Präsenz von HgCl_2 und IP_6 bildeten sich Kristalle bekannter Morphologie. Das Quecksilber scheint zunächst auf die Kristallisation keinen Einfluß zu haben. Die Diffraktionseigenschaften der erhaltenen Kristalle waren sogar teilweise besser als bei Kristallen ohne Quecksilberzusatz. Dies könnte aber auch auf die geringe Konzentration von DTT im Tropfen zurückzuführen sein (2 mM), welches in hoher Konzentration (100 mM) evtl. schädlich sein kann.

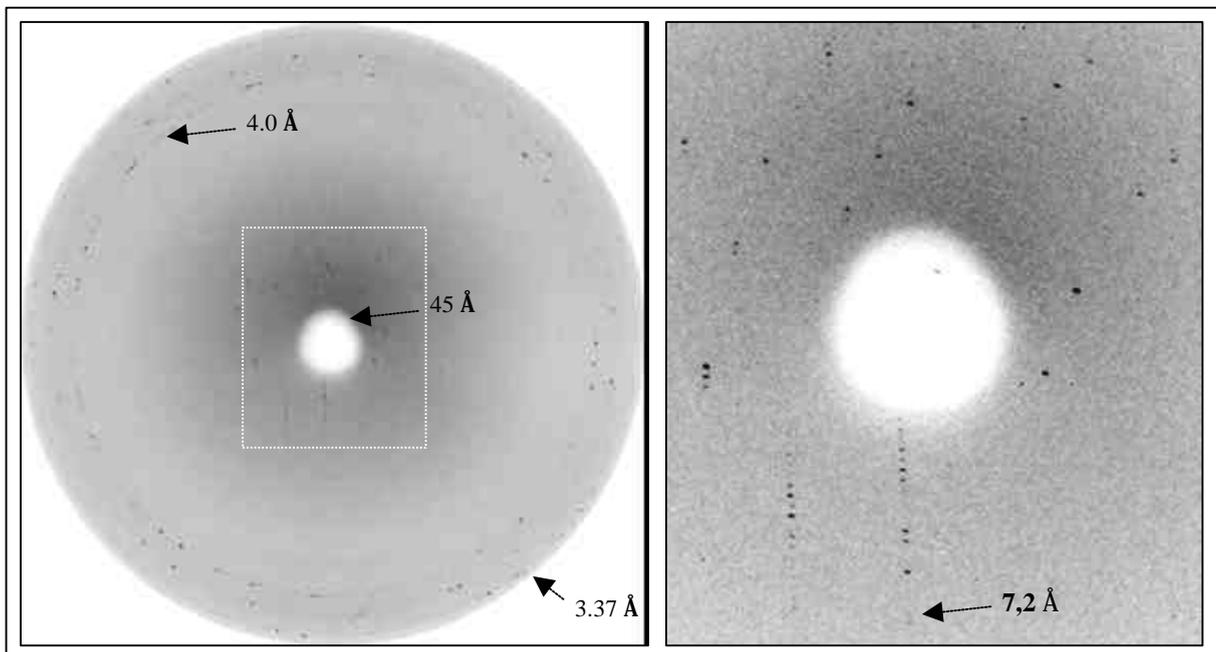


Abbildung 3.15 : Diffraktionsaufnahme eines β -Arrestin- IP_6 -Kristalls mit dem Drehanodengenerator: Dargestellt ist ein Diffraktionsimage des Kristalls "2000_47" sowie eine Ausschnittsvergrößerung. Der Kristall (350 μm ; hexagonal aus: 1,4 % Protein (10HIS- β Arr (4C-S)-Strep), 600 mM Tartrat, 100 mM DTT, 2 mM IP_6 , 2m M HgCl_2 , ohne Glycerin) wurde für fünf sek. in Kryoprotektant inkubiert (500 mM Tartrat, 30% Glycerin) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kristall-Detektorabstand: 300 mm; Exposition: 90 min. Die weiteren Meßparameter sind in Abschnitt 2.9 gegeben.

3.1.14. Kristallographische Datensätze von β -Arrestinkristallen

Aufgrund der geringen Beugungsintensität der Kristalle war es nicht möglich, vollständige Datensätze mit dem Drehanodengenerator aufzunehmen. Stattdessen wurde der Drehanodengenerator dafür verwendet, geeignete Kristalle für Messungen mit Synchrotronstrahlung auszuwählen. Insgesamt wurden vier kristallographische Datensätze von verschiedenen β -Arrestinkristallen (alle aus 10HIS- β Arr (4C-S)-Strep) mit Synchrotronstrahlung am DESY in Hamburg und an der ESRF in Grenoble aufgenommen (Abbildung 3.16). Die folgende Tabelle gibt die relevanten Parameter und "Qualitätsfaktoren" dieser Datensätze wieder. Die Auswertung erfolgte für die orthorhombische Raumgruppe P222.

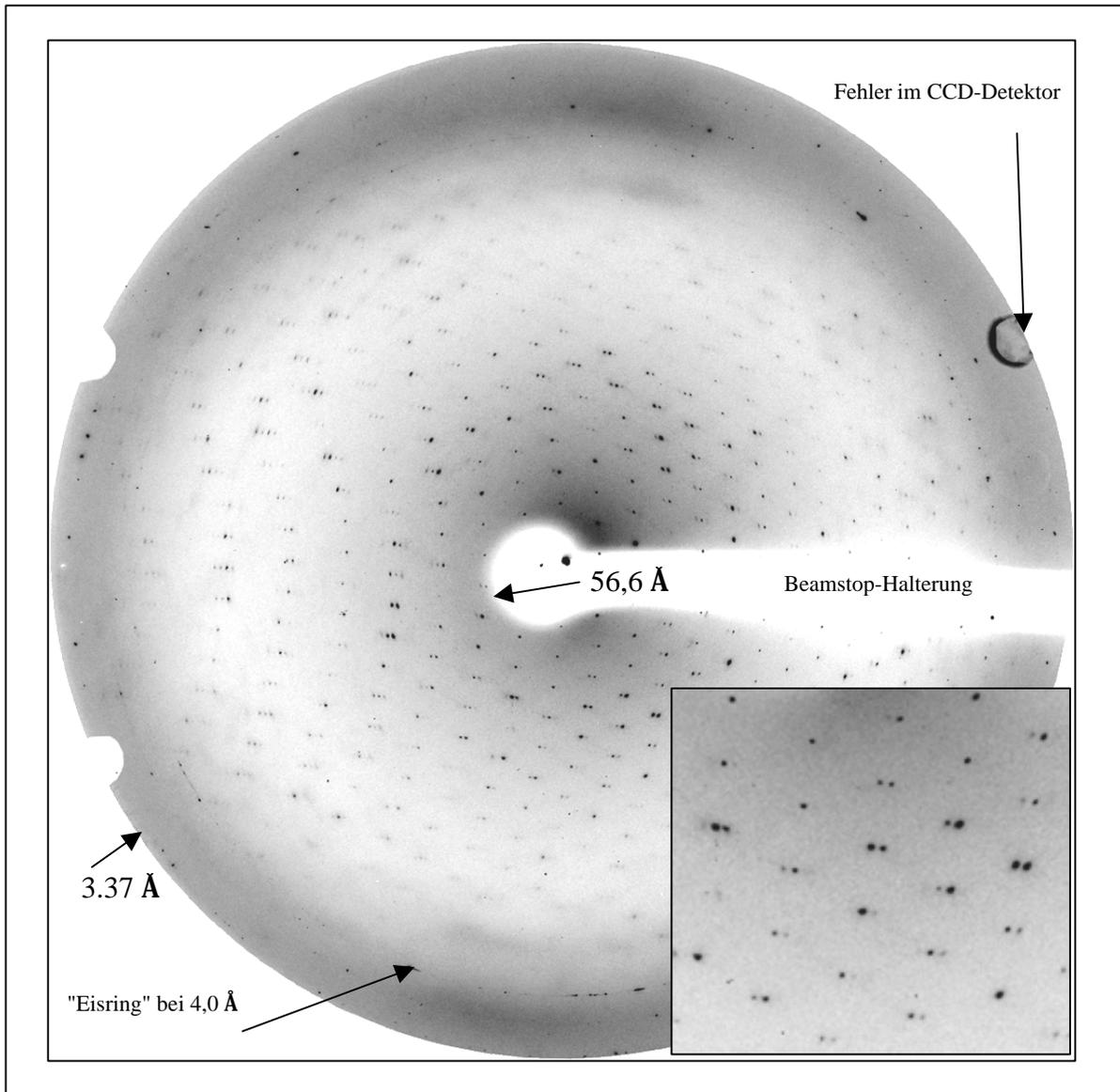


Abbildung 3.16: Diffraktionsaufnahme eines b-Arrestin-IP₆-Kristalls mit Synchrotronstrahlung: Gezeigt ist eine Aufnahme aus dem Datensatz "2000_88". Die Messung erfolgte an der ESRF in Grenoble an der Beamline ID-14-3. Die Wellenlänge der Synchrotronstrahlung betrug 0,9310 Å. Bei einem Kristall-Detektorabstand von 280 mm wurde der Kristall pro Aufnahme um 1,2° gedreht. Die Aufnahme erfolgte mit einer CCD-Kamera (MAR-Research)

Betrachtet man die Gitterkonstanten der verschiedenen Kristalle (Tabelle 3.7), die mit und ohne IP₆ und HgCl₂ gewachsen waren, so zeigt sich, daß diese Zusätze offenbar keinen signifikanten Einfluß in Bezug auf die generelle Packung der Moleküle im Kristall hat. Dies könnte bedeuten, daß die Isomorphie der Kristalle hoch genug ist, um über die Schwermetallpositionen und "Isomorphen Ersatz" allein die Struktur zu lösen. Es sind zwar im Allgemeinen mindestens zwei verschiedene Schwermetallerivate nötig, um das Phasenproblem eindeutig zu lösen, da aber die zwei Datensätze von Quecksilberderivaten bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden ist eine Verwendung der Daten für die MAD-Methode (Multiple Anomalous Dispersion) möglich.

	nativ 1	nativ2	IP ₆ Hg 1	IP ₆ Hg 2
Datensatz	holy 1	holy 2a	2000_47	2000_88
Synchrotron	DESY-X31	DESY- bw7b	ESRF-bm14	ESRF-ID14.3
Wellenlänge	0,9393 Å	0,8439 Å	0,9999 Å	0,9310 Å
Prozessierungs-software	Denzo / Scalepack	Mosfilm / Scala	Mosfilm / Scala	Denzo / Scalepack
auswertbare Auflösung	4,5 Å	7,0 Å	4,0 Å	4,0 Å
Vollständigkeit der Daten	70 %	98,8%	96,7 %	95,9 %
R_{merge} (<10%)	18,2 %	7,4 %	8,5 %	8,8 %
Vollständigkeit der ano. Daten	---	---	85,5	n.d.
R_{ano}	---	---	5,6 %	n.d.
R_{sym}	n.d.	7,4 %	7,7 %	n.d.
Anzahl der gemessenen Reflexe	28280	8788	43102	49912
Anzahl unabhängiger Reflexe	7112	2694	13595	13488
Gitterkonstanten	a = 75,8 Å	a = 74,7 Å	a = 75,2 Å	a = 75,2 Å
	b = 77,2 Å	b = 76,3 Å	b = 77,1 Å	b = 77,1 Å
	c = 268,9 Å	c = 270,9 Å	c = 271,0 Å	c = 269,7 Å
	α,β,γ=90°	α,β,γ=90°	α,β,γ=90°	α,β,γ=90°

Tabelle 3.7 : Qualitätsparameter der b-Arrestin-Datensätze: Bei dem ersten aufgenommenen Datensatz (holy 1) war die kristallographische Raumgruppe des Kristalls nicht bekannt. Kenntnis hierüber ist aber notwendig um unmittelbar vor der Messung eine Strategie zu entwickeln, um wieviel Grad und von welcher Position beginnend der Kristall während der Datenaufnahme gedreht werden muß, um einen vollständigen Datensatz zu erhalten. Der Kristall wurde "blind" über einen Sektor von 92° vermessen. Hierdurch wurden einige Bereiche "doppelt" gemessen, andere überhaupt nicht. Die gemessenen Kristalle wurden wie folgt gewonnen: holy 1: 3,3% Protein, 720 mM Tartrat, 30 % Glycerin, 100 mM DTT; holy 2a: gleicher Ansatz wie "holy 1"; 2000_47: siehe Legende zu Abbildung. 3.15; 2000_88: gewachsen in: 0,5% Protein, 500 mM Tartrat, 20% Glycerin, 100 mM DTT, 2 mM IP₆, 2 mM HgCl₂; umgesetzt in 800 mM Tartrat, 30% Glycerin, 100 mM DTT; eingefroren im Kryostrom. (Prozessierungssoftware: Otwinowski & Minor, (1997); Leslie, (1991))

3.1.14. Erste kristallographische Charakterisierung der Kristalle

Die Werte für die Gitterkonstanten lassen sich direkt aus einem indizierten Image des Datensatzes mit Hilfe der Abstände der Reflexe zueinander bestimmen. Die Elementarzelle, also die kleinste translationssymmetrische Einheit in einem Kristall, ist ein Parallelepiped, das durch die drei Kantenlängen a, b und c sowie die eingeschlossenen Winkel α , β und γ bestimmt ist. Die Einheitszelle wird gebildet aus asymmetrischen Einheiten, deren Anzahl und Position in der Zelle durch die Symmetrieoperationen der jeweiligen Raumgruppe bestimmt wird. Eine asymmetrische Einheit besteht aus einem oder mehreren Proteinmolekülen (siehe auch Abbildung 2.7).

Für die untersuchten β -Arrestinkristalle wurden folgende Gitterkonstanten bestimmt:

$$a = 75 \text{ \AA}, b = 77 \text{ \AA}, c = 270 \text{ \AA}$$

Die jeweiligen Winkel lagen für die triklin Indizierung eines Images bei ca. 90°. Aufgrund dieser Ergebnisse schieden folgende Kristallklassen von vorne herein aus: Hexagonal und trigonal ($\gamma = 120^\circ$) sowie kubisch ($a = b = c$). Neben der triklinen ($a \neq b \neq c, \alpha \neq \beta \neq \gamma$) und den monoklinen Raumgruppen ($a \neq b \neq c, \alpha = \gamma = 90^\circ \neq \beta$) verblieben noch die orthorhombische Kristallklasse ($a \neq b \neq c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) und die tetragonalen Raumgruppen ($a = b \neq c, \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), da die Längen von a und b sehr dicht beieinander liegen (nach Ducruix & Giegé, 1992).

Mit Hilfe des "Mosflm"-Software kann die kristallographische Raumgruppe genauer ermittelt werden. Diese Methode beruht auf einem Vergleich der Veränderungen, die nötig sind, um die Lage der Reflexe auf dem Detektor in Abhängigkeit von der Meßgeometrie an die, für jede Raumgruppe und Gitterkonstanten theoretisch erwarteten, anzupassen. Die Untersuchung ergab erwartungsgemäß für die trikline und die monoklinen Raumgruppen die besten Ergebnisse, da diese mehr Freiheitsgrade besitzen als die beiden anderen, höheren Symmetrien. Integration (Auswertung) der Daten ergab, daß sich die Übereinstimmung der symmetrieäquivalenten Reflexe durch Erhöhung der Symmetrie von P2 nach P222 nicht signifikant vermindert.

Unter Vorgabe der Gitterkonstanten (genaue Werte siehe Tabelle 3.7) wurden die Reflexe der jeweiligen Datensätze indiziert und integriert. Das orthorhombische System erfordert drei orthogonale kristallographische Achsen, durch die die einzelnen asymmetrischen Einheiten aufeinander abgebildet werden. Ob es sich hierbei um Dreh- oder Schraubenachsen handelt, läßt sich aus dem prozessierten Datensatz erkennen. Die prozessierten Reflexe bilden im reziproken Raum ein punktsymmetrisches dreidimensionales Gitter, wobei die Position eines Reflexes in diesem Gitter durch das Indextripel h, k und l vom Inversionszentrum ausgehend angegeben wird. Die Stärke eines Reflexes ergibt sich aus der resultierenden Amplitude der Interferenzen der am Kristall gebeugten Röntgenstrahlung. In den Schnittebenen durch den Ursprung und $h = 0$ (0kl-Ebene), $k = 0$ (h0k-Ebene) und $l = 0$ (hk0-Ebene) werden die Achsenreflexe sichtbar. Bei Schraubenachsen führen Interferenzeffekte zur Auslöschung bestimmter Achsenreflexe. Bei zweizähligen Schraubenachsen ist jeder Achsenreflex ungeradzähliger Ordnung ausgelöscht.

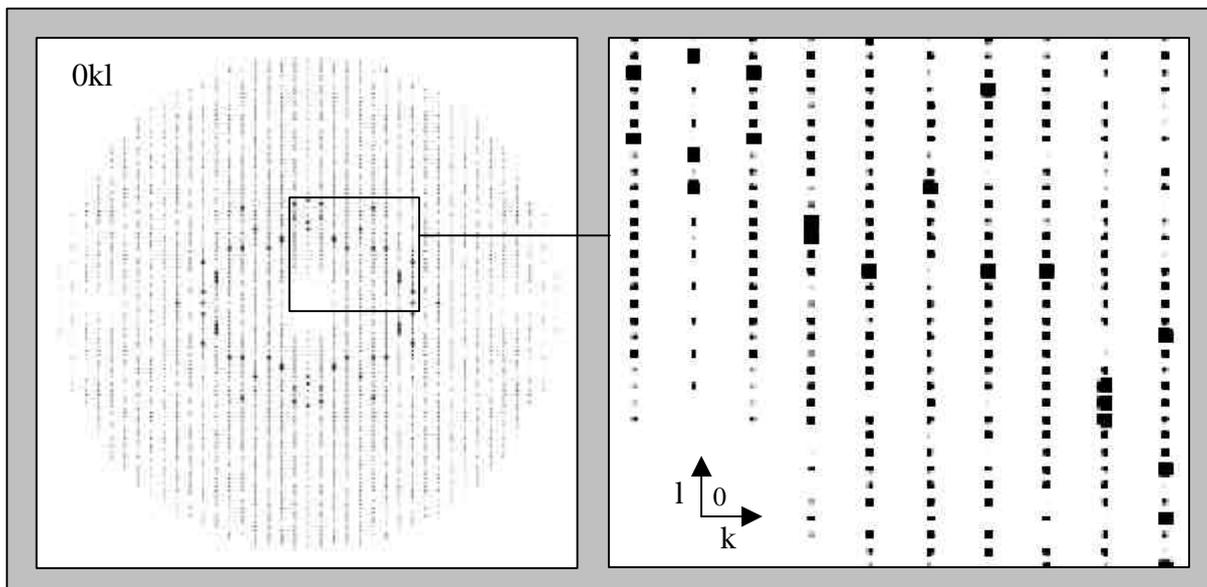


Abbildung 3.17 : Auslöschung der Achsenreflexe: Abgebildet sind die Amplituden der 0kl-Ebene des prozessierten Datensatzes "2000_47". Das Koordinatenkreuz steht im Inversionszentrum des reziproken Raums. Es ist zu erkennen, daß für die l -Achse (00l) und die k -Achse (0k0) jeder Reflex ungeradzähliger Ordnung fehlt bzw. nur sehr schwach ist.

Wie in Abbildung 3.17 zu erkennen, ist sowohl in der l-Achse als auch in der k-Achse jeder ungeradzahlige Reflex ausgelöscht bzw. sehr schwach. Dies bedeutet, daß die kristallographischen Achsen senkrecht zur a/b-Ebene und zur a/c-Ebene in der orthorhombischen Elementarzelle Schraubenachsen sind. Bei Betrachtung der h-Achse war diese Auslöschung nicht vollständig aber dennoch signifikant (nicht gezeigt).

Dies bedeutet, daß die β -Arrestinkristalle der primitiv orthorhombischem Raumgruppe $P2_12_12_1$ (No. 19) zugeordnet werden können. Die Kristalle können beschrieben werden durch:

$$P2_12_12_1 \quad a = 75 \text{ \AA}, b = 77 \text{ \AA}, c = 270 \text{ \AA}$$

3.1.15. Die Asymmetrische Einheit der Kristalle wird aus zwei Molekülen b-Arrestin gebildet

Für die kristallographische Auswertung der gemessenen Datensätze und die Bestimmung der Proteinstruktur ist es von großer Bedeutung zu wissen, aus wie vielen Proteinmolekülen sich die asymmetrische Einheit in der Elementarzelle zusammensetzt. Kenntnis hierüber ist um so wichtiger, da die erreichte, maximal auswertbare Auflösung der gemessenen Daten mit 4,0Å relativ gering ist. Der Gehalt an Solvenz im Kristall ist von Wichtigkeit bei der späteren Prozessierung der Daten und der Strukturbestimmung des Proteins ("solvent flattening").

3.1.15.1. Bestimmung der Kristalldichte und des Solvenzgehaltes

Die Durchführung der Kristall-Dichtebestimmung ist in Abschnitt 2.8.4.1. beschrieben. Es wurden die Dichten von zwei Kristallen (ca. 350 µm Durchmesser; Cystein-Mutante) und der entsprechenden Reservoirlösung (600 mM Tartrat, 20% Glycerin) bestimmt.

	Meßwert [mm]	Dichte [g/cm*3]	Solvenzgehalt	Anzahl / AU
Kristall I	37	1,17977	64,63 %	2,21
Reservoir I	76,5	1,10630		
Kristall II	45	1,15950	74,38 %	1,60
Reservoir II	76,5	1,10630		

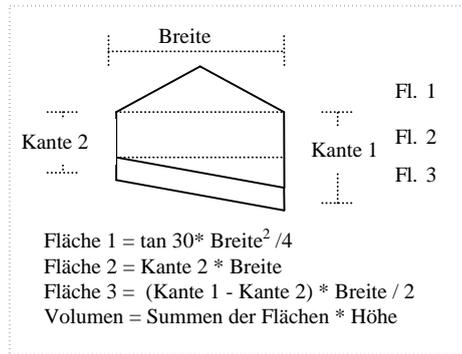
Tabelle 3.8 : Bestimmung von Dichte und Solvenzgehaltes der Kristalle: AU = Asymmetrischer Einheit

Der Solvenzgehalt (G_s) eines Kristalls ergibt aus den Dichten des Kristalls und der Reservoirlösung (ρ_s) als: $G_s = (\rho_K - \rho_P) / (\rho_s - \rho_P)$, wobei $\rho_P = 1,314 \text{ g/cm}^3$ die typische Dichte eines Proteins ist (Matthews, 1968). Bei dieser Dichte nimmt ein Molekül 10HIS- β Arr (4C-S)-Strep mit einem Molekulargewicht von 49820 g/mol ein Volumen von 62950 \AA^3 ein. Das Volumen einer Elementarzelle im Kristall beträgt 1571236 \AA^3 . Bei einem Solvenzgehalt von 64,63 % (Kristall I) steht dem Protein ein Volumen von 35,37 % des Zellvolumens also 555746 \AA^3 zur Verfügung. Mit dem errechneten Volumen eines Proteinmoleküls ergibt sich, daß sich in einer Elementarzelle 8,83 Moleküle befinden. Auf die vier asymmetrischen Einheiten in der orthorhombischen Elementarzelle bezogen bedeutet dies eine Anzahl von 2,2 Molekülen pro asymmetrischer Einheit. Für den zweiten Kristall ergibt sich analog ein Wert von 1,60.

Aus dieser Messung kann geschlossen werden, daß die asymmetrische Einheit in den β -Arrestinkristallen aus zwei Proteinmolekülen gebildet wird. Die Genauigkeit dieser Art der Bestimmung ist allerdings nicht sehr hoch. Während der Messung gaben die Kristalle offenbar langsam Wasser an das organische Lösungsmittel ab und sanken langsam tiefer im Gradienten, wodurch die genaue Bestimmung der Dichte erschwert wird. Darüberhinaus ist die Berechnung abhängig von dem Durchschnittswert für die Proteindichte.

3.1.15.2. Direkte Bestimmung der Proteinmasse im Kristall

Um die gefundenen Werte aus der Dichtebestimmung zu verifizieren, wurde eine Methode entwickelt, die nicht auf Literaturwerten aufbaut. Um die partielle Dichte des Proteins im Kristall zu ermitteln wurden drei Kristalle unter dem Mikroskop mit einem geeichten



Meßokular vermessen und ihr Volumen errechnet. In der Zeichnung links ist die Berechnung des Volumens eines Kristalls beschrieben, der an der Tropfenoberfläche zu einem unvollständigen Hexagon gewachsen ist. Die vermessenen Kristalle (Gesamtvolumen: $8468017 \mu\text{m}^3$) wurden mit Mercurochrom angefärbt, zwei mal in Reservoirpuffer gewaschen und in 4M Harnstoff / 10% SDS ($28 \mu\text{l}$ Endvolumen) bis zur vollständigen Auflösung bei 95° inkubiert.

Die Masse des in den aufgelösten Kristallen enthaltenen Proteins wurde mittels SDS-PAGE densitometrisch bestimmt. Aus einer β -Arrestin Eichlösung ($29,73 \mu\text{g/ml}$ 10HIS- β Arr(4C-S)-Strep), deren Konzentration UV-spektrometrisch und durch Bradford-Protein-Bestimmung exakt bestimmt wurde, wurde eine Eichreihe auf ein SDS-PAGE-Gel zusammen mit definierten Volumina der aufgelösten Kristalle aufgetragen. Das Coomassie-gefärbte Gel wurde als Computerdatei in 256 Graustufen "eingescannt". Hierbei ist darauf zu achten, daß die Helligkeit des Bildes beim "Scan"-Vorgang so hoch ist, daß keine Sättigung eintritt. In einer konstanten Meßfläche wurde die Verteilung der einzelnen Graustufen der einzelnen Proteinbanden mit der "Photoshop 5.0"-Software (Adobe) bestimmt (siehe Abbildung 3.18). Der gewichtete Mittelwert (\bar{X}) dieses Summenhistogramms korreliert direkt mit der Proteinmenge innerhalb der Meßfläche (bzw. der Proteinbande).

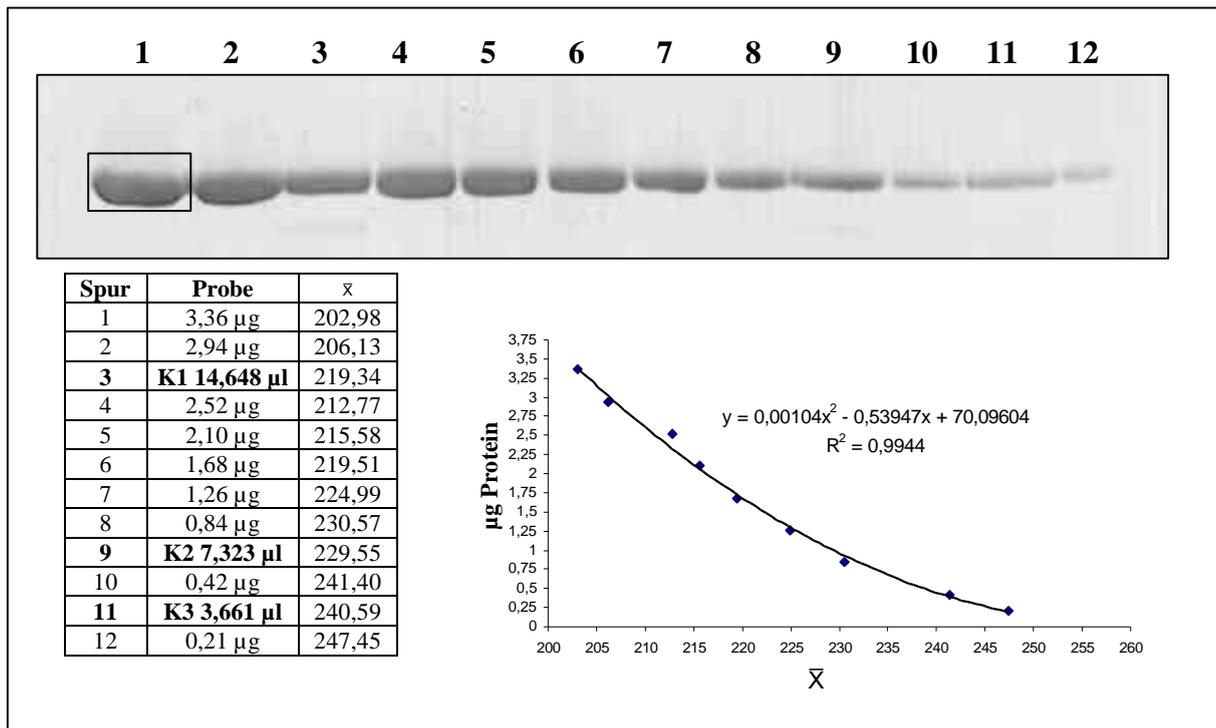


Abbildung 3.18 : Densitometrische Proteinbestimmung von Kristallen: Erläuterung siehe Text

Anhand der Eichkurve konnte die Masse des, in den "Kristallproben" K1 bis K3 enthaltenen, Proteins bestimmt werden. ($K1 \cong 1,803 \mu\text{g}$, $K2 \cong 1,062 \mu\text{g}$, $K3 \cong 0,504 \mu\text{g}$). Bezogen auf die eingesetzten Volumina und das Gesamtvolumen der Probe von $28 \mu\text{m}$ ergibt sich, daß die drei Kristalle (Volumen: $8,468017 \text{ E}18 \text{ \AA}^3$) $3,7895 \mu\text{g}$ oder $7,606 \text{ E-}11 \text{ mol}$ Protein enthalten haben. Aus dem Kristallvolumen läßt sich die Anzahl der darin enthaltenen Elementarzellen auf $5,62 \text{ E}12$ oder $0,933 \text{ E-}11 \text{ mol}$ bestimmen. Somit beinhaltet eine Elementarzelle $8,15$ Moleküle β -Arrestin. Für die orthorhombische Raumgruppe ergibt sich hieraus eine rechnerische Anzahl von $2,03$ Molekülen β -Arrestin pro asymmetrischer Einheit. Dieses Ergebniss wurde in einem weiteren Experiment dieser Art bestätigt.

Mit zwei Molekülen 10HIS- β Arr (4C-S)-Strep pro asymmetrischer Einheit ergibt sich ein Solvenzgehalt von $68,7 \%$.

3.1.16. Weitere Auswertung des Datensätze und Ermittlung der dreidimensionalen Proteinstruktur

Die weiteren Untersuchungen zur Stukturterminierung des β -Arrestinmoleküls sind momentan Gegenstand der aktuellen Arbeiten von Dr. Jörg Labahn in unserer Arbeitsgruppe. Ansätze zur Lösung der Struktur liegen sowohl im "Molekularen Ersatz" mit Hilfe der Arrestinstruktur aber auch in der Verwendung der Quecksilberderivat-Datensätze über die Methode des "Isomorphen Ersatzes" und der "Multiplen anormalen Dispersion". Erkenntnisse aus diesen Arbeiten werden im Diskussionsteil dieser Arbeit vorgestellt und erörtert.

3.2. Heterologe Expression und Kristallisation von PAR-4

Mit der Bearbeitung des PAR-4-Projekts wurde zu einem Zeitpunkt begonnen, als die Methoden zu Expression, Isolierung und Kristallisation von β -Arrestin bereits etabliert worden waren und erste kristallographische Ergebnisse aus dem β -Arrestin-Projekt vorlagen. Es galt zu evaluieren, in wie weit PAR-4 in *S.cerevisiae* oder *E.coli* in großen Mengen exprimiert und isoliert werden kann. Ziel war die Kristallisation des Proteins und die Determinierung der dreidimensionalen Struktur.

3.2.1. Expression von PAR-4 in *S.cerevisiae*

Zunächst wurde der codierende Bereich des *Rattus norvegicus* PAR-4 Gens (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. K.H. Scheidtmann, Universität Bonn) durch PCR mit einem N-terminalen bzw. C-terminalen StrepTag II versehen und in den Hefe Expressionsvektor pYEX BX kloniert. Nach einer ersten Evaluierung der Expression wurden zudem "Doppeltag"-Konstrukte mit StrepTag II und 6HIS-Tag hergestellt.

