

**Untersuchungen zur Funktion und
Kristallisation von heterolog exprimiertem
Par-4, Amida und DLK**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Johann Kubicek

Düsseldorf, August 2005

Diese Arbeit ist meinem Vater

Jan Kubicek (1987 †)

gewidmet.

Die vorliegende Arbeit wurde im Forschungszentrum Jülich am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI-2: Biologische Strukturforchung) unter der Leitung von Prof. Dr. G. Büldt erstellt.

Referent: Prof. Dr. G. Büldt

Korreferent: Prof. Dr. D. Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2005

*If you always do
what you always did
You will always get
what you always got*

Zusammenfassung

Das proapoptotische Protein Par-4 scheint eine Schlüsselrolle im Prozess der Apoptose und in anderen zellulären Prozessen einzunehmen. Neben der Rekrutierung von proapoptotischen Proteinen wie Amida und DLK aus dem Zellkern und der damit verbundenen Induzierung der Apoptose, wurde Par-4 kürzlich mit der Proteinkinase C ζ als ein Bestandteil der DISC identifiziert. Darüber hinaus steuert Par-4 in Neuronen mit Calmodulin die Ca^{2+} abhängige Regulation des Dopamin D2 Rezeptors. Diese Beispiele machen deutlich, dass Par-4 in unserem Körper zwar ubiquitär exprimiert wird, seine Funktion in verschiedenen Geweben aber unterschiedlich ist.

Par-4 konnte in dieser Arbeit erstmalig unter physiologischen und nicht physiologischen pH-Bedingungen mit und ohne DNA in hohen und sauberen Mengen gereinigt werden. Bei der Optimierung der Reinigungsbedingungen konnte Par-4 als DNA-bindendes Protein identifiziert werden. Durch erste Interaktionsversuche mit Ratten DNA wurde das Sextett GGGTTA als Zielsequenz bestimmt. Diese hat eine 100%-ige Übereinstimmung mit der Telomer-DNA von Vertebraten. Hierdurch wird erstmalig gezeigt, dass das proapoptotische Par-4 ein Nukleinsäure-bindendes Protein ist.

Die DNA konnte als Grund für die Aggregation bei der Reinigung im pH-Bereich 7,5 identifiziert werden. Kristalle von Par-4 (100 μm) und der Death Domain (170 μm) wurden bei pH 4,5 gezüchtet, obgleich das Protein in diesem pH-Bereich starke Multimerisierungen zeigte.

Durch rekombinant hergestellte Par-4 Proteine konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich von Par-4 essentiell für die Aktin-Bindung ist, welche die Par-4/DLK induzierte Apoptose nach sich zieht. Durch diese Entdeckung und weitere *in vivo* Versuche war es möglich, ein Modell der Par-4/DLK induzierten Apoptose zu veröffentlichen.

Entgegen den Annahmen, dass es sich bei den Modifizierungen von Par-4 bei der Expression in Hefe um Glykolisierung handelt, zeigten die Untersuchungen erstmalig, dass es sich bei der Modifikation von Par-4 in Eukaryonten um eine Sumolyierung handelt. Sumolyierungen regulieren die Aktivität von Proteinen, die als Transkriptionsfaktoren in der Zelle Gene aktivieren und reprimieren. Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit den gefundenen DNA-Bindungseigenschaften von Par-4 ein starker Hinweis auf eine bedeutsame Rolle von Par-4 bei der Regulation von Kernprozessen.

Die Funktionalität der rekombinant hergestellten DLK, konnte durch *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit Par-4 und Amida bestätigt werden. Erste Kristalle der DLK wurden gezüchtet.

ZUSAMMENFASSUNG

In einem DLK *in vitro* Kinasetest konnten die Phosphorylierungstellen der rekombinant hergestellte Phosphorylierungsmutanten von Amida und Par-4 identifiziert werden. In wieweit die Funktionalität dieser Mutanten *in vivo* hinsichtlich ihrer proapoptischen Funktion verändert ist, ist Bestandteil von laufenden Forschungen.

Die Proteine Amida, Par-4 und DLK sind alle an demselben proapoptischen Prozess beteiligt. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Amida und Par-4 nur dann miteinander einen Komplex bilden, wenn Amida oder Amida und Par-4 phosphoryliert sind. Hiermit ist der direkte Nachweis für die Interaktion von Par-4 und Amida geführt.

Veröffentlichung:

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Susanne Vetterkind, Susanne Illenberger, Jan Kubicek, Meike Boosen, Sarah Appel, Hassan Y. Naim, Karl-Heinz Scheidtmann and Ute Preuss. (2005) Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. *Experimental Cell Research* Volume 305, Issue 2 , 1 May 2005, Pages 392-408

Boosen, M., Vetterkind, S., Kubicek, J., Scheidtmann K.H. and Preuss, U. (2005) Phosphorylation of Par-4 at T155 is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. In progress.

1. Einleitung

1.1	Apoptose	5
1.1.1	Entdeckung der Apoptose	5
1.1.2	Bedeutung der Apoptose in unserer Entwicklung	6
1.1.3	Störungen der Apoptose und Folgen für den menschlichen Organismus	6
1.1.4	Morphologischer Ablauf und Kennzeichen der Apoptose	7
1.1.5	Regulierung der Apoptose	8
1.2	Prostate apoptosis response gene-4 (Par-4)	10
1.2.1	Identifizierte Interaktionspartner von Par-4	12
1.3	Amida	14
1.4	DAP-Like-Kinase (DLK)	14
1.5	Funktionale Beziehung zwischen Par-4, Amida und DLK	15
1.5.1	Strukturelle Eigenschaften von Par-4, Amida und DLK	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit	19

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1	Par-4	20
2.1.1	Klonierung von Par-4 Proteinen	21
2.1.1.1	Par-4 und seine funktionalen Teilbereiche	21
2.1.1.2	Klonierung der Par-4 Mutanten	22
2.1.2	Expression in <i>E.coli</i>	23
2.1.2.1	Expression und Reinigung von Par-4 und der Death Domain	24
2.1.2.2	Konstrukt His-Par-4-Strep	24
2.1.2.3	Konstrukt Strep-Par-4	27
2.1.2.4	Konstrukt Strep-Death Domain	27
2.1.2.5	Optimierung der Reinigungsbedingung von Par-4 und der Death Domain ..	30
2.1.2.6	Reinigung von Par-4 und Death Domain ohne Nukleinsäuren	33
2.1.2.7	Abtrennung der Nukleinsäure von der Death Domain	34
2.1.2.8	Abtrennung der Nukleinsäure von Par-4	39
2.1.2.9	Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4	43
2.1.2.10	Optimierung der Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4	44
2.1.2.11	Expression und Reinigung der hergestellten Mutanten in <i>E.coli</i>	48
2.1.2.12	Expression, Reinigung und Charakterisierung der Cysteinmutanten.....	48
2.1.2.13	Expression und Reinigung der Phosphorylierungsmutanten	51

2.1.2.14	Expression und Reinigung und Charakterisierung der Leucinmutante	52
2.1.2.15	Kristallisation der Par-4 Proteine	55
2.1.2.15.1	Death Domain	55
2.1.2.15.2	Par-4	57
2.1.3	Expression von Par-4 in Hefe	57
2.1.3.1	Allgemeines zur Protein Expression in Hefe <i>S.cerevisiae</i>	58
2.1.3.2	Expression, Reinigung und Sumoylierung von Par-4 in Hefe	59
2.2	DAP-Like-Kinase	62
2.2.1	Klonierung des DLK Konstrukts	62
2.2.2	Heterologe Expression und Reinigung der DLK	63
2.2.3	Optimierung der Expressionsbedingungen in <i>E.coli</i>	65
2.2.4	Reinigung der DLK aus inclusion bodies	65
2.2.5	Optimierung der Reinigung des DLK Proteins	67
2.2.6	Aktivitätstest der rekombinaten DLK	67
2.2.7	Kristallisation des DLK-Proteins	68
2.3	Amida	69
2.3.1	Klonierung von Amida und seiner Phosphorylierungsmutante	69
2.3.2	Expression	70
2.3.3	Reinigung	70
2.3.4	Optimierung der Reinigung	72
2.3.5	Reinigung der Phosphorylierungsmutante	76
2.3.6	Kristallisation von Amida	76
2.4	Charakterisierung des Nukleoproteinkomplexes von Par-4	77
2.4.1	Isolierung der von DD und Par-4 gebundenen <i>E.coli</i> Nukleinsäuren	77
2.4.2	Isolierung von an Par-4 gebundener Ratten DNA	79
2.5	<i>In vitro</i> Identifikation der Phosphorylierungsstellen von Par-4 und Amida	83
2.5.1	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von Amida und Amida S200A	83
2.5.2	<i>In vitro</i> Phosphorylierung von Par-4 Proteinen	84
2.6	<i>In vitro</i> Proteininteraktion zwischen Par-4, Amida und DLK	85
2.6.1	Interaktion der Proteine	85
2.6.2	Optimierung der Versuchsbedingungen der Interaktion	87
2.7	Charakterisierung der DLK und Par-4 induzierten Apoptose	89
2.7.1	<i>In vitro</i> Interaktion von Par-4 Proteinen und dem Aktin-Zytosklett	89
2.7.2	Model der von Par-4 und DLK vermittelten Apoptoseinduktion	90
2.8	Ergebnistabelle	92

2.9	Ausblick	94
------------	-----------------------	----

3. Material und Methoden

3.1	Material	95
3.1.1	Geräte und Zubehör	95
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	96
3.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	100
3.1.3.1	Puffer und Lösungen	100
3.1.3.2	Medien	102
3.1.4	Dokumentation der Ergebnisse	103
3.1.5	Organismen und Wachstumsbedingungen	103
3.1.5.1	Wachstumsbedingungen für <i>E.coli</i> und <i>S.cerevisiae</i>	103
3.1.5.2	Organismen	104
3.1.5.3	Stammhaltung	105
3.2	Methoden	105
3.2.1	Überexpression von Protein	105
3.2.1.1	Kulturbedingungen und Herstellung von klaren Lysaten von <i>E.coli</i>	105
3.2.1.2	Kulturbedingungen und Herstellung von klaren Lysaten von <i>S.cerevisiae</i>	106
3.2.1.3	Fraktionierung in Triton X-100-lösliche und -unlösliche Zellextrakte	106
3.2.2	Arbeiten mit DNA	107
3.2.2.1	Plasmide	107
3.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	108
3.2.2.3	Enzymatische Reaktionen mit Nucleinsäuren	108
3.2.2.4	Herstellung transformationskompetenter Zellen	109
3.2.2.5	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	109
3.2.2.6	Transformation von DNA in <i>S. cerevisiae</i>	109
3.2.2.7	PCR (Polymerase Ketten Reaktion)	110
3.2.2.8	PCR-Primer	111
3.2.2.9	Mutageneseprimer	112
3.2.2.10	Sequenzierungsprimer	113
3.2.2.11	Reinigung von PCR- amplifizierten DNA-Fragmenten	113
3.2.2.12	DNA Sequenzierung	113
3.2.2.13	Denaturierende Proteinfällung für die Nucleinsäure Isolierung	114
3.2.3	Arbeiten mit Proteinen	115
3.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	115
3.2.3.2	Färben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen	116
3.2.3.3	Prinzip des Western-Blots	116

3.2.3.4	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran	116
3.2.3.5	Immunochemische Detektion	117
3.2.3.6	Verwendete Antikörper und Konjugate	118
3.2.3.7	<i>In vitro</i> Kinasetest	118
3.2.3.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	119
3.2.4	Chromatographische Techniken	119
3.2.4.1	Affinitätschromatographie	119
3.2.4.2	Gelfiltrationen	121
3.2.5	Kristallisation von Proteinen	122
3.2.5.1	Dampfdiffusionsmethode	122
3.2.5.1.1	Hanging-Drop und Sitting-Drop	122
3.2.5.1.2	Die Methode des "Sparse-Matrix-Screen"	123
3.2.5.1.3	Kristallisation mit dem Kristallisationsroboter	126

4. **Literatur**

4.1	Literatur	131
-----	-----------------	-----

5. **Anhang**

5.1	Sequenzen von <i>Rattus norvegicus</i> Par-4	138
5.2	Sequenzen von <i>Rattus norvegicus</i> Amida	139
5.3	Sequenzen von <i>Rattus norvegicus</i> DLK	140
5.4	Abkürzungen	142

1. Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Entdeckung der Apoptose

1962 macht der junge Doktorand John Kerr eine Entdeckung, die das Wissen über das Sterben von Zellen veränderte. Durch sein Mikroskop beobachtete er eine sterbende Zelle, die nicht angeschwollen und geplatzt war, sondern die schrumpfte und danach verschwand (s. Abbildung 1.1).

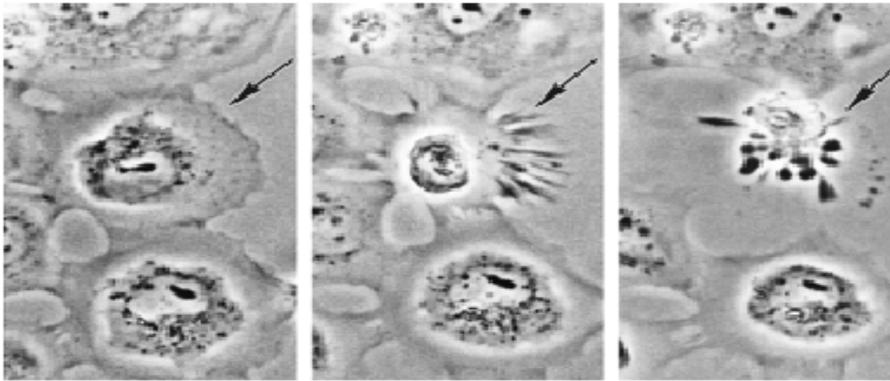


Abbildung 1.1: Zeitverlauf der Apoptose einer Tumorzelle. Die mit einem Pfeil markierte Tumorzelle zeigt typische Veränderungen wie Zellschrumpfung, Membranausstülpungen und die Ablösung vom Untergrund und Zellverband (Schulze-Osthoff K.; 2002)

Diese Art des Zelltodes konnte nicht die Art von Zelltod sein, die man zu der Zeit als Nekrose (griechisches Wort für Tötung) bezeichnete. Es musste sich also um eine andere Form des Zelltodes handeln.

Drei Jahre später konnte John Kerr, zu der Zeit Pathologe an der Universität von Queensland in Brisbane, diesen Vorgang mit Hilfe eines Elektronenmikroskops in weiteren überraschenden Einzelheiten beobachten. Er sah, wie sich Zellen aus dem Zellverband lösten, auf der glatten Membran zahlreiche Bläschen bildeten und Minuten später in viele kleine Bruchstücke zerfielen, die schließlich im Nichts zu verschwinden schienen.

Wiederum sieben Jahre später veröffentlichte John Kerr mit Andrew Wyllie und Alastair Currie die programmierten Schritte des zellulären Sterbens und nannten den Prozess "**Apoptose**" (griechisches Wort für Abwurf, Niedergang).

Heute ist bekannt, dass die Apoptose einer der wichtigsten Prozesse ist, den wir zum Überleben brauchen und dass dieser uns vor vielen Krankheiten schützt.

1.1.2 Bedeutung der Apoptose in unserer Entwicklung

Seit der Entdeckung des programmierten Zelltodes hat sich gezeigt, dass dieser an vielen wichtigen Prozessen beteiligt ist. Schon bei der Reifung der Gameten in der ersten und zweiten meiotischen Teilung setzt ein Selektionsprozess ein, bei dem 95% der entstandenen Gameten entfernt werden, da sie genetische Mängel aufwiesen. Dieser Vorgang setzt sich bei der embryonalen Entwicklung fort, denn auch dort spielt der programmierte Zelltod eine entscheidende Rolle. Durch den Vorgang der Apoptose werden z.B. die in der embryonalen Entwicklung aller Wirbeltiere vorhandenen Interdigitalzellen zwischen unseren Fingern und Zehen entfernt. Auch die Stütz- und Hilfszellen, die der Embryo während seine Wachstums braucht, sowie die milchproduzierenden Zellen der Mutter, die sie nach dem Abstillen nicht mehr benötigt, entsorgt der Körper durch apoptotische Vorgänge. Des Weiteren soll die Durchsichtigkeit der Augenlinse durch den Mechanismus der Apoptose gesteuert werden.

Im adulten Organismus dient der Vorgang der Apoptose als Rationalisierungsprogramm und stellt zugleich eine Art Qualitätskontrolle dar. Täglich entstehen und enden Millionen von Zellen in unserem Organismus. So ist die Lebenszeit von weißen Blutkörperchen auf nur wenige Minuten, von Zellen in der Darmwand auf drei bis fünf Tage und von Hautzellen auf rund 20 Tagen beschränkt.

Das Immunsystem stellt für den menschlichen Organismus einen Schutz gegen infektiöse und parasitäre Eindringlinge dar. Auch bei diesem spielt die Apoptose eine wichtige Rolle. Bei einer Virusinfektion werden die Lymphozyten durch die Antigene des Erregers zur Reifung angeregt. Aktivierte zytotoxische T-Lymphozyten töten virusinfizierte Zellen, indem sie in diesen spezifische Apoptosen auslösen und so den Organismus vor einer Verbreitung des Virus schützen. Die Apoptose ist also ein Bestandteil der Selbsttoleranz und der Eigenkontrolle des Immunsystems. Diese Beispiele machen deutlich, welchen einzigartigen Stellenwert die Apoptose für den Organismus einnimmt und lassen erahnen, welche Folgen es hat, wenn dieser Mechanismus nicht präzise funktioniert.

1.1.3 Störungen der Apoptose und Folgen für den menschlichen Organismus

Das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation ist sehr empfindlich. Dass eine fehlerhafte oder erhöhte Apoptose bei vielen Krankheiten eine Rolle spielt, ist noch nicht lange bekannt, denn man konnte die Apoptose *in vivo* lange Zeit nicht nachweisen. Gegenwärtige Nachweismethoden basieren vor allem auf der Messung der Externalisierung

von Phosphatidylserin und dem Auftreten der DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Aktivierung der Caspasen geht diesen nachweisbaren apoptotischen Veränderungen voraus und kann heute bereits in intakten Zellen nachgewiesen werden. Heute weiß man, dass Störungen innerhalb dieses Gleichgewichts während der Entwicklung zu Missbildungen und Erkrankungen führen.

Die Apoptose wird heute mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht. Dabei wirken sich apoptotische Störungen ganz unterschiedlich aus. Die Pathogenität von Krebszellen liegt in ihrer unkontrollierten Proliferation. Es scheint, dass die meisten Krebsarten auf apoptotische Stimuli nicht mehr reagieren und so nicht mehr empfänglich für diese Art des Zelltodes sind. Anders als bei Tumoren kann eine vorzeitige oder verstärkte Apoptose pathologische Zustände verursachen. Zu diesen Krankheiten gehören Anämien, multiple Sklerose oder Zellschädigungen nach Schlaganfällen, Herzinfarkten und nicht zu vergessen neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Creutzfeld-Jacob Syndrom und Morbus Crown.

Ein anderes Beispiel für erhöhte Apoptoseraten ist das Absterben der T-Helfer-Zellen bei einer HIV-Infektion. Paradox dabei ist, dass nicht nur vom Virus befallene Immunzellen sterben, sondern auch die, die nicht befallen sind. Es scheint, dass die Immunzellen durch die bloße Anwesenheit des Virus anfälliger für Apoptosesignale sind (Schulze-Osthoff K.; 2002). Diese übermäßige Apoptosereaktion kann im weiteren Verlauf der Infektion dazu führen, dass der Patient an einer eigentlich harmlosen Sekundärinfektion stirbt.

1.1.4 Morphologischer Ablauf und Kennzeichen der Apoptose

Den apoptotischen Prozess kann man in vier Schritte einteilen (s. Abbildung 1.2). Im ersten Schritt kann die Apoptose durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren induziert werden, die entweder von außen auf die Zelle einwirken (Entzug von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zell-Zell-Kontakten sowie durch Aktivierung der Todesrezeptoren) oder zellinterner Natur sind (DNA-Schädigung, Zellzyklusstörungen). Alle pro- und antiapoptotischen Stimuli werden in der Zelle „verrechnet“ und führen ggf. zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Morphologisch folgt im zweiten Schritt das Schrumpfen der Zelle und im dritten das Ausbilden von Ausstülpungen der Cytoplasmamembran (membrane blebbing), die Fragmentierung von Proteinen sowie der genomischen DNA und schließlich kommt es zum Auflösen der Zelle in apoptotische Körperchen. Diese werden von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen, so dass zelluläre Inhaltsstoffe der absterbenden Zelle nicht dem

Immunsystem präsentiert werden und es im Allgemeinen nicht, wie bei dem unkontrollierten Zelltod durch Nekrose, zu Entzündungsreaktionen des umliegenden Gewebes kommt. Im vierten Schritt teilt sich, bei regenerierbaren Geweben, eine benachbarte Zelle, um die entstandene Lücke zu schließen.

Der programmierte Zelltod stellt neben der Zellteilung und Zelldifferenzierung einen essentiellen Bestandteil des Lebens für jeden multizellulären Organismus dar. Der zugrunde liegende Mechanismus ist in Eukaryoten hochkonserviert.

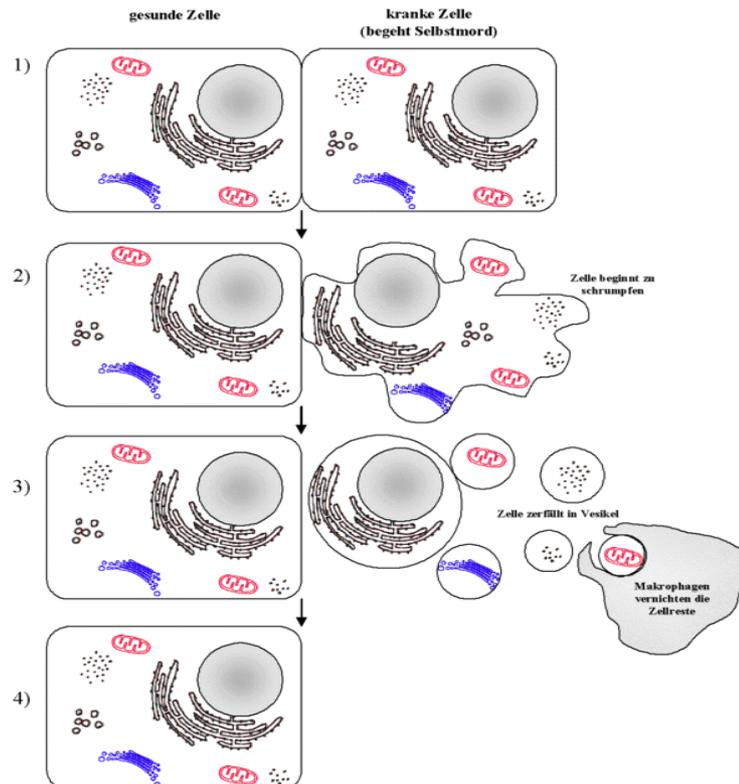


Abbildung 1.2: Morphologischer Ablauf der Apoptose (H. Hoffmeister; 2005)

1.1.5 Regulierung der Apoptose

In Abhängigkeit von der Art des Zelltyps, des auslösenden Reizes und der Wachstumsbedingungen werden verschiedene Mechanismen initiiert, die das Apoptose-Programm auslösen. Im Wesentlichen unterscheidet man heute zwischen drei Signalwegen, die alle zur Aktivierung der sogenannten Caspasen-Kaskade (siehe unten) führen. Die Abbildung 1.3 zeigt den extrinsischen Signalweg (über Membranrezeptoren) und den intrinsischen (über das Mitochondrium).

Bei dem **extrinsischen** Signalweg werden durch extrazelluläre Liganden (z.B. Fas, Trail, TNF) membranständige Rezeptoren (Todesrezeptoren) aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Bildung eines multimeren Komplexes, genannt DISC (death inducing signaling complex), der

z.B. aus CD95/FADD und Procaspase 8 besteht, in dem sich die Initiator-Caspase 8 autokatalytisch aktiviert. Initiator-Caspasen (u.a. 2, 8, 9) aktivieren durch proteolytische Spaltung die Effektorcaspasen (u.a. 3, 6, 7), welche durch Spaltung einer Vielzahl von Zielsubstraten (PARP, Aktin, Lamin, Dnasen etc.) den Zelltod besiegeln.

Der **intrinsische Signalweg** wird u.a. bei Entzug von Wachstumsfaktoren (z.B. NGF und Insulin) und bei Schädigungen der DNA aktiviert. Bei Entzug von Wachstumsfaktoren werden z.B. über den PI3/Akt-Kinase-Signalweg antiapoptotische Faktoren durch Phosphorylierung inhibiert und es kommt zu einer schädigenden Veränderung der Mitochondrienmembran, woraufhin Cytochrom C aus dem Mitochondrium freigesetzt wird. Cytochrom C verbindet sich mit Apaf-1 und der Procaspase 9 zum sog. Apoptosom. Dieses spaltet die Effektorcaspasen und es kommt zur Spaltung der Zielsubstrate wie beim extrinsischen Weg und zum Zelltod. Die p53-vermittelte Apoptose wird u.a. durch DNA-Schäden, fehlerhafte Replikation oder UV-Licht induziert und wirkt sich ebenfalls auf die Mitochondrienmembran aus. Mitglieder der Bcl-2-Familie können pro- (in einer Modellvorstellung bilden Bax oder Bad kanalähnliche Strukturen in der Mitochondrienmembran und bewirken so die Freisetzung von Cytochrom C) oder antiapoptotisch (Bcl-2 oder Bcl-XL wirken dem Prozess entgegen) wirken. Das relative Expressionsniveau der einzelnen Bcl-2 Mitglieder reguliert die Signalweiterleitung und entscheidet so über die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren

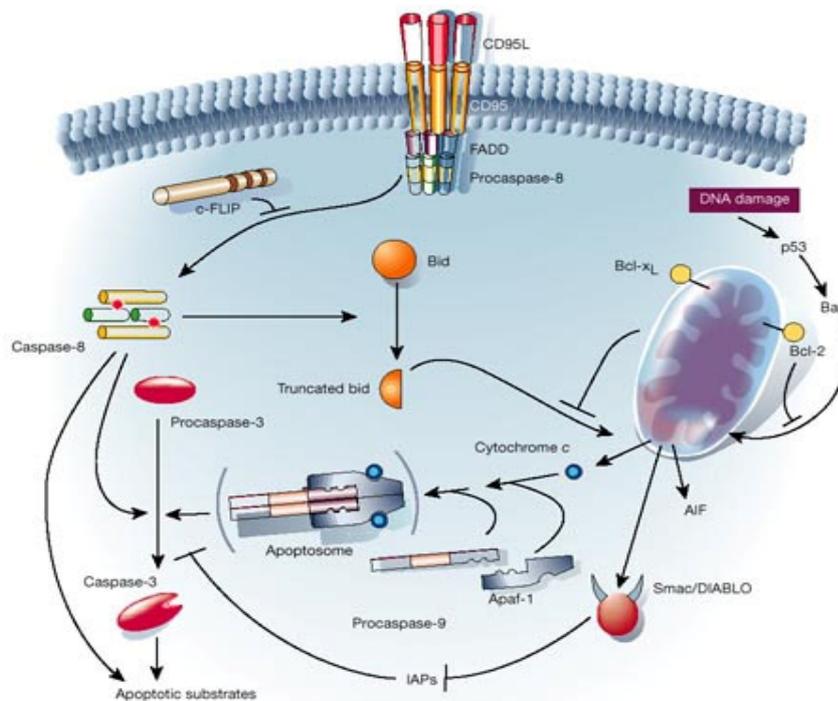


Abbildung 1.3 : Schema vom extrinsischen und intrinsischen Signalweg der Apoptose (Hengartner et al., 2000)

aus dem Mitochondrium. Ein weiteres Protein, das an der Regulation der Apoptose beteiligt ist und aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, wird Smac/DIABLO (Du et al., 2000) (Verhagen et al., 2000) genannt. Dieses proapoptotische Protein inhibiert die sog. IAPs (inhibitor of apoptosis protein) und erlaubt es der Zelle, die Apoptose inhibierende Wirkung der IAPs aufzuheben.

