

Interaktionsbereiche von Arrestin zu licht-aktiviertem P-Rhodopsin

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Darko Skegro

aus Düsseldorf

Jülich

2004

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

Referent: Prof. Dr. Büldt
Korreferent: Prof. Dr. Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Stäbchenzelle	1
1.2. Der Photorezeptor Rhodopsin	3
1.3. Die Signaltransduktion des Schvorgangs	3
1.4. Arrestin und die Abschaltung der Signaltransduktion	5
1.5. Konformationsänderung und Bindungsverhalten von Arrestin	6
1.6. Arrestin unter medizinischen Gesichtspunkten	10
1.7. Zielsetzung der Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Geräte und Zubehör	13
2.2. Verbrauchsmaterialien	14
2.3. Puffer, Lösungen und Medien	19
2.3.1. Puffer und Lösungen	19
2.3.2. Medien	22
2.3.3. Dokumentation der Ergebnisse	23
2.4. Organismen und Wachstumsbedingungen	23
2.4.1. Wachstumsbedingungen für <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> und <i>H. salinarum</i>	23
2.4.2. Organismen	24
2.4.3. Stammhaltung	26
2.5. Überexpression von Protein	26
2.5.1. Kulturbedingungen, Zellaufschluss und Herstellung von klaren Zelllysaten aus <i>E. coli</i>	26
2.5.2. Kulturbedingungen, Zellaufschluss und Herstellung von klaren Zelllysaten aus <i>S. cerevisiae</i>	27
2.5.3. Kulturbedingungen, Zellaufschluss und Herstellung von klaren Zelllysaten aus <i>H. salinarum</i>	28
2.6. Arbeiten mit DNA	28
2.6.1. Plasmide	29
2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese	29
2.6.3. Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren	30
2.6.4. Herstellung transformationskompetenter Zellen	30
2.6.5. Transformation von DNA in <i>E. coli</i> (Hanahan, 1983)	30
2.6.6. Transformation von DNA in <i>S. cerevisiae</i>	31
2.6.7. Transformation von DNA in <i>H. salinarum</i>	31
2.6.8. PCR (Polymerase Ketten Reaktion)	31
2.6.9. PCR-Primer	33
2.6.10. Sequenzierungsprimer	33
2.6.11. Mutageneseprimer	34
2.6.12. Reinigung von PCR- amplifizierten DNA-Fragmenten	34
2.6.13. DNA Sequenzierung	34
2.6.14. Klonierung verschiedener Arrestine in pYEX-GW und pYEX-BX	35
2.6.14.1. Klonierung in pYEX-GW	36
2.6.14.2. Klonierung in pYEX-BX	37

2.7. Arbeiten mit Proteinen	39
2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.7.2. Färben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen	40
2.7.3. Prinzip des Western-Blots	40
2.7.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran	40
2.7.5. Immunochemische Detektion	41
2.7.6. Verwendete Antikörper und Konjugate	41
2.7.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	42
2.7.7.1. Methode nach Bradford	42
2.7.7.2. UV-Vis Spektroskopie	42
2.8. Chromatographische Purifikation	42
2.8.1. Affinitätschromatographie	42
2.8.1.1. Proteinreinigung mit dem Strep-tag-II System	43
2.8.1.2. Proteinreinigung über immobilisierten Metallionen (IMAC)	44
2.8.2. Proteinreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie	45
2.9. Modifikation von Proteinen	46
2.10. Spektroskopie	47
2.10.1. Zeitabhängige statische Lichtstreuung von Rhodopsin-Arrestin-Komplexen	47
2.10.2. UV/VIS-Absorptionsspektroskopie	49
2.10.3. Fluoreszenzspektroskopie	50
2.10.4. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	51
3. ERGEBNISSE	53
3.1. Austausch der wildtypischen Cysteine 63, 128 und 143 gegen Alanine	53
3.1.1. Konstruktion und Expression von cystein-freiem Arrestin (CA-Arr)	53
3.1.2. Bindungsstudien von CA-Arr an P-Rhodopsin*	54
3.2. Gezielte Einführung von Cysteinen in CA-Arr	56
3.2.1. Expression der CA Arrestine in <i>S. cerevisiae</i>	57
3.3. KLS-Daten von CA Arrestinen mit je einem eingeführten Cystein	59
3.4. Modifikation funktionaler Arrestine	61
3.4.1. Bestimmung des Markierungsgrads von Arrestin mit Fluoreszenzmaleimiden	62
3.5. KLS an markierten CA Arrestinen mit einem Cystein	66
3.5.1. Analyse der N-terminalen Domäne von Arrestin hinsichtlich Interaktion mit P-Rhodopsin*	66
3.5.2. Analyse der C-terminalen Domäne von Arrestin hinsichtlich Interaktion mit P-Rhodopsin*	67
3.5.3. Untersuchung der α -helikalen Region an der Außenseite der N-terminalen Kuppel	68
3.6. KLS an mehrfach markierten CA Arrestinen	69
3.7. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	75
4. DISKUSSION	78
4.1. Substitution der wildtypischen Cysteine 63, 128, 143 zu Alanine	78
4.2. Expression von CA-Arrestinen mit Cystein- Substitutionen in <i>S. cerevisiae</i> und deren Reinigung	79
4.3. Modifikation interaktiver Arrestine	81
4.4. Bindungsstudien	82

4.5. Kinetische Lichtstremessungen (KLS) von Arrestin-Rhodopsin-Komplexen	83
4.5.1. Interaktion der N- bzw. C-terminalen Domäne mit P-Rhodopsin*	83
4.5.2. Interaktion der α -helikalen Region von Arrestin mit P-Rhodopsin*	85
4.6. Interaktion mehrfach markierter Arrestine mit P-Rhodopsin*	86
4.7. Konformationsänderung von Arrestin	87
4.8. Bindungsmodelle vom Arrestin-Rhodopsin-Komplex	89
4.9. Zukunftsaussichten	92
5. ZUSAMMENFASSUNG	93
6. BACTERIO-OPSIN ACTIVATOR (BAT)	94
6.1. Amplifikation des Bat-Gens aus <i>H. salinarum</i> und heterologe Expression in <i>E. coli</i>	96
6.2. Klonieren von Bat in pYEX-BX und Expression in F11 α	101
6.3. Homologe Expression von Bat in <i>H. salinarum</i>	101
6.4. Bat H206C	103
6.5. Zusammenfassung und Ausblick	104
7. LITERATURVERZEICHNIS	106
8. ANHANG	116
8.1. Aminosäuresequenz von Arrestin aus dem Rinderauge	116
8.2. Aminosäuresequenz von Bat aus <i>H. salinarum</i>	119
8.3. Plasmide und Vektoren	125
8.3.1. Klonierungsvektor	125
8.3.2. Expressionsvektoren	125
8.4. Abkürzungen	128

1. Einleitung

In jedem Augenblick unseres Lebens erregen Reize unsere verschiedenen Sinne wie den Tastsinn, Geruchs- und Geschmackssinn, die Ohren und die Augen. So können wir mit unserer Umwelt und unseren Mitmenschen Kontakt aufnehmen und auf Außenreize reagieren. Dabei spielt das Auge eine enorm wichtige Rolle, über das wir unterschiedliche Lichtreize aufnehmen und weiterverarbeiten. Neben Formen und Bewegungen eines Körpers können wir auch seine Farbe erkennen. Nach DIN 5036 ist definitionsgemäß Farbe diejenige Gesichtsempfindung eines dem Auge strukturlos erscheinenden Teiles des Gesichtsfeldes, durch die sich dieser Teil bei einäugiger Beobachtung mit unbewegtem Auge von einem gleichzeitig gesehenen, ebenfalls strukturlosen angrenzenden Bezirk allein unterscheidet.

Der Sehvorgang der Wirbeltiere an sich ist ein höchst empfindlicher Prozess, eine Stäbchenzelle in der Netzhaut ist in der Lage ein einziges Photon wahrzunehmen. Dabei löst Licht in der Netzhaut des Auges eine elektrische Erregung aus. Dabei spricht man von einer photoelektrischen Transduktion, da der Lichtreiz in elektrische Spannungspulse übersetzt wird. In der Retina von Wirbeltieren spielen zwei Typen von Zellen eine Rolle, die empfindlichen Stäbchen und die kegelförmigen Zapfen. Die Stäbchen ermöglichen das Sehen bei geringer Helligkeit (Stryer,1996), während die Zapfen vor allem für das Sehen bei höheren Lichtintensitäten und das Farbsehen verantwortlich sind. Die Stäbchen enthalten in den Außensegmenten den Photorezeptor Rhodopsin. Dieses lichtempfindliche Sehpigment wird durch einfallendes Licht aktiviert und löst nach Absorption des Lichtquants eine photochemische Reaktion aus. Aufgrund der hohen Konzentration an Rhodopsin wird nahezu jedes Lichtquant, was die Sehzelle erreicht, absorbiert, und sorgt so für eine hohe Lichtempfindlichkeit.

1.1. Die Stäbchenzelle

Die Stäbchenzelle arbeitet auch bei schwachem Licht, sie kann aber keine Farbe, wie die Zapfen, wahrnehmen. In der Netzhaut des Menschen gibt es etwa drei Millionen Zapfen und hundert Millionen Stäbchen. Stäbchen sind schlanke, längliche Strukturen. Die zylinderförmige Stäbchenzelle des Rindes hat eine Länge von 100 μm und einen Durchmesser

Einleitung

von ca. 1,2 μm . Morphologisch ist sie in ein Innensegment und in ein Außensegment unterteilt. Dabei werden diese Segmente von einem dünnen Steg, dem Cilium, verbunden (Abbildung 1-1, linke Seite). Das Innensegment gliedert sich strukturell in verschiedene Bereiche und besitzt neben dem Zellkern und den metabolisch aktiven Zellorganellen, wie Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat an seiner distalen Seite eine synaptische Endigung, die die Verbindung zu den nachgeschalteten Neuronen herstellt. Im Außensegment befindet sich der gesamte lichtempfindliche Apparat der Stäbchenzelle. Es besteht aus, von der Plasmamembran umhüllten, 500 bis 1000 abgeflachten, übereinander geschichteten Vesikeln, den sogenannten Disks. In diesen Disks ist zu etwa 90 % das Membranprotein Rhodopsin enthalten (Daemen, 1973). Die Disks werden im proximalen Teil des Außensegments ständig durch Ausstülpung der Membran des Ciliums neu gebildet und wandern in den oberen Teil des Stäbchens, wo sie durch Pigmentepithelzellen wieder abgebaut werden (Kinney et al, 1978; Steinberg et al., 1980).

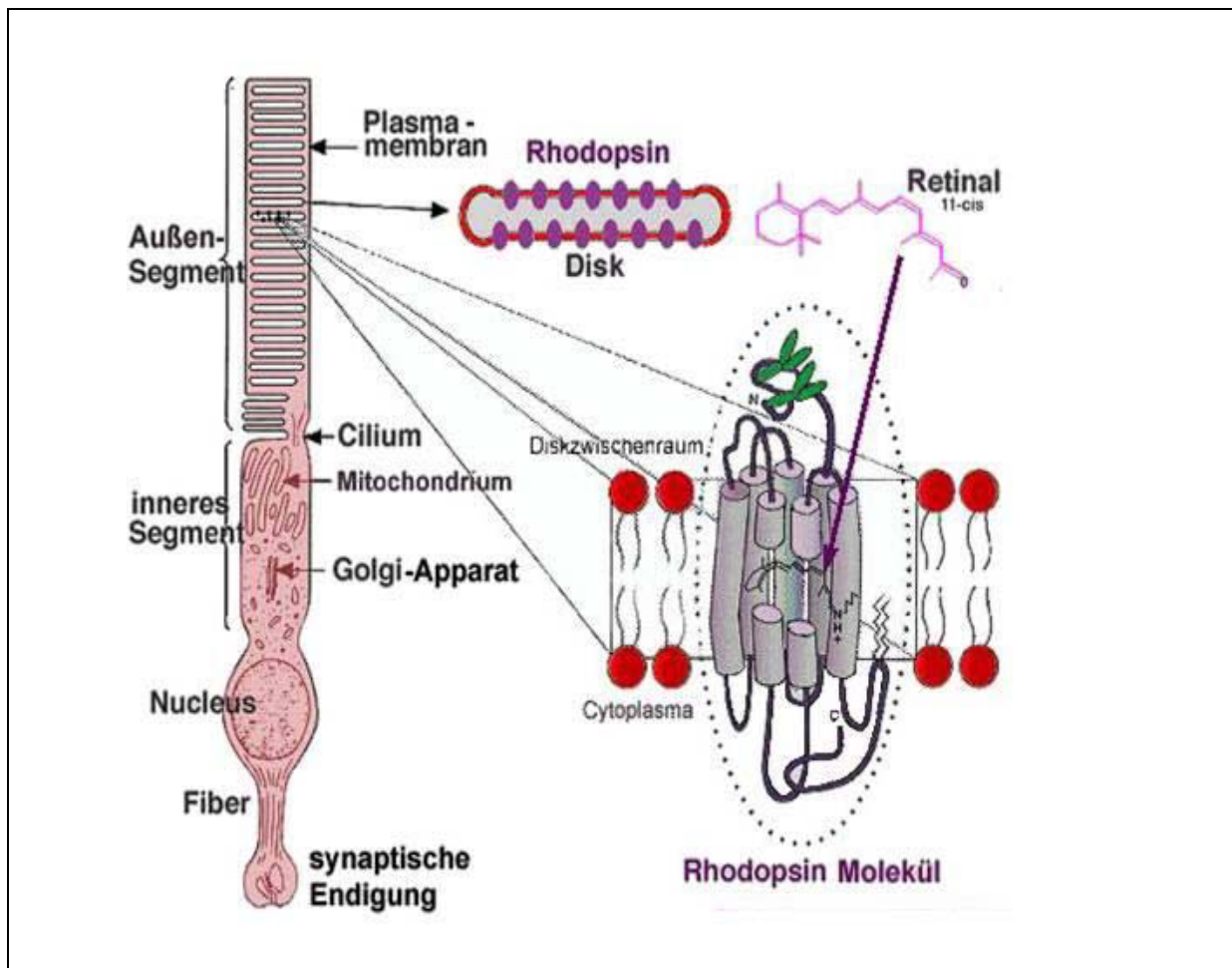


Abbildung 1-1: Darstellung einer Stäbchenzelle, der Diskmembran mit Rhodopsinmolekülen sowie in der Ausschnittvergrößerung das Rhodopsinmolekül in der Diskmembran. Das α -Helix-Bündel-Modell von Rhodopsin ist in der Zylinderform schematisch gezeigt. Die Bindungstasche für das 11-cis-Retinal ist schematisch angedeutet (nach Hargrave & Hamm, 1994).

1.2. Der Photorezeptor Rhodopsin

Das Rhodopsin, ein Membranprotein mit sieben α -Helices, stellt einen G-Protein gekoppelten Rezeptor dar und gehört zur Familie der Retinalproteine. Die Primärstruktur von Rinderrhodopsin wurde 1983 von Ovchinnikov und Hargrave aufgeklärt (Ovchinnikov et al., 1983). Rinderrhodopsin, ein integrales Glykoprotein, bestehend aus 348 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa, ist aus einem Apoprotein, dem Opsin, sowie aus einem kovalent an das Opsin gebundenen Chromophor, dem 11-*cis*-Retinal aufgebaut (Abbildung 1-1, rechte Seite). Die Aminosäuren Cys 322 und Cys 323 des C-terminalen Endes sind palmitoyliert, was zu einer Verankerung der Polypeptidkette in der Membran auf der cytoplasmatischen Seite und zur Bildung eines zusätzlichen Loops führt (Ovchinnikov et al., 1988). Im N-terminalen Bereich sind die Aminosäuren Asp 2 und Asp 15 glycosyliert (Fukuda et al., 1979). Der lichtempfindliche Chromophor 11-*cis*-Retinal befindet sich in der hydrophoben Tasche des Rhodopsins parallel zur Ebene der Diskmembran und ist über eine protonierte Schiff'sche Base mit der Aminosäure Lysin-296 des Opsins kovalent gebunden. Unbelichtet, befindet sich die Schiff'sche Base im protonierten Zustand und das Absorptionsmaximum liegt bei 498 nm.

Lichtinduktion induziert die Isomerisierung des 11-*cis*-Retinals zum *all-trans*-Retinal, und bewirkt damit eine räumliche Änderung der Polyenkette und des β -Iononringes des Retinals im Opsinmolekül (Borhan et al., 2000; Okada et al., 2001).

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist es, außer bei Rhodopsin (Palczewski et al., 2000) nicht gelungen, G-Protein bindende Rezeptoren (GPCR) zu kristallisieren und ihre dreidimensionale Strukturen zu bestimmen.

1.3. Die Signaltransduktion des Sehvorgangs

Nach der Absorption eines Photons, das zu einer Isomerisierung des Retinal-Chromophors von der 11-*cis* in die *all-trans* Konformation führt, durchläuft das Rhodopsin verschiedene spektroskopisch nachweisbare Zustände (Wald & Brown, 1958, 1968; Yoshizawa & Shichida, 1982). Nach wenigen Millisekunden entsteht ein pH- und temperaturabhängiges Gleichgewicht der beiden Photoprodukte Metarhodopsin I (Meta I) und Metarhodopsin II (Meta II) (Parkes & Liebman, 1984). Dieses Gleichgewicht lässt sich durch Zugabe von Transducin (Emeis & Hofmann, 1981) oder Arrestin (Schleicher et al., 1989) verschieben. Meta II ist die biochemisch aktive Konformation, die die lichtinduzierte Enzymkaskade

Einleitung

auslöst (Hofmann & Emeis, 1981; Emeis et al., 1982; Hofmann, 1986). An diese Proteinkonformation bindet das G-Protein Transducin. Das Transducin besteht aus drei Untereinheiten T_α (39 kDa), T_β (36 kDa) und T_γ (8 kDa), wobei die T_α -Untereinheit eine Bindungsstelle für ein Guanylnukleotid besitzt (Kühn, 1980; Fung et al., 1981). Im unbelichteten Außensegment ist Transducin peripher an der cytoplasmatischen Seite der Diskmembranen gebunden. Durch die Wechselwirkung des Transducins mit Meta II wird die Nukleotidbindungsstelle geöffnet und das zuvor fest gebundene Guanosindiphosphat (GDP) verlässt das Protein. Durch die anschließende Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) aus dem Cytoplasma an die freie Bindungsstelle (Kühn, 1980; Kibelbek et al., 1991) verliert die T_α -Untereinheit des Transducins ihre Affinität sowohl zu Meta II, als auch zur T_β und dissoziiert von der Diskmembran. Dieser Vorgang wiederholt sich während der gesamten Lebensdauer von Meta II. Ein photoaktiviertes Rhodopsin kann somit die Freisetzung von etwa 3000 Transducin Molekülen katalysieren (Dawis et al., 1988). Dies ist etwa die Hälfte der auf einer Diskmembran vorhandenen Transducinmenge. Die T_α -Untereinheit aktiviert eine cGMP abhängige Phosphodiesterase (PDE) (Fung et al., 1981), welche Membran assoziiert ist und aus vier Untereinheiten besteht, je eine katalytische α und β Einheit, als auch zwei identische, inhibitorische γ -Untereinheiten. Die beiden γ -Untereinheiten unterdrücken im unbelichteten Außensegment die katalytische Fähigkeit der PDE. Eine Aktivierung kann nur erfolgen, wenn der Inhibitor der PDE durch T_α -GTP gebunden und entfernt wird. Die Umsatzrate der PDE hat eine Größenordnung von mehreren tausend hydrolysierten cGMP pro PDE-Molekül pro Sekunde. Das aktive Enzym hydrolysiert zyklisches GMP zu 5'-GMP. Die Abnahme der cGMP Konzentration führt zur Schließung der Natriumkanäle und damit letztlich zu einer Hyperpolarisation der Stäbchenzelle.

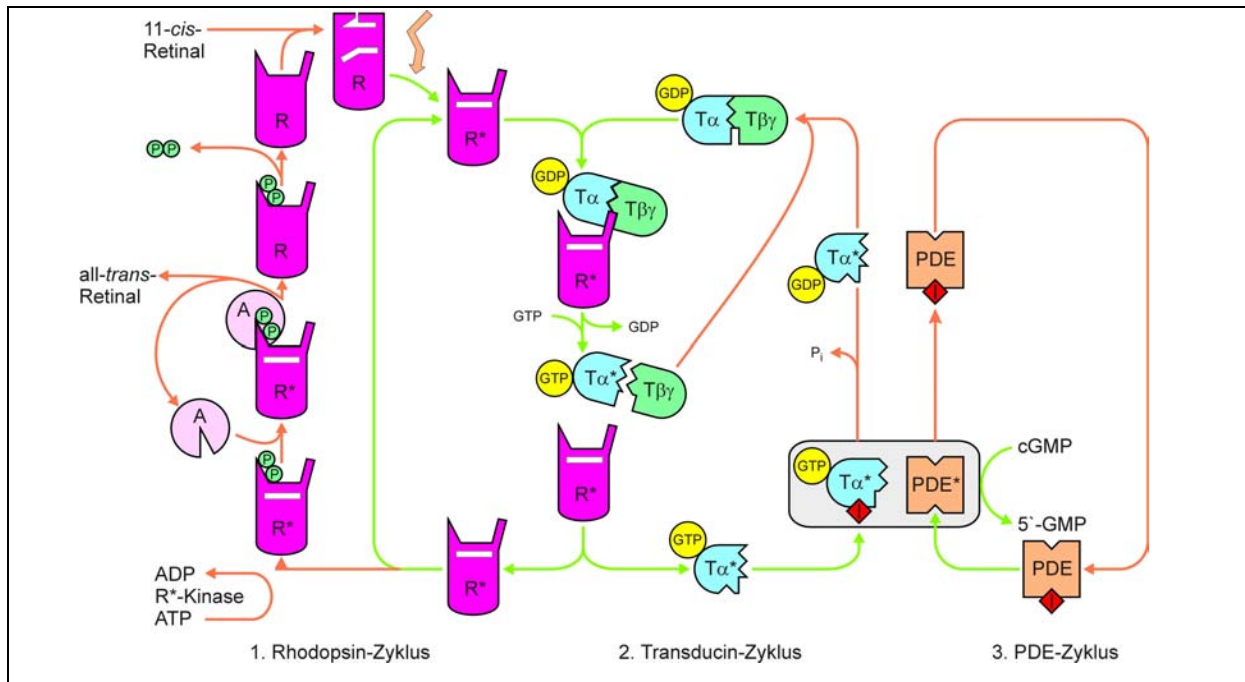


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Reaktionszyklen (Müller & Kaupp, 1998). Erklärungen siehe im Text, Kapitel 1.3.

1.4. Arrestin und die Abschaltung der Signaltransduktion

Der effektivste Weg zur Abschaltung der Enzymkaskade ist die Deaktivierung des photoaktiven Rezeptors. Die Abschaltung ist notwendig, da die Meta II Konformation (10^3 s) eine erheblich längere Lebensdauer als das aktive Rhodopsin (2-3 s, Pepperberg et al., 1988) besitzt. Ein spontaner Zerfall von Meta II ist viel zu langsam, um eine sichere Abschaltung zu gewährleisten. Die Deaktivierung beginnt mit der Bindung der Rhodopsinkinase an R^* und anschließender Phosphorylierung des C-terminalen Endes von Rhodopsin. Es können vier bis neun Phosphate auf die cytoplasmatische Seite des aktivierten Rhodopsins übertragen werden (Palczewski et al., 1991a), wobei ausschließlich Serine und Threonine phosphoryliert werden (Onorato et al., 1991). Die Rhodopsinkinase wird außerhalb ihrer katalytischen Domäne nahe dem N- und C-terminalen Ende autophosphoryliert und verliert dadurch die Affinität zum Rezeptor (Palczewski et al., 1992b). Bereits nach der Übertragung einer Phosphatgruppe auf das licht-aktivierte Rhodopsin kann die Bindung von Arrestin erfolgen (Wilden, 1995). Arrestin ist ein lösliches Protein, das sowohl im Innen- als auch im Außensegment der Photorezeptorzelle vorkommt. Es besteht aus einer Polypeptidkette von 404 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 45,275 kDa. Arrestin wird post-translational durch eine Acetylierung am N-terminalen Ende modifiziert (Buczylo & Palczewski, 1993). Bisher sind Daten von Röntgenstrukturanalysen bekannt, die sich hauptsächlich in der Auflösung der C- und N-Termini unterscheiden (Granzin et al., 1998; Hirsch et al., 1999). Arrestin besitzt eine

Größe von 90x39x50 Angström³ und besteht aus zwei Domänen (Granzin et al., 1998). Einen Großteil des Moleküls machen antiparallele β -Faltblätter mit einer kurzen N-terminalen α -Helix aus. Die zwei Domänen sind über einen flexiblen Bereich, der als „*hinge region*“ bezeichnet wird, verbunden. Die N-terminale Kuppel hat an der Basis einen Durchmesser von 35 und eine Tiefe von 24 Angström, während die C-terminale Kuppel im Vergleich etwa einen 10 Angström kleineren Durchmesser hat.

Durch Bindung von Arrestin ist die Sehkaskade beendet, da die Interaktion zwischen P-R* und Transducin sterisch blockiert wird. Die Dissoziation des Arrestins vom phosphorylierten Rhodopsin ist ein langsamer Prozess, der mit der Regeneration des Rhodopsin einhergeht (Hofmann et al., 1992). Durch die Retinoldehydrogenase wird der Chromophor zu *all-trans*-Retinol reduziert, was dazu führt, dass Arrestin seine Affinität zum phosphorylierten Rhodopsin verliert und dissoziiert. Für die Entfernung des *all-trans*-Retinals werden ATP-abhängige Transporter diskutiert (Sun et al., 1999). Das Retinal reagiert im intradiskalen Raum zunächst mit Phosphatidylethanolamin (PE) zu N-Retinylden-PE, das durch ABC-Transporter ins Cytosol geschleust wird (Weng et al., 1999). Dabei wird das N-Retinylden-PE beim Transport durch die Membran hydrolysiert. Anschließend wird das Retinal durch *all-trans*-Retinol-Dehydrogenase (RDH) zum *all-trans*-Retinol reduziert (Palczewski et al., 1994b). Dieses Retinol wird von einem Retinoid-bindenden Protein gebunden und diffundiert passiv zum retinalen Pigmentepithel (Palczewski et al., 1999; McBee et al., 2000), wo das Retinol durch eine Lecithin-Retinol-Acetyltransferase verestert wird (Ruiz, et al., 1999). Dieser Ester wird hydrolysiert und zum 11-*cis*-Retinal oxidiert (Simon et al., 1999). Eine Proteinphosphatase dephosphoryliert das Opsin, welches dann mit dem regenerierten 11-*cis*-Retinal zu neuem Rhodopsin assoziiert (Vinos et al., 1997).

1.5. Konformationsänderung und Bindungsverhalten von Arrestin

Der genaue Mechanismus der Arrestin-Rhodopsin Interaktion ist bis dato nicht bekannt, allerdings werden mehrere Modelle kontrovers diskutiert.

Durch die Phosphatgruppe wird die Affinität zum Transducin gemindert und die Bindung an Arrestin gesteigert (Gibson et al., 2000). Funktionell sind nur ein bis zwei Phosphate pro Rhodopsin nötig, um das Rhodopsin zu deaktivieren. Als Hauptphosphorylierungsstellen wurden die Aminosäuren Serin 338 und Serin 343 vermutet (Ohguro et al., 1993). Mutationsstudien von Brannock et al., (1999) zeigten jedoch, dass die negative Ladung des phosphorylierten Rhodopsins nicht ausreicht, um eine hundertprozentige Arrestinaktivität zu

erreichen. Rhodopsinmutanten, in denen sieben postulierte Phosphorylierungsstellen durch Serine ersetzt wurden, bewirkten eine geringere Arrestinaktivität, als Arrestine, in denen diese Stellen durch Threonine ersetzt wurden. Brannock konnte zeigen, dass außer Serin 338 und 343 auch Threonin 340 des Rhodopsins starken Einfluss auf das Bindungsverhalten von Arrestin besitzt. Der Austausch des Threonin 340 gegen Alanin oder Glutaminsäure führte zu einer Verminderung der Arrestinaktivität von ca. 50 % (Zhang et al., 1997). Eine Substitution von Serin 343 zu Alanin oder Glutaminsäure bewirkte nur im Fall des Alaninaustausches eine Abnahme der Arrestinaktivität von ca. 50 %. Diesen Daten zufolge reicht eine negative Ladung an Position 343, während an Position 340 die negative Ladung nicht mehr ausreicht, um eine Arrestinbindung zu initiieren. Der genaue Mechanismus der Arrestin-Rhodopsin Bindung ist bisher nicht aufgeklärt. Es wurden aber mehrere Mechanismen vorgeschlagen. Arrestin bindet nur an die Meta-II Konformation von P-Rhodopsin*, wobei die vorhergehende Phosphorylierung des licht-aktivierten Rhodopsinmoleküls durch Rhodopsinkinase vorausgesetzt wird (Kühn et al., 1973). Arrestin muss zuvor eine Umwandlung in eine aktive, zur Bindung befähigte Form gebracht werden. Diese Konformationen liegen im Gleichgewicht, wobei man annimmt, dass eine wesentliche Funktion der Aminosäuren im C-terminalen Bereich von Arrestin, die Stabilisierung der inaktiven Konformation sein könnte (Palczewski et al., 1991b). Die Vermutung für eine konformative Änderung im Arrestin wird durch die ungewöhnlich hohe apparente Aktivierungsenergie von 140 kJ/mol der Arrestin/Rhodopsin Wechselwirkung erhärtet (Pulvermüller et al., 1997). Weiterhin zeigt sich eine Veränderung der Proteolyse (Palczewski et al., 1991c) von Arrestin nach Bindung an Rhodopsin, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass rhodopsingebundenes Arrestin eine andere Konformation annimmt, als freies inaktives Arrestin. Im Gegensatz dazu postulieren Granzin et al., (1998) und Shilton et al., (2002) eine nur geringe Umlagerung der Proteins.

Vishnivetskiy et al., (2003) konnte zeigen, dass die Schlüsselmechanismen in allen Arrestinen konserviert sind. Untersuchungen an β -Arrestin (Han et al., 2001; Milano et al., 2002), bei denen die Kristallstrukturen von wildtypischen β -Arrestin und einer phosphorylierungsunabhängigen verkürzten Form verglichen wurden, konnten nur geringfügige Konformationsänderungen feststellen.

Ein weiteres Modell zum Mechanismus der Änderung von Arrestin geht von einer intramolekularen Salzbrücke zwischen den C-terminalen Aminosäuren und einer Lysinreichen Region im Arrestin aus. Diese Salzbrücke wird aufgebrochen und somit vorher blockierte Bindungsstellen für P-Rhodopsin* am Arrestinmolekül freigelegt. Dabei wird

Einleitung

jedem Bereich des Proteins eine spezielle Funktion während der Bindung an P-Rhodopsin* zugeordnet. Nach Gurevich besitzen die Aminosäuren 1-29 regulatorische Funktionen, während die N-terminale Hälfte (AS 29-163) zur Erkennung der Lichtaktivierung benötigt wird und interagiert mit Rhodopsin, welches wiederum die Konformation bei dieser Aktivierung ändert. Die Phosphorylierungs-Erkennungs-Domäne soll vornehmlich in der N-terminalen Region, im Bereich der Aminosäuren 163 und 191 liegen und soll mit dem phosphoryliertem C-Terminus von Rhodopsin interagieren. Bei diesem Prozess kommt dem Arginin 175 eine spezielle Rolle eines sensitiven Triggers zu. Arginin 175 wurde als Teil des „polar core“, ein Gerüst von Salzbrücken zwischen verschiedenen Aminosäureresten identifiziert (Abbildung 1-3).

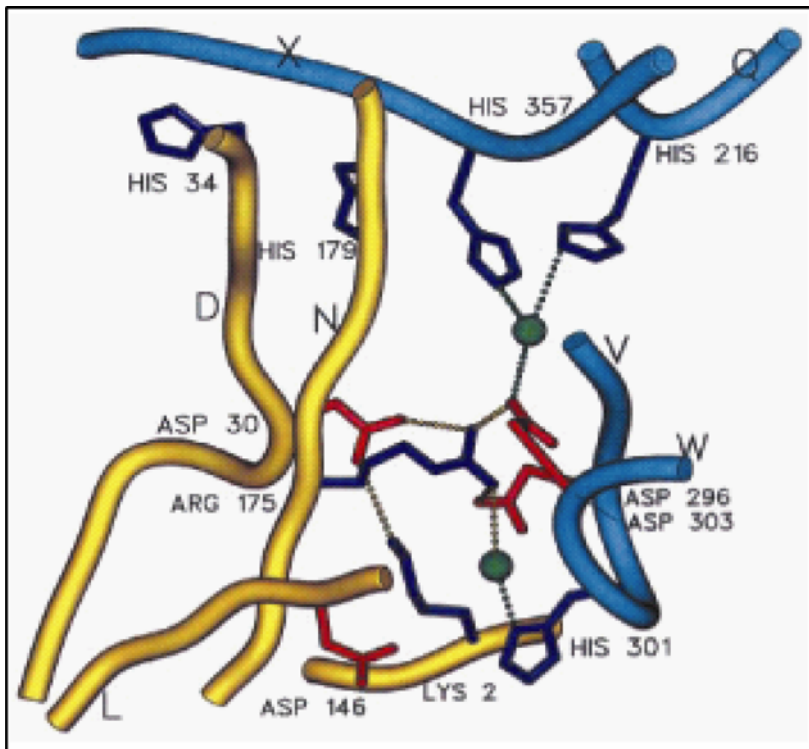


Abbildung 1-3: „Polar core“, das Salzbrückengerüst im Arrestin

Im Gerüst sind die Aminosäuren Asp 30, Arg 175, Asp 296 und Asp 303 beteiligt. In der Struktur von Granzin wird der N-Terminus via Lysin 2 einbezogen. Im Modell sind zusätzlich noch Wasserstoffbrückenbindungen mit den Resten His 216, His 301 und His 357 und Wassermoleküle (grün) eingezeichnet (Struktur von Granzin et al., 1998).

Das Arginin 175 liegt in einer unüblichen Rotamer-Konformation vor. Verantwortlich hierfür sind die Salzbrücken zu Asp 30, Asp 296 und Asp 303, sowie einer weiteren Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül. Bei der postulierten Triggerung müssen die Salz- und Wasserstoffbrücken gelöst werden. Bei diesem Prozess könnte Arginin 175 in eine Standard-Rotamer-Konformation übergehen und wäre so dem C-terminalen Ende des

Einleitung

Rhodopsins zugänglich. Nach Vishnivetskiy et al., (2002) dient dieser „*polar core*“ wahrscheinlich der Stabilität der inaktiven Arrestin-Konformation.

Die funktionalen Bereiche in Arrestin sind zwar spekulativ, jedoch deutet ein modellierter Arrestin-Rhodopsin-Komplex an (Granzin et al., 1998), dass die Größe einer kuppelartigen Domäne ausreicht, um die cytoplasmatischen Schleifen von Rhodopsin vollständig gegen Transducin abzuschirmen (Abbildung 1-4). Allerdings ist auch ein Mechanismus denkbar, dass sowohl die N- als auch die C-terminale Domäne bei der Arrestinbindung an Rhodopsin beteiligt sind (Pulvermüller et al., 2000; Han et al., 2001). Nach Vishnivetskiy et al., (2003) sind Aminosäurereste 49-90 und 237-268 von visuellem und β -Arrestin in hohem Maße für ihre Rezeptor-Präferenz verantwortlich. Das heißt, in beiden Domänen findet sich diese Präferenz, was das Modell von zwei für die Bindung involvierten Domänen favorisiert.

Neue Studien diskutieren ein Modell, wobei ein Arrestin zwei Rhodopsine bindet (Fotiadis et al., 2003).

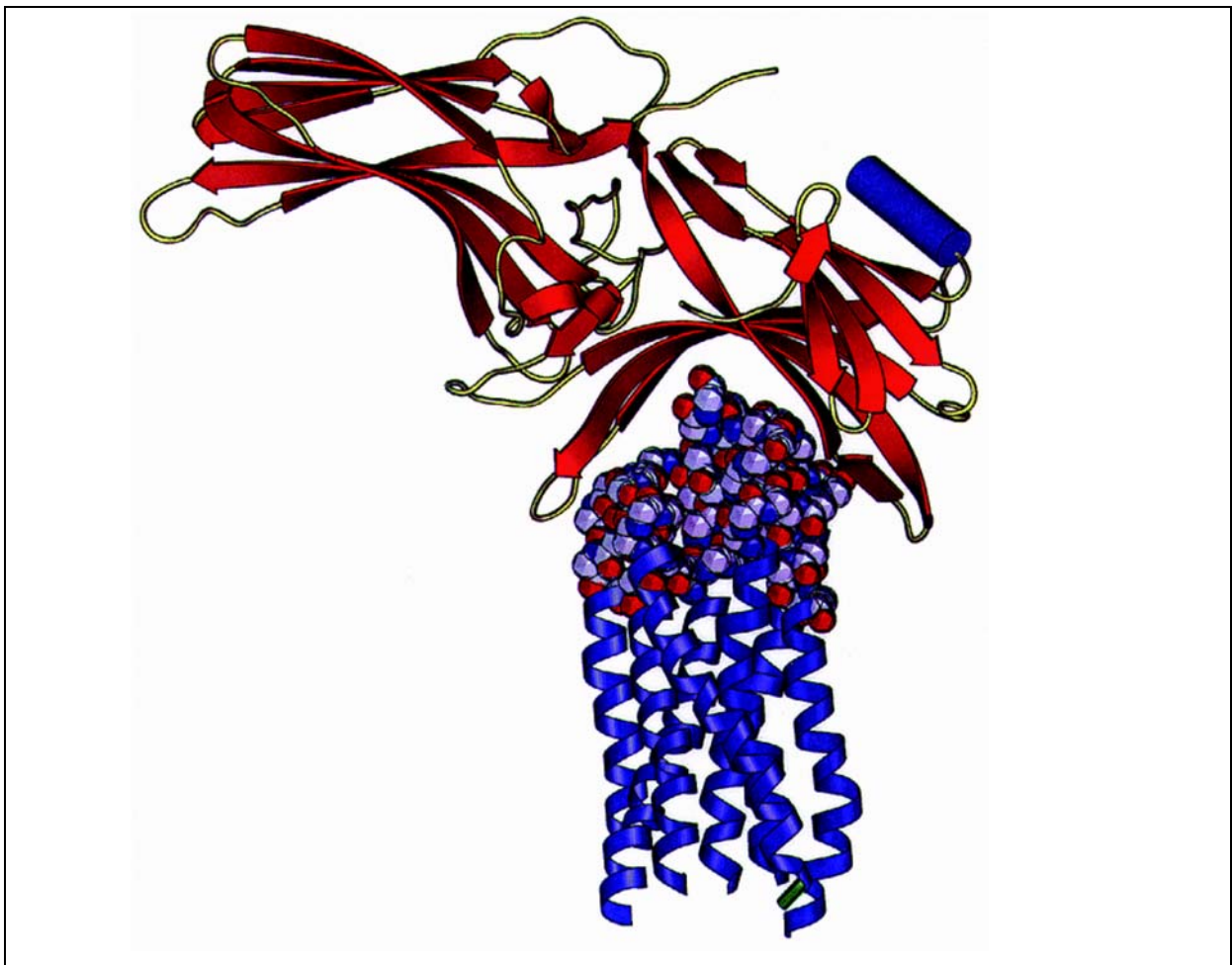


Abbildung 1-4: Mögliche Koordination von Arrestin (Molekül B) und Rhodopsin (theoretisches Modell von Metarhodopsin II, Protein Data Bank id: 1boj; Granzin et al., 1998)

1.6. Arrestin unter medizinischen Gesichtspunkten

Unter medizinischen Gesichtspunkten ist Arrestin interessant, da mit der sogenannten Oguchi-Krankheit (eine erbliche Form der Nachtblindheit) eine Deletion des Nukleotids 1147 im Arrestin-Gen verknüpft ist. Diese Mutation führt zu einem Stop-Codon, wodurch die Proteinsynthese vorzeitig beendet wird (Fuchs et al., 1995; Nakamachi et al., 1998). Zwei weitere Mutationen im Arrestin-Gen (Arg175Stop und Arg292Stop) sind gefunden worden, die eine Verbindung mit der Oguchi-Krankheit zulassen (Nakamura, 2004).

Arrestin spielt auch bei einer bis dato unheilbaren, retinal-degenerativen Augenkrankheit, „*Retinitis pigmentosa*“ (RP) eine wichtige Rolle. Mutationen an Arg 135 im Rhodopsin (R135L, R135G und R135W) führen zu Hyperphosphorylierung und damit, trotz Abwesenheit vom Chromophor, zur hoch affinen Bindung von Arrestin. Dieser stabile Rhodopsin-Arrestin-Komplex führt zu morphologischen Veränderungen der endosomalen Kompartimente (Chuang et al., 2004).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist, Erkenntnisse zur Bindungsregion von visuellem Arrestin bei der Komplexbildung mit Rhodopsin zu erlangen. Grundlage hierfür ist die dreidimensionale Struktur von Arrestin, bestehend aus zwei kuppelförmigen Domänen, die durch die flexible „*hinge region*“ verbunden sind und aus Literaturdaten bekannte Bindungsmodelle. Es besteht die Annahme, dass die Bindung von Arrestin an Rhodopsin an der Innenseite einer bzw. beider Kuppeln oder im α -helikalen Bereich außerhalb der Kuppeln stattfindet (Granzin et al., 1998; Smith et al., 1999). Zu diesem Zweck werden die konkaven Seiten der N- bzw. C-terminalen Domäne und Bereiche der N-terminalen α -Helix sterisch blockiert, so dass diese Bereiche für eine eventuelle Interaktion mit Rhodopsin nicht mehr zur Verfügung stehen. Anhand der Raumstruktur werden in jeder Domäne zwei und im α -helikalen Bereich drei Aminosäuren ausgewählt, deren Seitenketten aus dem Protein herausragen und keine Interaktion mit anderen Aminosäureresten des Proteins eingehen. Die ausgewählten Aminosäuren sollen gentechnisch durch Cysteine ersetzt werden. In jedem der genannten Arrestinbereiche werden alternative Aminosäuren durch Cysteine ersetzt, da im Falle einer Abweichung vom wildtypischen Verhalten einer Mutante ein Ausweichen auf alternative Proteine möglich ist.

Einleitung

Desweiteren wird eine Position in der Schleifenstruktur zwischen den konkaven Seiten der beiden Domänen gewählt (Abbildung 1-5), da sie in der Kristallstruktur in je zwei Molekülen der asymmetrischen Einheit eine andere Konformation einnimmt und eventuell am Bindungsmechanismus beteiligt sein könnte. Es wird vermutet, dass dieser Bereich direkt oder indirekt an der Interaktion von Arrestin zu Rhodopsin beteiligt ist.