Produkt (Protein)	Primer	Sites (durch PCR)	Plasmid pCR-Blunt / pYEX-BX
Strep-PAR-4	Strep Par4 / Par4 STOP	Pst I / -	010999 E3 / 070999 B1
PAR-4-Strep	START Par4 / Par4 Strep	Pst I / -	300699 C7 / 140899 B1
PAR-4-6HIS	START Par4 / PAR4 his REV Eco	Pst I / Eco RI	010999 D1 / 070999 A1
6HIS-PAR-4	PAR4 his FOR Sal/ Par4 STOP	Sal I / -	--- / 070999 D1
Strep-PAR-4-6HIS	Strep Par4 / PAR4 his REV Eco	Pst I / Eco RI	070999 E1 / 090999 C1
6HIS-Par-4-Strep	PAR4 his FOR Sal / Par4 Strep	Sal I / -	--- / 070999 C1
PAR-4 (ohne Tag)	START Par4 / Par4 STOP	Pst I / -	300699 A1 / 140899A2

Tabelle 3.9 : PAR-4 Konstrukte in pYEX BX: Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch Standardmethoden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert (DH5 α , XL1 blue oder TOP 10) und sequenziert. Für die PCR wurden dem Ansatz 10% DMSO zugegeben, da aufgrund des hohen GC-Gehaltes des PAR-4 Gens anders kein PCR-Produkt zu erhalten war. Die Umklonierung in pYEX BX erfolgte über die Pst I bzw. Sal I Schnittstelle des PCR-Produkts und der Eco RI Schnittstelle des Vektors pCR-Blunt. Aufgrund der Tatsache, daß die entsprechenden PCR-Produkte Sequenzfehler aufwiesen, erfolgte die Herstellung von 070999 D1 und 070999 C1 aus bereits vorhandenen anderen pYEX BX-Konstrukten über die Pst I bzw. Eco RI Schnittstelle des Vektors und der gen-internen Bgl II Schnittstelle (siehe auch Legende zu Tabelle 3.3). Alle Konstrukte in pYEX BX wurden durch Sequenzierung überprüft. Die pYEX BX-Konstrukte wurden in den Stamm F11 α transformiert.

3.2.1.1. PAR-4 wird in *S.cerevisiae* exprimiert

Erste Expressionsstudien der hergestellten Hefeklone zeigten, daß alle Konstrukte exprimiert werden. Der Nachweis erfolgte durch Westernblotanalyse von Zellysaten einer 10ml-Expressionskultur. Die Expressionsbedingungen entsprachen denen von β -Arrestin (Abschnitt 2.3.2.). Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist, werden die verschiedenen PAR-4 Konstrukte exprimiert. Auffällig sind die detektierten Abbauprodukte. Da die pelletierten Zellen in Probenpuffer bei 95°C (inkl. Glassbeads) aufgeschlossen wurden, ist zu vermuten, daß die Degradation bereits während der Expressionsphase in den Zellen stattgefunden hat. Es fällt auf, daß das detektierte Protein ein apparentes Molekulargewicht von ca. 50 kDa aufweist, anstelle der erwarteten 37 kDa. Ob dieser "Shift" durch posttranslationale Modifikation in Form von Phosphorylierung oder Glykosylierung bedingt ist, konnte zunächst nicht geklärt werden. Eine erneute Sequenzierung des Plasmids ergab allerdings, daß das offene Leseraster des PAR-4-Gens die korrekte Größe aufweist.

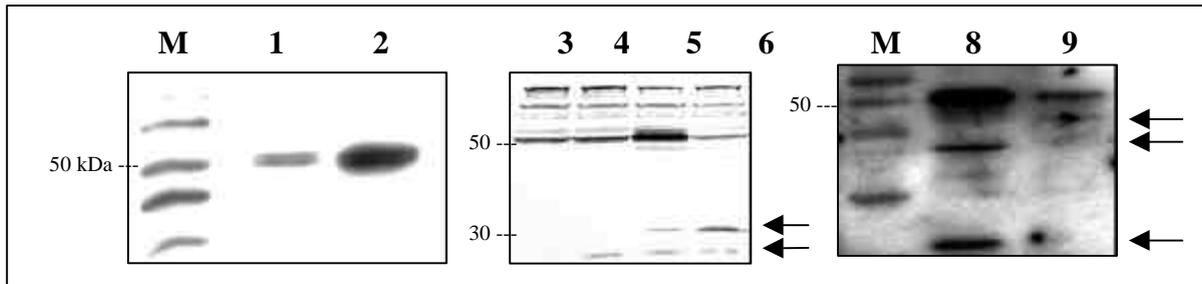


Abbildung 3.19 : Expression von PAR-4 in *S. cerevisiae*: Exemplarisch dargestellt sind die Ergebnisse der Westernblotanalyse von Gesamtzellextrakten verschiedener pYEX BX-Konstrukte in F11 α . **α -HIS:** 1. 070999 C1 (HIS-Par4-Strep), 2. 070999 D1 (HIS-Par4), **α -Strep:** 3. 070999 A1 (Par4-HIS), 4. 070999 B1 (Strep-Par4), 5. 070999 C1 (HIS-Par4-Strep), 6. 140899 D1 (Par4-Strep), **α -PAR-4:** 8. 070999 C1 (HIS-Par4-Strep) 9. 070999 B1 (Strep-Par4). Die Durchführung erfolgte, wie bereits beschrieben. Abbaubanden sind durch Pfeile markiert. Die Signale im α -Strep-Blot oberhalb von 50 kDa repräsentieren bereits bekannte Kreuzreaktionen des SA-AP-Konjugats mit Hefeproteinen. Für die entsprechenden Signale im α -PAR4-Blot ist ähnliches zu vermuten. Es könnte sich hierbei aber auch um Aggregate von PAR-4 handeln.

3.2.1.2. Reinigung von 6HIS-PAR-4-Strep aus *S. cerevisiae*

Erste Versuche mit geringen Kulturvolumina hatten gezeigt, daß ein geringer Teil des exprimierten PAR-4 löslich ist. Es wurde daher versucht, größere Mengen an exprimiertem PAR-4 mittels IMAC zu reinigen.

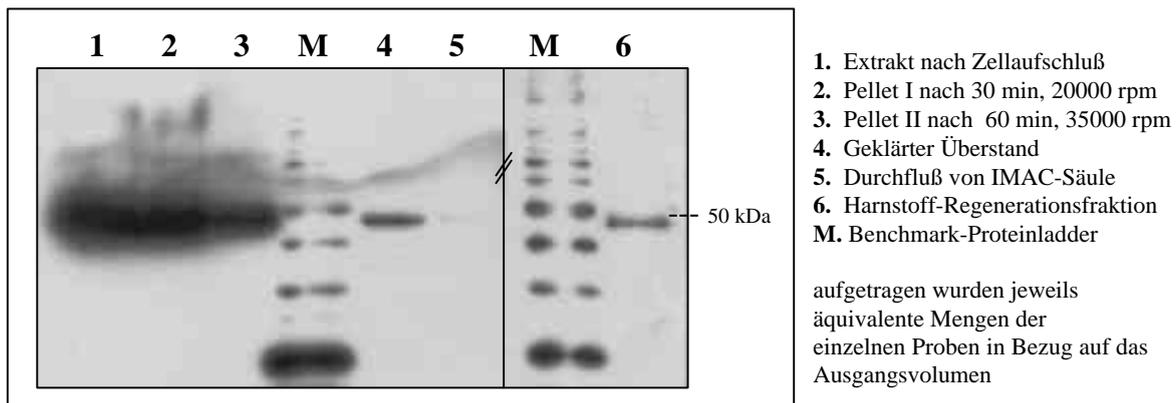


Abbildung 3.20 : IMAC-Reinigung von PAR-4: (Westernblot) Kulturen von F11 α - 070999 C1 (HIS-Par4-Strep) in wurden bei einer OD₆₀₀ von 3 induziert und nach vier Stunden geerntet. Fünf Gramm Zellen wurden in der French-Press mit 50 ml Aufschlußpuffer (200 mM NaCl, 3 mM Imidazol, 50 mM Tris pH 8,0 inkl. Proteaseinhibitoren) aufgeschlossen und gereinigt, wie in Abschnitt 2.3.3. beschrieben. Die IMAC-Säule wurde mit Cu²⁺-Ionen beladen. Waschpuffer I: 100 ml Aufschlußpuffer; Waschpuffer II: Aufschlußpuffer inkl. 10 mM Imidazol; Elutionspuffer: Aufschlußpuffer inkl. 100 mM Imidazol. Die Detektion von PAR-4 erfolgte mit α -HIS-Konjugat und Chemolumineszenz.

Anders als bei der Expression von β -Arrestin wuchsen die PAR-4 Expressionskulturen nach Induktion nicht weiter. Das Wachstum der PAR-4-Expressionskulturen nach Induktion bei OD₆₀₀ von 3 stagnierte, während sich die Zelldichte in β -Arrestin-Kulturen, die bei einer OD₆₀₀ von 5 induziert wurden, während der Expressionsphase von 5 Stunden verdoppelte. Dies könnte ein Hinweis auf Toxizität oder apoptotische Wirkung von PAR-4 auf *S. cerevisiae* sein.

Wie in Abbildung 3.20 klar zu erkennen ist, liegt in dem verwendeten Aufschlußpuffer das PAR-4-Protein in unlöslicher Form vor. Die geringe Menge an löslichem Protein fällt auf der Säule aus und ist nur mit 8M Harnstoff wieder in Lösung zu bringen. In den Wasch- und Eluatfraktionen konnte kein Protein nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt, wenn der Zellaufschluß mit 200 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) oder 200 mM Tartratpuffer (pH 8,0) durchgeführt wurde.

Um auszuschließen, daß das Protein während des Zellaufschlusses oxidiert wird, wurden Reinigungsversuche unter reduzierenden Bedingungen (50 mM DTT) über die Strep-Tactin-Säule durchgeführt. Auch hier zeigte sich, daß ein geringer Anteil des Proteins zunächst löslich bleibt, später allerdings auf der Säule präzipitiert.

Das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein erhöhte sich mit der Konzentration an Hefecytosol im Zellysat. Da der pH-Wert des Lysats unabhängig von dem Verhältnis von Zellen zu Aufschlußpuffer stabil blieb (50 mM Tris pH 8,0), wurde vermutet, daß das Protein in den Zellen mit einem Faktor interagiert, der das PAR-4 stabilisiert und in Lösung hält. Während des Zellaufschlusses wird dieser Faktor verdünnt, wodurch ein großer Teil des Proteins ausfällt. Der verbleibende lösliche Anteil an Protein präzipitiert, sobald der Faktor während der Waschkritte weiter verdünnt wird. Ob es sich bei dieser Komponente um einen niedermolekularen Stoff oder ein anderes Protein handelt blieb vorläufig ungeklärt. Möglicherweise ist dieser Effekt jedoch auch einfach auf Umgebungsbedingungen wie Ionenstärke, Temperatur etc. zurückzuführen.

3.2.2.3. Sekretion von PAR-4 ins Kulturmedium

Parallel zu den Expressionsstudien mit dem Vektor pYEX BX wurde versucht, PAR-4 mit Hilfe der Vektoren pYEX BX SS und pYEX BX SSB von den Hefen ins Kulturmedium sekretieren zu lassen. Eine Beschreibung der Vektoren befindet sich in Abschnitt 3.1.5.1. Um die Potenz des Sekretionssystems für PAR-4 zu evaluieren, wurde zunächst darauf verzichtet mit neuen Primern ein Konstrukt zu erstellen, welches die Expression und Sekretion eines muren Proteins ohne zusätzliche Aminosäuren ermöglicht (siehe Abschnitt 3.1.). Statt dessen wurden die bereits vorhandenen PAR-4-Doppeltag-Konstrukte im Leseraster der Signalsequenz von pYEX BX SS und pYEX BX SSB kloniert. Das PAR-4-Gen aus Klon 090999 A1 (Strep-Par-HIS in pYEX BX) wurde über Sal I und Eco RI in den entsprechend vorbereiteten Vektor pYEX BX SS kloniert. Das Sal I / Eco RI Insert aus 070999 C1 (HIS-Par-Strep in pYEX BX) wurde in pYEX BX SSB kloniert. Die resultierenden Plasmide (Abbildung 3.21) wurden in F11 α transformiert.

Plasmid 011099 A1 (9AS+Strep-Par-HIS in pYEX BX SS)	
AAA AGG	CCC GGG ATC CGC AGC TGT CGA CTG CAG ATG Strep-Par-HIS
Lys Arg	Pro Gly Ile Arg Ser Cys Arg Leu Gln Met
Plasmid 011099 B1 (8AS+ HIS-Par-Strep in pYEX BX SSB)	
AAA AGG	CCC GGG AGA TCC GCA GCT GTC GAC ATG HIS-Par4-Strep
Lys Arg	Pro Gly Arg Ser Ala Ala Val Asp Met

Abbildung 3.21 : DNA-Konstrukte zur Sekretion von PAR-4 ins Kulturmedium: Dargestellt sind die entstehenden N-Termini der PAR-4 Proteine nach Klonierung und Prozessierung durch KEX2. Die Schnittstelle für die KEX2-Protease (Strich) und Sal I (fett) sind gekennzeichnet.

Expression im kleinem Maßstab zeigten, daß PAR-4 ins Medium sekretiert wird (Abbildung 3.22). Vier Stunden nach Induktion war im Medium kein Protein nachweisbar (nicht gezeigt). Nach 20 Stunden ließ sich PAR-4 im Medium durch Westernblot als Doppelbande bei 52 kDa und 55 kDa nachweisen. Der Großteil des Proteins befand sich allerdings nach wie vor in den Zellen (vergl. Expositionszeiten in Abb. 3.23), wobei es auch hier als Doppelbande detektiert wurde. Das 55 kDa-Signal kann dem unprozessierten PAR-4 zugeordnet werden. Die 52 kDa-Bande entspricht offenbar dem prozessierten Protein, da diese Bande ebenfalls im α -Strep-Westernblot nachgewiesen werden konnte, die Integrität des C-Terminus damit also bestätigt

wurde (nicht gezeigt). Die Versuche zeigen, daß PAR-4 von den Hefen ins Kulturmedium segregiert wird, wobei die segregierte Menge sehr gering ist im Vergleich zu dem Anteil, der in den Zellen verbleibt. Der Versuch wurde mit ähnlichem Ergebnis im fünf Liter Maßstab reproduziert. Der zu betreibende Aufwand, um für die Kristallisation ausreichende Proteinmengen aus dem Medium zu isolieren ist allerdings deutlich zu hoch. Auf weitere Untersuchungen mit diesem Sekretionssystem wurde von daher verzichtet.

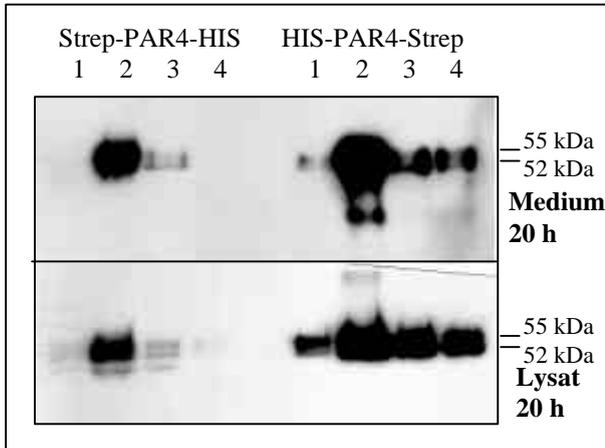


Abbildung 3.22 : Segregation von PAR-4 ins Kulturmedium: (Westernblot) 12 ml Kulturen von je vier verschiedenen Hefetransformanten (1 bis 4) wurden bei einer $OD_{600} = 3$ induziert. Nach 4 und nach 20 Stunden wurden 4 ml Kultur entnommen, abzentrifugiert und das Medium im Konzentrat (10 kDa Trenngrenze) auf 300 μ l reduziert. Das Äquivalent von 225 μ l Medium wurde in Probenpuffer auf das Gel aufgetragen. Nach 20 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (4 ml), mit Probenpuffer aufgeschlossen und analysiert. (225 μ l-Äquivalent). Der Nachweis von PAR-4 erfolgte mit α -HIS-Konjugat und Chemolumineszenz. Expositionszeit: oben 2 min, unten 5 sek, "4h-Proben" : 2 Stunden (nicht gezeigt)

Die Beobachtung, daß das apparente Molekulargewicht von PAR-4 in der SDS-PAGE mit 50 bis 55 kDa deutlich über dem kalkulierten Wert von 38 kDa liegt deutet, wie bereits erwähnt, auf posttranslationale Modifikation hin. Derartige Modifikationen in Form von Glykosylierungen und/oder Phosphorylierungen können aufgrund der durch sie verursachten Mikroheterogenität die Kristallisation des Proteins stören oder sogar vereiteln. Aus diesem Grunde sowie der Tatsache, daß das aus *S.cerevisiae* isolierte Protein instabil war, wurden zunächst keine weiteren Experimente mit dem Hefeexpressionssystem durchgeführt. Statt dessen wurde versucht, PAR-4 in *E. coli* zu exprimieren.

3.2.3. Expression von PAR-4 in *E. coli*

Die Expression heterologer Proteine in *E.coli* bietet einige Vorteile. Die Kultivierung der Zellen ist unkompliziert und liefert in kurzer Zeit viel Biomasse. Darüber hinaus stehen für *E.coli* viele etablierte Methoden und kommerziell erhältliche Expressionssysteme zur Verfügung. In Bezug auf die spätere Kristallisation der zu exprimierenden Proteine bietet *E.coli* den Vorteil fehlender posttranslationaler Modifikationen wie Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Disulfidbrücken. Gleichzeitig kann diese Tatsache aber auch dazu führen, daß in *E.coli* exprimiertes eukaryotisches Protein nicht richtig gefaltet wird und aufgrund der extrem hohen Expressionsraten in *E. coli* als unlösliche "inclusion bodies" ausfällt, da die Löslichkeitsgrenze für dieses Protein überschritten wird (Mitraki & King, 1989).

3.2.3.1. Das pET 11a Expressions-System in Verbindung mit *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)

Das pET Expressionssystem ermöglicht Expressionsraten von xenogenem Protein in *E. coli* bis zu einem Gehalt von 50 % des Gesamtproteins. Ermöglicht werden diese Raten durch Verwendung der höchst selektiven und aktiven T7-RNA-Polymerase. Zu exprimierende Gene werden in pET-Vektoren (Studier & Moffatt 1986, Rosenberg et al., 1987) unter die Kontrolle der Transkriptions- und Translationssignale des Bakteriophagen T7 gestellt. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase sowie die regulatorisch wirkenden Komponenten des Systems sind im Genom des entsprechenden *E.coli* Expressionsstammes codiert. Für die Expression von PAR-4 wurde der pET 11a-Vektor in Verbindung mit dem *E.coli* Stamm BL21-CodonPlus (DE3) verwendet. Das zu exprimierende Gen wird in pET11a hinter den T7lac-Promotor und die hoch effiziente Ribosom-Bindestelle des T7 Capsidproteins kloniert. BL21-CodonPlus (DE3) (Weiner et al., 1994) ist ein Lysogen des Bakteriophagen λ DE3 und enthält in seinem Genom ein DNA Fragment, welches das lacI-Gen, den lacUV5 Promotor und das Gen für die T7 RNA-Polymerase beinhaltet. Durch die gewählte Anordnung und Verteilung der einzelnen Elemente ist eine präzise Regulation und Induktion der Expression möglich. Das heterologe Gen in pET11a wird ausschließlich von der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Basistranskription wird zusätzlich durch den lac-Repressor am T7lac-Promotor inhibiert. Die Transkription des Polymerase-Gens im Genom, die ebenfalls durch den lac-Repressor verhindert wird, kann durch Zugabe von IPTG gezielt induziert werden. Hierdurch wird die Expression von Genen möglich, die einen toxischen Einfluß auf die Wirtszellen haben. Der Stamm BL21-CodonPlus (DE3) zeichnet sich durch weitere Eigenschaften aus, die die heterologe Expression von eukaryotischen Proteinen erleichtert. Den BL21-Stämmen fehlen die Gene für die lon-Protease und die ompT-Protease, die Protein während der Reinigung degradieren können (Grodberg & Dunn, 1988). Durch die Rifampicin-Sensitivität der BL-Stämme ist es möglich, die bakterielle RNA-Polymerase zu inhibieren und so die Hintergrund-Transkription von bakteriellen Genen zu vermindern. Überdies enthält BL21-CodonPlus (DE3) zusätzliche Kopien der argU- (AGA, AGG), ileY- (AUA) und leuW-tRNA (CUA), die eine effiziente Expression eukaryotischer Proteine erleichtert, die in anderen BL-Stämmen nur schlecht exprimierbar sind.

3.2.3.2. Klonierung von PAR-4 in pET 11a

Erste Arbeiten mit dem *E.coli* System, wie die Klonierung des PAR-4 Gens in pET11a sowie erste Expressionsversuche, wurden zusammen mit Darko Skegro im Rahmen eines Universitätspraktikums durchgeführt. Zunächst wurde das 6HIS-PAR4-Strep-Gen in pET 11a kloniert. Die kodierenden Sequenzen von Plasmid 070999 C1 (HIS-Par-Strep in pYEX BX) wurden mit Sal I und Eco RI aus dem Vektor pYEX BX geschnitten und die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Parallel hierzu wurde pET 11a-Vektor DNA mit Nde I geschnitten, ebenfalls durch Klenow-Polymerase aufgefüllt und dephosphoryliert. Vektor und Insert-DNA wurden ligiert und in *E.coli* TOP10 Zellen transformiert. Dieses Vorgehen brachte das PAR-4 Gen nahe hinter die T7-Ribosomen-Bindestelle (RBS) des Vektors, ohne zwischen RBS und Genanfang ein falsches ATG-Startsignal zu generieren, was einen Verlust des Leserasters von PAR-4 zur Folge gehabt hätte. Mehrere Klone dieser Ligation wurden durch Restriktion auf die richtige Orientierung des Inserts im Vektor kontrolliert und sequenziert. Hierbei konnten die Klone 091199 A4, 091199 A17 und 091199 A18 bestätigt werden.

3.2.3.3. PAR-4 wird in *E.coli* effizient exprimiert

Die erstellten Konstrukte wurden in *E.coli* B121-CodonPlus transformiert. Erste Studien zeigten, daß das Protein in voller Länge und hohen Mengen exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich aber auch, daß die Expressionsrate auch unter Selektionsdruck mit dem Alter der Startkolonie zurückgeht, da offenbar das Plasmid verändert wird und diese Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber Zellen besitzen, die PAR-4 exprimieren. In weiteren Versuchen wurde daher mit frisch transformierten Zellen gearbeitet.

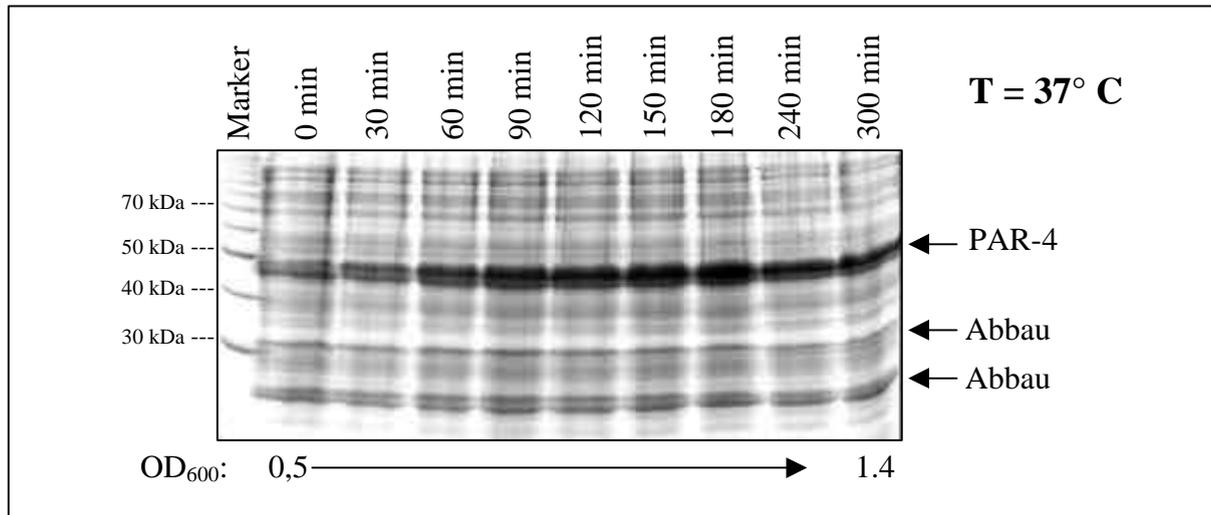


Abbildung 3.23 : Expression von PAR-4 in *E.coli*: Mehrere Kolonien frisch transformierter *E.coli* -Zellen wurden in 500 ml dYT_{amp}-Medium bei 37°C bis zu OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (zusätzlich weitere 100µg/ml Ampicillin). Nach jeweils 30 min wurden 1,5 ml-Aliquots entnommen, abzentrifugiert und in 100 µl Probenpuffer gekocht. Hiervon wurden 20µl (für t=0) auf das SDS-PAGE Gel (12%) aufgetragen. Die anderen Proben wurden in ihren Volumina auf die jeweilige OD₆₀₀ der Kultur bei t=0 skaliert.

Wie in Abbildung 3.23 zu erkennen ist, nimmt der Gehalt an exprimierten PAR-4 nach der Induktion stetig zu bis nach ca. 3,5 bis 4 Stunden eine Sättigung eintritt. Durch weitere Inkubation wird aber der Anteil an bakteriellem Protein im Verhältnis zur Zellzahl geringer wodurch der Anteil an PAR-4 am Gesamtprotein weiter steigt. Westernblotanalysen zeigten, daß sich der relative Anteil an PAR-4-Abbauprodukten mit der Zeit vermindert (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurde die Induktionsdauer, wenn möglich auf sechs bis acht Stunden ausgeweitet. Die Probe (t=0 min) zeigt, daß auch ohne Induktion durch IPTG eine gewisse Expression an PAR-4 vorliegt (bestätigt durch Westernblot, Ergebnis nicht gezeigt). Da PAR-4 aber offenbar nicht toxisch auf die *E.coli* Zellen wirkt, wurden keine weiteren Versuche unternommen, die Expression vor der eigentlichen Induktion, etwa durch Zugabe von Glukose zum Kulturmedium, zu reprimieren. Die Zellen teilen sich auch unter Induktionsbedingungen weiter (OD₆₀₀ verdreifacht sich fast über fünf Stunden). Versuche bei einer Inkubationstemperatur von 25°C änderten das Wachstumsverhalten und die Expressionsraten nicht wesentlich.

Auffällig ist das apparente Molekulargewicht des exprimierten Proteins. Dieses liegt mit ca. 48 kDa immer noch weit über dem errechneten Molekulargewicht von 38 kDa (52 kDa bei den Expressionsversuchen mit *S. cerevisiae*). Dies läßt rückblickend den Schluß zu, daß das PAR-4 in den Hefezellen tatsächlich posttranslational modifiziert wurde (siehe hierzu auch Abbildung 3.26).

3.2.3.4. Erhöhung der Stabilität des exprimierten PAR-4

Eine Fraktionsanalyse der Zellextrakte zeigte, daß der lösliche Anteil des exprimierten Proteins nach dem Zellaufschluß bei ca. 20 % lag. Analog zu den Ergebnissen der Expression in *S. cerevisiae* stieg der relative Anteil des löslichen PAR-4 umgekehrt proportional zur Menge an Zellaufschlußpuffer. Reinigungen über IMAC und Strep-Tactin lieferten ähnliche Ergebnisse, wie bei der Hefeexpression (siehe Abschnitt 3.2.). Das in der cytosolischen Umgebung im Zellysats noch lösliche Protein fällt während der Reinigung auf der Säule aus. *E.coli* bietet gegenüber Hefen den Vorteil, daß die Zellen mit geringen Aufwand, auch in kleinem Maßstab, mit der Ultraschallnadel effizient und reproduzierbar aufgeschlossen werden können, was eine systematische Evaluierung des optimalen Aufschlußpuffers ermöglicht. Zwei Liter einer Expressionskultur wurden in 50 ml-Aliquots zentrifugiert und als Pellets bei -70°C eingefroren. Mit diesen Zellen wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Aufschlußbedingungen durchgeführt. Unter standardisierten Bedingungen wurden die Zellen aufgeschlossen, mittels Ultrazentrifugation in Pellet- und Überstandsfraction getrennt, und durch SDS-PAGE analysiert.

Eine Versuchsreihe mit Aufschlußpuffer (400mM NaCl, 50 mM Tris, 5% Glycerin, 20mM DTT) bei verschiedenen pH-Werten (fünf Stufen von pH 6,3 bis 8,3) ergab, gemessen an der Menge an löslichen Proteins im Überstand, einen optimalen pH-Wert von 7,3 (Abbildung 3.24 rechts), wobei sich nach wie vor ca. 50% des Proteins in der Pelletfraktion befanden. Tartrat- und Phosphatpuffer schienen die Löslichkeit von PAR-4 im Vergleich zu NaCl zu vermindern.

Einen signifikanten Einfluß auf die Löslichkeit des Proteins hatte die Zugabe von CaCl₂, MgCl₂ bzw. EDTA zum Aufschlußpuffer.

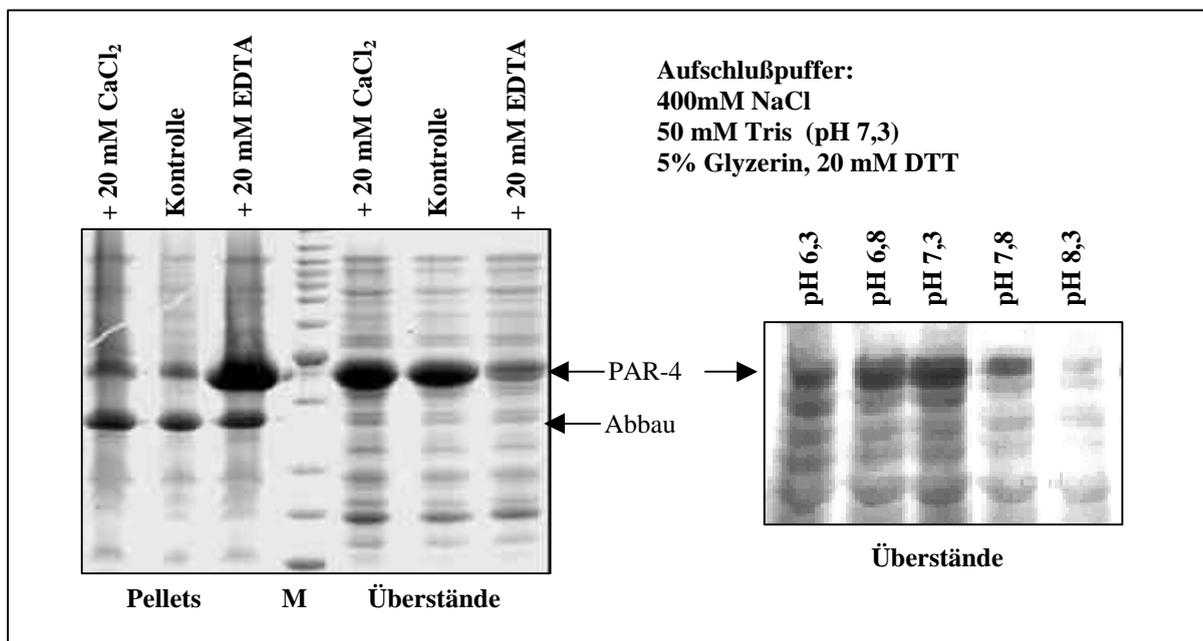


Abbildung 3.24 : Optimierung der Zellaufschlußbedingungen: Zellen, äquivalent zu 50 ml Kultur, wurden in den oben genannten Puffern (1 ml) resuspendiert und auf Eis drei mal für 30 sek. mit der Ultraschallnadel aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile werden durch 10 minütige Zentrifugation bei 100.000 g abgetrennt. Aliquots von Pellet- und Überstandsfractionen wurden durch SDS-PAGE untersucht.