Der dritte Signalweg wurde als ein durch Stress ausgelöster Signalweg identifiziert. Hierbei wird Calcium aus dem intrazellulären Speicher, dem endoplasmatischen Reticulum, freigesetzt und die Caspase 12 aktiviert. Gemeinsam ist diesen drei unterschiedlichen apoptotischen Signalwegen, dass sie sich gegenseitig beeinflussen und komplementieren und schließlich die Aktivierung der Caspasen-Kaskade und dem daraus resultierenden aktiven Zelltod herbeiführen.

1.2 Prostate apoptosis response gene-4 (Par-4)

In Prostatakarzinomzellen konnte durch Ionomycin oder Entzug von Testosteron die Apoptose eingeleitet werden, begleitet von einer Hochregulation eines Proteins, das folgerichtig den Namen Prostate apoptosis response gene-4 erhielt (Sells et al., 1994). Weitere Versuche ergaben, dass dieses Par-4 auch durch andere apoptotische Stimuli wie UV oder oxidativen Stress induziert werden konnte. Es zeigte sich, dass die Induktion apoptosespezifisch ist, da keine Veränderung der Expression von Par-4 als Reaktion auf eine Wachstumsstimulation, einen Wachstumsarrest oder eine Nekrose in Zellkultursystemen zu beobachten waren. Untersuchungen im Expressionsniveau wiesen darauf hin, dass das Par-4 Protein ubiquitär exprimiert wird.

Unabhängig von der Entdeckung, dass Par-4 bei Zellen, in denen Apoptose eingeleitet wurde, hochreguliert war, wurde das Par-4 Protein durch eine „Two-Hybrid“-Untersuchung als Interaktionspartner der DLK-Kinase entdeckt (Page et al., 1999). Par-4 ist ein 38 kDa großes Protein, das aus 332 AS besteht (*Rattus Norvegicus*). Gemäß Datenbankvorhersage hat es verschiedene funktionelle Domänen und potentielle Modifizierungsstellen.

Neben Phosphorylierungsstellen für die Kasein-Kinase II, die Proteinkinasen A und C, die DLK-Kinase (nicht in der Abbildung 1.3 eingezeichnet) (Page et al., 1999) liegen die auffälligsten Domänen am Carboxy-Terminus des Proteins. In der Aminosäuresequenz von Par-4 erstreckt sich von der AS 290-332 eine Leucin-Zipper Domäne, die gleichzeitig innerhalb einer sog. Death Domain (AS 258-332) liegt. Die Death Domain ist homolog zu anderen proapoptotischen Proteinen wie TNF-Rezeptor-1, FAS oder TRADD. Dies deutet

darauf hin, dass Par-4 in die Signalkaskade der Apoptose involviert ist (Rangnekar, 1998). Eine Leucin-Zipper-Domäne (Heptad-Repeat-Motif) kann die Interaktion zwischen zwei Proteinen sowohl als Homodimer als auch Heterodimer ermöglichen. Versuche mit Deletionsmutanten, die keinen C-Terminus besitzen, haben ergeben, dass das Protein die Fähigkeit verlor, die Zellen zur Apoptose zu stimulieren. Weitere Studien zeigten, dass durch eine Überexpression der Death Domain in Zellen, die zur Apoptose angeregt wurden, die proapoptotische Wirkung von Par-4 unterbunden wurde und unterstrichen so die dominant negative Wirkung der Death Domänen (Qing Guo., et al 1998). Durch diese Befunde erlangt Par-4 auch aus pharmazeutischer Sicht eine hohe Relevanz. Die Tatsache, dass im Par-4 beide Domänen zusammengefasst sind, ist bisher in keinem anderen Protein beobachtet worden.

Par-4 enthält zwei Kernlokalisationssequenzen, ist aber in den meisten Geweben, außer in Prostatazelllinien und -tumoren, wo es sowohl im Cytoplasma als auch im Nukleus vorkommt, im Cytoplasma lokalisiert (Boghaert, 1997). Dies ist insofern überraschend, da es im Par-4 Gen laut Datenbankvorhersage Modifizierungs- und Interaktionsites gibt, die sowohl für eine Cytoplasma Lokalisation als auch für eine mögliche Kern- sowie Membranlokalisierung sprechen, wie mehrere SH2 und SH3 Domänen und drei Sumoylierungsstellen (s. Abbildung 1.4). Dass Par-4 eine wichtige Kernfunktion hat, wird durch die Tatsache verstärkt, dass die Interaktionspartner Amida und DLK, die in dieser Arbeit ebenfalls näher untersucht werden, im Kern an den PML-Bodies lokalisiert sind und nur bei Koexpression mit Par-4 ins Cytoplasma translozieren.

Des Weiteren lässt gerade die Leucin-Zipper-Domäne Spekulationen über den Wirkungsort des Proteins zu, denn ein Leucin-Zipper vermittelt sowohl die Protein-Dimerisation (als Dimer Zipper/Zipper) als auch die DNA-Bindung. Dass Par-4 indirekt die Transkription von Zielgenen beeinflussen kann, wird am Interaktionspartner WT1 deutlich, wie man im späteren Verlauf der Arbeit sehen wird.

Sumo-Modifikationsstellen im Par-4 Gen:

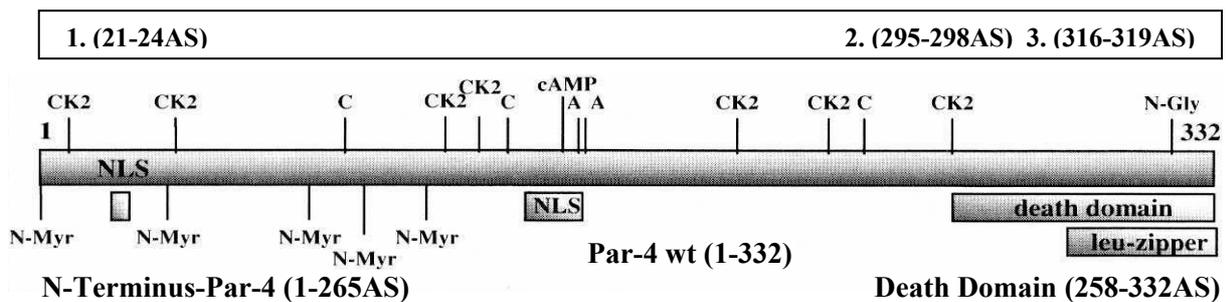


Abbildung 1.4 : Strukturelle und funktionelle Domänen von Par-4 (*Rattus norvegicus*) (abgewandelt Rangnekar, 1998)
 Balken über der Abbildung zeigt die drei Sumoylierungsstellen von Par-4 (21-24 AS, 295-298 AS, 316-319 AS)

1.2.1 Identifizierte Interaktionspartner von Par-4

Die Signalwege, die zur Auslösung von Apoptose durch Par-4 führen, sind noch nicht eindeutig aufgeklärt, aber die Identifizierung immer neuerer Interaktionspartner von Par-4 zeigen, dass durch diese nicht nur neue Erkenntnisse über die Par-4-vermittelte Apoptose erzielt werden, sondern dass es sich bei Par-4 um ein multifunktionales Protein handelt, dessen funktionaler Tätigkeitsbereich sich nicht auf das Cytoplasma beschränkt, sondern auf den Nukleus und die Plasmamembran ausgeweitet werden muss.

Als einer der ersten direkten Interaktionspartner ist eine atypische Isoform der Proteinkinase C, die PKC ζ , identifiziert worden (Diaz-Meco et al., 1996). Par-4 interagiert mit der regulatorischen Domäne der Proteinkinase C ζ und inhibiert deren Kinaseaktivität. Die atypischen PKCs, speziell die PKC ζ , sind mit den Signalwegen der Wachstumskontrolle assoziiert und werden über „second messenger“ wie Phosphatidylinositol oder Ceramid aktiviert. Die aktivierte PKC ζ ist in der Lage sowohl die MAP-Kinasen ERK 1 und ERK 2, die eine zentrale Rolle im Zellwachstum und Überleben der Zelle spielen, als auch den antiapoptotisch wirksamen Transkriptionsfaktor NF- κ B zu aktivieren. Eine Inhibierung der PKC ζ durch Par-4 führt so zu einer Reduktion der MAP-Kinase Aktivität sowie der NF- κ B-abhängigen Genexpression (z.B. BCL-2 antiapoptotisches Protein) und im Nachhinein zu einem Wachstumsstopp (Berra et al., 1997). Des Weiteren scheint die indirekte Inhibierung der MAP-Kinase und die gleichzeitige direkte Aktivierung der p38-Kinase die Apoptose über einen p-53 unabhängigen Weg zu induzieren (Qui et al., 1999). Mit der direkten Inhibierung der PKC ζ werden in der Zelle indirekt überlebenswichtige Signalwege blockiert und gleichzeitig die Expression antiapoptotischer Proteine verhindert. Dass Par-4 aber grundsätzlich an proapoptotischen Prozessen beteiligt ist, zeigt die Tatsache, dass die Par-4-Expression in vielen Tumoren herunterreguliert ist. Dazu gehören Nierenzell-Karzinome (Cook et al., 1999), neoplastische Lymphozyten (Boehrer et al., 2001), Prostata- Karzinome (Chakraborty et al., 2001), Melanome (Lucas et al., 2001) und viele Tumorzelllinien des zentralen Nervensystems (Vetterkind et al., 2005a). Im Gegensatz zu nicht transformierten Zellen führt die Überexpression von Par-4 in den meisten Tumorzelllinien zur Apoptose. Daher könnte die Regulation der Par-4-Expression oder -Aktivität einen Ansatzpunkt für eine Krebstherapie darstellen.

Ein weiterer Interaktionspartner von Par-4 ist der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor WT1 (Wilms-Tumor-Protein 1; Johnstone et al., 1996). WT1 ist ein Protein, das an der Entstehung von Wilms Tumoren, malignen embryonalen Tumoren der Niere, beteiligt ist.

WT1 kann je nach Spleißform die Expression seiner Zielgene reprimieren oder aktivieren. Eines dieser Zielgene ist das antiapoptotische *bcl-2*-Gen. Par-4 kann die Expression von Bcl-2 inhibieren, indem es zusammen mit WT1 an den Promotor des *bcl-2*-Gens bindet (Cheema et al., 2003). Die wachstumshemmende Funktion von Par-4 reicht aber scheinbar nicht aus, um Apoptose auszulösen. Tatsächlich führt die Expression von Par-4 in vielen Zelllinien nicht zur Apoptose, sondern sensibilisiert die Zellen lediglich für apoptotische Stimuli (Sells et al., 1997). In Studien wird die Interaktion von Par-4 und WT1, dabei handelt es sich um eine bestimmte Spleißform, als ein Mechanismus beschrieben, der die Zelle vor Apoptose schützt (Richard et al., 2001).

Neuere Interaktionspartner, wie das THAP 1 belegen die Annahme, dass Par-4 eine wichtige Kernfunktion hat (Roussigne et al., 2003). THAP Proteine gehören zu einer Familie von zellulären Faktoren und werden durch die am N-Terminus konservierte THAP-Domäne charakterisiert. In einem Hefe-Zwei-Hybridsystem wurde Par-4 als Interaktionspartner von THAP 1 gefunden. Endogenes Par-4 ist mit THAP 1 an den PML-Bodies kolokalisiert. THAP 1 selbst ist proapoptotisches Protein und induziert die Apoptose nach Serumentzug und TNF- α Behandlung.

Interessanterweise sind zwei weitere Interaktionspartner von Par-4, DLK (s. Abschnitt 1.4) und Amida (s. Abschnitt 1.3), ebenfalls im Kern an den PML-Bodies lokalisiert.

Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass Par-4 mit der Proteinkinase C ζ ein Bestandteil der DISC (death inducing signaling complex) ist (s. Abschnitt 1.5.1). Binden extrazelluläre Liganden (z.B. Fas, Trail, TNF) an membranständige Rezeptoren (Todesrezeptoren), werden diese aktiviert. Diese Aktivierung führt im Cytosol zur Bildung eines multimeren Komplexes, genannt DISC (death inducing signaling complex), der z.B. aus CD95/ FADD, Procaspase 8, der Protein Kinase C ζ und Par-4 bestehen soll (I.Leroy et al., 2005).

Eine völlig andere Funktion von Par-4 wurde kürzlich in Neuronen entdeckt. Dort ist Par-4 ein Modulator der Ca²⁺ abhängigen Regulation des Dopamin D2 Rezeptors (D2DR) und bindet mit Calmodulin an die Calmodulin Bindungsregion des D2DR Rezeptors (Sang Ki Kark et al., 2005). Werden Mäuse mit einem Par-4 Mangel Stresssituationen ausgesetzt, zeigen sie typische Depressionssymptome, wie sie aus anderen Mausmodellen bekannt sind. Diese neuen Erkenntnisse decken eine unerwartete Rolle für Par-4 im Dopaminsystem auf und verstärken den Verdacht, dass es sich bei Par-4 um ein multifunktionales Protein handelt.

1.3 Amida

Amida ist ein 30 kDa Protein, bestehend aus 260 AS (*Rattus Norvegicus*) und wurde nach einem buddhistischen Gott benannt. Im Jahre 2000 wurde Amida mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems als ein neues Protein identifiziert, welches mit Arc (*Activity regulated cytoskeleton-associated protein*) assoziiert ist und zu den frühen Sofortgenen (immediate early genes) gehört, wie auch C-jun, und C-fos. Bei der homologen Expression ist Amida im Nukleus lokalisiert und bei Überexpression wird Apoptose induziert (Irie et al., 2000).

Amida besitzt zwei neuartige Kernlokalisationssequenzen, die nicht lysin- sondern sehr argininreich sind. Versuche mit Deletionsmutanten von Amida zeigten, dass der Bereich zwischen den Kernlokalisationssites für die proapoptotische Funktion verantwortlich ist (Gan et al., 2003).

Bei der Überexpression von Amida wird in 50% der transfizierten Zellen die Apoptose induziert. Neuere Studien haben gezeigt, dass Amida in den Zellen, die nicht durch Apoptose entfernt wurden, den Zellzyklus in der S-phase der Mitose stoppen können. Es wurde postuliert, dass der Arrest des Zellzyklus in der Mitose durch eine Bindung von Amida an die DNA verursacht wird und dieser Arrest nur durch eine Phosphorylierung durch die CDK-2 Kinase wieder aufgehoben werden kann (Gan et al., 2003). Der Sinn und Zweck dieses Arrestes ist aber weiterhin ungeklärt.

Unabhängig von der Entdeckung als Interaktionspartner von Arc wurde Amida im Zeitraum meiner Dissertation mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems als neuer Interaktionspartner von Par-4 wt identifiziert (Boosen et al., 2005). Es konnte weiter gezeigt werden, dass eine homologe Koexpression von Par-4 wt und Amida, ähnlich wie bei der DLK, zu einer Translokation des nuklearen Proteins Amida in das Cytoplasma und zu einer Kolokalisation beider Proteine an das Aktin-Zytoskelett führte. Des Weiteren konnte nach Koexpression von Par-4 wt und Amida die Induktion der Apoptose beobachtet werden (Boosen et al., 2005).

1.4 DAP-Like-Kinase (DLK)

Die Serin/Threonin-Kinase DLK ist ein 52 kDa Protein und besteht aus 448 AS (*DAP-like kinase*; Kögel et al., 1998). Dieses Protein hat seinen Namen auf Grund einer hohen Sequenzidentität mit der DAP-Kinase (*Death Associated Protein Kinase*; Cohen et al., 1997) erhalten. Die DAP-Kinase spielt eine wichtige Rolle im Interferon γ - und TNF α -induzierten Zelltod. Die DLK und die DAP-Kinase bilden mit drei weiteren Vertretern eine neue Kinase-

Subfamilie, die hohe Sequenzidentitäten in der Kinasedomäne aufweisen, sich ansonsten aber stark unterscheiden. Alle Mitglieder dieser Kinase-Subfamilie werden mit der Regulation der Apoptose in Verbindung gebracht. Sie besitzt keine Todesdomäne wie die DAP-Kinase, sondern einen C-terminalen Leucin-Zipper. Die DLK ist im Zellkern lokalisiert und dort mit punktartigen Strukturen, den sog. „speckles“, assoziiert. Speckles sind Aggregate von Proteinen und können Transkriptions-, Replikations- oder Spleißzentren repräsentieren.

Auf Grund der Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren ATF4 (Kawai et al., 1998) und AATF (Page et al., 1999) und der Fähigkeit, Kernhistone zu phosphorylieren, ist eine Beteiligung der DLK an Transkriptionsprozessen denkbar. Ferner zeigte sich eine teilweise Kolokalisation von DLK mit den PML-NB Bodies. Diese kernmatrix-assoziierten Kerndomänen enthalten eine Vielzahl verschiedener Proteine wie z.B. Tumorsuppressoren, Protoonkogene oder Transkriptionsfaktoren. Die Funktion der PML-NB scheint in genregulatorischen Prozessen, der Transkription und vor allem auch der Apoptose zu liegen (Seeler et al., 1999; Wang et al., 1998). Die Funktion, die DLK in diesem Zusammenhang einnimmt, ist unbekannt, doch scheint es möglich, dass die DLK durch Phosphorylierung in die von PML gesteuerten Prozesse eingreift.

Die alleinige Expression von Par-4 oder DLK führt in Rattenfibroblasten nicht zur Auslösung von Apoptose. Die gleichzeitige Expression beider Proteine führt zur Translokalisierung der DLK ins Cytoplasma, wo sie mit Par-4 an den Spannungsfasern des Cytoskeletts kolokalisiert. Dort kann sie ihre spezifischen Substrate, z.B. die leichte Kette des Myosin II (MLC), phosphorylieren. Gleichzeitig ist eine starke Kontraktion des Cytoskeletts und die Induktion von Apoptose zu beobachten (Page et al., 1999a).

1.5 Funktionale Beziehung zwischen Par-4, Amida und DLK

Die Proteine Par-4, Amida und DLK sind wie viele andere Proteine alle an proapoptischen Prozessen beteiligt. Im Gegensatz zu anderen Proteinen scheint es aber, dass diese drei Proteine an einem anderen unabhängigen Weg der Apoptose beteiligt sind. Vergleiche zwischen der Par-4/DLK- und der Par-4/Amida-vermittelten Apoptose weisen auf Ähnlichkeiten zwischen beiden Mechanismen der Apoptoseinduktion hin. In beiden Fällen translozieren die kernständigen Proteine Amida bzw. DLK nach Koexpression mit Par-4 in das Zytoplasma und kolokalisieren mit Par-4 am Aktin-Zytoskelett, woraufhin Apoptose induziert wird. Daher wäre denkbar, dass die Rekrutierung von nuklearen Proteinen, die in apoptotische Prozesse involviert sind, einen generellen Mechanismus der Par-4-vermittelten

Apoptose darstellt (Boosen et al., 2005) und Amida und DLK Hauptkomponenten von diesem Mechanismus sind.

Unabhängig von den *in vivo* Untersuchungen zeigen die drei Proteine *in vitro* einen engen funktionalen Zusammenhang. Par-4 wurde über eine Two-Hybrid-Untersuchung als Interaktionspartner der DLK-Kinase entdeckt und Amida über eine Two-Hybrid-Untersuchung als Interaktionspartner von Par-4. *In vitro* sind sowohl Par-4 als auch Amida Phosphorylierungssubstrate der DLK. Eine direkte Interaktion der rekombinant hergestellten Proteine ist *in vitro* zwischen Amida und Par-4 zwar noch nicht gezeigt worden, ist aber wahrscheinlich.

1.5.1 Strukturelle Eigenschaften von Par-4, DLK und Amida

Die bisherigen Ergebnisse zur Struktur von Par-4, Amida und DLK stützen sich alleine auf deren Aminosäuresequenz und damit verbunden auf die Homologien zu anderen Proteinen und die Art der Bindung zu anderen Interaktionspartnern.

Par-4 besitzt am C-Terminus eine Domäne, die homolog zu anderen Apoptoseproteinen ist, wie den caspase recruitment domain (CARDs), den death effector domains (DEDs) und death domains (DDs). Die Proteinfamilien werden in der Abbildung 1.3 durch den Fas-Rezeptor (DDs), das Adaptermolekül FADD (DDs und Cards) und die Procaspase 8 (CARDs) repräsentiert. Die DISC (s. Abbildung 1.5) nimmt eine zentrale Stellung in der Signalweiterleitung der Apoptose ein. Über Dimere der speziellen Interaktionsdomänen, d.h. DDs, DEDs und CARDs, werden die apoptotischen Signale, die mit der Bindung des Aktivators an den Fas-Rezeptor beginnen, an den nächsten Partner in der Signalkaskade weitergeleitet. Die Bindung erfolgt über das „Greek Key Fold Motif“ (s. Abbildung 1.6), eben diesem Faltungsmotiv, das allen diesen Proteinfamilien gemeinsam ist.

Die CARDs (caspase recruitment domain), die DEDs (death effector domains) und schließlich die DDs (death domains) stellen Interaktionsdomänen dar, die alle ein bestimmtes Faltungsmotiv gemeinsam haben. Dieses Faltungsmotiv, das auch als „Greek Key Fold“ bezeichnet wird, besteht aus einem Bündel von sechs kurzen α -Helices, die mit Schleifen über einen hydrophoben Kern miteinander assoziiert sind und nach außen ein spezifisches Ladungsmuster präsentieren (Jeong et al., 1999; Zhou et al., 1999).

Alle drei Domänen sind an der Signalkaskade der Apoptose beteiligt und bilden nach deren Aktivierung (Aktivator bindet an Rezeptor) den DISC (death including signalling complex). Dieser besteht aus mindestens vier verschiedenen Proteinen, dem Aktivator, dem Rezeptor, dem Adapterprotein und der Initiatorcaspase (C. Scaffidi et al., 1998).

Erste Hinweise, dass es bei Par-4 möglicherweise zu einer Ausbildung dieses Faltungsmotivs kommt, brachte die Erkenntnis, dass Par-4 zusammen mit Protein Kinase C ζ an der Bildung der DISC beteiligt sein soll (s. Abbildung 1.5). Über welches Motiv diese Bindung vermittelt wird, ist aber ungeklärt.

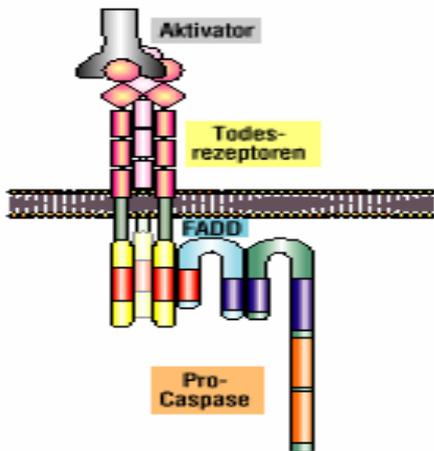


Abbildung 1.5: Bildung des DISC (Krug et al., 2001)



Abbildung 1.6: NMR Struktur der FADD-Death Domain (Greek Key Motif) (Eui-Jun Jeong et al., 1999)

Es sind aber Interaktionspartner gefunden worden, wie z.B. PKC ζ und WT1, bei denen die Bindung zwischen dem „Leucin-Zipper“ von Par-4 und einem „Zink-Finger“-Motiv des jeweiligen Interaktionspartners erfolgt (Berra et al., 1997; Sanchez et al., 1998) (Sells et al., 1997; Kim et al., 1998). Innerhalb dieser Death Domain am C-Terminus von Par-4 liegt in der Aminosäuresequenz von AS 290-332 ein strukturelles Motiv, welches Homologien zum Leucin-Zipper-Motiv anderer Proteine wie z.B. c-Myc und c-Max aufweist.

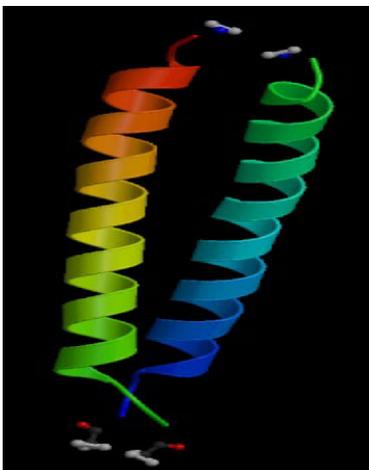


Abbildung 1.7: NMR-Struktur der heterodimeren Leucin- Zipper-Interaktion von c-Myc und c-Max (Lavigne et al., 1998)

Der Leucin-Reißverschluss (Leucin-Zipper s. Abbildung 1.7) besteht aus zwei Helices mit Leucin-/Isoleucinresten. Die Dimerisierung erfolgt durch starke hydrophobe Interaktionen der Isopropylreste.

Versuche mit Deletionsmutanten (ohne Leucin-Zipper) von Par-4 ergaben, dass diese nicht in der Lage sind, die apoptotischen Signale zu vermitteln. Die tatsächliche Existenz einer Leucin-Zipper-Funktion muss noch geklärt werden, zumal nicht die reine Leucin-Zipper-Domäne verwendet wurde, sondern die gesamte „Death Domain“ (s. Abbildung 1.4) (Qing Guo., et al 1998) (Rangnekar, 1998).

Auch die Protein Kinase DLK besitzt in ihrem C-Terminus eine Leucin-Zipper-Domäne. Da Par-4 ebenfalls eine Leucin Zipper-Domäne aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass die Leucin-Zipper von Par-4 und der DLK eine *coiled-coil*-Struktur ausbilden und so die Proteine interagieren können. Allerdings wurde gezeigt (Page et al., 1999a), dass nicht der Leucin-Zipper der DLK, sondern eine argininreiche Region (338-417AS) als Domäne für die Interaktion mit Par-4 wirkt.