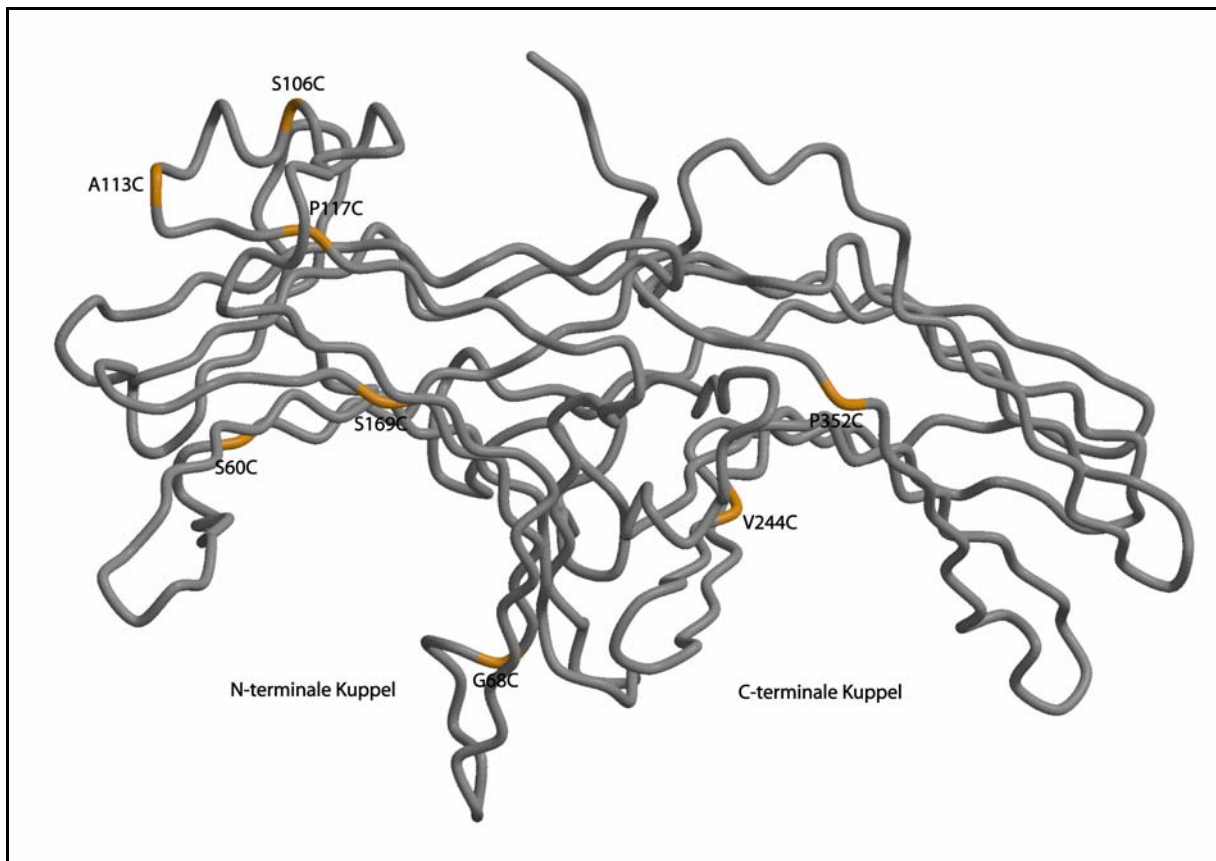


Abbildung 1-5: Das Modell zeigt das Polypeptid-Rückgrat von Arrestin. Die Positionen der Substitutionen sind gelb hervorgehoben. Weiterhin sind die substituierten Aminosäuren angegeben.

Es sollen Arrestine mit jeweils nur einem Austausch, aber auch Proteine mit zwei, drei und vier Austauschen erzeugt werden. Die Sulfhydrylgruppen der Cysteine können spezifisch, kovalente Bindungen zu Maleimidgruppen geeigneter Moleküle ausbilden. Der Hintergrund ist, diese Regionen mit Hilfe von großen Fluoreszenzfarbstoffen sterisch zu blockieren, um somit mögliche Interaktionsbereiche für Rhodopsin unzugänglich zu machen. Die wildtypische Arrestin-Aminosäuresequenz weist drei Cysteine auf (Cys 63, 128 und 143), deren Zugänglichkeit bei der Modifikation mit den Fluoreszenzfarbstoffen nicht auszuschließen ist. Aus diesem Grund sollen diese durch Aminosäuren ohne Sulfhydrylgruppe ausgetauscht werden. Ein erster Versuch mit Serin-Substitutionen zeigte keine Interaktion mit Rhodopsin, weshalb die Cysteine durch Alanine ersetzt werden sollen.

Einleitung

Mutiertes Protein sollte für diesen Zweck in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. Die löslichen, mutierten Arrestine sollen auf ihre Interaktion mit phosphoryliertem, licht-aktiviertem Rhodopsin (P-Rhodopsin*) mittels kinetischer Lichtstreuung überprüft werden. Arrestine, die uneingeschränkte Bindung mit P-Rhodopsin* eingehen, sollen anschließend mit Fluoreszenz-Farbstoffen modifiziert und erneut in Interaktionsversuchen mit P-Rhodopsin* geprüft werden, um dann Rückschlüsse auf Binderegionen von Arrestin machen zu können.

In **Kapitel 6** ist ein zweites Projekt beschrieben, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurde. Bat (Bacterio-opsin activator), ein licht- und redox-sensitiver Transkriptionsfaktor vom halophilen Organismus *Halobacterium salinarum* sollte mit dem entsprechenden Chromophor gewonnen und spektroskopisch untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. 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
UV-2101 PC, Shimadzu, Japan
UV-2401 PC, Shimadzu, Japan

Fermenter

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

ÄKTA

Explorer, Amersham Biosciences

SDS-Gelelektrophorese

Power Supply EPS 3500, Pharmacia, Uppsala, Schweden
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.

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 40 K, 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

Sorvall RC5C mit Rotoren SS34, Super-Lite GS-3, DuPont, Wilmington, U.S.A.

Beckman J20 XP mit den Rotoren JA 25.50 und JLA-8.1000, Palo Alto, U.S.A.

2.2. 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
Agar	Difco, ICN
Agarose (Standard)	Sigma, Biozym
L-Alanin	Merck, Fluka
Ampicillin	Boehringer Mannheim
L-Arginin	Sigma
L-Asparagin	Sigma, Fluka
L-Asparaginsäure	Sigma
Bacto Pepton	Difco
Brain Heart Infusion (BHI) Broth	Difco

Material und Methoden

Brain Heart Infusion (BHI) Agar	Difco
Bromphenolblau	Bio-Rad
BSA	Serva
Calciumchlorid	Merck
Citronensäure	Merck
Complete™, EDTA-free	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
L-Cystein	Sigma, Merck
Desthiobiotin	Sigma
Dimethylformamid	Merck
DMSO	Merck
DTT	Merck
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
GTP, Natriumsalz	Sigma
Glycerin	Sigma
L-Glycin	Sigma
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
HABA	Sigma
Harnstoff	Merck
HEPES	Sigma
Hefe-Extrakt (Yeast Extract)	Difco
L-Histidin	Sigma
Imidazol	Sigma
IPTG	Eurogentech
L-Isoleucin	Sigma

Material und Methoden

Isopropanol	Riedel de Haen
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycin	Sigma
Kupfersulfat	Merck
L-Leucin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
L-Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Riedel de Haen
L-Methionin	Sigma
Natriumchlorid	Merck
tri-Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Paraffinöl	Merck
Pepton	Oxoid
L-Phenylalanin	Sigm
PMSF	Sigma
Polyethylenglykol 3350	Sigma
Ponceau S	Sigma
L-Prolin	Sigma
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel de Haen
L-Serin	Sigma
SDS	BioRad
TEMED	BioRad
L-Threonin	Sigma
Tris (Base)	Sigma

Material und Methoden

Tris (HCl)	Sigma
Trypton	Difco
L-Tryptophan	Sigma, Aldrich
Tween 20	Sigma
L-Tyrosin	Sigma
Uracil	Sigma, Aldrich
L-Valin	Sigma
YNB, ohne Aminosäuren	Difco

Enzyme

Alkalische Phosphatase	Biolabs
Taq Expand High Fidelity	Boehringer Mannheim
T4 DNA-Ligase	Biolabs
KOD Hot Start Polymerase	Novagen

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

Filtereinheiten

- 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.

Molekulargewichts-Standards für die Elektrophorese

Protein

Rainbow, high molecular weight	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE, Molecular Weight Standard, Broad Range 10 kDa-Ladder	BioRad, München Gibco/BRL, Karlsruhe
BenchMark™, Protein Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
BenchMark™, Prestained Protein Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe

DNA

1 kb Ladder	Gibco/BRL, Karlsruhe
-------------	----------------------

Rotlichtquelle

Glühbirne PF712, Philips, Kassel

Säulenmaterialien für die Chromatographie

StrepTactin Sepharose,	IBA, Göttingen
His Bind Resin	Novagen
Superdex 200 10/300 GL	Amersham
Mini Q 4.6/ 50 PL	Amersham
PD- 10 Desalting column	Amersham
Hi Trap DEAE FF, 1 ml	Amersham
Hi Trap Q XL, 1 ml	Amersham
Hi Trap Phenyl FF HP, 1 ml	Amersham
Hi Trap Butyl FF, 1 ml	Amersham

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
Ultra-15, -10; Amicon, Beverly, USA
Centricon-10, -30; Amicon, Beverly, USA
Microcon-10, -30; Amicon, Beverly, USA
Centriplus-10, -30; Amicon, Beverly, USA

2.3. Puffer, Lösungen und Medien

2.3.1. Puffer und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben, werden alle Lösungen und Puffer in hoch reinem Wasser (Millipore-Qualität) angesetzt.

Chromatographie

Affinitätschromatographie-Puffer: His-Waschpuffer: 10 mM Imidazol, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 8,0
His-Elutionspuffer: 500 mM Imidazol, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 8,0
His-Strippuffer: 100 mM EDTA, 200 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 8,0
His-Regenerationspuffer: 6 M GuCl
Strep-Waschpuffer: 200 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 8,0
Strep-Elutionspuffer: 2,5 mM Desthiobiotin, 50 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 8,0
Strep-Regenerationspuffer: 1 mM HABA, 10 mM HEPES, 400 mM NaCl; pH 7,5

Anionenaustauscher-Puffer: AIEX-Waschpuffer: 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0 bzw. 20 mM Tris pH 8,0
AIEX-Elutionspuffer: 10 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 5,8-8,0; 1 M NaCl bzw. 20 mM Tris pH 8,0; 1 M NaCl

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

Material und Methoden

Polyacrylamidgelelektrophorese

2x SDS-Probenpuffer:	124 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

Protein

Rhodopsin-Puffer:	20 mM BTP: (1,3- Bis[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]- Propan, 130 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂ ; pH 7,5
Arrestin-Puffer :	50 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 8,0
Bat-Puffer :	200 mM NaCl, 10 mM Kaliumphosphat; pH 8,0

Herstellung transformationskompetenter Zellen

SOB (pro Liter):	20 g Trypton 5,0 g Hefeextrakt 0,6 g NaCl 0,2 g KCl pH 6,8-7,0
vor Gebrauch 10 ml einer Lösung 1 M Magnesiumchlorid und 1 M Magnesiumsulfat zufügen	
TFB-I-Puffer:	30 mM NaAc 50 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin; pH 6,0
TFB-II-Puffer:	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM NaCl 15 % Glycerin; pH 7,0

Material und Methoden

Transformation von *S. cerevisiae*

TE-LiAc:	10 mM Tris/ HCl, 0,1 mM EDTA, 100 mM LiAc; pH 7,6
TE-LiAc-PEG:	10 mM Tris/ HCl, 0,1 mM EDTA, 100 mM LiAc; pH 7,6 40 % (w/v) PEG 3350

Transformation von *H. salinarum*

Basal Salz C-Lösung:	250 g NaCl (4,3 M), 20 g MgSO ₄ * 7H ₂ O (80 mM), 3 g tri-NaCitrat* 2H ₂ O (10 mM), 2 g KCl (27 mM), 25 ml 2 M Tris; pH 7,4 (50 mM) ad 897 ml H ₂ O, autoklavieren; dann 3,1 ml 0,5 M CaCl ₂ (1,4 mM) dazu
Support Medium:	3 g Bacto Yeast Extract, 5 g Bacto Tryptone, ad 200 ml H ₂ O, autoklavieren; 897 ml Basal Salz C-Lösung (ohne CaCl ₂), autoklavieren; 3,1 ml 0,5 M CaCl ₂
Sphäroblasten-Lösung (SPH):	11,6 g NaCl (2 M), 0,2 g KCl (25 mM), 5ml 1M Tris; pH 8,75 (50 mM), 15 g Saccharose (15 % w/v), ad 100 ml H ₂ O
EDTA-Lösung:	3,7 g Na ₂ EDTA (0,5 M), mit NaOH auf pH 8,75 ad 20 ml SPH
PEG-Lösung:	6 ml PEG 600, 4 ml SPH
Sphäroblastenverdünnungslösung:	20,4 g NaCl (4 M), 3,7 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O (80 mM), 0,4 g KCl, 0,1 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O, 15 g Saccharose (15 % w/v), 2,5 ml 2M Tris, ad 1 l H ₂ O; pH 7,4

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, 0,1 % (v/v) Tween 20; pH 7,6
Stripping-Lösung:	60 mM Tris, 100 mM Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS

2.3.2. Medien

Wenn nicht anders angegeben, werden die Medien autoklaviert (121 °C, 2,1 bar, 20 min.). Medienzusätze (Kohlenstoffquellen, Antibiotika und andere Zusätze) werden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen zugesetzt.

Medienzusätze:

Ampicillin- Stammlösung:	200 mg/ml Ampicillin in H ₂ O, sterilfiltriert
Kanamycin- Stammlösung:	50 mg/ml Kanamycin in H ₂ O, sterilfiltriert
Novobiocin-Stammlösung:	1 mg/ml Novobiocin in H ₂ O, sterilfiltriert
IPTG-Stammlösung:	1 M in H ₂ O, sterilfiltriert
CuSO ₄ -Stammlösung:	500 mM in H ₂ O, sterilfiltriert
Galaktoselösung:	20 % (w/v) in H ₂ O, sterilfiltriert

Bakterienmedien:

dYT:	1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl
BHI:	52 g BHI pro l Medium

Halobakterienmedium:

Vollmedium POM:	250 g NaCl, 20 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O, 10g Fleischpepton L37, 3 g Na ₃ Citrat* 2H ₂ O, 2 g KCl, ad 1l H ₂ O pH 6,5
-----------------	---

Hefemedien:

Minimalmedium SC:	0,67 % (w/v) YNB ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Galaktose, 0,1 % (w/v) <u>DROP-OUT-MIX</u> ohne Uracil bzw. ohne Leucin Für Agarplatten wird dem Medium 2 % (w/v) Agar zugesetzt.
Vollmedium YPD:	2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt, 2 % (w/v) Galaktose Für Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

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

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

Anstelle von DROP-OUT-MIX können auch, je nach auxotrophem Bedarf, Zusätze aus 100x konzentrierten Stammlösungen hinzugefügt werden: Adenin 0,2 mg/l; Arginin 0,2 mg/l; Leucin 0,3 mg/l; Lysin 0,3 mg/l; Uracil 0,2 mg/l; Tryptophan 0,2 mg/l

2.3.3. Dokumentation der Ergebnisse

Agarosegele und SDS-Gele werden mit dem GelDoc 1000 (BioRad) dokumentiert. Die Dokumentation von Coomassie-gefärbten SDS-Gelen erfolgt unter Verwendung des UV-Weißlicht-Konvertierungsschirmes mit dem GelDoc 1000. Die Bearbeitung und Auswertung von Daten erfolgt mit den Programmen *Corel Draw 11*, *Adobe Photoshop 5*, *Adobe Illustrator 10.0.3.*, *Statgraphics Plus 5.0* und *Origin 6.1*.

2.4. Organismen und Wachstumsbedingungen

2.4.1. Wachstumsbedingungen für *E. coli*, *S. cerevisiae* und *H. salinarum*

Escherichia coli

E. coli wird, wenn nicht anders angegeben, in Flüssigmedium (dYT oder BHI) für 12 bis 16 h bei 37° C im Schüttelinkubator bei 120 Upm angezogen oder auf Agarplatten bei 37° C über Nacht inkubiert.

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae wird auf Agarplatten 2-4 Tage bei 30°C angezogen. Die Kultivierung in Flüssigmedium (YP oder SC) erfolgt im Schüttelinkubator (180 bis 200 Upm) bei 30°C, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

Halobacterium salinarum

H. salinarum wird in Support- oder in Vollmedium für 5-7 Tage bei 40°C im Schüttelinkubator bei 100 Upm angezogen, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

2.4.2. Organismen

Verwendeter *Saccharomyces cerevisiae* Stamm und seine Eigenschaften:

Es wurde der *S. cerevisiae* Stamm F11 α , mit den relevanten genetischen Marker leu2-3, 112, ura3-52, his3- Δ 200, suc2- Δ 9; Paarungstyp Mat α verwendet.

Tabelle 2-1: Verwendete *Halobacterium salinarum* Stämme und ihre Eigenschaften:

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz	Herkunft
L33	(BR ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁻ , Rub ⁻ , Ret ⁺) eine BR negative Mutante von S9	Wagner et al.1981	Oesterhelt
MPK40	(BR ⁻ , HR ⁺ , SRI ⁺ , SRII ⁺ , Car ⁺ , Rub ⁺ , Ret ⁺) eine BR negative Mutante von S9	Krebs et al.1991	Krebs

Material und Methoden

Tabelle 2-2: Verwendete *Escherichia coli* Stämme und ihre Eigenschaften:

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz	Herkunft
DH5 α	<i>F endA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1</i> <i>λ recA1 gyrA96relA1 deoR [lacZYA-argF]</i> <i>-U169 (ϕ 80dlacZDM15)</i>	Hanahan, 1985	ITC Biotech. GmbH
Top10	<i>F mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>deoR_80dlacZDM15 DlacX74 recA1 ara</i> <i>D139 D (ara-leu)7697 galU galK rpsL</i> <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen	Invitrogen
GM 2163	<i>Dam⁻</i>	Invitrogen	Invitrogen
BL21 :: DE3 [RIL]	<i>E.coli B F ompT hsdS dcm` Tet galλ</i> <i>(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam]</i>	Weiner et al., 1994	Stratagene
BL21::DE3 [pLysE]	<i>E.coli B F ompT hsdSb gal dcm (DE3)</i> <i>pLysE (Cam)</i>	Weiner et al., 1994	Stratagene
BL21 :: DE3 [pLysS]	<i>E.coli B F ompT hsdSb gal dcm (DE3)</i> <i>pLysS (Cam)</i>	Weiner et al., 1994	Stratagene
BL21 :: DE3 [RP]	<i>E.coli B F ompT hsdS dcm` Tet galλ</i> <i>(DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cam]</i>	Weiner t al., 1994	Stratagene
BL21 Star DE3	<i>F ompT hsdS (rm) gal dcm rne131 (DE3)</i>	Makarova	Stratagene
XL 10-Gold	<i>Tet^R Δ(mcrA)18 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173</i> <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> <i>The [F' proAB lac^f ZDM15 Tn10 (tet^R) Amy</i> <i>Cam^RJ^a</i>	Greener and Jerpseth, 1993	Stratagene
W3110	<i>F trpA23 xyf glyS_L</i>	Hill& Harnisch, 1981	Labor- sammlung

2.4.3. Stammhaltung

Die kurzfristige Lagerung von Organismen erfolgt auf Agarplatten bei 4 °C, die langfristige bei -80 °C wie im Folgenden näher erläutert:

600 µl einer über Nacht in Selektionsmedium angezogenen Kultur werden mit 40 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wird etwas gefrorene Substanz von der Oberfläche abgekratzt und zur Anzucht auf einer Agarplatte ausgestrichen oder in Flüssigmedium resuspendiert.

2.5. Überexpression von Protein

2.5.1. Kulturbedingungen, Zellaufschluss und Herstellung von klaren Zellysaten aus *E. coli*

Die Anzucht und Expression erfolgt stets in Selektionsmedium, wobei Antibiotika in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm und Expressionsvektor zugegeben werden. Die Hauptkultur wird aus einer Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,15 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 weiter inkubiert. Die Kultivierungstemperatur der Hauptkultur liegt nach der Induktion zwischen 28 °C und 37 °C, je nach Experiment und ist im Einzelnen angegeben. Die Induktion der Expression erfolgt mit 1 mM IPTG (Endkonzentration). Die Induktionsdauer variiert je nach Versuch und ist jeweils angegeben. Die Zellen werden durch 15 min Zentrifugation bei 4°C und 13000 Upm geerntet, in etwa 1/100 Kulturvolumen Wasser resuspendiert, eventuell aliquotiert und nach erneuter Sedimentation bei -80 °C eingefroren und gelagert. Das gefrorene Zellpellet wird in 1/25 Kulturvolumen Zellaufschlußpuffer aufgetaut und resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf Eis so lange mit 30 s Pulsen mit einer Ultraschallnadel (Labsonic L von Braun, kleine Nadel TL40) behandelt, bis der Zellaufschlußgrad über 90 % liegt. Dies wird in regelmäßigen Abständen unter einem Durchlichtmikroskop (Zeiss) kontrolliert. Das Zellysat wird durch Zentrifugation bei 4°C und 20000 Upm von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Kleine Partikel und Schwebestoffe werden anschließend mittels Filtration durch eine 0,45 µm Filtrationseinheit aus der Lösung entfernt. Zur Homogenisierung wird das Pellet in einem halben Volumen Zellaufschlußpuffer resuspendiert und 3x 1 min auf Eis mit Ultraschall behandelt.

2.5.2. Kulturbedingungen, Zellaufschluss und Herstellung von klaren Zellysaten aus *S. cerevisiae*

Die Hauptkulturen werden aus fast stationären Vorkulturen (OD_{600} 8-10) in Minimalmedium SC (ohne Leucin + 2 % Galaktose) auf eine OD_{600} von etwa 4 - 5 angeimpft. Dafür wird die entsprechende Vorkultur mit dem gleichen Volumen frischen Minimalmediums gemischt und so auf sterile Kolben verteilt, dass maximal ein Drittel des Kolbenvolumens erreicht wird. Die Kulturen werden bei 180 Upm bis 200 Upm (je nach Inkubator) und 30° C mindestens eine Stunde weiter inkubiert und anschließend die Expression induziert. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von 0,5 mM $CuSO_4$ (Endkonzentration). Die Induktionszeit beträgt etwa 5 Stunden. Am Ende dieser Zeit ist die OD_{600} noch deutlich unter 10 und die Kultur noch in der logarithmischen Phase. Die Zellernte erfolgt durch Zentrifugation im KA-9000 Rotor bei 4°C und 6000 Upm für 10 min. Die Zellpellets werden in 1/100 Kulturvolumen in H_2O resuspendiert, aliquotiert, erneut pelletiert und bei -80 °C eingefroren und gelagert. Das gefrorene Zellpellet wird in mindestens 2,5 ml Zellaufschlusspuffer pro g Zellen aufgetaut und resuspendiert. Dabei wird pro 50 ml Lösung eine Protease-Inhibitor-Tablette (Complete™, EDTA free, Boehringer Mannheim) zugegeben. Die Zellsuspension wird in einer auf Eis vorgekühlten French-Press-Zelle aufgeschlossen. Es sind dafür 2-3 Durchgänge in einer 40K Zelle (2000 PSIG (pounds-force per square inch gauge); 1 PSIG= 6894,7572 Pa) erforderlich. Die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsaustritts aus der Druckzelle ist über das Auslassventil so geregelt, dass die Flüssigkeit nicht schneller als tropfend austritt. Der Zellaufschlussgrad wird jeweils mit dem Durchlichtmikroskop (Zeiss) überprüft, er liegt meistens zwischen 80 % und 90 %. Das Zellysate wird durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C, 20000 Upm (JA 25.50 Rotor) und anschließender Zentrifugation für 60 min bei 4 °C, 35000 Upm im Ti-70 Rotor von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Kleine Partikel und Schwebestoffe werden anschließend durch Filtration durch eine 0,45 µm Filtrationseinheit aus der Lösung entfernt. Zur Homogenisierung der unlöslichen Zellbestandteile wird das Pellet in einem halben Volumen Zellaufschlußpuffer resuspendiert und 5 mal 1 min auf Eis mit dem Ultraschallstab behandelt.

2.5.3. Kulturbedingungen, Zellaufschluss und Herstellung von klaren Zellysaten aus *H. salinarum*

Die Anzucht erfolgt in Supportmedium, wobei mit pHS blue transformierte L33 Stämme mit Novobiocin (0,3 µg/ ml) selektiert werden. Die Hauptkultur wird aus einer Vorkultur (OD₆₀₀ 0,1) auf eine OD₆₀₀ von 0,8 bei 40° C angezüchtet (nach etwa einer Woche ist dieser Wert erreicht). Die Induktion der Expression erfolgt durch Heruntersetzen der Umdrehungszahl des Schüttlers von 100 auf 80 Upm (Reduktion des Sauerstoffs führt zur Induktion des Promotors). Die Induktionszeit beträgt ca. eine Woche. Die Zellen werden dann durch Zentrifugation (LJA 8.1000 Rotor) für 20 Minuten, bei 10° C und 6000 Upm pelletiert und in 1/ 100 Kulturvolumen Basal-Salz-C-Lösung aufgenommen und nach erneuter Sedimentation bei -20° C gelagert. Das gefrorene Zellpellet wird in 1/50 Kulturvolumen Zellaufschlusspuffer (200 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0) aufgetaut und resuspendiert. Durch diesen Prozess werden die Zellen, aufgrund der Veränderung des osmotischen Druckes, auch gleichzeitig aufgeschlossen. Um einen Aufschlussgrad nahe 100% zu erreichen kann man die Zellsuspension 3x auf Eis mit Ultraschall (Labsonic L von Braun, Nadel TL40) behandeln. Der Zellaufschlussgrad wird mit dem Durchlichtmikroskop überprüft (Zeiss). Das Zellysat wird durch Zentrifugation, 2 Minuten bei 10° C, 20000 Upm (JA25.50 Rotor) und anschließender Zentrifugation für 60 Minuten bei 4° C, 35000 Upm (Ti-70 Rotor) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt.

2.6. Arbeiten mit DNA

Für folgende Arbeiten wurden Materialien der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet:

Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> :	QIAprep Spin Miniprep Kit
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:	QIAEX II Gel Extraction Kit
Reinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen:	QIAquick PCR Purification Kit

2.6.1. Plasmide

Die in dieser Arbeit für Klonierung und Expression verwendeten Plasmide sind im Folgenden aufgeführt. Die zugehörigen Vektorkarten sind im Anhang dargestellt.

<u>Plasmid:</u>	<u>Marker:</u>	<u>Herkunft/ Referenz:</u>
pCR-Blunt	Kan ^r , Zeo ^r	Invitrogen, Groningen, Holland
pCR-TOPO-Blunt	Kan ^r , Zeo ^r	Invitrogen, Groningen, Holland
pYEX-BX	Amp ^r , leu2d, ura3	Clontech, Heidelberg
pYEX-GW	Amp ^r , leu2d, ura3	Invitrogen, Groningen, Holland
pET 11 a	Amp ^r	Novagen
pET 27 b	Kan ^r	Novagen
pHS blue	Kan ^r , nov ^R	Eidhoff, U., Jülich
pDONR	Kan ^r , Cm ^r	Invitrogen, Groningen, Holland

2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese

Agarose ist ein Heteroglucan aus β -D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose in alternierender α -1,3/ β -1,4-Verknüpfung. Die Herstellung der Gele erfolgt durch Lösen des natürlichen Polymers durch Erhitzen im Puffer und anschließende Abkühlung. Agarose-Gele können Nukleinsäuren in einem Bereich von 100 bis 60000 Basenpaaren trennen. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrats wandern die Nukleinsäuren in einem angelegten elektrischem Feld zur Anode. Dabei können kleinere Fragmente schneller durch das Gel wandern als große. Nukleinsäuren werden mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen, wie z.B. Ethidiumbromid oder Acridinorange, lokalisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-2 % verwendet. Agarose wurde mit 1x TAE-Puffer auf die gewünschte Konzentration gebracht und vollständig durch Erhitzen aufgelöst. Nach Abkühlen (auf ca. 60°C) wurde Ethidiumbromid (EtBr) in einer Endkonzentration von 25 μ g/ml Gel zugegeben und das Gel in entsprechende Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Gelkammer gesetzt, mit 1x TAE-Puffer überschichtet und mit den aufzutrennenden DNA-Proben in DNA-Probenpuffer beschickt. Zur Größenbestimmung wurden DNA-Längenmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 6-9 V/cm bis die gewünschte Trennung der Fragmente erreicht war. Das EtBr, welches in die DNA interkaliert, ermöglicht eine anschließende Detektion und Dokumentation der Fragmente unter UV-Licht ($\lambda=312$ nm).

2.6.3. Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

Restriktion:

Bei der Restriktion handelt es sich um sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen. Die Reaktionsparameter wurden dem jeweiligen Restriktionsenzym nach Angaben der Hersteller angepasst.

Ligation:

Restriktionsverdaute DNA-Fragmente oder vorbehandelte PCR-Produkte wurden mit dem entsprechenden Plasmid mittels T4-DNA-Ligase (Fa. Promega) verknüpft (Ausubel, 1989). Bei „blunt-end“-Klonierungen beträgt das molare Verhältnis von Insert zu Vektor-DNA 10:1 bis 20:1 und bei „sticky-end“-Klonierungen 3:1 bis 10:1.

Die Ligationsansätze wurden nach 1 h-24 h in kompetente Zellen transformiert.

2.6.4. Herstellung transformationskompetenter Zellen

Kolonien des entsprechenden Bakteriums, werden in 300 ml SOB-Medium gegeben und bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert, bis 4-7 x 10⁷ Zellen pro ml erreicht sind; das entspricht einer OD₆₀₀ von etwa 0,3. Die Zellen werden 10-15 min bei 4°C und 3500 Upm (3000 g) sedimentiert. Das Pellet wird in 60 ml eiskaltem TFB I (1/5 Volumen) aufgenommen und für 10 min auf Eis belassen. Danach werden die Zellen 15 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 12 ml TFB II (1/25 des ursprünglichem Volumens) aufgenommen, für 15 min auf Eis gestellt, in 100-200 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

2.6.5. Transformation von DNA in *E. coli* (Hanahan, 1983)

5 bis 20 µl eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA werden zu 100 µl kompetenter Bakterien, die langsam auf Eis aufgetaut wurden, 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 dYT-Medium bei 37°C für 45 bis 60 min geschüttelt um den Zellen die Möglichkeit zu geben, die neu erworbene Antibiotikaresistenz zu exprimieren. Anschließend wurden die Zellen auf entsprechenden Antibiotikanährböden ausgestrichen. Einzelkolonien werden in 3 ml Medium plus Antibiotikum angezüchtet. Die Präparation von Plasmid-DNA wird mittel QIA prep Spin Miniprep Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.6. Transformation von DNA in *S. cerevisiae*

Es wird eine modifizierte Lithiumacetat-Methode nach Schiestl & Gietz (1989) durchgeführt. 100 ml einer Kultur in YPD werden bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,7 angezogen. Die Zellen werden dreimal mit 50 ml und zweimal mit 1 ml sterilem Wasser, anschließend zweimal mit 1 ml TE-LiAc Lösung gewaschen. Sie werden in 1 ml TE-LiAc aufgenommen. Zur Transformation werden jeweils 50 µl der transformationskompetenten Zellen mit 300 µl TE-LiAc-PEG-Lösung versetzt und nach Zugabe von etwa 1 µg Plasmid-DNA unter leichtem Schütteln 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach 20-minütiger Inkubation bei 42 °C werden die Zellen sedimentiert, zweimal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 500 µl sterilem Wasser resuspendiert. 200 µl und 300 µl der Zellen werden auf SC-Agarplatten mit Galaktose und ohne Uracil bei 30 °C bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert und dann auf Platten ohne Leucin übertragen.

2.6.7. Transformation von DNA in *H. salinarum*

20 ml einer *H. salinarum* Kultur (OD 0,8) werden bei 4000 Upm 5-15 Minuten pelletiert und in 2 ml SPH vorsichtig resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wird 100 µl EDTA-Lösung unter rühren hinzugegeben. Unter dem Lichtmikroskop wird die Sphäroblastierung überprüft. Parallel werden 40 µl DNA in 2 M NaCl und 200 µl der oben genannten Zellsuspension durchmischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die Lösung wird mit 240 µl PEG-Lösung vorsichtig gemischt und genau 20 Minuten inkubiert. Der Ansatz wird mit 10 ml Sphäroblastenverdünnungslösung versetzt und 30 Minuten bei 40° C belassen. Anschließend wird die Zellsuspension 10 Minuten bei 4000 g pelletiert, in 1 ml Supportmedium mit 15 % Saccharose resuspendiert und 2-3 Tage bei 37° C und 120 Upm geschüttelt. 100- 200 µl der Zellen werden auf Platten mit Supportmedium mit Novobiocin (0,3 µg/ ml) ausplattiert und bei 40° C, 10-14 Tage inkubiert.

2.6.8. PCR (Polymerase Ketten Reaktion)

Die PCR wird zur „*in vitro*“ Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet. Man benötigt dazu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Dabei ist es zum einen möglich, am 5'-Ende der Primer nicht komplementäre Sequenzen anzuhängen, was z.B. das Einführen neuer Restriktionsschnittstellen an den Enden der amplifizierten DNA ermöglicht. Zum anderen können einige Nukleotide im mittleren Bereich des Primers ebenfalls nicht

Material und Methoden

komplementär sein, was den Austausch einzelner Basen ermöglicht (ortsspezifische Mutagenese).

Für die PCR-Amplifizierung wird ein Enzymgemisch aus den thermostabilen Enzymen Taq-DNA-Polymerase und Pwo-DNA-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim) verwendet. Dabei dient hauptsächlich die Taq-DNA-Polymerase der Amplifizierung, die Pwo-DNA-Polymerase hat vornehmlich Korrekturfunktion. Es wird der mitgelieferte Reaktionspuffer P2 mit MgCl₂ verwendet.

Die Reaktionsansätze ohne Enzyme in 0,2 ml Reaktionsgefäßen werden für 3-4 min auf 95°C erhitzt („*hot start*“-PCR). Das Enzymgemisch wird zugegeben, und die Reaktion im Thermocycler durchgeführt.

Standard-PCR:

Primer 1 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Template (Plasmid)	1,0 µl der DNA Präparation
dNTP Mix (je 10 mM)	2,0 µl
10 x Reaktionspuffer	10 µl
Enzymgemisch	1,0 µl
	ad H ₂ O 100 µl

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1:	3 min 94 °C
Schritt 2:	1 min 95 °C
Schritt 3:	1 min Annealing-Temperatur (T _m -4 °C)
Schritt 4:	1 1/2 min 72 °C
Schritt 5:	gehe zu Schritt 2: 35 x
Schritt 6:	5 min 72 °C
Schritt 7:	bis zur Beendigung des Programms 4° C

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

2.6.9. PCR-Primer

Als PCR-Primer werden hier Oligonukleotide bezeichnet, welche die kodierende Arrestinsequenz nicht verändern und lediglich zur Modifikation der Randbereiche dienen. Mit diesen Primern werden Restriktionsschnittstellen und kodierende DNA Sequenzen für Affinitätspeptide hinzugefügt. Restriktionsschnittstellen sind kursiv markiert und Affinitätstags sind unterstrichen.

- 1 **N-Strep-Arr-BcNd** 5'-CGT *GAT CAC ATA TGG* CTA GCT GGA GCC ACC
CGC AGT TCG AGA AGA TGA AGG CCA ATA AGC
CCG CAC C-3'
- 2 **C-His-Arr-BcEc** 5'-CGT *GAT CAG AAT TCT* CAG TGA TGG TGA
TGG TGA TGC TCA TCC ATA GCC GCC TCC
TGG-3'
- 3 **GW N-Strep-Arr** 5'-AAA AAG CAG GCT TCG AAG GAG ATA GAA CCA
TGT GGA GCC ACC CGC AGT TCG AGA AGA AGG
CCA ATA AGC CCG CAC C-3'
- 4 **GW C-His-Arr** 5'-AGA AAG CTG GGT CCT AGT GAT GGT GAT GGT
GAT GCT CAT CCA TAG CCG CCT CCT GG-3'
- 5 **attB1 Adapter** 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CT-3'
- 6 **attB2 Adapter** 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT-3'
- 7 **N-Bat** 5'-CGT CCC ATG ACG AGC GTC CAG AAC-3'
- 8 **C-Bat** 5'-CCG CGT CAC TCC TCG AAG AAC G-3'
- 9 **N-BamNdeHis-Bat** 5'-CGG *GAT CCC ATA TGC* ACC ATC ACC ATC ACC
ATA CGA GCG TCC AGA ACA CCG AGT C-3'
- 10 **C-SalHindStrep-Bat** 5'-CGG *TCG ACA AGC TTA GAT CTT* CAC TTC TCG
AAC TGC GGG TGG CTC CAC TCC TCG AAG AAC
GCG CCG ACG-3'

2.6.10. Sequenzierungsprimer

Als Sequenzierungsprimer werden hier Oligonukleotide bezeichnet, die für die Sequenzierung von DNA verwendet wurden und am 5' Ende die Modifikation IRD 800 tragen.

- 1 **IRD800-UP** 5'-GGC CTC TTC GCT ATT ACG C-3'
- 2 **IRD800-RP** 5'-GGC ACC CCA GGC TTT ACA-3'
- 3 **IRD800-revers** 5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

- 4 **IRD800-M13-20** 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
5 **IRD800-Bat int** 5'-CCC AGG TCG TGT TGC GGA ACT AC-3'

2.6.11. Mutageneseprimer

Als Mutageneseprimer werden hier Oligonukleotide bezeichnet, welche zur Mutation der kodierenden Sequenz Verwendung fanden (mutierte Stellen sind fett gedruckt).

- 1 **Arr S60C rev** 5'-CGT CAG **ACA** CAC GTA CAC TCT C-3'
2 **Arr G68Crev** 5'-GTC TTC CTG **ACA** GTA GCG GAA-3'
3 **Arr S169Crev** 5'-CGC **ACG** CAG CTC TTC TTG GG-3'
4 **Arr V244Cfor** 5'-GCA **ATG** TAC CAA CGT GGT TCT CTA C-3'
5 **ArrP352Cfor** 5'-GTG **TGT** TTC CGC CTC ATG CAT CCC CAG-3'
6 **ArrS106Cfor** 5'-CTG CAG GAG **TGC** CTC ATC AAG AAG-3'
7 **ArrA113Cfor** 5'-CAA GAA GCT GGG **GTG** CAA CAC CTA C-3'
8 **ArrP117Cfor** 5'-CCA ACA CCT ACT **GCT** TCC TGC TCA C-3'
9 **ArrC63A** 5'-GTG TAC GTG TCT CTG ACG **GCC** GCC TTC CG-3'
10 **ArrC128A/C143Arev** 5'-CTC AAA GTC GAC CCC **AGC** GCT CTT GCC CAC ATC
TTG CGG AGC TGG CTG CAG CAT CAC CGA **AGC**
GGG-3'
11 **Bat H206Cfor** 5'-GGC GCG AAC **TGT** CGC TTC CTC CAG-3'

2.6.12. Reinigung von PCR- amplifizierten DNA-Fragmenten

Zur Reinigung der PCR-Produkte wird das Reaktionsgemisch in Agarosegelen aufgetrennt, und die Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgt mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

2.6.13. DNA Sequenzierung

DNA-Fragmente werden im Rahmen dieser Arbeit mit dem LI-COR-System sequenziert. Das Long Read-Verfahren ermöglicht es Fragmente von teilweise bis 1200 bp zu lesen.

Durchgeführt wird das „Cycle-Sequencing“ mit dem Amersham Thermosequenase Kit. Dabei erfolgt die Markierung durch Verwendung von IRD800-gekoppelten Oligonukleotiden. Über die Fluoreszenzmarkierung erfolgt die Detektion der DNA-Stränge. Gelelektrophorese und Detektion werden mit dem LI-COR 4200 Gene ReadIR durchgeführt. Die Reaktionen werden nach Herstellerangaben angesetzt. Ein „Premix“ aus 5,7 µl Plasmid in Trispuffer (100 ng-150 ng DNA pro 1000 Nukleotide), 0,7 µl DMSO (50%) und 0,6 µl Primer (2pmol/µl) wurde

hergestellt, 1,5 µl des Premix wurde vier Reaktionsgefäße verteilt und mit je 1,5 µl „Nukleotidmix“ des Kits (G, A, T, C; 1:1 mit H₂O verdünnt) versetzt. Die Sequenzreaktionen wurden in 0,2 ml Gefäßen im Thermocycler mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung:	2 Minuten	94 °C
30 Zyklen:	40 Sekunden	94 °C
	40 Sekunden	50 °C
	60 Sekunden	70 °C
	Bis zur manuellen Beendigung	
	4 °C	

Nach Zugabe von 3 µl Stoppuffer (Amersham) wird erneut für 2 min bei 70°C denaturiert und sofort schnell abgekühlt, um Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Proben werden bis zum Probenauftrag unter Lichtabschluß bei 4° C gelagert. 2,3 µl von jeder Reaktion (6 µl Gesamtvolumen) werden auf das Gel (4,6 %iges Acrylamidgel, 66 cm lang) nach 30 min Vorlaufzeit aufgetragen.

Sequenziergel:

21 g	Harnstoff
30,5 ml	Wasser
5,0 ml	10x TBE-Puffer (162 g Tris-Base; 27,5 g Borsäure; 9,3 g EDTA Di-Na-Salz)
0,5 ml	DMSO
5,6 ml	40% Acrylamid-Bis-Acrylamid Lösung

nach Entgasen:

50 µl	TEMED
350 µl	10% APS

Die Lösung wurde sterilfiltriert und das Gel gegossen, wobei die Polymerisation nach etwa 1 h abgeschlossen ist.

Die Detektion erfolgt zeitgleich mit der Elektrophorese mittels eines Infrarotlasers bei 800 nm. Es wird mit der Software *e-seq Version 2.0* ausgewertet.

2.6.14. Klonierung verschiedener Arrestine in pYEX-GW und pYEX-BX

Die in dieser Arbeit verwendeten Arrestin- Konstrukte wurden mit zwei alternativen Methoden hergestellt. Ein Teil der Konstrukte wurde über Rekombination in den Expressionsvektor pYEX-GW hergestellt, während andere auf herkömmliche Weise mittels Restriktion und Ligation in den Hefe-Expressionsvektor pYEX-BX konstruiert wurden. Welche Methode für welches Konstrukt angewandt wurde ist im Ergebnis-Teil (Kapitel 3-1) tabellarisch aufgelistet.

2.6.14.1. Klonierung in pYEX-GW

Bei der Klonierung mit dem Gateway System werden DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert. Das System basiert auf der Integration des Phagen λ in das Genom von *E. coli*. Voraussetzung für die Rekombination ist, dass Erkennungssequenzen an das gewünschte DNA-Segment angefügt werden. Deshalb muss die zu inserierende DNA von den Erkennungssequenzen attB1 und attB2 flankiert werden. Dies geschieht in einer Zwei-Stufen-PCR (Abb. 2-1), da die N- und C-terminalen Überhänge für eine einfache Standard-PCR zu lang sind. Es könnte so zu fehlerhaften DNA-Produkten führen.

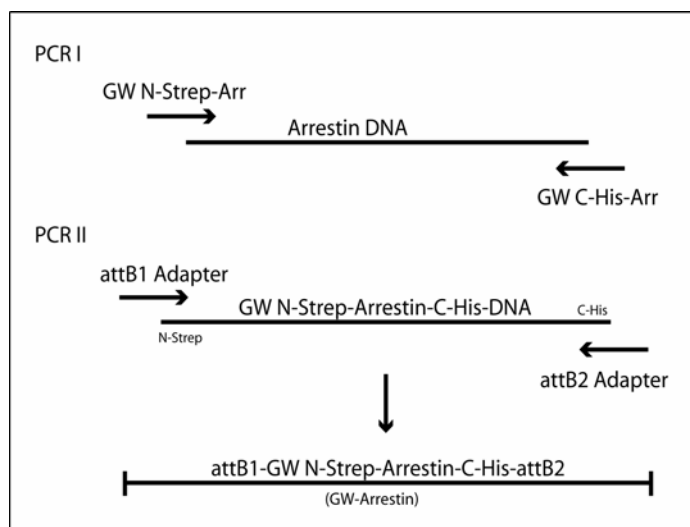


Abb. 2-1; PCR-Schema: Dargestellt sind die einzelnen Schritte der PCR, die zum PCR-Endprodukt GW-Arrestin führt. Es handelt sich hier um eine Zwei-Stufen-PCR. Bei PCR I werden dem codierenden Arrestin-Gen N-terminal ein Strep-tag-II, sowie ein Teil des attB1 Adapters und C-terminal ein His-tag und ein Teil des attB2 Adapters angehängt. In PCR II werden die vollen Längen der Adapter angefügt. Das Endprodukt wird im ersten Schritt in den Vektor pDONR gebracht, ehe er dann in den Expressionsvektor pYEX-GW transferiert wird.