Wie in Abbildung 3.24 deutlich zu erkennen ist, vermindert die Zugabe von EDTA zum Aufschlußpuffer die Löslichkeit von PAR-4 erheblich. Das Protein befindet sich fast vollständig in der Pelletfraktion. Da EDTA zweiwertige Kationen chelatiert, deutet dies darauf hin, dass diese Kationen für die Stabilität und Löslichkeit von PAR-4 bedeutsam sind. Ein positiver Einfluß von Calcium läßt sich aus der Abbildung nicht direkt erkennen, wird aber deutlich, wenn eine IMAC-Reinigung mit diesem Puffer durchgeführt wird. Obwohl nach wie vor größere Mengen Protein auf der Säule ausfielen, konnten durch Anwesenheit von 20 mM CaCl_2 während der gesamten Reinigung größere Mengen reinen löslichen Proteins gewonnen werden. Eine Computer-Sequenzanalyse des Proteins mit der „Protein-Database“ ergab, daß PAR-4 keine klar definierten Calcium-Bindungsstellen besitzt. Mit 20 mM Magnesiumchlorid konnte der gleiche Effekt auf die Stabilität von PAR-4 beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob Calcium bzw. Magnesium in hohen Konzentrationen (20 mM) den Verlust anderer Spurenelementsalze kompensiert, wurden analoge Untersuchungen mit 2 mM Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ und Cd^{2+} durchgeführt, ohne allerdings den stabilisierenden Effekt reproduzieren zu können. Zusätze von 10 mM Leucin oder 10% Isopropanol erhöhten die Ausbeuten ebenfalls nicht. Zusätze von 0,5% und 1% NP40 als Detergenz erhöhten jedoch die Ausbeuten an löslichem Protein.

3.2.4. Isolierung von PAR-4 aus *E.coli*

Durch Zugabe von 20 mM Calcium und/oder Magnesiumionen zum Aufschlußpuffer (400 mM bzw. 200 mM NaCl, 5% Glycerin, 50 mM bzw. 20 mM Tris pH 7,2; 20 mM DTT bei StrepTactin-Säule) war es möglich, Quantitäten an PAR-4 zu isolieren, die Kristallisationsstudien ermöglichen. Die Reinigung erfolgte sowohl mittels IMAC als auch mit der Strep-Tactin-Sepharose. Das gereinigte Protein ließ sich bis 5 mg/ml konzentrieren, zeigte aber eine Tendenz zur Präzipitation. Ca. 50 % des löslichen Proteins aus dem geklärten Zellysate fielen nach wie vor während der Reinigung auf der Säule aus (unabhängig, ob IMAC- oder Strep-Säule) und waren zunächst nur durch Denaturierung mit 8M Harnstoff in Lösung zu bringen. Das ausgefallene Protein ließ sich aber auch durch Waschen der Säule mit 200 mM NaAc bei pH 4,2 lösen und eluierte dann als scharfer Peak und mit 90%iger Reinheit. Dieses Protein konnte bis 15 mg/ml konzentriert werden. Ob PAR-4 bei diesem pH-Wert noch nativ gefaltet ist, kann allerdings bezweifelt werden. Darüber hinaus ist eine reguläre affinitätschromatographische Reinigung bei diesem pH-Wert nicht durchführbar. Wurde der Zellaufschluß und die gesamte Aufreinigung mit 200 mM MgCl_2 durchgeführt, konnte fast das gesamte exprimierte Protein in löslicher Form aus den Zellen isoliert und konzentriert werden. Offenbar ist der stabilisierende Effekt zweiwertiger Kationen konzentrationsabhängig. Aus der Abbildung 3.25 ist klar zu erkennen, daß das in den Bakterien exprimierte Protein fast quantitativ isoliert werden konnte. Hierzu waren allerdings zwei Reinigungsschritte notwendig, da die Bindungskapazität der Säule überschritten wurde (Spuren 3 und 4). Die hohe Löslichkeit und Stabilität des Proteins in 200 mM MgCl_2 / 20 mM Tris pH 7,28 wird auch durch die geringen Proteinmengen im Pellet (Spur1) und in der Harnstofffraktion (Spur6) verdeutlicht. Es konnten Ausbeuten von bis zu 11,1 mg Protein pro Gramm Bakterienzellen mit einer Reinheit von ca. 95% bei einer Konzentration von über 20 mg/ml realisiert werden. Dem Aufschlußpuffer wurde noch DNase und RNase (je eine „Spatelspitze“ pro 100 ml) zugegeben, da sich durch Analyse auf einem Agarosegel gezeigt hatte, daß neben dem Protein auch Nukleinsäure co-isoliert wurden. Da dies auch bei gereinigtem β -Arrestin festzustellen war, ist dies wahrscheinlich keine Eigenschaft des PAR-4 sondern ein systemimmanentes Phänomen der Reinigung. Durch Zugabe von Nukleasen kann diese Erscheinung aber weitgehend unterdrückt werden.

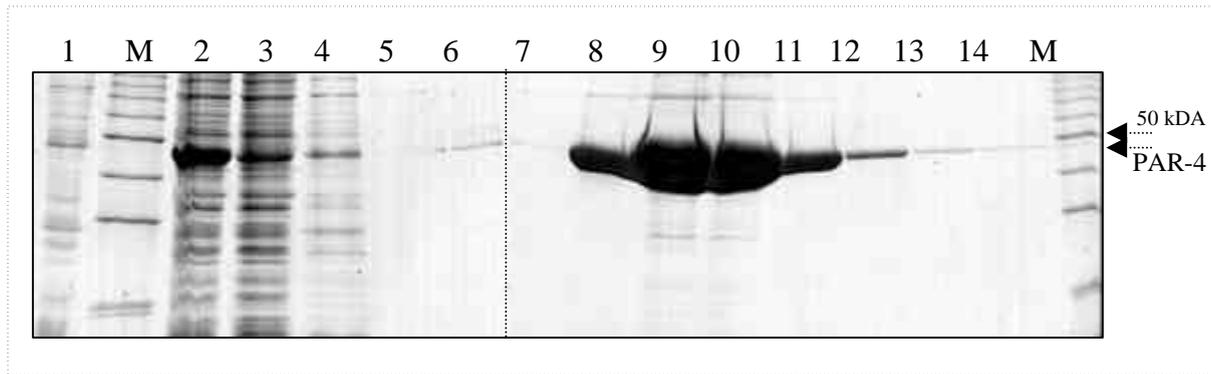


Abbildung 3.25 : Isolierung von 6HIS-PAR-4-Strep aus *E.coli*: (SDS-PAGE) Gezeigt sind die einzelnen Fraktionen der Reinigung von PAR-4 aus 4,5 Gramm Zellen über die Strep-Tactin-Säule. Die gesamte Reinigung erfolgte mit 200 mM MgCl₂, 20 mM Tris pH 7,28 ; 20 mM DTT. Die Elution erfolgte zusätzlich mit 2,5 mM Desthiobiotin. **1.** Pellet in 110 ml 8 M Harnstoff resuspendiert (3 µl), **2.** Lysat (5 µl ex 110 ml), **3.** Durchfluß (7 µl ex 150 ml), **4.** Waschfraktion 1 (20 µl ex 75 ml), **5.** Waschfraktion 2 (20 µl ex 75 ml), **6.** Harnstofffraktion (20 µl ex 50 ml), **7. bis 14.** Eluate 1 bis 8 (20 µl ex 10 ml) **M.** 10 kDa-Marker. Da die Säulenkapazität (15 ml) überschritten war, wurde der Durchfluß erneut über die regenerierte Säule aufgereinigt. Nach Konzentrierung konnten 2,5 ml mit einer Konzentration von 20 mg/ml Protein mit einem Reinheitsgehalt von ca. 95% (11,1 mg/g Zellen) erhalten werden.

Isolierung von PAR-4 durch IMAC verlief im Wesentlichen vergleichbar erfolgreich, allerdings interagierten die Magnesiumionen des Puffers mit dem Säulenmaterial und verdrängten Cu²⁺-Ionen von der Säule in die Probe.

In 200 mM MgCl₂ war das Protein über Wochen bei 4°C stabil und ließ sich nach Zugabe von 20% Glycerin einfrieren. Protein bei pH 4 ließ sich ebenfalls einfrieren, zeigte allerdings bei 4°C eine geringere Stabilität. In 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 20 mM Tris pH 7,3 präzipitierte das Protein binnen weniger Tage und war nicht erfolgreich einfrierbar.

Die Erkenntnisse in Bezug auf optimale Aufschlußpufferbedingungen ließen sich auf das Hefe-Expressionssystem übertragen. Mit 200 mM MgCl₂ / 50 mM Tris pH 7,28 als Puffer ließen sich auch aus *S. cerevisiae* (Klone 070999 C1 und 011099 B1; HIS-PAR4-Strep) Ausbeuten von 1,5 bis 2 mg PAR-4 / g Zellen erzielen. Allerdings war die Reinheit des Proteins geringer, es ließ sich weniger stark konzentrieren (ca. 7 mg/ml) und die Verluste im Pellet und durch Präzipitation auf der Säule waren deutlich höher als bei PAR-4 aus *E. coli*. Das aus Hefe isolierte PAR-4 zeigte zudem Heterogenität im Molekulargewicht (Modifikationen) und wies eine geringere Stabilität auf. (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesen Gründen wurde für die Kristallisation und biophysikalische Untersuchungen mit dem aus *E. coli* gewonnenen Protein gearbeitet.

Zusammenfassend standen für die Kristallisation und Funktionalitätstests ausreichende Mengen an gereinigtem PAR-4 in drei verschiedenen Puffern zur Verfügung.

Puffer	pH	Löslichkeit	Stabilität	Konzentration
200mM NaAc oder 200mM NaCl, 50 mM NaAc	4,0 - 4,2	++	++	ca. 15 mg / ml
200 mM NaCl, Tris, 20 mM MgCl ₂	7,3	+	+	ca. 5,5 mg / ml
200 mM MgCl ₂ , Tris	7,3	+++	+++	mind. 22 mg / ml

3.2.5. Untersuchungen zum Faltungszustand von PAR-4

Der Befund, daß PAR-4 nur in Gegenwart hoher Konzentrationen zweiwertiger Kationen stabil in Lösung zu halten ist, gibt einen Hinweis darauf, daß das Protein eventuell nicht oder nur teilweise gefaltet ist. Es ist bekannt, daß zweiwertige Kationen ein Protein im denaturierten bzw. partiell entfalteten Zustand stabilisieren können, indem das Protein mit einer hohen positiven Nettoladung versehen wird, welche die Interaktion mit anderen Proteinen und damit ggf. Präzipitation verhindert. (J. Labahn, FZ-Jülich, pers. Mtlg.). Um die strukturelle Integrität des gereinigten PAR-4 zu überprüfen, wurden sowohl physiologische als auch biophysikalische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu zählten der biochemische Nachweis der Interaktion von PAR-4 und der Dlk-Kinase in einem Kinasetest sowie Methoden, die direkten Einblick in den Faltungszustand eines Proteins erlauben. Anwendung fanden unter anderem die FTIR-Spektroskopie, die NMR und die CD-Spektroskopie.

3.2.5.1. PAR-4 wird von Dlk phosphoryliert

PAR-4 wurde u.a. durch einen "Two Hybrid Assay" als Interaktionspartner der DAP-like Kinase (Dlk) entdeckt. (Page et al., 1999). Die Dlk ist in der Lage, an PAR-4 zu binden und es zu phosphorylieren (siehe Abschnitt 1.2.4.). Die Bindung an Dlk setzt zumindest ein gewisses Maß an struktureller Integrität des PAR-4 Moleküls voraus. Aus diesem Grunde kann die Bindung und folgend die Phosphorylierung von Dlk an PAR-4 als Hinweis auf korrekte Faltung von PAR-4 gewertet werden. Untersucht wurde die in vitro Phosphorylierung von PAR-4. Die Durchführung dieses "Kinaseassays" erfolgte, wie in Abschnitt 2.7.1. beschrieben, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. K.H. Scheidtmann vom Institut für Genetik der Universität Bonn.

Die Versuche (Abbildung 3.26) zeigen, daß das rekombiante PAR-4 sowohl aus *E.coli* als auch aus *S. cerevisiae* als Substrat von Dlk phosphoryliert wird. In Spur 1 (Kontrolle ohne PAR-4) ist die Autophosphorylierung von Dlk (52 kDa) sowie die Phosphorylierung von MCL, H3 und H4 zu erkennen. Die Spezifität der Reaktion wird durch die Spuren 9 und 13 deutlich, wenn die Intensität der Banden von β -Arrestin mit denen von PAR-4 verglichen wird. Die Deletionsmutante $\Delta C2$ zeigt wie erwartet eine höhere Autophosphorylierung aber keine nachweisbare Phosphorylierung von PAR-4. Der Deletionsmutante fehlen die letzten 111 AS des C-Terminus, in dem auch die Leucin-Zipper-Domäne lokalisiert ist. Die Bedeutung dieses Befundes wird im Diskussionsteil näher erörtert. Die Spuren 2 bis 5 zeigen, daß sowohl das "native" wie auch das hitzebehandelte PAR-4 phosphoryliert wird (Signale bei 48 kDa). In wie weit eine vollständig native Faltung für die Erkennung und Phosphorylierung von PAR-4 durch Dlk essentiell ist, ist nicht bekannt. Möglicherweise ist eine teilweise Rückfaltung des Proteins, wie sie partiell nach Hitzedenaturierung eintreten kann, hierzu bereits ausreichend. Für diese Theorie spricht die Tatsache, daß auch Abbauprodukte von PAR-4, in der Abbildung gekennzeichnet durch einen schwarzen Punkt, ein Signal auf dem Autoradiogramm generieren (Spuren 2 und 10).

Bemerkenswert sind die Befunde mit PAR-4 aus Hefe. Neben den Signalen bei 48 kDa und 51 kDa treten zwei weitere Banden bei etwa 65 kDa und 70 kDa auf (Spur 10). Vergleicht man die Autoradiogramm-Signale mit dem entsprechenden SDS-Gel (Spur 14), so zeigt sich, daß die beiden Signale mit den größten apparenten Molekulargewicht bei gleicher Intensität gegenüber den beiden kleineren Signalen nicht im SDS-Gel zu erkennen sind. Diese Signale repräsentieren offenbar posttranslational modifiziertes PAR-4, welches erheblich effizienter

von Dlk phosphoryliert wird als nicht modifiziertes. Ob aus der besseren Phosphorylierbarkeit auf eine höhere strukturelle Integrität des modifizierten PAR-4 geschlossen werden kann, bleibt unklar. Da entsprechende Signale bei β -Arrestin nicht beobachtet wurde (Spuren 9 und 13), das, wie PAR-4 aus *S. cerevisiae*, über die Strep-Tactin-Säule isoliert wurde, kann nahezu ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um Spuren von kontaminierendem Hefeprotein handelt, das von Dlk phosphoryliert wird.

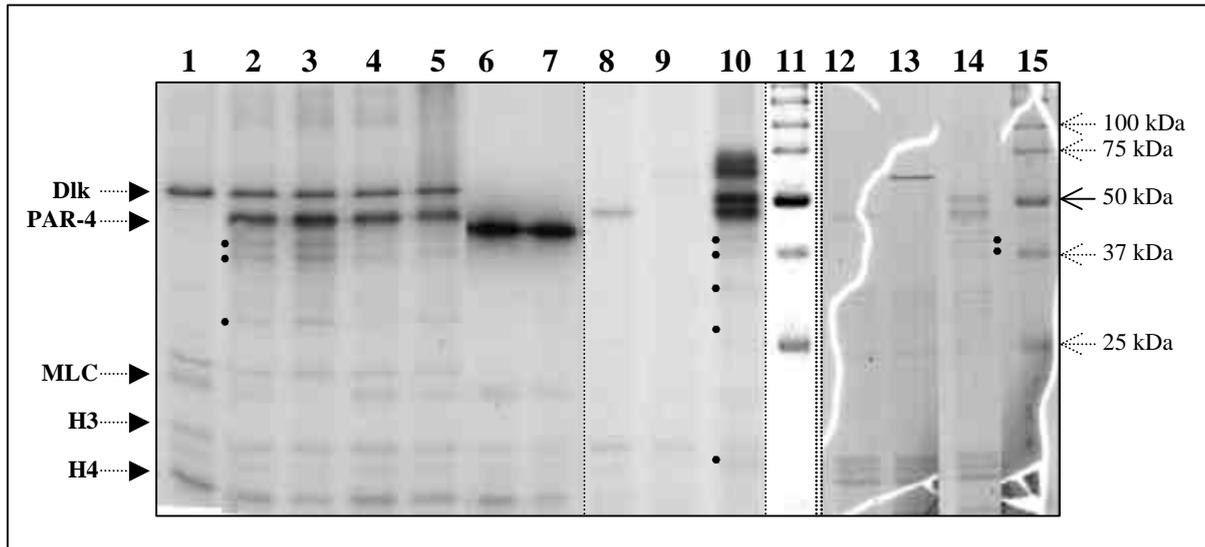


Abbildung 3.26 : In vitro Phosphorylierung von PAR-4 durch Dlk: Gezeigt sind Autoradiogramme und teilweise die dazu korrespondierenden SDS-Gele. Die Proben wurden auf einem 13,5 %igem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt, das anschließend getrocknet wurde. Nach Exposition der Röntgenfilme (24 bis 72 h) (Spuren 1 bis 10) wurden die Gele rehydratisiert (hierbei zerbrachen sie), und mit Coomassie gefärbt (Spuren 12 bis 15). Anhand des farbigen Proteinmarkers (Precision Protein Standard, Prestained, Fa. BioRad) war es möglich die Autoradiogramme und die gefärbten Gele aufeinander zu skalieren (Spuren 11 und 15). Die Spuren 8 bis 10 korrespondieren mit den Spuren 12 bis 14). Alle Proben hatten identische Zusammensetzung abgesehen von dem jeweiligen PAR- Anteil. Spuren: **1.** negativ Kontrolle, kein PAR-4; **2. bis 5.** PAR-4 aus 200 μ M $MgCl_2$, Tris pH 7,28; **2.** 0,15 μ g PAR-4 nativ; **3.** 0,5 μ g PAR-4 nativ; **4.** 0,15 μ g PAR-4 für 10 min bei 95°C inkubiert; **5.** 0,5 μ g PAR-4 für 10 min bei 95°C inkubiert; **6.** Deletionsmutante $\Delta C2$ von Dlk, ohne PAR-4; **7.** Deletionsmutante $\Delta C2$ von Dlk, 0,25 μ g PAR-4 in 400 mM NaCl Tris pH 7,5; **8.** 0,25 μ g PAR-4 in 400 mM NaCl Tris pH 7,5; **9.** 0,5 μ g β -Arrestin (Negativkontrolle); **10.** 0,5 μ g PAR-4 aus Hefe in 200 mM $MgCl_2$ Tris pH 7,28; **11.** Proteinmarker auf getrocknetem Gel; **12.** Gel zu Spur 8; **13.** Gel zu Spur 9; **14.** Gel zu Spur 10; **15.** Proteinmarker auf Gel analog zu Spur 11 **Expositionszeiten:** Spuren 1 bis 6: 1 Stunde; Spuren 8 bis 10: 3 Tage mit Verstärkerfolie QIII (geringere spezifische Aktivität des ^{32}P - γ -ATP). Abbauprodukte von PAR-4 sind durch Punkte markiert.

3.2.5.2. Charakterisierung von PAR-4 durch NMR

Durch NMR-Untersuchungen kann die Sekundärstruktur eines Proteins charakterisiert werden. Am Biozentrum in Basel wurden von Dr. H.J. Sass und Dr. Stephan Grzesiek eindimensionale NMR-Spektren von 6HIS-PAR-4-Strep aus *E.coli* aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei einer Feldfrequenz von 600 MHz, der Resonanzfrequenz von Protonen. In die Probe wird ein Magnetpuls mit einem Frequenzbereich von 600 MHz \pm 6kHz eingestrahlt, wodurch das Gleichgewicht der Spin-Orientierungen verschoben wird. Die Protonen-Spins relaxieren wieder zurück (mittlere Relaxationszeit) und senden dabei einen Magnetpuls in ihrer jeweiligen Resonanzfrequenz aus, der gemessen wird. Durch Fouriertransformation kann das Gesamtsignal aller relaxierten Spins in die einzelnen Resonanzfrequenzen aufgeschlüsselt werden. Diese Resonanzfrequenz ändert sich allerdings abhängig von der chemischen Umgebung des jeweiligen Protons im Protein. Für eine Charakterisierung der Sekundärstruktur eines Proteins sind primär die Protonen der Amidbindung relevant. Die Resonanzfrequenz dieser Amidprotonen ist zum einem von der jeweiligen Aminosäure selbst

abhängig zum anderen aber auch von Atomen die sich in der Nähe des Amidprotons befinden. In der Verschiebung der Resonanzfrequenz manifestieren sich demnach die Sekundär- und Tertiärstruktur-Elemente eines Proteins. Die Veränderung der Resonanzfrequenz eines Protons wird als "chemical shift" bezeichnet. Der „chemical shift“ (δ) ist definiert als die Differenz der Resonanzfrequenz der Probe bzw. des Protons (ν_P) und der Resonanzfrequenz eines Standards (ν_S) (meist Trimethylsilan), dividiert durch (ν_S) mal 10^6 und wird in [ppm] angegeben. (Wüthrich, 1986 und B. Koenig, pers. Mtlg.).

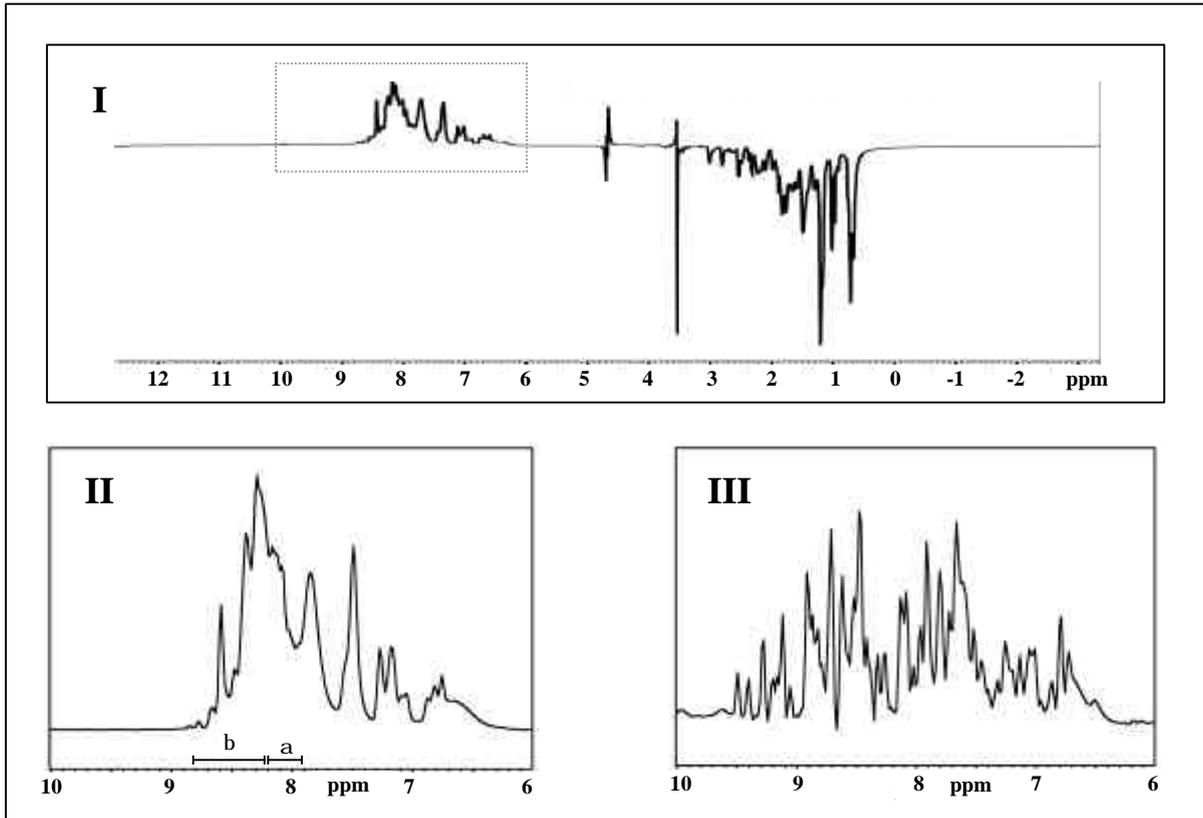


Abbildung 3.27: Eindimensionale NMR-Spektren von ungelabeltem Protein in Lösung: Alle Spektren wurden bei 303 K und 600 MHz aufgenommen. (Gerät: drx600) **I.** Gesamtes Spektrum von 6HIS-PAR-4-Strep (9,5 mg/ml in 100 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,28) **II.** Ausschnitt aus Spektrum des gleichen Proteins wie in I. allerdings drei Wochen früher aufgenommen, die Lagerung erfolgte bei 4°C; **III.** Spektrum von Ubiquitin (keine Spezifikationen). Auf der Ordinate ist die relative Intensität aufgetragen, die proportional zur Anzahl an Protonen ist, die an dem jeweiligen Signal beteiligt sind.

In obiger Abbildung sind die eindimensionalen NMR-Spektren von PAR-4 und Ubiquitin dargestellt. Jeder Peak entspricht, vereinfacht betrachtet, Protonen in einer bestimmten chemischen Umgebung. Ein erster Vergleich zeigt, dass die Dispersion der Peaks von Ubiquitin deutlich größer ist als die von PAR-4, obwohl Ubiquitin mit 8,5 kDa erheblich kleiner ist als PAR-4 mit 39 kDa. Dies deutet bereits auf eine höhere strukturelle Komplexität von Ubiquitin hin. Aus der Literatur sind die "chemical shifts" für Protonen in verschiedenen chemischen Umgebungen empirisch bekannt. Für Amidprotonen in α -Helizes beträgt dieser je nach Aminosäure zwischen 7,90 und 8,20 ppm. Für β -Faltblätter liegt dieser Bereich zwischen 8,25 und 8,78 ppm und für die Zufallsknäuel-Konformation zwischen 7,93 und 8,40 ppm (Wishart et al., 1991). Für PAR-4 lässt sich demnach feststellen, dass zumindest ein gewisser Teil des Proteinmoleküls als β -Faltblatt vorliegt. Eine klare Diskriminierung zwischen α -helikalen und Knäuel-Bereichen ist kaum möglich. Neben Sekundärstrukturelementen müssten in den Spektren I und II (Abbildung 3.27) auch Peaks auftreten, die auf Tertiärstruktur schließen lassen. Für Amidprotonen in spezieller Tertiärstruktur sollte

diese Peaks bis 10ppm auftreten (B. König und S. Grzesiek, pers. Mtlg.). Im Gegensatz zu Ubiquitin ist dies allerdings für PAR-4 nicht zu beobachten. Im Bereich von 0 bis -2 ppm treten in der Regel Peaks von Methylseitengruppen auf, die sich in einer Tertiärstruktur in der Umgebung von Aromaten befinden (Wuthrich, 1986 und J. Grötzinger, pers. Mtlg.). Für PAR-4 sind diese Peaks nicht nachweisbar (siehe Spektrum I).

Zusammenfassend lassen sich durch NMR-Analyse Sekundärstrukturmerkmale, allerdings keine Tertiärstruktur für das PAR-4 Molekül nachweisen.

Allerdings ergeben sich aus den NMR-Messungen auch noch andere Erkenntnisse. Aus den Breiten der Peaks kann man erkennen, daß das Protein monodispers ist und nicht in der Lösung aggregiert vorliegt. Dieser Befund wird gestützt durch die Tatsache, daß das Protein unter den gegebenen Bedingungen offenbar nicht dazu neigt, über Disulfidbrücken miteinander zu vernetzen (PAR-4 enthält drei Cysteingruppen). Eine photometrische Bestimmung der freien Sulfhydrylgruppen an Cysteinen in PAR-4 mit DTNB (5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure)) in einem Ellmans-Test ergab einen Wert von etwa 3mM (-SH₂) / mM PAR-4, wodurch der NMR-Befund bestätigt wird. (Daten nicht gezeigt).

Mit den Relaxationszeiten der Protonenspins läßt sich das ungefähre Molekulargewicht dieser monodispersen "Einheiten" auf ca. 40 bis 60 kDa ableiten. Es könnte sich also bei der gemessenen Probe um ein Gemisch aus PAR-4-Monomerem und Dimeren handeln.

3.2.5.3. Sekundärstrukturbestimmung durch CD-Spektroskopie

Mit der Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie lassen sich Sekundärstrukturelemente von Proteinen in Lösung sowohl qualitativ wie auch quantitativ bestimmen. Auch kann durch sie das Vorhandensein von Tertiärstruktur nachgewiesen werden. Das Meßprinzip bei der CD-Spektroskopie besteht darin, daß optisch aktive Substanzen unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht besitzen. Zirkular polarisiertes Licht wird durch die Zerlegung von polarisiertem Licht in zwei parallel polarisierte Wellen erzeugt, die eine Phasendifferenz zueinander aufweisen ($\lambda/4$ für linkszirkular polarisiertes Licht, $-\lambda/4$ für rechtszirkular polarisiertes Licht). Wird links- und rechtszirkular polarisiertes Licht gleichzeitig oder direkt nacheinander in eine Probe eingestrahlt, so ergibt sich aus der Differenz der Extinktionen der Meßwert für die entsprechende Wellenlänge. In der Praxis wird dies als Elliptizität angegeben. Das resultierende Spektrum (Elliptizität als Funktion der Wellenlänge) ist bei Proteinen unter anderem abhängig von deren Sekundärstruktur, wodurch man anhand eines CD-Spektrums auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Sekundärstruktur schließen kann, da im Protein durch das zirkular polarisierte Licht eine helikale Verschiebung der Elektronenverteilung induziert wird, die von der Umgebung (Sekundärstruktur und Tertiärstruktur) des chiralen Chromophors (induzierte Chiralität) abhängig ist. (Galla, 1988).

Die Untersuchungen an 6HIS-PAR-4-Strep aus *E. coli* (1 mg/ml) in 200 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH 7,28, 1 mM DTT wurden von Dr. J. Grötzinger am Inst. für Biochemie der RWTH Aachen durchgeführt und analysiert. Es wurden Spektren von 180 nm bis 320 nm aufgenommen. Als Ergebnis mußte festgestellt werden, daß in der Probe keine Tertiärstrukturelemente nachweisbar sind. Erkennbar war die Präsenz von α -helikalen Bereichen, wobei dieser Befund auch durch Schermetallionen imitiert werden kann, die an den 6HIS-Tag binden. Eine quantitative Auswertung der aufgenommenen Spektren wurde aus diesen Gründen nicht durchgeführt (J. Grötzinger, pers. Mtlg.). In wieweit dieses Ergebnis von der spezifisch untersuchten Probe abhing, oder ob das expremierte PAR-4 in 200 mM-Magnesiumpuffer keine Sekundärstruktur aufweist, ist Gegenstand der Diskussion. Weitere CD-Spektroskopische Untersuchungen wurden zunächst nicht durchgeführt.

3.2.5.4. Sekundärstrukturbestimmung von PAR-4 durch FTIR-Spektroskopie

Die im Infrarotbereich (2,5 bis 250 μm) beobachteten Absorptionsbanden werden durch Molekülschwingungen verursacht. Diese sind unter anderem Schwingungen von Atomkernen eines Moleküls in Richtung der Bindungsachse. Die Frequenz dieser Atomschwingungen hängt sowohl von dem Bindungsabstand, also von der chemischen Natur der Bindung, als auch von der Umgebung dieser Bindung ab. Absorption eingestrahlt Lichtes findet bei Resonanz der Frequenzen des Lichtes und der Bindungsschwingung statt (Galla, 1988). Für die Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen ist primär die Streckschwingung der Amid- C=O- Bindung (Amid-I-Bande) und die Beugungsschwingung der Amid- N-H-Bindung (Amid-II-Bande) von Bedeutung, da diese an den Wasserstoff-brückenbindungen innerhalb von α -Helices und β -Faltblattstrukturen beteiligt sind. Durch diese Wasserstoffbrücken verändert sich die Frequenz der Bindung und dadurch auch die Lage der Absorptionsbande im IR-Spektrum.

Bei der FTIR (Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie) wird ein Spektrum nicht kontinuierlich, also mit monochromatischem Licht wechselnder Wellenlänge aufgenommen, sondern die Probe wird mit einem "weißem" Frequenzspektrum bestrahlt, das alle zu vermessenden Wellenlängen beinhaltet. Mit Hilfe eines Interferometers und der Fourier-Transformation kann die Absorption für jede der eingestrahlt Wellenlängen zurückgerechnet werden. Vorteil dieser Methode ist eine höhere Quantenausbeute des eingestrahlt Lichtes sowie die deutlich kürzere Meßzeit.