Die Domäne von Amida, die für die Interaktion mit Par-4 und für die Induktion der Apoptose notwendig ist, wurde auf den Bereich 113-186 AS eingegrenzt (Scholten, 2004).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In einer früheren Dissertation am IBI-2 im Forschungszentrum Jülich wurde an der Kristallisation von Par-4 gearbeitet. Par-4 wurde heterolog exprimiert und gereinigt, um es strukturell zu untersuchen. Die Par-4 Proteine konnten in großen Mengen in *E.coli* exprimiert und entweder bei einer hohen Konzentration von Magnesiumionen oder bei pH-Werten von 4,5 stabil in Lösung gehalten werden. Eine native Faltung des Proteins sowie ein Nachweis der Funktionalität konnte aber bei diesen Umgebungen nicht gezeigt werden. Da die Kristallisation unter diesen Bedingungen keinen Erfolg zu haben schien, sollte in meiner Dissertation die Reinigung der Par-4 Proteine (Par-4, N-Terminus-Par-4 und die Death Domains s. Abbildung 1.4) hinsichtlich der Art der Oligomerisierung untersucht und die Aufreinigung weiter optimiert werden, um die Struktur zu lösen bzw. physiologische Untersuchungen vornehmen zu können.

Als zusätzliche Projekte sollten für die Proteine Amida und DLK, die mit Par-4 in engem funktionellen Zusammenhang stehen, ein geeignetes heterologes Expressionssystem gefunden werden, um diese heterolog zu exprimieren und zu reinigen. Für keines dieser Proteine wurden bisher von anderen Arbeitsgruppen *in vitro* Experimente veröffentlicht, da offenbar bisher niemand in der Lage war, diese Proteine zu reinigen bzw. zu isolieren.

Da es von Amida und DLK bis zu diesem Zeitpunkt keine dreidimensionale Struktur gab, sollten auch diese kristallisiert werden.

Als Kontrolle der strukturellen Integrität und physiologischen Aktivität des Proteins Par-4 sollten mögliche Komplexe mit den Proteinen Amida und DLK gebildet und damit eine weiterer Möglichkeit geschaffen werden, die Oligomerisierung des Par-4 zu unterbinden und die Kristallisation als Heterodimer zu ermöglichen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Par-4

Frühere Experimente zur Expression und Kristallisation wurden bereits von Dr. Eidhoff (Doktorarbeit; Par-4 und Death Domain) und von mir (Diplomarbeit; N-Terminus-Par-4) durchgeführt. Sowohl Par-4 als auch die beiden funktionalen Teilbereiche ließen sich in *E.coli* überexprimieren und mit einem Anreicherungsgrad von ca. 95 % (SDS-Page) in für kristallographische Experimente ausreichenden Mengen (~ 10-15 mg) erhalten. Trotz der erreichten Anreicherung der Proteine ging die Kristallisation über polykristalline Formen, Flüssigphasentrennung und nicht reproduzierbare Kristalle (Death Domain) nicht hinaus. Die Gründe dafür könnten vielfältig sein. Bis zu diesem Zeitpunkt war kein Funktionalitätstest etabliert, es wurde nicht gezeigt, dass das Protein Tertiärstruktur besitzt. Das Par-4 Protein zeigte zwar eindeutig Sekundärstruktur (FTIR-Spektroskopie Eidhoff Doktorarbeit; 2001), und auch NMR Untersuchungen zur Sekundärstruktur (Dr. H.J. Sass und Dr. Stephan Grzesiek Biozentrum Basel; 2001) bestätigten diese Ergebnisse. Aber eine Tertiärstruktur war unter diesen Bedingungen (Par-4 in 200mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5 oder 50mM KH₂PO₄ pH 4,5) nicht vorhanden. Die beiden Bedingungen, in denen das Par-4 Protein hochkonzentriert (~ 10-15 mg) in Lösung stabil war, konnten unterschiedlicher nicht sein. Im physiologischen pH Bereich (pH 7,5), oberhalb des berechneten isoelektrischen Punktes bei pH 5,9, schien das Protein eine hohe Menge an 2-fach positiven Kationen (speziell Mg) für seine Löslichkeit zu benötigen. Unterhalb des isoelektrischen Punktes war die Löslichkeit allein durch den sauren pH-Wert (4,5) bestimmt, d.h. unabhängig von der Gegenwart von zweiwertigen Kationen. Im Alkalischen (ab pH 9,5) konnte das Protein nicht in Lösung gehalten werden und präzipitierte sofort.

Unter beiden Bedingungen, in denen Par-4 löslich gewesen war, wurde der Effekt der Flüssigphasentrennung bei den Kristallisationsexperimenten in den meisten Ansätzen (80%) beobachtet. Dies deutete auf eine starke Multimerisierung in verschiedenen Zuständen (Aggregation) in den hochkonzentrierten Proteinlösungen hin, erklärte aber nicht, warum diese Zustände bei beiden pH-Werten, 7,5 und 4,5, gleichermaßen zu beobachten waren.

Der Grund für die Aggregatbildung bei beiden pH-Werten könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einem könnte die Aggregation über freie (reduzierte) Cysteine vermittelt werden, welche in der Aminosäuresequenz von Par-4 an Position 82, 103 und 165 liegen, zum anderen aber auch über den C-terminal gelegenen Leucin-Zipper, der zu ca. 40% aus hydrophoben Aminosäuren besteht.

Es ist auch denkbar, dass die Aggregation durch eine direkte Interaktion (Komplexbildung mit einem anderen Protein führt so zu einem stabilen Heteromer) oder eine indirekte Interaktion (Phosphorylierung durch DLK führt möglicherweise zu einer Konformationsänderung) unterbunden werden könnte.

2.1.1 Klonierung von Par-4 Proteinen

2.1.1.1 Par-4 und die funktionalen Teilbereiche

Für die nachfolgenden funktionalen und kristallographischen Experimente wurden verschiedene Konstrukte von Par-4 und den beiden funktionalen Teilbereichen erzeugt. Da als erster Reinigungsschritt eine Imac- oder Streptaktin-Affinitätschromatographie genutzt werden sollte, wurde Par-4 sowohl mit einem His- und Strep-Tag als auch nur mit einem Strep-Tag kloniert, um sicher zu gehen, dass der His-Tag keinen Einfluss auf das funktionale Verhalten und die Kristallisationseigenschaften von Par-4 hat. Der His-Tag ändert seinen Ionisierungszustand anders als der Strep-Tag in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Bei den beiden funktionalen Teilbereichen wurden die Konstrukte C-terminal nur mit einem Strep-Tag flankiert. In Tabelle 2.1 sind die Konstrukte zusammengefasst und in Abbildung 2.2 wird das Par-4 Konstrukt und die beiden funktionalen Teilbereiche graphisch noch einmal visualisiert.

Konstrukt Bezeichnung	Produkt	Sites durch PCR	Plasmid
091199A17	6His-Par-4-Strep	Sall	pET-11a
JK170903Y2	Strep-Par-4	NdeI	pET-23a
JK130402C4	Strep-N-Terminus-840 (1-265AS)	NdeI	pET-27b(+)
131100A3	Strep-DD Death Domain (258-332AS)	Sall	pET-11a

Tabelle 2.1: Par-4 Konstrukte in *E.coli* Expressionsvektoren: Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch Standardmethoden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert (Top10) und sequenziert. Für die PCR wurden dem Ansatz 10% DMSO zugegeben, da auf Grund des hohen GC-Gehaltes des Par-4 Gens anders kein PCR-Produkt zu erhalten war. Die Umklonierung in die verschiedenen *E.coli* Expressionsvektoren erfolgte über die oben genannten Restriktionsstellen. Die Konstrukte 6His-Par-4-Strep wt und Strep DD Death Domain (258-332AS) wurden aus der Doktorarbeit (Eidhoff, 2001) und das Konstrukt Strep-N-Terminus-840 (1-265AS) aus der Diplomarbeit (Kubicek; 2002) übernommen.

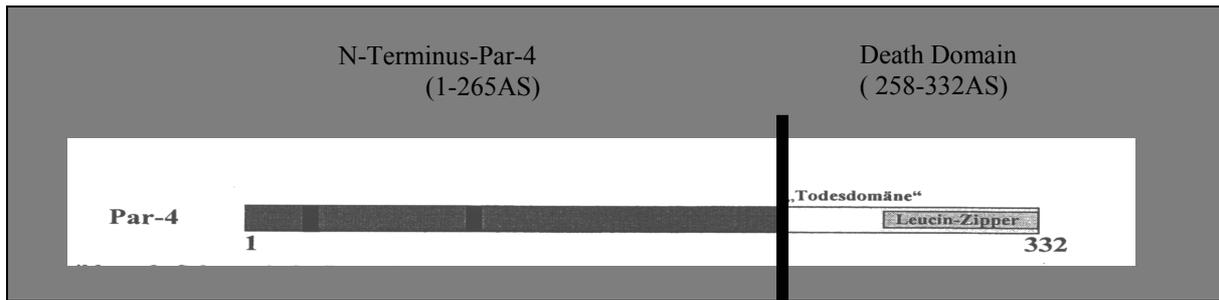


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Par-4 Gens mit den funktionalen Teilbereichen. Die Abbildung zeigt die beiden Teilbereiche N-Terminus-Par-4 (1-265AS) und die Death Domain (258-332AS)

2.1.1.2 Klonierung der Par-4 Mutanten

Wie in Abschnitt 2.1 erläutert, könnte der beobachtete Effekt der starken Multimerisierung des Proteins, sowohl in gering als auch in hochkonzentrierter Form, durch ein an der Oberfläche der Proteinstruktur liegendes Cystein vermittelt worden sein. Durch gezielte Punktmutationen in dem kodierenden Bereich von Par-4 wurden die hochreaktiven Cysteine gegen Alanine ausgetauscht. Weiterhin wurden die möglichen Phosphorylierungsstellen der DLK (Serin/Threonin Kinase) Serin und Threonin, die in der Aminosäuresequenz von Par-4 an den Stellen 154/155 gelegen sind, gegen Alanin ausgetauscht, um im Folgenden den Einfluss der Phosphorylierung auf die Funktion und Kristallisationseigenschaften des Proteins zu untersuchen. Der Austausch der Aminosäuren erfolgte mittels PCR und ist in der Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Konstrukt Bezeichnung	Produkt	Sites durch PCR	Plasmid
JK170803N1	Strep-Par-4MutC82A(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK170803M1	Strep-Par-4MutC103A(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK240903R1	Strep-Par-4MutC165A(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK161003L1	Strep-Par-4MutC82A/C103A/165A(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK191003O1	Strep-Par-4S154A(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK191003P1	Strep-Par-4T155A(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK191003Q1	Strep-Par-4ST154/155AA(Ex)	NDE/XHO	pET-23a(Ex)
JK5080412	Strep-Par-4L295A/316A/330A(Ex)	NDE/XHO	pET-27b+(Ex)

Tabelle 2.3: Par-4 Konstrukte mit Punktmutationen in *E.coli* Expressionsvektoren: Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch Standardmethoden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert (Top10) und sequenziert. Für die PCR wurden dem Ansatz 10% DMSO zugegeben, da aufgrund des hohen GC-Gehaltes des Par-4 Gens anders kein PCR-Produkt zu erhalten war. Die Umklonierung in die verschiedenen *E.coli* Expressionsvektoren erfolgte über die oben genannten Restriktionsstellen. Der Austausch der Serin/Threonin in Alanin erfolgte in der Gruppe von Dr.Preuß in Bonn.

2.1.2 Expression in *E.coli*

Das *E.coli* Bakterium lässt sich leicht kultivieren und bildet in kürzester Zeit hohe Mengen an Biomasse. Das *E.coli* Expressionssystem unterscheidet sich hinsichtlich Kosten, Zeit und Ausbeute signifikant von anderen heterologen Expressionssystemen wie Hefen, Insektenzellen oder homologen Expressionssystemen. Aber gerade diese hohe Expressionsrate kann manchmal dazu führen, dass das zu exprimierende Protein als unlösliche inclusion bodies ausfällt, da die Löslichkeitsgrenze für das jeweils exprimierte Protein in *E.coli* überschritten ist (Mitraki & King, 1998). Die Löslichkeitsgrenze ist eine thermodynamische Konstante, deren Überschreiten man allerdings durch Variation der Wachstumsrate (mittels Temperaturänderung) und der Expressionsrate (mittels Induktormenge, hier IPTG) entgegenwirken kann. Der fehlende posttranslationale Modifikationsapparat von *E.coli* kann ein Nachteil in Bezug auf die korrekte Faltung sein, falls das Protein natürlicherweise modifiziert ist. Andererseits ist eine Kristallisation des modifizierten Proteins kaum erreichbar. Die Frage nach der korrekten Faltung des Proteins ist daher durch Funktionalitätstests zu prüfen.

In dieser Arbeit wurde mit dem pET-11a, pET-27b(+) und pET-23a Expressionssystem in Verbindung mit dem Stamm der *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3) gearbeitet.

Die drei Expressionsvektoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Resistenzgene und der MCS (multiple cloning site). Der Vektor pET-27b(+) besitzt eine Kanamycin Resistenz, anstatt einer Ampicillin Resistenz wie bei pET-11a und pET-23a. Seine MCS bietet mehr Möglichkeiten zur Klonierung von kodierenden Sequenzen, da mehr singuläre Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stehen. Bei beiden wird das zu exprimierende Gen hinter den T7lac-Promotor und die hoch effiziente Ribosom-Bindestelle des T7 Capsidproteins kloniert. Durch die Kombination mit dem BL21-CodonPlus(DE3) Stamm (Weiner et al., 1994), welcher ein Lysogen des Bakteriophagen λ DE3 ist und in seinem Genom ein DNA Fragment mit dem lacI-Gen, dem lacUV5 Promoter und dem Gen für die T-7 RNA-Polymerase besitzt, und den beiden Expressionsvektoren ist eine genaue Regulation und Induktion der Expression möglich.

Anders als bei den *E.coli* Stämmen K12, DH 5 α und TOP 10 fehlen den BL-21-Stämmen die Gene für einige Proteasen (z.B. Ion- und ompT-Protease) (Grodberg & Dunn, 1988), was bei einer späteren Reinigung des Proteins von Vorteil ist. Eine effiziente Expression eukaryotischer Proteine wird zusätzlich durch die Kopienzahl der argU-(AGA, AGG), ileY-(AUA) und leuW-tRNAs (CUA) erleichtert, die einer eukaryotischen Codon-Usage entsprechen.

2.1.2.1 Expression und Reinigung von Par-4 und der Death Domain

Die Expression und Reinigung von den Par-4 Proteinen gliedert sich in die folgenden Abschnitte.

2.1.2.2 Konstrukt His-Par-4-Strep

In Abbildung 2.4 wird mittels eines SDS-Page die mit der Zeit ansteigende Expression verdeutlicht. Die Überexpression von Par-4 in *E.coli* ist klar zu erkennen und steht beispielhaft für die Überexpression von N-Terminus-Par-4 und Death Domain in *E.coli* (Abbildungen nicht gezeigt). Beobachtet man die Zeitabhängigkeit der Überexpression von Par-4 genauer, so fällt auf, dass die Expression nach Induktion $t = 0$ zuerst stark ansteigt und zwischen $t = 1.5$ und $t = 2$ Stunden ein Maximum erreicht. Ab diesem Punkt scheint die Menge an heterolog exprimiertem Par-4 konstant zu bleiben, was auf eine toxische Wirkung des Proteins auf die Bakterien schließen lässt, da deren Vermehrung zum Stillstand gekommen war.

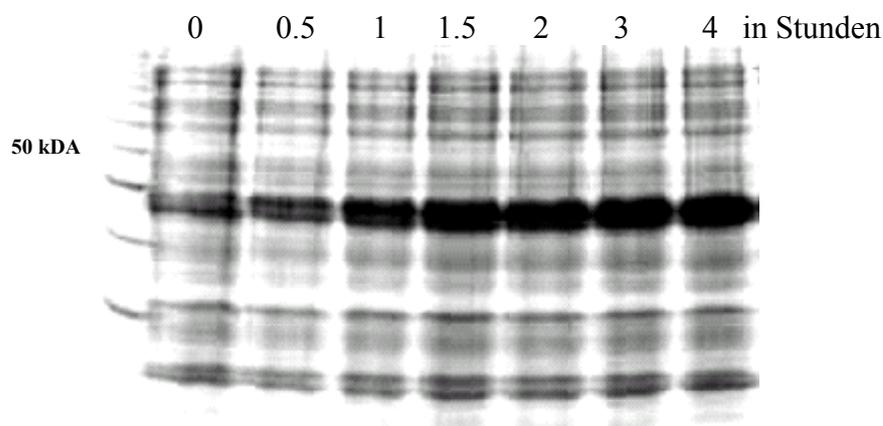


Abbildung 2.4: Darstellung der heterologen Expression von Par-4 nach Zeit in einem SDS-Page: Expression in *E.coli* nach Zeit. Mehrere Kolonien frisch transformierter *E.coli* -Zellen wurden in 200ml dYT-AMP Medium bis 0,6 angezogen und die Induktion mit 1mM IPTG gestartet. Die optische Dichte der Proben wurde gemessen und der Probe $T = 0$ Stunden angepasst, damit nur der Anstieg des überexprimierten Proteins deutlich wird.

Die Reinigung von Par-4 beschränkte sich bis hierher auf eine kombinierte Imac- und Strep-Tactin- oder nur eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Wie in Abbildung 2.5 zusehen ist, hat das Protein nach nur einem Reinigungsschritt eine Reinheit von ungefähr 95 % und ist schon bei der Elution stark konzentriert. Um die Reinheit noch weiter zu optimieren, folgte eine Gelchromatographie mit einer Sephacryl 200 Säule (s. Abbildung 2.6). Die Eluate der Gelfiltration wurden in einem SDS-Page aufgetragen (s. Abbildung 2.7).

1.Reinigungsschritt : Strep-Tactin Sepharose Affinitätschromatographie

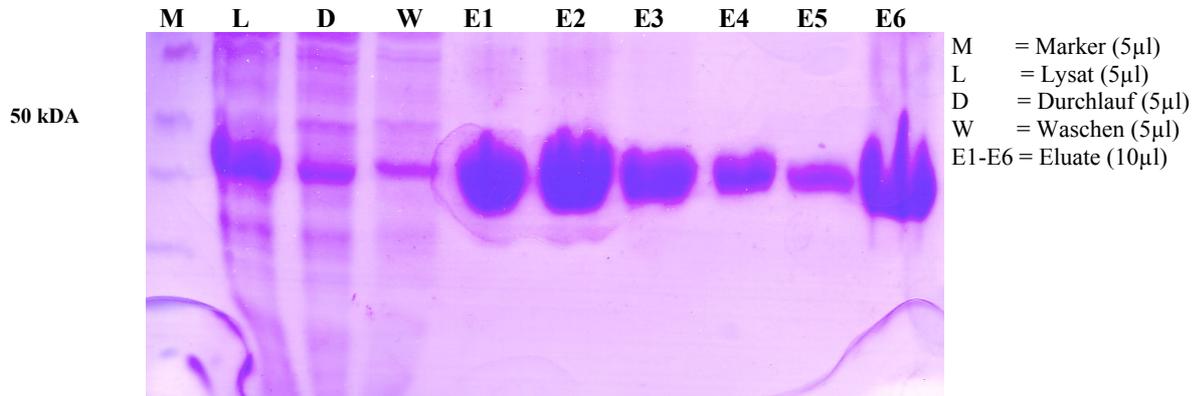


Abbildung 2.5: SDS-Page der Strep-Tactin Reinigung von His-Par-4-Strep aus *E.coli*. 6,5g Zellen *E.coli* wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5, 10mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 60 ml Lysat beladen. Es wurde mit 200ml Waschpuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 70ml Puffer (50mM KH₂PO₄)

2.Reinigungsschritt : Gelfiltration

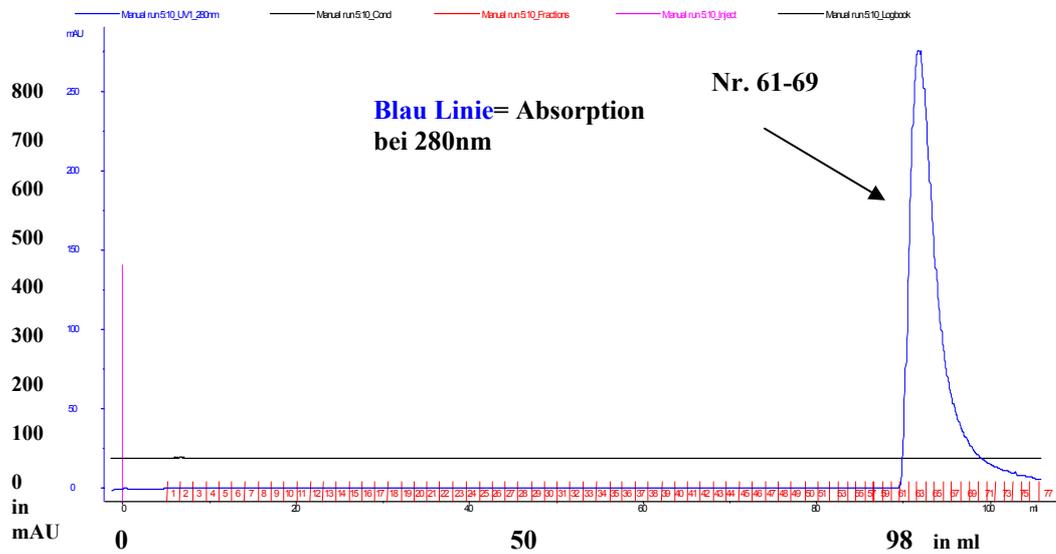


Abbildung 2.6: Chromatogramm einer Gelfiltration von His-Par-4-Strep. Die Säule (Sephacryl 200) wurde mit 50 mM KH₂PO₄ äquilibriert und die Proben à 3ml wurden gesammelt.

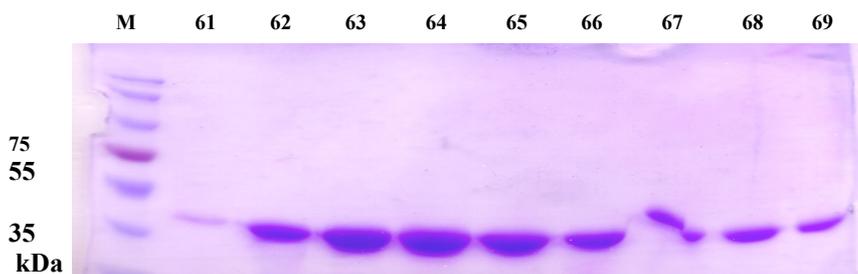


Abbildung 2.7: SDS-Page der Proben von Nr. 61 bis 69 aus der Gelfiltration von His-Par-4-Strep

Insgesamt konnte man aus den 6,5 g *E.coli* Zellen 900 µl à 12 mg reines Protein isolieren (s. Abbildung 2.7). Bei der Gelfiltration (s. Abbildung 2.6) fiel aber auf, dass sich Par-4 im Ausschlussvolumen der Säule bewegt. Da das Protein ein Molekulargewicht von 38 kDA hat, das Ausschlussvolumen der Säule aber 200 kDA beträgt, konnte man das Laufverhalten im Ausschlussvolumen nur durch starke Aggregation erklären. Auch weniger konzentrierte Proben zeigten das gleiche Laufverhalten (Daten nicht gezeigt), somit war dies kein Effekt der Konzentration. Auch eine Reinigung von Par-4 unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,5 (200mM MgCL₂ und 50mM Tris) änderte nichts daran, dass das Protein im Ausschlussvolumen der Säule lief. Auch die Vermessung der dynamischen Lichtstreuung (s. Abbildung 2.8) bestätigte die Ergebnisse der Gelfiltrationen unter den oben genannten Bedingungen. Im ersten Augenblick schien die Proteinlösung zwar monodispers, der Partikelgrößenbereich von 20 bis 500nm war aber zu groß, so dass man davon ausgehen konnte, dass es sich um eine multidisperse Proteinlösung handelte.

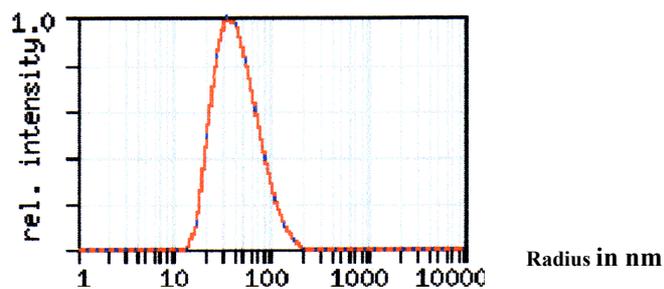


Abbildung 2.8: Dynamische Lichtstreuung einer konzentrierten Par-4 Proteinlösung in nm und deren relative Intensität. Die Messungen wurden in der Protein Strukturfabrik in Berlin (PSF) durchgeführt.

Ein Protein von 38kDa, das als Monomer in einer Lösung vorliegt, zeigt in der Regel eine Größe von 5-10nm. Selbst wenn Par-4 als Dimer oder Tetramer in der Proteinlösung vorliegen würde, könnte man die Partikelgröße von 20-500 nm nicht erklären. Die Messungen wurden mit Par-4 in dem Puffer 200mM MgCL₂, 50mM Tris pH 7,5 wiederholt und zeigten eine noch größere Durchschnittsgröße der Partikel. Dass die Partikelgröße im physiologischen pH-Bereich größer war als bei pH 4,5, ist durch die bei pH 7,5 gebundenen Nukleinsäuren (s. Abschnitt 2.1.2.5) zu erklären.

Um nun festzustellen, welcher der beiden funktionalen Bereiche (N-terminus-Par-4 oder Death Domain) der Grund für diese starke Aggregation war, wurden die Teilbereiche näher untersucht. Frühere Beobachtungen zeigten, dass der C-terminale Bereich (Death Domain) der Grund für die Aggregation sein könnte. Dieser ließ sich, im Gegensatz zum N-terminalen Bereich, der bis zu diesem Zeitpunkt nur in 100mM NaCL, 50 mM Tris pH 7,5 löslich war, unter exakt denselben Bedingungen reinigen, wie das Gesamtprotein. Zudem zeigte die Death

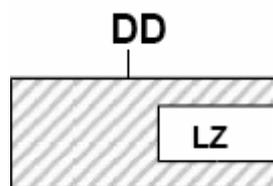
Domain bei der Reinigung ein ähnliches Aggregationsproblem wie Par-4 (s. Abschnitt 2.1.2.4). Setzte man dem Gesamtprotein Par-4 oder der Death Domain NaCl zu, präzipitierten diese sofort. Die Ursache für die Aggregation des Proteins Par-4 scheint demnach im C-terminalen Bereich des Proteins zu liegen.