In der ersten PCR wurde der zu inserierenden DNA vor dem Initiationscodon eine Shine-Dalgarno- und eine Kozak-Sequenz angefügt (siehe Reaktionsansatz 1). Die Shine-Dalgarno-Sequenz ist an der Bindung der mRNA an das 3'-Ende der 16S-rRNA beteiligt und moduliert dadurch die Initiationshäufigkeit und Translationseffizienz. In Eukaryoten wird die Translationseffizienz auch durch die Kozak-Sequenz beeinflusst.

Die Klonierung mit dem Gateway System verläuft über zwei Reaktionen. Die zu inserierende DNA wird in einer ersten Reaktion (siehe BP-Reaktion) in einen Vektor (pDONR 201) gebracht (PCR-Fragment flankiert mit attB-Sequenzen + pDONR Vektor = „Eingangsklon“) und anschließend in einer zweiten Reaktion (siehe LR-Reaktion) in den konvertierten Ziel- und Expressionsvektor pYEX-GW transferiert. Hierzu wurde der Expressionsvektor pYEX-BX mit BamHI geschnitten und mit Klenow-Enzym behandelt. In den Vektor wurde anschließend „Reading Frame Cassette A“ (Sequenz siehe Anhang) ligiert, so dass die eingeführten Fragmente die richtige Orientierung zum Promotor aufwiesen.

Die Klonierung mit dem Gateway System wird modifiziert nach Herstellerangaben (Invitrogen) durchgeführt. Die fertigen Konstrukte werden in DH 5 α oder TOP 10 Zellen transformiert, amplifiziert und nach Sequenzierung in F11 α Hefezellen transformiert. Die fertigen Konstrukte sind in Tabelle 3-1 im Ergebnisteil zusammengefasst.

2.6.14.2. Klonierung in pYEX-BX

Es werden verschiedene Arrestin-Konstrukte mittels PCR mit den flankierenden Primer N-Strep-Arr-BcNd und C-His-Arr-BcEc hergestellt und in Amplifikationsvektoren pBlunt oder TOPO-pBlunt zwischenkloniert. Die Primer führen am 3' Ende eine BclI-, NdeI-Site und eine codierende Sequenz für Strep-tag-II, während am 5' Ende eine BclI-, EcoRI-Site und ein 6x His-tag eingeführt wird. Korrekt amplifizierte Konstrukte werden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI ausgeschnitten und in die korrespondierende Site von pYEX-BX ligiert. Positive Klone werden durch Restriktionsverdau ermittelt und durch Sequenzierung bestätigt. Die Konstrukte sind im Ergebnisteil in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Reaktionsansatz 1 (PCR I):

5'-Primer:	GW-N-Strep-Arr (10 pmol)
3'-Primer:	GW-C-His-Arr (10 pmol)
Template-DNA:	20 ng
dNTP-Mix:	10 mM
BM Puffer P2:	5 μ l
Tag-Pwo-Pol:	0,5 μ l ad 50 μ l H ₂ O

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1:	15 s 94 °C
Schritt 2:	30 s 58 °C
Schritt 3:	2 min 68 °C
Schritt 4:	Gehe zu Schritt 1, 10x
Schritt 5:	Transfer von 20 μ l der Reaktion in die nächste PCR (PCR II)

attB Adapter PCR (PCR II):

attB1:	100 pmol
attB2:	100 pmol
DNA aus (R1):	20 μ l
NTP-Mix:	10 mM
BM Puffer P2:	5 μ l

Material und Methoden

Tag-Pwo-Pol: 0,5 µl
ad 100 µl H₂O

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1: 1 min 95 °C
Schritt 2: 15 s 94 °C
Schritt 3: 30 s 45 °C
Schritt 4: 2 min 68 °C
Schritt 5: Gehe zu Schritt 2, 5x
Schritt 6: 15 s 94 °C
Schritt 7: 30 s 55 °C
Schritt 8: 2 min 72 °C
Schritt 9: Gehe zu Schritt 6, 25x

BP-Reaktion:

attB-PCR-DNA: 5 µl
attP- DNA (pDONR): 2,5 µl
BP-Reaktionspuffer (5x): 5 µl
TE: 7,5 µl
BP Klonase Enzym Mix: 5 µl
mischen, ÜN bei 25 °C

LR-Reaktion:

BP-Reaktions-Mix: 20 µl
NaCl (0,75 M): 1 µl
pYEX-GW (150 ng/ ml): 4 µl
LR Klonase Enzym Mix: 6 µl
3 µl Proteinase K dazu; 10 min, 37 °C

2.7. Arbeiten mit Proteinen

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

Proteine lassen sich unter denaturierenden Bedingungen hauptsächlich aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen trennen. Proteine werden durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert. Die SDS-Anionen binden mit dem hydrophoben Teilen an die Proteinketten, wodurch ein SDS-Protein-Komplex entsteht, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Durch Zusatz der Reduktionsmittel Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) ist es möglich, Disulfidbrücken zu lösen bzw. die reduzierte Form zu erhalten. Proteine lassen sich durch Coomassie-Brilliant-Blue, den meist verwendeten Proteinfarbstoff, anfärben. Überschüssiger Farbstoff wird durch intensives Waschen mit einer sauren Lösung entfernt. Weniger als ein Mikrogramm eines Proteins kann mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgt mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) in vertikalen Gelapparaturen. Für das Trenngel wird eine Acrylamidkonzentration von 7,5 % (w/v) bis 15 % (w/v) und für das Sammelgel von 3,8 % (w/v) eingesetzt. Sammel- und Trenngel werden entsprechend der im folgenden aufgeführten Angaben angesetzt und die Polymerisation jeweils durch Zusatz von 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat in Wasser gestartet. Die Proteinproben werden, je nach zu ladendem Volumen, mit entsprechender Menge 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer bzw. 5-fach konzentriertem Harnstoffprobenpuffer versetzt.

Trenngel:

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

Sammelgel:

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

Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei konstanter Spannung, bis das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht.

2.7.2. Färben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Färbung von Proteinbanden in SDS-Gelen wurde in dieser Arbeit folgende Methode angewandt: Das Gel wird für 15 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wird mit 10 % (v/v) Essigsäure ausgewaschen.

2.7.3. Prinzip des Western-Blots

Das Proteingemisch wird in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran elektrogeblottet. Diese Membran ist hydrophob, besitzt eine hohe Bindungskapazität und erzeugt ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis als eine Nitrocellulosemembran. Mit einer geeigneten Sonde kann man das Protein anschließend nachweisen. Die hier untersuchten Proteine enthalten einen His-tag und einen Strep-tag-II an C- bzw. N-Terminus. Als Sonde für den His-tag wurde das monoklonale anti-poly Histidine/Peroxidase Konjugat der Firma Sigma verwendet. Die Peroxidase oxidiert ein Substrat, wobei durch Chemilumineszenz Licht entsteht, das einen fotografischen Film schwärzt. Der Strep-tag-II wurde mit einem biotinylierten Substrat (Firma IBA), das durch eine Redox-Reaktion einen Farbumschlag erfährt, nachgewiesen.

2.7.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgt im „*semi-dry*“-Verfahren (Transferkammer der Firma Hoelzel) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore; PolyScreen, NEN). Die Membran und 8 Lagen 3MM Whatman Papier werden auf Trenngel-Größe zugeschnitten. Die PVDF-Membran wird vor dem Transfer zunächst mit Methanol aktiviert und anschließend, wie auch das Whatman Papier, in Blot-Puffer getränkt. Das Trenngel äquilibriert 1 min in Blot-Puffer. Die Graphitplatten der Transferkammer werden gut mit H₂O befeuchtet und die einzelnen Lagen wie folgt luftblasenfrei geschichtet:

- Kathode
- 4 Lagen Filter-Papier
- Trenngel
- Transfermembran
- 4 Lagen Filter-Papier
- Anode

Der Transfer erfolgt in Abhängigkeit von der Blotgröße bei konstanter Stromstärke(0,6-1 mA/cm²). Anschließend wird die Blotmembran zur Visualisierung der transferierten Proteine mit

Ponceau S-Lösung gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wird mit Wasser abgewaschen. Durch mehrmaliges Waschen der Membran in TBS wird nach der Dokumentation vollständig entfärbt.

2.7.5. Immunochemische Detektion

Die Membran wird 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Die Inkubation mit 1:5000 verdünntem anti-poly-Histidin-Peroxidase-Konjugat (Tabelle 2-3) in 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Die Membran wird 2x mit TBS-T und 1x mit TBS für je 10 min bei Raumtemperatur gewaschen.

Wenn das SA-AP-Konjugat (siehe Tabelle 2-3) gegen den Strep-tag-II eingesetzt wird, erfolgt die Absättigung der Membran nach Herstellerangaben mit Roti-Block (Roth). Das Konjugat wird in TBS verdünnt (1: 4000) eingesetzt (Tabelle 2-3). Nach Inkubation mit dem SA-AP-Konjugat wird kolorimetrisch durch Zugabe von 7,5 % (w/v) Nitrotetrazoliumblau in 70 % (v/v) Dimethylformamid und von 5 % (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat in Dimethylformamid detektiert (Blake et al., 1984).

Bei der Chemolumineszenz-Detektion werden die Substrate Super Signal oder Super Signal Ultra (Pierce) nach Herstellerangaben eingesetzt. Röntgenfilme (XAR oder Biomax-ML, Kodak) werden je nach Leuchtintensität 10 s bis über Nacht exponiert. Die Filme werden nach Herstellerangaben mit Lösungen der Firma Kodak entwickelt.

2.7.6. Verwendete Antikörper und Konjugate

Tabelle 2-3: Konjugate und Antikörper

Name	Antigen / Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
SA-AP-Konjugat	Strep-tag / Biotin	Streptavidin an Alkalischer Phosphatase	GATC	1: 4000
Anti-poly-Histidin, Peroxidase Konjugat	poly-Histidin	monoklonal, IgG2a aus Maus, Peroxidase Konjugat	Sigma	1: 5000

2.7.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.7.7.1. Methode nach Bradford

Die Proteinkonzentration wird mit der Methode nach Bradford (1976) mit dem BioRad-Microassay nach Herstellerangaben bestimmt. Als Standard für die Eichkurve wird eine BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml (Pierce) verwendet.

2.7.7.2. UV-Vis Spektroskopie

Die Bestimmung der Konzentration der Arrestinproben erfolgt im Photometer (UV-2101PC Shimadzu). Die Proteinkonzentration wird dabei über das Lambert-Beer'sche Gesetz ermittelt:

$$c = A / \epsilon \cdot d$$

wobei c = Konzentration (mol/l)

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette

A = Absorption

Die Konzentration von gereinigtem Arrestin wird spektralphotometrisch bei 278 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{0,1\%} = 0,638$ (Palczewski et al., 1992c) und einer molekularen Masse von 45275 (Shinohara et al., 1987) bestimmt.

2.8. Chromatographische Purifikation

2.8.1. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf dem folgenden Prinzip:

Ein biospezifischer Ligand ist kovalent an das Chromatographiematerial – die Matrix – gebunden. Das zu reinigende Protein besitzt entweder natürlich (aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften) oder über gentechnisch fusionierte, sogenannte “tags“ oder Affinitätspeptide, eine starke Affinität zum immobilisierten Liganden. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine können durch Waschen entfernt werden, die Elution erfolgt durch Konkurrenz mit dem freien Liganden.

2.8.1.1. Proteinreinigung mit dem Strep-tag-II System

Unter der Bezeichnung Strep-tag versteht man Peptide, die aus Peptidbibliotheken mit dem Ziel isoliert wurden, dass sie eine spezifische Bindung an Streptavidin vermitteln. Das natürliche Substrat von Streptavidin, einem Exoprotein von *Streptomyces avidinii*, ist Biotin. Das Strep-tag-Peptid besitzt jedoch eine geeignete Struktur, die exakt in die Biotin-Bindetasche des Streptavidins paßt.

Das Strep-tag-II System nutzt die sehr hohe Affinität von StrepTactin zu dem Oktapeptid des Strep-tag-II, welches mittels molekularbiologischer Techniken N-terminal oder C-terminal an ein zu exprimierendes Protein angehängt werden kann. Ein entscheidender 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.

Das Zelllysate und damit das Protein (10-100 ml) wurde zwei- bis dreimal über die äquilibrierte Säule (3-15 ml) gegeben und anschließend mit 50-150 ml Zellaufschlusspuffer (siehe Tabelle 2-4) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 2,5 mM Desthiobiotin in Elutionspuffer. Desthiobiotin bindet mit hoher Affinität an StrepTactin und verdrängt aufgrund der höheren Konzentration das Strep-tag-II Protein von den Bindungsstellen auf dem Säulenmaterial. Desthiobiotin wurde anschließend mit 2,5-5 mM HABA ebenfalls kompetitiv von der Säule entfernt, wobei bei diesem Prozess eine intensive Rotfärbung des Materials den Erfolg der Verdrängung anzeigt.

Das Säulenmaterial wird nach jeder Verwendung mit 50 ml 8 M Urea regeneriert und mit Wasser äquilibriert. Die Eluatfraktionen wurden durch SDS-PAGE qualitativ und quantitativ analysiert.

Tabelle 2-4: Zusammenstellung der verwendeten Strep-tag-II- Puffer

Zellaufschluß- puffer	Waschpuffer I	WaschpufferII	Elutionspuffer	Regenerations- puffer
200mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ - Puffer pH8,0 10 mM DTT Proteaseinhibito- ren (EDTA frei)	100mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ - Puffer pH 8,0 10 mM DTT	50mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ - Puffer pH 8,0	50mM K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄ - Puffer pH 8,0 2,5mM Desthiobiotin	4 M Urea HABA

2.8.1.2. Proteinreinigung über immobilisierten Metallionen (IMAC)

Die Aufreinigung über die His-Säule basiert auf der Interaktion zwischen einem elektropositiven Übergangsmetallion (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) und Histidinresten. Diese Übergangsmetalle besitzen 6 Koordinationsstellen in oktahedralearer Konfiguration für die Interaktion mit elektronenreichen Liganden wie His, Trp, Cys. Das Metallion ist an einen Chelator, der 3 oder 4 elektronenreiche Gruppen aufweist, koordinativ gebunden. Der Chelator ist wiederum an einen Polymerträger (z.B. Sepharose) gekoppelt. Nach Bindung des Metallions an den Chelator stehen noch 2 Koordinationsstellen für Liganden zur Verfügung. Unter physiologischem pH bindet His über das freie Elektronenpaar des Imidazol-Stickstoffatoms an die elektronen-defizienten Orbitale des Metallions. Das fusionierte 6x His Tag ermöglicht eine sehr stabile Bindung auch in Lösungen, die Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff enthalten. Die Elution kann durch Protonierung des Imidazol-Stickstoffs ($\text{pK}_a = 6$) erfolgen. Das so entstandene positiv geladene Ammoniumion wird vom positiv geladenen Metallion abgestoßen. Alternativ kann die Elution durch Zugabe von Imidazol zum Elutionspuffer erfolgen.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich mit Chelating Sepharose Fast Flow Media (Amersham) und Kupfersulfat gearbeitet. Die Reinigungsprozedur entspricht im Wesentlichen der, die bereits für das Strep-tag-II System beschrieben wurde. Die Säule (25-30ml) wird mit den Metallionen beladen und mit His-Waschpuffer (Kapitel 2.3.1.) äquilibriert. Nach Auftragung des Zelllysates wurde die Säule mit steigender Konzentration an Imidazol in His-Waschpuffer gewaschen und mit einer Konzentration von 500 mM Imidazol in Elutionspuffer von der Säule gelöst. Die Metallionen wurden durch Zugabe von Strip-Puffer komplexiert und entfernt. Restliches, wahrscheinlich ausgefallenes Protein wurde durch 8 M Urea von der Säule gelöst, die nach anschließendem Waschen mit Wasser wieder regeneriert war.

Die Eluate wurden entweder direkt konzentriert oder über eine Strep-tag-II-Säule gegeben, sofern zusätzlich noch ein Strep-tag-II vorhanden war.

2.8.2. Proteinreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Grundlage für den Ionenaustausch ist die kompetitive Wechselwirkung geladener Ionen. Das Protein konkurriert hierbei mit Salz-Ionen um die geladenen Positionen auf einer Matrix. Zunächst bindet das Protein an die fixierten Ladungen der stationären Phase, dann erfolgt die Verdrängung und somit die Elution des Proteins durch steigende Salzkonzentration (NaCl 0-1 M) oder durch Änderung des pH-Werts der mobilen Phase. Je stärker das Protein geladen ist, desto stärker ist die Bindung an den Ionenaustauscher. Stark geladene Proteine werden dabei fester zurückgehalten und eluieren erst bei hoher Ionenstärke. Für die chromatographische Anwendung stehen hier mehrere Anionen- und Kationenaustauscher zur Verfügung, die sich hinsichtlich ihrer Stärke unterscheiden. Als starke Ionenaustauscher bezeichnet man Gruppen, die über einen weiten pH-Bereich den Ladungszustand beibehalten.

Das konzentrierte Eluat aus der Strep-tag-II Reinigung und damit das Protein (1-2 ml) wurde über die Probenpumpe der ÄKTA auf die mit AIEX-Waschpuffer (Kapitel 2.3.1.) äquilibrierte Säule (Hi Trap DEAE FF bzw. Q XL, 1 ml) gegeben und anschließend mit steigender NaCl-Konzentration in AIEX-Waschpuffer von der Säule gelöst. Das Säulenmaterial wird nach jeder Verwendung mit 20 % Ethanol regeneriert und mit Wasser äquilibriert. Die Eluatfraktionen wurden durch SDS-PAGE qualitativ und quantitativ analysiert.

2.9. Modifikation von Proteinen

Um eine Detektion der markierten Proben zu erleichtern, wurden Fluoreszenz-Farbstoffe ausgewählt (Tabelle 3-2). Verschiedene Moleküle, wie Fluorescein-5-maleimid (F-5-M), Alexa 633 Maleimid (A633), Atto 655 und Cy 5, die Molekulargewichte von 430-1300 Dalton aufweisen, wurden kovalent an die freiliegenden Cysteine der Proteine gebunden (Abb. 2-2).

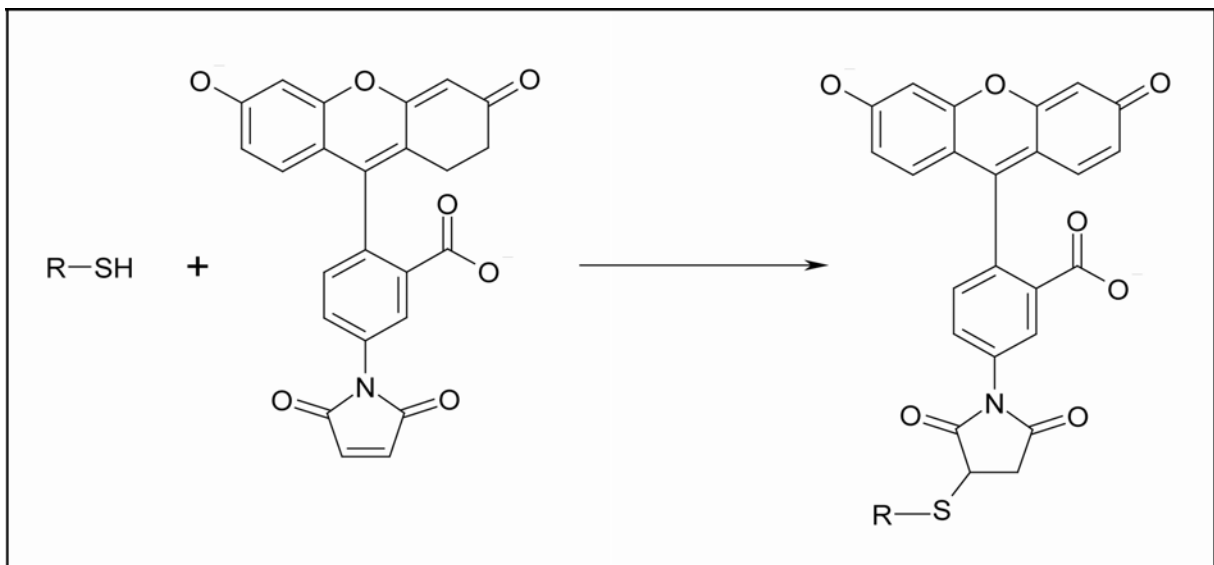


Abb. 2-2: Reaktion eines Maleimids (hier zum Beispiel Fluorescein-5-maleimid) mit einem Molekül, welches eine Sulfhydryl-Gruppe (wie zum Beispiel Cystein im Protein) enthält.

Stammlösungen der lichtempfindlichen Farbstoffe in DMSO wurden hergestellt und in einem 10-30 fachen Überschuß zum Protein gegeben. Diese Ansätze werden 2h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend alternativ in einer SDS-PAGE oder mit spektroskopischen Methoden nach Markierungsgrad überprüft.

2.10. Spektroskopie

In dieser Arbeit wurde als Test auf funktionelle und strukturelle Integrität des Arrestins seine Fähigkeit ausgenutzt, spezifisch an lichtaktiviertes phosphoryliertes Rhodopsin zu binden.

Diese Tests wurden in Zusammenarbeit mit A. Pulvermüller (Arbeitsgruppe K.-P. Hofmann) im Institut für Medizinische Physik und Biophysik am Universitätsklinikum Charité in Berlin mittels kinetischer Lichtstreuung und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie durchgeführt.

2.10.1. Zeitabhängige statische Lichtstreuung von Rhodopsin-Arrestin-Komplexen

Beim Auftreffen von Licht auf ein Teilchen führt die elektrische Feldstärke des Lichtes zu einer Kraft, die positive und negative Ladungen in entgegengesetzte Richtungen bewegt. Dadurch wird ein elektrischer Dipol im Teilchen induziert, der sich mit der Feldstärke des eintreffenden Lichtes ebenfalls periodisch ändert. Durch diesen oszillierenden Dipol wird elektromagnetische Strahlung in alle Richtungen ausgesendet. Man kann Informationen über Moleküldimensionen, Wechselwirkungen zwischen Makromolekülen und Diffusionskoeffizienten der streuenden Teilchen in Lösung bestimmen.

Die Interpretation der Lichtstreusignale für die Arrestinbindung an ihren Rezeptor, entspricht der Rayleigh-Debye Näherung:

$$I(\theta) \sim (1 + \cos^2\theta) \left[\left(\frac{n}{n_0} \right) - 1 \right]^2 V^2 P(\theta)$$

- $I(\theta)$ ist hierbei die Intensität des gestreuten Lichtes im Streuwinkel θ ;

- n , n_0 sind die Brechungsindizes der Partikel, bzw. der Lösung.

- V ist das Volumen der Partikel

- $P(\theta)$ ist der Formfaktor, der von der Größe und der Form des lichtstreuenden Partikels abhängig ist (Heck et al., 2000).

Es gelten hier folgende Vereinfachungen:

- 1.) Aufgrund der Größe und Form der Diskpartikel ist die Intensität der Streuung $I(\theta)$ proportional zum Quadrat des Volumens (V) der Streupartikel.
- 2.) Eine Proteinbindung an der Oberfläche der Diskmembran hat vorwiegend eine Zunahme des Membranpartikelvolumens zur Folge, daraus folgt: $\Delta I(\theta)/I(\theta) = 2 \Delta V/V$
- 3.) Die Änderung der Streulichtintensität ist direkt proportional zur Massenänderung der Partikel.

Das heißt, mit den Annahmen, dass die Bindung des Proteins an die Membran zu keiner Formveränderung führt und die Unterschiede der Brechungsindices n und n_0 relativ klein sind, hat die Proteinbindung nur einen Effekt auf das Volumen.

Da es sich hier um ein System mit homogener Dichte handelt, kann man das Volumen durch die Partikelmasse ersetzen und für kleine Änderungen gilt dann nach Schleicher und Hofmann:

$$\frac{\Delta I}{I} = 2 \times \frac{\Delta M}{M}$$

Zeitabhängige Änderungen der Lichtstreuintensitäten wurden mit einer von Hofmann & Emeis (1981) entwickelten Apparatur gemessen (Abbildung 2-3).

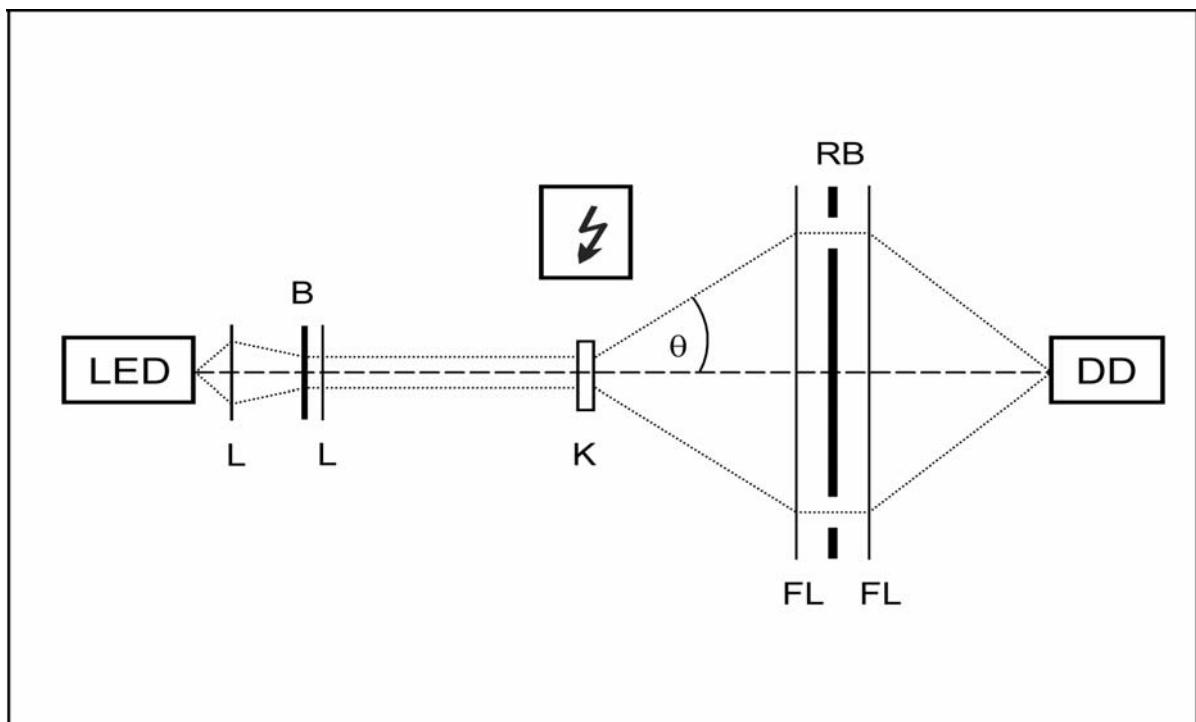


Abb. 2-3: Schematischer Aufbau der Lichtstreuapparatur: LED: Leuchtdiode, L: Linse, B: Blende, K: Küvette, FL: Fresnellinse, RB: Ringblende, DD: Detektor, θ : Streuwinkel (aus Heck et al., 2000; verändert).

Als Messlicht dient ein im nahen Infrarot emittierter Lichtstrahl (820 nm, Leuchtdiode: Hitachi HLP 60R), der mit Hilfe eines Linsensystems auf die Probe, in einer 10 mm 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 nachgeschalteten Spannungsverstärker verstärkt, mit einem Digitaloszilloskop (Nicolet 4094C) aufgezeichnet, digital abgespeichert und mit den Programmen *Statgraphics Plus 5.0* und *Origin 6.1* visualisiert.

Die Induktion der Bindung von Arrestin an Rhodopsin wurde hier durch einen Lichtblitz (500 nm) ausgelöst. Die Messungen erfolgten bei völliger Dunkelheit und bei 20°C . Desweiteren wurden die Experimente bei pH 8,0 in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer durchgeführt. Der Rhodopsinumsatz (R^*/R) wurde mit Hilfe von Graufiltern eingestellt und betrug 32 %. Die gemessenen Streusignale (ΔI) werden auf die Grundintensität des gestreuten Lichtes (I) normiert, um apparative Effekte auszuschließen. Somit stellt hier die Lichtstreuung eine Echtzeit-Messung dar, mit der Massenänderungen verfolgt werden können (Heck et al., 2000).

Um die Rhodopsin-Membran zu zerkleinern, wurde sie folgendermaßen präpariert:

Die Membran wurde mit Glaskugeln eine Minute kräftig geschüttelt und dann auf Eis belassen. Die Membranpartikel waren soweit verkleinert, dass die Sedimentation verzögert wurde.

2.10.2. UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

Grundlage ist hierbei der Übergang von Valenzelektronen in unbesetzte Orbitale, durch die Absorption von Photonen. Dabei erfolgt vor allem bei organischen Molekülen mit Doppelbindungen ein Übergang von Valenzelektronen aus besetzten bindenden π -in unbesetzte π^* -Orbitale.

Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird die Energie des absorbierten Photons entweder in Form von Wärme (Molekülrotationen, Translationen oder Schwingungen) an das Medium abgeführt, für chemische Folgereaktionen (Photochemie) genutzt, oder als energieärmeres Photon emittiert (Lumineszenz) (Abbildung 2-4).

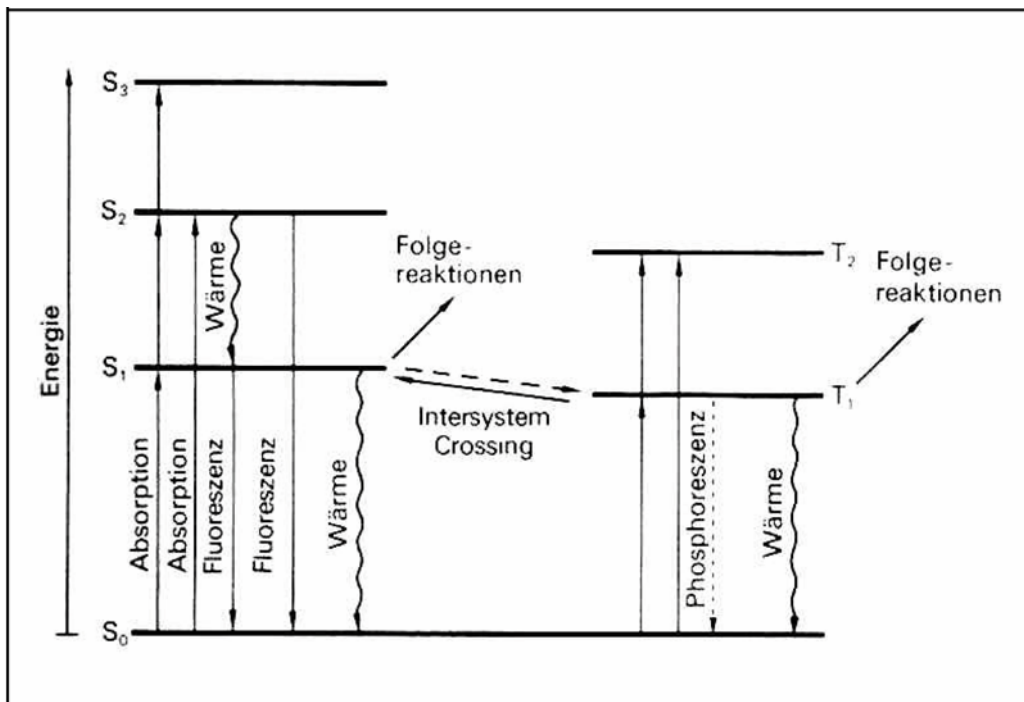


Abb. 2-4: Vereinfachtes Jablonski-Termschema

In dieser Arbeit wurde die UV/Vis-Spektroskopie einerseits zur quantitativen Bestimmung der Stoffkonzentration, zum anderen für qualitative Analysen von Proteinen verwendet.

Die im Rahmen der Arbeit gemessenen Absorptionsspektren wurden mit einem UV/Vis Spektralphotometer (UV-2101 PC) der Firma *Shimadzu* aufgenommen. Als Referenz wurde in allen Fällen der Puffer des jeweiligen Proteins verwendet, wobei alle Proben in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) gemessen wurden. Die Datenverarbeitung und Erstellung der Spektren wurden mit dem dazugehörigen Software-Programm (*UV-Probe Software Version 1.10*) durchgeführt. Die Bearbeitung der Spektren erfolgte anschließend mit *Origin Version 6.1*.

2.10.3. Fluoreszenzspektroskopie

Ein durch Absorption eines Photons angeregtes Molekül tendiert dazu, die überschüssige Energie wieder abzugeben. Geschieht diese Desaktivierung durch Aussenden von elektromagnetischer Strahlung, nennt man diesen Prozess Lumineszenz (Lumineszenz = Fluoreszenz + Phosphoreszenz). Bei der Fluoreszenz handelt es sich um eine kurzlebige Emission im Nanosekunden-Bereich. Die Fluoreszenz ist also der strahlende Übergang von Molekülen aus dem thermisch relaxierten ersten elektronisch angeregten Singulett- in den Singulett-Grundzustand ($S_1 \rightarrow S_0$) (Abbildung 2-4). Im Vergleich zum Absorptionsspektrum ist das Fluoreszenzemissionsspektrum zu längeren Wellenlängen verschoben (rotverschoben),

da ein Teil der absorbierten Energie für innere Umwandlungen genutzt wird und so die Emission energetisch niedriger ist als die Absorption. Bei der Messung eines Emissionsspektrums wird

bei einer definierten Wellenlänge angeregt, und die Emissionsintensität in Abhängigkeit von der Wellenlänge verfolgt.

Es ist nur sehr wenig Probenmaterial für Fluoreszenzuntersuchungen notwendig. Die Fluoreszenzspektroskopie stellt somit eine um mehrer Größenordnungen empfindlichere Meßmethode als die Absorption dar.

Die fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Spektrofluorophotometer RF-1501 der Firma *Shimadzu* durchgeführt. Um eine Bleichung des Fluorophors während der Messung zu verhindern, wurde ein Grau-Filter oder UG-1 der Firma Schott zur Abschwächung der Anregungswellenlänge eingesetzt. Analog zu den UV/Vis- Messungen wurden Quarzküvetten verwendet und die Spektren mit *Origin 6.1* dargestellt.

2.10.4. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Die FCS basiert auf der Analyse von Intensitätsfluktuationen fluoreszierender Moleküle in Lösungssystemen im thermodynamischen Gleichgewicht. Sie eignet sich zur Untersuchung von Transporteigenschaften wie translatorische und rotatorische Diffusion, aktivem Transport und chemischen Reaktionen. Die hier durchgeführte konfokale FCS ermöglicht über zeitliche Signalfluktuations die Dynamik von Biomolekülen zu erfassen. Um spontane zeitliche Fluktuationen eines Signals messen zu können, muss das analysierte System so klein wie möglich gehalten werden. Das erreicht man durch Kombination geringer Messvolumina und sehr geringen Konzentrationen (nmol) der fluoreszierenden Moleküle.

Bei der konfokalen FCS werden kleine Messvolumina dadurch erzeugt, dass ein paralleler Laserstrahl durch die Rückapertur in ein hochauflösendes Mikroskopobjektiv eingestrahlt wird. Dadurch entsteht ein Fokalvolumen, das auf eine Lochblende in der Bildebene des Objektivs abgebildet wird, um eine entsprechende Tiefenschärfe in axialer Richtung zu gewährleisten. Bei einer Detektion durch eine solche Lochblende tragen nur Moleküle zum Signal bei, deren Zahl zu jedem Zeitpunkt statistischen Konzentrations-Schwankungen unterworfen ist. Fluktuationen entstehen im einfachsten Fall dadurch, dass in Lösung befindliche fluoreszierende Moleküle in das ausgeleuchtete Messvolumen hinein- oder hinausdiffundieren. Für eine zeitliche Analyse der Fluktuationen wird von dem fluktuierenden Fluoreszenzsignal mathematisch eine Autokorrelationsfunktion ermittelt. Diese beschreibt die mittlere Aufenthaltsdauer eines einzelnen Moleküls im Fokalebereich des Objektivs. Die

Diffusion von Einzelmolekülen in und aus dem Detektionsvolumen führt dann zu Schwankungen in der Fluoreszenzintensität. Aus der Autokorrelation dieser Fluktuationen lassen sich anhand der Abklingzeit der Diffusionskoeffizient ablesen. Die fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Untersuchungen wurden mit einer vom IBI-1 entwickelten Apparatur (M.Böhmer and J. Enderlein, 2001) durchgeführt. Die Spektren wurden mit *Origin 6.1* dargestellt.

3. Ergebnisse

Um Erkenntnisse zur Bindungsregion von Arrestin und damit auch zum Bindungsmechanismus an Rhodopsin zu erlangen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurde cysteinefreies Arrestin (CA-Arr) generiert und mittels KLS auf Interaktion mit phosphoryliertem, licht-aktiviertem Rhodopsin (P-Rhodopsin*) untersucht. Anschließend wurden Aminosäuren in möglichen Binderegionen von CA-Arr zu Cysteinen substituiert. Arrestine, die Aktivität in der KLS zeigten, wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen modifiziert (via Sulfhydrylgruppe der generierten Cysteine), um somit mögliche Interaktionsbereiche sterisch zu blockieren und damit für P-Rhodopsin* unzugänglich zu machen.

3.1. Austausch der wildtypischen Cysteine 63, 128 und 143 gegen Alanine

Die wildtypische Aminosäuresequenz von Arrestin weist drei Cysteine auf, deren Zugänglichkeit bei der Modifikation der Proteine durch Fluoreszenzfarbstoffe nicht auszuschließen ist. Die Cysteine bilden im nativen Arrestin keine Cysteinbrücken aus (Granzin et al., 1998), sind deshalb für die Struktur und Funktion wahrscheinlich nicht essentiell. Nach dem Programm „Verify 3D“ erschien eine Substitution der Cysteine zu Serin optimal (Bowie et al., 1991). Das Arrestin CS (CS-Arr = C63S/C128S/C143S) zeigte jedoch keine Interaktion mit phosphoryliertem, licht-aktiviertem Rhodopsin (Diplomarbeit, 2001), weswegen wildtypischen Cysteine durch Alanine (CA-Arr = C63A/C128A/C143A) ersetzt wurden.

3.1.1. Konstruktion und Expression von cystein-freiem Arrestin (CA-Arr)

Der Austausch der Cysteine gegen Alanine wurde mittels PCR durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den Vektor pBlunt zwischenkloniert. Nachdem das Konstrukt durch Sequenzierung bestätigt wurde, erfolgte die Klonierung in den Hefe - Expressionsvektor pYEX-BX (Tabelle 3-1). Der in dieser Arbeit benutzte Expressionsvektor pYEX-BX und dessen Derivat pXEX-GW (siehe Anhang) basiert auf dem Plasmid pYEULC (Macreadie et al., 1991) und wurde für hohe Expressionsraten von nativen Proteinen in Hefe entwickelt. Dieser Vektor zeichnet sich durch den Cu^{2+} -induzierbaren Promotor CUP 1 aus,

der nicht durch den Kohlenstoffwechsel der Hefe beeinflusst wird und somit eine uneingeschränkte Wahl der Kohlenstoffquelle bei Zellzucht ermöglicht. Als Selektionsmarker dienen die Auxotrophiegene URA 3 und leu2-d (Erhard und Hollenberg, 1983). Das Markergen URA3 der Plasmide ist vornehmlich für die primäre Selektion transformierter Zellen wichtig. Der für hohe Expressionsraten verantwortliche Marker jedoch ist das nur gering exprimierte Allel leu2-d. Ein Leucinmangel hat zur Folge, dass die Kopienzahl des Plasmids auf 200 bis 300 Kopien pro haploiden Genom erhöht wird. Dies erhöht folglich die Gendosis des zu transkribierenden heterologen Gens in der Zelle und damit die Expressionsrate des Proteins.

Die Transformation erfolgte in den Hefestamm F11 α . Dieser Stamm wächst in Galaktosemedien zu hohen Zelldichten heran und zeigt im Vergleich verschiedener *S. cerevisiae* Stämme die höchsten Expressionsraten (Dissertation Bianca Krafft, 1999). F11 α Arrestin-Transformanten wurden in SC-Medium ohne Leucin mit 2 % Galaktose angezogen. Bei einer OD von 4-5 erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 0,5 mM CuSO₄ für 5 Stunden. Der Aufschluß der Hefe-Zellen wurde mit einer vorgekühlten French-Press bei einem Druck von 2000 PSIG und 4°C durchgeführt. Je nach Effizienz musste die Prozedur mehrfach wiederholt werden, bis ein Aufschlussgrad von circa 90 % erreicht wurde. Die Reinigung aller Arrestine erfolgte über eine Affinitätschromatographie mittels Strep-tag-II. Diese Reinigung hat gegenüber der His-Reinigung den Vorteil, dass Reduktionsmittel (z.B. DTT), als auch EDTA (Proteaseinhibitor) eingesetzt werden können. Reduzierende Bedingungen sind für die Qualität des rekombinanten Arrestins unerlässlich.

Die Expression von CA-Arr im *S. cerevisiae* Stamm F11 α verlief erfolgreich. Es konnte durchschnittlich 1,5 mg gereinigtes Protein pro Liter Kulturmedium erreicht werden (siehe Tabelle 3-1).

3.1.2. Bindungsstudien von CA-Arr an P-Rhodopsin*

Um das Bindungsverhalten von CA-Arr an phosphoryliertes, licht-aktiviertes Rhodopsin (P-Rhodopsin*) zu untersuchen, wurden zeitabhängige Lichtstremessungen (KLS) durchgeführt. Die Messungen bieten die Möglichkeit lichtinduzierte Bindungsprozesse an Diskmembranen zu verfolgen.

Durch die Bindung von Arrestin an Diskmembranen mit Rhodopsin wird die Masse der Membranpartikel vergrößert, wodurch die Intensität des gestreuten Lichts sich ändert. Das heißt, eine lichtinduzierte Bindung von Arrestin an phosphorylierte Membranen ist durch einen Anstieg der Lichtstreuintensität infolge der Massenzunahme der Diskmembran zu

beobachten. Dabei ist die Lichtstreuänderung ein Echt-Zeit-Monitor für die Bildung des Komplexes aus licht-aktiviertem, membrangebundenem, phosphoryliertem Rhodopsin und dem löslichem Arrestin. Dieser Effekt ist bei unphosphorylierten Membranen nicht zu beobachten (Hofmann et al., 1992; Heck et al., 2000).

Die Experimente wurden im Institut für „Medizinische Physik und Biophysik am Universitätsklinikum Charité Berlin“ durchgeführt. Prinzip und Durchführung der Messmethode sind in Abschnitt (2.10.1.) beschrieben.

Frühere Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass rekombinantes, heterolog exprimiertes Arrestin sich wie retinales Arrestin verhält (Diplomarbeit, 2001). Zur Ermittlung der Aktivität wurde in dieser Arbeit das KLS-Bindungssignal des CA-Arr dem des rekombinanten Arrestins gegenübergestellt.