Die Messungen an PAR-4 erfolgten in Zusammenarbeit mit C. Bolwien und D. Heitbrink in unserer Arbeitsgruppe, mit einem IFS66V-Spektrometer (Fa. Bruker, Karlsruhe) unter Verwendung einer Mikro-ATR-Diamantzelle (Fa. Resultec, Garbsen) anstelle einer konventionellen Transmissions-Küvette.

Das Spektrum I in Abbildung 3.28 zeigt, weshalb eine korrekte Analyse der Amid-I-Bande mit einer Probe in H_2O kaum möglich ist. Das Amid-Signal ist stark überlagert von der H_2O -Biegeschwingungs-Bande (1640 cm^{-1}), wodurch auch nach Differenzbildung mit dem Puffer ohne Protein die Ergebnisse stark fehlerbehaftet wären, da Hydratisierungs- H_2O des Proteins hierbei kaum berücksichtigt werden kann. Durch die Verwendung von D_2O als Lösungsmittel, dessen Absorptionsmaximum für die D-O-D Biegeschwingung bei 1200 cm^{-1} liegt, kann dieses Problem überwunden werden. Aus diesem Grunde wurde das Protein über eine PD10-Säule gegen den identischen Puffer in D_2O umgepuffert, bis 6,5 mg/ml konzentriert und analysiert (Spektrum III). Der Konzentratordurchfluß diente als Referenz für die Aufnahme des reinen D_2O -Pufferspektrums (Spektrum II). Der deutliche Peak bei 1450 cm^{-1} steht für HDO, das sich mit der Zeit aus D_2O und Resten von H_2O bildet (z.B. Kristallwasser des MgCl_2) und der Amid II-Bande (C=N-D). Die Differenz der Spektren II und III ergibt das eigentliche Signal des Proteins. Der Bereich um die Amid-I-Bande herum (1650 cm^{-1}) ist eine Überlagerung mehrerer verschiedener Amid-I-Peaks, die die verschiedenen Sekundärstrukturelemente widerspiegeln, in denen sich die entsprechende Amidgruppe im Protein befindet. Durch Anpassung der Differenzkurve mit mehreren Gauß-Funktionen können diese Einzelpeaks aufgelöst werden (Abbildung 3.28 unten). Aus dem Maximum der jeweiligen Gauß-Kurve und deren Integral lassen sich die einzelnen Sekundärstrukturelemente sowohl qualitativ als auch quantitativ beschreiben.

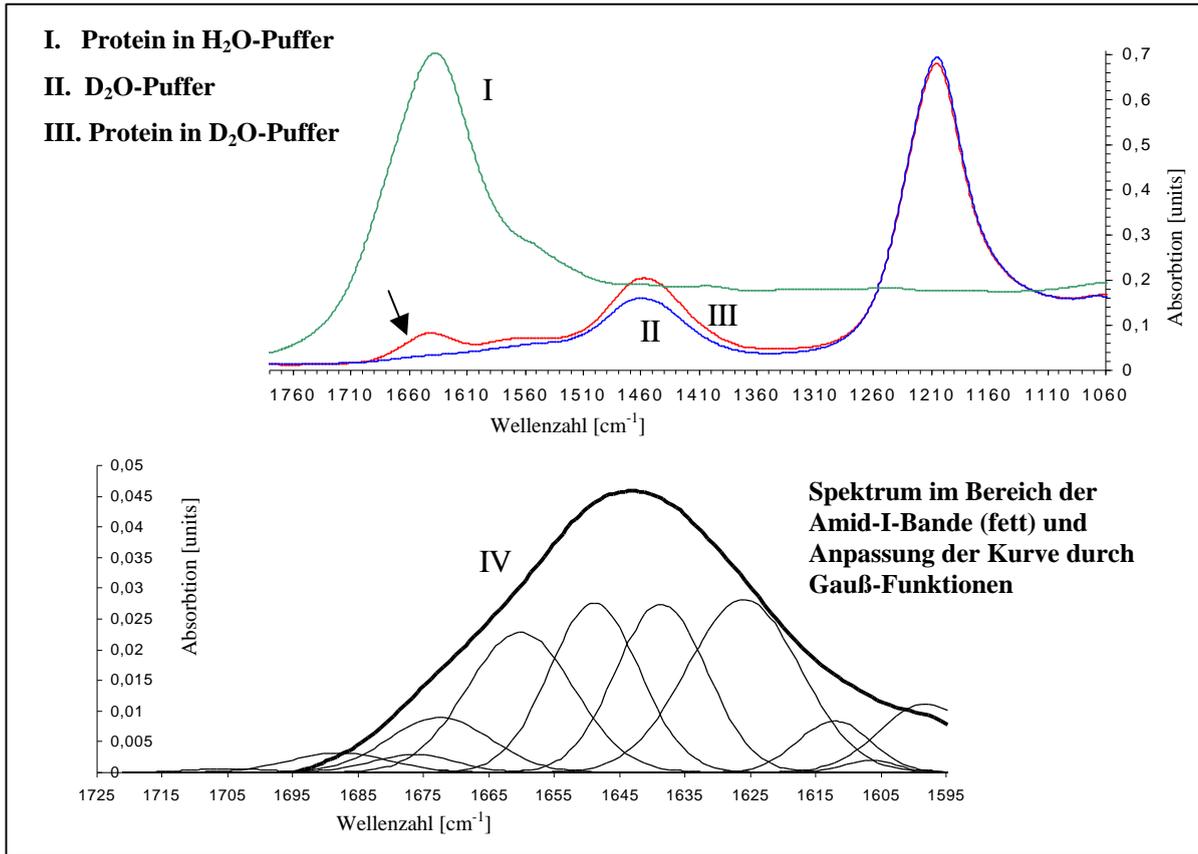


Abbildung 3.28 : FTIR-Spektrum und Sekundärstrukturanalyse von PAR-4: Die Messungen wurden an 6HIS-PAR-4-Strep in 200 mM MgCl₂, 20 mM Tris pH 7,28 durchgeführt. **I.** 20 mg/ml Protein in H₂O, **II.** Puffer in D₂O, **III.** 6,5 mg/ml in D₂O-Puffer. Jedes Spektrum wurde bei Raumtemperatur 500 mal aufgenommen und gemittelt. Die Lage der Amid-I-Bande ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die untere Kurve (**IV**) entspricht der Differenz der Spektren II. und III. Die Anpassung des Differenzspektrum erfolgte durch D. Heitbrink mit zwölf Gauß-Funktionen nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus.

Gauß-Funktion	Position der Maximums	Integral	Strukturelement (Literaturwert*)	Anteil am Protein
1	1598,08	0,199574	---	
2	1606,61	0,0200893	---	
3	1612,13	0,117764	---	
4	1626,04	0,611132	β-Faltblatt (1621-1627)	26,4 %
5	1638,59	0,477969	β-Faltblatt (1635-1640)	20,7 %
6	1648,83	0,476351	Zufallsknäuel (1641-1647)	20,6 %
7	1660,15	0,464257	α-Helix (1651-1657)	20,0 %
8	1672,57	0,177159	"Turns and Bends" (1658-1666)	7,7 %
9	1676,6	0,0475485	β-Faltblatt (1671-1679)	2,1 %
10	1687,9	0,0605381	"Turns and Bends" (1681-1685)	2,6 %
11	1704,84	0,00891471	---	
12	1713,51	0	---	

Tabelle 3.10 : Bestimmung der Sekundärstrukturelemente von PAR-4 durch FTIR: (* aus: Stuart, 1997)

Zusammenfassend ergibt sich für die Sekundärstruktur von PAR-4 in 200 mM MgCl₂-Puffer folgendes Bild. Das Protein setzt sich gemäß den FTIR-Daten aus 49 % β-Faltblatt-, 20 % α-Helix-, 10 % "Turns and Bends"- und 21 % Zufallsknäuel-Elementen zusammen. Die Genauigkeit der einzelnen Werte liegt bei etwa 10% des jeweiligen Wertes.

3.2.5.5. Sekundärstruktur von PAR-4

Vergleicht man die unterschiedlichen Befunde über die Sekundärstruktur von PAR-4 aus den Phosphorylierungsversuchen sowie den biophysikalischen Methoden der NMR, der CD-Spektroskopie und der FTIR-Spektroskopie, so kann resümiert werden, daß das Protein in 200 mM Magnesiumpuffer bei pH 7,28 eindeutig eine Sekundärstruktur aufweist, die mit der FTIR-Spektroskopie auch quantifiziert werden konnte. Über die strukturelle Homogenität der Proteinlösung können keine exakten Aussagen gemacht werden. Allerdings wurden mit keiner Methode Anzeichen gefunden, die auf die Präsenz von Tertiärstruktur schließen lassen. Im Gegenteil, die Ergebnisse suggerieren, daß das Protein unter diesen Bedingungen keine signifikante Tertiärstruktur ausbildet.

3.2.6. Kristallisation von 6HIS-PAR-4-Strep

Versuche zur Kristallisation wurden bislang ausschließlich mit 6HIS-PAR-4-Strep aus *E.coli* durchgeführt. Um erste Orientierungspunkte zu finden, in welchen chemischen Umgebungen das Protein stabil und eine Kristallisation möglich ist, wurde, wie auch für β -Arrestin, zunächst ein "Sparse Matrix Screen" mit den Puffer-Kits "Crystal Screen I und II" (siehe Abschnitt 2.8.1.1.) durchgeführt. In einem ersten Reihenversuch wurde mit PAR-4 gearbeitet das über IMAC oder Strep-Tactin gereinigt und in **200 mM NaCl**, Tris pH 7,28, 10 mM CaCl_2 , MgCl_2 , 20 mM DTT eluiert worden war (bei Eluat von der Strep-Tactin-Säule waren zusätzlich noch 2,5 mM dTB in der Proteinlösung vorhanden). Die Konzentration des Proteins in diesen Proben betrug jeweils ca. 5 mg/ml.

3.2.6.1. PAR-4 scheidet sich als Flüssigphase ab

Aus den ersten Reihenversuchen ergaben sich folgende Befunde. In ca. 80 % der untersuchten Puffer (je 2,5 μl Proteinlösung, siehe oben, plus 2,5 μl Puffer inkl. 50 mM DTT) scheidet sich das Protein schon während des Mischens des Ansatzes oder nach wenigen Stunden als flüssige Phase ab. Lediglich 14 Ansätze waren nach einer Stunde noch klar (sieben nach 24 Stunden). Diese bildeten später ebenfalls entweder festes Präzipitat aus oder bildeten eine Proteinphase in flüssiger Form aus. In einigen der Ansätze bildete sich die Flüssigphase binnen einiger Wochen zu festem Präzipitat um, das teilweise mikrokristallinen Charakter hatte (siehe Abbildung 3.30). Einzig der Ansatz mit Puffer II/47 (2M MgCl_2 , 0,1M Tris-Bicine pH 9,0) blieb über mehrere Wochen hinweg klar. Eine klare Systematik im Verhalten des Proteins in Bezug auf Präzipitationsmittel, pH-Wert oder Proteinkonzentration konnte aus den Ergebnissen allerdings zunächst nicht abgeleitet werden.

Abscheiden eines Proteins als Flüssigphase ist häufig bedingt durch hydrophobe Wechselwirkungen der Proteine untereinander in einer übersättigten Lösung (McPherson, 1999). Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Pufferkonzentrationen zeigten, daß die Phasentrennung bei PAR-4 nicht nur von der Protein- und/oder Fällungsmittelkonzentration abhängt sondern offenbar vielmehr von der Konzentration von Magnesiumionen in der Lösung, da Verdünnen des Proteins mit 200mM NaCl 20mM Tris pH 7,28 ebenfalls zur Präzipitation des Proteins führte. Dies bestätigt die Befunde, die während der Evaluierung der Reinigungsbedingungen gemacht wurden (siehe Abschnitt 3.2.4.).

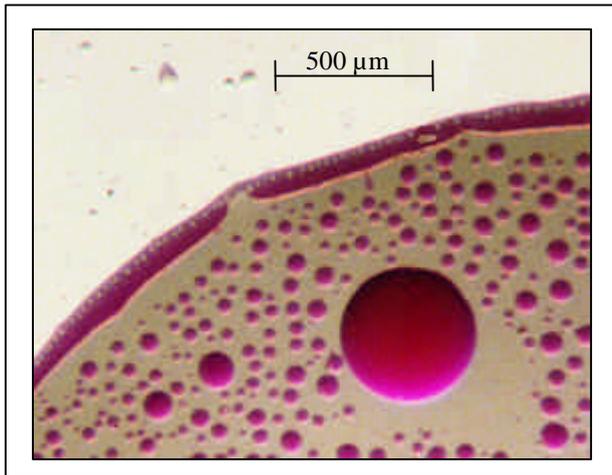


Abbildung 3.29 : Flüssigphasentrennung von PAR-4: Gezeigt ist ein typischer Kristallisationsansatz mit PAR-4. Bereits während des Pipettierens des Ansatzes oder nach wenigen Stunden scheidet sich das Protein als hochkonzentrierter Proteintropfen aus der Pufferlösung ab. Je nach verwendetem Puffer sammeln sich diese Tropfen als "Linse" am Boden des "hanging drops". hier: 2,5 μ l PAR-4 (5,5 mg/ml) plus 2,5 μ l Puffer I/25 (1 M NaAc; 0,1 M Imidazol; pH 6,5). Das Protein wurde nachträglich mit Sulforhodamin B angefärbt.

3.2.6.2. Weitere Reihenexperimente zur PAR-4-Kristallisation

Da offenbar hydrophobe Interaktionen die geringe Löslichkeit von PAR-4 verursachen, wurde versucht die Löslichkeit durch Zugabe von Detergenz zu erhöhen. Als Detergenz wurden 0,5% Nonidet P40 (NP40) den 96 Puffern der Puffer Kits zugesetzt und Kristallisationsansätze hergestellt. Durch NP40 wird zwar die Löslichkeit des PAR-4 heraufgesetzt, das allgemeine Ergebniss, daß sich das Protein nach wie vor als Flüssigphase abscheidet, änderte sich aber nicht. Es wurde zusätzlich das MembFac-Puffer-Kit (Fa. Hampton) verwendet, das speziell für die Kristallisation von extrem hydrophoben Membranproteinen entwickelt wurde. Auch hier konnten keine Orientierungshilfen in Bezug auf das optimale Kristallisationssystem gewonnen werden.

Die bisher beschriebenen Experimente wurden mit PAR-4 (5 mg/ml) in 200 mM NaCl (plus 20 mM CaCl₂ bzw. MgCl₂, Tris pH 7,3, DTT) durchgeführt. Analoge Versuche mit hochkonzentriertem PAR-4 (20 mg/ml) in 200 mM MgCl₂, Tris pH 7,28 reduzierte das Phänomen der Phasentrennung zwar, änderte aber das generelle Verhalten des Proteins nicht.

3.2.6.3. Löslichkeit von PAR-4 in der Nähe des isoelektrischen Punktes

Aus den Experimenten zur Reinigung von PAR-4 ging hervor, daß PAR-4 bei extrem niedrigen pH-Wert (200 mM NaAc pH 4,2) auch in Abwesenheit vom Magnesium stabil in Lösung zu halten ist (Abschnitt 3.2.4.). Über die strukturelle Integrität des Proteins bei diesem pH-Wert lagen zum damaligen Zeitpunkt keine weiteren Informationen vor.

Es wurden Kristallisierungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen von Na-Acetat als Fällungsmittel (0,5M, 1,0M, 1,5M und 2,0M) bei verschiedenen pH-Werten (4,0 4,5 5,0 5,5 6,0 und 6,5) durchgeführt (je 2,5 μ l Protein, 15 mg/ml, plus 2,5 μ l Reservoir). Es zeigte sich daß das Phänomen der Flüssigphasentrennung, wie zu erwarten, mit steigender Fällungsmittel-Konzentration aber auch mit steigendem pH-Wert zunimmt. Parallele Ansätze mit 20 mg/ml Protein in 200 mM MgCl₂ bei pH-Werten von 8,3 bis 6,3 (Tris HCl) und MgSO₄-Konzentrationen von 200 mM bis 1000 mM als Fällungsmittel ergaben, daß die Löslichkeit nicht nur mit steigender Salzkonzentration abnimmt (Effekt der Ionenstärke), sondern auch mit abnehmendem pH-Wert.

Betrachtet man nur die pH-Werte der oben beschriebenen Experimente, so zeigt sich, daß die Löslichkeit von PAR-4 etwa bei pH 6,0 bis 6,5 ein Minimum aufweist.

Dieses Minimum entspricht recht genau dem isoelektrischen Punkt (IP) des verwendeten 6HIS-PAR-4-Strep Proteins, der auf 6,1 berechnet wurde (EMBL isoelectric point service). Dieser Effekt ist für viele Proteine bekannt (McPherson, 1999). Für HIS-PAR-4 liegt der theoretische IP bei 6,0, für Strep-PAR-4 bei 5,6 und für PAR-4 (ohne Tags) bei 5,4. (Eine direkte gelelektrophoretische Bestimmung des IP scheiterte an der Unlöslichkeit des Proteins in dem magnesiumfreien Elektrophoresepuffer (Daten nicht gezeigt).

Bringt man diese Befunde in Verbindung mit der Beobachtung, daß PAR-4 entweder bei sehr niedrigem pH oder bei hohen Mg-Konzentrationen (200 mM) stabil in Lösung bleibt, so ergibt sich folgender plausibler Zusammenhang. Bei pH 4 liegt das Protein in stark positiv geladener Form vor (berechnete Nettoladung: +30). Hohe Konzentrationen zweiwertiger Kationen verursachen den gleichen Effekt, da einzelne negative Ladungen des Proteins mit zwei positiven Ladungen abgesättigt werden. Dies wiederum würde bedeuten, daß die geringe Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen nicht durch hydrophobe sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen wird. Eine eindeutige Beurteilung ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt allerdings nicht möglich.

3.2.6.4. PAR-4 kristallisiert aus Präzipitat

Wie bereits beschrieben, scheidet sich das Protein unter den meisten Fällungsmittelbedingungen zunächst als Flüssigphase ab. Nach einiger Zeit (Tage bis Wochen) bildet sich diese Flüssigphase bei einigen Ansätzen in Präzipitat um, welches in wenigen Fällen mikrokristallinen Charakter aufweist. Es konnte auch beobachtet werden, daß sich flüssige Proteintropfen bei gleichbleibender Morphologie in eine feste, kristalline Form umwandeln (nachweisbar durch Polarisierungseffekte). Dieses Verhalten des Proteins beruht darauf, daß sich in der überkonzentrierten Proteinlösung aus kinetischen Gründen zuerst amorphes Präzipitat (flüssig oder fest) bildet. Diese Form des Proteins ist allerdings in Bezug auf den Energiezustand thermodynamisch ungünstiger als in einem Kristall, weshalb sich ggf. später aus diesem Präzipitat kristalline Strukturen ausbilden können (McPherson, 1999).

Nach drei Wochen bis sechs Monaten waren in einigen Ansätzen eindeutig kristalline Proteinstrukturen nachweisbar. In den folgenden Abbildungen sind einige dieser Strukturen wiedergegeben. Versuche, diese Ergebnisse eindeutig zu reproduzieren, schlugen bisher fehl bzw. konnten aufgrund der langen "Inkubationszeit" noch nicht ausgewertet werden.

Faßt man die Ergebnisse zur Expression, Faltung und Kristallisation von PAR-4 zusammen so ergibt sich folgendes Bild: PAR-4 wurde in großen Mengen in *E. coli* exprimiert. Die Reinigung war nur bei sehr niedrigem pH-Wert oder in Gegenwart hoher Konzentrationen von Magnesium möglich, was Zweifel an der strukturellen Integrität des Proteins nährt. Durch biophysikalische Methoden, besonders durch die FTIR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, daß das Protein auch unter den genannten Bedingungen eine ausgeprägte β -Faltblatt-Sekundärstruktur aufweist. Präsenz einer stabilen Tertiärstruktur konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund könnte man das Verhalten des Proteins in Kristallisationsexperimenten erklären. Besitzt das Protein keine stabile Tertiärstruktur, könnte dies zur Folge haben, daß eine Mikroheterogenität verschiedener, flexibler (Zufalls-) Konformere in der Lösung vorliegen. Die Löslichkeit dieses Gemisches ist gering und Kristallisation von PAR-4, die bisher nur aus der Flüssigphase oder aus festen Präzipitat heraus beobachtet wurde, wäre das Produkt zufälliger Nukleation und damit Stabilisation gleichartiger Konformere. Die Untersuchungen zur Kristallisation stehen allerdings noch zu sehr am Anfang, um ein klares Urteil zu rechtfertigen.

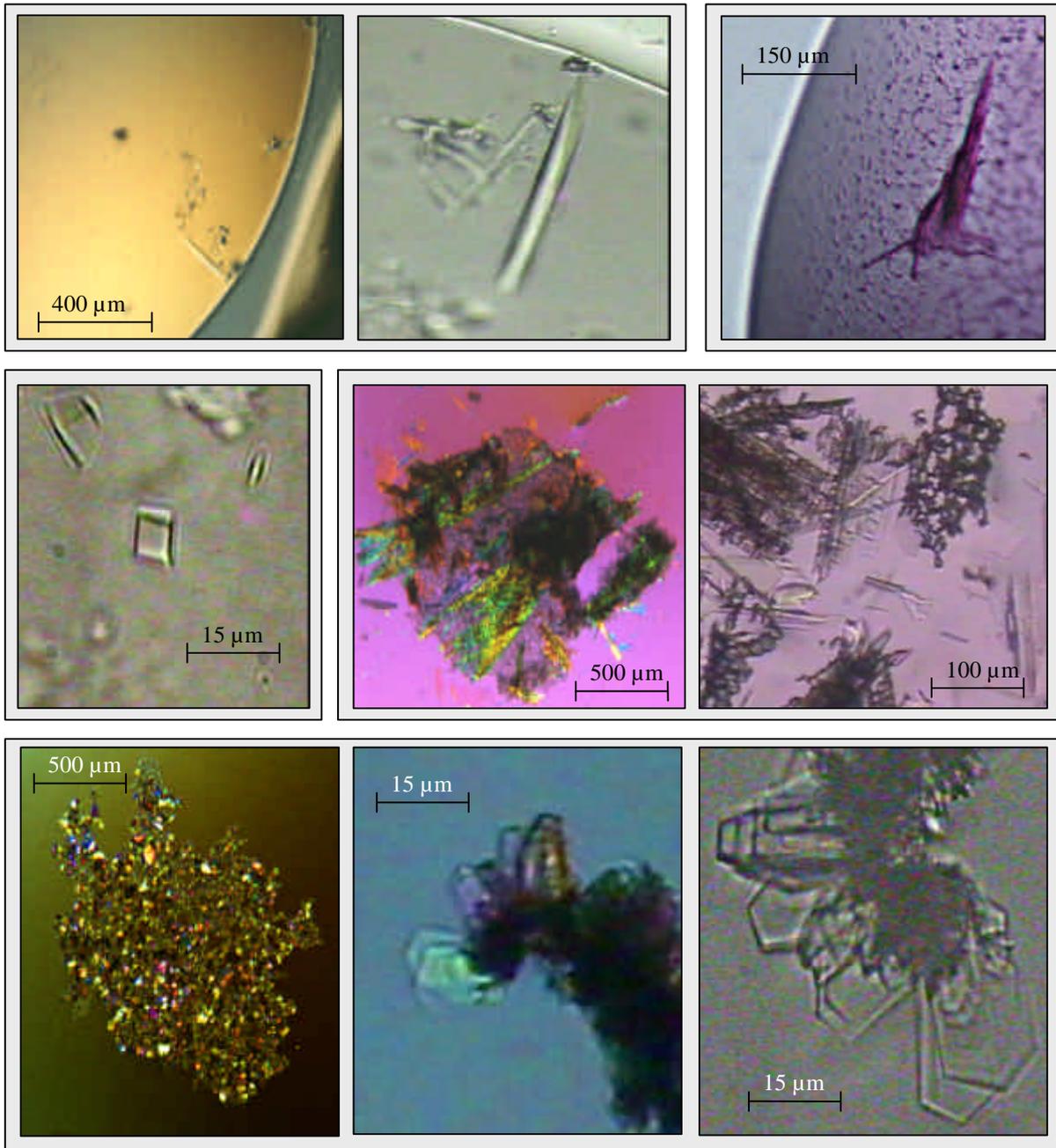


Abbildung 3.30 : Kristalline Proteinstrukturen von PAR-4:

oben links: Kristall gewachsen in 2,5 µl Puffer **II/2** (0,5M NaCl, 10 mM CTAB, 10 mM MgCl₂), + 2,5 µl PAR-4 (5 mg/ml) in 200 mM NaCl, Tris pH 7,28; 20 mM DTT. Der Kristall (10 x 10 x 300 µm) wuchs nach ca. drei Monaten. Er wurde in Reservoirpuffer inkl. 30% Glycerin überführt und im Kryostrom mit dem Drehanodengenerator vermessen. Er zeigte keine Diffraktion. **oben rechts:** "Faserbündel", gewachsen in Puffer **II/38** (20% PEG 10000, 0,1 M HEPES pH 7,5) Protein: 5,5 mg/ml in 200 mM NaCl Tris pH 7,28. Die Struktur zeigt Polarisationsseffekte und läßt sich mit Sulforhodamin B anfärben. Derartige Strukturen wurden in mehreren anderen Ansätzen mit unterschiedlicher Pufferzusammensetzung beobachtet. **Mitte links:** Mikrokristall in Puffer **II/14** (2,0 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M Na-Citrat pH 5,6 , 0,2 M K₂Na-Tartrat). Der Kristall wurde in Reservoirpuffer inkl. 30% Glycerin umgesetzt und bei 100 K mit dem Drehanodengenerator untersucht. Er zeigte keine Diffraktion. Der Nachweis von Protein im Kristall erfolgte durch „Iz-It“. Mit diesem Puffer konnten gleichförmige Kristalle auch in anderen Ansätzen beobachtet werden. "Makro seeding"-Experimente blieben erfolglos. **Mitte rechts:** "Zweidimensionale" Protein-Kristalle in Puffer **I/42** (20% PEG 8000, 50 mM K-Phosphat). Die kristallinen Flächen scheinen sich aus Faserbündeln und/oder Nadeln zusammensetzen (rechte Abb.) **unten:** Kristalle aus festem Präzipitat in Puffer **I/40** (20% Isopropanol, 20% PEG 4000, 0,1 M Na-Citrat pH 7,5), Protein: 5,5 mg/ml in 200 mM NaCl pH 7,28 ; **links:** Übersicht: **mitte** und **rechts:** Detailausschnitte.

Weitere Puffer unter denen Proteinkristallbildung mit ähnlichem Habitus wie in II/14 und I/40 beobachtet werden konnte: **II/30** (Mikrokristalle), **I/8** (Kristalle aus festem Präzipitat), **II/10** (Nadeln aus festem Präzipitat), **II/36** (Polykristalline "Kugeln" aus Flüssigphase), **1M MgSO₄ pH 7,8** (globuläre Struktur aus Proteintropfen gewachsen), **H₂O** (Nadelbündel nach Dialyse gegen destilliertes Wasser im Dialyseschlauch aus Präzipitat gewachsen) (Daten nicht gezeigt)

4. Diskussion

4.1 *Bos taurus* b-Arrestin 1

Anhand der Kristallstruktur des visuellen Arrestins (Granzin et al., 1998) wurden Modelle zur Funktion und Regulation dieses Moleküls entwickelt und aufgrund der hohen Homologie der beiden Proteine auch auf β -Arrestin übertragen.

Aus der Struktur des Arrestins nicht abzuleiten war bisher die Position und Funktion des C-terminalen Bereichs von β -Arrestin, zum einen, da die Arrestinstruktur für diesen Bereich nicht bekannt ist, zum anderen, da die β -Arrestine im Gegensatz zu den Arrestinen in diesem Bereich eine Domäne besitzen, die die Bindung an Clathrin und die Internalisierung von GPCRs vermittelt.

Ziel dieser Arbeit war daher, die dreidimensionale Kristallstruktur des bovinen β -Arrestin 1 zu ermitteln. Hierzu mußte das Protein in großen Quantitäten hergestellt und gereinigt werden. Ferner galt es, dieses Protein zu kristallisieren und die Kristallstruktur anhand des Arrestin-Modells sowie modellunabhängiger kristallographischer Methoden zu bestimmen (siehe Kapitel 1.1). Für die Expression und Reinigung visuellen Arrestins aus *E.coli* wurden bereits Prozeduren beschrieben (Schubert et al., 1999), die Expression von Arrestin in *S.cerevisiae* wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert (B. Krafft, Dissertation 1999).

4.1.1. Heterologe Expression und Purifikation von b-Arrestin

Zur Herstellung für die Kristallisation ausreichender Mengen β -Arrestins wurde die heterologe Expression in *S. cerevisiae* (Stamm F11 α) sowie die Reinigung des rekombinanten Proteins über affinitätschromatographische Methoden gewählt. Durch Fusion sogenannter Affinitätstags an β -Arrestin mittels molekularbiologischer Methoden wurde eine schnelle und effiziente Isolierung des resultierenden Proteins ermöglicht.

Erste Untersuchungen zeigten, daß β -Arrestin in *S. cerevisiae* effizient exprimiert wird. Probleme ergaben sich zunächst aus dem geringen Anteil löslichen Proteins nach Zellaufschluß. Es zeigte sich jedoch, daß die Pufferkapazität der zum Zellaufschluß verwendeten Lösung unzureichend war, um den niedrigen pH-Wert des Zellysats abzufangen. Durch Erhöhung der Pufferkapazität konnte dieses Hindernis beseitigt werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß der Einsatz von 200 mM Phosphatpuffer (bzw. Kalium Hydrogenphosphat) bei pH 8,0 die Stabilität des Proteins unabhängig von der Pufferkapazität stark erhöhte. Es muß sich hierbei also um einen spezifischen, stabilisierenden Effekt der Hydrogenphosphationen handeln (siehe auch Abschnitt 3.1.3.2.). Dieser Befund wurde auch dadurch bestätigt, daß mit diesem Puffer die Ausbeuten an visuellem Arrestin sowie von p44, einer Splice-Variante von Arrestin, aus *S.cerevisiae* um etwa einen Faktor 20 gesteigert werden konnten (nicht gezeigt). Der Hintergrund der stabilisierenden Wirkung von Phosphat auf Arrestin und β -Arrestin wird in Verbindung mit den Erkenntnissen aus den Kristallisationsexperimenten mit Inositolhexaphosphat (IP₆) genauer erörtert werden.

Die Isolierung des exprimierten β -Arrestins durch Affinitätschromatographie über den 6HIS-Tag bzw. den StrepTag II verlief im Wesentlichen erfolgreich. Unabhängig davon, ob der Affinitätstag N- oder C-terminal liegt, konnten vergleichbare Ausbeuten erzielt werden. Ein Hindernis in der Isolierung hoch reinen β -Arrestins über nur einen „Tag“ war die Co-Purifikation von proteolytischen Abbauprodukten des Proteins, die ebenfalls die Sequenzen des jeweiligen Affinitätstags beinhalten. Abbauprodukte können die Kristallisation eines Proteins dadurch behindern, daß sie ggf. spezifisch in das Kristallgitter inseriert werden und

dadurch Fehlstellen im Kristall entstehen, die sowohl weiteres Kristallwachstum inhibieren als auch die Beugungseigenschaften des Kristalls vermindern.

Durch Expression mit dem *S.cerevisiae*-Stamm BJ2168, der sich im Gegensatz zu F11 α durch multiple Proteasedefizienz auszeichnet, wurde versucht, die protolytische Degradation des exprimierten β -Arrestins zu reduzieren. Dieser Stamm zeigt allerdings im Vergleich zu F11 α eine zu geringe Expressionsrate für β -Arrestin. Durch Herstellung der „Doppeltag“-Konstrukte und sequenzielle Reinigung konnten in dieser Arbeit β -Arrestine voller Länge erfolgreich von Abbauprodukten getrennt werden.