2.1.2.3 Konstrukt Strep-Par-4

Die Reinigung von Strep-Par-4 erwies sich im Gegensatz zur Reinigung von His-Par-4-Strep als äußerst schwierig und aufwendig. Der Doppel-Tag His N-terminal und Strep C-terminal bei dem Konstrukt His-Par-4-Strep schützt das Protein vor dem Abbau in *E.coli* und bei der Reinigung vor proteolytischem Abbau. Bei der Reinigung von Strep-Par-4 wurden starke Abbaubanden im niederen kDa Bereich in Strep-Blot detektiert, ähnlich wie bei der Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4 (s. Abschnitt 2.1.2.9). Dieser proteolytische Abbau konnte auch durch Einsatz von Proteaseinhibitoren und durch das Arbeiten bei 4 Grad im Kühlraum nicht gestoppt werden. Deshalb wurde auf den Einsatz des Konstrukts Strep-Par-4 für die Kristallisation verzichtet. Im Verlauf der Arbeit erwies sich gerade dieses nur N-terminal getagte Konstrukt als das geeignete zur Untersuchung der Proteininteraktion, denn der C-terminal gelegene His Tag unterband die Interaktion und so die Komplexbildung (s. Abschnitt 2.6.1) von Amida und Par-4.

2.1.2.4 Konstrukt Strep-Death Domain

Wie in Abschnitt 2.1.2.2 dargelegt, bestand kein signifikanter Unterschied in der Überexpression der Death Domain zu Par-4. Die Death Domain hat ein Molekulargewicht von 12 kDa und macht somit nur ein Drittel der Größe des Gesamtproteins aus. Aber gerade dieser Abschnitt, welcher am C-terminalen Ende von Par-4 liegt, scheint der bedeutendste zu sein. Alle bisher bekannten Interaktionen, z.B. Proteinkinase PKC ζ (eine atypische Form der Proteinkinase C), WT1 (Wilms-Tumor-Protein 1), DLK (DAP-like kinase; Death Associated Protein Kinase) werden über den im C-Terminus liegenden funktionalen Bereich, der sogenannten Death Domain (258-332 AS) vermittelt.



DD 258- 332 AS
LZ 292-332 AS

Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Death Domain (258-332 AS) . DD= Death Domain; LZ = Leucin Zipper

Wie in der Abbildung 2.9 zu erkennen ist, zeigt der C-terminale Abschnitt (258-332 AS) Homologien zu zwei proapoptotischen Interaktionsdomänen, Death Domain (Greek Key Fold) und Leucin-Zipper (coiled-coil-Bildung) auf, die sich gegenseitig überlappen und nach bisherigen Erkenntnissen in keinem proapoptotischen Protein zusammen auftreten. Die Tatsache, dass das Par-4 Protein und die Death Domain nach heterologer Expression in *E.coli* nur unter gleichen Bedingungen zu reinigen waren, zeigt die Bedeutung des C-terminalen Abschnitts auch als funktionale Domäne.

1.Reinigungsschritt : Strep-Tactin Sepharose Affinitätschromatographie

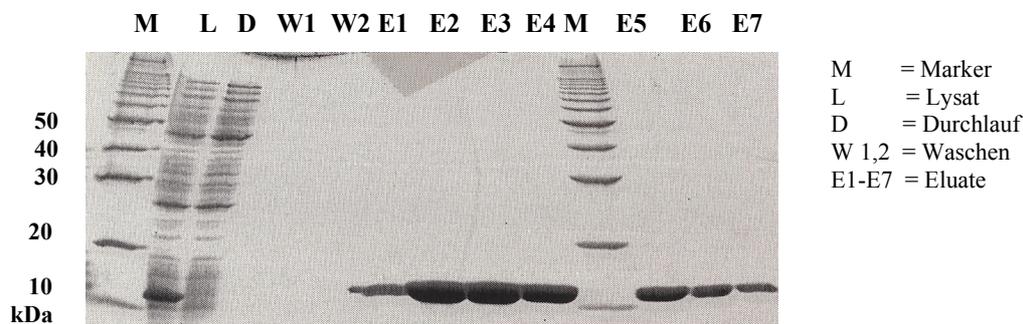


Abbildung 2.10: SDS-Page der Strep-Tactin Sepharose Reinigung von Strep-DD aus *E.coli*. 4,5g Zellen *E.coli* wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5, 10mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 60 ml Lysat beladen. Es wurde mit 200ml Waschpuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 70ml Puffer (50mM Kh₂PO₄)

2.Reinigungsschritt : Gelfiltration

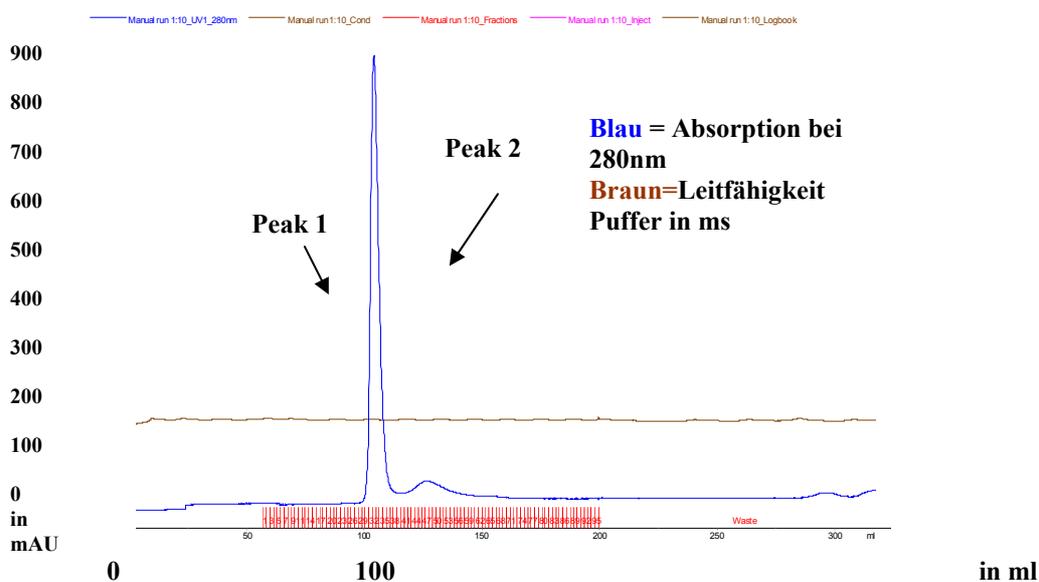


Abbildung 2.11: Chromatogramm einer Gelfiltration der Death Domain (50mM Kh₂PO₄). Die Säule (Sephadex 75 preparativ) wurde mit 50 mM KH₂PO₄ äquilibriert (t=4 C) und die Proben a 2,5ml wurden gesammelt.

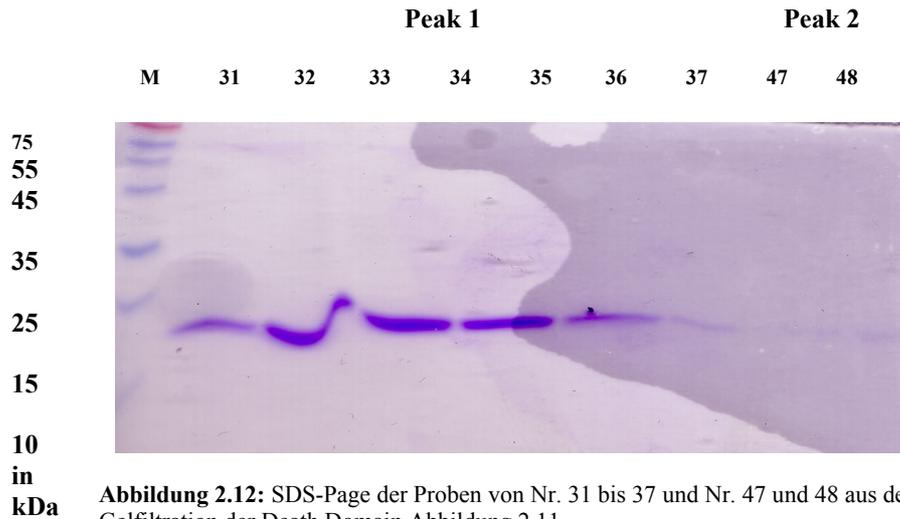


Abbildung 2.12: SDS-Page der Proben von Nr. 31 bis 37 und Nr. 47 und 48 aus der Gelfiltration der Death Domain Abbildung 2.11

Insgesamt konnte man aus den 4,5 g *E.coli* Zellen 700 µl à 9 mg reines Protein in 50mM KH_2PO_4 pH 4,5 isolieren. Ähnlich wie beim Gesamtprotein Par-4, lief das DD Protein im Ausschlussvolumen der preparativen Sephadex 75 Säule. Parallel wurde die DD auch in 200 mM MgCl_2 , 50mM Tris pH 7,5 gereinigt, aber die Gelfiltration zeigte das gleiche Ergebnis. Um das Par-4 und die DD direkt zu vergleichen, wurde das Laufverhalten beider Proteine bei gleichen Bedingungen mit einer analytischen Sephadex 200 Säule getestet.

Vergleich der Gelfiltration von Par-4 und DD:

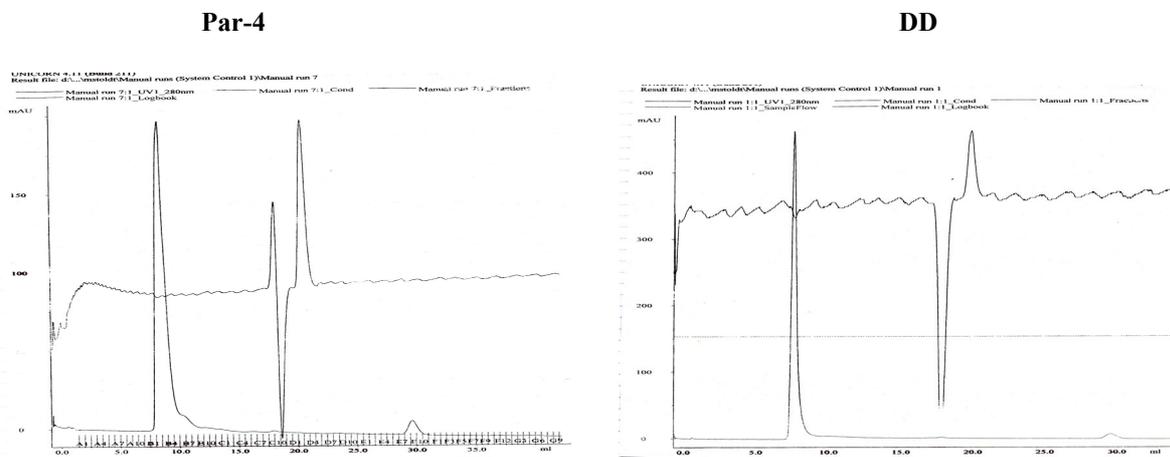


Abbildung 2.13: Vergleich der Chromatogramme von Par-4 und DD unter physiologischen pH-Bedingungen 200 mM MgCl_2 , 50mM Tris pH 7,5

Wie man an den Abbildungen 2.6 (Par-4), 2.11 (DD) bei nicht physiologischen pH-Bedingungen von pH 4,5 (50mM KH_2PO_4) und in der Abbildung 2.13 unter physiologischen pH-Bedingungen pH 7,5 (200 mM MgCl_2 , 50mM Tris) sieht, ist das Laufverhalten des Gesamtproteins Par-4 und der C-terminalen Death Domain völlig identisch, obwohl zwischen den Puffern 3 pH Schritte (pH 4,5 – pH 7,5) liegen und die berechneten isoelektrischen

Punkte bei pH 5,9 von einem Puffer in den anderen überschritten werden. In den beiden Puffern, in denen Par-4 löslich ist, wirken völlig unterschiedliche Ladungszustände in der wässrigen Lösung auf die Proteinoberfläche ein. Trotzdem ist das Protein bei beiden Puffern bis zu einer Konzentration von ~10 mg/ml löslich. Es ist anzunehmen, dass positive Ladungen sowohl im physiologischen (zweiwertige Kationen), als auch im nicht physiologischen pH-Bereich (Protonen bei pH 4,5), den Grund für die Stabilität darstellen.

2.1.2.5 Optimierung der Reinigungsbedingungen von Par-4 und der Death Domain

Par-4 enthält zwei Kernlokalisationssequenzen, ist aber in den meisten Geweben im Cytoplasma lokalisiert, außer in Prostatazelllinien und -tumoren, wo es auch im Nukleus vorkommt (Boghaert, 1997). Die bisher entdeckten Interaktionspartner, mit Ausnahmen von WT1 und THAP1 (s. Abschnitt 1.2.1), beschäftigten sich alle mit der Funktion von Par-4 im Cytoplasma. Diese Ausnahmen, zeigen aber, dass die Funktion von Par-4 nicht auf das Cytoplasma beschränkt ist.

Eine mögliche Funktion als Transkriptionsfaktor alleine oder eine Funktion als nukleinsäurebindendes Protein wurde für Par-4 bis zu diesem Zeitpunkt nicht in Erwägung gezogen und ist auch nicht Bestandteil der Interaktion mit WT1 und THAP1. Bei der Reinigung von Par-4 und anderen Proteinen werden dem Aufschlusspuffer sowohl DNase als auch RNase beigefügt, um mögliche unspezifische DNA- oder RNA-Verunreinigungen zu vermeiden.

Um zu testen, ob das in *E.coli* heterolog exprimierte Par-4 oder die DD auch nach der Zugabe von DNase und RNase mit Nukleinsäuren verunreinigt waren, wurde eine Gelfiltration sowohl unter physiologischen pH-Bedingungen pH 7,5 (200mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5) als auch nicht physiologischen pH-Bedingungen pH 4,5 (50mM KH₂PO₄ pH 4,5) mit den beiden Wellenlängen 280nm und 260nm durchgeführt.

Gelfiltration von Death Domain mit zwei unterschiedlichen Puffer Bedingungen:

DD= unter
physiologischen pH -
Bedingungen
200mM MgCl₂, 50mM
Tris pH 7,5

DD= unter nicht
physiologischen pH-
Bedingungen
50mM KH₂PO₄ pH 4,5

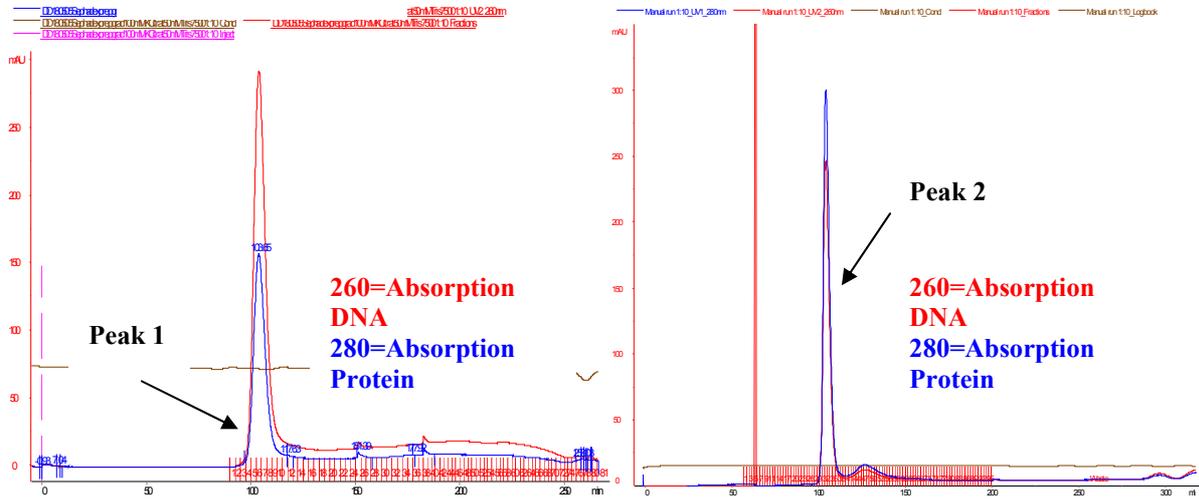


Abbildung 2.14: Vergleich der beiden Chromatogramme der DD unter physiologischen und nicht physiologischen pH Bedingungen

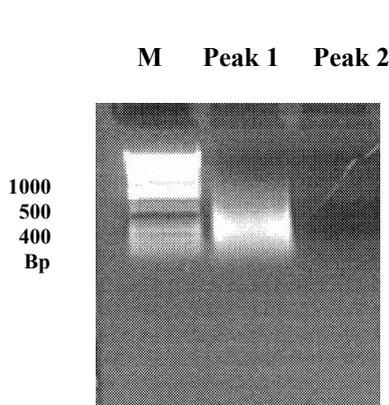


Abbildung 2.15: Aggarosegel der Proben aus Gelfiltration Abbildung 2.14

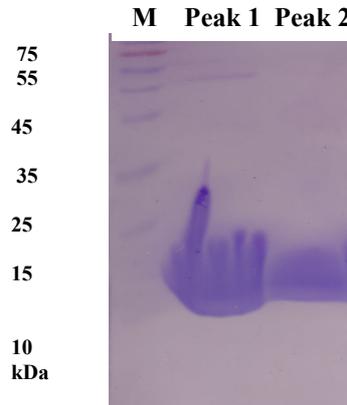


Abbildung 2.16: SDS-Page der Proben aus Gelfiltration Abbildung 2.14

Aus der Abbildung 2.15 wird deutlich, dass unter physiologischen pH-Bedingungen der C-terminale Abschnitt, die Death Domain und auch das Gesamtprotein Par-4 (Daten nicht gezeigt) Nucleinsäuren aus *E.coli* gebunden haben. Die Zugabe von DNase bzw. RNase scheint die freien, nicht aber die an das Protein gebundenen Nucleinsäuren zu zerlegen. Demnach sind letztere offenbar durch das Protein geschützt und nicht für DNase bzw. RNase zugänglich. Wie am Aggarosegel in Abbildung 2.15 zu sehen ist, handelt es sich nicht um nicht klar abgegrenzte Nucleinsäurebanden, wie es bei Nucleinsäureverunreinigungen in der Regel der Fall ist, sondern um ein Nucleinsäurestück mit einer definierten Größe von 200-

300 Bp. Da davon auszugehen ist, dass es sich in Abbildung 2.16 um einen Protein-Nukleinsäurekomplex handelt (aufgetragen wurde Protein-Eluatprobe aus Gelfiltration Abbildung 2.15), kann erwartet werden, dass die tatsächliche Größe des gebundenen Nukleinsäurestücks in Wirklichkeit kleiner ist. In Abbildung 2.16 sind die beiden Peaks in einem SDS-Page aufgetragen und zeigen eine Größe von ~12kDa, welches der Größe der Death Domain entspricht. Eluiert man das Protein mit 50mM KH_2PO_4 pH 4,5, so ist keine Nukleinsäure mehr detektierbar. Die pH-Wert Änderung von 7,5 auf 4,5 löst offenbar die Wasserstoffbrückenbindungen auf und die Nukleinsäuren fallen vom Protein ab. Die heterologe Expression in *E.coli*, einem Prokaryonten, der keinen Zellkern hat, verstärkt die Möglichkeit, dass sehr viele Par-4 Proteine Nukleinsäuren binden können, da Transkription und Translation in einem Kompartiment stattfinden, dem Cytoplasma. Die Bindung der Nukleinsäuren könnte auch eine mögliche Erklärung für die im Abschnitt 2.1.2.1 angesprochene Toxizität von Par-4 bei der heterologen Expression sein, da durch die Bindung von Par-4 an die in *E.coli* freiliegenden Nukleinsäuren, die Proteinbiosynthese der Bakterien zum Erliegen kommen könnte.

Um eine Vorstellung von der Größe der an Par-4 und DD gebundenen Nukleinsäuren zu bekommen, wurde, wie in Abschnitt 2.1.2.4 bereits beschrieben, eine Reinigung der Death Domain durchgeführt. Abweichend davon, wurde hier der an die Strep-Taktin Sepharose gebundene Nukleoproteinkomplex aber nicht mit einem pH-Gradienten von der Säule eluiert, sondern mit 50mM KH_2PO_4 pH 5,3 gewaschen, um ausschließlich die Nukleinsäuren vom Protein abzutrennen. Jeweils 2*5ml diese Eluats wurde aufgefangen und getrennt in 3 kDa Konzentrierern aufkonzentriert und auf ein Aggarosegel aufgetragen. In Abbildung 2.17 wird die tatsächliche Größe der Nukleinsäuren deutlich. Die Nukleinsäuren sind etwas kleiner als 100 Basenpaare. Dass Par-4 ein nukleinsäurebindendes Protein ist, wurde bis jetzt in keiner wissenschaftlichen Publikation diskutiert. Die Ergebnisse aus dem Chromatogramm in der Abbildung 2.15 und die Tatsache, dass Par-4 zwei Kernlokalisationsites (NLS) hat und diese essentiell für die Kernlokalisierung sind (N.El-Guendy et al., 2003), lassen aber darauf schließen, dass Par-4 im Kern nicht nur indirekt auf die Transkription eines Zielgens einwirkt (zusammen mit WT1 s. Abschnitt 1.2.1), sondern wahrscheinlich selber an einen spezifischen Nukleinsäureabschnitt bindet. In der Regel haben die DNA- oder RNA- Bindeproteine eine hohe Affinität zu einer spezifischen Sequenz. Ist diese Zielsequenz nicht vorhanden, haben diese Proteine aber eine niedrigere Affinität zu jeder beliebigen DNA oder RNA Sequenz, was wiederum eine Erklärung für die Nukleinsäurebindung bei der heterologen Expression in *E.coli* darstellt.

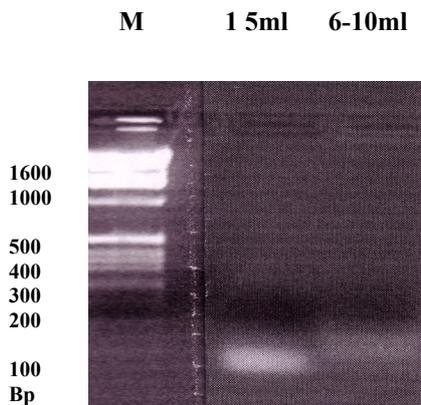


Abbildung 2.17: Aggarosegel der isolierten Nucleinsäuren nach pH-Elution von pH 5,7 bis 5,2 von der Strep-Taktin Sepharose

2.1.2.6 Reinigung von Par-4 und Death Domain ohne Nucleinsäuren

Die bisherigen Kristallisationsversuche im physiologischen pH-Bereich (pH 7,5) wurden also immer mit einem Protein-Nucleinsäure Komplex durchgeführt und führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis, nämlich der Kristallisation von Par-4. Die im physiologischen pH-Bereich gebundenen Nucleinsäuren sind, wie man in Abbildung 2.17 erkennen kann, zwar definiert, aber könnten durchaus der Grund für die in der Gelfiltration beobachtete Aggregation und die bisher nicht erfolgte Kristallisation sein. Um dies auszuschließen, mussten Bedingungen gefunden werden, die Nucleinsäuren vom Protein abzulösen.

Eine schon beschriebene Möglichkeit zur Trennung des Protein-Nucleinsäure Komplexes ist es, das Protein mit einem pH-Gradienten von der Strep-Taktin Sepharose zu eluieren. In diesem Fall ist zwar keine Nucleinsäure in der Proteincharge mehr detektierbar (s. Abbildung 2.14 und 2.15), aber die Proteinlösung zeigt starke Aggregationen und es ist bei diesem pH-Wert keine Tertiärstruktur nachzuweisen. Deshalb musste ein anderer Weg gefunden werden, um Par-4 oder die Death Domain im physiologischen pH-Bereich nucleinsäurefrei zu reinigen.

Als erstes wurde versucht die Proteincharge mit 50mM KH_2PO_4 pH 4,5, in der keine Nucleinsäuren mehr nachweisbar waren, langsam zu dialysieren. Alle Versuche in diese Richtung, ob bei einer niedrigen oder hohen Proteinkonzentration, schlugen fehl. Waren Par-4 oder Death Domain einmal in einem so sauren pH-Wert (pH 4,5) gelöst, war es nicht möglich, die Proteinlösung in einen physiologischen pH-Bereich zu dialysieren, da die Proteine sofort ausfielen.

Die wohl einfachste Methode, ein Protein nukleinsäurefrei zu reinigen, ist, das Protein mit Additiven wie 8M Urea oder Guanidin Hydrochlorid zu reinigen und es später zurückzufalten. Das kann aber zu inkorrekten Faltungszuständen und Intermediaten oder, was noch eher anzunehmen ist, zu Aggregationsproblemen führen. Während eines Rückfaltungsprozesses bildet sich Sekundär- und Tertiärstruktur von zunächst vollständig denaturiertem Protein aus. Denaturiertes Protein ist konformell sehr flexibel, was dazu führt, dass es sehr anfällig für Thiol-Austauschreaktionen ist. Par-4 besitzt eine ungerade Anzahl von Cysteinen und diese könnten durchaus für die Aggregation verantwortlich sein.

Eine andere Möglichkeit, die Rückfaltung zu begünstigen oder eine Aggregatsbildung zu unterbinden, ist die Zugabe von Additiven wie L-Arginin. Der faltungsverbessernde Effekt von L-Arginin ist durch eine Patentveröffentlichung (1985) bekannt, der Wirkungsmechanismus wurde aber bisher nicht näher charakterisiert.

Eine weitere Möglichkeit, die Nukleinsäure vom Protein abzutrennen, ist es, das Protein leicht zu erhitzen. Durch die Erhöhung der Temperatur und durch Einsatz verschiedener Additive, kristallisierten sich für die Death Domain und Par-4 zwei unterschiedliche Wege heraus, die in den folgenden Abschnitten näher erläutert werden.

2.1.2.7 Abtrennung der Nukleinsäure von der Death Domain

Die Death Domain bestand nach temperaturabhängigen FT-IR Messungen nur aus alpha-helikalen Bereichen, denn aus der Abbildung 2.18 gab es keine Hinweise für turns, random coils oder β -Faltblatt Strukturen. Darüber hinaus sind die alpha-helikalen Bereiche (Wellenzahl 1651-1657 s. Abbildung 2.18) bei der Death Domain bis zu einer Temperatur von 55 Grad stabil. Ab einer Temperatur von 55 Grad löst sich die alpha-helikale Sekundärstruktur langsam auf und bei einer Temperatur von 75 Grad entfaltet sich das Protein. Die wohl wichtigste Erkenntnis der temperaturabhängigen FT-IR Messungen war aber die Reversibilität des Vorganges, nach Abkühlung zeigte die Proteinlösung genau das gleiche FT-IR Diagramm. Dass die völlige Entfaltung erst bei einer Temperatur von 75 Grad erfolgt, deutet darauf hin, dass in der Proteinlösung ein Oligomer auseinander bricht und sich entfaltet.