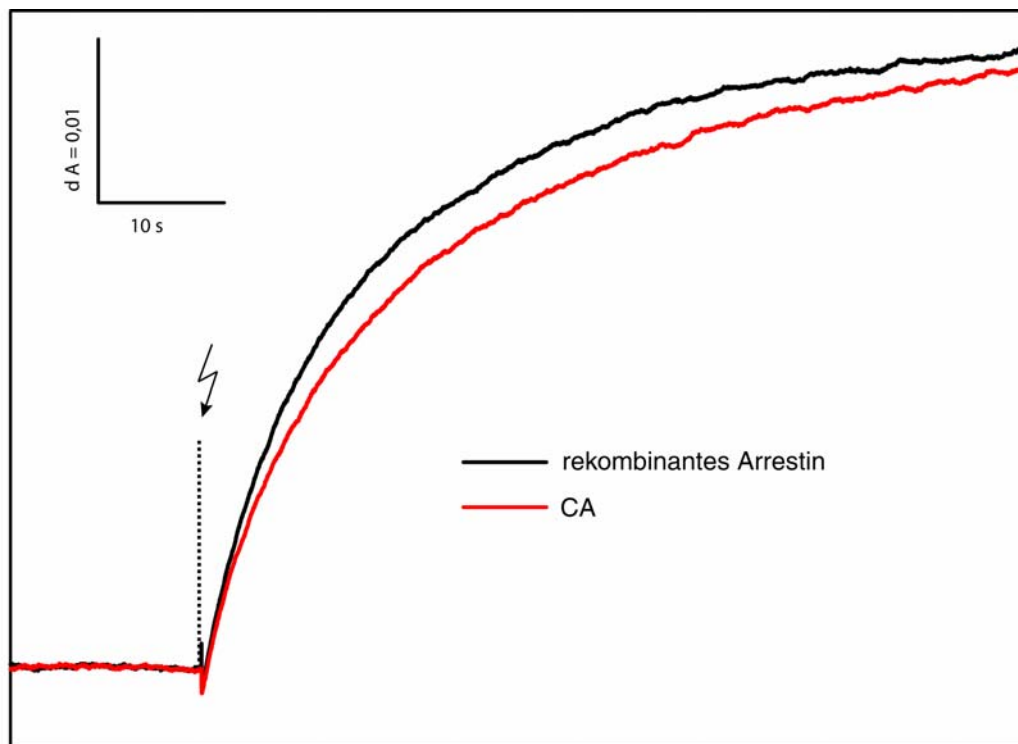


Abb. 3-1: Blitzlichtinduzierte Lichtstrebundungssignale von rekombinantis Arrestin und Arrestin CA. Dargestellt sind die Bindungssignale von rekombinantis Arrestin (schwarze Kurve) und CA (rote Kurve) an phosphorylierte Membranen. Es sind die Original-Bindungssignale abzüglich der Kontrolle (P-Rhodopsin* ohne Protein) gezeigt. Messbedingungen: Der Zeitpunkt der Blitzbleichung ist mit 15 s festgelegt worden. Die Effizienz der Lichtbleichung ist mit Hilfe von Graufiltern auf 32 % eingestellt. Das Experiment wurde bei 20 °C durchgeführt und die Dauer ist auf 80 s limitiert. Eingesetzt wurden 3 μM P-Rhodopsin in 20 mM BTP (1,3- Bis[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan), 130mM NaCl, 1mM CaCl₂, pH 7,5 und 1 μM Arrestin in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8,0.

Die Abbildung 3-1 zeigt die Kinetiken der Bindungssignale von rekombinantis Arrestin und CA-Arr. Beide Arrestine binden nach Lichtinduktion innerhalb von Sekunden an phosphorylierte Membranen, ersichtlich aus dem ansteigenden Kurvenverlauf. Der negative

Ausschlag nach dem Blitz ist bekannt und auf das Rhodopsin zurückzuführen (Schleicher et al., 1987; 1989). Die Signale besitzen in etwa gleiche Steigungen innerhalb der ersten Sekunden. Demnach sind die Geschwindigkeiten, mit der die Arrestine an phosphoryliertes licht-aktiviertes Rhodopsin binden vergleichbar. Da deutliche Unterschiede in der Amplitudenhöhe nicht erkennbar sind, binden beide Proteine offensichtlich mit vergleichbarer Affinität an die Membran bzw. P-Rhodopsin*.

In diesem Experiment konnte im Wesentlichen gezeigt werden, dass die Funktionalität des CA-Arr nicht beeinträchtigt ist.

3.2. Gezielte Einführung von Cysteinen in CA-Arr

Da CA-Arr offensichtlich bezüglich ihrer Interaktion zu P-Rhodopsin* voll aktiv ist, wurde anhand der Röntgenstruktur der retinalen Arrestins eine gezielte Mutagenese des CA-Arr-Gens durchgeführt. In jeder Domäne wurden zwei Aminosäuren im α -helikalen Bereich drei Aminosäuren und zwischen beiden Kuppeldomänen eine Aminosäure ausgewählt deren Seitenketten aus dem Protein exponiert vorlagen (Abbildung 1-4, Kapitel 1) und durch Cysteine ausgetauscht. In der N-terminalen Kuppel wurden die Aminosäuren Serin 60 bzw. Serin 169, in der C-terminalen Kuppel die Aminosäuren Valin 244 bzw. Prolin 352, im α -helikalen Bereich Serin 106, Alanin 113 bzw. Prolin 117 und Glycin 68 in der „*hinge region*“ gegen Cysteine ausgetauscht. Es wurden in CA-Arr jeweils ein Austausch, oder gleichzeitig mehrere Cysteine eingeführt (siehe Tabelle 3-1, linke Spalte).

Die Klonierung der mutierten Arrestine wurde alternativ mit zwei Methoden (Kapitel 2.6.14.) in pYEX-BX bzw. pYEX-GW durchgeführt. Welcher Vektor für das jeweilige Arrestin Konstrukt eingesetzt wurde ist in Tabelle 3-1 (Spalte 2) aufgeführt.

Bezeichnung des Arrestins	Verwendeter Vektor	Nummer des Konstrukts	Durchschnittlich gereinigtes Protein [mg Protein/ l Medium]
CA= (C63A/C128A/C143A)	pYEX-BX	# 5/10	1,5
CA S60C	pYEX-GW	# 2	1,0
CA S169C	pYEX-GW	# a2	1,2
CA S106C	pYEX-GW	# 2	2,0
CA A113C	pYEX-GW	# 1	1,5
CA P117C	pYEX-GW	# 1	0,9
CA G68C	pYEX-BX	# 2	0,1
CA V244C	pYEX-GW	# a4	1,5
CA P352C	pYEX-GW	# 17	1,0
CA S60C/S169C	pYEX-BX	# 4	0,1
CA S60C/V244C	pYEX-BX	# 1	1,8
CA V244C/P352C	pYEX-BX	# 8	0,2
CA S60C/G68C/V244C	pYEX-BX	# 14	0,1
CA S60C/S169C/V244C/P352C	pYEX-BX	# 12	1,2

Tabelle 3-1: Zusammenfassung aller Arrestin-Konstrukte und der erzielten Expressionsraten

3.2.1. Expression der CA Arrestine in *S. cerevisiae*

Die Expression eukaryotischer Gene in Hefe hat zwei entscheidende Vorteile. Es stellt zum einen ein sehr ökonomisches Expressionssystem dar, und zum anderen weist es viele Merkmale eines Expressionssystems höherer Eukaryoten auf. Ein weiterer Vorteil gegenüber prokaryotischer Systeme besteht darin, dass im besten Fall das rekombinant hergestellte Protein alle posttranslationalen Modifikationen des ursprünglichen Wirtes tragen kann. Hefezellen können ähnlich einfach wie Bakterienzellen kultiviert werden, ihr Genom ist stabil, vollständig sequenziert und es stehen seit langem viele molekularbiologische Techniken zur Verfügung. Ein Nachteil dieses Systems sind die Proteasen, die in bestimmten Wachstumsphasen der Hefe induziert werden (Jones et al., 1991) und in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. Saure Proteasen der Vakuole werden beim Zellaufschluss freigesetzt und können das heterolog exprimierte Protein bei der Aufarbeitung

Ergebnisse

abbauen. Zudem erschwert die recht rigide Zellwand der Hefen einen schonenden Zellaufschluß, mitunter ebenfalls zu Proteineinbußen führen kann.

In Abbildung 3-1 sind die Fraktionen einer Strep-tag-II Reinigung am Beispiel von Arrestin CA S60C im Coomassie gefärbten SDS Gel dokumentiert und zeigt die Effizienz der Reinigung.

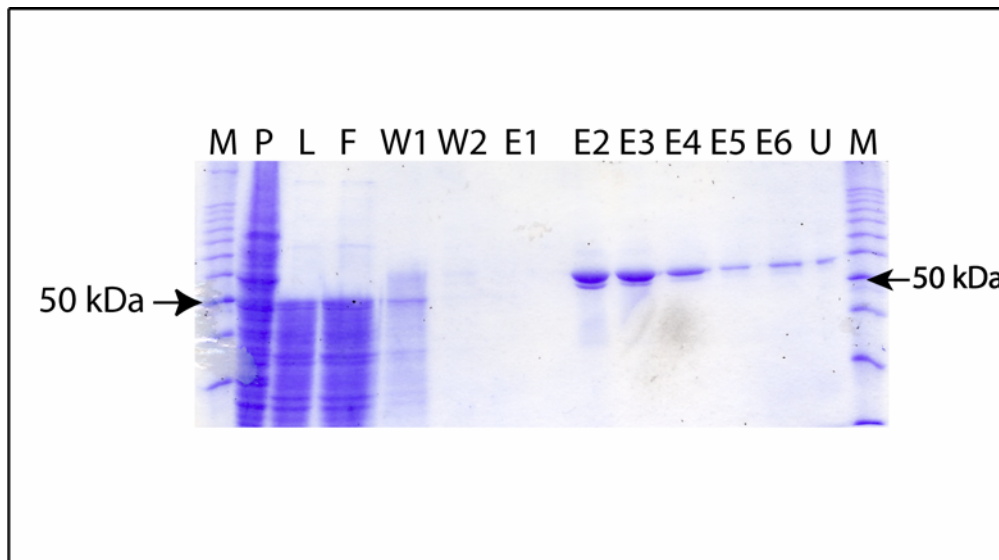


Abbildung 3-2: Typische Strep-tag-II Reinigung von visuellem Arrestin (hier als Beispiel CA S60C).

(SDS-PAGE-Gel): ~6g F11 α -Zellen wurden in 30 ml Aufschlußpuffer (200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, pH 8,0, 1Tablette Proteaseinhibitoren complete ohne EDTA, 20 mM DDT) mit Hilfe der French-Press (2 Zyklen) aufgeschlossen (90% Aufschlussgrad).

Nach Homogenisierung des Pellets wurden 60 ml klaren Lysats dreimal auf eine 25 ml Strep-tag-II-Säule gegeben.

Waschschritte: Schritt 1: 200mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, pH 8,0; Schritt 2: 100mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, pH 8,0; Schritt 3: 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, pH 8,0; **Elution:** 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer, pH 8,0 plus 0,026 g/ 50ml Desthiobiotin **Spuren:** M. 10kDa Marker; P. Pellet; L. Lysat; F. Durchlauf; W1-3. Waschschritte 1-3; E1-E6. Eluate 1-6; U. Elution und Regeneration mit Harnstoff

Es konnte hier 1mg lösliches Arrestin CA S60C aus 6 g Zellen (dies entspricht etwa 1 l Medium) mit einer Reinheit von ungefähr 80-90 % isoliert werden (siehe Eluate in Spuren E2-E6). Das lösliche Protein lässt sich mit Konzentratoren, die ein 10 kDa Ausschlussvolumen besitzen, anreichern. In den Reinigungen bzw. Proteinpräparationen ergaben sich jeweils bei fast allen Mutanten Ausbeuten von 1-2 mg gereinigtem Protein aus ungefähr 6 g Hefezellen. Diese Mengen sind ausreichend für die anschließenden Bindungsexperimente. Unter den hier verwendeten Bedingungen sind die meisten mutierten Arrestine im Allgemeinen recht stabil. Einige Arrestine (CA G68C, CA S60C/S169C, CA V244C/P352C, CA S60C/G68C/V244C) jedoch konnten nur in geringem Maße exprimiert werden (siehe Tabelle 3-1, rechte Spalte). Unterschiede in den Ausbeuten der verschiedenen exprimierten Arrestine sind ausschließlich im Zusammenhang mit dem jeweiligen Arrestin-Gen bzw. der modifizierten Genprodukte zu suchen (Tabelle 3-1, rechte Spalte). Diese

Arrestine zeigten zudem auch in später beschriebenen Bindungsstudien keine Interaktion mit P-Rhodopsin*.

3.3. KLS-Daten von CA Arrestinen mit je einem eingeführten Cystein

Um die funktionelle Integrität der mutierten Arrestine (Tabelle 3-1) zu überprüfen wurden zeitabhängige Lichtstremessungen mit phosphoryliertes, licht-aktiviertes Rhodopsin (P-Rhodopsin*) durchgeführt. Als Beispiel für jeden zu untersuchenden Bereich von Arrestin sind in Abb. 3-3 Modelle von CA-Arr mit den ausgetauschten Positionen in der N- bzw. C-terminalen Domäne, im α -helikalen, sowie Loop-Bereich dargestellt. Die Region zwischen der N- und C-terminalen Domäne erregte die Aufmerksamkeit unserer Arbeitsgruppe, da sie verschiedene Konformationen in der postulierten offenen und geschlossenen Form von Arrestin einnimmt (Hirsch et al., 1999). Sie wird deshalb als möglicher Interaktionsbereich diskutiert.

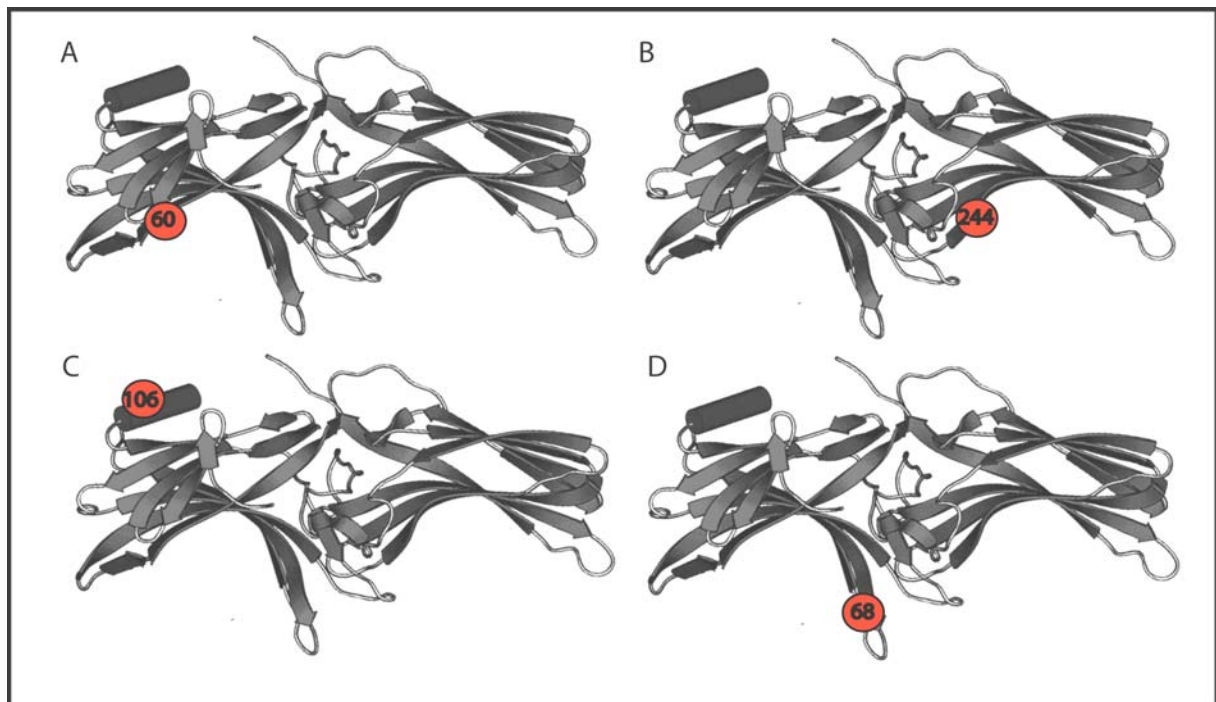


Abbildung 3-3: Dargestellt sind hier Modelle von Arrestin. Die ausgetauschten Positionen von CA-Arr sind rot hervorgehoben. A: CA S60C; B: CA V244C; C: CA S106C; D: CA G68C

Die Ergebnisse der Arrestine mit einem Cystein sind in Abbildung 3-4 dargestellt. Es sind die Kinetiken der Bindungssignale der Arrestine CA G68C (Loop-Bereich zwischen den Domänen) CA S60C, CA S169C (N-terminale Domäne), CA V244C, CA P352C (C-

Ergebnisse

terminale Domäne), CA S106C, CA A113C, CA P117C (α -helikaler Bereich) sowie der Kontrolle (P-Rhodopsin*) dargestellt.

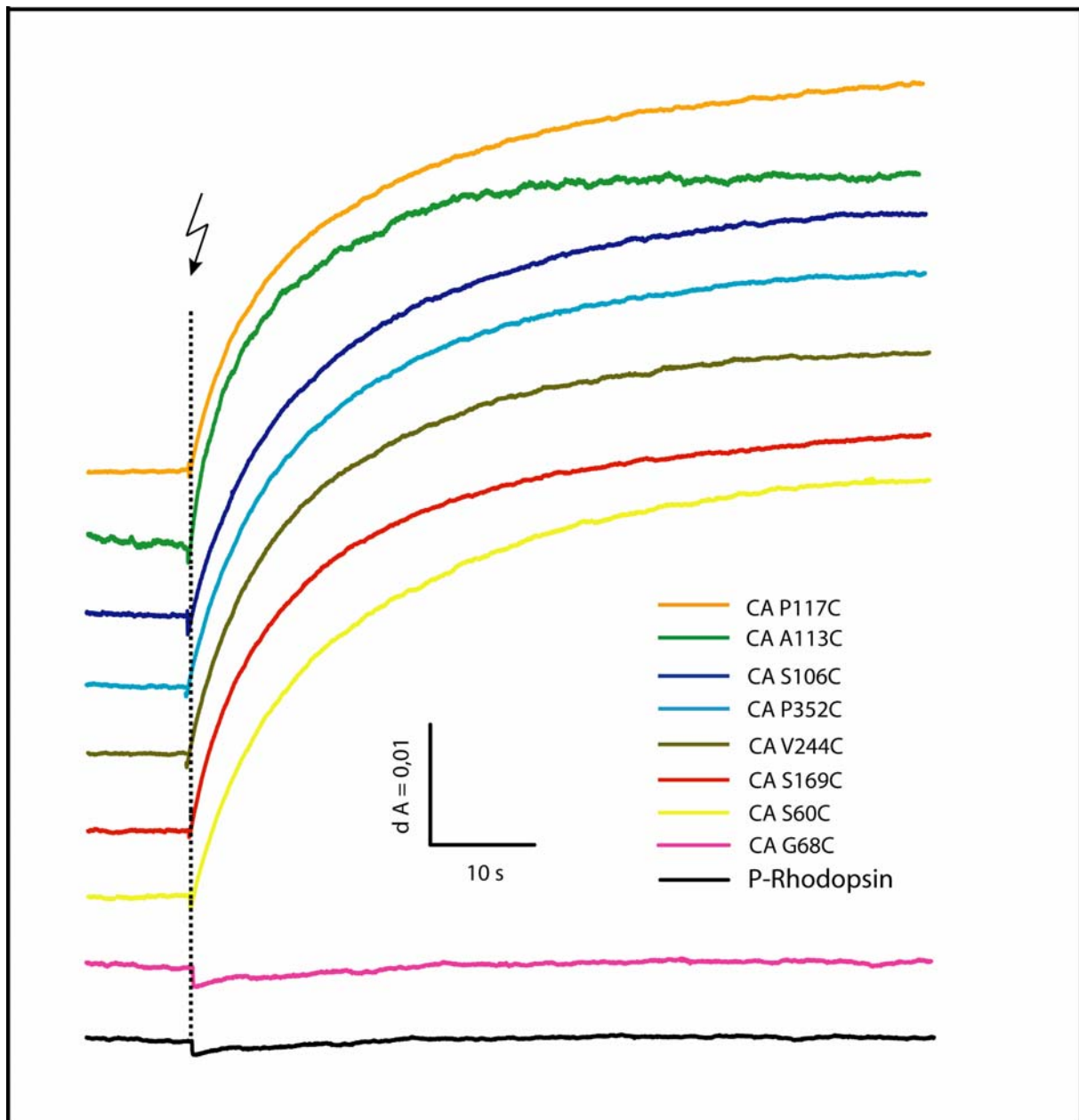


Abb. 3-4: Blitzlichtinduzierte Lichtstreubindungssignale von der Kontrolle (P-Rhodopsin), CA G68C, CA S60C, CA S169C, CA V244C, CA P352C, CA S106C, CA A113C, CA P117C. Die Messbedingungen sind analog zu Abbildung 3-1.

Arrestin CA G68C zeigt, wie die Kontrolle, keinen Anstieg des Bindungssignals. Alle anderen Arrestine binden nach Lichtinduktion innerhalb von Sekunden an die phosphorylierten Membranen, was anhand des steigenden Kurvenverlaufs zu erkennen ist. Die Signale besitzen in etwa gleiche Steigungen innerhalb der ersten Sekunden, demnach binden diese Arrestine vergleichbar an licht-aktiviertes Rhodopsin. Unterschiede in der Amplitudenhöhe sind auf unterschiedliche Arrestin-Konzentrationen der jeweiligen Proben

zurückzuführen. Da die Konzentrationsbestimmung nach Bradford quantitativ erfolgt, gehen auch Abbauprodukte von Arrestin mit in die Bestimmung ein. Die Menge der Abbauprodukte ist nicht genau zu quantifizieren, deshalb kann nur von einer estimativen Menge Arrestin ausgegangen werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Funktionalität der Arrestine CA S60C, CA S169C, CA V244C, CA P352C, CA S106C, CA A113C, CA P117C durch die Mutagenese nicht beeinträchtigt wurde. Arrestin CA G68C zeigte keine Funktionalität und wurde deshalb in anschließenden Experimenten nicht mehr berücksichtigt. Lösliche und funktionale Arrestine wurden anschließend mit Fluoreszenzfarbstoffen (siehe Tabelle 2-5, Kapitel 2.9.) modifiziert und auf Bindungseigenschaften an phosphorylierte Membranen getestet.

3.4. Modifikation funktionaler Arrestine

Zur Modifikation der Arrestine wurden die eingeführten Cysteine in den ausgewählten Regionen mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen gekoppelt.

Fluoreszenz-Farbstoff	Molekular-Gewicht (MW)	Extinktionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
F-5-M	~ 430	86 000	491	514
Atto 655	~ 650	125 000	663	684
Cy 5	~ 750	250 000	652	670
Alexa 633	~ 1300	159 000	627	644

Tabelle 3-2: Dargestellt sind die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Eigenschaften

Die verwendeten Farbstoffe binden mit hoher Spezifität die frei zugänglichen Sulfhydrylgruppen der Cysteine des Proteins kovalent und bilden stabile Thioether-Bindungen aus (siehe Abbildung 2-2). Die hier verwendeten Farbstoffe sind bereits bewährte Fluorophore für eine Vielzahl von Proteinen. Die spektroskopischen Eigenschaften der Farbstoffe kann man der Tabelle 3-2 entnehmen. Alle in dieser Arbeit getesteten Fluoreszenzmaleimide wurden geprüft, ob sie spezifisch und ausschließlich an die Cysteine der Arrestine binden. Voraussetzung für ein reproduzierbares Ergebnis ist aber eine nahezu hundertprozentige Markierung der Proteine, um Restaktivität nicht markierter Proteine zu vermeiden. Insgesamt zeigte sich, dass die Markierung der Arrestine mit Cy 5 und Atto 655

nicht reproduzierbar waren. Diese Farbstoffe zeigten unspezifische Bindung an das Protein. Nur bei Alexa 633 und F-5-M wurde eine spezifische Bindung an die Cysteine, mit zu erwartenden Protein-Farbstoff-Verhältnissen, nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Deshalb werden alle nachfolgenden Experimente mit A633 und F-5-M markierten Proteinen durchgeführt.

3.4.1. Bestimmung des Markierungsgrads von Arrestin mit Fluoreszenz-maleimiden

Zur Bestimmung des Markierungsgrads wurden zwei Ansätze gewählt: SDS-PAGE (siehe Abbildungen 3-5) und spektroskopische Methoden (Abbildung 3-6 und 3-7).

Mittels SDS-PAGE sind deutliche Unterschiede im Laufverhalten von markiertem und unmarkiertem Arrestin zu erkennen. Es ist eine Retardierung der markierten Proteine zu größeren Molekulargewichten hin, entsprechend der Molekulargewichte von A633 (~ 1,3 kDa) und F-5-M (~ 0,5 kDa) zu beobachten. Im Vergleich mit unmarkiertem Arrestin in Spur 3 zeigt die Bande mit A633 markiertem Arrestin (Spur 1) entsprechend die größte Verzögerung gefolgt von F-5-M markiertem Arrestin (Spur 2). Diese Ergebnisse entsprechen auch den Erwartungen, da Größenunterschiede zwischen Proteinen von 0,5 kDa in einer 7,5 % SDS-PAGE auflösbar sind. Auf der Höhe der unmarkierten Probe (Spur 3) findet man in Spur 1 und Spur 2 keine Bande. Ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel macht Proteinmengen von 1 µg noch deutlich sichtbar, das heißt weniger als 1 µg Protein könnte unmarkiert sein. Bei einer hier aufgetragenen Menge von etwa 20 µg Protein je markierter Probe, entspricht das einem Markierungsgrad von mindestens 95 %. Die weiteren Banden im SDS-Gel sind Protein- Verunreinigungen.

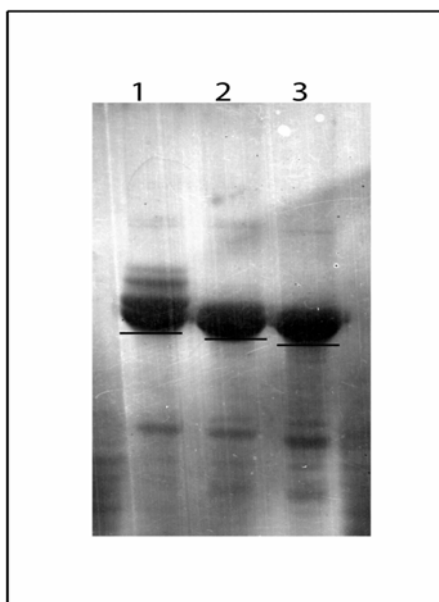


Abb. 3-5: Markierte und unmarkierte Proteinproben in einem mit Coomassie gefärbten 7,5 % SDS-Gel: Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Laufeigenschaften von Arrestin, am Beispiel von unmarkiertem und markiertem CA S60C/V244C **Spur 1:** CA S60C/V244C + A633; **Spur 2:** CA S60C/V244C + F-5-M; **Spur 3:** CA S60C/V244C. Die Reaktion der Proteine mit den Maleimiden wurde für 2 h bei RT mit zehnfachem Überschuss an Farbstoff im Dunkeln durchgeführt.

Ergebnisse

Spektroskopisch kann man das Verhältnis von Protein zu Farbstoff mit Hilfe von Fluoreszenz und Absorption bestimmen.

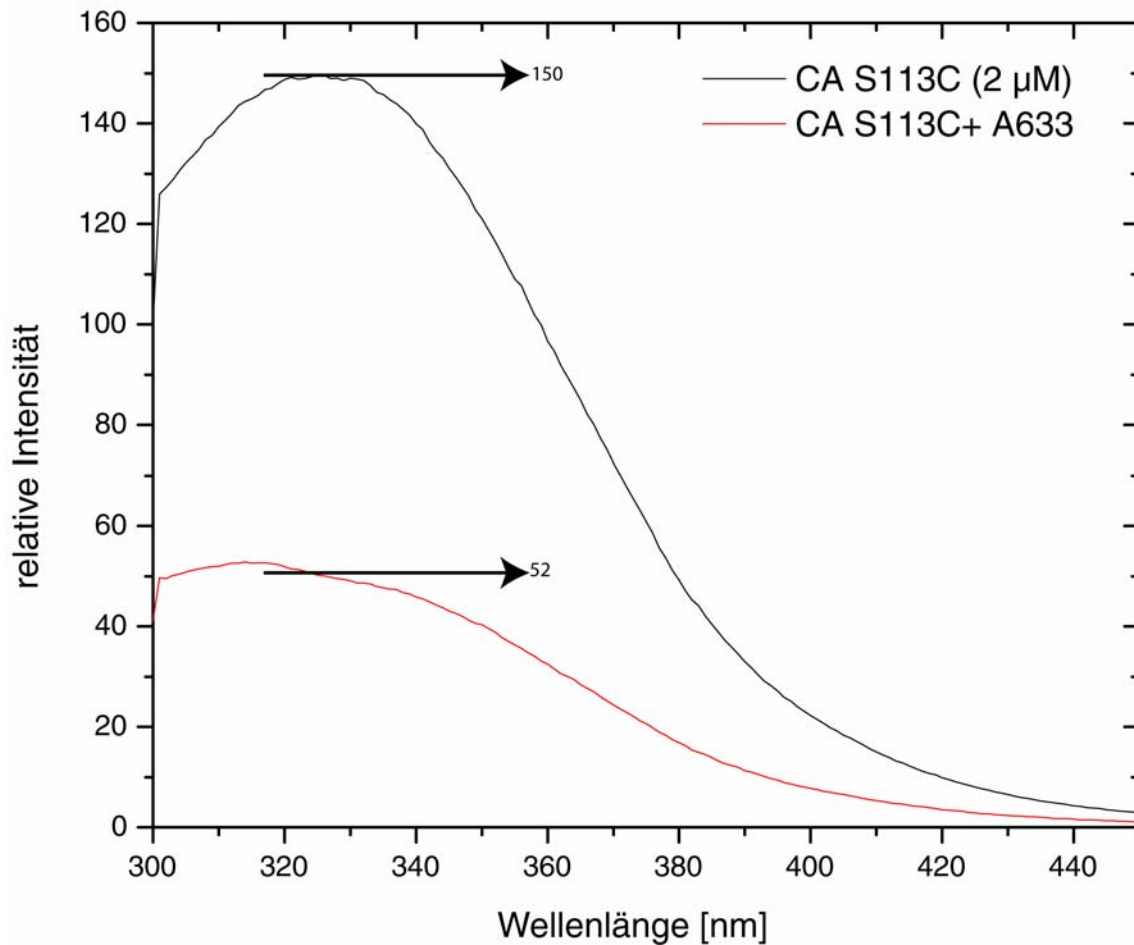


Abb. 3-6: Fluoreszenz-Emissionsspektrum von Arrestin CA S60C/V244C (2µM) und CA S60C/V244C + A633: Es wurde mit einem UG 1 Filter gearbeitet. Zunächst wurde ein Emissionsspektrum von Arrestin CA S60C/V244C mit einer Konzentration von 2 µM Protein und einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen (Anregung der Tryptophane im Arrestin). Das Maximum der Intensität (150) dient als Referenz (schwarze Kurve). Nachdem Arrestin CA S60C/V244C mit A633 modifiziert (RT, 2 h , 10x Überschuß A633, im Dunkeln) und von überschüssigem Farbstoff mit Hilfe von Sephadex G-25 Säulen gereinigt wurde, wurde ein Emissionsspektrum (λ_{exc} 280 nm) des Eluats aufgenommen (Intensitätsmaximum 52; rote Kurve).

Nachdem eine nach Bradford bestimmte Menge an Arrestin markiert wird, ist eine Reinigung von überschüssigem Farbstoff via Gelfiltration für nachfolgende Experimente unerlässlich. Bei dieser Prozedur kann es zu Verlusten von markiertem Protein kommen. Eine genaue Aussage über die Konzentration von markiertem Arrestin ist deshalb nicht mehr möglich. Eine Proteinbestimmung markierter Arrestine mittels UV/VIS-Spektroskopie oder nach Bradford ist aufgrund der absorbierenden Eigenschaften der Farbstoffe nicht möglich. Deshalb muss die Proteinmenge einer markierten Arrestinprobe in der Fluoreszenzspektroskopie bestimmen werden. Emissionsspektren von einer nach Bradford

Ergebnisse

bestimmten Menge unmarkierten Arrestins und der markierten, gereinigten Probe aus der Gelfiltration werden bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm aufgenommen. Die Maxima der Kurven werden in Relation zueinander gesetzt und erlauben so eine Aussage über die Konzentration des markierten Proteins, wie im folgenden am Beispiel von CA S60C/V244C und CA S60C/V244C + A633 gezeigt wird.

In Abbildung 3-6 werden die Emissionsspektren von Arrestin CA S60C/V244C und CA S60C/V244C + A633 bei einer Anregungswellenlänge (λ_{exc}) von 280 nm dargestellt. Bei dieser Wellenlänge werden die Tryptophane des Arrestins angeregt jedoch nicht der Fluoreszenzfarbstoff A633. Wie man erkennen kann, besitzt die Referenzprobe CA S60C/V244C (schwarze Kurve) ein Intensitätsmaximum von 150. Die Probe CA S60C/V244C + A633, in der Grafik rot dargestellt, hat ein Intensitätsmaximum von 52. Die Gesamtmenge an Protein dieser Probe beträgt folglich etwa ein Drittel der Referenzprobe. Da die Referenz 2 μ M Protein enthält, sind in der Probe mit markiertem Arrestin 0,578 μ M Protein. Das Maximum der zu untersuchenden Probe (rote Kurve) hat sich zu größeren Wellenlängen (von 325nm nach 327 nm) verschoben. Diese Rotverschiebung resultiert aus der Umgebungsänderung der Tryptophane im Arrestin durch Bindung des Farbstoffs. Eine Rotverschiebung der Proben ist bereits ein Indiz für eine vorhandene Markierung der Proteine.

In der Fluoreszenzspektroskopie alleine können keine quantitativen Aussagen über den Markierungsgrad der Proben getroffen werden, deshalb werden markierte Probe in der Absorptionsspektroskopie eingesetzt. Das Absorptionsspektrum der gleichen Probe mit markiertem Arrestin wird mit 2 μ M A633 ($OD_{629} = 0,224$ in wässriger Lösung) verglichen. Das lokale Maximum der Probe mit markiertem Arrestin (629 nm) wird mit der bekannten Absorption des A633 in diesem Wellenlängenbereich in Relation gesetzt, um die Konzentration des Farbstoffes in der Arrestinprobe zu erhalten (Abb. 3-7).

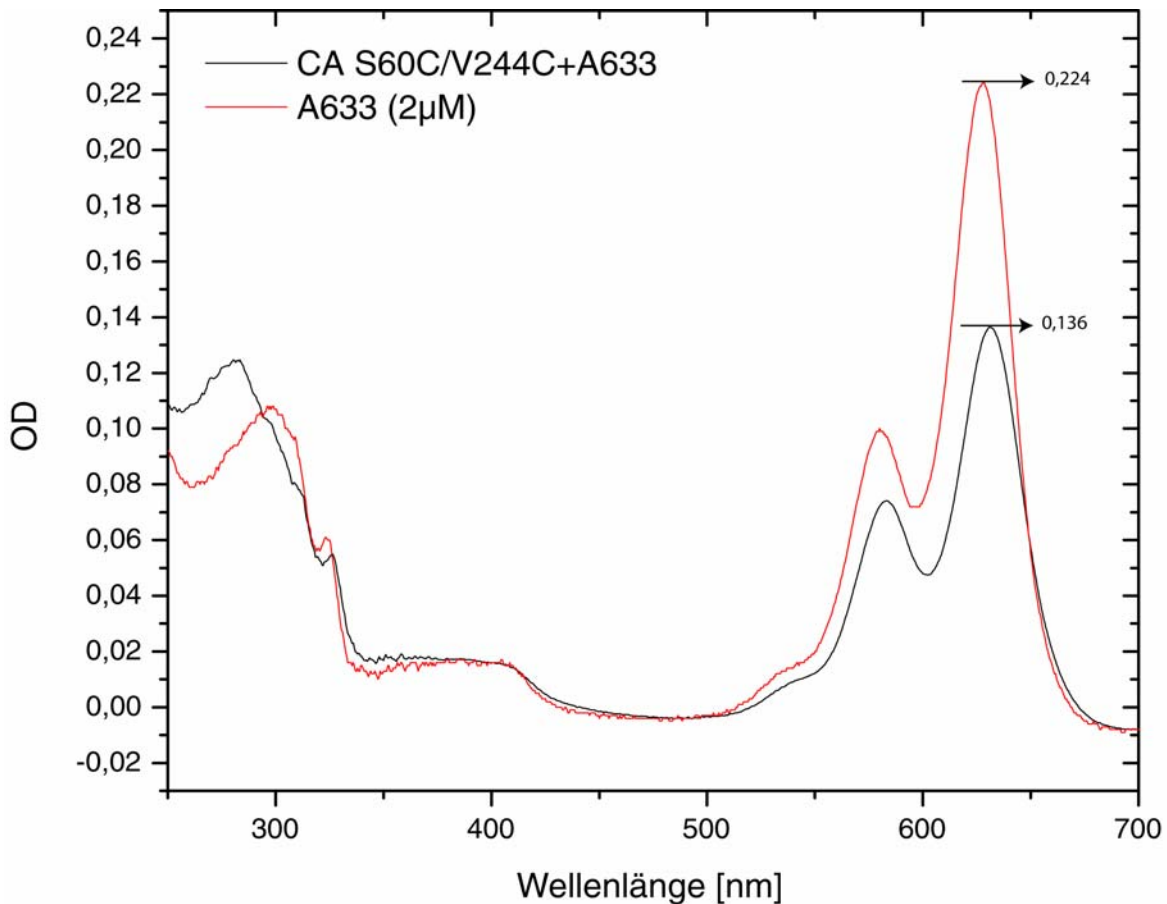


Abb. 3-7: Absorptionsspektrum von A633 (2µM) und CA S60C/V244C + A633. Es wurde zunächst ein Spektrum von A633 (2µM) als Referenz aufgenommen und mit dem Spektrum der Probe CA S60C/V244C + A633 verglichen. Das Maximum der Farbstoff-Probe liegt bei einer OD von 0,224 (= 2µM) bei 629 nm (rote Kurve), während das Maximum der Protein-Probe bei OD 0,136 um 631 nm liegt (schwarze Kurve). Die OD von 0,136 entspricht einer Konzentration von 1,22 µM.

Betrachtet man die Maxima der Amplituden, ergibt sich eine Konzentration an gebundenen Farbstoff von 1,22 µM. Im Emissionsspektrum wurde eine Proteinkonzentration von 0,57 µM ermittelt. Insgesamt zeigt sich somit ein Protein-Farbstoff-Verhältnis von ungefähr 1:2. Da bei Arrestin CA S60C/V244C zwei Positionen markiert werden können, kann man von einem nahezu kompletten Markierungsgrad ausgehen.

Wie in der Abbildung dargestellt, ist das Maximum der markierten Proteinprobe gegenüber dem freien Farbstoff A633 um 2 nm rotverschoben. Diese Verschiebung ist bedingt durch die Bindung des Farbstoffes an das Protein.

3.5. KLS an markierten CA Arrestinen mit einem Cystein

Um die Bindungsregion von Arrestin an phosphoryliertes, licht-aktiviertes Rhodopsin einzugrenzen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff A633 kovalent an die eingeführten Cysteine der löslichen Arrestine (CA S60C, CA S169C, CA V244C, CA P352C, CA S106C, CA A113C, CA P117C, siehe Abbildung 3-4) gebunden. Die Gegenwart des Farbstoffes soll innerhalb eines begrenzten Bereichs von Arrestin zu einer selektiven, sterischen Blockierung der Bindung zu Rhodopsin führen. Das heißt, dass Fluoreszenzfarbstoff markierte Arrestine, die eine reduzierte bzw. keine Bindungsfähigkeit zu Rhodopsin aufweisen, den Farbstoff (A633) an oder in der Nähe eines Interaktionsbereichs tragen. Grundvoraussetzung für die nachfolgenden Experimente ist, dass sich das System durch den bloßen Zusatz von Fluoreszenzfarbstoffen nicht ändert. Hierfür wurde das P-Rhodopsin markiert und nach anschließender Lichtaktivierung in der KLS vermessen. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zur nicht markierten P-Rhodopsin Probe (Daten nicht gezeigt). Somit kann ein Einfluss der Fluoreszenzfarbstoffe allein auf das System ausgeschlossen werden.

3.5.1. Analyse der N-terminalen Domäne von Arrestin hinsichtlich Interaktion mit P-Rhodopsin*

Es wurde postuliert, dass die primäre Bindungsstelle in der N-terminalen Kuppel lokalisiert ist (Granzin et al., 1998). Die Proteine CA S60C und CA S169C mit gebundenen A633 in diesem Bereich wurden mittels KLS untersucht, um diese Hypothese zu untersuchen. Abbildung 3-8 zeigt anhand von CA S60C (siehe auch Abbildung 3-3 A) den Einfluss der sterischen Blockierung der N-terminalen Kuppel auf das Bindungsverhalten zu phosphoryliertem licht-aktiviertem Rhodopsin.

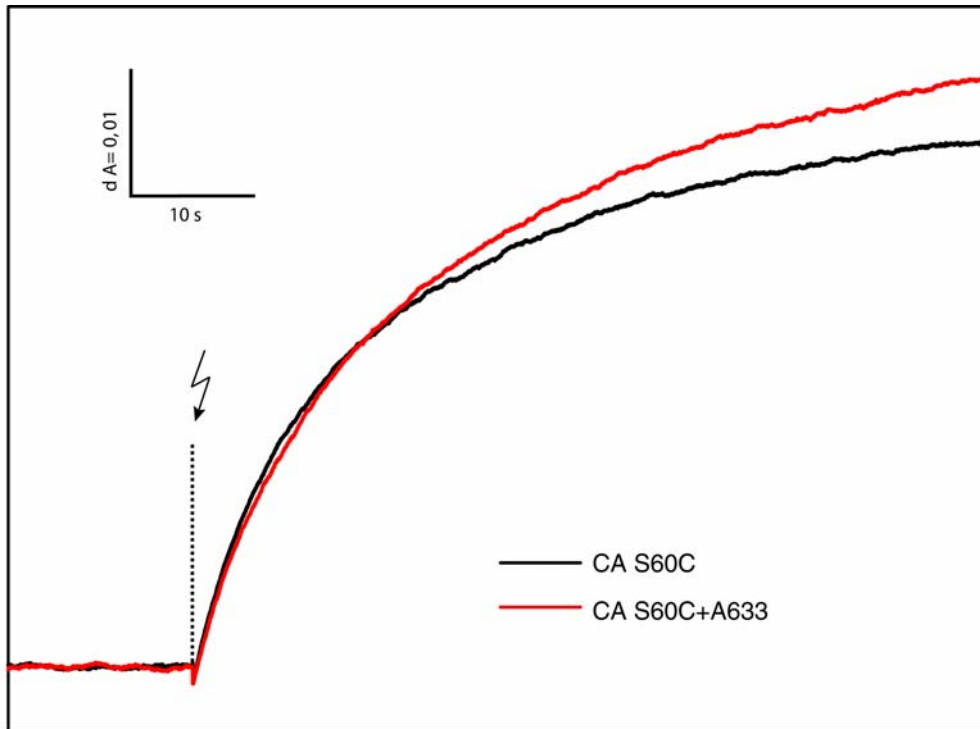


Abb. 3-8: Blitzinduzierte Lichtstreubindungssignale von CA S60C und CA S60C + A633: Gezeigt sind die Bindungssignale von Arrestin CA S60C (schwarze Kurve) und CA S60C + A633 (rote Kurve) an die phosphorylierten Membranen. Es sind die Original-Bindungssignale abzüglich der Kontrolle (P-Rhodopsin* ohne interaktives Protein) gezeigt. Messbedingungen: analog zu Abbildung 3-1

Die Reaktionskinetiken von CA S60C und CA S60C + A633 mit phosphoryliertem Rhodopsin* sind vergleichend dargestellt. Es ist kein signifikanter Unterschied der Bindungssignale zu beobachten. Die Kinetiken (Anfangssteigungen) und die Amplituden der Signale sind annähernd gleich. Analoges gilt für Arrestin CA S169C (Daten nicht gezeigt).