Die hohe Sensitivität von β -Arrestin gegenüber oxidativer Schädigung durch Sauerstoff konnte zum einen durch hohe Dosen an DTT (50 mM), besonders aber durch den Austausch von vier Cysteinen gegen Serine vermindert werden. Daß die Sauerstoffsensitivität auch bei dieser Mutante, wenn auch gemindert, weiterhin vorlag, läßt mehrere Schlußfolgerungen zu. Neben der Möglichkeit, daß die Instabilität des Proteins in Gegenwart von Sauerstoff nicht von Cysteinen vermittelt wird, ist die wahrscheinlichere Erklärung, daß die drei im Molekül verbliebenen Cysteine, für dieses Verhalten verantwortlich sind (siehe auch Abschnitt 3.1.6.). In Verbindung mit den Beobachtungen zur Wirkung von IP₆ kann vermutet werden, daß β -Arrestin in einer „oxidationsresistenten“ (IP₆-gebundenen) oder einer „sauerstoffsensibelen“ Zustandsform (Konformation?) vorliegen kann. Auf diesen Punkt wird im Zusammenhang mit der Molekülstruktur genauer eingegangen werden.

Sollte es sich aufgrund einer vorläufigen Kristallstruktur von β -Arrestin ergeben, daß die verbliebenen drei Cysteine tatsächlich die Sauerstoffsensibilität vermitteln und keinen strukturgebenden Charakter haben, könnten sie ebenfalls gegen Serine ausgetauscht werden, um die Proteinstabilität und evtl. damit auch die Qualität der Kristalle zu erhöhen.

Mit bis zu 2,7 mg β -Arrestin pro Gramm Hefezellen konnten mit relativ geringem Aufwand große Mengen reinen Proteins isoliert werden. Damit steht erstmals eine Prozedur zur Verfügung, mit der β -Arrestin, ökonomisch sinnvoll, im Milligrammaßstab aus eukaryotischen Zellen gewonnen werden kann.

4.1.2. Funktionalität und Modifikation des exprimierten β -Arrestins

Die Rhodopsin-Bindungsstudien zeigten, daß das exprimierte β -Arrestin (bzw. 10HIS- β Arr(4C-S)-Strep) zumindest zu einem Teil funktional ist. Der Vergleich zu Arrestin zeigte, daß die dreifache Menge an β -Arrestin eingesetzt werden mußte, um ein Signal zu generieren, das einem Drittel des Arrestin-Signals entsprach. Aufgrund der vergleichbaren Bindungskinetiken läßt dies den Schluß zu, daß nur ein Teil des in der Probe enthaltenen Proteins korrekt gefaltet war (siehe Abschnitt 3.8.1.). Durch Zugabe von IP₆ kann die Stabilität von β -Arrestin zwar deutlich erhöht werden, allerdings inhibiert IP₆ die Bindung von β -Arrestin an Rhodopsin (siehe Abschnitt 1.1.5.).

Ein bisher ungeklärtes Phänomen ist das Migrationsverhalten von β -Arrestin in der SDS-PAGE. Das apparente Molekulargewicht liegt für 10HIS- β Arr(4C-S)-Strep bei ca. 58 kDa und nicht, wie errechnet, bei 49 kDa (49820 Da). Ursachen für diese Diskrepanz können in posttranslationaler Modifikation des Proteins durch den Expressionsorganismus Hefe liegen. Über Glykosylierung von β -Arrestin liegen keine Informationen vor, bekannt ist allerdings, daß β -Arrestin an Position Ser412 phosphoryliert sein kann. Phosphatgruppen wie auch Glykosylierungen können einen retardierenden Effekt auf das Laufverhalten eines Proteins haben. Kovoov und Mitarbeiter beschreiben 1999, daß β -Arrestin im Cytoplasma fast vollständig in phosphorylierter Form vorliegt und die Dephosphorylierung als Bestandteil der Regulation erst an der Plasmamembran stattfindet. Es ist daher durchaus denkbar, daß das heterolog exprimierte Protein von endogenen Hefe-Kinasen phosphoryliert wird. Die Bindung

an den Rezeptor bzw. an Rhodopsin wird hierdurch nicht inhibiert, wohl aber die Bindung an Clathrin. Durch einen geeigneten Clathrin-Bindungs-Test könnte die Frage, ob β -Arrestin in phosphorylierter Form vorliegt, also geklärt werden. Wirkliche Relevanz hat der Status von Serin 412 aber in Verbindung mit der physiologischen Regulation und der Kristallstruktur von β -Arrestin, weshalb dies zu einem späteren Zeitpunkt genauer betrachtet werden wird.

4.1.3. Kristallisation von β -Arrestin

Nachdem sich gezeigt hatte, daß die für visuelles Arrestin etablierten Kristallisationsbedingungen nicht auf β -Arrestin übertragbar waren, galt es, ein neues Kristallisationssystem zu entwickeln. Durch „Sparse Matrix Screening“ konnten binnen kurzer Zeit erste Kristallisationsbedingungen für β -Arrestin gefunden werden. Allgemein kristallisierte β -Arrestin mit Fällungsmitteln hoher Ionenstärke (vergl. Abschnitt 3.1.10.1.), während PEGs und organische Lösungsmittel zumeist zur Präzipitation des Proteins führten. Besonders erfolgreich war die Kristallisation mit K, Na-Tartrat bei einem pH-Wert von 6,8 bis 7,2. Der hexagonale Habitus der Kristalle änderte sich mit der verwendeten β -Arrestin Variante nicht, d.h., daß die Packung im Kristall und wahrscheinlich auch die Faltung des Proteins durch die verwendeten Affinitätstags sowie den Austausch von vier Cysteinen gegen Serine nicht verändert wird. Dies hätte die Signifikanz der Interpretation einer späteren Molekülstruktur eventuell mindern können.

Ein großes Hindernis bei der kristallographischen Analyse der Kristalle waren die schlechten Diffraktionseigenschaften. Kristalle aus Wildtyp-Protein zeigten keine detektierbare Diffraktion. Dies ist, wie in Abschnitt 3.1.9.7 detailliert erörtert, wahrscheinlich auf das schnelle Wachstum der Kristalle in nicht äquilibrierten Ansätzen zurückzuführen. Kristallbildung in äquilibrierten Lösungen wurde durch die geringe Stabilität des Proteins über die Zeit und die beobachtete Sauerstoffsensitivität verhindert. Durch Verwendung des mutierten Proteins konnte dieses Problem gemindert, wenn auch nicht beseitigt werden. Mit 10HIS- β Arr(4C-S)-Strep konnten erstmals Kristalle erhalten werden, die ein geringes Maß an Diffraktion zeigten. Die kristallographische Qualität der Kristalle war allerdings zu gering und nicht reproduzierbar genug, um mit ihnen systematische Untersuchungen zur Optimierung von Kryobedingungen durchzuführen.

Ein Durchbruch in der Kristallisation von β -Arrestin konnte durch den Zusatz von IP_6 erzielt werden. IP_6 erhöhte, bei gleichzeitiger Reduktion der Löslichkeit, die Stabilität des Proteins und ermöglichte die reproduzierbare Produktion diffraktierender Kristalle. Die Tatsache, daß die Kristallisation von β -Arrestin in Anwesenheit von IP_6 mit deutlich geringeren Proteinkonzentrationen stattfand, ist aber nicht nur auf die geringere Löslichkeit des β -Arrestin- IP_6 -Komplexes zurückzuführen. Wahrscheinlicher ist, daß durch IP_6 der Anteil an stabilem, ungeschädigten Proteins erhöht wird, bzw., daß ein mutmaßliches Konformerengleichgewicht in der Proteinlösung in Richtung des kristallisierbaren Konformers verschoben wird. Ob der Beobachtung, daß sich auch in Gegenwart von IP_6 Kristalle mit hexagonalem Habitus bilden, kann geschlossen werden, daß die Grundkonformation des Proteins im IP_6 -gebundenen Zustand der entspricht, in der β -Arrestin auch ohne IP_6 kristallisierte. Teilweise bestätigt wird diese Vermutung, wie später gezeigt werden wird, durch die kristallographische Analyse der verschiedenen Kristalle (Differenzdichte).

Durch die erfolgreiche Co-Kristallisation von β -Arrestin mit Quecksilberchlorid wird die Ermittlung der Proteinstruktur durch isomorphen Ersatz ermöglicht. Diese Form der kristallographischen Analyse bietet den Vorteil, daß sie unabhängig von dem Arrestinmolekülmodell ist. Dies hat besondere Relevanz, wenn die beiden Proteine deutliche Unterschiede in ihrer Feinstruktur aufweisen.

4.1.4. Kristallographische Analyse von β -Arrestin

Wie in Abschnitt 3.1.14. beschrieben, konnten mit Synchrotronstrahlung vier kristallographische Datensätze von β -Arrestinkristallen aufgenommen werden. Unter Verwendung des Datensatzes „2000_88“ (10HIS- β Arr(4C-S)-Strep mit IP₆ und HgCl₂; 4.0 Å Auflösung) und der bekannten Struktur des visuellen Arrestins konnte durch die Methode des „Molekularen Ersatzes“ die Packung des β -Arrestins im Kristall bzw. die Position und Orientierung der einzelnen Moleküle in der Elementarzelle ermittelt werden.

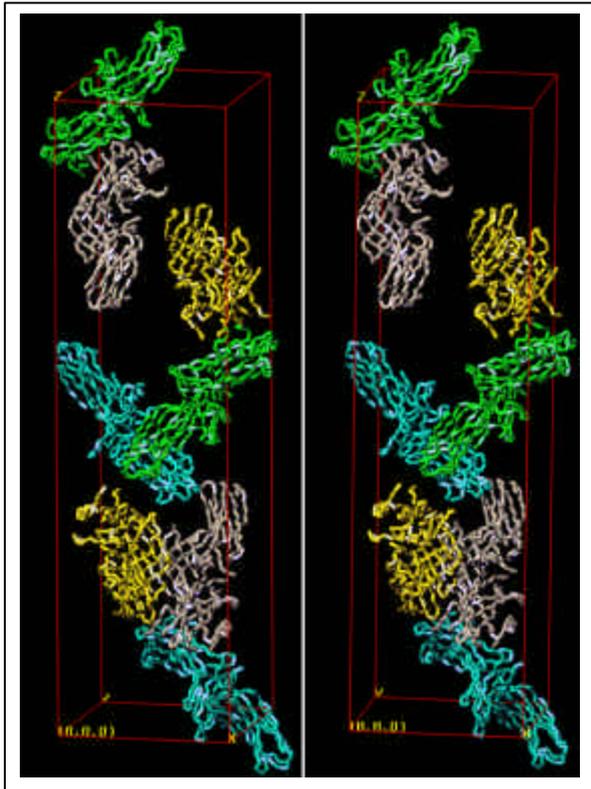


Abbildung 4.1: Position und Orientierung der β -Arrestinmoleküle in der Elementarzelle:

Das Stereobild zeigt, wie die C _{α} -Ketten der acht β -Arrestinmoleküle in der Elementarzelle orientiert sind. Dargestellt ist das 320 AS beinhaltende Poly-Alanin-Modell des (β -)Arrestins, das für den molekularen Ersatz verwendet wurde. Wie in Abschnitt 3.1.15. beschrieben, wird die asymmetrische Einheit des Kristalls aus zwei Molekülen, A (grün, türkis) und B (gelb, beige) gebildet. Die Elementarzelle ist als rotes Prisma dargestellt. Durch die Symmetrieoperationen der Raumgruppe P2₁2₁2₁ sind die Positionen der übrigen sechs Moleküle vorgegeben. Die Charakterisierung der Elementarzelle wurde von Dr. J. Labahn (FZ-Jülich) durch molekularen Ersatz des Arrestin-Modells durchgeführt. Bei dieser Methode wird aus dem Modell die Patterson-Funktion (Funktion der interatomaren Vektoren) „zurückgerechnet“ und mit dem Patterson-Raum des gemessenen Datensatzes in Bezug auf Rotation und Translation verglichen. Auf diese Weise kann die Position des β -Arrestins im realen Raum der Zelle ermittelt werden. Die Phasen aus dem Arrestin-Modell werden auf den Datensatz übertragen, wodurch man eine Elektronendichtekarte des Datensatzes erhält, die allerdings noch stark von dem Ausgangsmodell geprägt ist. Durch weitere Verfeinerung wird versucht, den Einfluß des ursprünglichen Modells zu vermindern und Informationen über die Dichteverteilung der nicht im Modell enthaltenen Molekülbereiche zu erhalten.

Die obige Abbildung zeigt die Lage der acht β -Arrestinmoleküle, deren Massenschwerpunkt innerhalb der Elementarzelle liegt. Betrachtet man die Verteilung der Moleküle über einen größeren Raum, so kann man die periodische Anordnung der Moleküle bzw. der Elementarzellen im Kristall erkennen. Abbildung 4.2 verdeutlicht, wie die β -Arrestinmoleküle im Kristall gepackt sind. Zu erkennen ist, daß sich in Längsrichtung der Elementarzelle (270 Å) Lagen aus Molekülen A mit dazu senkrecht orientierten Lagen aus Molekülen B abwechseln. In dieser Anordnung spiegelt sich die nichtkristallographische Symmetrieachse wieder, die parallel zur a/b-Flächendiagonale liegt, und durch die Molekül A auf Molekül B abgebildet werden kann. In dieser Anordnung kann die Packung aber auch als leicht gestörte tetragonale Symmetrie interpretiert werden. (vergleiche Abschnitt 3.1.14). Es ist durchaus möglich, daß die Kristalle ursprünglich eine korrekte, im Vergleich zur orthorhombischen Symmetrie höhere, tetragonale Symmetrie aufgewiesen haben. In einer derartigen Elementarzelle (dann: a = b) mit acht Molekülen bestünde die asymmetrische Einheit nur aus einem Molekül. Durch Schädigungen des Kristalls während des Wachstums oder des Einfrierens könnte die Packung dann derart gestört worden sein, so daß sie nur noch als orthorhombische Raumgruppe vorliegt. In einer derartigen Gitterstörung könnte ebenfalls die Ursache für die nach wie vor geringe, erreichbare Diffraktionsauflösung von 4.0 Å liegen.

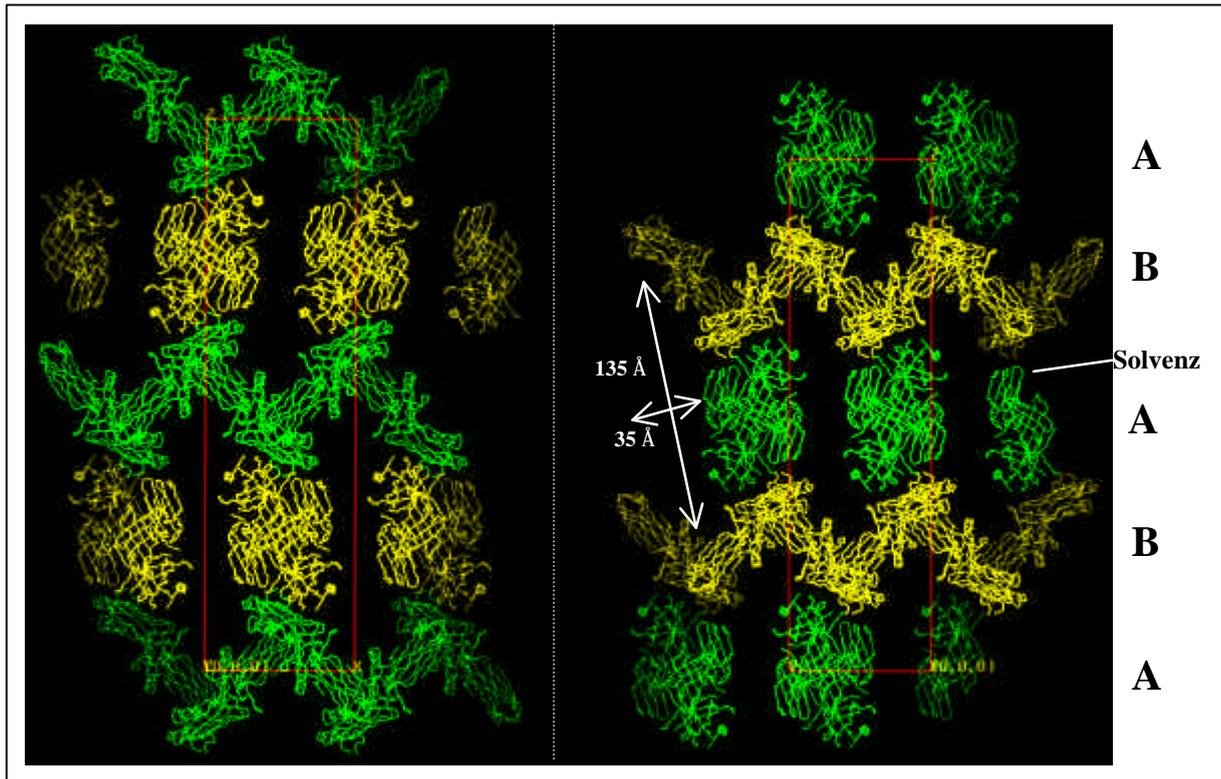


Abbildung 4.2 : Solvenzkanäle des b-Arrestin-Kristalls: links: Ansicht entlang der b-Achse (y), rechts: Ansicht entlang der a-Achse (x). Maße der Elementarzelle (rot): $a=75,46 \text{ \AA}$, $b=77,13 \text{ \AA}$, $c= 270,9 \text{ \AA}$. Moleküle A (unterste Schicht) sind in grüner, Moleküle B in gelber Farbe dargestellt. Pfeile: Abmessungen der Solvenzkanäle

Die geringe Stabilität der Kristalle wird auch verständlich, wenn man die Größe und Orientierung der Solvenzkanäle betrachtet. Mit 68,7 % liegt der Solvenzgehalt der Kristalle ohnehin über dem Durchschnitt für andere Proteinkristalle von ca. 50 % (McPherson, 1999). Mit Innenmaßen von ca. 135 \AA mal 35 \AA sind die Solvenzkanäle extrem groß. (zum Vergleich ein Molekül β -Arrestin hat ein Volumen von ca. $90 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA} \times 35 \text{ \AA}$) Dies bedeutet, daß der Kristall alleine ob seiner lockeren Packung sensibel gegen mechanische Deformation ist. Zu beachten ist allerdings, daß in Abbildung 4.2 nur die C_{α} -Kette des gekürzten Modell-Arrestin Moleküls aus der „Molekular-Ersatz-Methode“ mit 320 AS dargestellt ist. Nimmt man die Seitengruppen und die noch fehlenden „Loops“ hinzu, vergrößert sich das Molekül um ein Volumen von 47000 \AA^3 , das sich aber gleichmäßig über das Molekül verteilt.

4.1.5. Interaktion der Moleküle im Kristall

Über die intermolekularen Interaktionsflächen der Moleküle im Kristall, die zu der beobachteten Packung führen, kann zu diesem Zeitpunkt wegen der geringen Auflösung und der Unvollständigkeit des Modells noch keine konkrete Aussage gemacht werden. Eine Ausnahme hierzu stellt der unten abgebildete Interaktionsbereich der jeweils symmetrieäquivalenten Moleküle dar. Abbildung 4.3 gibt eine Sicht auf eine „Lage“ von symmetrieäquivalenten Molekülen (hier B-Moleküle). Man erkennt, daß sich jeweils die N-terminale Kuppel eines Moleküls (vergleiche Abbildung 1.2) an die C-terminale Kuppel des anderen Molekül anlagert. In der unteren Ansicht entsteht dadurch der Eindruck einer durchgehenden β -Faltblattstruktur, die eine „große Kuppel“ entstehen läßt.

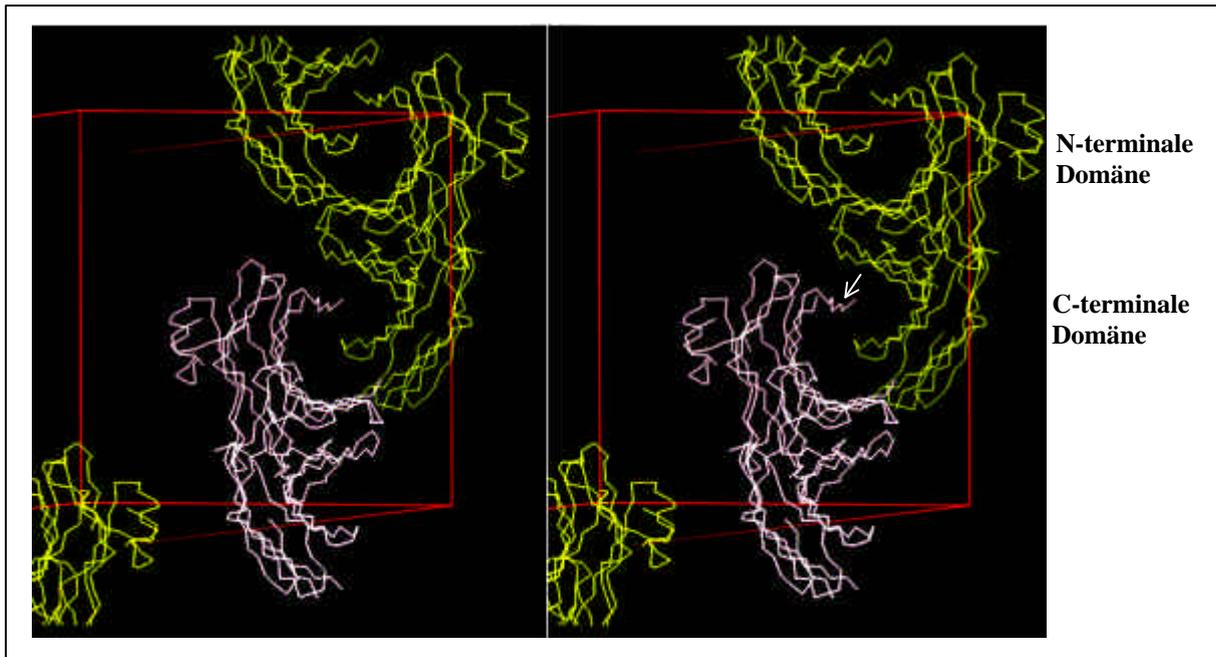


Abbildung 4.3 : Packung symmetrieäquivalenter Moleküle im Kristall: Das Stereobild zeigt in ungefährer Aufsicht auf die a/b-Ebene (rot), wie die symmetrieäquivalenten Moleküle (hier B-Moleküle) miteinander in Verbindung treten. Der Pfeil (rechts) deutet auf den Loop der AS 154 bis 165 hin.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß auch eine funktionale Dimerisierung des vis. Arrestins in Lösung, das im Kristall die gleiche Packung aufweist, diskutiert worden ist (Schubert et al, 1999).

Die Loopstruktur (Pfeil) besteht aus den AS 154 bis ca 165. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß durch diese Anordnung eine große Anzahl von basischen (positiv geladenen) Seitengruppen in Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen kommen. Man sollte erwarten, daß diese Packung aus energetischen Gründen nicht besonders „attraktiv“ ist. Hierin könnte der Grund dafür liegen, daß die Kristallisation von β -Arrestin bisher nur unter Bedingungen hoher Ionenstärke zu beobachten war (siehe Abschnitt 3.1.10.1.). Durch die hohen Salzkonzentration können die positiven Ladungen der Seitenketten abgeschirmt werden.

4.1.6. Differenzdichte-Analyse der Kristalle

Mit den Datensätzen „holy_2a“ und „2000_88“ (vergl. Tab. 3.7) liegen Daten von Kristallen vor, die in An- bzw. Abwesenheit von IP_6 und HgCl_2 gewachsen waren. Errechnet man für beide Datensätze eine Elektronendichte-Karte, so kann man aus der Differenz der Elektronendichte die Unterschiede in der jeweiligen Struktur bzw. die Position der gebundenen Liganden ermitteln.

Ein erster wichtiger Befund der kristallographischen Analyse ist, daß beide Kristallderivate (nativ und $\text{IP}_6/\text{HgCl}_2$) bei 6,5 Å isomorph sind, das heißt mit gleicher Packung und Konformation, kristallisierten. Dies bestätigt die Vermutung anhand der Kristallmorphologie und der Gitterkonstanten, daß die Ligandenbindung keine Veränderung von Struktur und Packung des kristallisierten Proteins induziert. Die Differenzdichtekarte ist aufgrund der niedrigen Auflösung bisher nicht für alle Differenzdichten interpretierbar.

Ein Differenzdichtebereich in der C-terminalen Kuppel der Moleküle hob sich allerdings signifikant von den übrigen Signalen ab. Der in Abbildung 4.4 markierte Bereich konnte aufgrund seiner Dichte eindeutig dem IP_6 -Molekül zugeordnet werden.

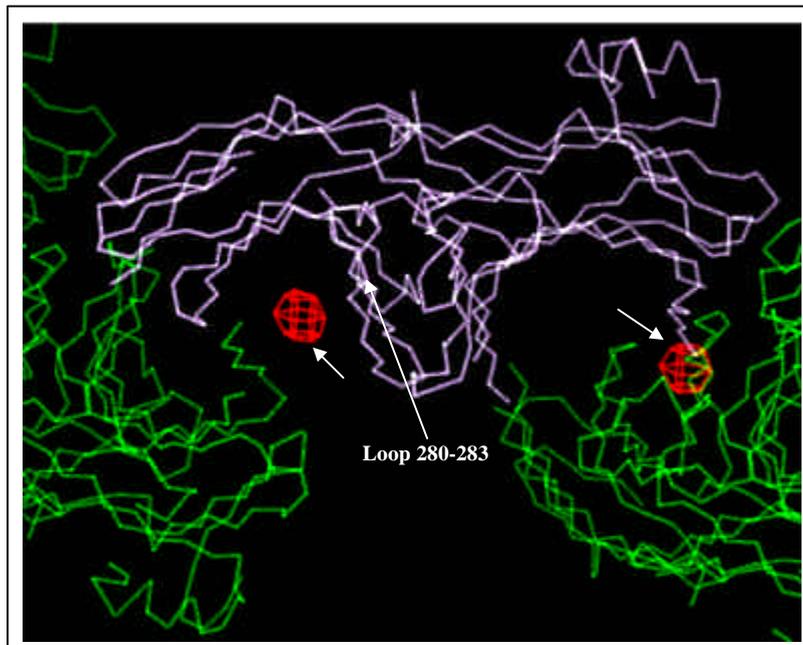


Abbildung 4.4 : Position des gebundenen IP₆ : Abgebildet ist die Differenzdichtekarte zusammen mit dem Packungsmodell von β -Arrestin. Die Blickrichtung entspricht der in Abbildung 4.3. und zeigt hier die Sicht auf eine Lage von „A-Molekülen“. Für „B-Moleküle“ ergibt sich das gleiche Bild. Bei einem Konturlevel von 5 rms (root mean square) sind die gezeigten Dichten (rot) die einzig Beobachtbaren in der asymmetrischen Einheit.

IP₆ bindet in der C-terminalen Kuppel des β -Arrestinmoleküls und verbrückt gleichzeitig auch zwei symmetrieäquivalente Moleküle. Wie bereits erwähnt, zeichnen sich die relevanten Abschnitte der beteiligten Moleküle durch eine hohe Dichte an basischen Seitenketten aus. Über die negativen Ladungen der Phosphatreste des IP₆ werden diese positiv geladenen Bereiche über Salzbrücken miteinander verknüpft und folglich die Packung der Moleküle im Kristall stabilisiert. Dies erklärt, warum „IP₆-Kristalle“ reproduzierbar deutlich bessere Diffraktions-Eigenschaften aufweisen. Durch die Abschirmung der positiven Ladungen erleichtert IP₆ zusätzlich die Aneinanderlagerung der Proteine während des Kristallwachstums. Eine eindeutige Interpretation, worin der positive Einfluß der IP₆-Bindung auf die Stabilität des Proteins in Lösung besteht, läßt dieser Befund nicht zu. Zu vermuten ist, wie bereits beschrieben, daß IP₆ das β -Arrestin in einer gegen Präzipitation und Oxidation stabilisierten Konformation hält. Anhand der Differenzdichte konnten keine Anzeichen für weitere gebundene IP₆-Moleküle gefunden werden. Pro Molekül β -Arrestin ist demnach ein Molekül IP₆ gebunden.

4.1.7. Charakterisierung der IP₆-Bindestelle

Betrachtet man die IP₆-Bindestelle im Detail, lassen sich unter Verwendung des, für die „Molekular-Ersatz“-Methode verwendeten Arrestin-Modells zur Bestimmung der Positionen der äquivalenten Aminosäuren des β -Arrestins, die einzelnen basischen Aminosäuren zuordnen, die über Salzbrücken bzw. Wasserstoff-Brücken mit den Phosphatresten des IP₆-Moleküls interagieren.

In den β -Arrestin-Kristallen ist IP₆ an einer Position gebunden, die einen direkten Kontakt zu fünf basischen Aminosäuren der C-terminalen Kuppel des Molekül A₁ (Lys 230, Arg 234, Lys 248, Lys 322 und Lys 324) sowie zu drei positiv geladenen Seitengruppen von Molekül A₂ (Lys 158, Arg 159 und Arg 163) erlaubt und damit die Packung der Moleküle stabilisiert. Hauptsächlich in der C-terminalen Kuppel liegen noch weitere positiv geladene Seitengruppen, die ebenfalls zu den elektrostatischen Wechselwirkungen mit IP₆ beitragen.

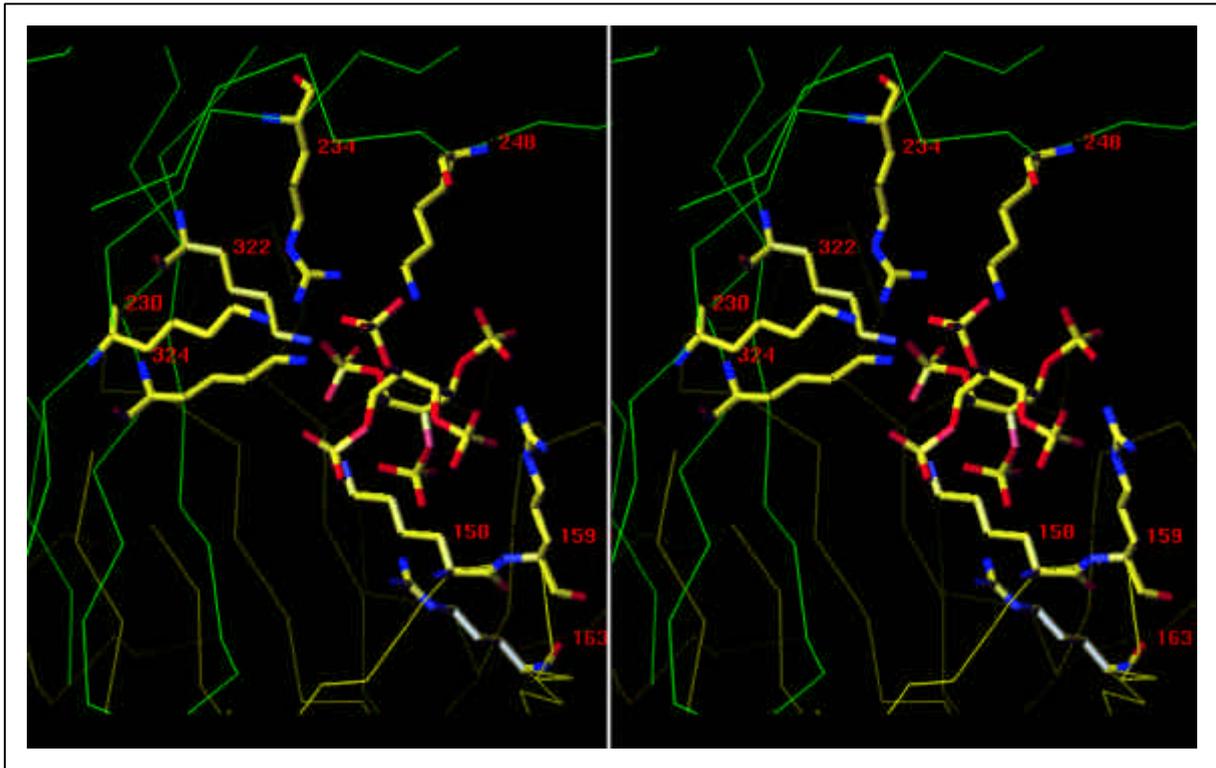


Abbildung 4.5 : Koordination von IP₆ durch β -Arrestin: Stereobild der IP₆-Bindestelle von β -Arrestin. Folgende Seitengruppen sind dargestellt (Numerierung in Sequenzvergleich, Abbildung 1.1). **Molekül A₁** (grün): Lys 230 (239), Arg 234 (243), Lys 248 (257), Lys 322 (331) und Lys 324 (333). **Molekül A₂** (gelb): Lys 158 (166), Arg 159 (167) und Arg 163 (172). Das IP₆-Molekül sowie die Seitengruppen sind in jeweils erlaubten Standardkonformationen dargestellt.