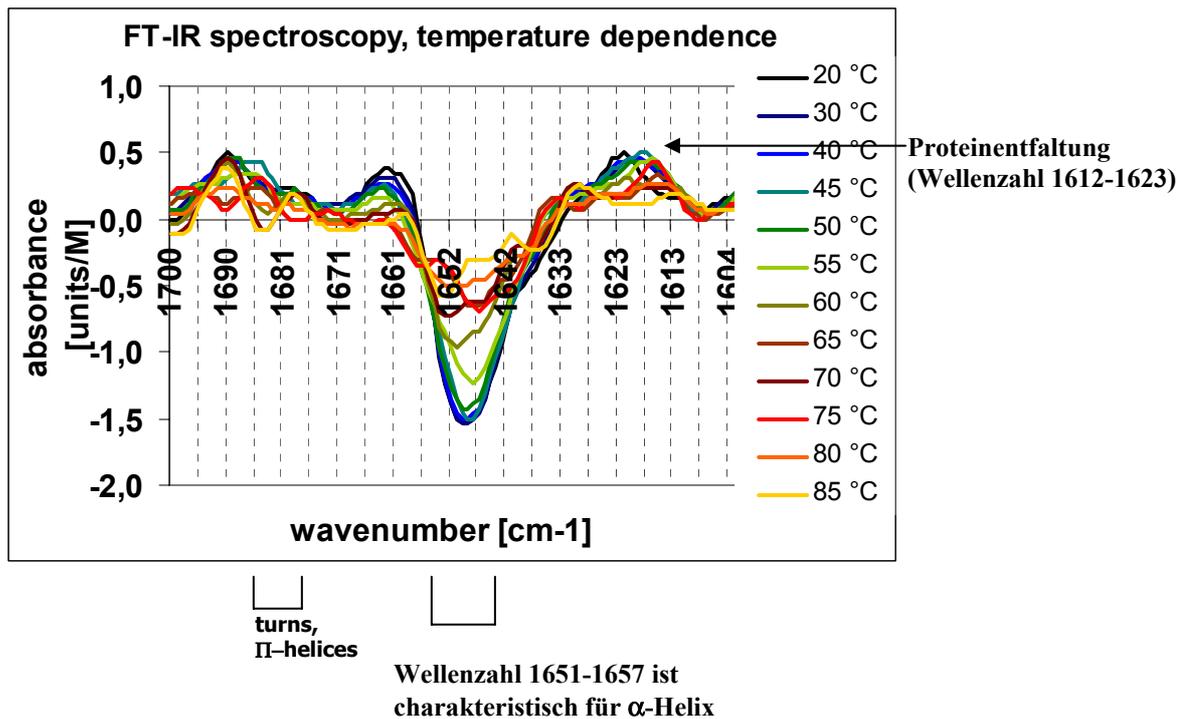


Abbildung 2.18: Temperaturabhängige spektroskopische Entfaltung der Death Domain bei Konzentration von 8mg in 50mM KH_2PO_4 pH 4,5 Bis zu einer Erwärmung von 50 Grad zeigt die Death Domain stabile alpha-helikale Sekundärstrukturen. Erst ab 55 Grad entfaltet sich das Protein und der Entfaltungsprozess ist reversibel (FT-IR Spektrum).

Das Lysat der Death Domain wurde an die Strep-Taktin Sepharose Säule gebunden, gewaschen und mit 200 mM MgCl_2 und 50 mM Tris pH 7,5 und Destiobiotin eluiert.

Das Eluat wurde gedrittelt und wie folgt behandelt:

1. Unbehandeltes Eluat in 200 mM MgCl_2 und 50 mmTris pH 7,5
2. Zugabe von 1M L-Arginin zum Eluat und 12 Stunden Inkubation bei 4 Grad unter homogenem Schütteln
3. Erhitzung des Eluats auf 90 Grad für eine Stunde, Zugabe von 1M L-Arginin und Inkubation für 12 Stunden bei 4 Grad unter homogenem Schütteln

Gelfiltration Versuch 1: unbehandelte Probe

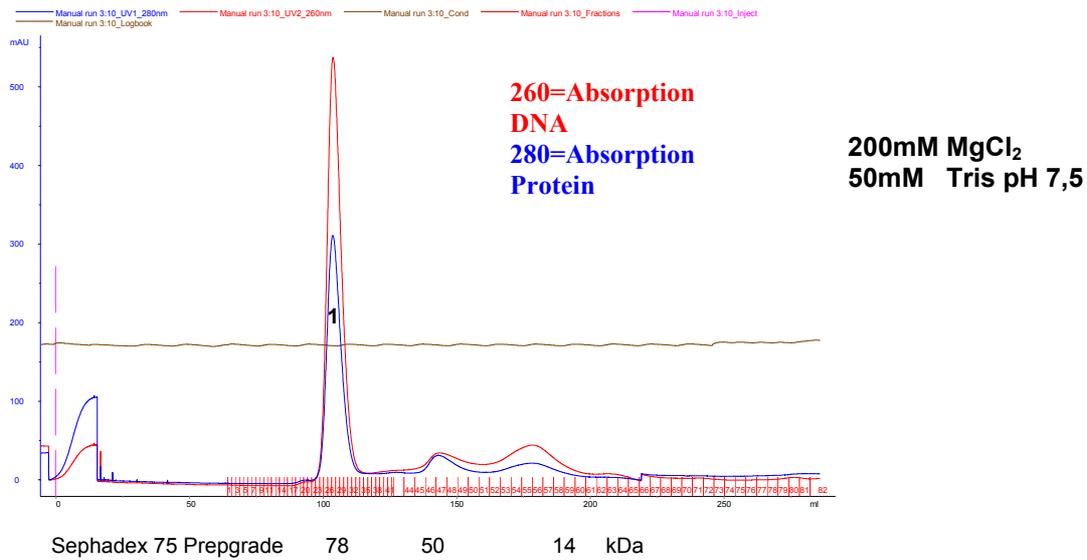


Abbildung 2.19: Chromatogramm des Versuches 1. Unbehandelt Eluat in 200 mM MgCl₂ und 50 mM Tris pH 7,5

Gelfiltration Versuch 2 : 1M L-Arginin zum Eluat und 12 Stunden Inkubation bei 4 Grad unter rotierendem Schütteln.

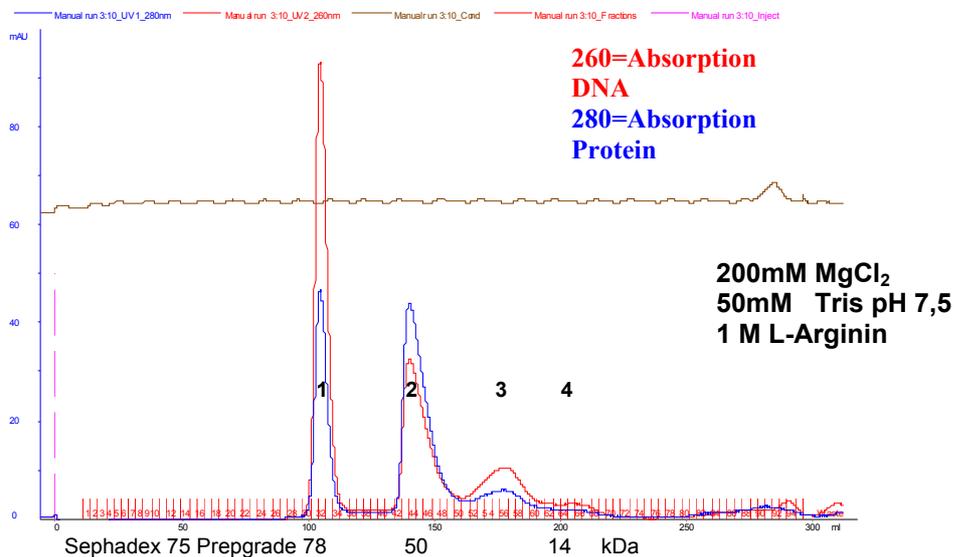


Abbildung 2.20: Chromatogramm des Versuches 2. Zugabe von 1M L-Arginin zum Eluat und 12 Stunden Inkubation bei 4 Grad unter homogenem Schütteln

Gelfiltration Versuch 3: Erhitzung des Eluats auf 90 Grad für eine Stunde, Zugabe von 1M L-Arginin und Inkubation für 12 Stunden bei 4 Grad unter rotierendem Schütteln.

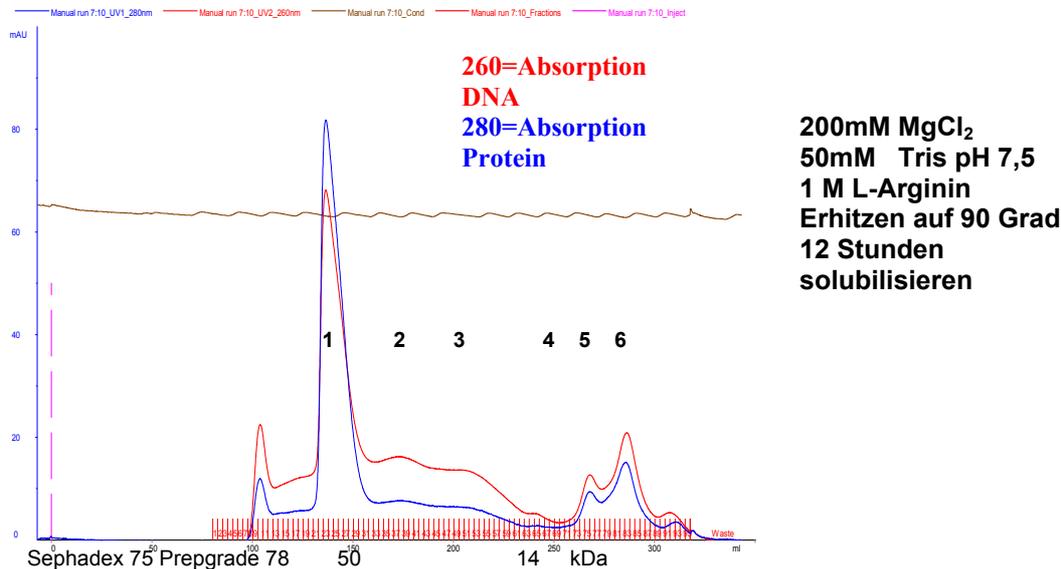


Abbildung 2.21: Chromatogramm des Versuches 3. Erhitzung des Eluats auf 90 Grad für eine Stunde, Zugabe von 1M L-Arginin und Inkubation für 12 Stunden bei 4 Grad unter homogenem Schütteln

Vergleicht man die Chromatogramme des ersten Versuchs, welcher zur Kontrolle diente, mit dem Chromatogramm des zweiten Versuchs, bei dem nur das Additiv L-Arginin zugegeben wurde und mit dem Chromatogramm des dritten Versuchs, in dem die Proteinlösung neben Zugabe des Additivs zusätzlich auf 90 Grad erhitzt wurde, so lässt sich feststellen, dass alleine schon die Zugabe von L-Arginin teilweise eine Ablösung der Nukleinsäuren von der Proteinlösung zur Folge hatte. Dieser Effekt wurde durch die Erhitzung der Proteinlösung noch verstärkt. Die Hauptproteinbande lief jetzt nicht mehr im Aufschlussvolumen der Säule, sondern bei 50kDa. Beide Behandlungsmethoden hatten, trotz unterschiedlicher Wirkungsweise auf das Protein, zur Folge, dass sie denselben Multimerisierungszustand (50kDa) stabilisierten. Folglich lässt sich annehmen, dass sich ein stabiles Tetramer gebildet hat.

Es wurden Proben von allen Peaks der drei Chromatogramme gesammelt und sowohl auf ein SDS-Page, zur Proteinkontrolle, als auch auf ein Aggarosegel, zur DNA Kontrolle, aufgetragen.

SDS-Page der gesammelten Proben aus den Chromatogrammen der Versuche 1,2 und 3

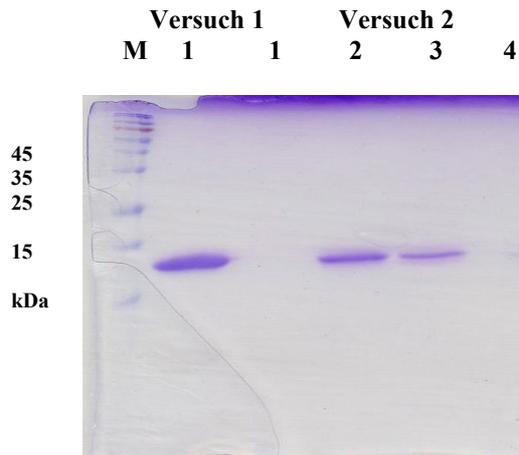


Abbildung 2.22: SDS-Page der gesammelten und konzentrierten Proben von Versuch 1 und 2

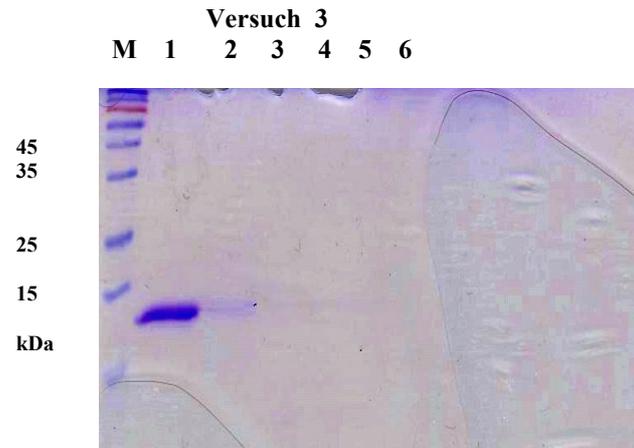


Abbildung 2.23: SDS-Page der gesammelten und konzentrierten Proben von Versuch 3

Wenn man vom ersten Versuch absieht, da dieser lediglich als Vergleich diente und den Ist - Zustand ohne jegliche Behandlung darstellte, so konnten bei den Versuchen 2 und 3 überall Proteinmengen konzentriert und isoliert werden, wenn keine Nukleinsäuren mehr an die Proteine gebunden waren.

Aggarose-Gele der gesammelten Proben aus den Chromatogrammen der Versuche 1, 2 und 3

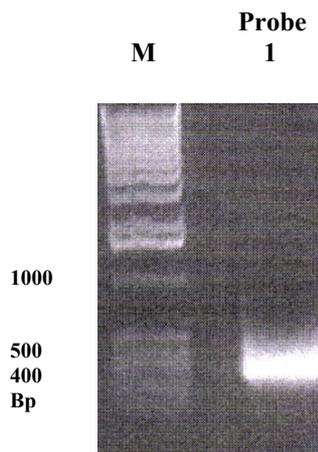


Abbildung 2.24: Aggarosegel der an Probe 1 gebundenen Nukleinsäure

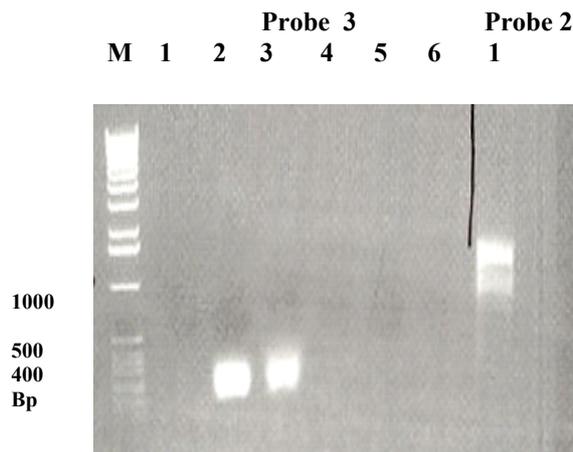


Abbildung 2.25: Aggarosegel der an Probe 2 und 3 gebundenen Nukleinsäure

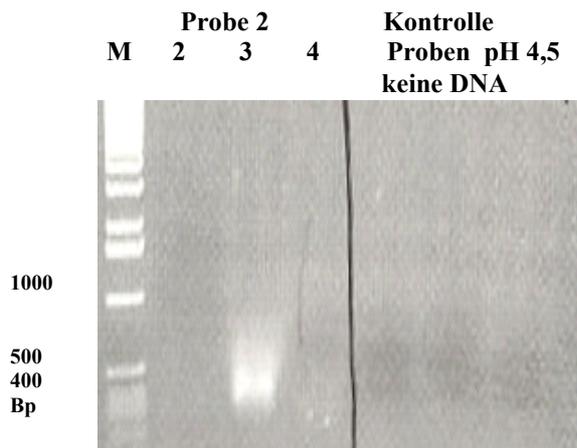


Abbildung 2.26: Aggarose-gel der an Probe 2 und der Kontrolle bei pH 4,5 gebundenen Nukleinsäure

Aus diesen Ergebnissen wurde ein festes Reinigungsprotokoll entwickelt und die daraus gewonnen Proteinchargen wurden in der Kristallisation eingesetzt.

2.1.2.8 Abtrennung der Nukleinsäure von Par-4

Die Ergebnisse aus der Optimierung der Death Domain Reinigung ließen sich nur teilweise auf das Gesamtprotein Par-4 übertragen. Anders als bei der Death Domain, die ja nur aus alpha-helikalen Bereichen besteht und die nach Denaturierung reversibel sind, besteht nach Sekundärstrukturvorhersage das Gesamtprotein Par-4 sowohl aus alpha-helikalen Bereichen als auch aus β -Struktur und weiteren Strukturelementen. Die drei Cysteine, die im N-terminalen Abschnitt an Position 82, 103 und 165 AS liegen, bergen ein weiteres Risiko bei der Rückfaltung, da sie sich falsch zusammen lagern könnten, wenn man das Protein für die Nukleinsäureabtrennung ähnlich wie die Death Domain denaturieren würde. Es musste Weg für die Abtrennung im physiologischen pH –Bereich gefunden werden, um eine mögliche fehlerhafte Rückfaltung zu vermeiden.

Als erstes wurde mit Hilfe der Micrococcus Nuclease, die sowohl RNA als auch DNA in kleinste Bestandteile zerlegt, versucht, die vom Protein gebundenen Nukleinsäuren mit einem Enzym abzubauen. Da die Micrococcus Nuclease aber ein bestimmtes Micromilieu braucht und zwingend CaCl_2 erfordert, schlugen diese Ansätze alle fehl, da durch Zugabe von CaCl_2 das Par-4 Protein unmittelbar ausfällt.

Die in Punkt 2.1.2.6 beschriebene Abtrennung der Nukleinsäure (s. Abbildung 2.17) wurde anschließend als Waschschrift auf die Par-4 Proteinreinigung übertragen. Dazu wurde der im Lysat befindliche Protein-Nukleinsäure Komplex an die Strep-Taktin Sepharose gebunden und auf der Säule mit 200 mM MgCl₂ und 50 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Um die Nukleinsäuren von den Proteinen abzutrennen, musste der Protein-Nukleinsäure Komplex in einem fast einstündigen Vorgang mit 200 mM MgCl₂ und 50 mM Mes pH 5,5 gewaschen werden. Durch das anschließende Waschen mit dem Puffer 200 mM MgCl₂ und 50 mM Tris pH 7,5 wurde langsam wieder ein pH-Wert von 7,5 erreicht. Das Protein wurde mit dem Elutionspuffer 200 mM MgCl₂ und 50 mM Tris pH 7,5 mit Destiobiotin von der Säule eluiert und auf 3-4 ml konzentriert.

Die Gelfiltration (s. Abbildung 2.27) sollte Aufschluss über den Aggregationszustand des Proteins in Bezug auf die gebundenen Nukleinsäuren geben.

Gelfiltrationen einer behandelten und unbehandelten Probe.

1.

2.

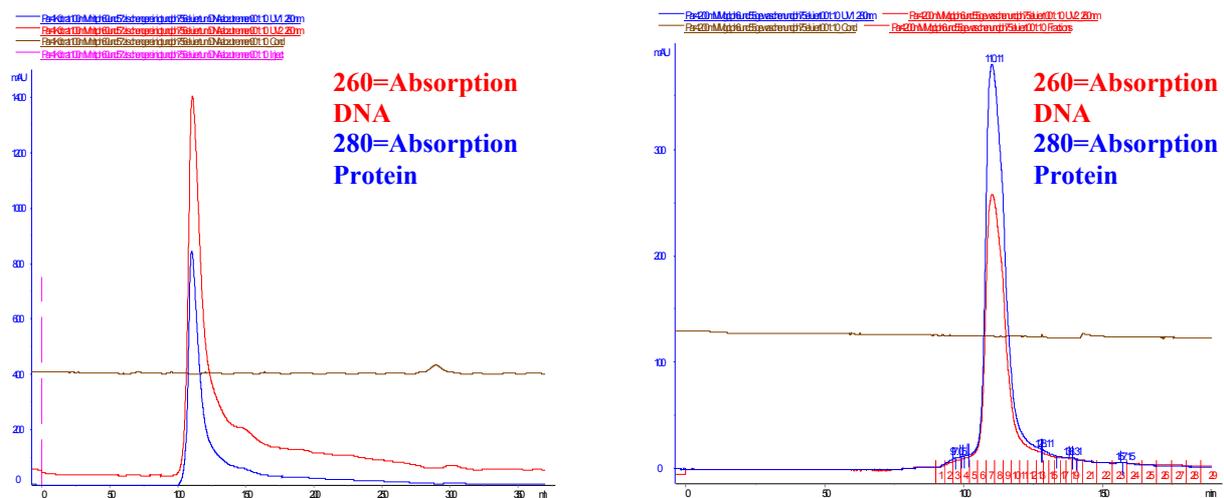


Abbildung 2.27: Vergleich von zwei Chromatogramm von Par-4 mit Laufpuffer 200 mM MgCl₂ und 50 mM Tris pH 7,5. Protein wurde in Chromatogramm 1 mit 200 mM MgCl₂ und 50 mM Tris pH 5,5 gewaschen, um Nukleinsäure abzutrennen. Chromatogramm 2 dient als Kontrolle, da unbehandelt.

Von beiden Chromatogrammen wurden Proben gesammelt, auf ein SDS-Page und auf ein Aggarosegel (s. Abbildung 2.28) aufgetragen und miteinander verglichen.

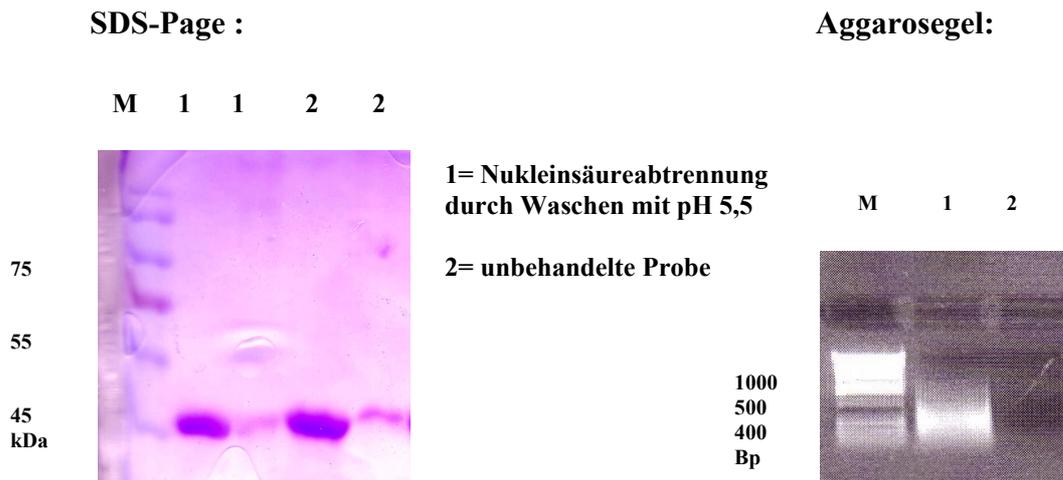


Abbildung 2.28: SDS und Aggarosegel der gesammelten Proben aus Chromatogramm 1 und 2

Aus den beiden Chromatogrammen und dem Aggarosegel (s. Abbildung 2.28) ist klar ersichtlich, dass die Titration mit 200 mM $MgCl_2$ und 50 mM Mes pH 5,5 eine Ablösung der Nukleinsäuren vom Protein Par-4 zur Folge hat. Bei dieser Art der Behandlung eluiert zwar ebenfalls ein Teil des gebundenen Proteins von der Säule, was aber auf Grund des positiven Ergebnisses in Kauf genommen wurde. Außerdem war die Menge an reinem und vor allem nukleinsäurefreiem Protein für die Kristallisationsexperimente ausreichend. Des Weiteren ist aus der Abbildung 2.27 eine Auswirkung auf das Laufverhalten zu erkennen. Läuft das Protein mit gebundener Nukleinsäure mit Ausschlussvolumen der Säule (Sephadex 75 pregrade) bei ~100 ml, so eluiert das Protein ohne Nukleinsäure bei 110ml und es könnte sich um einen Dimer handeln.

Eine andere Überlegung, die Par-4 Proteinlösung nukleinsäurefrei zu bekommen war, sie mit L-Arginin über Nacht zu solubilisieren. Ähnlich wie bei der DD wurde Par-4 in 200 mM $MgCl_2$ und 50 mM Tris pH 7,5 aufgenommen, an die Strep-Taktin Sepharose gebunden und mit dem Aufschlusspuffer und Destiobiotin von der Säule eluiert. Dem Eluat, insgesamt ~90ml, wurde 1M L-Arginin als Trockensubstanz zugesetzt und bei 4 Grad über Nacht solubilisiert. Anschließend wurde die Proteinlösung in der Ultrazentrifuge bei 40000 rpm abzentrifugiert und in einem 30kDa Konzentrierer bis zu einem Volumen auf 2-3ml konzentriert und über eine Sephadex 75 pregrade Gelfiltrationssäule weiter aufgereinigt.

Gelfiltration: Par-4 mit L-Arginin behandelt

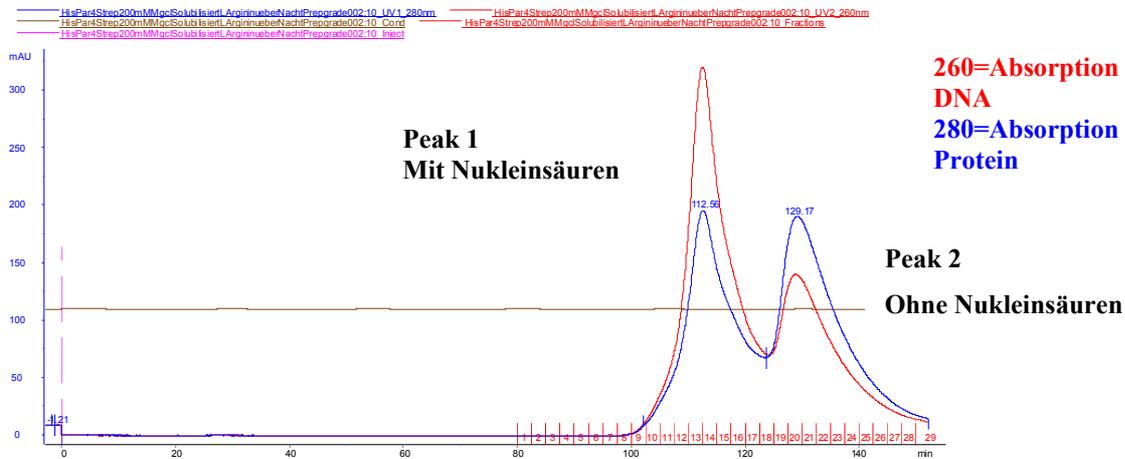


Abbildung 2.29: Chromatogramm von Par-4 über Nacht behandelt mit 1M L-Arginin

Wie in Abbildung 2.29 zu sehen ist, hat sich ein Teil des Proteins von den Nukleinsäuren getrennt und läuft jetzt rechtsverschoben und damit kleiner als in Peak 2.