Das Resultat lässt folgern, dass die N-terminale Domäne allein kein Interaktionsbereich zu Rhodopsin ist, oder aber die Molekülgröße des A633 reicht nicht aus, um effektiv die Interaktion zu blockieren.

3.5.2. Analyse der C-terminalen Domäne von Arrestin hinsichtlich Interaktion mit P-Rhodopsin*

Experimente mit Arrestin-Peptiden zeigten, dass die C-terminale Kuppel von Arrestin in der Bindung zum P-Rhodopsin* involviert sein könnte (Pulvermuller et al., 2000). Durch kovalente Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs A633 an das eingeführte Cystein an Position 244 bzw. 352 (CA V244C, CA P352C), soll die konkave C-terminale Kuppelinnenseite des Arrestins selektiv sterisch blockiert werden (siehe auch Abbildung 3-3 B).

Abbildung 3-9 zeigt vergleichend die Bindungssignale von CA V244C und CA V224C + A633 mit phosphoryliertem Rhodopsin*. Es ist auch hier kein signifikanter Unterschied der

Bindungssignale zu beobachten. Die Anfangssteigungen und die Amplituden der Signale sind etwa gleich. Die blitzlichtinduzierten Lichtstrebungssignale von CA P352C und CA P352C + A633 ergaben das gleiche Resultat (Daten nicht gezeigt).

Es wird deutlich, dass sterische Blockierung der C-terminalen Kuppel mit einem Molekül A633 allein, auch keine Hinweise auf den Interaktionsbereich gibt.

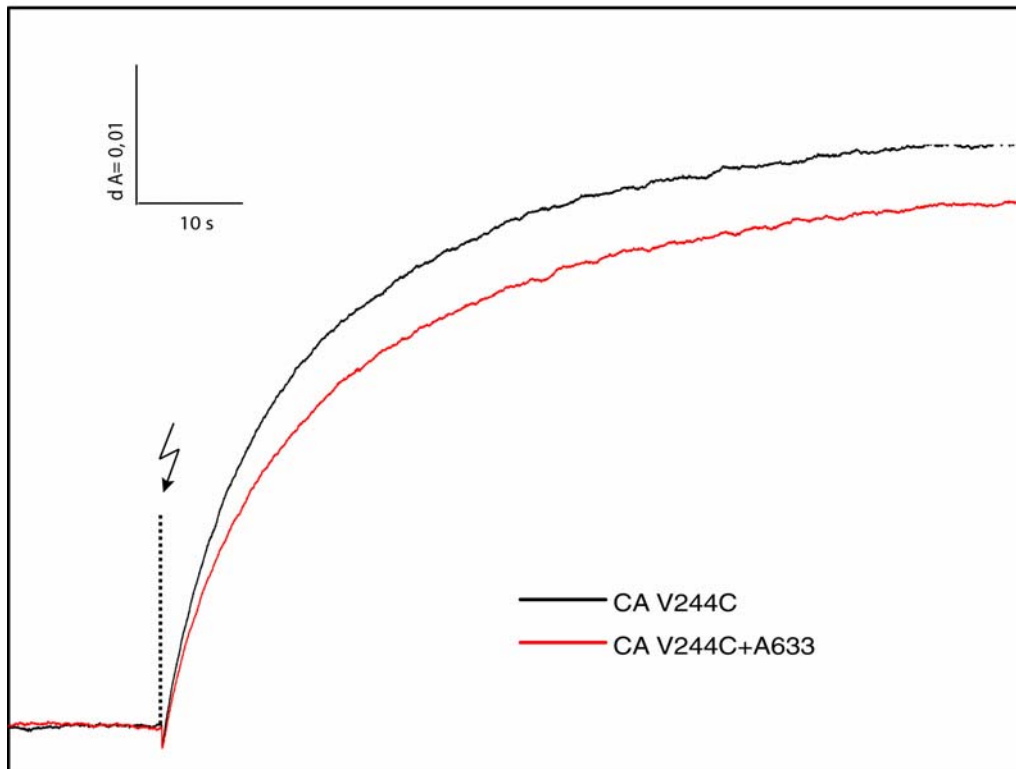


Abb. 3-9: Blitzinduzierte Lichtstrebungssignale von CA V244C und CA V244C + A633: Gezeigt sind die Bindungssignale von Arrestin CA V244C (schwarze Kurve) und CA V244C + A633 (rote Kurve) an die phosphorylierten Membranen. Es sind die Original-Bindungssignale abzüglich der Kontrolle (P-Rhodopsin* ohne interaktives Protein) gezeigt. Messbedingungen: analog zu Abbildung 3-1

3.5.3. Untersuchung der α -helikalen Region an der Außenseite der N-terminalen Kuppel

Smith und Mitarbeiter (1999) diskutieren einen primären Interaktionsbereich im α -helikalen Bereich der Aminosäuren 90 bis 130 von Arrestin. Um dieser These nachzugehen wurde A633 kovalent an die Arrestine CA S106C, CA A113C und CA P117C gebunden und hinsichtlich Bindung an phosphoryliertes licht-aktiviertes Rhodopsin überprüft. Abbildung 3-10 zeigt das Ergebnis der blitzlichtinduzierten Lichtstreusignale des sterisch blockierten α -helikalen Bereichs anhand des Beispiels von Arrestin CA S106C und CA S106C + A633 (siehe Abbildung 3-3 C). Markiertes wie auch unmarkiertes Arrestin bindet nach Lichtinduktion innerhalb von Sekunden an phosphorylierte Membranen, ersichtlich aus dem

ansteigenden Kurvenverlauf. Unterschiede in der Kinetik resultieren hauptsächlich aus Messungenauigkeiten, liegen jedoch im Rahmen der Fehlerrate von ca. 10 % der Meßmethode. Unterschiede in der Amplitudenhöhe sind nicht erkennbar.

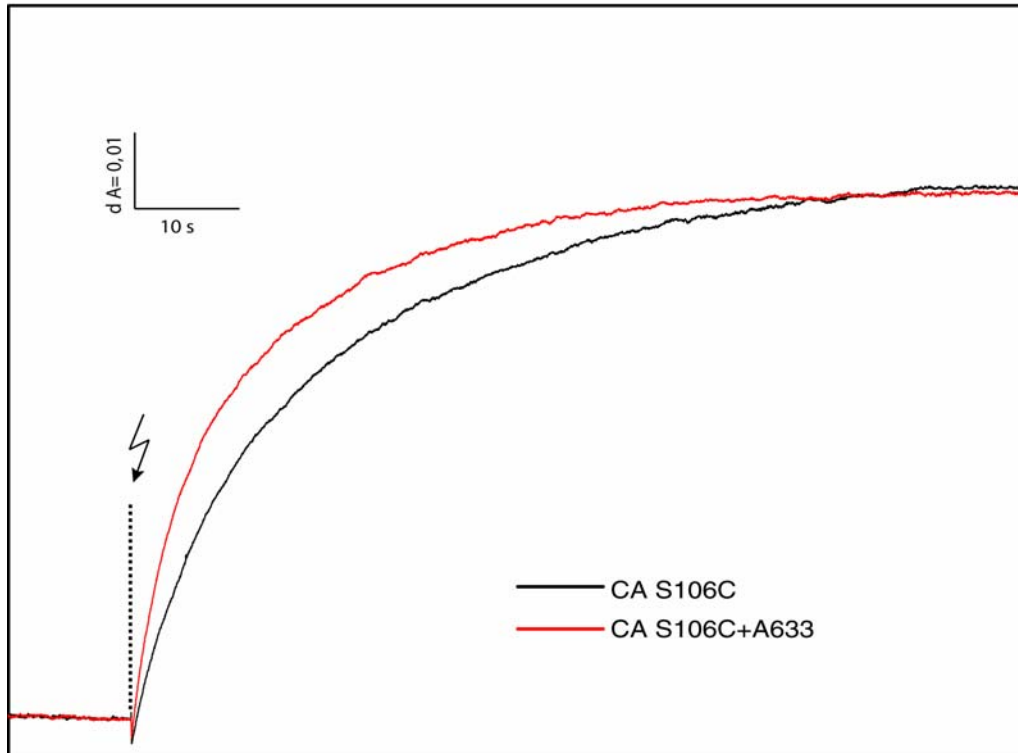


Abb. 3-10: Blitzinduzierte Lichtstreubindungssignale von CA 106C und CA S106C + A633: Gezeigt sind die Bindungssignale von Arrestin CA S106C (schwarze Kurve) und CA S106C + A633 (rote Kurve) an die phosphorylierten Membranen. Es sind die Original-Bindungssignale abzüglich der Kontrolle (P-Rhodopsin* ohne interaktives Protein) gezeigt. Messbedingungen: analog zu Abbildung 3-1.

Es konnte in den Bindungstests gezeigt werden, dass einfach markierte Proteine keinen Beitrag zu den postulierten Interaktionsbereichen leisten können.

3.6. KLS an mehrfach markierten CA Arrestinen

Nach Interpretation der vorhergehenden Experimente wurden alternative Modelle zur Interaktion in Betracht gezogen. Ein Modell beinhaltet, dass beide Arrestinkuppeln alternativ an Rhodopsin binden können. Eine weitere Vorstellung ist, dass beide Kuppeln gleichzeitig bei der Bindung involviert sind. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden in beide Domänen des CA-Arr je ein Cystein an den Positionen 60 und 244 eingeführt, so dass beide Kuppeln gleichzeitig blockiert werden. Abbildung 3-11 zeigt ein schematisches Modell von Arrestin CA S60C/V244C, in dem die Positionen 60 und 244 hervorgehoben sind.

Ergebnisse

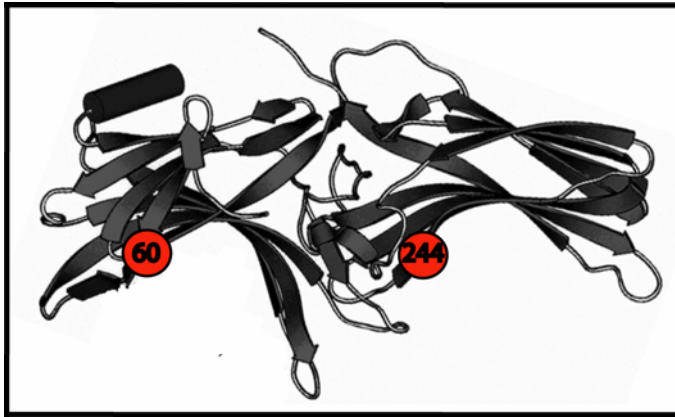


Abbildung 3-11: Dargestellt ist hier ein Modell von Arrestin. Die ausgetauschten Positionen von Arrestin CA sind rot hervorgehoben.

Markiertes und unmarkiertes CA S60C/V244C wurde anschließend hinsichtlich der Interaktion mit P-Rhodopsin* mittels KLS überprüft (Abb. 3-12).

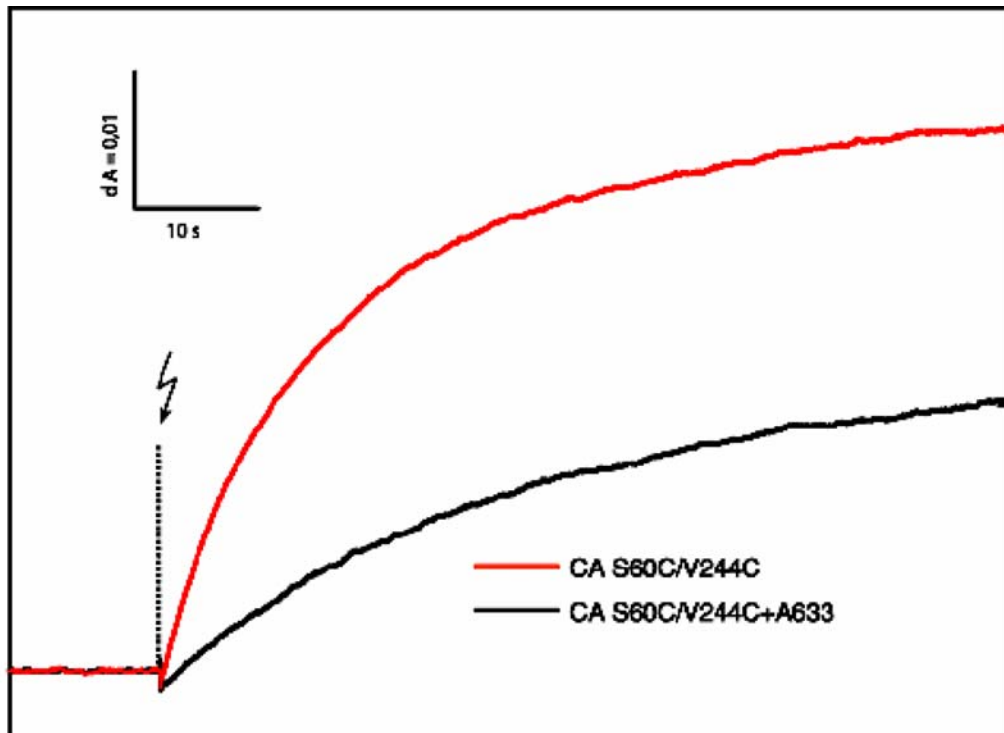


Abb. 3-12: Blitzlichtinduzierte Lichtstreuungssignale von CA S60C/V244C und CA S60C/V244C + A633. Dargestellt sind die Bindungssignale von CA S60C/V244C + A633 (schwarze Kurve) und CA S60C/V244C (rote Kurve) an die phosphorylierten ROS-Membranen. Der Zeitpunkt der Blitzbleichung ist mit 12 s festgelegt worden. Messbedingungen analog zu Abbildung 3-1.

Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied beider Bindungssignale. Wie die Amplituden der Abbildung zeigen, ist das Bindungssignal von markiertem CA S60C/V244C um circa 50% gegenüber CA S60C/V244C reduziert. Das Resultat wurde mit verschiedenen Proteinpräparationen mehrmals wiederholt und bestätigt. Ein Vergleich der Kinetiken der Anfangs-Steigungen zeigt einen deutlich langsameren Übergang des mit A633 markierten Arrestins zur Membran. Um dieses erste Ergebnis zu verifizieren, wurde Arrestin CA

Ergebnisse

S60C/V244C mit F-5-M markiert. Die Interaktion des markierten Proteins mit P-Rhodopsin* wurde in der KLS überprüft. Farbstoff F-5-M konnte die Reduktion des Bindungssignales nicht hervorrufen (Daten nicht gezeigt). Das A633, mit einem Molekulargewicht von ~1.3 kDa ist gegenüber allen anderen verwendeten Farbstoffen (siehe Tabelle 2-5) größer, und kann somit einen deutlich größeren Bereich des Arrestins abdecken und so die Zugänglichkeit für P-Rhodopsin* stärker reduzieren. Eine komplette Blockierung der Interaktion wurde jedoch nicht erreicht. Der Abfall der Intensität ist jedoch ein klarer Hinweis dafür, dass beide Kuppeln an der Bindung beteiligt sind.

Mit der Annahme, dass je ein A633 in beiden Kuppeln für eine vollständige sterische Blockierung nicht ausreicht, wurden jeweils zwei Moleküle A633 in die Kuppeln kovalent gebunden.

Hierzu wurde ein CA-Arr generiert, bei der die Aminosäuren an den Positionen 60, 169 (N-terminal) und 244, 352 (C-terminal) durch Cysteine gentechnisch ausgetauscht wurden (Abbildung 3-13).

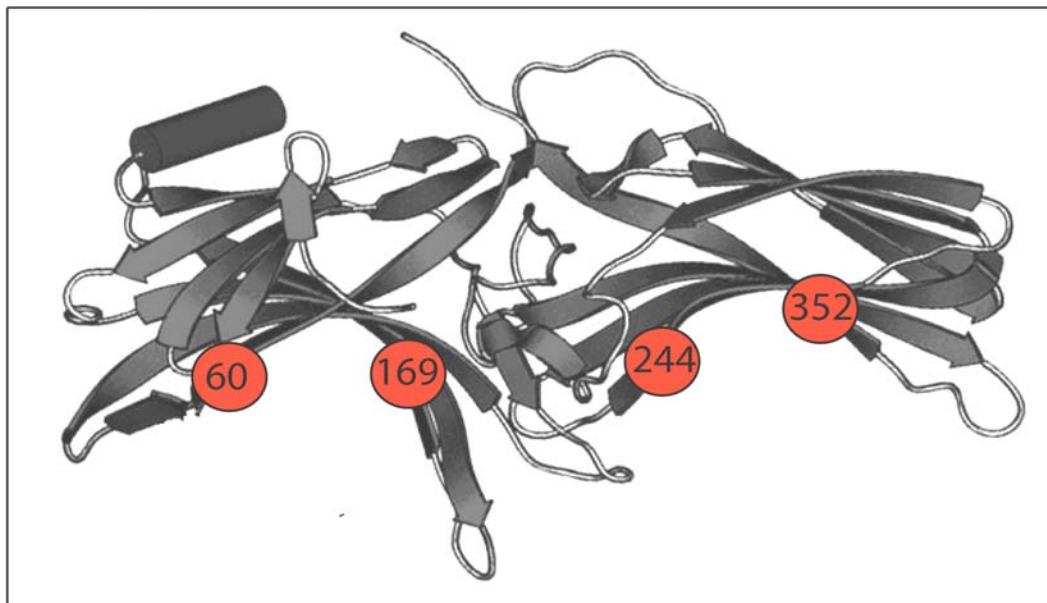


Abbildung 3-13: Dargestellt ist hier ein Modell von Arrestin. Die ausgetauschten Positionen von Arrestin CA sind rot hervorgehoben.

Dieses lösliche Arrestin CA S60C/S169C/V244C/P352C wurde mittels KLS auf Interaktion mit P-Rhodopsin* untersucht. Nachdem gezeigt wurde, dass dieses Protein aktiv ist, wurde es markiert und noch mal hinsichtlich Interaktion überprüft. Abbildung 3-14 zeigt die Bindungssignale des unmarkierten Arrestins im Vergleich zum modifizierten Protein und der Kontrolle (P-Rhodopsin* ohne interagierendes Protein). Während die Photoaktivierung des Rhodopsins zu einem Anstieg der Intensität des unmarkierten Arrestins führt (Abb. 3-14, rote

Ergebnisse

Kurve), ist ein Anstieg des Signals des vierfach-farbstoffmarkierten Arrestins nicht zu beobachten (Abbildung 3-14, blaue Kurve). Das heißt Arrestin CA S60C/S169C/V244C/P352C ist im Gegensatz zu CA S60C/S169C/V244C/P352C + A633 aktiv. Das markierte Arrestin zeigt gegenüber der Kontrolle (P-Rhodopsin) nur minimale Unterschiede in Kinetik und Amplitudenhöhe. Die Bindung des unmarkierten Arrestins CA S60C/S169C/V244C/P352C an P-Rhodopsin* verläuft wie bei allen anderen aktiven Arrestinen innerhalb der ersten Sekunden. Die vier Farbstoffmoleküle blockieren offensichtlich vollständig die Bindung des Arrestins zum P-Rhodopsin*. Dieses Resultat weist klar darauf hin, dass die Binderegion des Arrestins gleichermaßen in der N- und C-terminalen Kuppel zu finden ist.

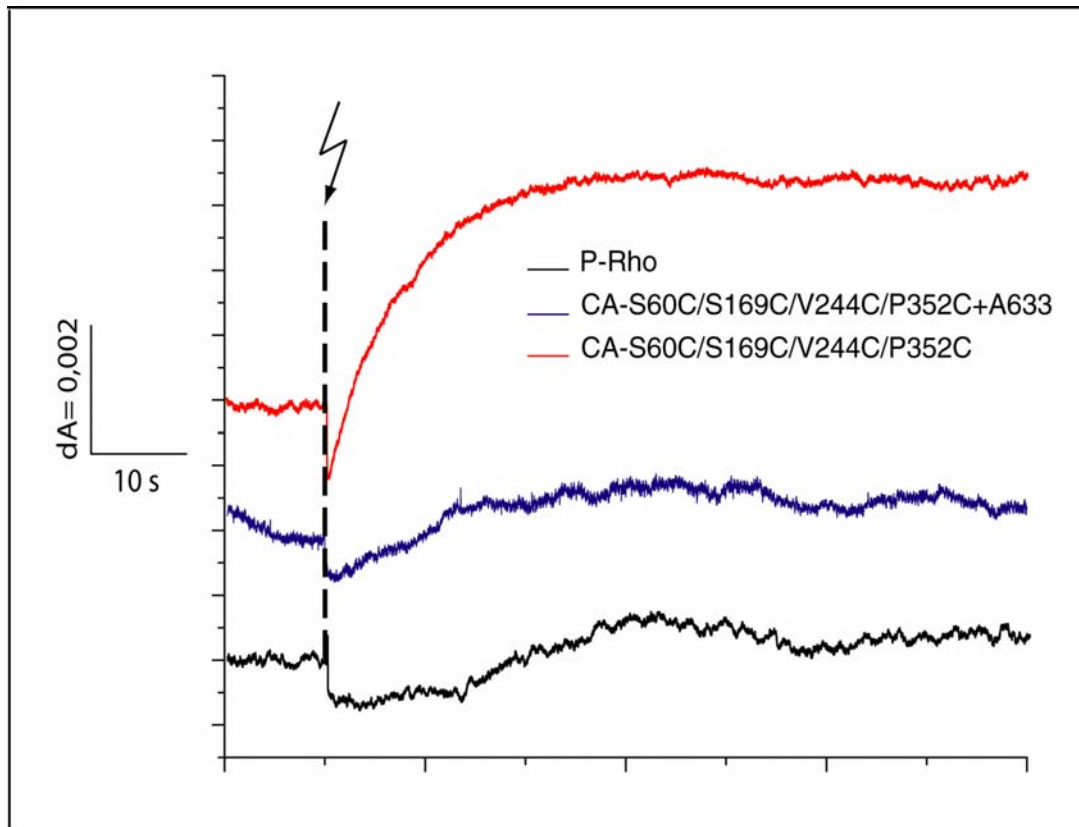


Abb. 3-14: Blitzlichtinduzierte Lichtstreubindesignale von CA S60C/S169C/V244C/P352C und CA S60C/S169C/V244C/P352C + A633 und P-Rhodopsin. Dargestellt sind die Bindungssignale von CA S60C/S169C/V244C/P352C + A633 (rote Kurve), CA S60C/S169C/V244C/P352C (blaue Kurve) und P-Rhodopsin als Kontrolle. Es sind die Original-Bindungssignale gezeigt. Messbedingungen: Der Zeitpunkt der Blitzbleichung ist mit 10 s festgelegt worden.. Messbedingungen analog zu Abbildung 3-1.

Es wurde gezeigt (3.5.2. und 3.5.3.), dass die einzeln markierten Arrestine (CA S60C bzw. CA S169C und CA V244C bzw. CA P352C) keinen Beitrag zur Interaktion mit Rhodopsin leisten können. Die Moleküle, die eingesetzt wurden, waren eventuell nicht groß genug, um eine sterische Blockierung hervorzurufen. Bei einem vorstellbaren Modell, bei dem beide

Kuppeln gleichzeitig im Bindungsmechanismus involviert sind, kann die Blockierung einer ganzen Domäne ausreichen, eine Bindung zum P-Rhodopsin* zu verhindern. Aus diesem Grund wurden Arrestine mit zwei Cysteinen pro Domäne, die in der Lage sind zwei Maleimide zu binden, generiert. In Abbildung 3-15 (A und B) sind die ausgetauschten Positionen schematisch dargestellt.

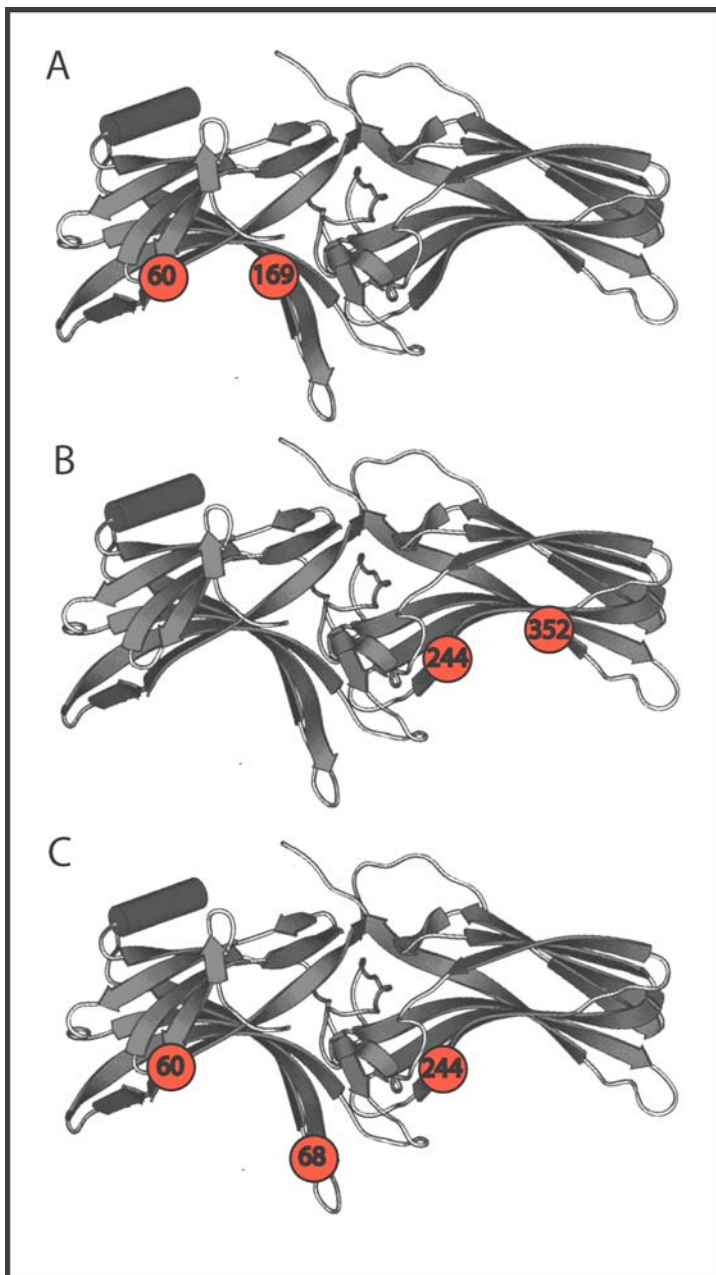


Abbildung 3-15: Dargestellt sind hier Modelle von Arrestinstrukturen. Die ausgetauschten Positionen von CA-Arr sind rot hervorgehoben.
A: CA S60C/S169C; B: CA V244C/P352C; C: CA S60C/G68C/V244C

Es wurden die Aktivitäten von CA S60C/S169C (N-terminale Kuppel) und CA V244C/P352C (C-terminale Kuppel), mittels KLS untersucht. Beide unmarkierten Arrestine können kein Bindungssignal hervorrufen und zeigen somit keine Aktivität. Abbildung 3-16

Ergebnisse

(schwarze und rote Kurve) zeigt die Kinetiken der Bindungssignale der nicht aktiven Proteine CA S60C/S169C und CA V244C/P352C. Somit können sie nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

Parallel zum Arrestin CA G68C (siehe Kapitel 3.3.) wurde ein weiteres Protein mit drei Austauschungen exprimiert (CA S60C/G68C/V244C), was nach Kopplung von Farbstoffen, den ganzen inneren Bereich des Arrestins abdecken soll. Abbildung 3-16 zeigt die Bindungssignale von CA S60C/G68C/V244C (blaue Kurve).

Sowie bereits CA G68C zeigt dieses Protein keine Interaktion mit P-Rhodopsin* in der KLS und wurde ebenfalls für nachfolgende Untersuchungen nicht eingesetzt.

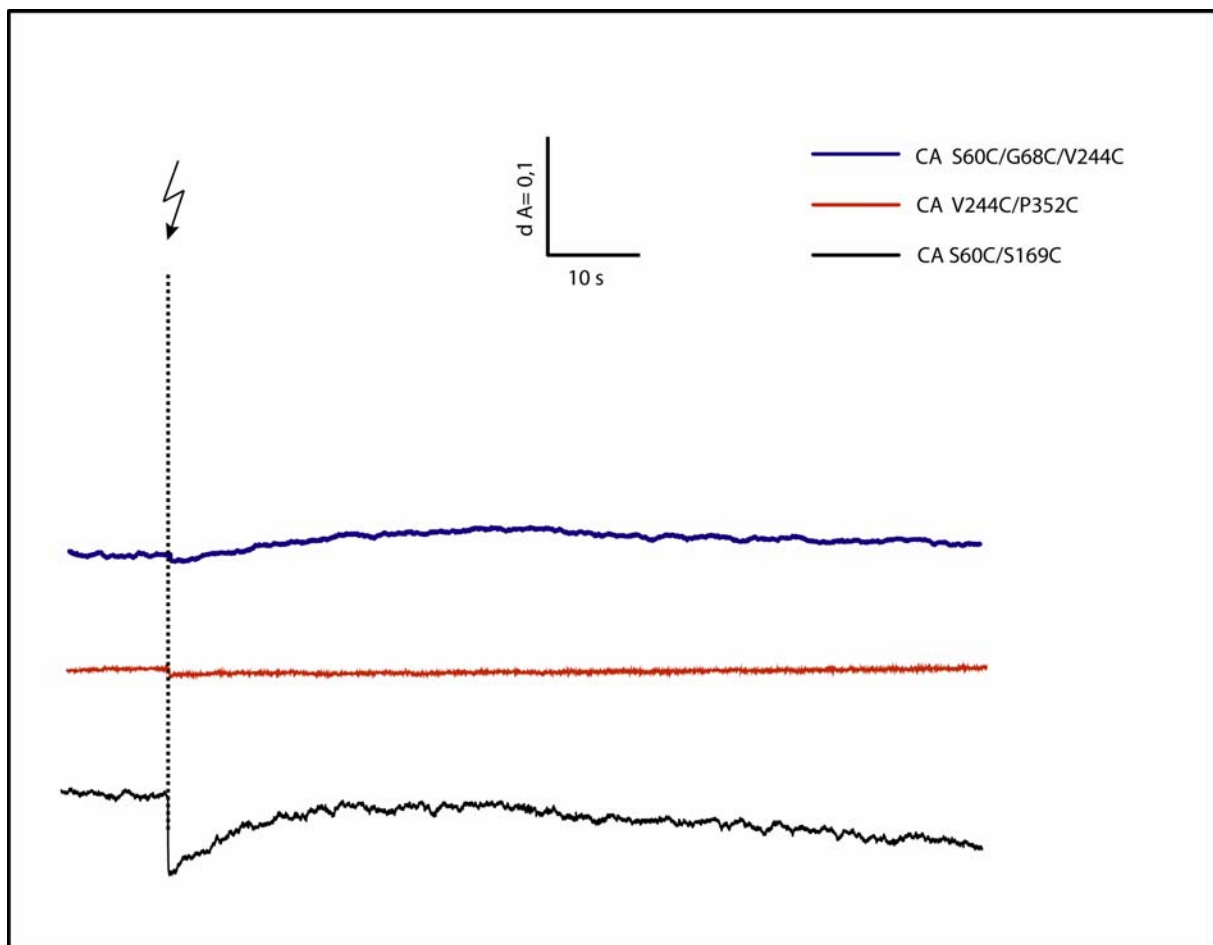


Abb. 3-16: Blitzlichtinduzierte Lichtstreuungssignale von CA S60C/G68C/V244C, CA S60C/S169C, CA V244C/P352C und P-Rhodopsin*. Messbedingungen: Der Zeitpunkt der Blitzbleichung ist mit 11 s festgelegt worden. Die Messbedingungen sind analog zu Abbildung

In Tabelle 3-3 sind zusammenfassend die Bindungseigenschaften aller markierter und unmarkierter Arrestine mit A633 an P-Rhodopsin* noch einmal veranschaulicht zusammengefasst. Eine Reduktion (+/-) bzw. Funktionsverlust (-) nach Bindung von A633 in

Ergebnisse

den entsprechenden Bereichen zeigen, dass diese Region bzw. Regionen für die Interaktion zu P-Rhodopsin* von Bedeutung sind.

Bindung an licht-aktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin (P-Rhodopsin*)		
Arrestin	Ohne A633	Mit A633
Rekombinantes Arrestin	+	+
CA = (C63A/C128A/C143A)	+	+
CA S60C	+	+
CA G68C	-	nicht untersucht
CA S106C	+	+
CA A113C	+	+
CA P117C	+	+
CA S169C	+	+
CA V244C	+	+
CA P352C	+	+
CA S60C/S169C	-	nicht untersucht
CA V244/P352C	-	nicht untersucht
CA S60/V244C	+	+/-
CA S60C/G68C/V244C	-	nicht untersucht
CA S60C/S169C/V244C/P352C	+	-

Tabelle 3-3: Bindung von Arrestin an lichtaktiviertes phosphoryliertes Rhodopsin
 Dargestellt sind alle generierten Arrestine und deren Bindung vor und nach Modifikation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 633 Maleimid (A633), wobei eine Bindung an P-Rhodopsin* mit einem Plus (+) gekennzeichnet wurde. Ein Minuszeichen (-) sagt aus, dass es zu keiner Bindung zum P-Rhodopsin* kommt. Plus/Minus (+/-) stellt reduzierte Bindung dar.

3.7. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Eine alternative Methode, um Bindungseigenschaften von Arrestin an P-Rhodopsin* zu untersuchen, bietet die FCS. Basierend auf der Korrelationsanalyse von Intensitätsfluktuationen fluoreszierender Moleküle, angeregt durch Laserlicht, ist es möglich Aussagen über Diffusion (Medina and Schwille, 2002) und damit letztendlich über Protein/Protein-Wechselwirkungen von Arrestin zu P-Rhodopsin* zu machen. Im Fokus steht dabei die Diffusionszeit τ_D der Moleküle, die durch das konfokale Volumen diffundieren. Dabei gilt, je kleiner die Masse eines Teilchen, desto schneller diffundiert es nach Eintritt in das beobachtete, konfokale Volumen wieder aus.

Kommt es also zu einer Bindung von markiertem Arrestin zum P-Rhodopsin* nach Lichtaktivierung, sollte die Diffusionszeit des markierten Proteins, aufgrund der Anbindung an die erheblich größeren Membranfragmente, deutlich verlangsamt werden.

Ergebnisse

Vorraussetzung für gutes Signal/Rausch-Verhältnis sind geringe Konzentrationen (nmol), hohe molare Absorptionskoeffizienten ($\epsilon = 159.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und gute Quantenausbeute (50-60 %) der Fluoreszenzfarbstoffe.

Der Einsatz an markiertem Protein lag bei ca. 100 nmol Endkonzentration. Die Messzeit betrug ca. 30 min. Angeregt wurde der Farbstoff A633 durch einen Krypton/Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 640 nm. Durch Autokorrelation der Daten kann die Diffusionszeit der gemessenen Proben errechnet werden. Diese Funktion wird im Korrelator errechnet, indem die Intensitäten des Streulichts zu einer bestimmten Zeit mit der zu einer späteren Zeit multipliziert werden. Diese Operation wird oft wiederholt, die Ergebnisse werden aufsummiert und durch die Anzahl dieser Operationen geteilt.

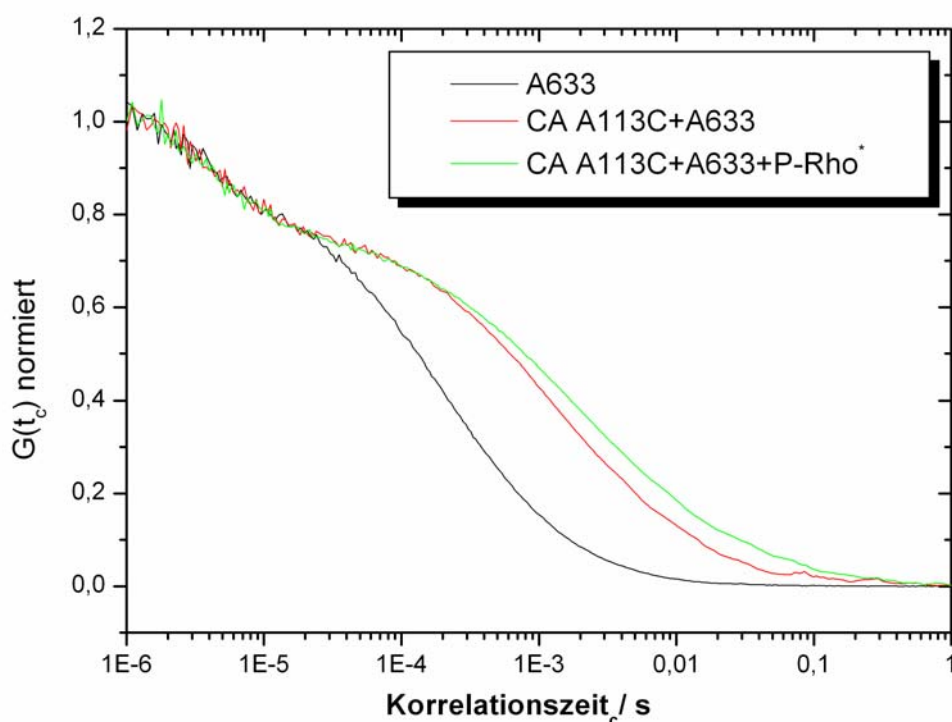


Abb. 3-17: FCS-Spektrum von A633, Arrestin CA A113C + A633 und CA A113C + A633 + P-Rhodopsin*. Dargestellt ist hier das autokorrelierte, normierte Spektrum vom Farbstoff A633 (schwarze Kurve), Arrestin CA A113C + A633 (rote Kurve) und CA A113C + A633 + P-Rhodopsin*.

In Abbildung 3-17 ist ein normiertes autokorreliertes FCS-Spektrum dargestellt. Nanomolare Mengen A633 in Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 wurden als Kontrolle eingesetzt (schwarze Kurve). Das Arrestin CA A113S wurde mit fünffachen molaren Überschuss A633 2 h bei RT im Dunkeln markiert, mittels Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-25) vom überschüssigen Farbstoff getrennt und in einer nanomolaren Konzentration in der FCS eingesetzt (rote Kurve). Desweiteren wurde ein tausendfacher molarer Überschuss an P-Rhodopsin in

Ergebnisse

Diskmembranen mit A633 markiertem Arrestin CA A113C gemischt und unmittelbar vor der FCS-Messung durch Laserlicht (500 nm) aktiviert.

Die verrauschten, übereinander liegenden Kurven im Anfangsbereich sind auf Photophysik zurückzuführen und für dieses Experiment nicht weiter von Bedeutung. Nach kurzer Zeit ist ein sigmoider Verlauf der Kurven zu erkennen. Auf halber Höhe des linearen Bereiches kann man die Diffusionszeit der Proben ablesen. Das Spektrum zeigt eine deutliche Zunahme der Diffusionszeit des Arrestins + A633 ($\tau_D = 1,43 \cdot 10^{-3}$ s, rote Kurve) gegenüber dem reinen Farbstoff A633 ($\tau_D = 2,56 \cdot 10^{-4}$ s, schwarze Kurve). Eine noch stärkere Zunahme der Diffusionszeit erkennt man bei CA A113C + P-Rhodopsin* + A633 ($\tau_D = 2,1 \cdot 10^{-3}$ s, grüne Kurve). In Tabelle 3-4 sind die Diffusionszeiten der gemessenen Proben noch einmal veranschaulicht zusammengefasst.

Die zunehmende Diffusionszeit des Arrestin CA A113C + P-Rhodopsin* + A633 kann mit der Bindung des Arrestins an die Membranen erklärt werden. Allerdings erscheint die beobachtete Zunahme der Diffusionszeit zu gering. Man würde eine deutlich langsamere Diffusionszeit, aufgrund der enormen Größe der Membranen, erwarten. Eine Verifizierung des Ergebnisses steht hier noch aus. Insgesamt wird aber auch in diesem Experiment deutlich, dass eine sterische Blockierung der Bindung des Arrestins zum P-Rhodopsin* durch Kopplung eines Moleküls A633 nicht erreicht werden kann. Das Ergebnis der FCS ist also mit dem der KLS konsistent.

Einzelmolekül	Diffusionszeit τ_D
A633	$2,56 \cdot 10^{-4}$ s
Arrestin CA A113C + A633	$1,43 \cdot 10^{-3}$ s
Arrestin CA A113C + P-Rhodopsin* + A633	$2,1 \cdot 10^{-3}$ s

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Diffusionszeiten

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, Erkenntnisse zur Interaktion und Bindungsmechanismus von visuellem Arrestin an Rhodopsin zu erlangen. Grundlage hierfür war zum einen die Kristallstruktur von Arrestin (Granzin et al., 1998) und zum anderen aus Literaturdaten bekannte Bindungsmodelle, auf deren Basis eine Arrestin Mutagenese durchgeführt wurde. Es wurde überprüft, ob die Bindung an der N-terminalen (Granzin et al., 1998) bzw. N- und C-terminalen Kuppelinnenseite (Pulvermüller et al., 2000) oder etwa außerhalb der Kuppeln (Smith et al., 1999) stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die konkaven Seiten der N- bzw. C-terminalen Domäne, Bereiche der N-terminalen α -Helix und ein Loop-Bereich zwischen beiden Domänen sterisch blockiert, so dass sie für die Interaktion mit Rhodopsin nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die generierten Arrestine wurden zunächst auf ihre Funktionalität hin mittels KLS überprüft. Anschließend wurden Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch, kovalent an die Cysteine der Arrestine gebunden und in Interaktionsversuchen mit Rhodopsin eingesetzt. Zur Herstellung von Arrestin wurde die, in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte heterologe Expression in *S. cerevisiae*, sowie die Reinigung des rekombinanten Proteins über affinitätschromatographischen Methoden gewählt.

4.1. Substitution der wildtypischen Cysteine 63, 128, 143 zu Alanine

Die wildtypische Aminosäuresequenz von Arrestin wies drei Cysteine (an Positionen 63, 128, 143) auf, deren Zugänglichkeit bei der Modifikation der Proteine durch Fluoreszenzmaleimide nicht auszuschließen war. In vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass unter bestimmten Reaktionsbedingungen die natürlichen Cysteine zugänglich sind (Palczewski et al., 1992b). In der Raumstruktur sind diese Cysteine zwar nicht an der Oberfläche lokalisiert, sie konnten jedoch mit DTNB-Molekülen (Ellmann's Reagenz: 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) markiert werden (Hargrave et al., 1999). In dieser Arbeit wurden Fluoreszenzmaleimide für die Modifikation der Arrestine gewählt, da sie zum einen ein Diffundieren in das Protein, aufgrund ihrer Größe (0,5-1,3 kDa; \varnothing ca. 15 Å), erschweren, zum anderen laut Literaturdaten eine hohe Spezifität besitzen sollten (Falke et al., 1988). Es sollte gewährleistet werden, dass nur die Zielaminosäure modifiziert wird. Es zeigte

sich aber in Markierungsexperimenten (Diplomarbeit, 2001), dass alle drei wildtypischen Cysteine zugänglich waren. Hier wurde die Flexibilität der Arrestin-Struktur deutlich erkennbar. Es bestand deshalb die Notwendigkeit, die Cysteine 63, 126 und 143 gegen Aminosäuren auszutauschen, die keine Sulfhydrylgruppe besitzen und daher keine spezifischen Wechselwirkung mit Maleimiden eingehen können.