Von besonderem Interesse sind hierbei die Aminosäuren Arg 280, Lys 282 und Arg 283. Diese liegen in einem Loop (siehe Abbildung 4.4) und haben in der Konformation des Modells keinen direkten Kontakt zum IP₆. Durch eine geringe Konformationsänderung, verbunden mit dem „Umklappen“ dieses Loops, würden diese Seitengruppen in unmittelbarem Kontakt zum IP₆ treten (nicht gezeigt).

4.1.8. Arrestine und Inositolphosphatderivate

β -Arrestine üben eine doppelte Funktion in der Regulation von GPCRs aus. Zum einen binden sie an die Rezeptoren und unterbrechen die Signalweiterleitung über G-Proteine, zum anderen dienen sie als Adapterproteine, mit denen sie die Rezeptoren an die Clathrin-coated pits koppeln und damit die Rezeptorinternalisierung vermitteln.

Über die genauen Bereiche des β -Arrestins, durch die die Rezeptorbindung vermittelt wird, sind wenige Fakten bekannt (siehe auch Abschnitt 1.1.3.). Intensiver wurde die Interaktion von visuellen Arrestin an lichtaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin untersucht. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen Arrestin und β -Arrestin und der Tatsache, daß die Arrestine reziprok an die Rezeptoren binden können, sind die Befunde über Arrestin zumindest bedingt auch auf β -Arrestin übertragbar. Über Bindungsstellen und Regulationsmechanismen der Bindung von Arrestin an Rhodopsin sind verschiedene, teilweise kontroverse Modelle vorgeschlagen worden (Ohguro et al, 1994; Palczewski et al., 1994a und 1994b; Gurevich 1998). Allgemeiner Konsens scheint darüber zu herrschen, daß die Erkennung des phosphorylierten Zustandes des Rezeptores durch polybasische Regionen in der C- und/oder N-terminalen Kuppel des Arrestins vermittelt wird.

Die Erkennung und Bindung des phosphorylierten Rezeptors soll einhergehen mit einer Reihe von putativen Konformationsänderungen, die die Position der Kuppeln zueinander verändern.

Als ein putativer Regulator dieser Interaktionen wurden Phosphoinositide und Inositolphosphate diskutiert. Es ist bekannt, daß Inositolhexaphosphat (IP₆) sowohl an Arrestin als auch an β -Arrestin binden kann. (Palczewski et al., 1991; Gaidarov et al., 1999). *In vitro* bindet IP₆ etwa 200 mal stärker an β -Arrestin als an Arrestin und inhibiert sowohl die Bindung von Arrestin und β -Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin als auch die von β -Arrestin an Clathrin. Gaidarov und Mitarbeiter gelang es 1999 durch eingehende Studien, eine Phosphoinositid-Bindestelle in der C-terminalen Kuppel von β -Arrestin 2 zu lokalisieren. Durch Mutagenese- und Bindungsstudien identifizierten sie die Aminosäuren Lys 233, Arg 237 und Lys 251 als hauptsächlich verantwortlich für die Bindung von Phosphoinositiden. Diese Seitengruppen entsprechen den Seitengruppen 230, 234 und 248 in β -Arrestin 1, die, wie oben beschrieben, die Koordination von IP₆ in den β -Arrestinkristallen vermitteln.

Mutiertes- β -Arrestin 2 (K₂₃₃R₂₃₇K₂₅₁/Q) bindet IP₆ im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein mit geringerer Affinität. Andererseits werden sowohl wildtyp- als auch mutiertes β -Arrestin 2 durch IP₆ in ihrer Bindung an Clathrin und Rhodopsin in etwa gleichstark inhibiert. Gleichzeitig werden diese Bindungen durch Phosphoinositide, für die die Bindung an die drei beschriebenen Seitengruppen eindeutig gezeigt werden konnte, nicht inhibiert. Aufgrund dieser Befunde aus *in vitro* Bindungsstudien von wt- β -Arrestin 2 und der Mutante postulieren Gaidarov und Mitarbeiter eine hochaffine Bindestelle für Phosphoinositide an der beschriebenen Position sowie eine zweite Bindestelle für IP₆, die eine geringere Affinität besitzt. Besetzung dieser Bindestelle mit IP₆ wirkt inhibierend, während Besetzung der hochaffinen Bindestelle mit Phosphoinositiden keinen Einfluß auf das Bindungsverhalten von β -Arrestin hat.

Diese Interpretation in Bezug auf eine weitere Bindestelle steht zunächst im Gegensatz zu der ermittelten Position von IP₆ im β -Arrestinkristall und dem Befund, daß nur ein einziges IP₆ pro Molekül gefunden wurde.

Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch liegt in der Tatsache, daß in der oben beschriebenen Studie das Hexainositolphosphat (IP₆) mit dem Phosphoinositid di-C8-PI-(3,4,5)-P₃ (PIP₃) verglichen werden. Während IP₆ sechs Phosphatgruppen in einem kompakten Molekül konzentriert, besitzt PIP₃ nur drei Phosphatgruppen, die in ihrer Orientierung zusätzlich durch die Diacylglycerol-Gruppe eingeschränkt sind.

Betrachtet man die Redundanz an basischen Seitengruppen, die in der IP₆-Bindestelle liegen (siehe Abbildung 4.5) und die Beweglichkeit eines kleinen IP₆-Moleküls (freie Drehbarkeit), ist vorstellbar, daß Deletion dreier positiver Ladungen durch Mutation einen relativ geringen Einfluß auf die Bindung von IP₆ hat. Phosphoinositide hingegen sind eventuell aufgrund ihrer restringierteren Mobilität (lange Diacylketten) und der geringeren Anzahl an Phosphatresten spezifisch auf die Präsenz der drei relevanten positiven Ladungen angewiesen, um an β -Arrestin zu binden. Die von Gaidarov ermittelten Bindungskonstanten von IP₆ (0,058 μ M) und PIP₃ (0,28 μ M) unterstützen diese Interpretation.

Angesichts der Tatsache, daß in der Packung des Kristalls zwei Moleküle β -Arrestin durch ein IP₆-Molekül verbrückt werden, könnte allerdings tatsächlich auf eine zweite Bindestelle für Inositolphosphate und evtl. auch Phosphoinositide hindeuten. Diese würde dann u.a. durch die Aminosäuren Lys 158, Arg 159 und Arg 163 (β -Arrestin 1) gebildet werden.

Durch Mutagenese- und Bindungsstudien muß diese Hypothese überprüft werden.

4.1.8.1. IP₆-Bindung an β -Arrestin im Vergleich zu Arrestin

Interessant ist, daß in den von Gaidarov durchgeführten Studien der Austausch alleine von Arg 237 gegen Glutamat (negative Ladung) die Bindungsstärke von IP₆ an β -Arrestin 2 erheblich verminderte, zusätzlicher Austausch von Lys 233 gegen Glutamat die Bindung fast

vollständig inhibierte. Visuelles Arrestin besitzt an der homologen Position (242) ebenfalls ein Glutamat. Hierdurch könnte die im Vergleich zu β -Arrestin 200fach geringere Affinität von visuellem Arrestin zu IP_6 erklärt werden.

Die IP_6 -Bindungsstellen in Arrestin wurden von J. Granzin untersucht (Granzin et al., in Vorbereitung). Für diese Untersuchungen wurden Kristalle von visuellem Arrestin mit IP_6 -haltigem Puffer getränkt und kristallographisch untersucht. Die Analyse ergab drei mehr oder minder stark besetzte Positionen von IP_6 , das teilweise ebenfalls durch Seitengruppen verschiedener Moleküle (A bis D) der asymmetrischen Einheit gebunden wird:

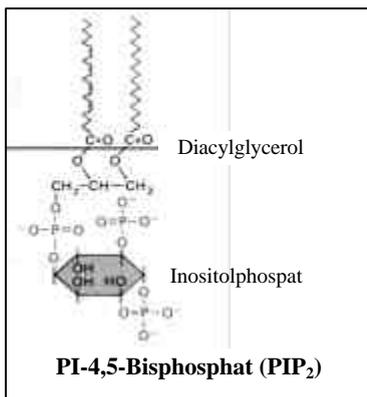
Position 1: Lys 15 (D), Arg 18 (D), Lys 166 (D) und Arg 171 (D);

Position 2: Ser 229 (A), Asn 246 (B), Asn 271 (A), Ser 326 (B), Gln 328 (B) und Glu 350 (B);

Position 3: Ser 229 (C), Glu 242 (D), Tyr 254 (D), Asn 271 (C), Ser 326 (D), Gln 328 (D) und Glu 350 (D)

Im Vergleich zum β -Arrestin ist vor allem die N-terminale Position 1 von Interesse. Die Arrestinseitengruppen Lys 166 und Arg 171 entsprechen den β -Arrestinseitengruppen Lys 155 und Arg 163, die auch im β -Arrestinkristall an der Koordination des IP_6 beteiligt sind, wobei Lys 155 nicht in direkten Kontakt mit IP_6 tritt (nicht gezeigt). Letzteres kann allerdings auch durch die geringe Auflösung fehlinterpretiert sein. Bindung von IP_6 an die homologen Seitengruppen zu Lys 15 und Arg 18 (Lys 11 und Pro 18) ist für β -Arrestin nicht beobachtet worden. Dennoch könnte dieser Befund im Rückschluß auf eine zweite IP_6 -Bindestelle schließen lassen. Ein entscheidender Nachteil der „Soaking methode“ besteht allerdings darin, daß das IP_6 an Arrestin in einem bereits ausgebildeten Kristallgitter bindet, wobei unter Umständen Bindungsstellen nicht, teilweise oder mit veränderten Koordinationseigenschaften zugänglich sind. Im Falle des β -Arrestin ist dies nicht zu befürchten, da das IP_6 bereits vor der Kristallisation an des Protein gebunden war. Aufgrund der Anteile der beiden β -Arrestin Moleküle an der Koordination vom IP_6 im Kristall kann davon ausgegangen werden, daß das Protein in Lösung über die C-terminalen Aminosäuren an IP_6 gebunden ist, respektive β -Arrestin in Lösung als, durch IP_6 verbundenes, Dimer vorliegt.

4.1.8.2. Regulatorische Bedeutung von Phosphoinositiden



Versteht man die Erkennung des aktivierten Rezeptors und Bindung daran als einen rein kompetitiven Prozeß von IP_6 bzw. PIP_3 mit den Phosphatgruppen des Rezeptors um die „Phosphatkoordinations-Stellen in der C-terminalen Kuppel von β -Arrestin, so wird der inhibierende Effekt des fest gebundenen IP_6 verständlich.

Es wird aber davon ausgegangen, daß Rezeptorerkennung und Bindung ein mehrstufiger Prozess ist, der mit Konformationsänderungen im (β -) Arrestinmolekül verbunden ist.

Worin besteht nun der inhibitorische Effekt von IP_6 bzw. der regulatorische Einfluß von Phosphoinositiden auf die

Rhodopsin- und ggf. die Clathrinbindung von (β -) Arrestinen? Über den Diacylrest sind Phosphoinositide in Membranen verankert und können somit an sie gebundene Moleküle beispielsweise an die Plasmamembran rekrutieren. Hierdurch können sie entscheidenden Einfluß auf die Regulation von Signalwegen nehmen (zusammengefaßt in De Camilli et al., 1996).

Es konnte von Gaidarov und Mitarbeitern 1999 gezeigt werden, daß PIP_3 *in vitro* keinen Einfluß auf die Clathrinbindung von β -Arrestin hat. *In vivo* exprimiertes β -Arrestin 2 stimulierte die Clathrin vermittelte Internalisierung, während diese durch die ektopische Expression des PIP_3 -bindungsdefizienten, mutierten β -Arrestins in dominant negativer

Weise inhibiert wurde. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß wt- β -Arrestin nach Aktivierung β_2 -Adrenerger Rezeptoren aus dem Cytosol an die Plasmamembran und die Coated Pits rekrutiert wurde, während mut- β -Arrestin im Cytosol verblieb bzw. nur geringfügig an der Membran angereichert vorlag, nicht aber in den Coated Pits (Gaidarov et al., 1999).

Eine Interpretation dieser Befunde ist, daß β -Arrestin durch die Bindung an Phosphoinositide an der Membran anreichert und fixiert wird. Diese Bindung könnte vor oder nach der Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor erfolgen. Der erhöhte Anteil an mut- β -Arrestin an der Membran würde die Fraktion widerspiegeln, die bereits über Rezeptorbindung an der Membran arretiert ist. Da sich β -Arrestin in nicht stimulierten Zellen im Cytoplasma verteilt aufhält ist es wahrscheinlich, daß die Bindungsfähigkeit von β -Arrestin an membranständige Phosphoinositide nach Rezeptorbindung durch eine Konformationsänderung des β -Arrestins induziert wird. Der dominant-negative Einfluß des mutierten β -Arrestins deutet ebenfalls darauf hin, daß die Wirkung von PIP_3 nicht für die Rezeptorbindung selbst essentiell ist sondern für Prozesse, die zwischen der Rezeptorbindung und der Internalisierung stattfinden. Gleichzeitig scheint Phosphoinositidbindung essentiell für die Internalisierung des Rezeptors *in vivo* nicht aber für die Bindung an Clathrin *in vitro* zu sein.

Phosphoinositide scheinen also über ihre Funktion als Membranverankerungspunkte weitere regulatorische Funktionen für β -Arrestin zu haben. Hinweise hierauf ergeben sich auch aus Befunden, daß Phosphoinositide auch in der Funktion und Regulation von AP2 eine Rolle spielen, einem Proteinkomplex, der wie β -Arrestin als Clathrin-Adapter dient (Rapoport et al., 1997; Beck & Keen, 1991)

Welche physiologische Rolle IP_6 bei der Regulation von β -Arrestin *in vivo* spielt, bleibt aber bisher völlig ungeklärt. Vorstellbar wäre, daß Inositolphosphate wie zum Beispiel der „second messenger“ IP_3 in die Signalkaskade eingreifen können. Experimentelle Befunde liegen hierzu allerdings noch nicht vor.

Zu diskutieren wäre, ob es ein Zusammenhang besteht zwischen der Inhibierung der Clathrinbindung von β -Arrestin durch die Phosphorylierung von Ser 412 (siehe Abschnitt 1.1.5.) und Förderung der Internalisierung durch die Bindung von Phosphoinositiden. Die Phosphorylierung inhibiert die Clathrinbindung, nicht aber die Rezeptorbindung. Folgerichtig stellt sich die Frage, ob der phosphorylierte C-Terminus von β -Arrestin über das negativ geladene Phosphoserin 412 an die positiv geladene Inositolphosphat-Bindestelle gebunden wird. Unterstützt werden könnte diese Bindung durch den stark negativ geladenen Bereich des Protein vor diesem Serin (401-**DDKEEEED**-408), der im Gegensatz zu β -Arrestin 2 und vis. Arrestin nur in β -Arrestin 1 auftritt. Der Phosphorylierungszustand könnte dann als Auslöser einer Konformationsänderung fungieren, der den C-Terminus, samt Clathrin-Bindedomäne zugänglich macht oder die Verdrängung durch Phosphoinositide ermöglicht.

4.1.9 Weitere Auswertung der kristallographischen Daten

Neben der direkten Bestätigung der von Gaidarov und Mitarbeitern postulierten Phosphoinositidbindestelle und Zweifeln an einer weiteren IP_6 -Bindestelle, waren bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Informationen aus den kristallographischen Daten zu gewinnen. Bisher ist lediglich die Struktur des „Proteinkerns“, soweit er homolog zu Arrestin ist, bestimmt. Aus der Elektronendichtekarte ist aber schon erkennbar, daß Elektronendichte-Informationen über mindestens 40 Aminosäuren des C-Terminus vorliegen, die in der Arrestinstruktur nicht enthalten sind. In diesem Bereich liegt auch die Clathrin-Bindedomäne des β -Arrestins, deren Struktur von höchstem Interesse ist. Bisher liegen zur Struktur dieser Domäne nur Informationen aus der Co-Kristallisation von AP2 mit β -Arrestinpeptiden vor

(Neer & Smith, 2000). In den verschiedenen Funktions- und Konformationsmodellen wird der C-Terminus von Arrestin an verschiedenen Positionen im Molekül vermutet. Informationen zur tatsächlichen Struktur und Position anhand der Röntgenstruktur sollte hier für Klarheit sorgen. Analoges gilt für die verschiedenen Modelle zur Interaktion und Bindung von β -Arrestin und Arrestin an die verschiedenen Rezeptoren.

4.1.10 Ausblick auf weitere Experimente zu β -Arrestin

Im Vergleich mit dem analogen Expressionssystem für visuelles Arrestin konnte die Reinigungseffizienz dramatisch verbessert werden. Durch das verbesserte Verfahren wird es nunmehr möglich sein, p44, eine Splicevariante von visuellem Arrestin in für die Kristallisation ausreichenden Mengen zu gewinnen. Erste Versuche hierzu zeigten, daß mit dem beschriebenen System bis zu 1,5 mg p44 pro Gramm Hefezellen in reiner und konzentrierter Form gereinigt werden können. Bisher waren nur Ausbeuten von 3,5 μ g / Gramm Hefe erzielt worden (B. Krafft, Dissertation 1999). In Verbindung mit IP₆ konnten durch das Phosphatpuffer-System auch Mutanten von Arrestin in löslicher Form isoliert werden, die sich bisher jeder Reinigung entzogen. Durch die Verfügbarkeit großer Mengen dieser Proteine sollten durch Kristallisations- und Bindungsstudien neue Erkenntnisse in Bezug auf die Mechanismen gewonnen werden können, die der Bindung von Arrestin an Rhodopsin sowie deren Regulation zugrunde liegen. Diese Ergebnisse könnten, ob der nahen Verwandtschaft der beiden Proteine, auch einen positiven Einfluß auf das Verständnis von β -Arrestin und dessen Regulation haben.

Ebenfalls zu evaluieren ist, in wie weit das entwickelte System übertragbar ist auf die rekombinante Produktion und Reinigung der Retina-Zapfen-Arrestine (X-Arrestine). Diese Arrestine vermitteln die adaptive Regulation des Rhodopsins in den Retina-Zapfen, in denen die Perzeption von Farben stattfindet. Es scheint, daß hier verschiedene X-Arrestine die verschiedenen Farbbeimpfindungen selektiv regulieren (Craft & Whitmore, 1995, Sakuma et al., 1998). Über diese Proteine ist, auch weil sie bisher nicht in großen Mengen isoliert werden konnten, nur wenig bekannt.

Das wichtigste Ziel ist und bleibt vorläufig die Ermittlung der Proteinstruktur von β -Arrestin bei hoher Auflösung. Mit den momentan zur Verfügung stehenden kristallographischen Daten mit einer auswertbaren Auflösung von 4.0 Å wird es wahrscheinlich möglich sein, den Kettenverlauf des Proteins zu bestimmen. Mit diesen Informationen alleine werden sicherlich schon einige Fragestellungen in Bezug auf die grobe Regulation des Proteins beantwortet werden können, aber auch viele neue Fragen auftreten. Um die ungefähre Orientierung der Proteinseitenketten zu bestimmen, sind Auflösungen von mindestens 3.6 Å erforderlich. Um dies zu erreichen, muß die Stabilität der Kristalle erhöht werden. Zunächst wird evaluiert werden, in wie weit sich die Kristallstabilität mit dem derzeit verwendeten Tartratsystem weiter optimieren läßt bzw. ob sie mit IP₆ unter den anderen Bedingungen erhöht werden kann, unter denen erfolgreich Kristalle hergestellt werden konnten (vergl. Abschnitt 3.1.10.1). Ebenfalls zu untersuchen ist, welchen Einfluß andere Inositolphosphate auf die Kristallstabilität haben. Sollte es sich aus den vorläufigen Struktur-Informationen ergeben, daß die drei verbliebenen Cysteine im (4C-S)- β -Arrestin für die Oxidationssensitivität des nicht IP₆ gebundenen Proteins verantwortlich sind, stellt der Austausch auch dieser Seitengruppen einen Erfolg versprechenden Ansatz zur Stabilitätserhöhung des Proteins und der Kristalle dar.

Durch Auswertung der „Quecksilber-Daten“ und evtl. weiterer Schwermetall-Derivate wird es möglich sein, die β -Arrestin-Struktur völlig unabhängig von dem Arrestin-Modell zu

bestimmen. Hierdurch wird es möglich sein, auch kleinste strukturelle Unterschiede zwischen diesen beiden Proteinen aufzulösen.

Ein ambitionierter, aber denkbarer Ansatz zur Stabilisierung der Kristallpackung ergibt sich aus den immens großen Solvenzkanälen in den Kristallen. Um die Stabilität der Packung zu stärken wird versucht werden, diese „Löcher“ zu füllen. Ein Ansatz hierfür werden die Co-Kristallisation von β -Arrestin mit der N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne von Clathrin bzw. „Soaking“-Experimente hiermit sein. In wie weit dieser Ansatz mit IP₆, welches Clathrinbindung inhibiert, bzw. dem hier kristallisierten β -Arrestin-Konformer kompatibel ist, muß evaluiert werden.

Eine faszinierende Perspektive bietet die Co-Kristallisation von β -Arrestin mit dem β -Adrenergen Rezeptor oder anderen GPCRs, was allerdings bisher noch an der Verfügbarkeit großer Mengen dieser Rezeptoren (mit Ausnahme von Rhodopsin) scheitert.

Anhand einer hochaufgelösten Molekülstruktur werden rational geplante Mutagenese-Experimente möglich sein, anhand derer die Funktion, die Regulation und die Dynamik von β -Arrestin untersucht werden kann. Mit den in dieser Arbeit etablierten Expressions- und Reinigungsbedingungen steht erstmalig das Werkzeug zur Herstellung dieser rekombinanten Mutanten-Proteine in größerem Maßstab in einem eukaryotischen Hintergrund zur Verfügung. Über die verwendeten Affinitätstags könnte β -Arrestin an eine feste Matrix (Sepharose) gebunden werden und zur Reinigung von GPCRs aber auch zur Identifizierung weiterer Bindungspartner von β -Arrestin verwendet werden.

4.2 *Rattus norvegicus* PAR-4

Das Prostate Apoptosis Response 4 Protein spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation des programmierten Zelltodes sowohl in einigen Tumorzellarten als auch in neuronalen Zellen. Es scheint eine Schlüsselfunktion in der Symptomatik vieler neurodegenerativer Erkrankungen zu besetzen. Die Verbindung von PAR-4 mit der Alzheimer oder Parkinson Krankheit, aber auch mit Prostata- und Nierenkrebs, um nur einige zu nennen, verdeutlicht die immense medizinische Relevanz dieses Proteins.

PAR-4 scheint in der Aktionskaskade, die zur Apoptose der Zelle führt, an einem sehr frühen Zeitpunkt aktiv zu sein. Mit WT 1, PKC ζ und Dlk sind bereits drei direkte Interaktionspartner von PAR-4 charakterisiert worden (siehe Abschnitt 1.2 und Referenzen darin). Diese Interaktion scheint über die C-terminal gelegene Leucin-Zipper- bzw. Death-Domäne von PAR-4 vermittelt zu werden. Obwohl die Interaktionspartner teilweise ebenfalls eine Leucin-Zipper-Domäne besitzen, bindet PAR-4 aber nicht an diese Bereiche sondern an Zinkfinger-Strukturen bzw. eine argininreiche Region (Dlk). Diese Befunde machen PAR-4 neben seiner medizinischen Bedeutung auch aus struktureller Sicht interessant, da hier offenbar ein neuer, noch nicht strukturell charakterisierter, Proteininteraktionsmechanismus vorliegt.

Bisher sind keine Methoden beschrieben, mit denen PAR-4 in großen Mengen (Milligrammmaßstab) isoliert werden kann. Für die bisher durchgeführten Studien wurde PAR-4 entweder *in vitro* translatiert oder direkt in Zellkultursystemen exprimiert.

Ziel der hier beschriebenen Experimente war daher, PAR-4 zunächst in großem Maßstab herzustellen, zu isolieren und zu kristallisieren.

4.2.1. Heterologe Expression und Reinigung von PAR-4

Initiale Versuche zur Expression von PAR-4 wurden mit dem *S.cerevisiae*-System durchgeführt. Obwohl das Protein in Hefen in großen Mengen und löslicher Form exprimiert wird, scheiterte die Isolierung und Konzentrierung von PAR-4 über affinitätschromatographische Methoden zunächst an der geringen Stabilität und Löslichkeit des Proteins außerhalb der Umgebung des Hefecytosols. Gleiche Beobachtungen mußten bei ersten Expressionsversuchen mit *E.coli* gemacht werden. Nach intensiven Optimierungsexperimenten gelang es schließlich durch Verwendung hoher Konzentrationen von Magnesiumionen bei einem pH-Wert von 7,3, PAR-4 sowohl aus Hefe als auch aus *E.coli* in hohen Konzentrationen und hoher Reinheit zu isolieren und scheinbar stabil in Lösung zu halten. Gleichzeitig konnte bereits präzipitiertes Protein durch Ansenkung des pH-Wertes auf 3 bis 4 resolubilisiert werden. Die native Faltung des Proteins ist in dieser Umgebung allerdings zweifelhaft, wie später anhand biophysikalischer Studien gezeigt werden wird.

Die Vermutung lag nahe, daß das Protein im Cytosol der Expressionsorganismen durch weitere, bisher unbekannte Faktoren stabilisiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß Zellaufschluß, Reinigung und Konzentrierung in „proteinfreiem“ *E.coli*-Cytosol („Größe“ <10 kDa) auch in Abwesenheit hoher Magnesiumkonzentrationen erfolgreich war (nicht gezeigt). Bei dem stabilisierenden Faktor handelt es sich demnach um einen niedermolekularen Stoff, dessen Identität bisher aber noch völlig ungeklärt ist.

4.2.2 Funktionalität und Faltung des isolierten PAR-4

In Gegenwart hoher Konzentrationen von $MgCl_2$ gelang es, PAR-4 bis über 20 mg/ml zu konzentrieren. Bekannt ist allerdings, daß zweiwertige Kationen entfaltete Proteinstrukturen vor Präzipitation schützen, indem sie eine hohe positive Ladungsdichte an der Oberfläche des Proteins applizieren (siehe Abschnitt 3.2.5.). Aufgrund dieser Zweifel an einem nativen Faltungszustand des isolierten PAR-4 wurde zum einen die physiologische Funktionalität von PAR-4 in einem Kinasetest untersucht, zum anderen wurden biophysikalische Messungen an dem Protein durchgeführt, die direkten Einblick in den Faltungszustand ermöglichen. Angewendet wurde die NMR-Spektroskopie, die CD-Spektroskopie und die FTIR-Spektroskopie (siehe Abschnitte 3.2.5.2 bis 3.2.5.4). Ergänzend wurden mit Dr. V. Gordeliy aus unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit dem Institut für Festkörperphysik am FZ-Jülich Neutronen-Kleinwinkel-Beugungsexperimente (SANS) an PAR-4 durchgeführt, die Aufschluß über die äußere Form des Proteinmoleküls geben sollen (Daten nicht gezeigt).

Die Kinasetests mit Dlk ergaben, daß PAR-4 als Substrat für die Phosphorylierung dient. Die Signifikanz dieser Ergebnisse in Bezug auf die korrekte Faltung des Proteins wird allerdings dadurch gemindert, daß sowohl hitzedenaturiertes wie auch proteolytisch degradiertes PAR-4 von Dlk erkannt und phosphoryliert wird. Die Beobachtung, daß in *S.cerevisiae* exprimiertes und offenbar posttranslational modifiziertes PAR-4 mit der höchsten Effizienz phosphoryliert wird, gibt einen Hinweis darauf, daß posttranslationale Modifikationen für die Funktionalität von PAR-4 bedeutsam sind. Über Art und Ausmaß der Modifikationen liegen allerdings noch keine experimentellen Ergebnisse vor.

Sowohl mit NMR- als auch CD-Spektroskopie konnten keine Anzeichen gefunden werden, die auf eine intakte Tertiärstruktur des Proteins hindeuten. Mit der NMR-Methode konnten α -Helices und β -Faltblattbereiche nachgewiesen werden. Eine qualitative wie auch quantitative Aussage über die Sekundärstrukturelemente von PAR-4 konnte durch die Ergebnisse aus der FTIR-Spektroskopie gemacht werden. Hiernach besteht das PAR-4-Molekül zu ca. 50% aus β -Faltblatt-Strukturen und zu ca. 20% aus α -helikalen Bereichen.

Der hohe Anteil an β -Faltblattstrukturen könnte erklären, warum die CD-spektroskopische Analyse keine eindeutigen Befunde brachte. Während die FTIR-Spektroskopie eine hohe Sensitivität für β -Faltblattstruktur aufweist, werden mit der CD-Spektroskopie α -helikale Strukturen mit höherer Sensitivität detektiert.

Die FTIR-spektroskopische Analyse von resolubilisiertem PAR-4 bei pH 3,2 ergab, daß das Protein unter diesen Bedingungen keine signifikanten Anzeichen von Sekundärstruktur aufweist, es offenbar tatsächlich denaturiert ist (nicht gezeigt).

Die Neutronenbeugungsexperimente an PAR-4 in Lösung (D_2O) sind bisher nicht vollständig ausgewertet. Eine erste Analyse der Meßdaten, ausgewertet von V. Gordeliy, ergab zum einen, daß das Protein über 16 Stunden hinweg bei Raumtemperatur in Bezug auf seine Konformation zu Beginn der Messung stabil bleibt. Ferner deutet sich an, daß die Probe in Bezug auf die Teilchengröße heterogen ist. So scheint der Gyrationradius einer Population von PAR-4 Molekülen mit 16 Å in 100% D_2O -Magnesiumpuffer bei pH 8,1 (bzw. 30 Å in 8% D_2O -Magnesiumpuffer bei pH 7,5) das monomere und kompakt gefaltete Protein zu beschreiben. Mit 38 kDa ergibt sich, unter Annahme einer Kugelform von PAR-4, rechnerisch ein Molekülradius von 22,5 Å. Die zweite Molekülpopulation von PAR-4 besitzt einen Gyrationradius von ca. 110 Å. Hierbei könnte es sich um monodisperse Aggregate von PAR-4 handeln. Die intensivere qualitative und quantitative Auswertung der gemessenen Daten wird wahrscheinlich genauere Informationen sowohl über die Form des PAR-4 Moleküls als auch über den Anteil des scheinbar korrekt gefalteten Proteins bringen (V. Gordeliy, pers. Mtlg.).

Zusammengefaßt liegt mit dem exprimierten und gereinigten PAR-4 offenbar ein strukturell labiles Protein mit einem hohen Anteil an β -Faltblattstruktur vor. Weitere Optimierung der Reinigungs- und Pufferbedingungen wird unumgänglich sein, um die strukturelle Integrität und Homogenität des Proteins in Lösung deutlich zu erhöhen.

4.2.3 Kristallisation von PAR-4

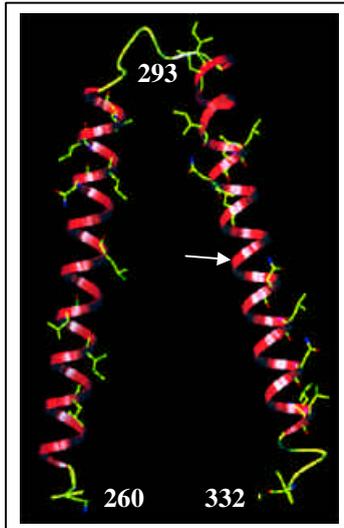
Die Versuche zur Kristallisation von PAR-4 stehen noch am Anfang. Bisher wurden nur Kristalle beobachtet, die nicht reproduzierbar aus Präzipitat gewachsen waren. Diese Tatsache und die Eigenschaft von PAR-4, sich als flüssige Phase aus der Kristallisationslösung abzuscheiden, weisen auf die geringe Stabilität und Heterogenität des Proteins in Lösung hin. Die möglichen Ursachen für dieses Verhalten wurden bereits detailliert in Abschnitt 3.2.6. erörtert. Eine Erfolg versprechende Methode zur Kristallisation dürfte in der Mikrodialyse bestehen. Hierdurch kann die Proteinlösung langsam in einen metastabilen Zustand versetzt werden, bzw. kann durch Entzug von Magnesium eine metastabile Proteinlösung schonend und langsam kristallisiert werden.