In Peak 1 hat das Par-4 im Gegensatz zu Peak 2 noch Nukleinsäuren gebunden (Aggarosegele nicht gezeigt).

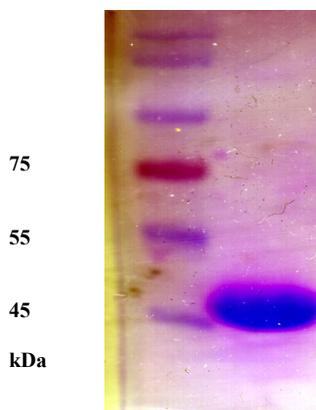


Abbildung 2.30: Aufkonzentrierte Probe Par-4 ohne Nukleinsäure (Peak 2) aus Chromatogramm Abbildung 2.30 (SDS-Page)

Die in Abbildung 2.30 aufgetragene Par-4 Proteinlösung war nukleinsäurefrei. Diese Reinigungsmethode hatte allerdings zur Folge, dass die Mengen an Protein aus einem Gramm *E.coli*, die man unter Punkt 2.1.2.2 reinigen konnte (6,5 g *E.coli* Zellen 900 µl à 12 mg/ml), bei weitem nicht mehr erreicht wurden. Aus 6,5 g *E.coli* Zellen wurden 300 µl à 8mg/ml nukleinsäurefreies Protein hergestellt. Die Ausbeute ist um 75% kleiner als bei dem

Reinigungsvorgang unter Punkt 2.1.2.2 aber für kristallographische Untersuchungen völlig ausreichend.

2.1.2.9 Reinigung von N-Terminus-Par-4-Strep

Die folgenden Ausführungen zeigen, dass sich der N-terminale Bereich (N-Terminus-Strep-Par-4) völlig anders verhält als der C-terminale Bereich (Death Domain) bzw. das Gesamtprotein Par-4. Die Abbildung 2.31 zeigt ein SDS-Page des ersten Versuchs, den N-Terminus-Par-4 zu reinigen.

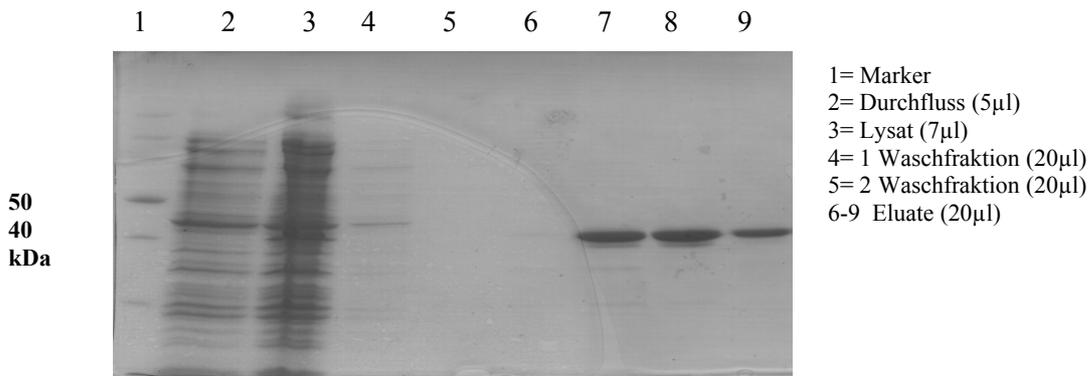


Abbildung 2.31: SDS-Page der Strep-Tactin Sepharose Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4 aus *E.coli*. Die Induktionszeit betrug 2 Stunden. 5,04g Zellen *E.coli* wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5, 20mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 90%Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die mit Puffer voräquilierte Säule mit 55 ml Lysat beladen. Es wurde mit 150ml Waschpuffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50ml Puffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5, 20mM DTT 2,5mM Desthiobiotin)

Im Unterschied zum C-terminalen Bereich und zum Gesamtprotein Par-4 ist für den N-terminalen Bereich die Reinigung mit 100mM Natrium-Chlorid und 50mM Tris pH 8,0 nicht abträglich, d.h. er ist in NaCl löslich. Wie man den Abbildungen 2.32 und 2.33 entnehmen kann, ist aber der proteolytische Abbau auffallend hoch und die Ausbeute an exprimiertem Protein (Eluat Fraktionen 6-9) ist für die Möglichkeiten, die man erfahrungsgemäß mit einer heterologen Expression in *E.coli* hat, sehr gering.

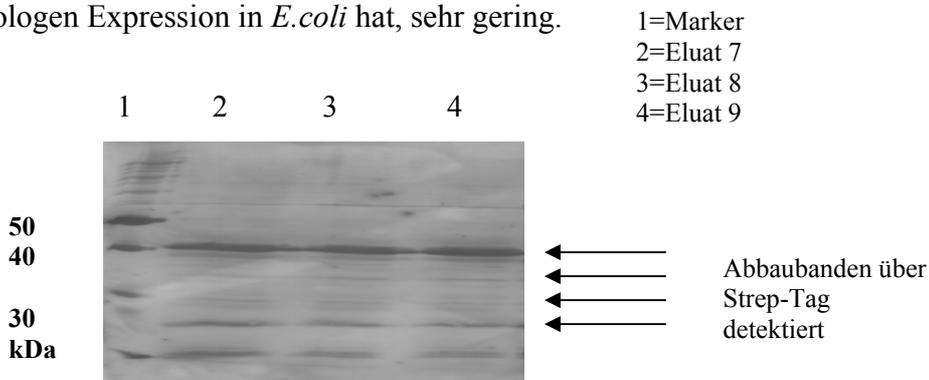


Abbildung 2.32: Western-Blot-Analyse der Eluatfraktionen 6, 7 und 9 der Reinigung. Die Detektion des StrepTagII erfolgte mit dem SA-AP-Konjugat

Der Grund hierfür lag in der kurzen Induktionszeit von nur zwei Stunden. Variationen in den Expressionsbedingungen, wie Absenkung der Temperatur von 37°C auf 30°C, Verringerung der Konzentration des IPTG auf 0,1mM und speziell eine Verlängerung der Induktionszeit, haben die Menge an exprimiertem Protein nicht verändert, vielmehr fand ein starker proteolytischer Abbau statt (s. Abbildung 2.32). Des Weiteren konnte durch stringenteres Waschen mit höheren Salzkonzentrationen die Zahl der Abbaubanden nicht verringert werden. Dies wird wahrscheinlich dadurch verursacht, dass das N-Terminus-Par-4 schwächer als die meisten seiner Abbauprodukte mit einem Strep-Tag an die Säule bindet. Das Protein war gut löslich und stabil. 5,04g Pellet ergaben eine Ausbeute von 4 mg bei einer Konzentration von 10 mg/ml. Die Menge an konzentriertem Protein war damit zwar für kristallographische Untersuchungen und Funktionalitätstests ausreichend, aber wie man in Abbildung 2.32 sehen kann, nicht sauber genug. Daher war es notwendig, die Reinigung zu optimieren.

2.1.2.10 Optimierung der Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4

Die Optimierung der Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4 erwies sich als recht schwierig. Wie man in der Abbildung 2.32 sehen kann, gibt es einen starken proteolytischen Abbau, der sich auch nicht verändern ließ, als die Reinigung bei 4°C durchgeführt wurde. Die für heterologe Expression in *E.coli* sehr kurze Induktionszeit von zwei Stunden ließ den Schluss zu, dass die Überexpression von N-Terminus-Strep-Par-4 in *E.coli* für die Organismen selbst stark toxisch sein müsste. Als erstes wurde versucht, das Gemisch aus vollständigen und abgebauten N-Terminus-Strep-Par-4 Proteinen mit einer Gelfiltration in seine Einzelteile aufzutrennen (s. Abbildung 2.33)

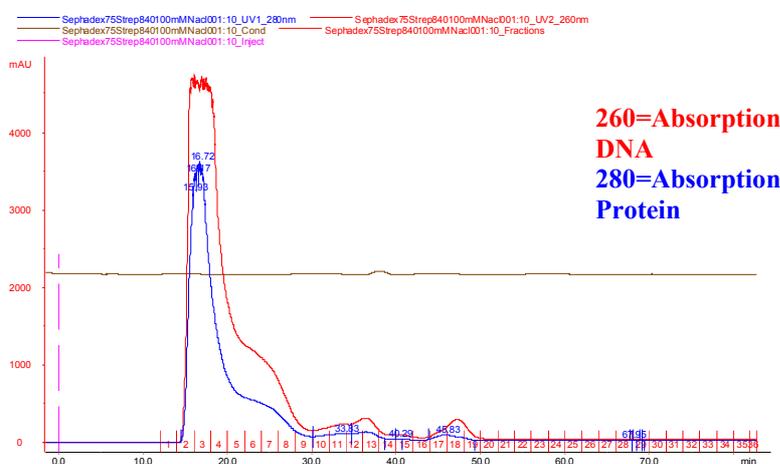


Abbildung 2.33: Gelfiltration mit einer analytische Sephadex 75 Säule einer Proteinprobe von N-Terminus-Strep-Par-4, die mit 100mM NaCl und 50mMTris bei pH 7,5 über eine Strep-Taktin Sepharose aufgereinigt wurde.

Die Bedingungen für die Reinigung wurden wie in Punkt 2.1.2.9 beschrieben beibehalten. Die Gelfiltration zeigte, dass auch bei der Reinigung der N-terminalen Domäne Nukleinsäuren an das Proteingemisch gebunden waren. Man konnte in diesem Fall (anders als bei DD und Par-4, da dort die Nukleinsäuren direkt mit dem zu reinigenden Protein assoziiert waren) aber noch nicht sagen, dass die Nukleinsäuren mit der N-terminalen Domäne assoziiert waren, denn dafür war die Proteinfraction, die nach der Strep-Taktin Sepharose Reinigung eluiert wurde, nicht sauber genug (SDS-Page nicht gezeigt). Alle Versuche in diesem Puffersystem (100mM NaCl und 50mM Tris bei pH 7.5), die Reinigung des Proteins zu optimieren, schlugen fehl.

So wurden verschiedene Puffer für die Aufreinigung von N-Terminus-Strep-Par-4 getestet. Jeweils 0,5 g Zellen an heterolog exprimiertem N-Terminus-Strep-Par-4 wurden mit den in der Tabelle 2.34 aufgeführten Aufschlusspuffern aufgenommen und über die Strep-Taktin Sepharose gereinigt. Je eine Probe des Eluats wurde auf ein SDS-Page aufgetragen und miteinander verglichen.

Molarität	Salz	Molarität	Puffer	pH Wert	Löslichkeit
100mM	NaCl	50 mM	Tris	pH 7,5	+++
200mM	NaCl	50 mM	Tris	pH 7,5	++
100mM	MgCl ²	50 mM	Tris	pH 7,5	+
200mM	MgCl ²	50 mM	Tris	pH 7,5	+
100mM	KCl ²	50 mM	Tris	pH 7,5	--
200mM	KCl ²	50 mM	Tris	pH 7,5	--
100mM	CaCl ²	50 mM	Tris	pH 7,5	--
200mM	CaCl ²	50 mM	Tris	pH 7,5	--
100mM	K-Citrat	50 mM	Tris	pH 7,5	++
200mM	K-Citrat	50 mM	Tris	pH 7,5	+

Tabelle 2.34: Löslichkeit von N-Terminus-Strep-Par-4 in verschiedenen Salzen

Das Protein N-Terminus-Strep-Par-4 war neben Natrium-Chlorid auch in 100mM K-Citrat 50mM Tris pH 7,5 gut löslich. Auffällig war, dass der proteolytische Abbau, wie in Abbildung 2.35 zu sehen, nicht so groß war, wie bei der Aufreinigung mit 100mM NaCl und 50mM Tris bei pH 7,5 (s. Abbildung 2.32).

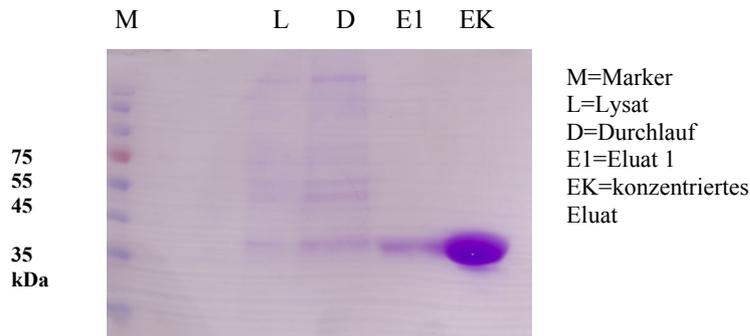


Abbildung 2.35: SDS-Page der Strep-Tactin Sepharose Reinigung von N-Terminus-Strep-Par-4 aus 4g *E.coli*. Aufgenommen, gewaschen und Eluiert mit 100mM K-Citrat 50mM Tris pH 7.5.

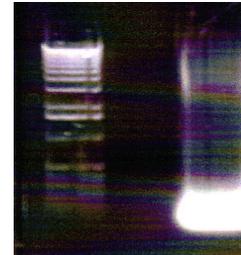


Abbildung 2.36: Aggarosegel der Probe EK (konzentrierte Probe s. Abbildung 2.35) und die daran gebundene Nukleinsäure.

Der N-terminale Bereich von Par-4 N-Terminus-Strep-Par-4 scheint ebenso wie Par-4 oder die Death Domain, definierte Nukleinsäurestücke zu binden (s. Abbildung 2.36). Ist die Bindung am C-terminalen Bereich der Death Domain durch den Leucin-Zipper zu erklären, so ist die Bindung an den N-terminalen Bereich von Par-4 noch unklar. Für die Abtrennung der Nukleinsäuren konnte annähernd das gleiche Protokoll wie für Par-4 benutzt werden. Durch eine kurzzeitige pH-Absenkung auf 5,5 wurde eine Abtrennung der Nukleinsäuren erreicht. Dies führte auch hier zu einem geringen Verlust von Proteinmenge.

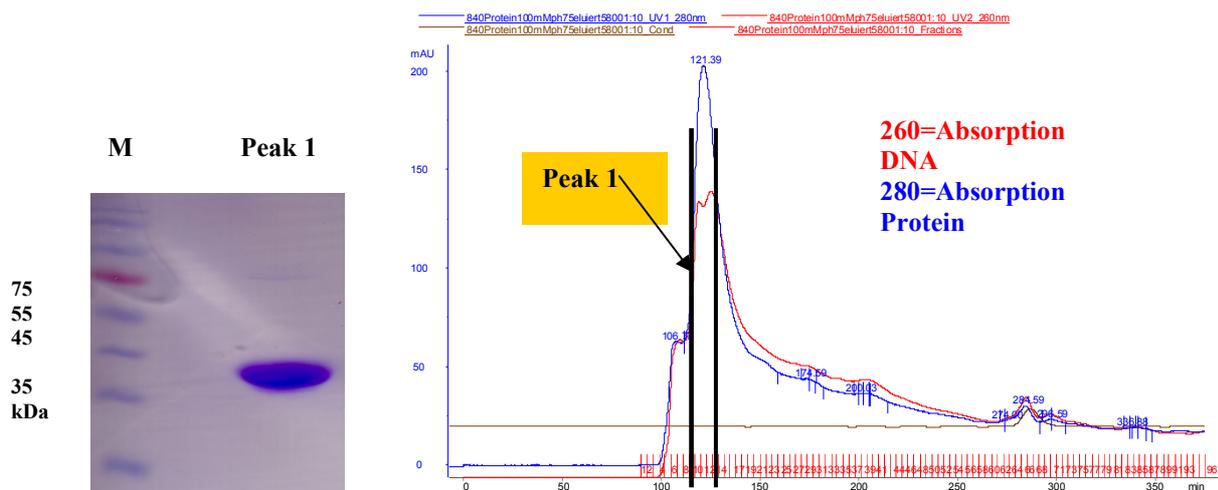


Abbildung 2.37: Chromatogramm der Reinigung nach Abtrennung der Nukleinsäure und SDS-Page, das die konzentrierte Probe von N-Terminus-Strep-Par-4 in 100mM K-Citrat 50mM Tris pH 7,5 gereinigt zeigt.

Aus dem Bereich, der durch die schwarzen Balken im Chromatogramm markiert ist, wurden die Eluatfraktionen, konzentriert und im SDS-Gel aufgetragen

In dem Chromatogramm (Abbildung 2.37) ist die erfolgreiche Ablösung der Nukleinsäuren vom N-Terminus-Strep-Par-4 zu sehen. Im SDS-Page in Abbildung 2.37 ist das Protein in konzentrierter und ausreichend sauberer Form für die Kristallisation gezeigt. Aus 4g *E.coli* konnte man 200 µl a 8mg Protein N-Terminus-Strep-Par-4 isolieren.

Sowohl an Par-4 als an den beiden funktionalen Teilbereichen, der Death Domain und N-Terminus-Par-4, binden definierte Nukleinsäurestücke. Für die Kristallisation ist es entscheidend, homogene Proteinlösungen herzustellen. Dies ist gelungen mit der Möglichkeit, die Nukleinsäuren von den Proteinen abzutrennen. Bei der Optimierung der Reinigung von N-Terminus-Par-4 wurde mit K-Citrat ein Salz gefunden, in dem nicht nur N-Terminus-Par-4, sondern auch Par-4 und die Death Domain löslich sind. Die Reinigung dieser beiden Proteine in K-Citrat konnte anschließend auf beide erfolgreich übertragen werden. Dass Par-4 und die Death Domain in MgCl₂ sehr gut löslich sind, korreliert mit der Bindung von Nukleinsäuren. Dass die Proteine im physiologischen Bereich alle im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäulen liefen, war klar ein Effekt der gebundenen Nukleinsäuren, da sich nach deren Abtrennung das Laufverhalten änderte (s. Abbildung 2.19-2.21, 2.27). Viele Proteine, die einen Leucin-Zipper oder ähnliche protein- oder DNA-bindende Motive wie HLH (helix-loop-helix) besitzen, sind nur als Homo- oder Heterodimer funktional. Dies erklärt, dass Par-4 und die Death Domain, nicht als Monomer zu reinigen waren. Es ist anzunehmen, dass es sich bei Par-4 um einen stabilen Dimer und bei der Death Domain um einen stabilen Tetramer handelt. Im nicht physiologischen pH-Bereich bei pH 4,5 zeigen sowohl die Death Domain als auch Par-4 dasselbe Laufverhalten in der Gelfiltration. Der Grund für die Aggregation von Par-4 und der Death Domain bei diesem pH-Wert könnte an den im Par-4 Gen im hohen Maße vorkommenden Ladungen und damit verbundenen Ladungswchselwirkungen liegen. Ob der N-terminale Bereich von Par-4 bei diesem pH-Wert überhaupt gefaltet ist, scheint sehr fraglich, denn der N-terminale Bereich (N-Terminus-Par-4) alleine ist bei diesem pH-Wert nicht handhabbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Par-4 und auch die beiden Teilbereiche DD und N-Terminus-Par-4 nukleinsäurefrei in einem physiologischen pH-Bereich gereinigt und so optimale Ausgangspositionen für funktionale und kristallographische Untersuchungen geschaffen werden konnten. Um die Anzahl der Faktoren, die für die Aggregation verantwortlich sein könnten, zu verringern, werden im nächsten Abschnitt verschiedene Punktmutationen in das Par-4 Gen eingeführt und deren Auswirkungen auf die Reinigung beschrieben.

2.1.2.11 Expression und Reinigung der hergestellten Mutanten in *E.coli*

2.1.2.12 Expression, Reinigung und Charakterisierung der Cysteinmutanten

Die häufigste Form der kovalenten Bindung bei der Ausbildung von Sekundärstruktur ist die Entstehung von Disulfidbrücken (S-S) zwischen zwei Cysteinresten, ausgebildet durch Oxidation ihrer Schwefel-Wasserstoff- (Sulfhydryl-Thiol-) Gruppen. Disulfidbrücken haben eine große Bedeutung für die Struktur und die Funktion vieler Proteine (Stuart et al., 2002). Proteine, die Disulfidbrücken ausbilden, können in zwei Gruppen unterteilt werden:

Bei der ersten Gruppe unterstützen die Disulfidbrücken die Faltung der Proteine oder tragen zur Stabilisierung der Proteinstruktur bei. Außerdem können sie eine intermolekulare Bindung von Proteinen vermitteln.

Bei der zweiten Proteingruppe trägt der Wechsel zwischen dem oxidierten und dem reduzierten Zustand der Sulfhydryl-Gruppen der Cysteine zu einer Aktivierung bzw. Deaktivierung der Proteine bei, z.B. von Enzymen wie der Ribonukleotid-Reduktase (Kadokura et al., 2003). Die Reduktion bzw. Oxidation der Cysteinreste erfolgt hauptsächlich durch Mitglieder der Thioredoxin-Familie. Bei dem Enzym Thioredoxin handelt es sich um eine Disulfid-Reduktase, die großen Anteil daran hat, im Zytoplasma der Zellen ein niedriges Redox-Potential aufrecht zu erhalten. Daher besitzen zytoplasmatische Proteine, im Gegensatz zu extrazellulären oder membranständigen Proteinen, viele freie Sulfhydryl-Gruppen. Disulfide kommen aus diesem Grund im Zytoplasma nur sehr selten vor. Eine spontane Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen kann nur sehr langsam ablaufen (Arnér et al., 2000). Das bedeutet, dass eine gesteuerte Oxidation und Reduktion zytoplasmatischer Proteine zur Regulation der Proteinfunktion und –struktur genutzt werden kann.

Im Par-4 Protein sind in der Aminosäuresequenz 3 Cysteine vorhanden (s. Abbildung 2.38)

Proteinsequenz Par-4:

MATGGYRSSGSTTDFLEEWKAKREK**M**RAKQNPVGGPGSSGGDPAAKSPAG
 PLAQTAAAGTSELNHGPAGAAAPAAPGPGALN**C**AHGSSALPRGAPGSRR
 PEDE**C**PIAAGAAGAPASRGDEEEDPSAPEKGRSSGSPARKGKGQIEKRKL
 REKRRSTGVVNIPAAE**C**LDEYEDDEAGQKERKAEDAITQNTIQNEAASL
 PDPGTSYLPQDPSRTVPGRYKSTISAPEEEILNRYPRTDRSGFSRHRNRDTS
 APANFASSSTLEKRIEDLEKEVLRERQQNLRRLTRL**M**QDKEE**M**IGKLEEI
 DLLNRDLDD**M**EDENEQLKQENKTLKVVGGQLTR Stop

Abbildung 2.38: Aminosäuresequenz von Par-4 mit eingezeichneten Cysteinen

Die Cysteine liegen im Par-4 Protein an Position 82, 103 und 165 der Aminosäuresequenz. Ob zwei von den drei Cysteinen in der Tertiärstruktur eine Disulfidbrücke bilden oder ob eines oder alle drei an einer Homomerisierung beteiligt sind, ließ sich bis jetzt nicht mit Sicherheit feststellen. Aber würden zwei von ihnen eine Disulfidbrücke bilden, läge ein Cystein frei und könnte, wenn es an der Oberfläche des Proteins läge, mit einem anderen Par-4 eine kovalente Disulfidbrücke bilden und zur Dimerisierung der beiden beitragen. Um dies näher zu untersuchen, wurde durch eine Punktmutation jeweils eines der Cysteine durch ein Alanin ausgetauscht (s. Tabelle 2.3). So entstanden vier Konstrukte JK170803N1 (C82A), JK170803M1 (C103A), JK170803R1 (C165A) und JK161003L1 (C82A/C103A/C165A). Diese wurden in *E.coli* heterolog exprimiert und mit der Expression und Reinigung von Par-4 verglichen. Gleichzeitig wurden die Konstrukte auf ihre funktionale Aktivität *in vivo* von der Gruppe Dr. Preuß in Bonn untersucht.

Die heterologe Expression und Reinigung erfolgte wie für Par-4 (s. 2.1.2.2).

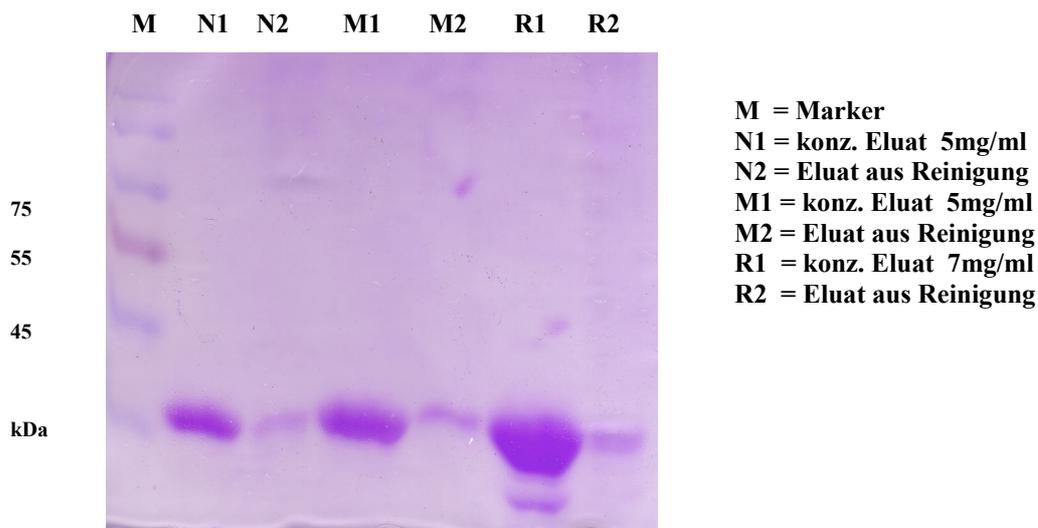


Abbildung 2.39: SDS-Page der konzentrierten Eluate von JK170803 M1(C82A),N1(C103A) und R1(C165A) Jeweils 4g *E.coli* von N1, M1und R1wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5, 10mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 60 ml Lysat beladen. Es wurde mit 200ml Waschpuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 70ml Puffer (50mM Kh₂PO₄ pH 4,5).