Die Cysteine bilden im nativen Arrestin keine Cysteinbrücken aus (Granzin et al., 1998) und scheinen so keine essentielle Bedeutung für das Protein zu haben. Ein Austausch der Cysteine durch Serine erschien zunächst sinnvoll, da die Größe von Serin der des Cysteins in etwa entsprach. In Bindungsstudien zeigte sich aber, dass Arrestine mit Serin-Substitutionen keine Aktivität zeigten (Diplomarbeit, 2001). Ein Grund hierfür könnten die reaktiven Hydroxylgruppen der Serine sein, die möglicherweise intramolekulare Wechselwirkungen eingehen und somit die strukturelle Integrität des Proteins verändern. Ein weiterer Vorschlag, die wildtypischen Cysteine mit Alaninen zu substituieren, wurde umgesetzt. Die Alanine bewirken keine Veränderung der Funktionalität des Arrestins, wie in den KLS-Studien gezeigt werden konnte (Kapitel 3.1.). Alle anschließend generierten Arrestine wurden auf der Basis dieses Arrestins (CA-Arr = C63A/C128A/C143A) hergestellt.

4.2. Expression von CA-Arrestinen mit Cystein- Substitutionen in *S. cerevisiae* und deren Reinigung

Mehrere Versuchsreihen haben gezeigt, dass unter Verwendung des Vektors pYEX-BX, die Expression von Arrestinen mit dem Expressionsstamm F11 α in SC leu⁻ Medium plus 2 % Galaktose, sowie Induktion mit 0,5 mM CuSO₄ bei einer OD₆₀₀ 5 für 5 h zu optimalen Resultaten führt (Diplomarbeit, 2001). Dadurch wurde in den meisten Fällen ein ausreichender Anteil an rekombinantem Protein als Ausgangsmaterial für die Proteinreinigung exprimiert.

Durch Einsatz von 200 mM Kaliumphosphatpuffer konnte eine Stabilisierung der Arrestine erreicht werden, was durch Zusatz von Proteaseinhibitoren noch unterstützt wurde. Proteaseinhibitoren sind essentiell für den Zellaufschluß, da Hefeproteasen generell ein erhebliches Problem bei der Expression rekombinanter Proteine darstellen (Emr, 1990; Jones, 1991; Moehle et al., 1987).

Die Reinigung aller Arrestine erfolgte über eine Affinitätschromatographie mittels Strep-tag-II. Die Strep-tag-II Affinitätsreinigung macht sich eine, der Interaktion von Streptavidin und Biotin nachempfundenen Bindung zu Nutze. Die Streptavidin-Biotin Affinität ist in ihrer

Stärke mit der von Antigen und Antikörper vergleichbar. Der Strep-tag-II ist ein Peptid bestehend aus den Aminosäuren: „NH₂-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-COOH“ und soll das Biotin nachahmen. StrepTaktin ist eine Streptavidin Variante und wurde speziell zur Bindung dieses Peptids generiert (Voss & Skerra, 1997). Die Isolierung der exprimierten Arrestine durch Affinitätschromatographie über den Strep-tag-II verlief recht erfolgreich. Verluste der Proteine sind im Wesentlichen auf Proteasen zurückzuführen, trotz Einsatz einer Reihe von Proteaseinhibitoren beim Zellaufschluß, als auch bei der Reinigung. Fast alle Arrestine konnten ähnlich erfolgreich mit Hilfe des Strep-tag-II isoliert werden, was einen weiteren Reinigungsschritt mittels IMAC, HIC oder Ionenaustausch-Chromatographie nicht mehr notwendig machte. Ausbeuten von ca. 1 mg Protein pro l Medium wurden erreicht und waren damit ausreichend für anschließende Bindungsexperimente (siehe Kapitel 3.2.2.). Es konnten jedoch nicht alle generierten Arrestine in ausreichenden Mengen und aktiver Form gewonnen werden (Tabelle 3-1). Unverständlicherweise konnte CA S60C/S169C/V244C/P352C im Gegensatz zu CA S60C/S169C und CA V244C/P352C stabil exprimiert werden, was eventuell auf Mutation im Vektor pYEX-BX zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher ist aber eine Varianz der Expressionsraten, die hier beobachtet wurde. Eine Wiederholung der Auslese von Hefeeinzelkolonien mit diesen Konstrukten, um Klone mit besseren Expressionsraten zu isolieren, sollte zu größeren Expressionsraten und stabilem Protein führen. Der Instabilität der Arrestine CA G68C und CA S60C/G68C/V244C könnten ähnliche Probleme zugrunde liegen, oder aber Glycin 68 besitzt eine essentielle Funktion für die Proteinstabilität des Arrestins. Unterschiedliches Verhalten bezüglich der Löslichkeit der exprimierten Arrestine ist sicherlich auf den Einfluss der ausgetauschten Aminosäuren zurückzuführen. Auffällig war, dass Arrestine, die eine geringe Expressionsrate aufwiesen, nicht stabil isoliert werden konnten. Diese Arrestine zeigten auch keine Bindungseigenschaften mehr zu P-Rhodopsin* (Kapitel 3.3. und 3.6.).

Beide Banden liegen oberhalb der 50 kDa Markerbande. Die Anwesenheit des N-terminalen Strep-tag-II und des C-terminalen 6x His-tag bewirken eine Retardierung zu höheren Molekulargewichten. Eine Erhöhung des SDS-Gehaltes im Gel auf 1 % führt zu einer Verschiebung der Arrestin Bande zu 48 kDa (Broekhuysse & Bessems, 1985), dies korreliert mit dem von H. Kühn ermittelten Molekulargewicht des “48k-Proteins“. Hierbei ist anzunehmen, dass die zwei Banden durch unterschiedliche Beladung der Proteine mit SDS bedingt sind (Abbildung 3-2., Spur E2). Es wurden zwar noch Phosphorylierungen und auch Glycosylierungen diskutiert (Banga et al., 1987; Weyand & Kühn, 1990), massen-

spektrometrische Untersuchungen (Ohguro et al., 1994; Buczylo & Palczewski, 1993) konnten diese jedoch nicht bestätigen.

4.3. Modifikation interaktiver Arrestine

Bei den in dieser Arbeit verwendeten reaktiven Gruppen der Farbstoffe handelte es sich ausnahmslos um Maleimide, die bereits in einer Reihe von Experimenten erfolgreich eingesetzt wurden. So wurde Fluorescein-5-maleimid (F-5-M) unter anderem schon für die Untersuchung der Struktur vom transmembranen Glykoprotein H-2K^k (Cardoza et al., 1984) oder für die Ermittlung der zwei verschiedenen Konformationen von Aktin (Konno and Morales, 1985) eingesetzt. Die sulfhydryl-reaktiven Gruppen der Fluoreszenzfarbstoffe zeichneten sich durch hohe Selektivität und, nach erfolgter Reaktion mit Cystein unter physiologischen Bedingungen, große Stabilität aus (siehe Kapitel 3.4.). Bei erhöhten pH-Werten jedoch nimmt die Stabilität der Thio-Ether-Bindung ab (persönliche Mitteilung Dr. J. Fitter). Alexa 633 Maleimid (A633) und F-5-M zeigten unter den verwendeten Bedingungen die reproduzierbarsten Ergebnisse. Allerdings zeigte sich, dass die Molekülgröße von F-5-M nicht ausreichte, um signifikante sterische Effekte bei den Bindungsstudien hervorzurufen. Reaktionen des Proteins mit Cy 5 und Atto 655 waren unspezifisch und schlecht reproduzierbar. Für die selektive Blockierung der ausgewählten Bereiche im Arrestin wäre auch ein Einsatz weiterer reaktiver Moleküle denkbar. Die benutzten Maleimide hatten jedoch den Vorteil, Fluoreszenzeigenschaften zu besitzen. Für die kinetischen Lichtstreuexperimente war zwar nur die Größe der Moleküle und nicht die Fluoreszenz entscheidend, jedoch brachte der Extinktionskoeffizient von A633 ($\epsilon = 159000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Möglichkeit mit sich, markierte Proteine in der Fluoreszenz-Spektroskopie einzusetzen. Zum einen konnte der Markierungsgrad von Arrestin recht genau bestimmt werden (Kapitel 3.4.), zum anderen konnte das markierte Protein, aufgrund des hohen Extinktionskoeffizienten des Farbstoffes, in der Einzelmolekülspektroskopie (FCS, Kapitel 3.7.) eingesetzt werden.

4.4. Bindungsstudien

Erstmals wurde die Bindung zwischen Arrestin und licht-aktiviertem phosphoryliertem Rhodopsin von Kühn et al., (1984) beschrieben. Kinetische Analysen dieser Komplexbildung erfolgten später durch Schleicher et al., (1989).

Es wurde ein Modell angenommen, wobei der N- und C-Terminus zur Stabilisierung einer inaktiven Konformation von Arrestin interagieren (Gurevich et al., 1994; Gurevich & Benovich, 1993a; Wilson & Copeland, 1997; Palczewski, 1994a; Palczewski et al., 1991c; Gurevich, 1998). Allerdings zeigte die Raumstruktur von Arrestin (Granzin et al. 1998) eine große Flexibilität am C-Terminus, und kann deshalb zu dem Modell von Gurevich und Palczewski keinen Beitrag leisten. Eine Änderung von der inaktiven zur aktiven, bindenden Form von Arrestin soll durch Interaktion der Aminosäuren 158 bis 185 (Gurevich & Benovich, 1993a) mit dem phosphorylierten C-Terminus von Rhodopsin erfolgen. Dieser soll den C-Terminus von Arrestin „rausschieben“ (Ohguro et al., 1994, Palczewski, 1994b). Wie Gurevich 1994 zeigen konnte, soll das auch Heparin und Inositolhexaphosphat bewirken können. Dem Arginin 175 als Verbindung zwischen den C- und N-terminalen Domänen und den drei Aspartaten (30, 296, 303) als Interaktionspartner kommt eine Rolle bei der Phosphorylierungserkennung als sensitiver Trigger zu (Gurevich, 1998; Vishnievskiy et al., 1999). Untermuert wurde diese Hypothese durch die publizierte Raumstruktur von Granzin, (1998).

In dieser Arbeit wurde angenommen, dass aufgrund der kuppelartigen zwei Domänen-Struktur, Arrestin das Rhodopsin abschirmt und somit weitere Interaktionen der cytoplasmatischen Schleifen von Rhodopsin mit Transducin sterisch verhindern kann.

Arrestine wurden deshalb in verschiedenen Bereichen modifiziert und in der KLS untersucht, um zu testen, ob die Bindung an der Innenseite, oder etwa außerhalb der Kuppeln, wie von Smith und Mitarbeiter (1999) diskutiert wird, stattfindet.

4.5. Kinetische Lichtstremessungen (KLS) von Arrestin-Rhodopsin-Komplexen

Für die kinetische Lichtstreuung war der Brechungsindex n von enormer Bedeutung. Nach der von Hofmann und Schleicher, (1987) entwickelten Rayleigh-Debye Näherung für die Intensität des gestreuten Lichtes im Streuwinkel θ für die Arrestinbindung an den Rezeptor geht der Brechungsindex n quadratisch in die Gleichung ein, weshalb durch eine Veränderung des Brechungsindex nicht mehr angenommen werden kann, dass die Proteinbindung nur noch ein Effekt auf das Volumen und damit auf die Masse besitzt. Grundvoraussetzung war deshalb, dass sich das System durch den bloßen Zusatz von Fluoreszenzfarbstoff nicht änderte. Nur die Proteinbindung, und damit der Massezuwachs der Diskmembranen sollte die Veränderung der Intensität des gestreuten Lichts bewirken, wie in Kapitel 3.5. beschrieben wurde.

4.5.1. Interaktion der N- bzw. C-terminalen Domäne mit P-Rhodopsin*

Dem N- terminalen oder C-terminalen Bereich von Arrestin wird eine Bindungsstelle mit den cytoplasmatischen Schleifen von Rhodopsin zugewiesen, wobei die Erkennung des licht-aktivierten Rhodopsins eine entscheidende Rolle spielt. Diese Bindung soll bei Arrestin im Bereich der Aminosäuren 1-191 stattfinden (Gurevich & Benovich, 1993a; Krupnick et al., 1994).

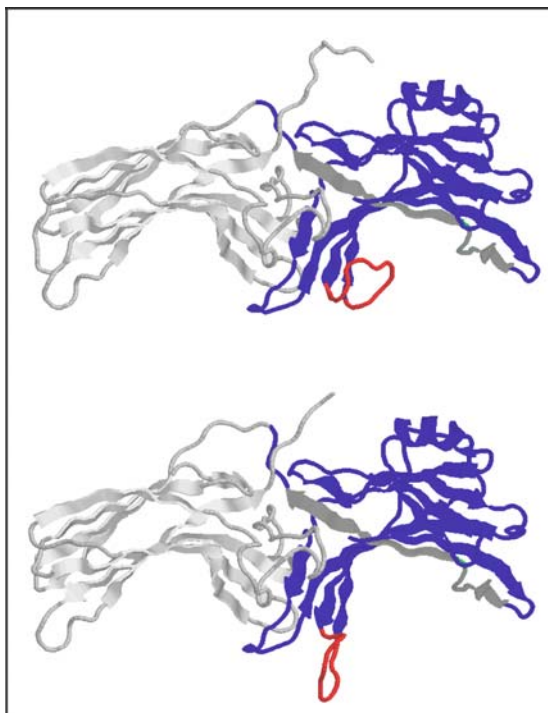


Abbildung 4-1 : Offene und geschlossene Arrestinstruktur (verändert nach Granzin et al., 1998): Oben dargestellt ist die, aus dem Kristall bekannte offene Konformation von Arrestin (Molekül B) und unten Molekül A, die geschlossene Konformation. Die Schleife, die in beiden Strukturen eine andere Konformation einnimmt, ist rot gezeichnet. Desweiteren ist die N-terminale Domäne in blau und die C-terminale Domäne in rot gezeichnet.

Es wird postuliert, dass die offene Konformation (siehe Abb. 4-1, unten) die bindungsfähige Form darstellt. Die Schleife zwischen den beiden Kuppeln im Arrestin richtet sich nach Bindung mit Rhodopsin in die N-terminale Kuppel (rot dargestellt, Abb. 4-1, oben) und hält so das P-Rhodopsin* fest. Die N-terminale Domäne soll ausreichen, um eine Interaktion von Rhodopsin zum Transducin sterisch zu verhindern (Granzin et al., 1998). Dem C-terminalen Bereich von Arrestin wird eine sekundäre Bindestelle mit hydrophobem Charakter zugewiesen. Diese soll erst nach Phosphorylierungserkennung durch jeweils nachfolgende Änderung zweier verschiedener intramolekularer Interaktionen exponiert werden (Gurevich & Benovich, 1993a; Gurevich, 1998). Allerdings ist eine direkte Bindung der C-terminalen Domäne an P-Rhodopsin nicht auszuschließen (persönliche Mitteilung J. Granzin). Erhärtet wurde diese These durch Kompetitionsmessungen mit Arrestin-Peptiden, die mehrere Regionen im Arrestin ausmachen konnten, die bei der Bindung involviert sind, darunter auch die C-terminale Domäne von Arrestin. Lichtstreuung konnte die Beteiligung einer Bindung der C-terminalen Kuppel zum P-Rhodopsin zeigen (Schröder et al., 2002).

In Abbildung 4-2 sind die möglichen Bereiche der Interaktionen schematisch dargestellt. Es wird sichtbar, dass die Dimensionen beider Domänen ausreichen, um vollständig die Interaktionsbereiche von Rhodopsin abzuschirmen

Eine Untersuchung der Bindung von CA-Arr mit einzelnen Cystein-Substitutionen in den postulierten N- bzw. C-terminalen Binderegionen an P-Rhodopsin* erfolgte mittels zeitabhängiger Lichtstreuung *in vitro* (Schleicher & Hofmann, 1987). Zunächst musste die Bindung dieser unmarkierten Arrestine zu P-Rhodopsin* überprüft werden. Die Ergebnisse der Lichtstreuung zeigten, dass die Arrestine CA S60C, S169C (N-terminal) bzw. CA V244C, CA P352C (C-terminal) die gleichen Bindungseigenschaften wie rekombinantes Arrestin besitzen (Abbildung 3-4). Sie waren in der Lage ein Bindungssignal zu generieren, was dem wildtypischem Arrestin in etwa entsprach. Allerdings ist eine genaue Aussage über die Affinität der generierten Arrestine zum P-Rhodopsin* nicht möglich, da die Konzentrationsbestimmung nach Bradford nur quantitative Aussagen über das Protein liefern kann, somit gehen Abbauprodukte und Protein-Verunreinigungen mit in die Bestimmung ein, tragen aber nichts zum Bindungssignal bei. Da die Amplitudenhöhen konzentrationsabhängig sind, konnten sie nicht miteinander korreliert werden. Somit war eine Bestimmung der Zeitkonstanten τ nicht möglich.

Insgesamt machte eine sterische Blockierung der N- oder C-terminalen Kuppel durch Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffs keine Eingrenzung der interaktiven Regionen von Arrestin möglich. Eventuell sind die Interaktionsbereiche des Arrestins an anderen Positionen im

Protein zu suchen, oder die Größe der Farbstoffe ist nicht ausreichend, um sterische Blockierung hervorzurufen. Dies könnte der Fall sein, wenn sich der interagierende Bereich von Arrestin über weite Regionen zieht.

Durch die freie Drehbarkeit des Farbstoffs um die Thio-Ether-Bindung konnte eine definierte Orientierung im Protein nicht bestimmt werden. So ist eine Verdrängung des Farbstoffs in unrelevante Regionen durch die Interaktion des Arrestins mit den phosphorylierten Loops des Rhodopsins durchaus denkbar.

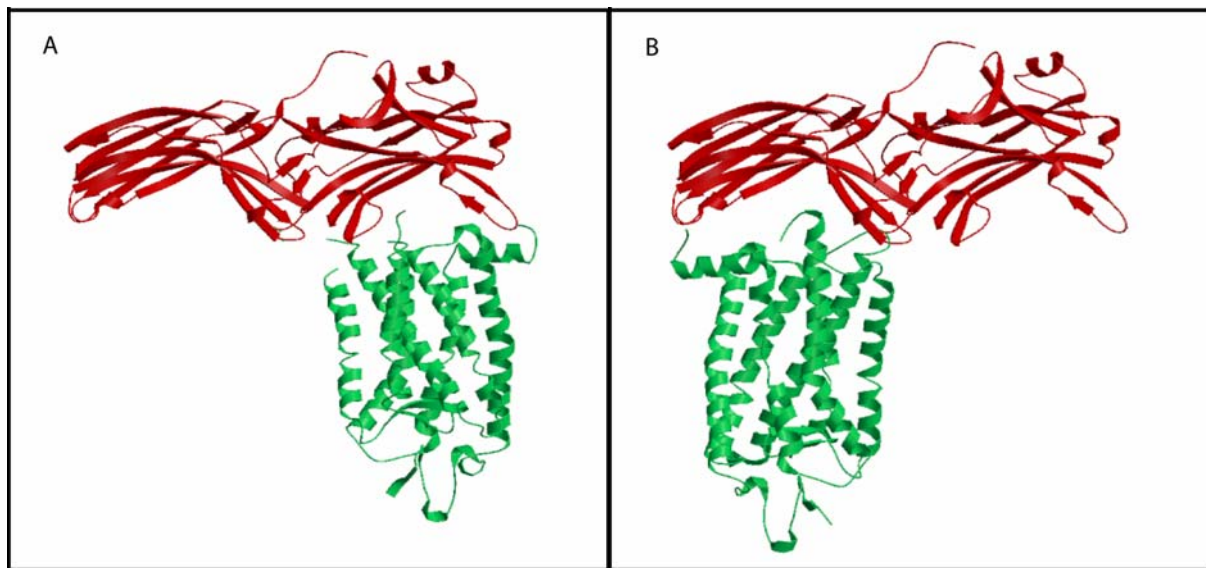


Abbildung 4-2: Modell von Rhodopsin abgeschildert durch N- bzw. C-terminalen Domänen von Arrestin. A: N-Terminus von Arrestin bindet Rhodopsin. B: C-Terminus von Arrestin bindet Rhodopsin.

4.5.2. Interaktion der α -helikalen Region von Arrestin mit P-Rhodopsin*

Smith und Mitarbeiter (1999) diskutieren andere primäre Interaktionsflächen zwischen Arrestin und P-Rhodopsin*, außerhalb der Kuppeln, im Bereich der Aminosäuren 101-130 (α -helikaler Bereich). Es wurde gezeigt, dass ein Fusionsprotein, bestehend aus den Aminosäuren 90-140 von Arrestin und Glutathion S-Transferase (GST), Rhodopsin bindet. Diesem Bereich wurde deshalb eine primäre Bindungsregion zugesprochen. Die Daten aus der KLS konnten hierzu keinen Beitrag leisten. Die Bindung der Arrestine CA S106C, CA A113C und CA P117C an P-Rhodopsin* konnte durch die Kopplung der Farbstoffe an das Arrestin nicht verhindert werden. Die Ergebnisse der KLS zeigten deutlich, dass die modifizierten Arrestine die gleichen Bindungseigenschaften wie rekombinantes Arrestin besitzen (Abbildung 3-4). Allerdings besteht die Möglichkeit auch hier, dass die Größe der

Farbstoffe nicht ausreichte, um diese flexible Region sterisch für Rhodopsin unzugänglich zu machen.

4.6. Interaktion mehrfach markierter Arrestine mit P-Rhodopsin*

Da es keine Unterschiede zwischen einzeln markierten und unmarkierten Arrestinen im Bindungsverhalten zu P-Rhodopsin* gab, wurden mehrere Positionen gleichzeitig in einem Arrestinmolekül markiert, um eine größere Fläche der diskutierten Binderegionen abzuschirmen. In vorhergehenden Studien mit Peptid-Kompetitionsversuchen konnten die Regionen, die bei der Wechselwirkung vom Arrestin-Rhodopsin-Komplexes beteiligt sind, eingegrenzt werden (Pulvermüller et al., 2000). Die Bindungsstellen von Arrestin befinden sich demnach wie auch Raman et al., 1999 postuliert, sowohl in der C-terminalen als auch der N-terminalen Domäne des Arrestinmoleküls, wobei die Arrestinbindungsstellen in den konkaven Regionen der inaktiven Konformation lokalisiert sind (Krupnick et al., 1994).

Arrestin CA S60C/V244C deckte Bereiche in der N- als auch C-terminalen Kuppel gleichzeitig ab, was eine erste deutliche Reduktion des Bindungssignales bei Einsatz mit A633 erbrachte (Kapitel 3.6.). Mit F-5-M konnte der Effekt in solchem Maße nicht erreicht werden, was die Schlussfolgerung nach sich zog, dass die Größe der gebundenen Moleküle entscheidend für eine Blockierung der Bindungsregion war. Desweiteren konnten so Bindungsbereiche in der N- als auch C-terminalen Kuppelinnenseiten definiert werden. Diese These konnte durch die Untersuchungen des markierten Arrestins CA S60C/S169C/V244C/P352C mittels KLS erhärtet werden. In Abbildung 4-3 ist ein Modell mit je zwei Farbstoffen F-5-M in den Kuppeln dargestellt, da die Struktur von A633 nicht genau bekannt ist. Allerdings konnten nur je zwei Farbstoffmoleküle A633 pro Kuppel die Interaktion von Arrestin zu P-Rhodopsin* unterbinden. Nach den Resultaten der KLS zu urteilen, binden N- und C-terminale Kuppel das P-Rhodopsin* simultan oder alternativ.

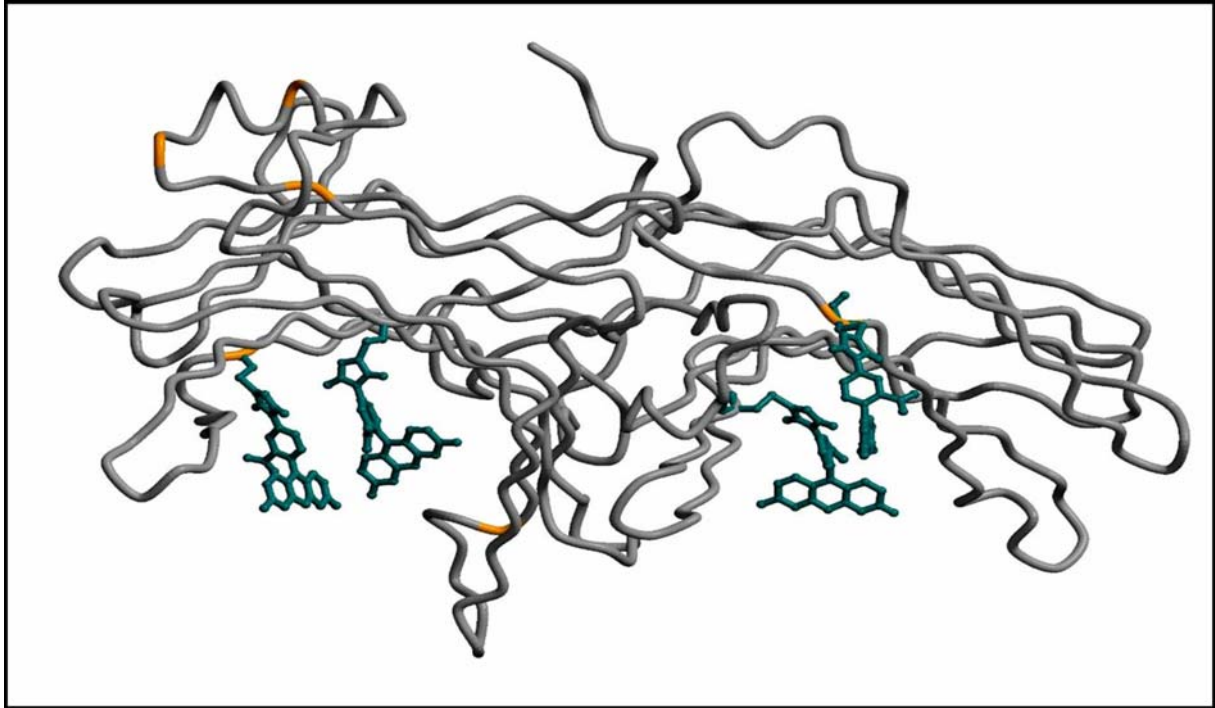


Abbildung 4-3: Fluoreszenzfarbstoffe (F-5-M) gebunden an Positionen 60, 169, 244 und 352 eines Arrestin Modells. Die Positionen an denen Cysteine eingeführt wurden, sind gelb markiert.

4.7. Konformationsänderung von Arrestin

Man geht davon aus, dass durch Interaktion mit dem phosphorylierten C-Terminus von P-Rhodopsin* im Arrestin eine Konformationsänderung von einer inaktiven zu einer bindenden, aktiven Form hervorgerufen wird. Dabei werden zwei Modelle diskutiert, bei dem von einer großen Konformationsänderung im Molekül ausgegangen wird, während im anderen Modell keine großen Umlagerungen bei der Aktivität erwartet werden. Für große Konformationsänderungen sprechen Arbeiten von Schleicher et al., (1989); Pulvermüller et al., (1997), die hohe Aktivierungsenergien von ca. 140 kJ/mol für die Komplexbildung des Arrestins mit phosphoryliertem Rhodopsin bestimmen konnten. Die hohe Aktivierungsenergie deutet auf eine strukturelle Änderungen bei der Komplexbildung hin. Indizien, dass es zumindest zwei Konformationen des Arrestins gibt, wurden unter anderem durch Experimente mit Proteasen geliefert (Palczewski et al., 1991c). Die Proteolyse von Arrestin mit Trypsin in An- oder Abwesenheit von phosphoryliertem Rhodopsin ergab unterschiedliche Peptidmuster, was so interpretiert wurde, dass verschiedene Konformationen von freiem inaktiven und gebundenen Arrestin existieren (Palczewski et al., 1991c). Allerdings stellt sich die Frage, ob nicht Arrestin von Rhodopsin eventuell gegen die Protease geschützt wird. Andere Untersuchungen ergaben, dass Bindungsstellen von Arrestin erst durch einen

Konformationswechsel exponiert werden. Die Studien von Ohguro et al. (1994) fanden differenzierte Lysin-Acetylierung in An- oder Abwesenheit von phosphoryliertem Rhodopsin, sowohl in der N-terminalen als auch in der C-terminalen Arrestindomäne. Dies deutet nicht nur auf eine Umlagerung, sondern auch auf eine Beteiligung beider Domänen von Arrestin bei der Bindung zum P-Rhodopsin hin. Diese Umlagerung ist nur durch die so genannte „*hinge region*“ möglich. Es wurde postuliert, dass alle Rezeptorbindungselemente des Arrestins nur dann in Kontakt mit den cytoplasmatischen Loops von Rhodopsin kommen können, wenn es zu dramatischen Umlagerungen im Arrestin kommt. Beide Domänen von Arrestin bewegen sich relativ zu einander, limitiert durch die Länge der „*hinge region*“. Eine exakte Länge und Sequenz der „*hinge region*“ ist für eine Bindung an Arrestin nicht notwendig, es müssen jedoch mindestens zehn Aminosäuren sein (Vishnivetskiy et al., 2002). Diese Ergebnisse schließen eine direkte Beteiligung dieser Region mit Rhodopsin aus und suggerieren eine Bewegung der zwei Domänen zueinander.

Arbeiten von B. Krafft (Dissertation, 1999) mit Fusionsproteinen (Arrestin und GST) konnten Hinweise geben, dass eine große Umlagerung im Arrestin in eine aktive, bindende Form nicht stattfinden kann. Unterstützt wird diese These von Wilson & Copeland, (1997); die nach spektroskopischer Charakterisierung der Interaktion von Arrestin mit Heparin und Inositolhexaphosphat im Gegensatz zu Schleicher und Mitarbeitern (1989) nur minimale Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur annahmen.

Die Ergebnisse der KLS dieser Arbeit lassen beide Modellvorstellungen zu. Vier Farbstoffmoleküle A633 gebunden an CA S60C/S169C/V244C/P352C können beide Kuppeln von Arrestin, aber auch eine große, bei Aktivierung entstehende Kuppel sterisch so blockieren, dass es zu keiner Interaktion mit P-Rhodopsin* mehr kommen kann. Aufschluß könnte eventuell die zukünftige Untersuchung der markierten Arrestine CA S60C/S169C und CA V244C/P352C bringen. Bei einer Bindung dieser Arrestine mit P-Rhodopsin* kann davon ausgegangen werden, dass beide Domänen unabhängig voneinander agieren. Dies würde für eine geringfügige Umlagerung des Arrestin sprechen. Bei einer großen Konformationsänderung von Arrestin sollte ein Vergleich der Bindungssignale von markierten und unmarkierten CA S60C/S169C und CA V244C/P352C in der KLS einen Unterschied in der Affinität der Arrestine zum P-Rhodopsin* sichtbar machen.

4.8. Bindungsmodelle vom Arrestin-Rhodopsin-Komplex

Die spezielle Zielsetzung in dieser Arbeit war, primäre Bindungsstellen von Arrestin an P-Rhodopsin zuzuordnen und damit ein Bindungsmodell eines Arrestin-Rhodopsin-Komplexes darstellen zu können. Aufgrund der Ergebnisse der Lichtstreuung kann ausgeschlossen werden, dass nur eine Domäne (N- oder C-terminal) in die P-Rhodopsin Bindung involviert ist. Vielmehr können zwei Modelle für eine Bindung von Arrestin an Rhodopsin angenommen werden, die auch in anderen Arbeitsgruppen diskutiert werden. Neuere Studien postulieren eine Bindung von einem Arrestin mit einem Rhodopsin-Dimer (Fotiadis et al., 2003; Fotiadis et al., 2004). Mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM= „*atomic force microscopy*“) konnte man zeigen, dass fast alle Rhodopsin Moleküle in der Diskmembran in Dimeren bis hin zu Oligomeren angeordnet sind. Ein Arrestin mit einer Oberfläche von 45 nm² kann daher leicht zwei Rhodopsine (cytoplasmatische Oberfläche ca. 15 nm²) abschirmen (Smith et al., 2004). Bei diesem angenommenen Modell stellt sich dann die Frage, ob ein Photon, wie es seit langem suggeriert wird, effektiv Rhodopsin aktivieren kann. Die Rolle der einzelnen Moleküle im Dimer sind auch nicht geklärt. Mit diesem Modell würden auch nur geringfügige Konformationsänderungen von Arrestin stattfinden. In Abbildung 4-4 ist ein solcher Komplex schematisch dargestellt.



Abbildung 4-4: Schematische Darstellung eines möglichen Arrestin Rhodopsin Komplexes (1:2 Verhältnis)

In welcher Form eine Umlagerung von Arrestin bei der Aktivierung stattfindet, wird immer noch kontrovers diskutiert. Granzin et al., (1998) und Shilton et al., (2002) schlagen geringfügige Änderungen im Arrestin vor. In SAXS („*small-angle X-ray scattering*“) Experimenten konnten nur lokale Bewegungen von Loops und flexiblen N- und C-Termini beobachtet werden. Dieses Modell ist konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit aus der KLS. Erst nach vollständiger Blockierung beider Domänen, ist eine Bindung zum P-Rhodopsin nicht mehr zu beobachten. Bleibt eine Domäne oder ein Teil dieser zugänglich, bindet Arrestin an P-Rhodopsin.

Ein anderes vorgeschlagenes Modell geht von einem Arrestin-Rhodopsin-Verhältnis von 1:1 aus. Dieses Modell ist nach den Ergebnissen hier zu urteilen, auch vorstellbar. Parkes et al., (1999) und Pulvermüller (1997) konnten in kinetisch-stöchiometrischen Untersuchungen, in denen Meta-II Stabilisierung mit verschiedenen Arrestin-Konzentrationen titriert wurden, auf bimolekulare Reaktionen mit der Bildung von 1:1 Arrestin-Rhodopsin-Komplexen hinweisen. Für Arrestin ist es daher unwahrscheinlich, dass zwei Rezeptoren gleichzeitig gebunden werden. Arrestin bindet mit einem 1:1 Verhältnis an Rhodopsin, wobei es zu großen Konformationsänderungen im Arrestin kommt, bei dem beide Domänen an der Bindung beteiligt sind. Wichtig ist hier die Erkennung der Phosphorylierung des Rhodopsins, Induktion des Konformationswechsels vom inaktiven zum bindenden Arrestin und die eigentliche Bindung der exponierten Bindungsregionen mit phosphoryliertem Rhodopsin. Der Arrestin-Rhodopsin-Komplex besitzt eine hochaffine Bindung ($K_D = 20 - 50 \text{ nM}$) mit hoher Spezifität des Arrestins für photoaktiviertes und phosphoryliertes Rhodopsin (Pulvermüller et al., 1997). Eine Phosphorylierung des Rezeptors ist somit essentiell für die Konformationsänderung von Arrestin. Vor Aktivierung halten zwei Formen von intramolekularen Wechselwirkungen das Arrestin in der inaktiven Form. Der „*polar core*“, ein Netzwerk von fünf geladenen Aminosäureresten, der die zwei Domänen miteinander verbindet (Hirsch et al., 1999; Han et al., 2001; Vishnivetskiy et al., 1999) und die Wechselwirkung vom C-Terminus, β -Faltblatt I und α -Helix I (Vishnivetskiy et al., 2000) halten Arrestin in der basalen Form und sind in allen Arrestinen konserviert (Milano et al., 2002). Der „*polar core*“ dient als Phosphatsensor in Arrestin. Eine Destabilisierung dieser Interaktionen durch Mutationen im Arrestinmolekül führen zu Bindung an phosphoryliertes und unphosphoryliertes Rhodopsin. Dies deutet auf eine Aufhebung der intramolekularen Wechselwirkungen im Arrestin bei der Bindung zu P-Rhodopsin hin. Durch die Wechselwirkung des Arrestins mit den Phosphaten des Rhodopsins wird der Konformationswechsel im Arrestin vom inaktiven Arrestin zum bindenden Arrestin ausgelöst

und die Bindungsstellen von Arrestin werden exponiert (Gurevich et al., 1998). Eine Verschiebung der beiden Domänen zueinander findet statt, so dass eine große Kuppel entsteht, was durch die postulierten Bindungsregionen des Arrestins, die nicht in unmittelbarer Nachbarschaft liegen, erhärtet wird. Emissionspektren von Arrestin, die mit Fluoreszenzfarbstoffen an Position Ile 72 (N-terminale Domäne) und Ser 251 (C-terminale Domäne) modifiziert wurden, zeigten eine Zunahme der Fluoreszenz nach Bindung an P-Rhodopsin, resultierend aus der Veränderung der Umgebung des Fluorophors (Smith et al., 2004). Für die simultane Interaktion mit Rhodopsin ist somit ein Konformationswechsel notwendig. Abbildung 4-4 zeigt schematisch den Arrestin-Rhodopsin-Komplex, bei dem von einem umgelagerten Arrestin ausgegangen wird. Dieses Arrestin schirmt vollständig ein phosphoryliertes Rhodopsin ab.

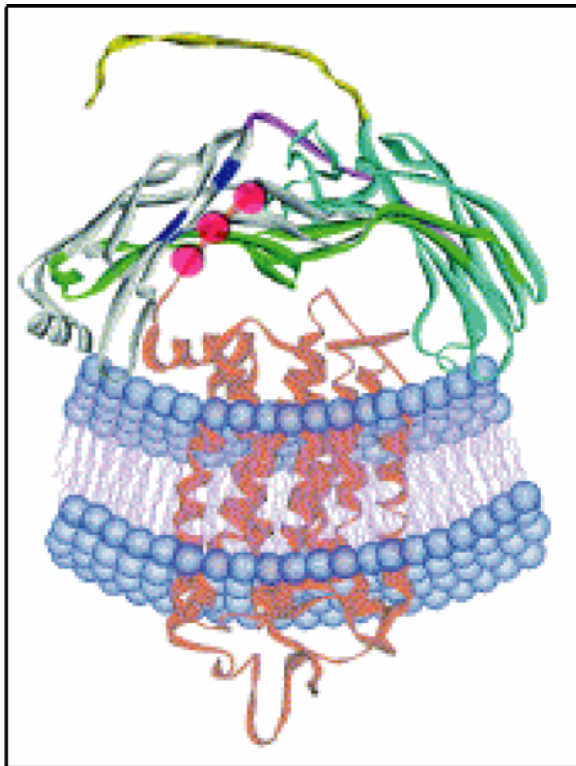


Abbildung 4-5: Hypothetisches Modell des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes. Arrestin (oben) schirmt durch die Konformationsänderung das in der Diskmembran gelegene Rhodopsin ab (verändert aus Gurevich et al., 2003). Phosphatbindungsregionen sind in dunkelblau, weitere Rezeptorbindungsregionen von Arrestin sind grün dargestellt. Angefügte Phosphate an Rhodopsin sind als rote Kreise gezeichnet.

In diesem Modell (Abbildung 4-5) wird auch deutlich, dass es eine wesentliche Funktion des Konformationswechsels ist, die Interaktion des Arrestins mit dem photoaktivierten Rhodopsin zu verhindern, bevor die Phosphorylierung erfolgt ist. Eine Interaktion des aktivierten Rhodopsins mit dem Transducin wird somit während der Amplifikationsphase der Signaltransduktion gewährleistet.

4.9. Zukunftsaussichten

Mit der KLS konnten die Bindungsregionen von Arrestin eingegrenzt werden. Es zeigte sich, dass beide Domänen von Arrestin in der Bindung zum Rhodopsin involviert sind, jedoch kann keine genaue Aussage über den Mechanismus getroffen werden.

Eine Untersuchung der modifizierten Arrestine CA S60C/S169C und CA V244C/P352C mittels KLS kann den Bindungsmechanismus eventuell weiter eingrenzen.

Durch die Vielzahl der generierten Arrestine eröffnen sich mehrere Möglichkeiten genaue Erkenntnisse über den Bindungsmechanismus zu erlangen. Ein Ansatz wäre die Bindung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen an Arrestine und P-Rhodopsin, um einen möglichen Energietransfer zu beobachten (FRET). Genauere Ergebnisse können mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) erhalten werden, bei dem statt Fluoreszenzfarbstoffe, „*Spinlabel*“ eingesetzt werden. Diese Methode ist deutlich sensitiver und erlaubt Distanzen von 2Å zu unterscheiden.

Die Kristallisation eines Arrestin-Rhodopsin-Komplexes und anschließender Lösung der Struktur bleibt jedoch das Ziel, um den Bindungsmechanismus vollständig zu verstehen. Einen stabilen Komplex könnte man durch Bindung der eingeführten Cysteine mit der cytoplasmatischen Region von Rhodopsin durch „*Crosslinker*“ erreichen.

5. Zusammenfassung

Arrestin spielt eine Schlüsselrolle in der Deaktivierung der lichtinduzierten Signalkaskade. Nach Phosphorylierung des licht-aktivierten Rhodopsins (P-Rhodopsin*) kann Arrestin an den Rezeptor binden und verhindert so eine weitere Interaktion von Rhodopsin mit seinem G-Protein Transducin.

In dieser Arbeit wurden Erkenntnisse zur Bindungsregionen von Arrestin bei der Komplexbildung mit Rhodopsin gewonnen. Zur Eingrenzung putativer Interaktionsbereiche von visuellem, bovinem Arrestin und Rhodopsin wurden in die konkaven Seiten der N- bzw. C-terminalen Kuppel, den α -helikalen Bereich und der „loop“-Region zwischen den Domänen von CA-Arr (Arrestin mit Austausch von wildtypischen Cysteinen 63, 128 und 143 gegen Alanine) Cysteine eingeführt, welche zur selektiven Bindung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, unter Ausbildung von stabilen Thioether-Bindungen, dienen. Es wurden CA-Arr Arrestine mit jeweils nur einem Austausch, aber auch Proteine mit zwei, drei und vier Austauschen erzeugt. Ein begrenzter Bereich um diese ausgetauschten Positionen wurde mit Hilfe der großen Fluoreszenzfarbstoffe sterisch blockiert und war so für Interaktionen mit P-Rhodopsin* unzugänglich. Aktive, markierte Arrestine wurden für Interaktionsversuche mit licht-aktiviertem, phosphoryliertem Rhodopsin in der zeitabhängigen statischen Lichtstreuung (KLS) eingesetzt. Während KLS-Messungen zeigten, dass mit einfach markierten Arrestinen keine Eingrenzung des Bindungsbereich möglich ist, konnte mit einem Arrestin, das in jeder Kuppel zwei Farbstoffmoleküle gebunden hatte ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Es konnte kein Bindungssignal mehr in der KLS beobachtet werden. Ein Arrestin mit jeweils einem Farbstoffmolekül in jeder Kuppel zeigte ein intermediäres Bindungssignal (reduzierte Aktivität).

Anhand der erhaltenen Resultate konnten somit die Bindungsregionen von Arrestin klar aufgezeigt werden. Sie befinden sich in beiden kuppelartigen Domäneninnenseiten von Arrestin.

Im Hinblick auf weiterführende Studien könnten, außer kristallographische Analysen des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes, fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen (FRET) oder Elektronen-Spin-Resonanz-Experimente (ESR) die Interaktionsbereiche zwischen Arrestin und P-Rhodopsin* eindeutig aufzeigen.

6. Bacterio-opsin activator (Bat)

Halobacterium salinarum ist ein stäbchenförmiges Archaeobakterium, welches in extrem salzhaltigen Gewässern (NaCl-Konzentration ca. 4 M) vorkommt. Da die Temperaturen der Umgebung ebenfalls sehr hoch sind, ist der Sauerstoffgehalt des Mediums zu gering, um nur durch Atmung überleben zu können. Deshalb nutzen diese halophilen Bakterien, durch das Protein Bacteriorhodopsin (BR), auch sichtbares Licht zur Energiegewinnung. Unter aeroben Bedingungen ist das Bakterium in der Lage ATP vorwiegend via dem Trichloroessigsäure Zyklus (TCA) zu synthetisieren (Kennedy et al., 2000). Unter anaeroben Bedingungen kann eine ATP-Synthese entweder durch Fermentation von Arginin oder Photosynthese eintreten. Dabei wird die Synthese von BR induziert. BR ist ein Komplex bestehend aus dem Apoprotein Opsin und dem Chromophor Retinal. Das Bacteriorhodopsin generiert mittels Lichtenergie einen pH-Gradienten über der Purpurmembran und es entsteht ein elektrochemisches Potential. Die im Potential gespeicherte Energie wird dann zur ATP-Synthese genutzt.