4.2.4. Die putative Struktur des C-Terminus von PAR-4

PAR-4 wurde 1994 von Sells und Mitarbeitern als Protein beschrieben, das sich strukturell-funktional durch einen Leucin-Zipper (AS 290 bis 332) und eine „Death Domain“ (AS 258 bis 332) auszeichnet. Interessanterweise wäre der Leucin-Zipper hier integraler Bestandteil der Death Domain und würde damit eine strukturell bisher nicht charakterisierte Domänenstruktur darstellen.

Die „Leucin-Zipper-Domäne“ (Heptad-Repeat-Motif) fungiert in der Regel als Dimerisierungs-Domäne mit anderen Leucin-Zipper-Proteinen. (Homo- oder Heterodimere). Diese Domäne scheint essentiell für die Funktion von PAR-4 zu sein, da Deletionsmutanten ohne Leucin-

Zipper nicht in der Lage sind, apoptotische Signale zu vermitteln. Gleichzeitig wirkt der C-Terminus des Proteins alleine dominant negativ, d.h. er verhindert auch in Gegenwart vollständigen PAR-4 Proteins die apoptotische Wirkung. Ob der Leucin-Zipper tatsächlich



auch als solcher funktional ist, ist allerdings nicht geklärt. Zweifel entstehen durch die Beobachtung, daß die Interaktion von PAR-4 mit Dlk zwar über die C-terminale Domäne von PAR-4 vermittelt wird, die Bindung aber nicht mit dem Leucin-Zipper von Dlk stattfindet sondern über eine Arginin-reiche (positiv geladene) Region dieses Proteins (Page et al., 1999). Dies korreliert mit der Tatsache, daß der C-terminale Bereich von PAR-4 eine starke Häufung von negativ geladenen Glutamaten und Aspartaten aufweist. In der Abbildung links ist die AS-Sequenz des C-Terminus als Helix-Modell dargestellt. Die rechte Helix entspricht dem putativen Leucin-Zipper, die ganze Struktur der Death Domain. Neben den Helices sind Leucin-, Isoleucin- und Asparagin-Seitengruppen dargestellt (modelliert von J. Labahn mit der "O"-Software, (Jones et al., 1991)). Selbst, wenn man die rechte Helix in zwei flexible Subhelices zerlegt (Pfeil in

Abbildung), ergibt sich keine perfekte Leucin-Zipper-Struktur, bei der alle relevanten Seitengruppen und speziell die Leucine an einer Seite der Helix zu liegen kommen. Vergleicht man allerdings die Sequenz und die Struktur von PAR-4 mit denen anderer Leucin-Zipper-Proteinen, wie dem Jun-Homodimer oder dem Myc-Max-Heterodimer (Lavigne et al., 1998; Junius et al., 1996), so zeigt sich, daß auch dort keine vollständige Erfüllung der Heptad- bzw. 3-4-Regel gegeben ist.

Betrachtet man aber die bereits ermittelten Strukturen anderer Death Domain-Proteine, so wird der Konflikt zwischen einem Leucin-Zipper und einer Death Domain Struktur mit überlappenden Bereichen deutlich (Abbildung 4.6).

Während die Interaktion zwischen zwei Leucin-Zipper-Domänen die Ausbildung einer langen α -Helix (hier 32 AS) erfordert (teilweise wird das Motif auch durch zwei kürzere Helices gebildet), besteht eine "Death Domain" aus einem Bündel von kurzen, antiparallel orientierten α -Helices, die über Schleifen miteinander verbunden sind.

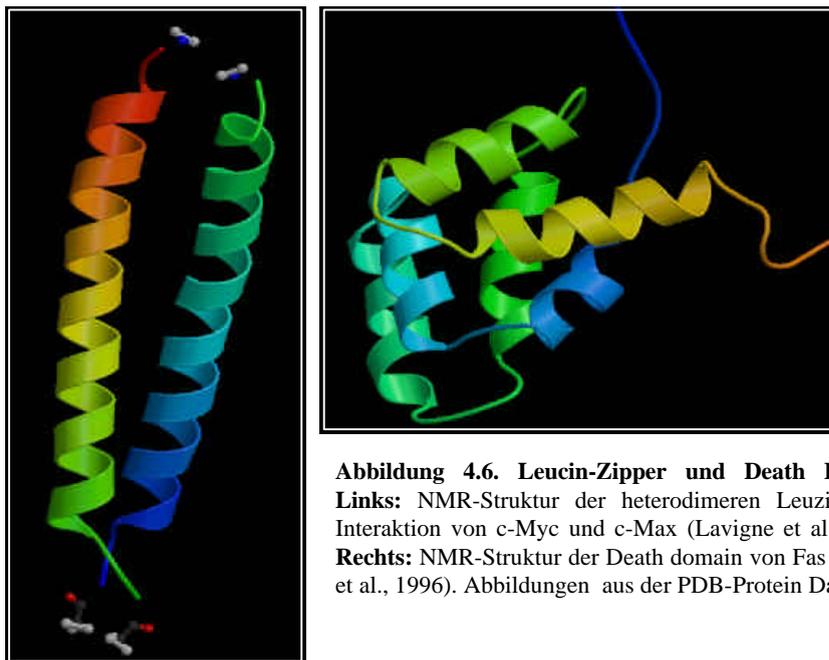


Abbildung 4.6. Leucin-Zipper und Death Domain:
Links: NMR-Struktur der heterodimeren Leuzinzipper-Interaktion von c-Myc und c-Max (Lavigne et al., 1998).
Rechts: NMR-Struktur der Death domain von Fas (Huang et al., 1996). Abbildungen aus der PDB-Protein Database)

Dieses Faltungsmotif, das auch als "Greek Key Fold" bezeichnet wird, haben die Death Domänen mit anderen Familien von apoptose-relevanten Interaktionsdomänen gemeinsam. Zu diesen zählen die CARDs (caspase recruitment domain) und die DEDs (death effector domains). Alle diese Domänen werden aus sechs Helices gebildet, die sich um einen hydrophoben Interaktionskern gruppieren. (Jeong et al., 1999; Zhou et al., 1999 und zusammengefaßt in Vaughn et al., 1999). In Bezug auf PAR-4 dürften die (fälschlich?) einem Leucin-Zipper zugeordneten Leucinseitengruppen diesen hydrophoben Interaktionskern bilden.

Für weitere Experimente zur Reinigung und Kristallisation von PAR-4 ergibt sich aus diesen Überlegungen, daß nicht weiter versucht werden sollte, durch Zugabe von Substanzen wie Leucin oder Detergenzien, die Stabilität des PAR-4 in Lösung zu erhöhen. Derartige Versuche, die die Dimerisierung von PAR-4 über die putativen Leucin-Zipper-Domänen verhindern sollten, sind in Bezug auf die Struktur einer Death Domain eher kontraproduktiv. Endgültige Klarheit darüber, welche funktionelle Interaktionsdomäne am C-Terminus von PAR-4 verwirklicht ist, Leucin-Zipper oder Death Domain, oder evtl. doch beide, wird sich aus der zu ermittelnden Proteinstruktur ergeben.

4.2.5. Ausblick auf weitere Studien mit und zu PAR-4

Vorrangiges Ziel der Arbeiten zu PAR-4 in unserer Arbeitsgruppe bleibt vorläufig, die dreidimensionale Struktur dieses Proteins zu ermitteln. Hierzu wird es zunächst nötig sein, die strukturelle Integrität des isolierten PAR-4 zu erhöhen bzw. eindeutig zu bestätigen und die physiologische Funktionalität nachzuweisen. Neben den beschriebenen biophysikalischen Methoden könnte die Aktivität des Proteins durch Mikroinjektion in Dlk-exprimierende Zellkulturzellen getestet werden. In Verbindung mit Dlk kann PAR-4 in geeigneten Zellen Apoptose induzieren (K.H. Scheidtmann, pers. Mtlg.). Neben der Kristallisation und röntgenkristallographischer Strukturdetermination könnte die PAR-4-Struktur auch in Lösung mittels NMR zu bestimmen sein. Mit einer Größe von 38 kDa liegt PAR-4 an der oberen Grenze dessen, was mit dem derzeitigen Stand der NMR-Technik zu bewältigen ist. Die ersten Befunde aus den eindimensionalen NMR-Spektren (Breite der Peaks) deutet darauf hin, daß PAR-4 mittels NMR bearbeitet werden kann (H.J. Sass, pers. Mtlg.).

Für dreidimensionale NMR-Studien wird es nötig sein, das Protein mit "Spin-label" zu versehen. Dies bedeutet, die Kultivierung und Expression muß unter Medium-Bedingungen erfolgen, unter denen das Protein fast ausschließlich aus ^{13}C , ^{15}N und ^2H - Isotopen aufgebaut wird. Da diese Spin-Markierung sehr kostenintensiv ist, muß zuvor die Expression unter Minimalmedium-Bedingungen etabliert sowie die Reinigung von PAR-4 optimiert werden.

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Protokollen ist es erstmals möglich, PAR-4 in Milligramm-Mengen zu isolieren. Hieraus ergeben sich neue Möglichkeiten in der Erforschung der Funktion und Regulation von PAR-4. Dies gilt zum einen für die Charakterisierung der Interaktion mit den bereits bekannten Proteinen WT1, Dlk und PKC ζ , zum anderen aber auch für die Identifizierung weiterer Interaktionspartner, beispielsweise über eine "Affinitätsfalle", in der PAR-4, an eine feste Matrix gekoppelt (StrepTag oder HIS-Tag), als "Köder" fungiert. Aus Hefe isoliertes PAR-4 kann des Weiteren für die Kartierung der Phosphorylierungs- und ggf. Glykosylierungsstellen an PAR-4 eingesetzt werden.

In Anbetracht der immensen medizinischen und pharmazeutischen Relevanz und den im Gegensatz dazu wenigen physiologischen und biochemischen Informationen zu PAR-4 bleibt zu hoffen, daß die hier vorgestellten Arbeiten, vor allem aber die dreidimensionale Struktur des Proteins, helfen werden, fundiertere Einblicke in den Prozeß des programmierten Zelltodes und neurodegenerativer Krankheiten zu erlangen.

5. Zusammenfassung

β -Arrestine sind essentielle Regulatoren G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Sie vermitteln sowohl die Signalterminierung als auch in Funktion eines Adaptermoleküles die Internalisierung der Rezeptoren von der Plasmamembran über "Clathrin coated Pits".

In dieser Arbeit wurden zunächst Protokolle zur heterologen Expression von bovinem β -Arrestin 1 in *S. cerevisiae* und zur Reinigung des rekombinanten Proteins entwickelt. Durch molekularbiologische Methoden wurden dem β -Arrestin C- und N-terminale Affinitätstags angefügt. Die Reinigung erfolgte durch Affinitätschromatographie und führte zu Ausbeuten von bis zu 2,7 mg β -Arrestin / Gramm Hefezellen. Die Reinheit des Proteins konnte durch Verwendung zweier verschiedener Affinitätstags und sequenzielle Reinigung optimiert werden. Durch Mutagenese von vier Cysteinen gegen Serine wurde die Stabilität des gereinigten Proteins gegen Oxidation verbessert. Ferner zeigte sich, daß der Einsatz hoher Konzentrationen an Phosphationen die Stabilität des Proteins in Lösung signifikant erhöht.

Die Funktionalität des heterolog exprimierten β -Arrestins wurde anhand von Bindungsstudien mit Rhodopsin bestätigt. Unter Verwendung von K,Na-Tartrat als Fällungsmittel konnte β -Arrestin kristallisiert werden, wobei die geringe Stabilität und die fehlenden Diffraktionseigenschaften der bis zu 800 μ m großen Kristalle zunächst die röntgenkristallographische Analyse behinderte. Durch die Co-Kristallisation von β -Arrestin mit Inositolhexaphosphat (IP₆) als Ligand konnte die Diffraktionsqualität der Kristalle erheblich gesteigert werden. Es zeigte sich, daß weder die Art und Position der Affinitätstags noch IP₆ einen Einfluß auf den Habitus der Kristalle respektive die Packung der Moleküle im Kristall hat. Anhand mit Synchrotronstrahlung gemessener Datensätze und der Methode des Molekularen Ersatzes der bekannten Röntgenstruktur von visuellen Arrestin, wird derzeit die Molekülstruktur des β -Arrestin 1 bestimmt. Darüber hinaus wurde β -Arrestin mit Quecksilber durch Co-Kristallisation derivatisiert, wodurch die Struktur determinierung, von dem Arrestin-Modell unabhängig, durch die Methode des isomorphen Ersatzes ermöglicht wird

Als erstes Ergebnis der röntgenkristallographischen Analyse konnte eine Bindestelle für IP₆ in der C-terminalen Kuppel des β -Arrestinmoleküls identifiziert werden. Weitere, in der Literatur postulierte Bindestellen für IP₆ konnten dagegen nicht verifiziert werden. Ziel der weiteren Arbeiten wird die Verbesserung der kristallographischen Auflösung der Kristalle sowie die Co-Kristallisation von β -Arrestin mit seinen Bindungspartnern sein.

PAR-4 spielt als protagonistischer Faktor eine entscheidene Rolle bei der Vermittlung des programmierten Zelltodes, sowohl in bestimmten Tumorzellen als auch in der Symptomatik vieler neurodegenerativer Krankheiten, wie Alzheimer oder Parkinson. PAR-4 scheint in dieser apoptotischen Signalkaskade an einem sehr frühen Punkt aktiv zu sein.

In den hier vorgestellten Arbeiten wurde versucht, PAR-4 heterolog zu exprimieren und zu kristallisieren. Erste Versuche scheiterten an der geringen Löslichkeit des Proteins, ein Problem, daß durch die Verwendung hoher Konzentrationen zweiwertiger Kationen überwunden werden konnte. Durch Verwendung von Affinitätstags und chromatographischer Reinigungsmethoden konnten für die Kristallisation ausreichende Ausbeuten an PAR-4 sowohl aus *E.coli* (10 mg/g Zellen) als auch aus *S.cerevisiae* (2 mg/g Zellen) gewonnen werden. Die Funktionalität des Proteins wurde auf physiologischer Ebene durch einen Kinasetest überprüft. Der Faltungszustand bzw. die Struktur des isolierten PAR-4 wurde durch verschiedene biophysikalische Methoden wie NMR und FTIR-Spektroskopie untersucht und vorläufig charakterisiert. Kristallisationsexperimente führten bisher nur zu Kristallen, die nicht für eine röntgenkristallographische Analyse geeignet sind. Die Experimente hierzu stehen allerdings erst am Anfang. Ziel der weiteren Arbeiten wird die Ermittlung der dreidimensionalen Struktur von PAR-4 sein.

6. Literatur

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1989)** Molecular Biology of The Cell. 2nd Edt. Garland Publishing, New York
- Attramadal, H., Arriza, J.L., Aoki, C., Dawson, T.M., Codina, J. et al. (1992)** β -Arrestin2, a Novel Member of the Arrestin/ β -Arrestin Gene Family. *J. Biol. Chem.* 267, 17882-17890
- Ausubel, F.M., Brent, A., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989)** Current Protocols im Molecular Biology. Vol 1-Vol 4 Wiley & Sons, New York
- Barradas, M., Monjas, A., Diaz-Meco, M.T., Serrano, M. and Moscat, J. (1999)** The Downregulation of the Pro-apoptotic Protein Par-4 is Critical for Ras-induced Survival and Tumor Progression. *EMBO* 18(22), 6362-6269
- Beck, K.A. and Keen, J.H. (1991)** Interaction of Phosphoinositide Cycle intermerdiates with the Plasma Membrane-associated Clathrin Assembly Protein AP-2. *J. Biol. Chem.* 266, 4442-4447
- Benovic, J.L., De Blasi, A., Stone, W.C., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1989)** β -adrenergic Receptor Kinase: Primary Structure Delineates a Multigene Family. *Science* 246, 235-239
- Benovic, J.L., Onorato, J.J., Arriza, J.L., Stone, W.C., Lohse, M. et al. (1991)** Cloning, Expression and Chromosomal Localization of β -adrenergic Receptor Kinase 2: A new Member of the Receptor Kinase Family. *J. Biol. Chem.* 266, 14939-14946
- Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J. (1997)** Positioning Atypical Protein Kinase C Isoforms in the UV-Induced Apoptotic Signaling Cascade. *Mol. Cell. Biol.* 17(8), 4346-4354
- Bogheart, E.R., Sells, S.F., Walid, A.J., Malone, P., Williams, N.M., Weinstein, M.H., Strange, R. and Rangnekar, V.M. (1997)** Immunohistochemical analysis of the Proapoptotic Protein Par-4 in Normal Rat Tissues. *Cell Growth Differ.* 8(8), 881-890
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. and Short, J.M. (1987)** *Biotechniques* 5, 376-379
- Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.L., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R. and Trendelenburg, U. (1994)** International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoreceptors. *Pharmacol. Rev.* 46, 121-136
- Camandola, S. and Mattson, M.P. (2000)** Pro-apoptotic Action of PAR-4 involves Inhibition of NF-Kappa B Activity and Suppression of BCL-2 Expression. *J. Neurosci. Res.* 61(2), 134-139

- Castelli, L.A., Mardon, C.J., Strike, P.M., Azad, A.A. and Macreadie, I.G.** (1994) High-Level Secretion of Correctly Processed Beta-Lactamase from *Saccharomyces cerevisiae* using a High-copy-number Secretion Vector. *Gene* 142, 113-117
- Chan, S.L., Tammariello, S.P., Estus, S. and Mattson, M.P.** (1999) Prostate Apoptosis Response-4 Mediates Trophic Factor Withdrawal-induced Apoptosis of Hippocampal Neurons: Action Prior to Mitochondrial Dysfunction and Caspase Activation. *J. Neurochem.* 73(2), 502-512
- Chuang D.-M. and Costa, E.** (1979) Evidence for Internalisation of the Recognition Site of β -Adrenergic Receptor Susceptivity Induced by (-)Isoproterenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3024-3028
- Cook, J., Krishnan, S., Ananth, S., Sells, S.F., Shi, Y., Walther, M.M., Linehan, W.M., Sukhatme, V.P., Weinstein, M.H. and Rangnekar, V.M.** (1999) Decreased Expression of the Pro-apoptotic Protein Par-4 in Renal Cell Carcinoma. *Onkogene* 18(5), 1205-1208
- Corpet, F.** (1988) Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucl. Acids Res.* 16, 10881-10890
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. and McPherson, A.** (1994) *Acta Cryst.* D50, 414-423
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. and Novick, P.** (1996) Phosphoinositides as regulators in Membrane Traffic. *Science* 271, 1533-1539
- Diaz-Meco, M.T., Lallene, M.J., Monjas, A., Frutos, S. and Moscat, J.** (1999) Inactivation of the Inhibitory KappaB Protein Kinase/Nuclear Factor KappaB Pathway by Par-4 Expression Potentiates Tumor Necrosis Factor Alpha-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 19606-10612
- Diaz-Meco, M.T., Municio, M.M., Fruto, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. and Moscat, J.** (1996) The Produkt of Par-4, a Gene Induced during Apoptosis, Interacts Selectively with the Atypical Isoforms of Protein Kinase C. *Cell* 86(5), 777-786
- Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E. et al.** (1986) Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75-79
- Duan, W., Rangnekar, V.M. and Mattson, M.P.** (1999) Prostate Apoptosis Response-4 Production in Synaptic and Exitotoxic Insults: Evidence for a Pivotal Role in Mitochondrial Dysfunction and Neuronal Degeneration. *J. Neurochem.* 72(6), 2312-2322
- Duan, W., Zhang, Z., Gash, D.M. and Mattson, M.P.** (1999) Participation of Prostate Apoptosis Response-4 in Degeneration of Dopaminergic Neurons in Models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46(4), 587-597
- Ducruix, A and Giegé, R.** (1992) *Crystalization of Nucleic Acids and Proteins.* Oxford University Press

- Erhard, E. and Hollenberg, C.P.** (1983) The Presence of a Defective LEU 2 Gene on 2 μ DNA Recombinant Plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* is Responsible for Curing and High Copy Number. *J. Bacteriol.* 156, 625-635
- Evans, C.F., Engelke, D.R. and Thiele, D.J.** (1990) ACE1 Transcription Factor Produced in *Escherichia coli* Binds Multiple Regions within Yeast Metallothionein Upstream Activation Sequence. *Mol. Cell Biol.* 10, 426-429
- Ferguson, S.G., Barak, L.S., Zhang, J. and Caron, M.G.** (1996) G-Protein-Coupled Receptor Regulation: Role of G-Protein-Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 1095-1110
- Ferguson, S.S., Zhang, J., Barak, L.S. and Caron, M.G.** (1998) Molecular Mechanisms of G-Protein-coupled receptor Desensitization and Resensitization. *Life Sci.* 62, 1561-1565
- Ferguson, S.S.G., Downey III, W.E., Colaoietro, A.-M., Barak, L.S., Ménard, L. and Caron, M.G.** (1996b) Role of β -Arrestin in Mediating Agonist Promoted G Protein-Coupled Receptor Internalization. *Science* 271, 363-366
- Ferguson, S.S.G., Zhang, J., Barak, L.S. and Caron, M.G.** (1998b) Role of β -Arrestins in the Intracellular Trafficking of G-Protein-Coupled Receptors. *Advances in Pharmacology* 42, 420-424
- Ford, C.E., Skiba, N.P., Bae, H., Daaka, Y., Reuveny, E., Shekter, L.R., Rosal, R., Weng, G., Yang, C.S., Iyengar, R., Miller, R.J., Jan, L.Y., Lefkowitz, R.J. and Hamm, H.E.** (1989) Molecular Basis for Interactions of G Protein β Subunits with Effectors. *Science* 280, 1271-1274
- Fredericks, Z.L., Pitcher, J.A. and Lefkowitz, R.J.** (1996) Identification of G Protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 271, 13795-13803
- Fürst, P., Hu, S., Hackett, R. and Hamer, D.** (1988) Copper Activates Metallothionein Gene Transcription by Altering the Conformation of a Specific DNA Binding Protein. *Cell* 55, 705-717
- Gaidarov, I., Krupnick, J.G., Falck, J.R., Benovic, J.L. and Keen, J.H.** (1999) Arrestin function in G-Protein-coupled Receptor Endocytosis Requires Phosphoinositide Binding. *EMBO J.* 18(4), 871-881
- Galla, H.-J.** (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie.* Thieme Verlag, New York
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Benovic, J.L. and Keen, J.H.** (1997) Localization of the Arrestin Binding Locus to the Clathrin Terminal Domain. *J. Biol. Chem.* 272, 15017-15022
- Granzin, J. et al.**, (2000) X-Ray Structure of Arrestin Complexed with Inositolhexaphosphate at 2.7 Å Resolution. In preparation
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B. and Büldt, G.** (1998) X-Ray Crystal Structure of Arrestin from Bovine Rod Outer Segments. *Nature* 391, 918-921

- Grodberg, J. and Dunn, J.J.** (1988) OmpT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170, 1245-1253
- Guo, Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S.F., Geddes, J.W., Bondada, V., Rangnekar, V.M. and Mattson, M.P.** (1998) Par-4 is a Mediator of Neuronal Degeneration Associated with the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Nat. Med.* 4(8), 957-962
- Gurevich, V.V., Dion, S.B., Onorato, J.J., Ptasienski, J., Kim, C.M. et al.** (1995) Arrestin Interactions with G-Protein-coupled Receptors: Direct Binding Studies of wild Type and Mutant Arrestins with Rhodopsin, β_2 -Adrenergic and m2 Muscarinic cholinergic Receptors. *J.Biol. Chem.* 270, 720-731
- Gurevich, V.V.** (1998) The Selectivity of Visual Arrestin for Light-activated Phosphorhodopsin is Controlled by Multiple Nonredundant Mechanisms. *J. Biol. chem.* 273, 15501-15506
- Gurevich, V.V., Richardson, R.M., Kim, C.M., Hosey, M.M. and Benovic, J.L.** (1993) Binding of Wild Type and Chimeric Arrestins to the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *J. Biol. Chem.* 268, 16879-16882
- Hanahan, D.** (1983) Studies on Transformation of Echerichia Coli with Plasmids. *J. Biol. Chem.* 166, 557-580
- Hamer, D., Thiele, D.J., Lemontt, J.E.** (1985) Function and Autoregulation of Yeast Copperthionein. *Science* 228, 685-690
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for Transformation of E.coli. (In: Rickwood, D., Hames, B.D. DNA Cloning, a practical approach. IRL Press, 1, 109-135
- Heck, M., Pulvermuller, A. and Hofmann, K.P.** (2000) Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin-containing membranes and soluble proteins. *Methods Enzymol.* 315(22), 329-347
- Herrmann, J.L., Briones, F. Jr., Brisbay, S., Logothetis, C.J. and McDonnell, T.J.** (1998) Prostate Carcinoma Cell Death resulting from Inhibition of Proteasome activity is Independent of Functional Bcl-2 and p53. *Oncogene* 17(22), 2889-2899
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V. and Sigler, P.B.** (1999) The 2.8 Å Crystal Structure of Visual Arrestin: a Model for Arrestin's Regulation. *Cell* 97(2), 257-269
- Hofman, K.P.** (1985) Effect of GTP on the rhodopsin-G-protein complex by transient formation of extra metarhodopsin II. *Biochim. Biophys. Acta* 810, 278-281
- Hofman, K.P., Schleicher, A., Emeis, D. and Reichert, J.** (1981) Light-induced axial and radial shrinkage effects and changes of the refractive index in isolated bovine rod outer segments and disc vesicles: physical analysis of near-infrared scattering changes. *Biophys. Struct. Mech.* 8, 67-93
- Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L. and Bairoch, A.** (1999) The PROsite database, its Status in 1999. *Nucl. Acids. Res.* 27, 215-219

- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P. and Fesik, S.W.** (1996) NMR Structure and Mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) Death Domain. *Nature* 384, 638-641
- Jancarik, J. and Kim, S.H.** (1991) *J. Appl. Cryst.* 24, 409-411
- Jeong, E.-J., Bang, S.H., Lee, T.H., In Park, Y., Sim, W.-S. and Kim, K.-S.** (1999) The Solution Structure of FADD Death Domain. *J. Biol. Chem.* 274, 16337-16342
- Johnstone, R.W., See, R.H., Sells, S.F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D.A., Licht, J.D., Sugrue, S.P., Roberts, T., Rangnekar, V.M. and Shi, Y.** (1996) A Novel Repressor, Par-4, Modulates Transcription and Growth Suppression Functions of the Wilms' Tumor. *Mol. Cell. Biol.* 16(12), 6945-6956
- Jones, E.W.** (1990). In: *Yeast Genetics* (Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., Smith, A.R.W., eds.) Springer Verlag, New York
- Jones, T.A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M.** (1991) The Graphics Package O. *Acta Cryst. A* 47, 110-119
- Junius, F.K., O'Donoghue, S.I., Nilges, M., Weiss, A.S. und Gerry F. King** (1996) High Resolution NMR Solution Structure of the Leucine Zipper Domain of the c-Jun Homodimer. *J. Biol. Chem.* 271, 13663-13667
- Kelley, L.A., MacCallum, R.M. and Sternberg, M.J.E.** (2000) Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299, 501-522
- Khyse-Andersen, J.** (1984) Electrophoretic transfer of Multiple gels: A Single Apparatus without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209
- Kim, J., Lee, K. and Pelletier, J.** (1998) The DNA Binding Domains of the WT1 Tumor Suppressor Gene Product and Chimeric EWS/WT1 Oncoprotein are Functionally Distinct. *Oncogene* 16(8), 1021-1030
- Kovoor, A., Celver, J., Abdryashitov, R.I., Chavkin, C. and Gurevich, V.V.** (1999) Targeted Konstruktion of Phosphorylation-independent β -Arrestin Mutants with Constitutive Activity in Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6831-6834
- Krafft Bianca. Dissertation** (1999) Arrestin - heterologe Expression, Mutagenese und biophysikalische Untersuchungen.
- Kruman, I.I., Nath, A., Maragos, W.F., Chan, S.L., Jones, M., Rangnekar, V.M., Jakel R.J. and Mattson, M.P.** (1999) Evidence that Par-4 Participates in the Pathogenesis of HIV Encephalitis. *Am. J. Pathol.* 155(1), 39-46
- Krupnick, J.G. and Benovic, J.L** (1998) The Role of Receptor Kinases and Arrestins in G-Protein-Coupled Receptor Regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 289-319

- Krupnick, J.G., Goodman, O.B. Jr., Keen, J.H. and Benovic J.L.** (1997) Arrestin / Clathrin Interaction: Localisation of the Clathrin Binding Domain of Nonvisual Arrestins to the Carboxyl Terminus. *J. Biol. Chem.* 272, 15011-15016
- Kumi-Diaka, J. and Butler, A.** (2000) Caspase-3 Protease Activation during the Process of Genistein-induced Apoptosis in TM4 Testicular Cells. *Biol Cell* 92(2), 115-124
- Kurose, H., Isogaya, M., Kikkawa, H. and Nagao, T.** (1998) Domains of β_1 and β_2 Adrenergic Receptors to Bind Subtype Selective Agonists. *Life Sciences* 62, 1513-1517
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Holt, J.A., Barak, L.S. and Caron, M.G.** (2000) The Interaction of β -Arrestin with the AP2-Adaptor is Required for the Clustering of β_2 -Adrenergic Receptor into Clathrin-Coated Pits. *J. Biol. Chem.* 275, 23120-23126
- Laporte, S.A., Oakley, R.H., Zhang, J., Holt, J.A., Ferguson, S.S., Caron, M.G. and Barak, L.S.** (1999) The β -adrenergic Receptor / β -Arrestin Complex Recruits the Clathrin Adaptor AP-2 during Endocytosis. *Proc. Natl. Aca.Sci. USA* 96, 3712-3717
- Lavigne, P., Crump, M.P., Gagne, S.M., Hodges, R.S., Kay, C.M. and Sykes, B.D.** (1998) Insights into the Mechanism of Heterodimerization from the 1H-NMR Solution Structure of the c-Myc-Max Heterodimeric Leucine Zipper. *J. Mol. Biol.* 281, 165-181
- Leslie, A.G.W.** (1991) Molecular Data Processing. In: Moras, D., Podjarmy, A.D. and Thierry, J.C. (1991) Crystallographic Computing 5. Oxford University Press
- Lin, F.T., Daaka, Y. and Lefkowitz R.J.** (1998) β -Arrestin Regulates Mitogenic Signaling and Clathrin-mediated Endocytosis of the Insulin-like Growth Factor I Receptor. *J. Biol. Chem.* 273, 31640-31643
- Lohse, M.J., Benovic, J.L., Codina, J., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J.** (1990) β -Arrestin: A Protein That Regulates β -Adrenergic Receptor Function. *Science* 248, 1547-1550
- Lohse, M.J., Andexinger, S., Pitcher, J. Trukawinski, S. Codina, J. et al.** (1992) Receptor-specific Desensitization with Purified Proteins: Kinase Dependence and Receptor Specificity of β -Arrestin and Arrestin in the β_2 -adrenergic and Rhodopsin Systems.
- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J.** (1999) Beta-Arrestin Dependent Formation of β_2 adrenergic Receptor-Src Protein Kinase complex. *Science* 283, 655-661
- Macreadie, I.G., Jagadish, M.N., Azad, A.A., Vaughan, P.R.** (1989) Versatile Cassettes Designed for the Copper Inducible Expression of Foreign Genes in Yeast. *Plasmid* 21, 147-150
- Matthews, B.W.** (1968) Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497