In Abbildung 2.39 sind alle Eluate der Reinigung von JK170803 M1(C82A), N1(C103A) und R1(C165A) in einem SDS-Page aufgetragen. Die Triplemutante JK161003L1 (C82A/C103A/C165A) wurde zwar heterolog exprimiert, konnte aber nicht gereinigt werden, da sie nicht löslich war. Anhand der Proteinproben im SDS-Page, konnte man keinen Unterschied zwischen den drei löslichen Proteinen erkennen. Alle drei sind in 50mM Kh₂PO₄ pH 4,5 löslich und ließen sich auch gut konzentrieren. Auch die jeweiligen Chromatogramme der Gelfiltrationen (Daten nicht gezeigt) ließen bei den Bedingungen 50mM Kh₂PO₄ pH 4,5

keinen Unterschied erkennen. Alle hergestellten Mutanten liefen im Ausschlussvolumen der Säule wie Par-4 unter diesen Bedingungen. Es scheint, als ob die Einzelmutationen keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität und die Multimerisierung von Par-4 haben. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen, die *in vivo* mit den Konstrukten gemacht wurden.

Dort wurden die Par-4 Cysteinmutanten unter den Aspekten der subzellulären Lokalisation, der Aktin-Bindung und des proapoptotischen Potentials untersucht. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Par-4-Cysteinmutanten zeigte sich, dass alle drei Cysteinmutanten wie das Par-4 Protein im Zytoplasma am Aktin-Zytoskelett lokalisiert waren. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Par-4-Cysteinmutanten korrekt gefaltet und funktionell waren, und dass der Austausch der Cysteinreste von Par-4 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Par-4 ausübt.

Die Expression einer Dreifachmutante von Par-4, bei der alle drei Cysteinreste gegen Alanin ausgetauscht worden waren, verdeutlichte, dass die Cysteinreste generell einen Einfluss auf die Faltung des Par-4 Proteins haben. Diese Mutante war in unspezifischen Einschlüssen im Zellkern akkumuliert und konnte nicht mit den Par-4 Antikörpern detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Vermutlich ist sie nicht korrekt gefaltet. Um den Einfluss der Cysteinreste auf die Stärke der Aktin-Bindung von Par-4 zu untersuchen, wurden TX-100-lösliche und -unlösliche Zellextrakte von REF52.2-Zellen hergestellt, die mit den Par-4-Cysteinmutanten transfiziert waren. Dabei zeigte sich, dass die Mutanten Par-4-C103A und Par-4-C165A ebenso wie Par-4 zum größten Teil in der TX-100-unlöslichen Fraktion nachzuweisen waren (81% bzw. 57%). Nur die Cysteinmutante Par-4-C82A wurde zu 70% in der TX-100-löslichen Fraktion nachgewiesen. Da diese Cysteinmutante in der fluoreszenzmikroskopischen Analyse eindeutig am Aktin-Zytoskelett detektiert werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass zwar eine Bindung an die Aktin-Filamente wie bereits gezeigt über den N-Terminus von Par-4 erfolgte (Vetterkind et al., 2005b), dass jedoch die starke, TX-100-unlösliche Bindung an Aktin nicht mehr möglich war. Bei der Untersuchung der Apoptoseinduktion nach der Koexpression der Par-4-Cysteinmutanten mit der DLK zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zur Apoptoseinduktion nach der Koexpression von Par-4 mit der DLK. Nach der Koexpression von Par-4 mit der DLK stieg die Apoptoserate auf 40% an. Nach der Koexpression der DLK mit den Cysteinmutanten Par-4-C82A, Par-4-C103A und Par-4-C165A, lag die Apoptoserate bei 36%, 45% bzw. 32%. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Austausch der Cysteinreste gegen Alanin keinen entscheidenden Einfluss auf die Par-4/DLK-vermittelte Apoptose hat. Wie bereits gezeigt wurde, ist eine Bindung von Par-4 an das Aktin-Zytoskelett und die Interaktion mit der DLK für die

Induktion der Apoptose notwendig (Vetterkind et al., 2005b). Obwohl die Par-4-Cysteinmutante Par-4-C82A nur schwächer als die anderen Cysteinmutanten an das Aktin-Zytoskelett bindet, scheint diese Bindung für die Induktion der Apoptose ausreichend zu sein. Zusammenfassend zeigen diese *in vivo* Ergebnisse zum einen, dass zwar die Aktin-Bindung von Par-4 durch den Austausch des Cysteins an der Position 82 gegen Alanin leicht beeinträchtigt wird, dass aber weder die subzelluläre Lokalisation, noch die Aktin-Bindung oder die Induktion der Apoptose maßgeblich durch den Austausch einer der drei Cysteinreste beeinträchtigt wird.

Zum anderen zeigen die Cysteinmutanten *in vitro* sowohl im physiologischen als auch im nicht physiologischen pH-Bereich das gleiche Aggregationsverhalten wie das Par-4 Protein. Demzufolge scheinen diese Arten der Mutationen keinen Vorteil für die kristallographischen Untersuchungen zu bringen.

2.1.2.13 Expression und Reinigung der Phosphorylierungsmutanten

Die Anlagerung und Entfernung von Phosphatgruppen an Proteine ist eine sehr wichtige Modifikationsart, die in allen Kompartimenten der eukaryotischen Zelle vorkommt. Die Einführung einer negativen Ladung in ein Protein kann große Auswirkungen auf dessen elektrostatische Eigenschaft haben. Die Modifikation spielt beim Zellzyklus, bei der Signalübertragung, bei der Tumorentstehung und ganz allgemein bei der Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen eine sehr wichtige Rolle.

Die DLK oder DLK/ZIP-Kinase zählen (Kögel et al., 1998; Kawai et al., 1998) mit den DAP (Death associated Protein) zu einer Kinase-Subfamilie. Im Gegensatz zu den DAP, die eine Todesdomäne besitzen, haben die DLK/ZIP-Kinasen einen Leucin-Zipper als Interaktionsmotiv. Ihre proapoptotische Funktion ist strikt an ihre Kinaseaktivität gekoppelt. Das Protein Par-4 wird von der DLK *in vitro* phosphoryliert (Page et al., 1999), daher ist anzunehmen, dass die Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der von Par-4/DLK vermittelten Apoptose spielt. Dabei wird dem Serin, im Par-4 Gen an Position 154 AS gelegen, eine große Bedeutung postuliert (Rangnekar, 1998).

Daher wurde die in Par-4 vorhandene Phosphorylierungssite an Position S154, T155 gegen Alanin ausgetauscht (Meike Boosen et al., Dissertation 2005). Es wurden drei Konstrukte hergestellt, in denen jeweils Serin gegen Alanin, Threonin gegen Alanin und dann beide gegen Alanin ausgetauscht wurden. Zunächst wurden die drei Konstrukte JK191003O1

(S154A), JK191003P1 (T155A) und JK191003Q1 (S154A/T155A) in *E.coli* exprimiert und gereinigt.

Die heterologe Expression und Reinigung erfolgte wie für Par-4 (s. Abschnitt 2.1.2.2), was auch bei allen drei Konstrukten gut gelang (s. Abbildung 2.40). Insgesamt konnte man aus den drei Konstrukten aus je ~5 g *E.coli* Zellen 500 µl à 8 mg reines Protein isolieren.

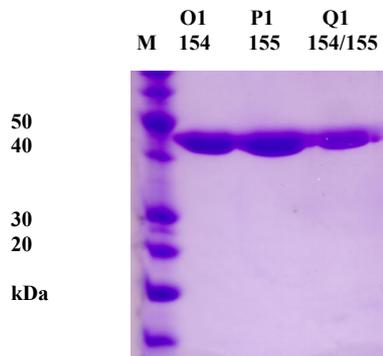


Abbildung 2.40: SDS-Page der konzentrierten Eluate von JK191003O1 (S154A), JK191003P1 (T155A) und JK191003Q1 (S154A/T155A) Jeweils 5g *E.coli* von O1, P1 und R1 wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5, 10mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 60 ml Lysat beladen. Es wurde mit 200ml Waschpuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 70ml Puffer (50mM Kh₂PO₄ pH 4,5).

2.1.2.14 Expression, Reinigung und Charakterisierung der Leucinmutante

Bei apoptotischen Proteinen treten verschiedenen Motive wie der Zinkfinger-, helix-turn-helix-, helix-loop-helix- und der Leucin-Zipper auf, über die diese Proteine miteinander als Homo- oder Heterodimer oder mit DNA in Wechselwirkung treten. Wie in Abschnitt 1.2 erläutert hat der C-terminale Abschnitt von Par-4 sowohl Homologien zur Death Domain als auch zu einem Leucin-Zipper Motiv. Die Leucin-Zipper Motive (graphische Darstellung in Abbildung 2.41) bilden amphipathische Helices aus, die

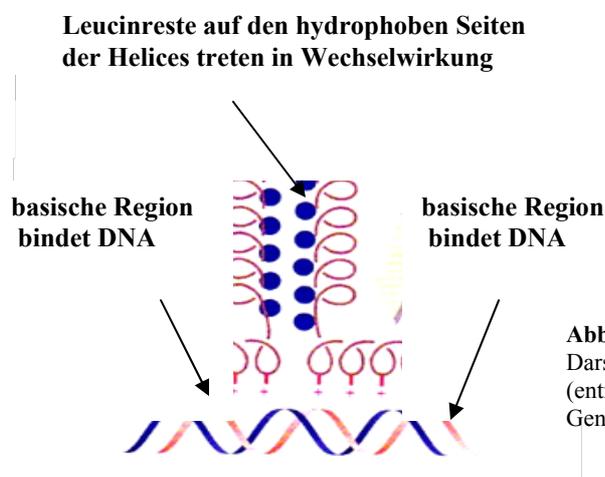


Abbildung 2.41: Graphische Darstellung eines Leucin-Zippers (entnommen aus Molekularbiologie der Gene/ B.Lewin 1998)

sich über die in regelmäßigen Abständen wiederholenden Leucine ineinander verzahnen, wobei ein basischer Rest übrigbleibt, der sich an die DNA bindet. Der Leucin-Zipper ist

konserviert, aber durchaus sehr flexibel und muss nicht aus sieben Leucinen gebildet sein, sondern es reichen wie bei C/EBP (ein Faktor, der als Dimer sowohl an die CAAT-BOX als auch an den Core-Enhancer an S-40 bindet) 4 Leucine oder wie bei Jun und Fos (bilden zusammen AP1) 5 Leucine zur Dimerbildung aus.

In der unteren Abbildung wird die Homologie eines Leucin-Zipper Motivs zu dem C-terminalen Abschnitt von Par-4 graphisch verdeutlicht.

Protein Sequenz der Death Domain :

Met A S W S H P Q F E K A G F S R H N R D T S A P A N F A S S S T L E K R I E D L E
1(295 AS) 2

K E V L R E R Q Q N L R L T R L M e t Q D K E E M e t I G K **L** K E E I D L **L** N R D L
3(316AS) 4 5 6(330AS)

D D **M** E D E N E Q **L** K Q E N **K** T L L **K** V V G Q **L** T R

Abbildung 2.42: Proteinsequenz der Death Domain. Homologien zu einem Leucin-Zipper sind grün und die dazugehörigen Leucin rot gekennzeichnet. Basische Aminosäuren sind violett hervorgehoben (mögliche Binderegion an die DNA). Die rot vergrößerten Leucine wurden im Konstrukt JK5080412 (L295A,L316A,L330A) in Alanine umgewandelt.

Im Konstrukt JK050804 12 sind die Leucine (L295A, L316A, L330A in der Abbildung 2.42 Nummer 1, 4, 6) in Alanine umgewandelt worden. Ähnlich wie bei den Cysteinmutanten in Abschnitt 2.1.2.12, sollte die Leucin Mutante unter den Aspekten der subzellulären Lokalisation, der Aktin-Bindung und des proapoptotischen Potentials *in vivo* untersucht werden. Darüber hinaus bestand natürlich großes Interesse, inwieweit die Mutante heterolog in *E.coli* zu exprimieren und löslich war.

Die heterologe Expression und Reinigung erfolgte wie für Par-4 (s. 2.1.2.2.). Die Abbildung 2.43 zeigt die Proben der Strep-Taktin Reinigung des Konstrukts JK050804 12. Ähnlich wie bei der Par-4 Reinigung, wurde anstatt mit Destiobiotin mit einem pH-Gradienten eluiert. Entgegengesetzt der Par-4 Reinigung, in der die Proteinfraction erst ab einem pH-Wert von 5,2 von der Strep-Taktin Säule eluiert werden konnte, eluierte das Protein schon sehr früh von der Säule . Die pH-Werte der aufgefängenen Eluate sind in Abbildung 2.43 vermerkt. Bei der Elution von Par-4 trat um den isoelektrischen Punkt des Proteins eine Trübung in den Eluatfraktionen auf, die aber durch weiteres Absenken des pH-Wertes wieder verschwand.

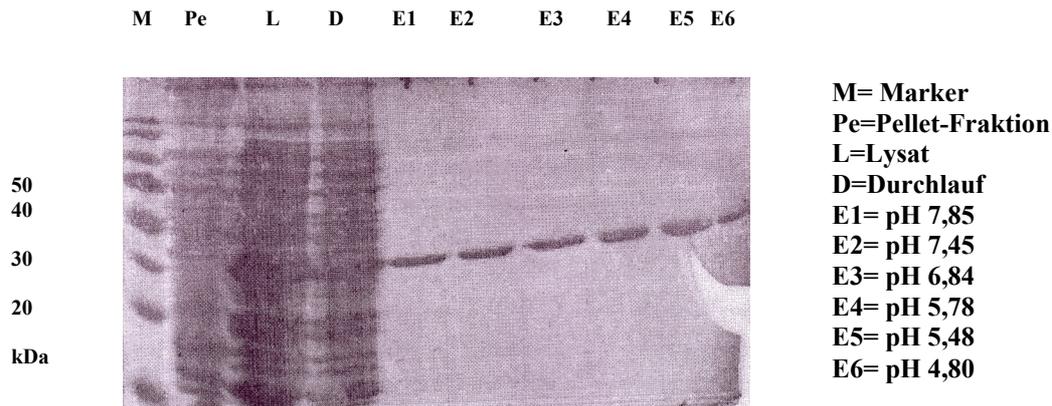


Abbildung 2.43: SDS-Page der konzentrierten Eluate von JK050804 12 (L295A, L316A, L330A) Jeweils 5g *E.coli* Zellen wurde mit 50ml Aufschlusspuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5, 10mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 60 ml Lysat beladen. Es wurde mit 200ml Waschpuffer (200 mM MgCl₂, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 70ml Puffer (50mM Kh₂PO₄ pH 4,5)

Diese Trübung konnte bei der Elution von dem Konstrukt JK050804 12 nicht beobachtet werden. Wie den pH-Werten der aufgefangenen Eluate zu entnehmen ist (Abbildung 2.43), scheint das Protein in jedem pH-Wert löslich zu sein.

Die anschließende Gelfiltration brachte allerdings keine neuen Erkenntnisse hinsichtlich der Aggregation im physiologischen und nicht physiologischen pH-Bereich. Doch scheint der Austausch der Leucine gegen Alanin und somit die funktionale Beeinträchtigung des Leucin-Zippers, einen Einfluss auf die pH-Abhängigkeit des Proteins zu haben.

Durch *in vivo* Versuche konnte im Unterschied zu den Par-4 Cysteinmutanten gezeigt werden, dass die Leucinmutante in nahezu 50% der mit Par-4-L3A transfizierten Zellen zusätzlich im Zellkern nachweisbar war. Das heißt, dass die subzelluläre Lokalisation sich mit dem Austausch der Leucine gegen Alanin dramatisch verändert hat und bedeutet, dass die Hemmung der Funktion des Leucin-Zippers die subzelluläre Lokalisation von Par-4 beeinflusst. Damit verbunden konnte man auch eine Absenkung des apoptotischen Potentials gegenüber Par-4 beobachten. Diese Erkenntnis, dass die Par-4 Triplemutante (L295A, L316A, L330A) bei einer Überexpression in einer Zelllinie zu 50% im Kern zu beobachten ist, macht deutlich, dass sich die Funktion von Par-4 im zellulären Ablauf nicht auf das Cytoplasma beschränkt. Es wird ebenfalls deutlich, dass die Zeit, die Par-4 im Kern verbleibt, sehr kurz ist und deshalb kann es selbst bei einer Überexpression *in vivo* schlecht oder gar nicht detektiert werden. Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, bindet ein Komplex aus Par-4 und dem Transkriptionsfaktor WT1 an eine WT1-Bindungsstelle des *bcl-2*-Promotors und reprimiert die Transkription des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (Cheema et al., 2003). Anhand von Par-4-Deletionsmutanten (ohne C-Terminus) wurde gezeigt, dass die Interaktion

mit WT1 über den C-Terminus von Par-4 erfolgt. Dabei ist ein C-terminales Fragment, das die AS 268-332 umfasst, ausreichend für die Interaktion (Johnstone et al., 1996). Dieses C-terminale Fragment umfasst den Leucin-Zipper von Par-4 (AS 292-332), aber nur einen Teil der Todesdomäne (AS 258-332). Auf Grund dieser Befunde ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion mit WT1 über den Leucin-Zipper erfolgt. Nach den Ergebnissen aus Abschnitt 2.2 (Nukleinsäurebindung von Par-4) ist anzunehmen, dass Par-4 nicht nur über einen Komplex mit WT1 als Transkriptionsfaktor wirkt, sondern dass Par-4 selbst als Homodimer in der Genregulation aktiv ist.

2.1.2.15 Kristallisation der Par-4 Proteine

Die Experimente zur Kristallisation von Par-4 werden in unserem Institut jetzt schon seit drei Jahren intensiv betrieben. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Kristallisation ist es, eine saubere, homogene und möglichst hochkonzentrierte Proteinprobe herzustellen. Dass dies nicht immer ausreichend ist, wurde in den letzten Abschnitten detailliert dargelegt. Es wurde mehrfach versucht, Par-4 unter physiologischen pH-Bedingungen mit verschiedenen Puffern zu kristallisieren, aber die Entdeckung, dass aus *E.coli* rekombinant hergestelltes Par-4 unspezifisch die unterschiedlichsten DNAs gebunden hat (s. Abschnitt 2.5.1), macht deutlich, warum die Kristallisation unter diesen Voraussetzungen nicht funktionieren konnte.

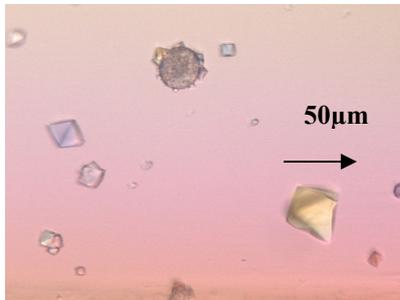
Bei der Reinigung von Par-4 unter nicht physiologischen Bedingungen (50mM KH₂PO₄ pH 4,5), wurden zwar hohe Multimerisierungen beobachtet, aber in der Proteinlösung konnten keine Nukleinsäuren mehr detektiert werden. Waren die Voraussetzungen für die Kristallisation aus einer nicht homogenen Probe (Partikelgröße von 10-150 nm) noch so ungünstig, konnten in dieser Arbeit für Par-4 und die Death Domain unter diesen Bedingungen erste Erfolge in der Kristallisation erzielt werden.

2.1.2.15.1 Death Domain

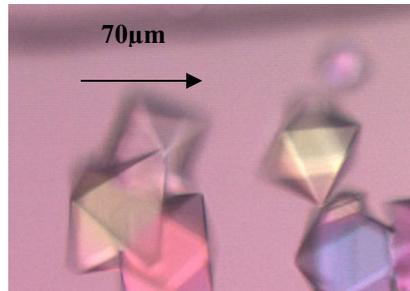
Bei der Kristallisation der Death Domain wurden bereits Kristalle von Dr. Eidhoff hergestellt, die aber eine schlechte Beugung zeigten. Diese Kristalle wuchsen unter der Reservoirbedingung 25% tertiär-Butanol und 100 mM Na-Citrat bei pH 7,5 heran und konnten unter diesen Bedingungen nicht reproduziert werden. Nachdem die Sauberkeit der Proteinlösung durch zusätzliche Reinigungsschritte verfeinert worden war, wurde mit Hilfe eines Tecan-Pipettierroboters ein Feinscreen gegen tertiär-Butanol und den pH-Wert erstellt.

Nach ~ 1 Woche wuchsen die ersten Kristalle in verschiedenen Bedingungen des Feinscreens heran.

1. Bild



2. Bild



3. Bild

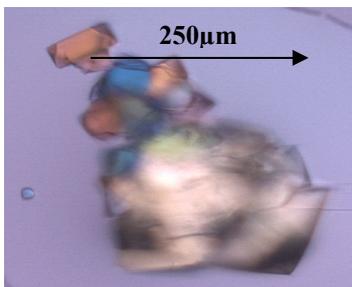


Abbildung 2.44: Bipyramidale Death Domain Kristalle. Gezeigt sind Aufnahmen von Sitting-Drop Ansätzen mit Death Domain (18mg/ml) Ansätze 0,3µ:0,3µl

- 1 Bild : F 12 (42% tertiär Butanol/100mM Na-Citrat/pH 7,5)
- 2 Bild : E 8 (34% tertiär Butanol/100mM Na-Citrat/pH 7,25)
- 3 Bild : A 12 (42% tertiär Butanol/100mM Na-Citrat/pH 6,25)
- 4 Bild : B 9 (36% tertiär Butanol/100mM Na-Citrat/pH 6,5)

4. Bild

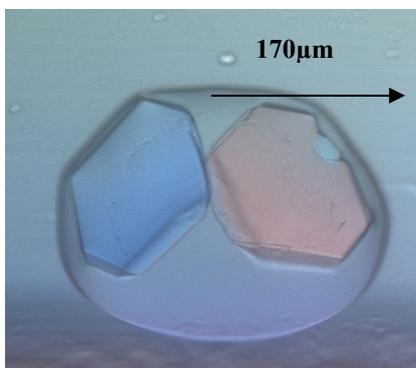


Abbildung 2.45: pseudohexagonaler Death Domain Kristall. Gezeigt sind Aufnahmen von Sitting-Drop Ansätzen mit Strep-Death Domain (18mg/ml)

Bei den bipyramidalen Kristallen (s. Abbildung 2.44 Bild 1 und 2) handelt es sich um die tetragonale Form (Raumgruppe $P4_322$), die bereits von Dr. Eidhoff erhalten wurde. Die Kristalle (Abbildung 2.44 Bild 3) konnten aufgrund ihrer Größe bisher nicht weitergehend charakterisiert werden. Bisher wurden auch keine Cryobedingungen gefunden, die es erlaubten die pseudohexagonalen Kristalle (s. Abbildung 2.45 Bild 4) schadenfrei (100K) einzufrieren. Es konnte jedoch durch Diffraktionsaufnahmen gezeigt werden, dass es sich nicht um Salzkristalle handelte. Klar zeigt sich jedoch, dass die Kristallisationsform der Death

Domain Kristalle stark vom pH-Wert abhängt. Dies hängt sicherlich mit der hohen Anzahl an ionisierbaren Seitengruppen in der postulierten Leucin-Zipper-Domäne zusammen. Aufgrund der niedrigen Dielektrizitätskonstante von tertiär-Butanol wird die Coloumb-Wechselwirkung zwischen den Molekülen sehr stark sein, daher wird erwartet, dass die verschiedenen Kristallformen nicht nur eine unterschiedliche Packung aufweisen, sondern auch eine unterschiedliche Anzahl von Molekülen in der asymmetrischen Einheit.

2.1.2.15.2 Par-4

Bei der Kristallisation von gesamt Par-4 (50mM KH_2PO_4 pH 4,5) haben sich ebenfalls erste Erfolge eingestellt. Die Kristalle wuchsen bei 100mM K-Citrat, 50mM Tris pH 7,5 in einem Zeitraum von 8 Monaten heran, konnten aber bis heute nicht reproduziert werden (s. Abbildung 2.46).

Bild 1

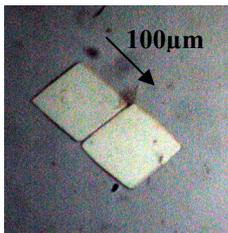


Bild 2

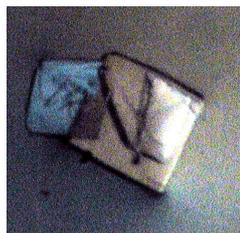


Bild 3

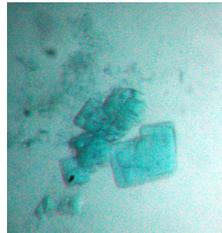


Abbildung 2.46: Par-4 Kristalle. Gezeigt sind Aufnahmen von Hanging-Drop Ansätze. Bild 1 und 2 mit Polarisationsfilter. Bild 3 mit Commasieblau angefärbt (Proteinnachweiß)

2.1.3 Expression von Par-4 in Hefe

Frühere Expressionen von Par-4 in Hefe wurden auf Grund der geringen Ausbeute und der damaligen Annahme von posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen und der damit verbundenen Probleme bei der Kristallisation nicht weiter verfolgt. In der Hefeexpression zeigte das Protein im SDS-Page eine Größe von 52 und 55 kDa (s. Abbildung 2.47). Demgegenüber läuft das Protein, wenn es in *E.coli* heterolog exprimiert wird, im SDS-Page bei ~ 45 kDa (s. Abbildung 2.40). Bezogen auf das apparante Molekulargewicht beträgt der Unterschied bei der heterologen Expression von Par-4 in Hefen und in *E.coli* ~ 10 kDa. Diese 10 kDa könnten posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen sein. Andererseits werden gerade Proteine die an der Regulation von zellulären Prozessen wie z.B. Zellkerntransport, Signaltransduktion,

Zellteilung und der zellulären Antwort auf Stresssituationen in eukaryotischen Zellen auf verschiedene Weise modifiziert. Beispiele für solche Modifizierungen sind Rub1, Apg8, Apg12 und Sumo (small ubiquitin-like modifier). Par-4 besitzt in seiner Gensequenz an Position 21-24 AS, 295-298 AS und 316-319 AS Modifizierungsstellen für Sumoylierungen. Sumoylierungen sind im Gegensatz zu Ubiquitierungen keine Markierungen für Degredation, sondern sie regulieren Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktion. Da Par-4 in diese Prozesse involviert ist, wäre es denkbar, dass Par-4 in Hefen sumoyliert wird. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass das Molekulargewicht von Sumo-Protein in Hefen 12 kDa ist. Daher wurde die Expression von Par-4 in Hefe wiederholt und versucht, Par-4 aus der unlöslichen Pelletfraktion in Lösung zu bringen, um mögliche Modifikationen nachzuweisen.