Vier Gene sind verantwortlich für die Synthese von BR, *bop*, *brp*, *blp* und *bat* (Peck and Krebs, 2001; Leong and Betlach 1988; Leong et al., 1988), welche in einem Cluster von Genen vorliegen (Abbildung 6-1).

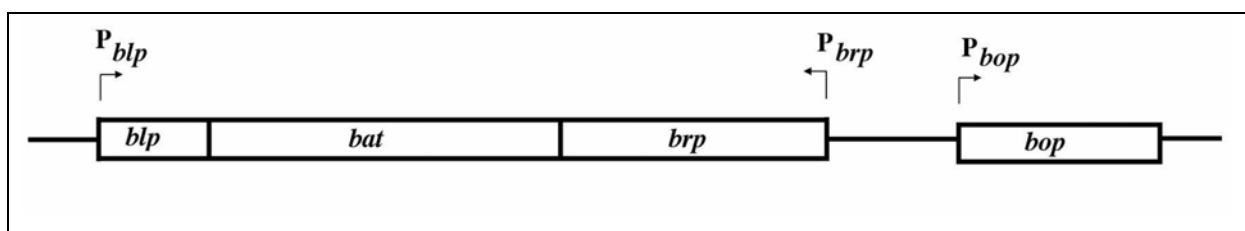


Abbildung 6-1: Mappedes *bop* Gen-Cluster. Dargestellt sind die relativen Größen und die Anordnung der vier Gene *blp*, *bat*, *brp* und *bop* in einem Gen-Cluster mit den Positionen der Promotoren (P). Die Orientierung der Promotoren ist schematisch durch Pfeile dargestellt (verändert aus Baliga, 2001).

Licht und Sauerstoffmangel induzieren die Expression vom *bop* Gen (*bacterio-opsin gene*). *Bop* Gen Expression wird durch zwei regulatorische Gene beeinflusst. Eins dieser Gene ist das *brp* Gen (*bacterio-opsin related protein gene*), von dem postuliert wird, für einen putativen, membrangebundenen Lichtdetektor zu kodieren (Shand & Betlach, 1991). Das zweite dieser Gene ist das *bat* Gen. Mutationsstudien zeigten, dass *bat* die Biosynthese des

Opsins und verantwortliche Gene (*brp* und *blh*) für die Retinalsynthese (Peck & Krebs, 2001) auf Transkriptionsebene reguliert (Baliga et al., 2000). Insertionen im *bat* Gen führten zu einer Erniedrigung der BR-Expression. Dabei koordiniert *bat* die Synthese von Bacterio-opsin als Antwort auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen (Gropp and Betlach, 1994). *Bat* reguliert direkt die Expression anderer Gene, wie *brp*, *crtB1* und wird dabei selbst von *brp* moduliert (Baliga et al., 2001).

Das Bat Protein (Bacterio-opsin activator), welches im Dunkeln 5-7x stärker exprimiert wird (Shand & Betlach, 1994) gehört zur Superfamilie der cytoplasmatischen Sauerstoff-Sensor-Proteine. Bat ist ein lösliches Protein (Betlach & Leong, 1989) bestehend aus 674 Aminosäuren und hat eine Größe von 73,3 kDa (Leong & Betlach, 1988). Das Protein ist ein Vertreter der unlängst entdeckten PAS/PAC-Domänen-Proteine (Taylor & Zhulin, 1999). Marvan (1999) ordnet dem Bat N-terminal eine Untereinheit der PAS/PAC-Domänen, die LOV-Domäne (= Light, Oxygen, Voltage), zu. Die PAS/PAC-Domäne (gelber Block) von Bat soll für den Redox-Status der Zelle verantwortlich sein (Yang & DasSarma, 1996).



Abbildung 6-2: Modularer Aufbau von Bat. Die PAS/PAC Domäne ist gelb, die GAF Domäne blau und die HTH Domäne (Helix-turn-Helix) ist rot dargestellt. Die Zahlen bezeichnen die Aminosäuren.

Es wurden mittels Sequenzanalysen weitere Domänen im Bat gefunden (Abbildung 6-2). Eine putative cGMP-Bindedomäne (GAF) (blauer Block) ist empfänglich für Änderungen der Lichtintensitäten (Baliga et al., 2002). Am C-Terminus von Bat konnte ein bakterielles AraC-Typ-Helix-turn-Helix-Motiv (HTH) identifiziert werden (roter Block), welcher darauf hindeutet, dass Bat direkt an die DNA bindet (Baliga & DasSarma, 2000). Bat wird also als ein licht- und sauerstoffabhängiger Transkriptionsregulator diskutiert.

Die Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des Programms *BL2SEQ* („Biology Workbench“) nach Primärstrukturhomologien zu bekannten Strukturen untersucht. Der Sequenzvergleich von der PAS/PAC-Domäne von Bat zeigte zum einen eine hohe Homologie zur LOV-Domäne von Phototropin (64 %), zum anderen aber auch Homologie zu FixL (43 %), einem Sauerstoffsensoren aus *Rhizobium meliloti* (Miyatake et al., 1999; Gong et al., 1998) und NifL (59 %), einem Flavoprotein, das abhängig vom Redox-Status, in *Azotobacter vinelandii* die Transkription für die Stickstoff-Fixierung kontrolliert (Hill & Dixon, 1996; Baliga & DasSarma, 1999; Gropp & Betlach, 1995).

LOV-Domänen tragen eine prosthetische Gruppe, den Chromophor FMN (Flavinmononukleotid), der blaues Licht absorbiert und einen Photozyklus induziert. FixL ist ein Häm-bindendes Protein, während NifL ein FAD (Flavinadenindinukleotid) koordiniert. Beide Proteine sollen genauso wie Bat Sauerstoffsensoren sein (Blanco & Kennedy, 1993). Die Homologien von Bat zu FixL und NifL lassen den Entschluss zu, dass es sich bei Bat auch um ein chromophorbindendes Protein handelt.

Um Erkenntnisse über Bat und seinen Chromophor (Häm, FAD oder FMN) zu erlangen, ist im Rahmen eines Nebenprojektes Ziel dieser Arbeit, das Protein homolog in *H. salinarum*, als auch heterolog in *E. coli* und *S. cerevisiae* zu exprimieren und mit biophysikalischen Methoden zu untersuchen,

6.1. Amplifikation des Bat-Gens aus *H. salinarum* und heterologe Expression in *E. coli*

Für die Expression von Bat wurde dessen kodierender Bereich aus dem Gesamtzellextrakt von *Halobacterium salinarum* (Stamm MPK 40) mit den Primern N-Bat und C-Bat in einer PCR amplifiziert und in den Vektor pCR-Blunt kloniert. Plasmid DNA (*bat* pBlunt # 1) enthielt das komplette *bat*-Gen wie mittels Restriktionsanalyse und nachfolgende Sequenzierung bestätigt werden konnte. Durch eine weitere PCR wurden am 5'-Ende kodierende Sequenzen für einen 6x His-tag, sowie vor dem Start Codon die Restriktionsschnittstellen BamHI und NdeI (Primer N-BamNdeHis-Bat) eingeführt. Am 3'-Ende wurden kodierenden Sequenzen für einen Strep-tag-II (C-SalHindStrep-Bat) sowie die Restriktionsschnittstellen SalI und HindIII hinter dem Stop Codon eingeführt. Das resultierende *bat*-Gen (in *bat* pBlunt #13) wurde in pET 27b kloniert. Die kodierenden Sequenzen wurden mit den Restriktionsendonukleasen NdeI/BglIII herausgeschnitten und in den Vektor pET 27b zwischen die NdeI und BamHI Schnittstellen kloniert. Das resultierende Plasmid *bat* pET 27b #2 (Tabelle 6-1) konnte mittels Restriktion bestätigt werden und wurde in verschiedene *E. coli* BL 21 (DE3) Expressionsstämme transformiert. Das pET Expressionssystem in Verbindung mit den BL-Stämmen, welche Lysogene des Bacteriophagen λ DE3 sind und in ihren Genomen DNA-Fragmente, wie LacI^q-Gen (*Lac repressor I- high quantity*), *lacUV5* Promotor (Derivat des *lac* Promotors) und eine Proteasedefizienz besitzen, ermöglicht hohe Expressionsraten, die etwa 50 % des Gesamtzellproteins betragen können (Fleer, 1992; De Baetselier et al., 1991). Eine präzise Regulation und Induktion der Expression wird durch IPTG (Isopropyl- β -

thiogalaktopyranosid), einem nicht metabolisierbaren Substratanalogon der Lactose, ermöglicht. Die Verwendung der *E.coli*-B-Stämme hat gegenüber *E. coli* K zwei große Vorteile. Erstens können höhere Zelldichte erreicht werden und es fehlen die Proteasen Lon und OmpT, die in *E. coli* K zum cytosolischen Abbau rekombinanter Proteine bzw. zu einer Proteolyse während der Aufarbeitung führen können. *Bat* pET 27b # 2 wurde in verschiedene BL 21 DE3 Expressionsstämme transformiert (siehe Kapitel 2.4.2.). Erste Studien zeigten, dass Bat in ausreichenden Mengen in allen *E. coli* B-Stämmen exprimiert wurde. Allerdings galt ein besonderes Interesse der Expression in pLysE. Die Zellen hatten nach der Expression in diesem *E. coli*-Stamm eine grüne Farbe, was auf einen eventuell vorhandenen Chromophor schließen ließ. Da das gewünschte Expressionsprodukt toxisch für die Zelle sein könnte, ist eine Überexpression in pLysE enthaltenen B-Stamm durchaus sinnvoll. Dieses Plasmid kodiert ein Lysozym, das mit der T7-Polymerase assoziiert und deren Aktivität inhibiert. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Zellaufschluß durch die hohe Lysozymkonzentration bestenfalls durch einfaches Einfrieren und Auftauen der Zelle erfolgen kann.

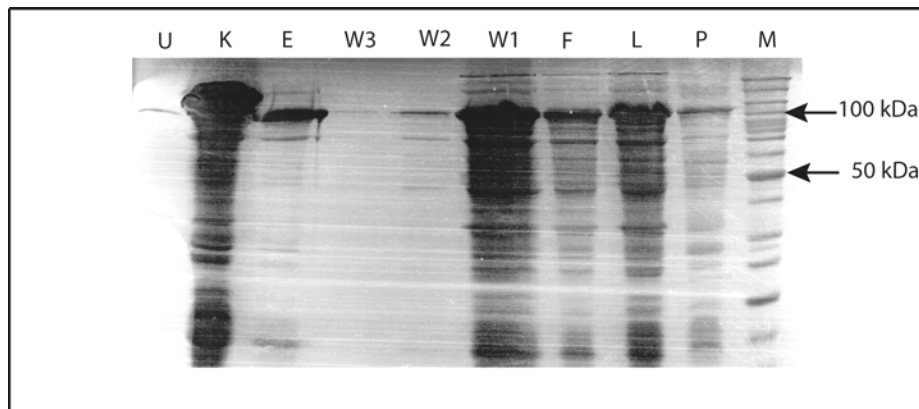


Abb. 6-3: Expression von Bat in *E.coli*: Strep-tag-II Reinigung (SDS-PAGE-Gel): ~ 1,5 g *E.coli* BL 21 (DE3) pLys E Zellen wurden in 30 ml Aufschlusspuffer (50mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer, pH 8,0 200mM NaCl; 1 Tablette Proteaseinhibitoren complete ohne EDTA, Aspartat-Protease 1:1000; 10 mM DDT) in der French Press (2 Zyklen) aufgeschlossen (90 % Aufschlussgrad). Nach Extraktion des Pellets wurde 30 ml klares Lysat dreimal auf eine 25 ml StrepTactin Säule gegeben. **Waschschritte:** Wash 1: 50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer, pH 8,0; 200mM NaCl; Wash 2: 25mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer, pH 8,0; 100mM NaCl Wash 3: 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer, pH 8,0; 50 mM NaCl **Elution:** 10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer, pH 8,0; 50mM NaCl; 10 % Glycerin; 0,026 g/ 50ml dTB; **Spuren:** M. 10kDa Marker; P. Pellet; L. Lysat; F. Flow; W1-3. Wash1-3; E. Eluat. K. Konzentrat; U. Urea

Die Fraktionen einer Reinigung über StrepTactin Sepharose nach einer *E. coli*-BL21(DE3)pLysE-Expression wurden zur Analyse in der SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 6-3). Die Expressionsbedingungen wurden mit 37°C, 130 Upm im Schüttler festgelegt. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Expression nach 3 h gestoppt. 1 l der Zellsuspension wurde pelletiert und in 30 ml Aufschlußpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in der French-Press aufgeschlossen und unlösliche von löslichen

Bestandteilen mittels Zentrifugation getrennt. Nachdem das Pellet isoliert wurde, konnte der Überstand mittels StrepTactin Sepharose aufgearbeitet werden. Die Analyse zeigte, dass der lösliche Anteil des exprimierten Proteins nach Zellaufschluß bei ca. 80 % liegt (Vergleich: L und P). Allerdings überraschte es, dass Bat bei höheren Molekulargewichten (~100-110 kDa) lief (Spur L). Das kalkulierte Molekulargewicht von Bat liegt bei ~74 kDa, jedoch besitzt es einen niedrigen theoretischen pI von ~ 4, was das Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE stark beeinflussen kann. Schon beim ersten Waschschrift wurde fast das ganze Protein von der Säule eluiert (Spur W1). Ein Teil des Proteins blieb jedoch haften. In den nachfolgenden Waschschriften wurde nur noch wenig Protein von der Säule gespült (Spuren W2 und W3). Die Reinigungseffizienz blieb jedoch niedrig, denn nach Konzentration (Spur K) der Eluate (Spur E) konnte man eine starke Verunreinigung durch andere Proteine und/oder durch Abbau von Bat feststellen. Veränderungen der Reinigungsbedingungen (Puffer, Ionenstärke, pH, Zusatz von Glycerin) brachten keinen nennenswerten Erfolg.

In der Westernblot Analyse sind deutlich zwei Banden um 100 kDa in allen Fraktionen erkennbar. Dies ist eventuell auf unterschiedliche Besetzung mit SDS zurückzuführen. Es ist auch Protein im Pellet lokalisiert (Spur P). Die Menge an löslichem Protein in voller Länge ist jedoch ausreichend für nachfolgende spektroskopische Untersuchungen (Spuren E3-E7).

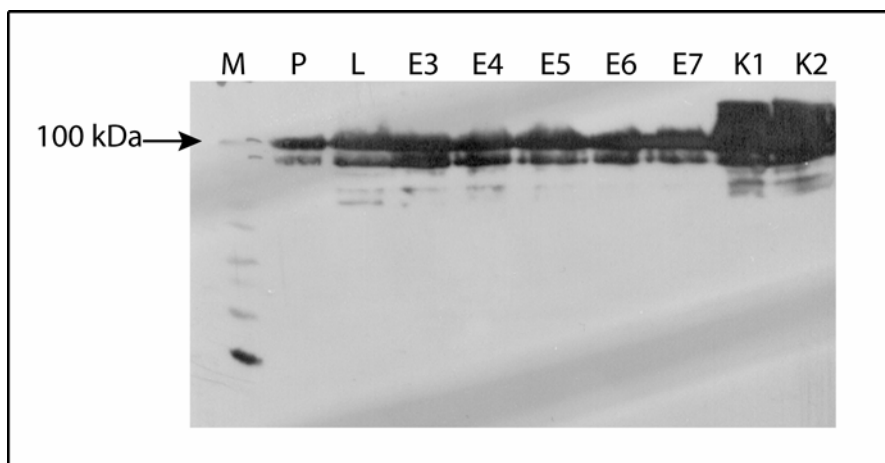


Abb. 6-4: Löslichkeit des exprimierten Bat: (Western Blot)

Fraktionen aus einer Strep-tag-II Reinigung wurden mittels Western Blot nach Inkubation mit monoklonalen anti-poly Histidin/ Peroxidase Konjugat analysiert. Die Detektion erfolgte über Chemilumineszenz. **Spuren:** M. Bench Marker, P. Pellet, L. Durchlauf, E3-E7. Eluate, K1-2. Konzentrate

Purifikation von Bat mittels His-tag blieben erfolglos. Dies ist eventuell auf eine schlechte Zugänglichkeit des N-terminalen His-tags zurückzuführen, der für die Interaktion mit den getesteten zweiwertigen Kationen (Cu^{2+} , Ni^{2+}) auf der Säule nicht zur Verfügung steht.

Erste Versuche zur Anionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe der ÄKTA blieben erfolglos (Daten nicht gezeigt). Weitere Experimente zur Optimierung der Reinigungsmethode konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Erste Aussagen über einen möglichen Chromophor konnten mit Hilfe von Absorptionsspektren getroffen werden. Für diesen Zweck wurden Spektren von der löslichen Fraktion des Gesamtzellextraktes von *E. coli* ohne *bat* und löslichem Extrakt nach einer *Bat*-Expression im UV/VIS Spektralphotometer zwischen 700- und 400 nm aufgenommen. Es zeigten sich signifikante Banden im Differenz-Spektrum der beiden Proben (Abbildung 6-5, untere Kurve).

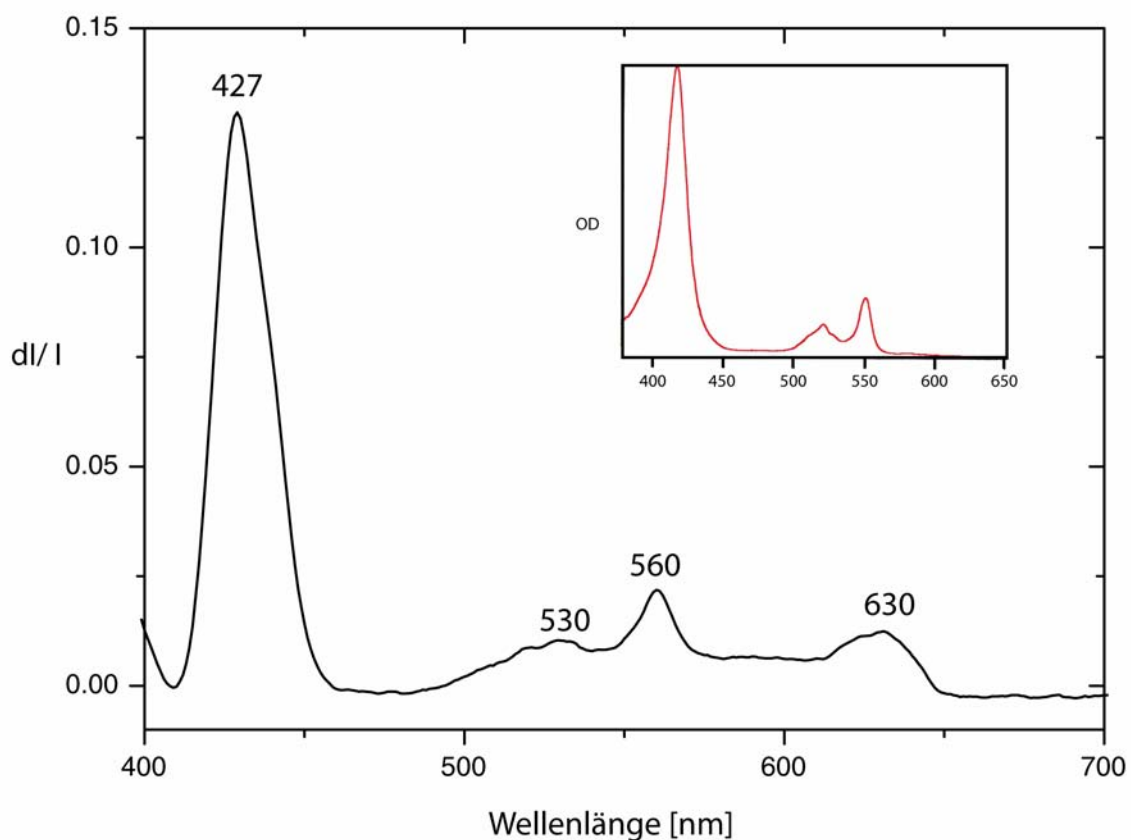


Abb. 6-5: Differenzspektrum von Bat (unten) und Absorptionsspektrum von Cytochrom c: Lösliche Fraktion des Gesamtzellextraktes von *E. coli* wurde von der, der *Bat*-Expression abgezogen. Das Spektrum ist in einem Wellenlängenbereich von 700-400 nm aufgenommen worden. Rechts oben ist ein Absorptionsspektrum von Cytochrom c, einem Häm-bindenden Protein dargestellt.

Ein deutliches Maximum im Wellenlängenbereich von 427 nm ist zu erkennen. Absorptionsmaxima sind weiterhin bei 530-, 560-, und 630 nm sichtbar. Ein Vergleich des Differenz-Spektrums mit einem Spektrum eines Häm-bindenden Proteins (Cytochrom c in der Abbildung 6-5, rechts oben) zeigt große Ähnlichkeit in den Maxima der Absorptionsbanden. Man kann Absorptionsbanden um 425, 530 und 550 nm erkennen. Ein Spektrum von LOV1, als Beispiel für ein FMN-bindenden Protein (Abbildung 6-6), zeigt im Gegensatz dazu große

Unterschiede zu den hier gemessenen Bat-Spektren. Die typischen Absorptionsmaxima des FMN um 425, 450 und 480 nm sind in den gemessenen Bat-Spektren nicht vorhanden.

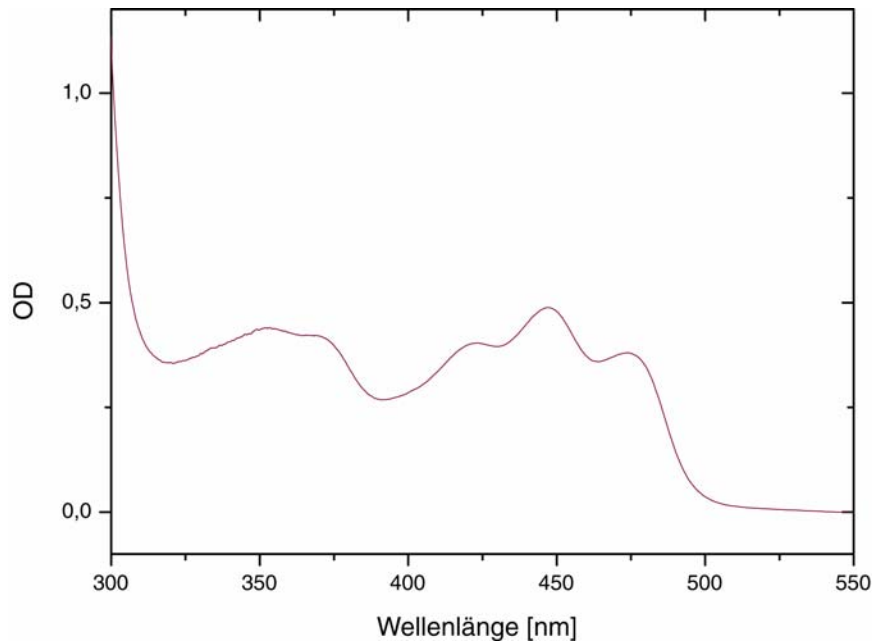


Abbildung 6-6.: Dargestellt ist hier ein Absorptions-Spektrum von LOV 1, einem FMN-bindendem Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Person). Deutlich zu erkennen sind drei Maxima zwischen 400 und 500 nm und weitere Maxima im Bereich um 325 und 375 nm.

Da FMN fluoresziert, Häm jedoch keine Fluoreszenz besitzt, wurden ergänzend fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen am Bat-haltigem Extrakt durchgeführt.

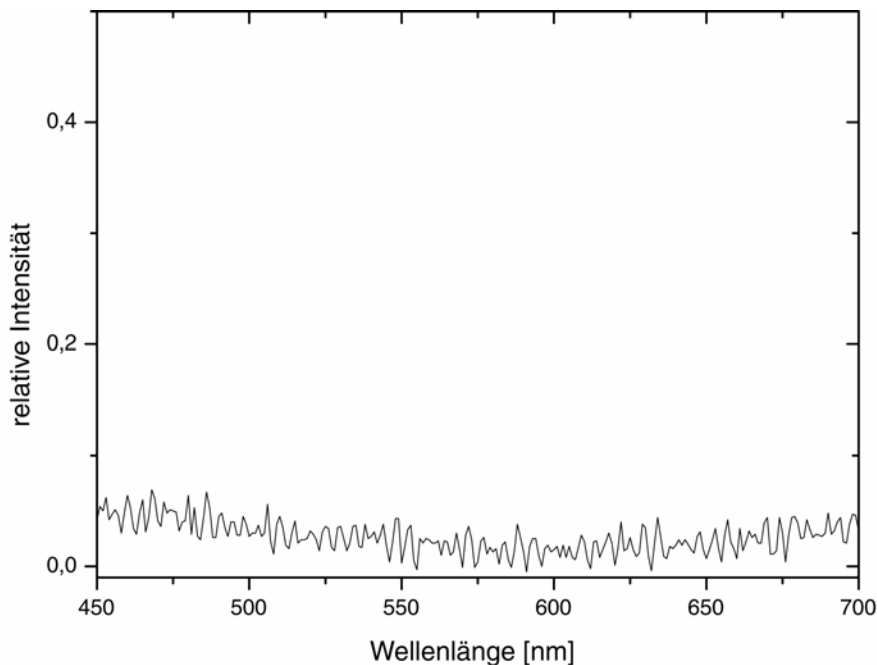


Abbildung 6-7:
Emissionsspektrum der löslichen Fraktion aus Gesamtzellextrakt.
Gemessen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 420 nm über einen Bereich von 450-700 nm.

Wie in Abbildung 6-7 dargestellt ist, kann eine nennenswerte Fluoreszenz nicht beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass kein FMN in *E. coli* produziert wurde.

Insgesamt kann allerdings eine genaue Aussage über einen Co-Faktor nicht getroffen werden, da die signifikanten Banden im Absorptionsspektrum auch von einem Protein stammen

können, welches durch Bat induziert wurde. Die Möglichkeit besteht, dass die Expression von Bat, aufgrund der transkriptionsregulierenden Eigenschaften, die Expression eines Häm-bindenden Proteins, wie z. B. Cytochrom, bewirkt. Um diese Hypothese auszuschliessen, ist die Etablierung eines effizienten Reinigungssystems deshalb unumgänglich.

6.2. Klonieren von Bat in pYEX-BX und Expression in F11 α

Die Expression in *S. cerevisiae* war für verschiedene Arten von Protein, wie lösliche cytoplasmatische Proteine, integrale Membranproteine und sekretorische Proteine erfolgreich (Valenzuela et al., 1982; Dhanabal et al., 1999). Zu diesem Zweck wurde das *bat*-Gen in den *S. cerevisiae* Vektor pYEX-BX kloniert. Die kodierenden Sequenzen wurden aus dem Plasmid bat pBlunt # 13 mit EcoRI herausgeschnitten und in das zuvor mit demselben Enzym geschnittene Plasmid pYEX-BX kloniert. Korrekte Klone, in denen die Insert-DNA in der richtigen Orientierung eingebaut wurde, wie Bat-pYEX-BX #1, wurden anschließend in den *S. cerevisiae* Stamm F11 α transformiert. Eine ausreichende Expression in Hefe wurde allerdings nicht erreicht.

6.3. Homologe Expression von Bat in *H. salinarum*

Homologe Expression von Bat in *H. salinarum* sollte gewährleisten, dass zum einen der native Chromophor der Zelle exprimiert wird und zum anderen, dass Mechanismen die für die Faltung und Rekonstitution mit dem Co-Faktor verantwortlich sind, zur Verfügung stehen. Für die homologe Expression von Bat wurde das Gen unter die Kontrolle des nativen Promotors des Bacterioopsingens (*bop*) gestellt. Das ~ 400 Bp lange Fragment des *bop* Promotors lag als BamHI/ NdeI Fragment in dem Vektor pBlunt (pblunt-bprom: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Schlesinger) vor. Der *bop* Promotor ist der stärkste Promotor der vier Rhodopsine (BR, HR, SR I, SR II) aus *H. salinarum* und wird in der späten logarithmischen Phase des Wachstums der Bakterien durch Sauerstoffmangel induziert (Yang und DasSarma, 1990; Shand und Betlach, 1991). Ziel der Verknüpfung des *bat*-Gens mit dem Promotor war, die Expression von Bat in *H. salinarum* zu erhöhen. Das *bat*-Gen aus bat-pBlunt-#13 wurde mit den Restriktionsendonukleasen NdeI/ HindIII herausgeschnitten und in die korrespondierenden Schnittstellen von bprom-pBlunt kloniert. Resultierende Plasmide wurden durch Restriktion und Sequenzierung überprüft. Das bestätigte Plasmid bat-bprom-pBlunt wurde mit den Enzymen BamHI/ HindIII aus dem Vektor geschnitten und in korrespondierende Restriktionsschnittstellen des Vektors pHS blue

ligiert. Es konnte dabei Plasmid *bat* bprom pHS blue # 8 isoliert werden, welches in den BR-negativen *H. salinarum* Stamm L33 transformiert wurde. Die Transformation erfolgte wie in Kapitel 2.6.7. beschrieben. Zur Expression von Bat wurden Transformanten des Stammes L33 unter Novobiocin-Selektionsdruck, zum einen in Schüttelkolben, zum anderen im Fermenter angezogen. Nach einer Wachstumsdauer von ungefähr 60 Stunden unter sauerstoffreichen Bedingungen bis zur spätlogarithmischen Phase wurde die Induktion durch Sauerstoffentzug und mit Beleuchtung durch Weißlicht eingeleitet. Die Dauer der Expression im Schüttler betrug ca. 80 Stunden. Eine besonders hohe Ausbeute erreichte man durch anschließendes Stehen lassen der Kultur für zwei bis drei Tage. Unter extremen Sauerstoffmangelbedingungen wird der *bop* Promotor besonders stark induziert. Die Expressionsrate korrelierte mit einer rot-braunen Verfärbung der Zellen, die dem Bat-Chromophor zugesprochen wurde. Bei dem Vergleich der Expressionsraten von Bat im Stamm L33 im Schüttler mit denen im Fermenter ist kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Die Expressionsrate im *H. salinarum* Stamm L33 war vergleichbar zu der in *E. coli* pLysE (Daten nicht gezeigt). Nach Beendigung der Expression wurden die L33 Zellen pelletiert. Die Zellen wurden im Puffer (200 mM NaCl, 10 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 8) aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation (1 h, 35000 Upm, 4°C, Ti-70 Rotor) wurde lösliches Protein von unlöslichen Bestandteilen getrennt und über StrepTactin Sepharose gereinigt. Eine effiziente Reinigung konnte, wie bereits für Bat aus *E. coli* beschrieben, auch hier nicht erreicht werden. Die lösliche Fraktion aus dem Gesamtzellextrakt aus L33 zeigte auch keine signifikante Unterschiede im Vergleich zur Absorption der Fraktion aus *E. coli* (Abbildung 6-8). Der hohe Untergrund ist auf Streuung von Partikel des inhomogenen Gesamtzellextrakts zurückzuführen. Die Lage der Absorptionsmaxima beider untersuchter Proben ist annähernd gleich, was darauf schließen lässt, dass der gleiche Chromophor in L33 akkumuliert.

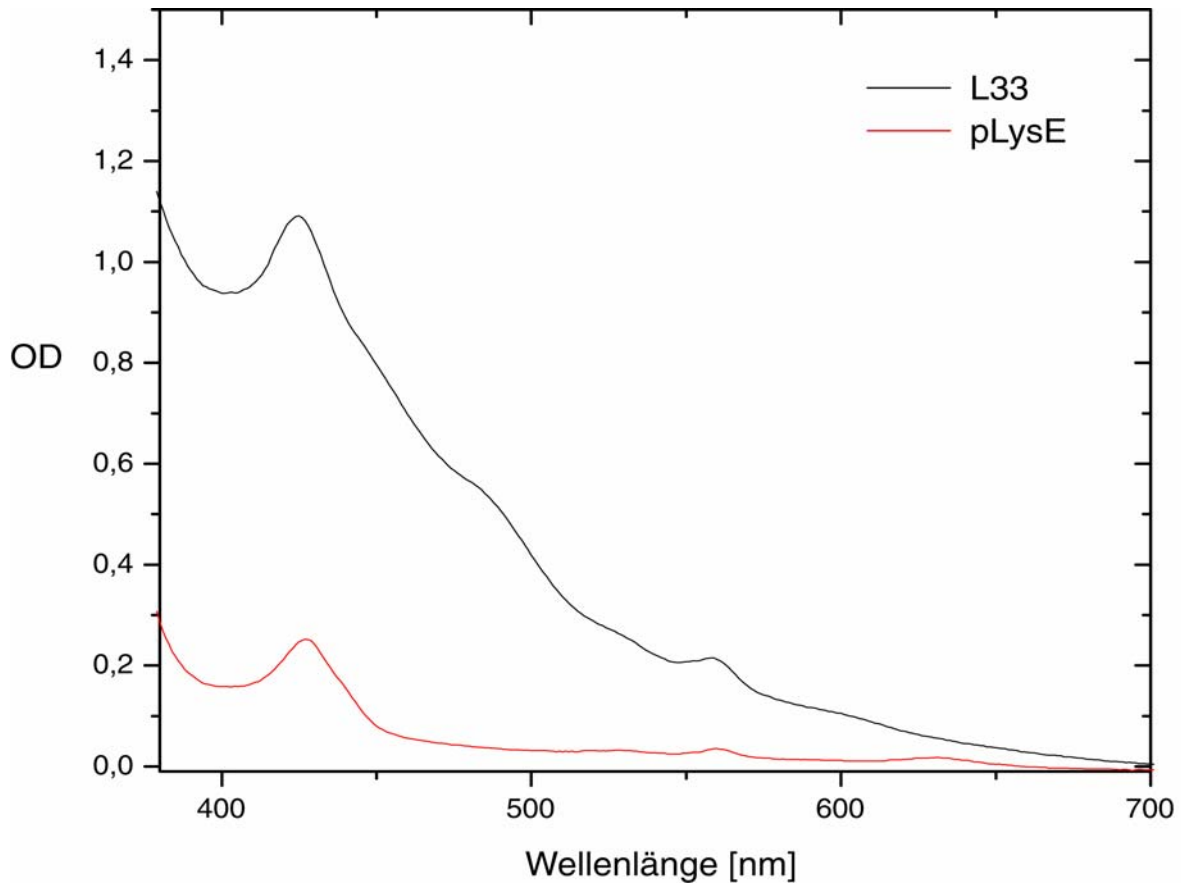


Abb. 6-8: Absorptionsspektrum von konzentrierten Bat-Lysaten aus *E. coli* und *H. salinarum*: Aufgetragen sind die optischen Dichten der löslichen Fraktion aus Gesamtzellextrakten in Abhängigkeit von der Wellenlänge λ . Die Fraktion aus *E. coli* ist in rot, während die L33 Fraktion in schwarz dargestellt ist. Das Spektrum ist in einem Wellenlängenbereich von 700-380 nm aufgenommen worden. Die Untergrundstreuung der L 33 Probe wurde nicht abgezogen.

6.4. Bat H206C

In den Absorptionsspektren der Proben aus *E. coli* und *H. salinarum* konnte kein FMN nachgewiesen werden (siehe Kapitel 6.1. und 6.3.). Gründe hierfür könnten sein, dass es sich bei Bat um ein Häm- bindendes Protein handelt. Nach genaueren Untersuchungen der konservierten Aminosäuren war ein signifikanter Unterschied von Bat gegenüber FMN- bindenden LOV-Domänen ersichtlich. In LOV-Domänen wird das FMN an ein Cystein in einem konservierten Aminosäurebereich kovalent gebunden, während bei Bat an dieser Stelle ein Histidin auftritt. Um herauszufinden, ob Bat mit einem Cystein an dieser Stelle FMN binden kann, wurde gentechnisch ein gezielter Austausch des Histidins 206 gegen ein Cystein vorgenommen und das entstandene Bat H206C wurde heterolog in *E. coli* und homolog in *H. salinarum* exprimiert.

Die Mutagenese erfolgte durch Standard-PCR mit dem internen Mutageneseprimer Bat H206C for, der die Mutation einführt und dem 3'-Primer von Bat (C-SalHindStrep-Bat). Als Template diente die Bat- Sequenz *bat* pBlunt # 13. Die amplifizierte DNA wurde in TOPO

pBlunt kloniert (*bat* TOPO pBlunt # 4, siehe Tabelle 6-1). Die Einführung der Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die Klonierung des Gens in die Expressionsvektoren pET 27 bzw. bprom pHS blue und anschließende Transformation in *E.coli* pLys E bzw. *H. salinarum* L33 wurde analog Kapitel 6.1. und 6.3. durchgeführt. Die Expressionsraten von Bat H206C in beiden Systemen, als auch die Reinigungseffizienz, war vergleichbar zum wildtypischen Bat. Spektroskopische Untersuchungen zeigten auch keinen Unterschied zu wildtypischen Bat.

Bezeichnung des Proteins	Konstrukt in pBlunt oder TOPO pBlunt	Konstrukt in pET 27b	Konstrukt in bprom pHS blue	Konstrukt in pYEX-BX
Bat H206C	<i>bat</i> TOPO pBlunt # 4	<i>bat</i> pET 27b # 18	<i>bat</i> bprom pHS blue # 10	-
Bat	<i>bat</i> pBlunt # 4	<i>bat</i> pET 27b # 2	<i>bat</i> bprom pHS blue # 8	<i>bat</i> pYEX-BX # 1

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der *bat* Konstrukte

6.5. Zusammenfassung und Ausblick

Ein Expressionssystem konnte erfolgreich bestimmt werden. Das *E. coli*- als auch *H. salinarum*-System führt zu großen Mengen Protein. Es bedarf jedoch einer Etablierung eines Reinigungssystems für Bat, da weder affinitäts- noch ionenausschlusschromatographische Methoden zu reinem Protein führten. Eine Optimierung dieser Chromatographien bzw. Etablierung weiterer Reinigungsstrategien (z.B. hydrophobe Interaktionschromatographie) sind unabdingbar, konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Insgesamt konnte eine Charakterisierung von Bat nur bedingt erfolgreich durchgeführt werden. Leider gelang es nicht einen Chromophor dem Protein eindeutig zuzuordnen, da das Protein bislang nicht in reiner Form vorliegt.

Die spektroskopischen Ergebnisse zeigen allerdings deutliche Hinweise auf eine Akkumulation eines Häm-bindenden Proteins. Ein FMN konnte weder im Gesamtzellextrakt von *E.coli* noch *H. salinarum* nachgewiesen werden, was Bat als Blaulichtrezeptor ausschließt.

Bei einer erfolgreichen Etablierung einer Reinigung sind weitere Untersuchungen hinsichtlich den postulierten DNA-bindenden Eigenschaften von Bat in Zukunft zu berücksichtigen. Ziel wäre hierbei Bat mit der DNA zu kokristallisieren und die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen.

Das *H. salinarum*-System, mit dem vorangeschalteten *bop*-Promotor, wurde erfolgreich für die Expression eines homologen, löslichen Proteins eingesetzt und kann in Zukunft als alternatives Expressions-System eingesetzt werden.

7. Literaturverzeichnis

- Baliga, N. S. and S. DasSarma.** "Saturation mutagenesis of the TATA box and upstream activator sequence in the haloarchaeal bop gene promoter." Journal of Bacteriology 181.8 (1999): 2513-18.
- Baliga, N. S. and S. DasSarma.** "Saturation mutagenesis of the haloarchaeal bop gene promoter: identification of DNA supercoiling sensitivity sites and absence of TFB recognition element and UAS enhancer activity." Molecular Microbiology 36.5 (2000): 1175-83.
- Baliga, N. S. et al.** "Is gene expression in Halobacterium NRC-1 regulated by multiple TBP and TFB transcription factors?" Molecular Microbiology 36.5 (2000): 1184-85.
- Baliga, N. S. et al.** "Genomic and genetic dissection of an archaeal regulon." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98.5 (2001): 2521-25.
- Baliga, N. S. et al.** "Coordinate regulation of energy transduction modules in Halobacterium sp analyzed by a global systems approach." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99.23 (2002): 14913-18.
- Banga, J.P., Suleyman, S., Kasp, E., Brown, E., LeRoy, F., Sanders, M., Dumonde, D.:** Immunoaffinity purification of S-antigen using monoclonal antibodies to different antigenic sites. Invest Ophthalmol Vis Sci 28, (1987) 604-607.
Biochemistry 23, (1984) 5054-5061.
- Betlach, M. et al.** "Characterization of A Halobacterial Gene Affecting Bacterio-Opsin Gene-Expression." Nucleic Acids Research 12.20 (1984): 7949-59.
- Betlach, M. C. and F. Gropp.** "The Bop Gene-Cluster of Halobacterium-Halobium." Systematic and Applied Microbiology 16.4 (1994): 712-15.
- Betlach, M. C., D. Leong, and H. W. Boyer.** "Bacterioopsin Gene-Expression in Halobacterium-Halobium." Systematic and Applied Microbiology 7.1 (1986): 83-89.
- Betlach, M. C., R. F. Shand, and D. M. Leong.** "Regulation of the Bacterio-Opsin Gene of A Halophilic Archaeobacterium." Canadian Journal of Microbiology 35.1 (1989): 134-40.

- Bobovnikova, Y. et al.** "Restriction Mapping the Genome of Halobacterium-Halobium Strain Nrc-1." Systematic and Applied Microbiology 16.4 (1994): 597-604.
- Bohmer & Enderlein:** "Fluorescence spectroscopy of single molecules under ambient conditions: methodology and technology." Chemphyschem 4(8) (2003):793-808.
- Borhan et al.:** "Movement of retinal along the visual transduction path." Science 288(5474) (2000): 2209-12.
- Bowie, J.U., Luthy, R., Eisenberg, D.:** "A method to indentify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure." Science 253, (1991) 164-170.
- Brannock, M. T., K. Weng, and P. R. Robinson.:** "Rhodopsin's carboxyl-terminal threonines are required for wild-type arrestin-mediated quench of transducin activation in vitro." Biochemistry 38.12 (1999): 3770-77.
- Broekhuysse, R.M. & Bessems, H.J.:** The molecular weight of bovine retinal S-antigen. Exp Eye Res 40, (1985) 763-766.
- Buczylko, J. & Palczewski, K.:** "Purification of arrestin from bovine retinas." Methods Neurosci 15, (1993) 226-236.
- Cardoza:** "Hairpin configuration of H-2Kk in liposomes formed by detergent dialysis." Biochemistry 23(19) (1984):4401-9.
- Chuang, J. Z. et al.:** "Structural and functional impairment of endocytic pathways by retinitis pigmentosa mutant rhodopsin-arrestin complexes." J Clin.Invest 114.1 (2004) 131-40.
- Daemen, F.J.:** "Vertebrate rod outer segment membranes." Biochim Biophys Acta 300, (1973) 255-288.
- DasSarma, S. and P. Arora.** "Genetic analysis of the gas vesicle gene cluster in haloarchaea." Fems Microbiology Letters 153.1 (1997): 1-10.
- DasSarma, S. et al.** "Genomic perspective on the photobiology of Halobacterium species NRC-1, a phototrophic, phototactic, and UV-tolerant haloarchaeon." Photosynthesis Research 70.1 (2001): 3-17.
- Dawis, S.M., Graeff, R.M., Heyman, R.A., Walseth, T.F., Goldberg, N.D.:** "Regulation of cyclic GMP metabolism in toad photoreceptors. Definition of the metabolic events subserving photoexcited and attenuated states." J Biol Chem 263, (1988) 8771-8785.
- Emeis, D. & Hofmann, K.P.:** "Shift in the relation between flash-induced metarhodopsin I and metarhodopsin II within the first 10% rhodopsin bleaching in bovine disc membranes." FEBS Lett 136, (1981) 201-207.