- Mattson M.P., Pedersen, W.A., Duan, W., Culmsee, C. and Camandola, S.** (1999) Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Perturbed Energy Metabolism and Neuronal Degeneration in Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 893, 154-175
- Mattson, M.P.** (2000) Apoptotic and Anti-apoptotic Synaptic Signaling Mechanisms. *Brain Pathol.* 10(2), 300-312
- Mattson, M.P. and Goodman Y.** (1995) Different Amyloid Peptides Share a Similar Mechanism of Neurotoxicity Involving Reactive Oxygen Species and Calcium. *Brain. Res.* 676, 219-224
- Mattson, M.P., Culmsee, C. and Yu, Z.F.** (2000) Apoptotic and Antiapoptotic Mechanisms in Stroke. *Cell Tissue Res.* 301, 173-87
- Mattson, M.P., Duan, W., Chan, S.L. and Camandola, S.** (1999) Par-4: An Emerging Pivotal Player in Neuronal Apoptosis and Neurodegenerative Disorders. *J. Mol. Neuroscience* 13, 17-28
- McDonald, P., Cote, N.L., Lin, F.-T., Premont, R.T., Pitcher, J.A. and Lefkowitz, R.J.** (1999) Identification of NSF as a β -Arrestin1-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* 274, 10677-10680
- McPherson, A.** (1989) Preparation and Analysis of Protein Crystals. Wiley
- McPherson, A.** (1999) Crystalization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Miller, W.E., Maudsley, S., Ahn, S., Khan, K.D., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J.** (2000) β -Arrestin Interacts with the Catalytic Domain of the Tyrosin Kinase c-Src. *J. Biol. Chem* 275, 11312-11319
- Mitraki, A. and King, J.** (1998) Purification of Calf Prochymosin (prorennin) Synthesized in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 2, 800-804
- Nalca, A., Qiu, S.G., El-Guendy, N., Krishnan, S. and Rangnekar, V.M.** (1999) Oncogenic Ras Sensitizes Cells to Apoptosis by Par-4. *J. Biol. Chem.* 274, 29976-29983
- Nathans, J. and Hogness, D.S.** (1983) Isolation, sequence analysis, and intron-exon arrangement of the gene encoding bovine rhodopsin. *Cell* 34, 807-814:
- Neer, E.J. and Smith, T.F.** (2000) A Groovy New Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 960-962
- Ohguro, H., Palczewski, K., Walsh, K.A. and Johnson, R.S.** (1994) Topographic Study of Arrestin Using Differential Chemical Modifications and Hydrogen/Deuterium Exchange. *Protein Sci.* 3, 2428-2434
- Otwinowski, Z. and Minor, W.** (1997) Processing of X-Ray Data Collected in Oscillation Mode. *Meth. Enzymol.* 276, 307-326

-
- Page, G.** (2000) Identifizierung von Interaktionspartnern der Dlk-Kinase mit dem Hefe-Two-Hybrid-System. Dissertation Uni-Bonn
- Page, G., Kogel, D., Rangnekar, V. and Scheidtmann, K.H.** (1999) Interaction Partners of Dlk/ZIP Kinase: Coexpression of Dlk/ZIP Kinase and Par-4 Results in Cytoplasmatic Retention and Apoptosis. *Oncogene* 18, 7265-7273
- Palczewski, K.** (1994b) Structure and Functions of Arrestins. *Protein Sci.* 3, 1355-1361
- Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R.S., Carr, S.A., Crabb, J.W., Kaplan, M.W., Johnson, R.S. and Walsh, K.A.** (1994a) Characterization of a Truncated Form of Arrestin Isolated from Bovine Rod Outer Segments. *Protein Sci.* 3, 314-324
- Palczewski, K., Pulvermuller, A., Buczylo, J., Gutmann, C. and Hofmann, K.P.** (1991) Binding of Inositol Phosphates to Arrestin. *FEBS Lett.* 295, 195-199
- Pedersen, W. A., Mani, K and Brundin, P.** (1999) Recent Advances on the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Exp. Neurol.* 157, 1-18
- Pedersen, W.A., Luo, H., Kruman, I., Kasarskis, E. and Mattson, M.P.** (2000) The Prostate Apoptosis Response-4 Protein Participates in Motor Neuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sklerosis. *FASEB J.* 14(7), 913-924
- Pedersen, W.A., Luo, H., Kruman, I., Kasarskis, E. and Mattson, M.P.** (1999b) Involvement of the Prostate Apoptosis Response-4 (Par-4) Protein in Motor Neuron Degeneration in ALS. *Soc. Neurosci. Abst.* 25, 49
- Pulvermüller, A., Schroeder, K. Fischer, T. and Hofmann, K.P.** (2000) Interactions of Metarhodopsin II: Arrestin Peptides Compete with Arrestin and Transducin. *J. Biol. Chem.* accepted
- Pulvermüller, A., Maretzki, D., Rudnicka-Nawrot, M., Smith, W.C., Palczewski, K. and Hofmann, K.P.** (1997) Functional Differences in the Interaction of Arrestin and its Splice Variant, p44, with Rhodopsin. *Biochemistry* 36, 9253-9260
- Qiu, G., Ahmed, M., Sells, S.F., Mohiuddin, M., Weinstein, M.H. and Rangnekar, V.M.** (1999) Mutually Exclusive Expression Pattern of Bcl-2 and Par-4 in Human Prostate Tumors Consistent with Down-Regulation of Bcl-2 by Par-4. *Oncogene* 18(3), 623-631
- Qiu, S.G., Krishnan, S., el-Guendy, N. and Rangnekar, V.M.** (1999) Negative Regulation of Par-4 by Oncogenic Ras is Essential for Cellular Transformation. *Oncogene* 18(50), 7115-7123
- Quiocho, F.A. and Richards, F.M.** (1964) Intermolecular Cross Linking of a Protein in the Crystalline State: Carboxypeptidase-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 833-839
- Rangnekar, V.M.** (1998) Apoptosis Mediated by a Novel Leucine Zipper Protein Par-4. *Apoptosis* 3, 61-66

- Rapoport, I., Miyazaki, M., Boll, W., Duckworth, B., Cantley, L.C., Shoelson, S. and Kirchhausen, T.** (1997) Regulatory Interactions in the Recognition of Endocytic Sorting Signals by AP-2 Complexes. *EMBO J.* 16(9), 2240-2250
- Ronai, Z.** (1999) Deciphering the Mammalian Stress Response: a Stressful Task. *Oncogene* 18, 6084-6086
- Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J. and Studier, F.W.** (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135
- Sanchez, P., De Carcer, G., Sandoval, I.V., Moscat, J. and Diaz-Meco, M.T.** (1998) Localization of Atypical protein Kinase C Isoforms into Lysosome-targeted Endosomes Interaction with p62. *Mol. Cell. Bio.* 18(5) 3069-3080
- Schleicher, A., Kühn, H., and Hofmann, K.P.** (1989) Kinetics, Binding Constant and Activation Energy of the 48-kDa Protein-Rhodopsin Complex by Extrametarhodopsin II. *Biochemistry* 28, 1770-1775
- Schmidt, T.G.M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A.** (1996) Molecular Interaction between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target Streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766
- Schubert, C., Hirsch, J.A., Gurevich, V.V., Engelmann, D.M., Sigler, P.B. and Fleming, K.G.** (1999) Visual Arrestin Activity may be Regulated by Self-Association. *J. Biol. Chem.* 274, 21186-21190
- Sells, S.F., Han, S.S., Muthukumar, S., Maddiwar, N., Johnstone, R., Boghaert, E., Gillis, D., Liu, G., Nair, P., Monning, S., Collini, P., Mattson, M.P., Sukhatme, V.P., Zimmer, S.G., Wood, D.P. Jr., McRoberts, J.W., Shi, Y. and Rangnekar, V.M.** (1997) Expression and Funktion of the Leucine Zipper Protein Par-4 in Apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3823-3832
- Sells, S.F., Wood, D.P. Jr., Joshi-Barve, S.S., Muthukumar, S., Jakob, R.J., Crist, S.A., Humphreys, S. and Rangnekar, V.M.** (1994) Commonality of the Gene Programs Induced by Effectors of Apoptosis in Androgen-dependent and -independent Prostate Cells. *Cell Growth Differ.* 5, 457-466
- Shiina, T., Kawasaki, A., Nagao, T. and Kurose, H.** (2000) Interaction with β -Arrestin determines the Difference in Internalization Behavior between Beta1- and Beta2-adrenergic Receptors. *J. Biol. Chem.* (epub ahead of print)
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J. and Tao, R.** (1987) Primary and Secondary Structure of Bovine Retinal S Antigen (48-kDa Protein). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6975-6979
- Song, Z. and Steller, H.** (1999) Death by design: Mechanisms and Control of Apoptosis. *TIBS Millennium Issue* 24 (12), 49-52
- Sterne-Marr, R., Gurevich, V.V., Goldsmith, P., Bodine, R.C., Sanders, C., Donoso, L.A. and Benovic, J.L.** (1993) Polypeptide Variants of β -Arrestin and Arrestin3. *J. Biol. Chem.* 268 (21), 15640-15648

- Strambolic, V., Mak, T.W. and Woodgett, J.R.** (1999) Modulation of Cellular Apoptotic Potential: Contributions to Oncogenesis. *Oncogene* 18, 6094-6103
- Stuart, B.** (1997) *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Wiley & Sons, Chichester
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130
- Stulovici, B., Cerione R.A., Kilpatrick, B.F., Caron, M.G. and Lefkowitz R.J.** (1984) Direct Demonstration of Impaired Functionality of a Purified Desensitized β -adrenergic receptor in a reconstitution system. *Science* 225, 837-840
- Szczyoka, M. and Thiele, D.J.** (1989) A Cysteine-rich Nuclear Protein Activates Yeast Metallothionein Gene Transcription. *Mol cell Biol.* 9, 421-429
- ter Haar, E., Harrison, S.C. and Kirchhausen, T.** (2000) Peptide in Groove Interaction Link Targets Proteins to the β -Propeller of Clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 1096-1100
- ter Haar, E., Musacchio, A., Harrison, S.C. and Kirchhausen, T.** (1998) Atomic Structure of Clathrin: A Beta-Propeller Terminal Domain Joins an Alpha Zigzag Linker. *Cell* 95, 563-573
- Vaughn, D.E., Rodriguez, J., Lazebnik, Y. and Joshua-Tor, L.** (1999) Crystal Structure of Apaf-1 Caspase Recruitment Domain: An α -Helical Greek Key Fold for Apoptotic Signaling. *J. Mol. Biol.* 293, 439-447
- von Zastrow, M. and Kobilka, B.K.** (1992) Ligand-Regulated Internalization and Recycling of Human β_2 -adrenergic Receptors between the Plasma Membrane and Endosomes Containing Transferrin Receptors. *J. Biol. Chem.* 267, 3530-3538
- Voss, S. and Skerra, A.** (1997) Mutagenesis of a Flexible Loop in Streptavidin Leads to Higher Affinity for the Strep-Tag II Peptide and Improved Performance in Recombinant Protein Purification. *Protein Eng.* 10, 975-982
- Waldo, G.L., Northup J.K., Perkins, J.P. and arden, T.K.** (1983) Characterization of an Altered Membrane Form of the β -Adrenergic Receptor Produced during Agonist-induced Desensitization. *J. Biol. Chem.* 258, 13900-13908
- Wang, Y.M., Seibenhener, M.L., Vandenplas, M.L. and Wooten, M.W.** (1999) Atypical PKC zeta is Activated by Ceramide, Resulting in Coactivation of NF-kappaB/JNK Kinase and Cell Survival. *J. Neurosci. Res.* 55(3), 293-302
- Watson, S. and Arkininstall, S.** (1994) *The G-Protein Linked Receptor-Facts Book*. Academic Press London
- Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Johnson-Browne, B. and Vaillancourt, P.** (1994) *Strategies* 7(2) 41-43
- Wess, J.** (1998) Molecular Basis of Receptor/G-Protein-Coupling Selectivity. *Pharmacol. Ther.* 80 (3), 231-264

- Wilden, U., Choe, H.-W., Krafft, B. and Granzin, J.** (1997) Crystalization and Preliminary X-Ray Analysis of Arrestin from Bovine Rod Outer Segment. *FEBS Letters* 415, 268-270
- Wilsbach, K. and Payne, G.S.** (1993) Vps1p, a Member of the Dynamin GTPase Family, is Necessary for Golgi Membrane Protein Retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12, 3049-3059
- Wishart, D.S., Sykes, B.D. and Richards, F.M.** (1991) Relationship between Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and Protein Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* 222, 311-333
- Wuthrich, K.** (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. Wiley, New York
- Zhang, J., Barak, L.S., Anborgh, P.H., Laporte, S.A., Caron, M.G. and Ferguson, S.S.** (1999) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes. *J. Biol. Chem.* 274, 10999-11006
- Zhang, Z. and Dubois, R.N.** (2000) Par-4, a Proapoptotic Gene, is Regulated by NSAIDs in Human Colon Carcinoma Cells. *Gastroenterology* 118(6), 1012-1017
- Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G.** (1999) Solution Structure of Apaf-1 CARD and its Interaction with Caspase-9 CARD: A Structural Basis for Specific Adaptor/Caspase Interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11265-11270

7. Anhang

7.1 Sequenz von *Bos taurus* b-Arrestin 1

1/1
 ATG GGC GAC AAA GGG ACG CGG GTG TTC AAG AAG GCG AGC CCC AAT GGA AAG CTC ACC GTC
 Met gly asp lys gly thr arg val phe lys lys ala ser pro asn gly lys leu thr val
61/21
 TAT CTG GGA AAG CGG GAC TTT GTG GAC CAC ATC GAC CTC GTG GAG CCC GTG GAT GGA GTG
 tyr leu gly lys arg asp phe val asp his ile asp leu val glu pro val asp gly val
121/41
 GTT CTT GTG GAT CCG GAG TAT CTC AAG GAG AGG AGA GTC TAT GTG ACG CTG ACC TGC GCC
 val leu val asp pro glu tyr leu lys glu arg arg val tyr val thr leu thr cys ala
181/61
 TTC CGC TAC GGC CGG GAG GAC CTG GAT GTC CTG GGC CTG ACC TTT CGC AAG GAC CTG TTT
 phe arg tyr gly arg glu asp leu asp val leu gly leu thr phe arg lys asp leu phe
241/81
 GTG GCC AAC GTG CAG TCT TTC CCG CCG GCC CCT GAG GAC AAG AAG CCC CTG ACG CGG CTG
 val ala asn val gln ser phe pro pro ala pro glu asp lys lys pro leu thr arg leu
301/101
 CAG GAG CGC CTC ATC AAG AAG CTG GGC GAG CAT GCC TAC CCT TTC ACC TTT GAG ATC CCT
 gln glu arg leu ile lys lys leu gly glu his ala tyr pro phe thr phe glu ile pro
361/121
 CCG AAC CTC CCA TGC TCT GTG ACT TTG CAG CCG GGA CCT GAA GAT ACA GGG AAG GCC TGC
 pro asn leu pro cys ser val thr leu gln pro gly pro glu asp thr gly lys ala cys
421/141
 GGT GTG GAC TAC GAA GTG AAA GCC TTC TGT GCG GAG AAC CTG GAG GAG AAG ATC CAC AAG
 gly val asp tyr glu val lys ala phe **cys** ala glu asn leu glu glu lys ile his lys
481/161
 CGG AAT TCT GTG CGC CTG GTC ATC CGG AAG GTT CAG TAT GCC CCA GAG AGG CCT GGC CCC
 arg asn ser val arg leu val ile arg lys val gln tyr ala pro glu arg pro gly pro
541/181
 CAG CCC ACG GCC GAG ACC ACC AGG CAG TTC CTC ATG TCA GAC AAG CCC TTG CAT CTG GAG
 gln pro thr ala glu thr thr arg gln phe leu met ser asp lys pro leu his leu glu
601/201
 GCC TCC CTG GAC AAG GAG ATC TAC TAC CAC GGA GAA CCC ATC AGT GTC AAC GTC CAT GTC
 ala ser leu asp lys glu ile tyr tyr his gly glu pro ile ser val asn val his val
661/221
 ACC AAC AAC ACC AAC AAG ACG GTG AAG AAG ATC AAG ATC TCG GTG CGC CAG TAT GCA GAC
 thr asn asn thr asn lys thr val lys lys ile lys ile ser val arg gln tyr ala asp
721/241
 ATC TGT CTG TTC AAC ACA GCC CAG TAC AAG TGC CCT GTG GCC ATG GAA GAG GCT GAT GAC
 ile **cys** leu phe asn thr ala gln tyr lys **cys** pro val ala met glu glu ala asp asp
781/261
 ACA GTG GCA CCC AGC TCT ACG TTC TGC AAG GTC TAC ACG CTG ACC CCC TTC CTG GCC AAC
 thr val ala pro ser ser thr phe **cys** lys val tyr thr leu thr pro phe leu ala asn
841/281
 AAT CGA GAG AAG CGG GGC CTC GCC CTG GAC GGG AAG CTC AAA CAC GAG GAC ACG AAC CTG
 asn arg glu lys arg gly leu ala leu asp gly lys leu lys his glu asp thr asn leu
901/301
 GCC TCC AGC ACC CTG TTG AGG GAA GGA GCC AAC CGG GAG ATC CTG GGC ATC ATT GTT TCC
 ala ser ser thr leu leu arg glu gly ala asn arg glu ile leu gly ile ile val ser
961/321
 TAC AAA GTG AAA GTG AAG CTG GTG GTG TCT CGT GGC GGC CTG TTG GGA GAT CTT GCA TCC
 tyr lys val lys val lys leu val val ser arg gly gly leu leu gly asp leu ala ser
1021/341
 AGT GAT GTG GCC GTG GAA CTG CCT TTC ACC CTA ATG CAC CCC AAG CCC AAA GAG GAA CCC
 ser asp val ala val glu leu pro phe thr leu met his pro lys pro lys glu glu pro
1081/361
 CCA CAC CGG GAA GTT CCA GAG CAC GAG ACG CCG GTA GAT ACC AAT CTC ATA GAA CTT GAC
 pro his arg glu val pro glu his glu thr pro val asp thr asn leu ile glu leu asp
1141/381
 ACC AAC GAT GAC GAC ATT GTG TTT GAG GAC TTT GCC CGC CAG AGA CTA AAA GGC ATG AAG
 thr asn asp asp asp ile val phe glu asp phe ala arg gln arg leu lys gly met lys
1201/401
 GAT GAC AAG GAG GAA GAG GAG GAT GGT ACC GGC TCT CCG CGG CTC AAC GAC AGA TAG
 asp asp lys glu glu glu glu asp gly thr gly ser pro arg leu asn asp arg **AMB**

7.2 Sequenz von *Homo sapiens* b-Arrestin 2

1/1
 atg ggg gag aaa ccc ggg acc agg gtc ttc aag aag tcg agc cct aac tgc aag ctc acc
 Met gly glu lys pro gly thr arg val phe lys lys ser ser pro asn cys lys leu thr
61/21
 gtg tac ttg ggc aag cgg gac ttc gta gat cac ctg gac aaa gtg gac cct gta gat ggc
 val tyr leu gly lys arg asp phe val asp his leu asp lys val asp pro val asp gly
121/41
 gtg gtg ctt gtg gac cct gac tac ctg aag gac cgc aaa gtg ttt gtg acc ctc acc tgc
 val val leu val asp pro asp tyr leu lys asp arg lys val phe val thr leu thr cys
181/61
 gcc ttc cgc tat ggc cgt gaa gac ctg gat gtg ctg ggc ttg tcc ttc cgc aaa gac ctg
 ala phe arg tyr gly arg glu asp leu asp val leu gly leu ser phe arg lys asp leu
241/81
 ttc atc gcc acc tac cag gcc ttc ccc cgg gtg ccc aac cca ccc cgg ccc ccc acc cgc
 phe ile ala thr tyr gln ala phe pro pro val pro asn pro pro arg pro pro thr arg
301/101
 ctg cag gac cgg ctg ctg agg aag ctg ggc cag cat gcc cac ccc ttc ttc ttc acc ata
 leu gln asp arg leu leu arg lys leu gly gln his ala his pro phe phe phe thr ile
361/121
 ccc cag aat ctt cca tgc tcc gtc aca ctg cag cca ggc cca gag gat aca gga aag gcc
 pro gln asn leu pro cys ser val thr leu gln pro gly pro glu asp thr gly lys ala
421/141
 tgc ggg gta gac ttt gag att cga gcc ttc tgt gct aaa tca cta gaa gag aaa agc cac
 cys gly val asp phe glu ile arg ala phe cys ala lys ser leu glu glu lys ser his
481/161
 aaa agg aac tct gtg cgg ctg gtg atc cga aag gtg cag ttc gcc ccg gag aaa ccc ggc
 lys arg asn ser val arg leu val ile arg lys val gln phe ala pro glu lys pro gly
541/181
 ccc cag cct tca gcc gaa acc aca cgc cac ttc ctc atg tct gac cgg tcc ctg cac ctc
 pro gln pro ser ala glu thr thr arg his phe leu met ser asp arg ser leu his leu
601/201
 gag gct tcc ctg gac aag gag ctg tac tac cat ggg gag ccc ctc aat gta aat gtc cac
 glu ala ser leu asp lys glu leu tyr tyr his gly glu pro leu asn val asn val his
661/221
 gtc acc aac aac tcc acc aag acc gtc aag aag atc aaa gtc tct gtg aga cag tac gcc
 val thr asn asn ser thr lys thr val lys lys ile lys val ser val arg gln tyr ala
721/241
 gac atc tgc ctc ttc agc acc gcc cag tac aag tgt cct gtg gct caa ctc gaa caa gat
 asp ile cys leu phe ser thr ala gln tyr lys cys pro val ala gln leu glu gln asp
781/261
 gac cag gta tct ccc agc tcc aca ttc tgt aag gtg tac acc ata acc cca ctg ctc agc
 asp gln val ser pro ser ser thr phe cys lys val tyr thr ile thr pro leu leu ser
841/281
 gac aac cgg gag aag cgg ggt ctc gcc ctg gat ggg aaa ctc aag cac gag gac acc aac
 asp asn arg glu lys arg gly leu ala leu asp gly lys leu lys his glu asp thr asn
901/301
 ctg gct tcc agc acc atc gtg aag gag ggt gcc aac aag gag gtg ctg gga atc ctg gtg
 leu ala ser ser thr ile val lys glu gly ala asn lys glu val leu gly ile leu val
961/321
 tcc tac agg gtc aag gtg aag ctg gtg gtg tct cga ggc ggg gat gtc tct gtg gag ctg
 ser tyr arg val lys val lys leu val val ser arg gly gly asp val ser val glu leu
1021/341
 cct ttt gtt ctt atg cac ccc aag ccc cac gac cac atc ccc ctc ccc aga ccc cag tca
 pro phe val leu met his pro lys pro his asp his ile pro leu pro arg pro gln ser
1081/361
 gcc gct ccg gag aca gat gtc cct gtg gac acc aac ctc att gaa ttt gat acc aac tat
 ala ala pro glu thr asp val pro val asp thr asn leu ile glu phe asp thr asn tyr
1141/381
 gcc aca gat gat gac att gtg ttt gag gac ttt gcc cgg ctt cgg ctg aag ggg atg aag
 ala thr asp asp asp ile val phe glu asp phe ala arg leu arg leu lys gly met lys
1201/401
 gat gac gac tat gat gat caa ctc tgc tag
 asp asp asp tyr asp asp gln leu cys AMB

7.3. Sequenz von *Rattus norvegicus* PAR-4

1/1
 ATG GCG ACC GGC GGC TAT CGG AGC AGC GGC AGC ACC ACG GAC TTC CTG GAG GAG TGG AAA
 Met ala thr gly gly tyr arg ser ser gly ser thr thr asp phe leu glu glu trp lys
61/21
 GCG AAG CGC GAG AAG ATG CGC GCC AAG CAG AAC CCC GTG GGC CCG GGT TCG AGC GGC GGC
 ala lys arg glu lys met arg ala lys gln asn pro val gly pro gly ser ser gly gly
121/41
 GAT CCA GCC GCC AAG TCC CCT GCG GGA CCG CTC GCC CAG ACT ACG GCC GCG GGG ACC TCG
 asp pro ala ala lys ser pro ala gly pro leu ala gln thr thr ala ala gly thr ser
181/61
 GAA CTC AAC CAC GGC CCC GCC GGC GCG GCC GCA CCT GCC GCC CCC GGG CCG GGC GCC CTG
 glu leu asn his gly pro ala gly ala ala ala pro ala ala pro gly pro gly ala leu
241/81
 AAC TGC GCT CAC GGC TCG TCC GCG CTG CCC CGC GGG GCT CCC GGC TCC CGG CGG CCG GAG
 asn cys ala his gly ser ser ala leu pro arg gly ala pro gly ser arg arg pro glu
301/101
 GAC GAG TGT CCT ATT GCC GCT GGG GCC GCG GGA GCA CCC GCG TCC CGG GGA GAC GAG GAG
 asp glu cys pro ile ala ala gly ala ala gly ala pro ala ser arg gly asp glu glu
361/121
 GAG CCG GAT AGC GCC CCG GAG AAG GGC CGC AGC TCG GGG CCC AGC GCC AGG AAA GGC AAA
 glu pro asp ser ala pro glu lys gly arg ser ser gly pro ser ala arg lys gly lys
421/141
 GGG CAG ATC GAG AAG AGG AAG CTG CGG GAG AAG CGC CGC TCC ACC GGC GTG GTC AAC ATC
 gly gln ile glu lys arg lys leu arg glu lys arg arg ser thr gly val val asn ile
481/161
 CCC GCG GCG GAG TGC TTA GAT GAG TAC GAA GAT GAC GAA GCA GGA CAG AAG GAA CGG AAG
 pro ala ala glu cys leu asp glu tyr glu asp asp glu ala gly gln lys glu arg lys
541/181
 CGA GAG GAT GCT ATC ACA CAG CAG AAC ACC ATC CAG AAT GAA GCT GCG AGC CTC CCA GAT
 arg glu asp ala ile thr gln gln asn thr ile gln asn glu ala ala ser leu pro asp
601/201
 CCA GGA ACC TCC TAC CTG CCC CAG GAC CCG TCG AGA ACA GTC CCA GGC AGA TAC AAA AGC
 pro gly thr ser tyr leu pro gln asp pro ser arg thr val pro gly arg tyr lys ser
661/221
 ACA ATC AGT GCC CCA GAA GAA GAA ATC TTA AAT AGA TAT CCC CGA ACA GAT AGA AGT GGC
 thr ile ser ala pro glu glu glu ile leu asn arg tyr pro arg thr asp arg ser gly
721/241
 TTC AGT AGA CAC AAC AGA GAT ACC AGT GCG CCT GCT AAC TTC GCT TCA AGT AGC ACC TTG
 phe ser arg his asn arg asp thr ser ala pro ala asn phe ala ser ser ser thr leu
781/261
 GAA AAG AGA ATT GAA GAT CTT GAG AAG GAA GTC TTG AGA GAA AGG CAA GAA AAC CTT CGA
 glu lys arg ile glu asp leu glu lys glu val leu arg glu arg gln glu asn leu arg
841/281
 CTT ACG AGG CTG ATG CAA GAT AAA GAA GAA ATG ATT GGA AAA CTC AAG GAA GAG ATT GAT
 leu thr arg leu met gln asp lys glu glu met ile gly lys leu lys glu glu ile asp
901/301
 TTG TTA AAT AGA GAC CTC GAT GAC ATG GAA GAC GAA AAC GAG CAA CTA AAG CAG GAA AAT
 leu leu asn arg asp leu asp asp met glu asp glu asn glu gln leu lys gln glu asn
961/321
 AAA ACT CTT TTG AAA GTT GTT GGG CAG CTG ACA AGG TAG
 lys thr leu leu lys val val gly gln leu thr arg AMB

7.4 Abkürzungen

Δ	Deletion
A	Adenosin, Ampere
?	Angström
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
β-OG	β-Octylglykosid
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTB	Desthiobiotin
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Desoxy-Nukleosid Triphosphat
EDTA	N, N-Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(b-Aminoethylether) N', N', N', N' Tetraessigsäure
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H3	Histon 3
H4	Histon 4
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxysäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
IMAC	Immobilised Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalaktosid
IR	Infrarot
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
MCL	Myosin Light Chain
min	Minute
N-	Amino-
OD _x	Optische Dichte bei x Nanometern
p44	Protein, Spleißvariante von Arrestin
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	pH-Wert an dem ein Protein keine Ladungen trägt
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PES	Polyethersulfon
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-tris-Phosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
ppm	parts per million
PVDF	Polyvinylidendifluorid

Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ss	Signalsequenz
T	Thymidin, Transducin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxybenzethylensorbitanmonolaureat
U	Unit ($\mu\text{mol Substrat min}^{-1} \text{ mg Protein}$)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
wt	wildtypisch
w/v	Masse pro Volumen
x	mal
YGSC	Yeast Genetics Stock Center
YNB	Yeast Nitrogen Base (Hefe Stickstoffbase)
YP	Yeast Pepton

Die Aminosäuresequenzen wurden im Ein- und Dreibuchstabencode nach den Regeln der „IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature“ angegeben (Eur. J. Biochem. 5 [1968], 151-153).

Danksagung

Aufrichtig gedankt sei jedem Einzelnen, der, in welcher Form auch immer, zum Zustandekommen, zur Fortführung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat !
Mein besonderer Dank gilt

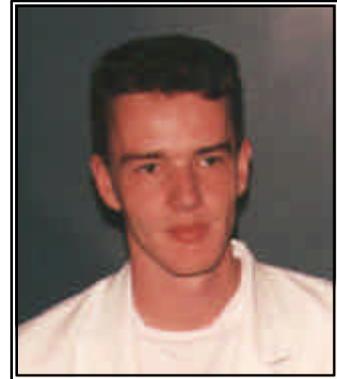
- meinen Eltern für die Unterstützung vor und während meines Studiums
- Georg Büldt für die Überlassung des Themas und der Arbeitsstelle
- Alexander Pulvermüller (Charité Berlin) für die β -Arrestin Bindungsstudien
- Wim Pyckout (IFF) und Valentin Gordeliy für die SANS-Messungen
- Karl Heinz Scheidtmann (Uni Bonn) für die Kinase-Assays und das PAR-4 Plasmid
- Martin Lohse (Uni Würzburg) für das β -Arrestin 1 Plasmid
- Joachim Grötzingler (RWTH, Aachen) für die CD-Spektroskopie-Messungen
- Stephan Grzesiek und Hans-Jürgen Sass (Biozentrum, Basel) für die NMR-Messungen
- Dirk Heitbrink und Carsten Bolwien für die FTIR-Messungen
- Arndt Baumann (IBI-1), auch für die Überlassung der GPCR-Plasmide
- den Mitarbeitern des IBI-1, besonders aber Wolfgang Bönick
- Bianca Krafft für die Einarbeitung in das Gebiet der Hefe-Expression und des Jülicher Nachtlebens und für viele schöne Bier- und Videoabende. Haben auch fertig!!!
- Birgit Gehrman dafür, daß sie mich von der administrativen (dunklen) Seite der Forschung fern gehalten hat...
- Allen Kollegen für die großen und kleinen Gefallen und Anregungen, das Korrekturlesen der Arbeit, den Kaffee, die Diskussionen in der Raucherecke und die Freizeitgestaltung. Dafür, daß Forschen sogar in Jülich Spaß machen kann...

und natürlich:

- Ramona Schlesinger und Jörg Labahn, für alles !

Lebenslauf

Name Ulf Benno Eidhoff
Geburtsdatum 16. November 1970
Geburtsort Siegburg
Familienstand ledig
Anschrift Altdorfer Straße 34
52428 Jülich



Bildungsweg

1977 – 1981 Gemeinschaftsgrundschule Vilich, Bonn
1981 – 1990 Kardinal-Frings-Gymnasium, Bonn-Beuel mit Abitur
(Durchschnittsnote 1,3)
1990 – 1991 Wehrdienst als Sanitäter am Zentralinstitut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr in Koblenz in der Abteilung Transfusionsmedizin
1991 Beginn des Biologiestudiums zum WS 91/92 an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität zu Bonn
02.07.1993 Vordiplom (Durchschnittsnote: 1,07)
1993 – 1995 Hauptstudium mit molekularbiologischem Schwerpunkt
1995 – 1996 Einjähriges Studium an der University of New South Wales, Sydney, Australien im Rahmen eines DAAD-Stipendiums; dort viermonatige Forschungsarbeit über Sequenzdiversität der Carbamoylphosphat-Synthetase bei *Plasmodium falciparum* (Malaria-Erreger) in der Arbeitsgruppe von Dr. T.S. Stewart.
17.07.1996 Diplomhauptprüfungen (Durchschnittsnote 1,0)
01.08.1996 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K.H. Scheidtmann bis
15.09.1997 am Institut für Genetik der Universität Bonn über die „Charakterisierung SV40-Large T Antigen-transformierter Rattenhirntumorzellen“.
17.06.1997 Diplomierung (Gesamtnote: „mit Auszeichnung“)
seit 1.10.1997 Promotion am Institut für Biologische Strukturforschung des Forschungszentrums Jülich GmbH in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Büldt mit dem Titel: „Heterologe Expression, Kristallisation und Untersuchungen zur Struktur von *Bos taurus* β -Arrestin und *Rattus norvegicus* PAR-4“.