- Emeis, D., Kühn, H., Reichert, J., Hofmann, K.P.:** "Complex formation between metarhodopsin II and GTP-binding protein in bovine photoreceptor membranes leads to a shift of the photoproduct equilibrium." FEBS Lett 143, (1982) 29-34.
- Emr, S.D.:** Heterologous gene expression in yeast. Methods Enzymol 185, (1990) 231-233.
- Erhard, E. & Hollenberg, C.P.:**"The presence of a defective LEU2 gene on 2 mu DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number." J Bacteriol 156, (1983) 625-635.
- Falke et al.:** "Structure of a bacterial sensory receptor. A site-directed sulfhydryl study." J Biol Chem. 263 (29) (1988):14850-8.
- Fotiadis et al.:** "The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane." FEBS Lett. 564(3) (2004): 281-8.
- Fotiadis et al.:** "Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes." Nature. 421(6919) (2003):127-8.
- Fuchs, S., Nakazawa, M., Maw, M., Tamai, M., Oguchi, Y., Gal, A.:** "A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese." Nat Genet 10, (1995) 360-362.
- Fukuda, M.N., Papermaster, D.S., Hargrave, P.A.:** "Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH₂ terminus." J Biol Chem 254, (1979) 8201-8207.
- Fung, B.K., Hurley, J.B., Stryer, L.:** "Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision." Proc Natl Acad Sci U S A 78, (1981) 152-156.
- Gibson, S.K., Parkes, J.H., Liebman, P.A.:** "Phosphorylation stabilizes the active conformation of rhodopsin." Biochemistry 37, (1998) 13910
- Gibson et al.:** "Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin." Biochemistry 39(19) (2000):5738-49.
- Goo, Y. A. et al.** "Proteomic analysis of an extreme halophilic archaeon, Halobacterium sp. NRC-1." Molecular & Cellular Proteomics 2.8 (2003): 506-24.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., Büldt, G.:** "X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments." Nature 391, (1998) 918-921.
- Gropp, F. and M. C. Betlach.** "The Bat Gene of Halobacterium-Halobium Encodes A Trans-Acting Oxygen Inducibility Factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91.12 (1994): 5475-79.

- Gropp, F., R. Gropp, and M. C. Betlach.** "A 4th Gene in the Bop Gene-Cluster of Halobacterium-Halobium Is Coregulated with the Bop Gene." Systematic and Applied Microbiology 16.4 (1994): 716-24.
- Gropp, F., R. Gropp, and M. C. Betlach.** "Effects of Upstream Deletions on Light-Regulated and Oxygen-Regulated Bacterioopsin Gene-Expression in Halobacterium-Halobium." Molecular Microbiology 16.2 (1995): 357-64.
- Gurevich, V. V. and E. V. Gurevich.:** "The molecular acrobatics of arrestin activation." Trends in Pharmacological Sciences 25.2 (2004): 105-11.
- Gurevich, V. V. and E. V. Gurevich.:** "The new face of active receptor bound minireview arrestin attracts new partners." Structure 11.9 (2003): 1037-42.
- Gurevich, V.V. & Benovic, J.L.:** Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. J Biol Chem 268, (1993a) 11628-11638.
- Gurevich, V.V., Chen, C.Y., Kim, C.M., Benovic, J.L.:** Visual arrestin binding to rhodopsin. Intramolecular interaction between the basic N terminus and acidic C terminus of arrestin may regulate binding selectivity. J Biol Chem 269, 8(1994) 721-8727.
- Gurevich, V.V.:** The selectivity of visual arrestin for light-activated phosphorhodopsin is controlled by multiple nonredundant mechanisms. J Biol Chem 273, (1998) 15501-15506.
- Han, M. et al.:** "Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 angstrom: Possible mechanism of receptor binding and membrane translocation." Structure 9.9 (2001) 869-80.
- Hargrave, P.A., Hamm, H.E., Hofmann, K.P.:** "Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin." Bioessays 15, (1993) 43-50.
- Heck et al.:** "Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin-containing membranes and soluble proteins." Methods Enzymol. 315 (2000):329-47.
- Hill & Dixon:** "Azotobacter vinelandii NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch." Proc Natl Acad Sci U S A. 93(5) (1996):2143-8.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., Sigler, P.B.:** "The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: A model for arrestin's regulation." Cell 97.2 (1999) 257-69.
- Hofmann & Schleicher:** "Kinetic study on the equilibrium between membrane-bound and free photoreceptor G-protein." J Membr Biol. (3) (1987):271-81.

- Hofmann, K.P., Pulvermuller, A., Buczylko, J., Van Hooser, P., Palczewski, K.:** "The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin." J Biol Chem 267, (1992) 15701-15706.
- Hofmann, K.P.:** "Photoproducts of rhodopsin in the disk membrane." Photochem. Photobiophys 13, (1986) 309-327.
- Jones, E. W.:** "Tackling the Protease Problem in *Saccharomyces cerevisiae*." Methods Enzymol 194, (1991) 428-453.
- Kennedy et al.:** "Genome sequence of Halobacterium species NRC-1." Proc Natl Acad Sci U S A. 97(22) (2000):12176-81.
- Kibelbek, J., Mitchell, D.C., Beach, J.M., Litman, B.J.:** "Functional equivalence of metarhodopsin II and the Gt-activating form of photolyzed bovine rhodopsin." Biochemistry 30, (1991) 6761-6768.
- Kinney, M.S., Fisher, S.K.:** "The photoreceptors and pigment epithelium of the larval *Xenopus* retina: morphogenesis and outer segment renewal." Proc R Soc Lond B Biol Sci 201, (1978) 149-167.
- Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., Schepers, T., Hamm, H.E., Benovic, J.L.:** Arrestin-rhodopsin interaction. Multi-site binding delineated by peptide inhibition. J Biol Chem 269, (1994) 3226-3232.
- Kühn, H., Cook, J.H., Dreyer, W.J.:** "Phosphorylation of rhodopsin in bovine photoreceptor membranes. A dark reaction after illumination." Biochemistry 12, (1973) 2495-2502.
- Kühn, H., Hall, S.W., Wilden, U.:** Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin. FEBS Lett 176, (1984) 473-478.
- Kühn, H.:** "Light- and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor membranes." Nature 283, (1980) 587-589.
- Leong, D., M. Betlach, and H. Boyer.** "Bacterioopsin Gene-Expression." Journal of Cellular Biochemistry (1987): 54.
- Leong, D., H. Boyer, and M. Betlach.** "Transcription of Genes Involved in Bacterio-Opsin Gene-Expression in Mutants of A Halophilic Archaeobacterium." Journal of Bacteriology 170.10 (1988): 4910-15.
- Leong, D. et al.** "Characterization of A 2Nd Gene Involved in Bacterio-Opsin Gene-Expression in A Halophilic Archaeobacterium." Journal of Bacteriology 170.10 (1988): 4903-09.

- Macreadie, I. G., Horaitis, O., Verkuylen, A.J., Savin, K.W.:** "Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu²⁺-mediated expression of foreign genes in yeast." Gene 104, (1991) 107-111.
- Medina, A.M., Schwille P.:** "Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in Biology." BioEssays 24.8, (2002) 758-764
metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions "
- Milano et al.:** "Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis." Biochemistry 41(10) (2002): 3321-8.
- Miyatake et al.:** "Iron coordination structures of oxygen sensor FixL characterized by Fe K-edge extended x-ray absorption fine structure and resonance raman spectroscopy." J Biol Chem. 274(33) (1999):23176-84.
- Moehle, C.M., Aynardi, M.W., Kolodny, M.R., Park, F.J., Jones, E.W.:** ProteaseB of *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation and regulation of the PRB1 structural gene. Genetics 115, (1987) 255-263.
- Müller, F. & Kaupp, U.B.:** "Signaltransduktion in Sehzellen." Naturwissenschaften 85, (1998) 49-61.
- Nakamachi, Y., Nakamura, M., Fujii, S., Yamamoto, M., Okubo, K.:** "Oguchi disease with sectoral retinitis pigmentosa harboring adenine deletion at position 1147 in the arrestin gene." Am J Ophthalmol 125, (1998) 249-251.
- Nakamura, M. et al.:** "Novel mutations in the arrestin gene and associated clinical features in Japanese patients with Oguchi's disease." Ophthalmology 111.7 (2004) 1410-14.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Johnson, R.S.:** "Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites." Biochemistry 32, (1993a) 5718-5724.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Walsh, K.A., Johnson, R.S.:** Topographic study of arrestin using differential chemical modifications and hydrogen/deuterium exchange. Protein Sci 3, (1994) 2428-2434.
- Onorato, J.J., Palczewski, K., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Benovic, J.L.:** "Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase." Biochemistry 30, (1991) 5118-5125.
- Ovchinnikov, I., Abdulaev, N.G., Feigina, M.I., Artamonov, I.D., Bogachuk, A.S.:** [Visual rhodopsin. III. Complete amino acid sequence and topography in a membrane]. Bioorg Khim 9, (1983) 1331-1340.

- Ovchinnikov, Y., Abdulaev, N.G., Bogachuk, A.S.:** "Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitoylated." FEBS Lett (1988) 230, 1-5.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Imami, N.R., McDowell, J.H., Hargrave, P.A.:** Role of the carboxyl-terminal region of arrestin in binding to phosphorylated rhodopsin. J Biol Chem 266, (1991c) 15334-15339.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Kaplan, M.W., Polans, A.S., Crabb, J.W.:** "Mechanism of rhodopsin kinase activation." J Biol Chem 266, (1991a) 12949-12955.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R.S., Carr, S.A., Crabb, J.W., Kaplan, M.W., Johnson, R.S., Walsh, K.A.:** "Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments." Protein Sci 3, (1994a) 314-324.
- Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Hofmann, K.P.:** "Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin." J Biol Chem 266, (1991b) 18649-18654.
- Palczewski, K., Riazance-Lawrence, J.H., Johnson, W.C.J.:** "Structural properties of arrestin studied by chemical modification and circular dichroism." Biochemistry 31, (1992b) 3902-3906.
- Palczewski, K.:** Structure and functions of arrestins. Protein Sci 3, (1994b) 1355-1361.
- Parkes et al.:** "Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II equilibrium and the binding of metarhodopsin II to G protein in rod disk membranes." Biochemistry. 38(21) (1999):6862-78.
- Peck et al.:** "brp and blh are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in Halobacterium salinarum." J Biol Chem. 276(8) (2001):5739-44.
- Pepperberg, D.R., Kahlert, M., Krause, A., Hofmann, K.P.:** "Photolytic modulation of a highly sensitive, near-infrared light-scattering signal recorded from intact retinal photoreceptors." Proc Natl Acad Sci U S A 85, (1988) 5531-5535.
- Pfeifer, F. and M. Betlach.** "Genome Organization in Halobacterium-Halobium - A 70 Kb Island of More (At) Rich Dna in the Chromosome." Molecular & General Genetics 198.3 (1985): 449-55.
- Pfeifer, F. A., H. W. Boyer, and M. C. Betlach.** "Restoration of Bacteriorhodopsin Gene-Expression in A Revertant of Halobacterium-Halobium." Journal of Bacteriology 164.1 (1985): 414-20.
- Pulvermuller, A. et al.:** "Interactions of metarhodopsin II - Arrestin peptides compete with arrestin and transducin." Journal of Biological Chemistry 275.48 (2000) 37679-85.

- Pulvermuller, A., Maretzki, D., Rudnicka-Nawrot, M., Smith, W.C., Palczewski, K., Hofmann, K.P.:** "Functional differences in the interaction of arrestin and its splice variant, p44, with rhodopsin." Biochemistry 36, (1997) 9253-9260.
- Raman, D. et al.:** "The interaction with the cytoplasmic loops of rhodopsin plays a crucial role in arrestin activation and binding." Journal of Neurochemistry 84.5 (2003): 1040-50.
- Raman, D., S. Osawa, and E. R. Weiss.:** "Binding of arrestin to cytoplasmic loop mutants of bovine rhodopsin." Biochemistry 38.16 (1999): 5117-23.
- Schleicher, A. & Hofmann, K.P.:** "Kinetic study on the equilibrium between membrane-bound and free photoreceptor G-protein." J Membr Biol 95, (1987) 271-281.
- Schleicher, A., Kühn, H., Hofmann, K.P.:** "Kinetic, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein- rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II." Biochemistry 28, (1989) 1770-1775.
- Schroder, K., A. Pulvermuller, and K. P. Hofmann.:** "Arrestin and its splice variant Arr(1-370A) (P-44) - Mechanism and biological role of their interaction with rhodopsin." Journal of Biological Chemistry 277.46 (2002): 43987-96.
- Shand, R. F. and M. C. Betlach.** "Expression of the Bop Gene-Cluster of Halobacterium-Halobium Is Induced by Low Oxygen-Tension and by Light." Journal of Bacteriology 173.15 (1991): 4692-99.
- Shand, R. F. and M. C. Betlach.** "Bop Gene-Cluster Expression in Bacteriorhodopsin-Overproducing Mutants of Halobacterium-Halobium." Journal of Bacteriology 176.6 (1994): 1655-60.
- Shilton, B. H. et al.:** "The solution structure and activation of visual arrestin studied by small-angle X-ray scattering." E. Journal of Biochemistry 269.15 (2002) 3801-09
- Shinohara et al.:** "Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein)." Proc Natl Acad Sci U S A. 84(20) (1987):6975-9.
- Simsek, M. et al.** "A Transposable Element from Halobacterium-Halobium Which Inactivates the Bacteriorhodopsin Gene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences 79.23 (1982): 7268-72.
- Smith, W. C. et al.:** "The surface of visual arrestin that binds to rhodopsin." Mol Vis. 10 (2004): 392-98.
- Smith, W.C., McDowell, J.H., Dugger, D.R., Miller, R., Arendt, A., Popp, M.P., Hargrave, P.A.:** "Identification of regions of arrestin that bind to rhodopsin." Biochemistry 38, (1999) 2752-2761.

- Steinberg, R.H., Fisher, S.K., Anderson, D.H.:** "Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors." J Comp Neurol 190, (1980) 501-508.
- Stryer L.:** "Biochemie." (1996) 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- Taylor & Zhulin:** "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev. 63(2) (1999):479-506.
- Vinos et al.:** "A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function." Science 1;277(5326) (1997):687-90.
- Vishnivetskiy, S. A. et al.:** "An additional phosphate-binding element in arrestin molecule - Implications for the mechanism of arrestin activation." Journal of Biological Chemistry 275.52 (2000) 41049-57.
- Vishnivetskiy, S. A. et al.:** "Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge." Journal of Biological Chemistry 277.46 (2002): 43961-67.
- Vishnivetskiy, S. A. et al.:** "Mapping the arrestin-receptor interface - Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins." Journal of Biological Chemistry 279.2 (2004): 1262-68.
- Vishnivetskiy, S. K. et al.:** "How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin?" Journal of Biological Chemistry 274.17 (1999) 11451-54.
- Voss, S. & Skerra, A.:** 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, (1997) 975-982.
- Wald, G. & Brown, P.K.:** "Human rhodopsin." Science 127, (1958) 222-226.
- Wald, G. & Brown, P.K.:** "The molar extinction of rhodopsin." J Gen Physiol 37, (1953) 189-200.
- Wald, G.:** "The molecular basis of visual excitation." Nature 219, (1968) 800-807.
- Weyand, I. & Kühn, H.:** Subspecies of arrestin from bovine retina. Equal functional binding to photoexcited rhodopsin but various isoelectric focusing phenotypes in individuals. Eur J Biochem 193, (1990) 459-467.
- Wilden, U.:** "Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding." Biochemistry 34, (1995) 1446-1454.
- Wilson & Copeland:** "Spectroscopic characterization of arrestin interactions with competitive ligands: study of heparin and phytic acid binding." J Protein Chem. 16(8) (1997):755-63.

- Yang, C. F. and S. DasSarma.** "Transcriptional Induction of Purple Membrane and Gas Vesicle Synthesis in the Archaeobacterium Halobacterium-Halobium Is Blocked by A Dna Gyrase Inhibitor." Journal of Bacteriology 172.7 (1990): 4118-21.
- Yang, C. F. et al.** "Genetic and topological analyses of the bop promoter of Halobacterium halobium: Stimulation by DNA supercoiling and non-B-DNA structure." Journal of Bacteriology 178.3 (1996): 840-45.
- Yoshizawa, T. & Shichida, Y.:** "Low-temperature spectrophotometry of intermediates of rhodopsin." Methods Enzymol 81, (1982) 333-354.

8. Anhang

8.1. Aminosäuresequenz von Arrestin aus dem Rinderauge

Die Aminosäuren Ser 60, Cys 63, Gly 68, Ser 106, Ala 113, Pro 117, Cys 128, Cys 143, Ser 169, Val 244 und Pro 352 sind im Zeichenformat "fett" hervorgehoben.

```

1/1                               31/11
atg aag gcc aat aag ccc gca cca aac cac gtt atc ttc aag aag
atc tcc cgt gat aaa
Met lys ala asn lys pro ala pro asn his val ile phe lys lys
ile ser arg asp lys
61/21                               91/31
tcg gtg acc atc tac ctg ggg aag aga gat tac ata gac cac gtt
gaa cga gta gag cct
ser val thr ile tyr leu gly lys arg asp tyr ile asp his val
glu arg val glu pro
121/41                               151/51
gtg gat ggc gtc gtg ctg gtg gat cct gag ctc gtg aag ggc aag
aga gtg tac gtg tct
val asp gly val val leu val asp pro glu leu val lys gly lys
arg val tyr val ser
181/61                               211/71
ctg acg tgt gcc ttc cgc tac ggc cag gaa gac atc gac gtg atg
ggc ctc agc ttc cgc
leu thr cys ala phe arg tyr gly gln glu asp ile asp val met
gly leu ser phe arg
241/81                               271/91
agg gac ctc tac ttc tcc cag gtc cag gtg ttc cct ccc gtg ggg
gcc tcg ggc gcc acc

```

Anhang

arg asp leu tyr phe ser gln val gln val phe pro pro val gly
ala ser gly ala thr

301/101

331/111

acg agg ctg cag gag **agc** ctc atc aag aag ctg ggg **gcc** aac acc
tac ccc ttc ctg ctc

thr arg leu gln glu **ser** leu ile lys lys leu gly **ala** asn thr
tyr pro phe leu leu

361/121

391/131

acg ttt **cct** gac tac ttg ccc **tgt** tcg gtg atg ctg cag cca gct
ccg caa gat gtg ggc

thr phe **pro** asp tyr leu pro **cys** ser val met leu gln pro ala
pro gln asp val gly

421/141

451/151

aag agc **tgt** ggg gtc gac ttt gag atc aaa gca ttc gcc acg cac
agc aca gat gtg gaa

lys ser **cys** gly val asp phe glu ile lys ala phe ala thr his
ser thr asp val glu

481/161

511/171

gag gac aaa att ccc aag aag agc **tcc** gtg cgt ttg ctg atc cgg
aag gta cag cac gcg

glu asp lys ile pro lys lys ser **ser** val arg leu leu ile arg
lys val gln his ala

541/181

571/191

cca cgc gat atg ggt ccc cag ccc cga gcc gag gcc tcc tgg cag
ttc ttc atg tcg gac

pro arg asp met gly pro gln pro arg ala glu ala ser trp gln
phe phe met ser asp

601/201

631/211

aag ccc ctg cgc ctc gcc gtc tcg ctc agc aaa gag atc tat tac
cac ggg gaa ccc att

lys pro leu arg leu ala val ser leu ser lys glu ile tyr tyr
his gly glu pro ile

661/221

691/231

cct gtg acc **gtg** gcc gtg acc aac agc aca gag aag aca gtg aag
aag att aaa gtg cta

Anhang

pro val thr **val** ala val thr asn ser thr glu lys thr val lys
lys ile lys val leu

721/241

751/251

gtg gag caa gtg acc aac gtg gtt ctc tac tcg agt gat tat tac
atc aag acg gtg gct

val glu gln val thr asn val val leu tyr ser ser asp tyr tyr
ile lys thr val ala

781/261

811/271

gcc gag gaa gca cag gaa aaa gtg ccg cca aac agc tcg ctg acc
aag acg ctg acg ctg

ala glu glu ala gln glu lys val pro pro asn ser ser leu thr
lys thr leu thr leu

841/281

871/291

gtg ccc ttg ctg gcc aac aac cgt gag aga agg ggc atc gcc ctg
gat ggg aaa atc aag

val pro leu leu ala asn asn arg glu arg arg gly ile ala leu
asp gly lys ile lys

901/301

931/311

cac gag gac acg aac ctg gcc tcc agc acc atc ata aag gag gga
ata gac aag acc gtc

his glu asp thr asn leu ala ser ser thr ile ile lys glu gly
ile asp lys thr val

961/321

991/331

atg ggg atc ctg gtg tct tac cag atc aag gtg aag ctc acg gtg
tca ggc ctt ctg gga

met gly ile leu val ser tyr gln ile lys val lys leu thr val
ser gly leu leu gly

1021/341

1051/351

gag ctc aca tcc agt gaa gtg gcc act gag gtg **ccg** ttc cgc ctc
atg cat ccc cag cca

glu leu thr ser ser glu val ala thr glu val **pro** phe arg leu
met his pro gln pro

1081/361

1111/371

gag gac cca gat acc gcc aag gaa agt ttt cag gat gaa aat ttt
gtt ttt gag gag ttt

glu asp pro asp thr ala lys glu ser phe gln asp glu asn phe
val phe glu glu phe

1141/381

1171/391

gct cgc caa aat ctg aaa gat gca gga gaa tat aag gaa gag aag
aca gac cag gag gcg

ala arg gln asn leu lys asp ala gly glu tyr lys glu glu lys
thr asp gln glu ala

1201/401

gct atg gat gag tga

ala met asp glu OPA

8.2. Aminosäuresequenz von Bat aus *H. salinarum*

Die Aminosäure His 206 ist im Zeichenformat "fett" hervorgehoben.

1/1

31/11

atg acg agc gtc cag aac acc gag tcc gag acc gcc gcc ggc gcg acg
acg atc ggc gtg

Met thr ser val gln asn thr glu ser glu thr ala ala gly ala thr
thr ile gly val

61/21

91/31

ttg ttc gcg ggc agc gac ccg gag acg ggg ccg gct gcc tgt gac ctc
gac gag gac ggc

leu phe ala gly ser asp pro glu thr gly pro ala ala cys asp leu
asp glu asp gly

121/41

151/51

cgg ttc gac gtg acc cag att cgt gat ttc gta gcc gca cgc gat cgc
gtc gac gat ccc

arg phe asp val thr gln ile arg asp phe val ala ala arg asp arg
val asp asp pro

181/61

211/71

gac atc gac tgt gtg gtc gcc gtc cac gaa ccg gat ggc ttc gac ggc
gtg gcg ttc ctg

Anhang

asp ile asp cys val val ala val his glu pro asp gly phe asp gly
val ala phe leu

241/81

271/91

gaa gca gtc cga cag acc cac gcg gag ttc ccg gtc gtg gtc gtg ccg
aca gcc gtc gac

glu ala val arg gln thr his ala glu phe pro val val val val pro
thr ala val asp

301/101

331/111

gag gac gtt gcg cgg cgc gcc gtc gac gcc gac gcg acg ggg ctg gtg
ccg gcg gtg tcc

glu asp val ala arg arg ala val asp ala asp ala thr gly leu val
pro ala val ser

361/121

391/131

gag gac gcg acc gcg gcg atc gcc gac cgc atc gag cag agc gcg ccc
gcc cac tcc gag

glu asp ala thr ala ala ile ala asp arg ile glu gln ser ala pro
ala his ser glu

421/141

451/151

gac acc gag acg cgg atg ccg atc tcc gac ctg acc gtg gag tcc gag
cgc cgc ctc aaa

asp thr glu thr arg met pro ile ser asp leu thr val glu ser glu
arg arg leu lys

481/161

511/171

gag caa gcc ctc gac gag gcc ccg atc ggg atc acg atc tcg gac gcc
acc gac ccg gaa

glu gln ala leu asp glu ala pro ile gly ile thr ile ser asp ala
thr asp pro glu

541/181

571/191

gag ccg atc atc tac atc aac gac tcc ttc gag gac atc acg ggg tat
tcg ccc gac gag

glu pro ile ile tyr ile asn asp ser phe glu asp ile thr gly tyr
ser pro asp glu

601/201

631/211

gtc gtg ggc gcg aac **cac** cgc ttc ctc cag gga ccg aag acc aac gaa
gag ccg cgt ggc

Anhang

val val gly ala asn **his** arg phe leu gln gly pro lys thr asn glu
glu pro arg gly

661/221

691/231

ggg ttc tgg acc gcg atc acc gag gac cac gac acc cag gtc gtg ttg
cgg aac tac cgc

gly phe trp thr ala ile thr glu asp his asp thr gln val val leu
arg asn tyr arg

721/241

751/251

cgc gac ggg tcg ctg ttc tgg aac cag gtg gac atc agc ccg atc tac
gac gag gac ggc

arg asp gly ser leu phe trp asn gln val asp ile ser pro ile tyr
asp glu asp gly

781/261

811/271

acc gtc tca cac tac gtc ggg ttc cag atg gac gtc tcc gag cgc atg
gct gcc caa cag

thr val ser his tyr val gly phe gln met asp val ser glu arg met
ala ala gln gln

841/281

871/291

gag ctg cag ggg gaa cgc cag tcc ctg gat cga ctg ctg gac cgc gtg
aac ggc ctg atg

glu leu gln gly glu arg gln ser leu asp arg leu leu asp arg val
asn gly leu met

901/301

931/311

aac gat gtc acg tcg gcg tta gtg cgg gcg gcc gac cgg gag gag atc
gaa act cgg atc

asn asp val thr ser ala leu val arg ala ala asp arg glu glu ile
glu thr arg ile

961/321

991/331

acc gac cgc atc ggc acc ggc ggc gag tac gcc ggc gcg tgg ttc ggg
cgg tac gac gcg

thr asp arg ile gly thr gly gly glu tyr ala gly ala trp phe gly
arg tyr asp ala

1021/341

1051/351

acc gag gac acg atc acg gtc gcg gag gca gcg ggg gac tgt gag gga
tgc gac ggc gac

Anhang

thr glu asp thr ile thr val ala glu ala ala gly asp cys glu gly
cys asp gly asp

1081/361

1111/371

gtc ttc gat ctc gcg tcc gcc ggc gag gcc gtc gcg ttg ctt cag gac
gtc gtc gag cag

val phe asp leu ala ser ala gly glu ala val ala leu leu gln asp
val val glu gln

1141/381

1171/391

cgc gaa gcg ctc gtg agc acg gac gcc gac ggc gtc tcc ggg acc gcc
gac ggc gac gcg

arg glu ala leu val ser thr asp ala asp gly val ser gly thr ala
asp gly asp ala

1201/401

1231/411

tgc gtg ctg gtg ccg gtc acg tac cgg tcg acg acc tac ggc gtg ctc
gcc gtg tcg acc

cys val leu val pro val thr tyr arg ser thr thr tyr gly val leu
ala val ser thr

1261/421

1291/431

gcc gaa cac cgc atc gac gac cgc gaa cag gtg ttg ttg cgc tcg ctt
ggc cgc acg acc

ala glu his arg ile asp asp arg glu gln val leu leu arg ser leu
gly arg thr thr

1321/441

1351/451

ggc gcg tcg atc aac gac gcg ttg acc cgg cgc acc atc gcc acg gac
acc gtg ttg aac

gly ala ser ile asn asp ala leu thr arg arg thr ile ala thr asp
thr val leu asn

1381/461

1411/471

atc ggc gtc gag ctg tcc gat acg gcg ctg ttc ctg gtt gag ttg gcg
ggg gcg aca gac

ile gly val glu leu ser asp thr ala leu phe leu val glu leu ala
gly ala thr asp

1441/481

1471/491

acc acc ttc gag cag gag gcg acg atc gcg gac agc cag acg cag ggc
gtg ctc atg ctc

Anhang

thr thr phe glu gln glu ala thr ile ala asp ser gln thr gln gly
val leu met leu

1501/501

1531/511

gtg aca acg cca cac gac gac ccc cag gcg gtc gtc gac acc gcg ttg
ggc tac gac gcc

val thr thr pro his asp asp pro gln ala val val asp thr ala leu
gly tyr asp ala

1561/521

1591/531

gtc cag gac gcc gag gtc atc gtc tcg acc gac gac gag agc gtg gtg
cag ttc gat ctg

val gln asp ala glu val ile val ser thr asp asp glu ser val val
gln phe asp leu

1621/541

1651/551

tcg agt tcg ccg ctg gtg gac gtg ctc tcc gag tgt ggg agc cgg gtc
atc cgc atg cac

ser ser ser pro leu val asp val leu ser glu cys gly ser arg val
ile arg met his

1681/561

1711/571

gcc gac cgg acg acg ctg gag ctc gac gtc cgg gtc gga acc gag ggg
gcg gcg cgg cgg

ala asp arg thr thr leu glu leu asp val arg val gly thr glu gly
ala ala arg arg

1741/581

1771/591

gtg ttg agc acg ttg cgg gac aag tac gcc gac gtg gag ctg gtc gcg
tac cac gag gac

val leu ser thr leu arg asp lys tyr ala asp val glu leu val ala
tyr his glu asp

1801/601

1831/611

gat ccc gag cag acc ccg cat ggg ttc cgc gag gag ttg cgc aac gac
ctg act gac cgg

asp pro glu gln thr pro his gly phe arg glu glu leu arg asn asp
leu thr asp arg

1861/621

1891/631

cag ctc acc gcc ctc cag aag gcg tac gtg agc ggc tac ttc gag tgg
ccg cgg cgc gcg

gln leu thr ala leu gln lys ala tyr val ser gly tyr phe glu trp
pro arg arg ala

1921/641

1951/651

gag ggc aag cag ctc gcg gag tcg atg gat atc gtg ccg tcg acg tac
cac cag cat ctg

glu gly lys gln leu ala glu ser met asp ile val pro ser thr tyr
his gln his leu

1981/661

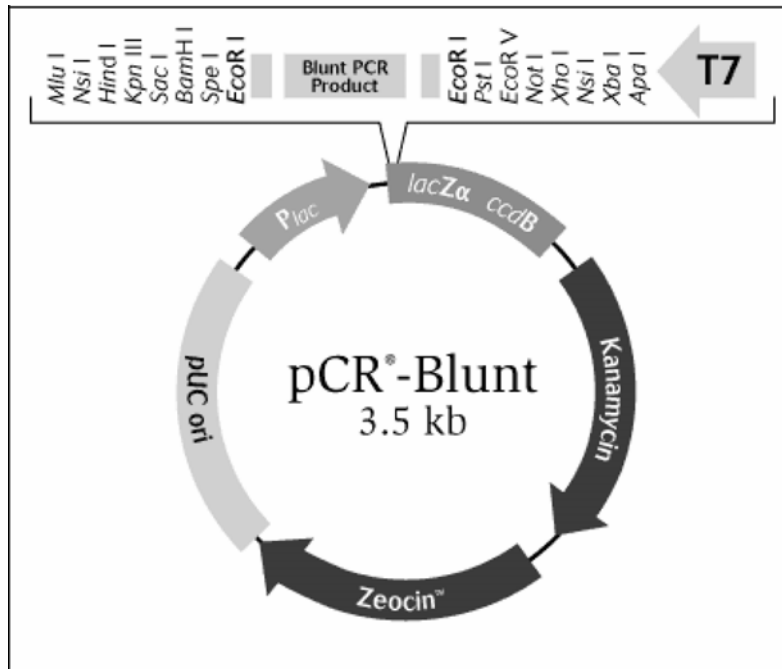
2011/671

cag gct gcc aag cag aag ctc gtc ggc gcg ttc ttc gag gag tga
gln ala ala lys gln lys leu val gly ala phe phe glu glu OPA

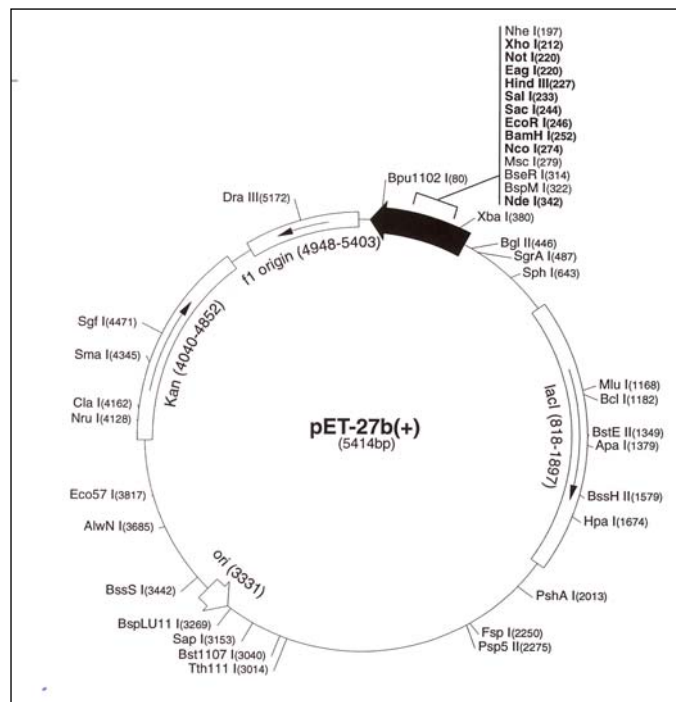
Die Aminosäuresequenzen wurden im Ein- und Dreibuchstabencode nach den Regeln der „IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature“ angegeben (Eur. J. Biochem. 5 [1968], 151-153).

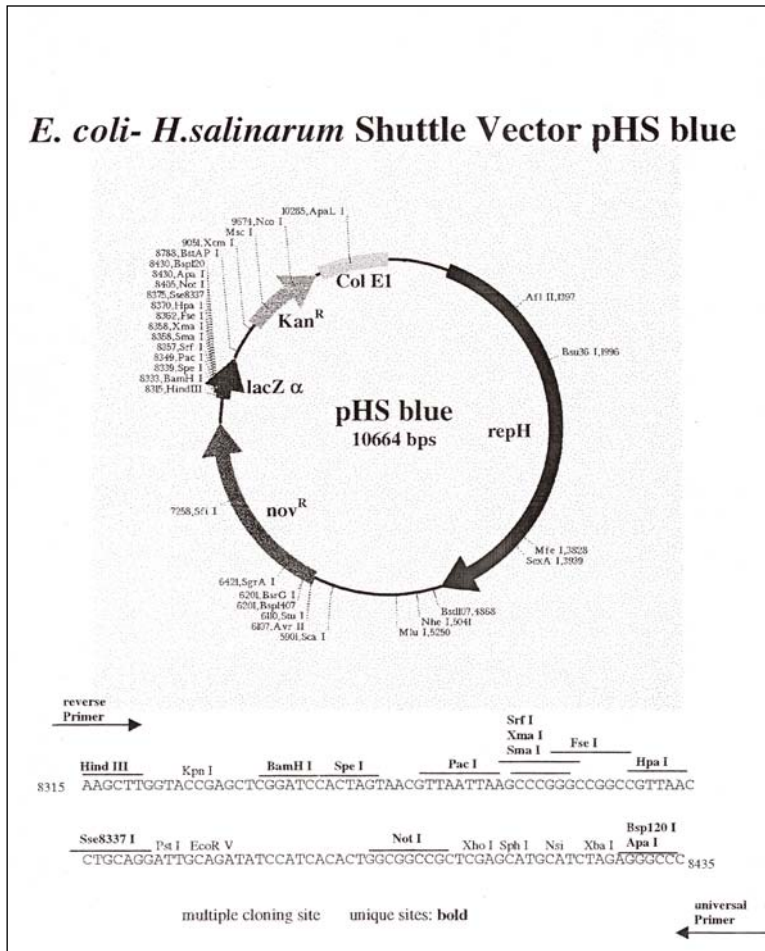
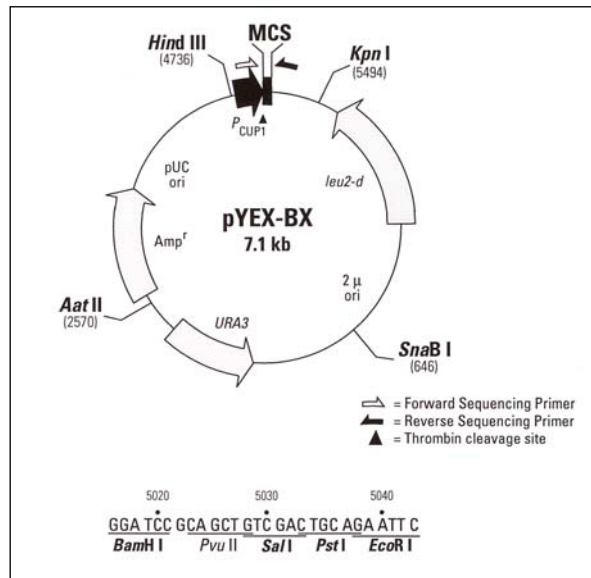
8.3. Plasmide und Vektoren

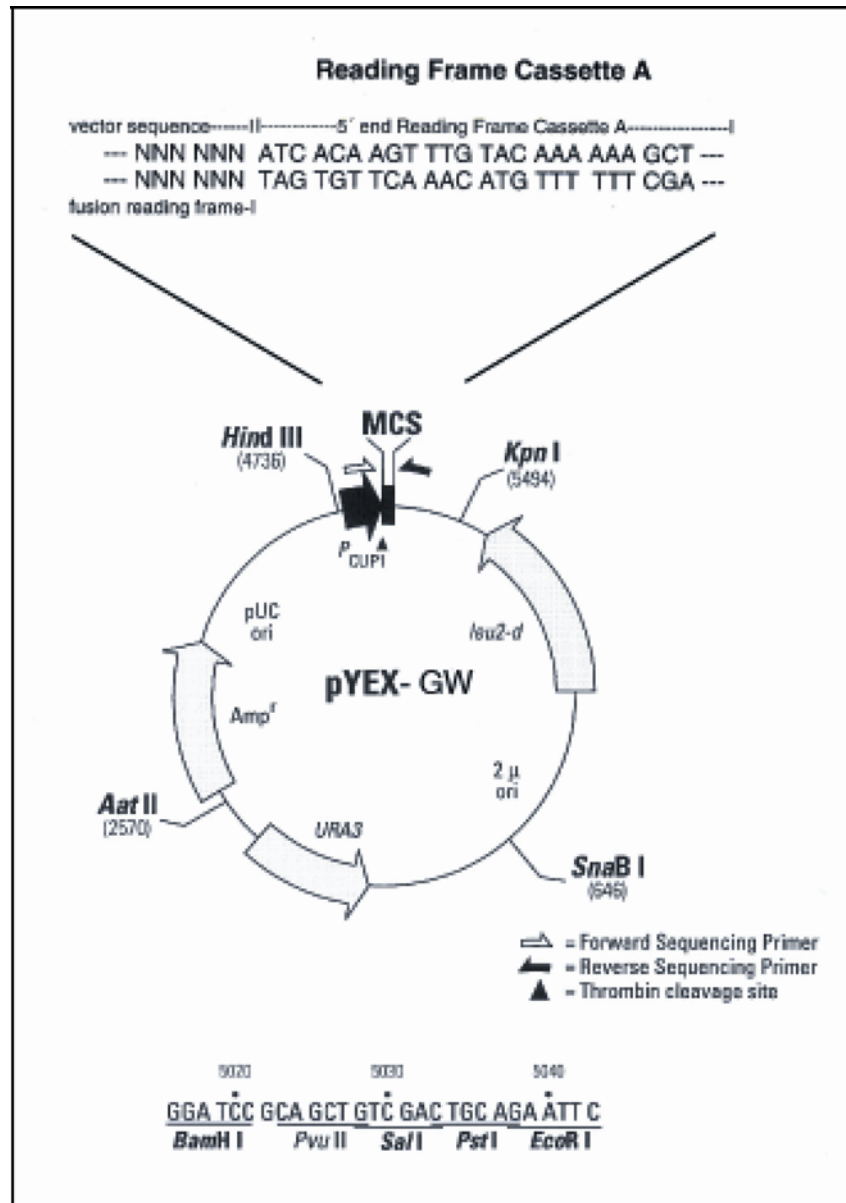
8.3.1. Klonierungsvektor



8.3.2. Expressionsvektoren







8.4. Abkürzungen

3D	dreidimensional
48K	Arrestin
A	Adenosin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxy-Nukleosid Triphosphat
EDTA	N, N-Ethylendiamintetraacetat
E	Eluat
F	Durchfluss
g	Gramm
G	Guanosin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GuCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxysäure

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IMAC	Immobilised Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalaktosid
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LiAc	Lithiumacetat
L	Lysat
M	Molar
min	Minute
N-	Amino-
NADPH	Nikotinadenindinukleotidphosphat
NADH	Nikotinadenindinukleotid
OD _x	Optische Dichte bei x Nanometern
P	Pellet, unlösliche Fraktion
p44	Protein, Spleißvariante von Arrestin
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P-Rhodopsin	phosphoryliertes Rhodopsin im Grundzustand
P-Rhodopsin*	phosphoryliertes, licht-aktiviertes Rhodopsin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rho*	Rhodopsin in Meta II (licht-aktiviert)
ROS	Rod Outer Segments (Stäbchenaußensegmente)
RT	Raumtemperatur
S-Antigen	Arrestin
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase

SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
T	Thymin, Transducin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxybenzethylensorbitanmonolaureat
U	Unit ($\mu\text{mol Substrat min}^{-1} \text{ mg Protein}$), Urea
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Visible (sichtbares Licht)
v/v	Volumenanteil
w/v	Masse pro Volumen
x	mal
YP	Yeast Pepton

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Allen Mitgliedern des IBI-2 sei für das angenehme Arbeitsklima sowie die ständige Diskussionsbereitschaft gedankt.

Mein besonderer Dank gilt:

Ramona Schlesinger, die mich in den letzten Jahren super unterstützt hat. Ihre engagierte, freundschaftliche Betreuung ging sicherlich über das normale Maß hinaus

Prof. Dr. Georg Büldt für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das Interesse an diesem Thema

Alexander Pulvermüller (Charité Berlin) für die gute Zusammenarbeit

Jörg Fitter für die Diskussionsbereitschaft und die Einblicke in die Fluoreszenz

Ingo Gregor für die Hilfe bei der FCS und KLS-Apparatur

Jan Kubicek, minn kölsche Frünn... tja wer hätte das gedacht (Gruß vom Feindesland!)

Jörg Labahn und Ulf Eidhoff für die vielen Diskussionen und die knallharten Exkursionen... (Gruß an Hamburg und die Schweiz!)

Birgit Gehrman herzlich für die tollen Gespräche und ihr offenes Ohr bei jeder Art von Problemen

Ilona Ritter, Sascha Lehmann und Christian Baeken für die immer währende Hilfsbereitschaft

Olga Mironova, Ivan Budyak und Sabina Haber-Pohlmeier für ihre Diskussionsbereitschaft

Britta Person, Teresa Bednarz und Ken Ataka, sowie dem Kopf der Gruppe Joachim Heberle für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft, und natürlich für die witzigen Gespräche zwischendurch

Oliver Weiergräber und Joachim Granzin für die Hilfe bei den Abbildungen

Valentin Gordeliy und seiner Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Freundin Britta, die mich immer unterstützt und zum Lachen gebracht hat!

Aber vor allem möchte ich meinen Eltern und Schwestern danken.....für alles!