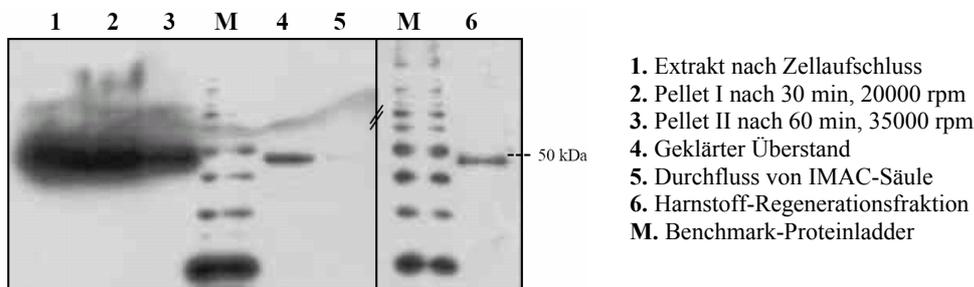


Abbildung 2.47: IMAC-Reinigung von PAR-4 (entnommen aus Dissertation, U.Eidhoff, 2001) : (Westernblot) Kulturen von F11 α - 070999 C1 (HIS-Par4-Strep) wurden bei einer OD₆₀₀ von 3 induziert und nach vier Stunden geerntet. Fünf Gramm Zellen wurden in der French-Press mit 50 ml Aufschluspuffer (200 mM NaCl, 3 mM Imidazol, 50 mM Tris pH 8,0 inkl. Proteaseinhibitoren) aufgeschlossen und gereinigt, wie in Abschnitt 2.3.3. beschrieben. Die IMAC-Säule wurde mit Cu²⁺-Ionen beladen. Waschpuffer I: 100 ml Aufschluspuffer; Waschpuffer II: Aufschluspuffer inkl. 10 mM Imidazol; Elutionspuffer: Aufschluspuffer inkl. 100 mM Imidazol. Die Detektion von PAR-4 erfolgte mit α -HIS-Konjugat und Chemolumineszenz.

2.1.3.1 Allgemeines zur Protein Expression in Hefe *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gehört zu den ältesten biotechnologisch genutzten Mikroorganismen und hat sich als ideales System für molekularbiologische Studien erwiesen. Das Genom der Hefe wurde vollständig sequenziert (Mewes et al., 1997) und ist stabil. Unter optimalen Bedingungen zeigt sie ein schnelles Wachstum, wobei die Expressionsraten heterologer Proteine annähernd denen in *E.coli* entsprechen. Es wurden bereits sehr viele cytoplasmatische Proteine und auch integrale Membranproteine in *S.cerevisiae* überexprimiert (Valenzuela et al., 1982 Brake et al., 1984). Der wohl gravierendste Unterschied zu prokaryotischen Expressionssystemen liegt in der posttranslationalen Modifikation, wie z.B. der spezifischen proteolytischen Prozessierung von zymogenem Protein, der Phosphorylierung und Glykosylierung, welche essentiell für die Funktionalität und Faltung des Proteins sein können. Andererseits können posttranslationale

Glykolysierungen bei späteren Kristallisationsversuchen zu Problemen führen. Der Erfolg einer Überexpression eines bestimmten eukaryotischen Proteins ist von vielen Faktoren abhängig. Zum einen muss das zu exprimierende Protein im Milieu des Cytosols stabil sein und vor allem darf es für die Hefe nicht toxisch sein. Ein weiterer Faktor ist der Abbau durch Proteasen, die in einer bestimmten Wachstumsphase der Hefe induziert werden und das zu exprimierende Protein spalten können, was die Ausbeute deutlich schmälern kann. Durch ein geeignetes, induzierbares Expressionssystem, wie dem pYEX-BX Expressionsvektor in Verbindung mit dem Hefe-Stamm F11 α , welches die Produktion des Zielproteins zeitlich von der Vermehrung der Zellen trennt, kann das Problem des Abbaus durch Proteasen teilweise umgangen werden. Der Vektor zeichnet sich durch den mit Kupferionen induzierbaren Promoter CUP1 (Macreadie et al., 1989) und zwei auxotrophen Selektionsmarkern, URA 3 und leu2-d, aus. Sowohl Uracil (Pyrimidin Base und essentieller Bestandteil der RNA) als auch Leucin wirken in Verbindung mit dem F-11 α als auxotrophe Marker, da diesem Stamm durch Mutagenese die Fähigkeit genommen wurde, Uracil und Leucin zu synthetisieren. Der Selektionsmarker leu2-d (Erhard & Hollenberg, 1983) verfügt über einen stark verkürzten, aber intakten Promotor mit geringer Transkriptionsrate. Als Resultat führt Leucin-Mangel im Medium zu einer erhöhten Replikationsrate des Plasmids und so zu einer Steigerung der Expressionsrate des Proteins.

2.1.3.2 Expression, Reinigung und Sumoylierung von Par-4 in Hefe

Mit dem Klon 011099 B1 (s. Abbildung 2.48) wurde eine Hefeexpression durchgeführt, da dieser die beste Expression in Hefen zeigte.

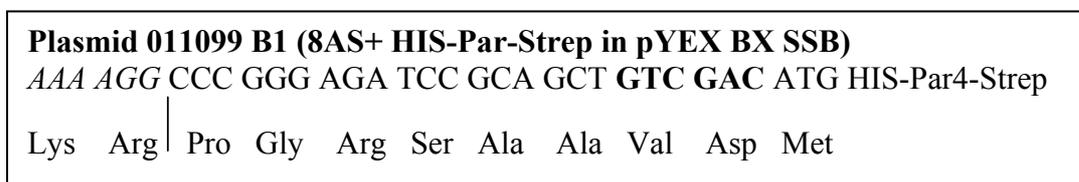


Abbildung 2.48: DNA-Konstrukte zur Sekretion von Par-4 ins Kulturmedium (Dissertation, U. Eidhoff, 2001): Dargestellt sind die entstehenden N-Termini der Par-4 Proteine nach Klonierung und Prozessierung durch KEX2. Die Schnittstelle für die KEX2-Protease (Strich) und Sal I (fett) sind gekennzeichnet.

Die transformierten Klone 011099 B1 wurden in einem Volumen von einem Liter auf eine OD₆₀₀ von 3,0 gebracht (entspricht einer Zellzahl von 3 x 1,8x10⁷ Zellen pro ml) und die Expression wurde mit 0,5 mM CuSO₄ (Endkonzentration) induziert. Nach einer Induktionszeit von 20 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und ergaben ein Pellet von 1,5g. Die 1,5g

Zellen wurden in 100ml 100mM K-Citrat 50mM Tris pH 7,5 aufgenommen und in mehreren Schritten in der Frenchpress aufgebrochen. Danach wurde die unlösliche Fraktion in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und mit der Pelletfraktion weitergearbeitet, da dort die größten Mengen an Par-4 Protein vorliegen. Die Pelletfraktion wurde in 50 ml 100mM K-Citrat 50mM Tris pH 7,5 aufgenommen und mit der Ultraschallnadel homogenisiert. Dann wurde entsprechend dem Volumen von 50 ml 1M L-Arginin als Trockensubstanz dazugeben und über Nacht bei 4 Grad in Gegenwart von Proteaseinhibitoren solubilisiert.

Im nächsten Schritt wurde die noch immer unlösliche Fraktion durch eine Ultrazentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde gefiltert und eine IMAC-Reinigung durchgeführt, da vorangegangene Strep-Taktin Reinigungen nicht funktioniert hatten, obwohl das Protein sowohl einen His-Tag als auch einen Strep-Tag besitzt.

Die Eluate aus der IMAC-Reinigung wurden konzentriert und Westernblots mit Strep- (s. Abbildung 2.49), His- (s. Abbildung 2.50) und Sumo-Antikörpern (s. Abbildung 2.51) durchgeführt.

Strep-Blot des solubilierten Par-4 Proteins aus dem Hefe-Pellet:



Abbildung 2.49: Strep-Blot von solubilierten Par-4 aus Hefe.

His-Blot des solubilierten Par-4 Proteins aus dem Hefe-Pellet:

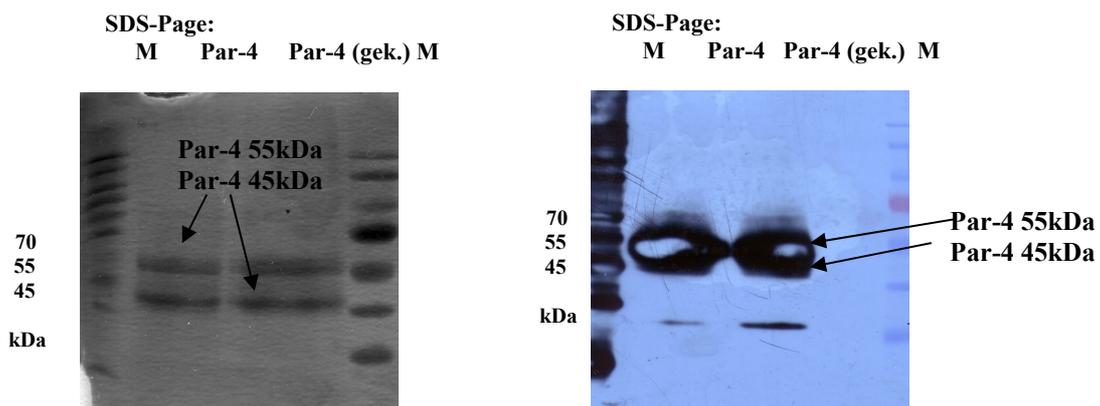


Abbildung 2.50: SDS-Page und His-Blot von solubilierten Par-4 aus Hefe.

Sumo-Blot des solubilisierten Par-4 Proteins aus dem Hefe- Pellet:

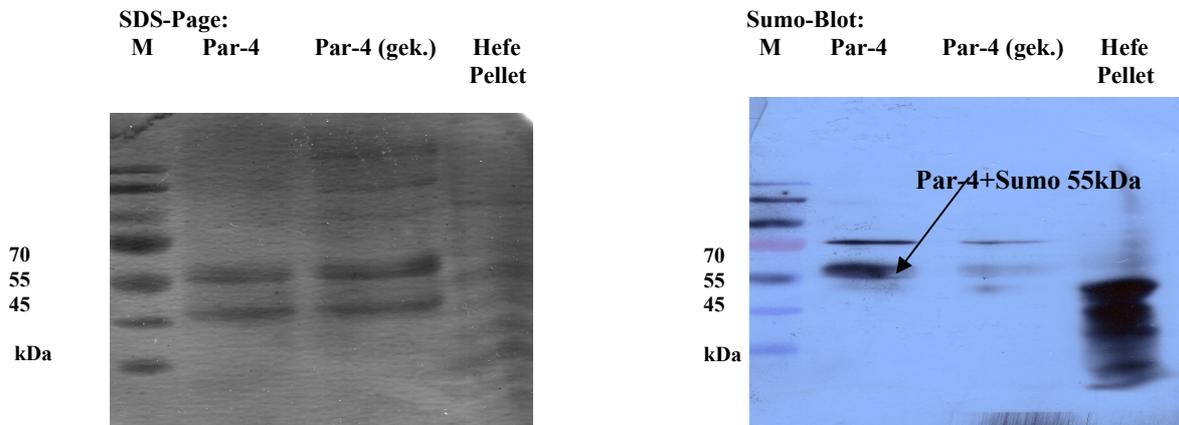


Abbildung 2.51: SDS-Page und Sumo-Blot von solubilisierten Par-4 aus Hefe.

Wie an den SDS-Pages und Westernblots der Abbildungen 2.49, 2.50 und 2.51 zu entnehmen ist, konnte man mit dieser Art (s. Abschnitt 2.1.3.2) der Isolierung von Par-4 aus dem Hefe-Pellet im Gegensatz zum Westernblot (Abbildung 2.47) Par-4 Protein mit einem Molekulargewicht von 45 und 55 kDa isolieren. In der His-Blot (Abbildung 2.50) wird Par-4 (Gel ist überladen) sowohl bei 45 als auch bei 55 kDa detektiert. Da Par-4 im Strep-Blot nur bei einer Höhe von 45 kDa detektiert werden kann und der Sumo-Blot eine Bande bei 55 kDa zeigt, ist anzunehmen, dass Par-4 mit einer Größe von 55 kDa sumoyliert ist. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass diese Sumoylierung am C-terminalen Ende von Par-4 erfolgt, da dort Par-4 in diesem Bereich zwei Sumoylierungssites besitzt und der Strep-Antikörper kein Signal zeigte. Es ist vorstellbar, dass der Antikörper durch die Sumoylierung sterisch an der Interaktion mit dem Strep-Tag gehindert wurde. Dass Par-4 Protein sumoyliert wird, konnte bis jetzt in keinem anderen System gezeigt werden.

2.2 DAP-Like-Kinase

Die DLK ist eine Serin/Threonin Kinase und wird auf Grund ihrer Sequenzhomologie in der Kinasedomäne zu den DAP-Kinasen, auch DAP-like Kinase genannt, gezählt. Sie besitzt im Unterschied zu den DAP-Kinasen keine Todesdomäne als funktionales Motiv, sondern einen C-terminal gelegenen Leucin-Zipper. Die Koexpression von Par-4 und DLK in Cos-7, REF52.2, Saos, PC12 und 208F Zellen führte grundsätzlich zur Apoptoseinduktion (Page et al., 1999). Expression von Par-4 und DLK alleine führten nicht zur Apoptoseinduktion. Die Erkenntnis, dass die Kinasenegativ-Mutante (DLK ohne Kinasedomäne) (Boosen Diplomarbeit., 2001) auch nach Koexpression mit Par-4 keine Apoptose auslöste, macht deutlich, wie wichtig die Kinaseaktivität für die proapoptotische Funktion von DLK ist. Bei bisherigen *in vitro* Versuchen mit der DLK, wurde das Protein in geringen Mengen aus einem Baculoextrakt gewonnen. In dieser Arbeit sollte DLK heterolog exprimiert, gereinigt und hinsichtlich ihrer Funktionalität geprüft werden. In Zusammenarbeit mit der Gruppe Dr. Preuß in Bonn sollten die *in vitro* Versuche mit Par-4 und seinen funktionalen Teilbereichen ausgedehnt werden, um mehr über die Interaktion und den Mechanismus von Par-4 und der DLK zu erfahren, um sie dann mit den *in vivo* Ergebnissen zu vergleichen. Darüber hinaus sollte die DLK in für kristallographische Untersuchungen ausreichenden und sauberen Mengen hergestellt werden.

2.2.1 Klonierung des DLK Konstrukts

Das DLK Gen besteht aus 448 AS und hat ein apparantes Molekulargewicht von 52kDa. Als Template für die PCR-Reaktion diente ein Konstrukt der DLK für die endogene homologe Expression aus einer Zelllinie. In den ersten Schritten wurde versucht, DLK in einer Ein-Schritt-PCR mit zwei Außenprimern herzustellen. Da durch diese Methode kein geeignetes PCR-Produkt herzustellen war, wurde das Gen in zwei sich überlappenden Teilbereichen hergestellt (1050 Bp und 600 Bp), diese annealt und aufgefüllt. Das so entstandene PCR-Produkt wurde in den Klonierungsvektor pCR-Blunt kloniert, sequenziert und danach in den *E.coli* Expressionvektor pET-23a kloniert (s. Tabelle 2.51). Bewusst wurden sowohl Schnittstellen für die Expression in *E.coli* (NDE) als auch für die Expression in *S.cerevisiae* (BamH1) durch die PCR-Reaktion eingebaut, da zu diesem Zeitpunkt nicht klar sein konnte, in welchem heterologen System die DLK exprimiert werden konnte.

Konstrukt Bezeichnung	Produkt	Sites durch PCR	Plasmid
JK 150903D1	Strep-DLK	BamH1/NDE	pET-23a

Tabelle 2.51: DLK Konstrukte in *E.coli* Expressionsvektoren: Die Herstellung des Konstrukte erfolgte durch Standardmethoden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert (Top10) und sequenziert. Die Umklonierung in den *E.coli* Expressionsvektor erfolgte über die oben genannten Restriktionsstellen.

2.2.2 Heterolge Expression und Reinigung des DLK

Erste Expressionsstudien zeigten, dass der hergestellte Klon JK 150903D1 das Protein exprimiert. Der Nachweis erfolgte durch SDS-Page-Analyse von Zelllysaten einer 50ml Expressionskultur (s. Abbildung 2.52). Die Expressionsbedingungen entsprachen denen des Par-4 Proteins.

In Abbildung 2.52 ist die Überexpression von DLK-Protein in *E.coli* klar zu erkennen und das Protein zeigt im SDS-Page eine Größe von ~55 kDa.

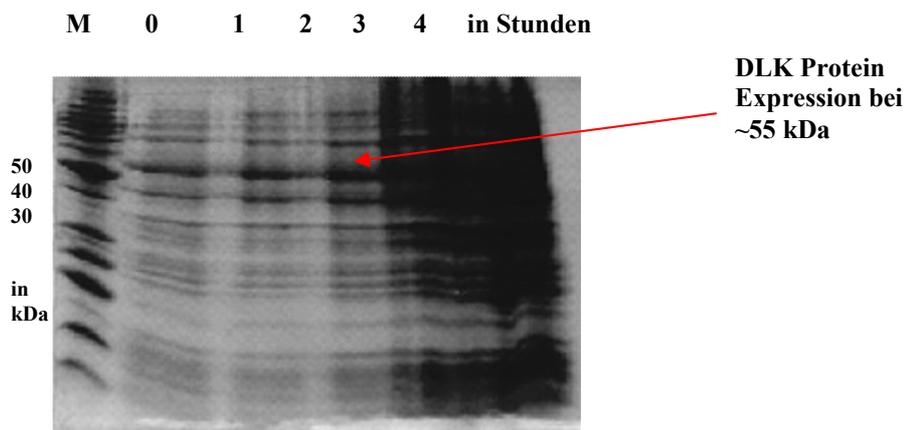


Abbildung 2.52: Darstellung der DLK Expression in einem SDS-Page: Expression in *E.coli* nach Zeit. Mehrere Kolonien frisch transformierter *E.coli* -Zellen wurden in 50ml dYT- Medium bis 0.6 angezogen und die Induktion mit 1mM IPTG gestartet. Die optische Dichte der Proben wurde gemessen und der Probe T= 0 Stunden angepasst, damit nur der Anstieg des überexprimierten Proteins deutlich wird.

1.Reinigungsschritt : Strep-Taktin Sepharose Affinitätschromatographie

In der Abbildung 2.53 wird die Strep-Taktin Sepharose Affinitätschromatographie in einem SDS-Page dargestellt. Daraus konnte abgeleitet werden, dass sich das DLK-Protein nicht in der löslichen Fraktion befindet. Das DLK-Protein war demnach entweder nicht in diesem verwendeten Puffer löslich oder wurde in der *E.coli* Expression als inclusion bodies

hergestellt. Dass es exprimiert war, zeigt die Pellet-Fraktion (s. Abbildung 2.53), in der es ungefaltet, aber nach Größe getrennt sichtbar ist.

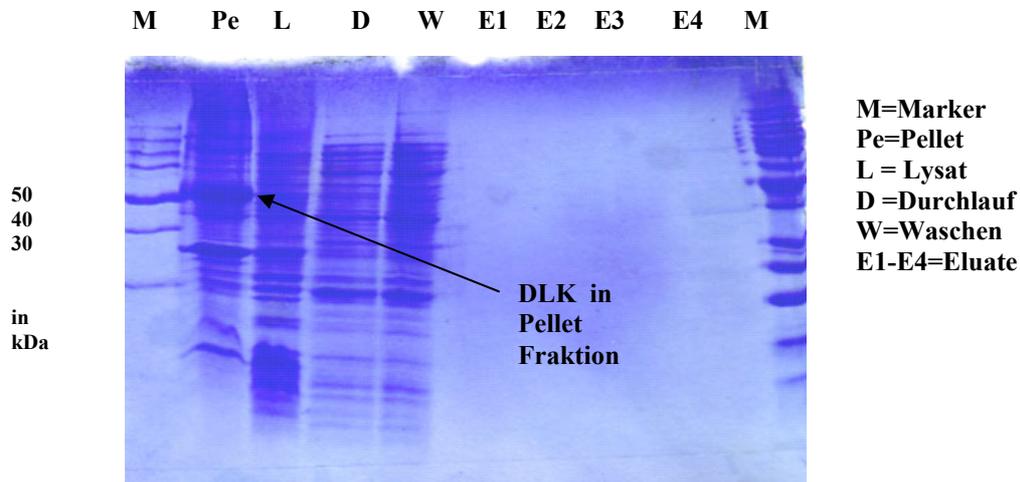


Abbildung 2.53: SDS-Page der Strep-Tactin Sepharose Reinigung von Strep-DLKaus *E.coli*. 2.28g Zellen *E.coli* wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (50mM KH_2PO_4 pH 7,5, 10mM DTT, inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquiliibrierte Säule mit 55 ml Lysat beladen. Es wurde mit 70ml Waschpuffer (100mM KH_2PO_4 , 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50ml Puffer (50mM KH_2PO_4)

Um die Löslichkeit zu verbessern, wurden vier verschiedene Puffersysteme mit jeweils zwei verschiedenen pH-Werten getestet (s. Tabelle 2.54). Jeweils acht kleine Pellets wurden mit je 2ml des entsprechenden Puffers versetzt und die Zellen durch eine Ultraschallnadel aufgebrochen, durch Zentrifugation getrennt und die Proben auf ein SDS-Page aufgetragen und in einem Western Blot auf den Strep-Tag detektiert (s. Abbildung 2.55).

Molarität Salz	Molarität Puffer	pH Wert	Löslichkeit
100mM NaCl	50 mM Tris	pH 7,50	--
100mM NaCl	50 mM Mes	pH 6,50	--
100mM MgCl_2	50 mM Tris	pH 6,50	--
100mM MgCl_2	50 mM Mes	pH 5,50	--
100mM K-Citrat	50 mM Tris	pH 6,50	--
100mM K-Citrat	50 mM Mes	pH 5,50	--
100mM Hepes	50 mM Tris	pH 6,50	--
100mM Hepes	50 mM Mes	pH 5,50	--

Tabelle 2.54: Übersicht über die Löslichkeit von DLK in verschiedenen Puffern

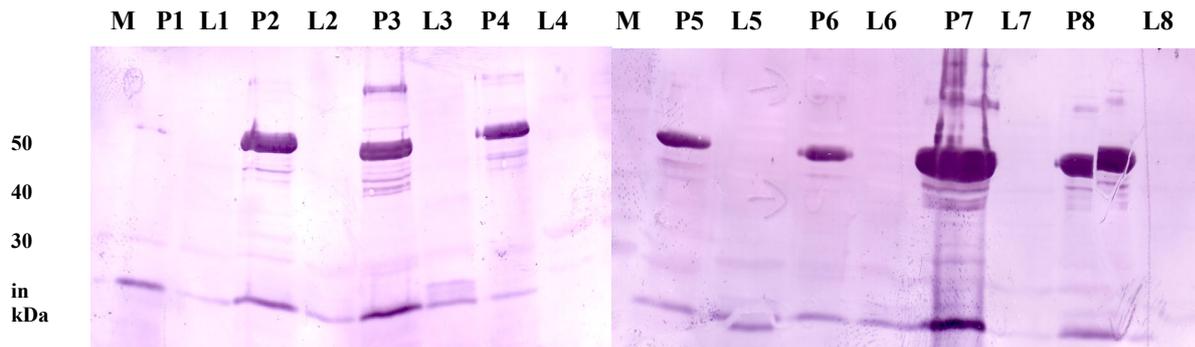


Abbildung 2.55: Western-Blot-Analyse der Pellet und Lysat Fraktion der 8 verschiedenen Puffer. Die Detektion des StrepTag von der DLK erfolgte mit dem SA-AP-Konjugat

In keinem der für diesen Versuch ausgewählten Puffern konnte das Protein DLK von der unlöslichen (P Pellet) in die lösliche (L Lysat) Fraktion überführt werden. Demnach wird DLK in der heterologen Expression in inclusion bodies exprimiert.

2.2.3 Optimierung der Expressionsbedingungen in *E.coli*

Um bei *E.coli* die Expression eines Proteins in inclusion bodies zu verhindern, kann mit verschiedenen Parametern, wie Temperatur, der Menge des Induktionsmittels (IPTG) und nicht zuletzt mit verschiedenen Expressionsstämmen von *E.coli* gearbeitet werden. Als erstes wurde mit verschiedenen Temperaturen (25, 30 und 37 Grad), in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen des Induktionsmittels (1mM, 0,5mM und 0,1mM) gearbeitet. Keine dieser Veränderungen brachte eine Löslichkeitsverbesserung. Als letzte Möglichkeit wurden verschiedene Expressionsstämmen von *E.coli* ausgetestet, wodurch das Löslichkeitsverhalten jedoch nicht verändert wurde.

2.2.4 Reinigung der DLK aus inclusion bodies

Die Reinigung aus inclusion bodies kann im Hinblick auf die Sauberkeit des Proteins viele Vorteile haben. Da sich das Protein als unlösliche Fraktion im Pellet befindet, ist schon die Trennung von unlöslichen und löslichen Bestandteilen nach der Ultrazentrifugation eine Art Vorreinigung. Allerdings mussten jetzt Additive gefunden werden, um das Protein möglichst sanft aus der unlöslichen in die lösliche Fraktion zu überführen. Eine nicht ganz sanfte, aber sehr wirkungsvolle Möglichkeit ist es, dass Protein in 8M Urea oder 8M Guanidin-Hydrochlorid zu denaturieren und mittels Dialyse das Protein in einem geeigneten Puffersystem zurückzufalten. Da aber immer die Gefahr der falschen Rückfaltung besteht, wurde auf diese Möglichkeit zunächst verzichtet.

Nach verschiedenen Tests mit verschiedenen Substanzen, zeigte das anionische N-Laurosyl-Sacrosyl Na-Salz die größte Effektivität. Mehrere Kolonien vom Konstrukt JK 150903D1 frisch transformierter *E.coli*-Zellen wurden in 10 Liter DYT_{amp}-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 angezogen und mit 1mM IPTG induziert. Die Induktion wurde erst nach 10 Stunden abgebrochen, da das Protein für Proteasen nicht angreifbar in inclusion bodies exprimiert wurde. Aus 10 Litern Kultur wurden 35 g Zellen geerntet. Ein Pellet von 5 Gramm wurde mit 50ml Zellaufschlusspuffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5) in der Frenchpress aufgebrochen, der Überstand verworfen und das Pellet mit 50ml Zellaufschlusspuffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5 inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Ultraschallnadel homogenisiert und mehrmals mit demselben Puffer gewaschen. Nach der Homogenisierung wurde der Lösung 3% N-Laurosyl-Sacrosyl Na-Salz zugegeben und über Nacht bei 4C solubilisiert.

Anschließend wurden mittels Ultrazentrifugation erneut die unlöslichen von den löslichen Bestandteilen getrennt und mit der löslichen Fraktion eine Strep-Taktin Reinigung durchgeführt (s. Abbildung 2.56).

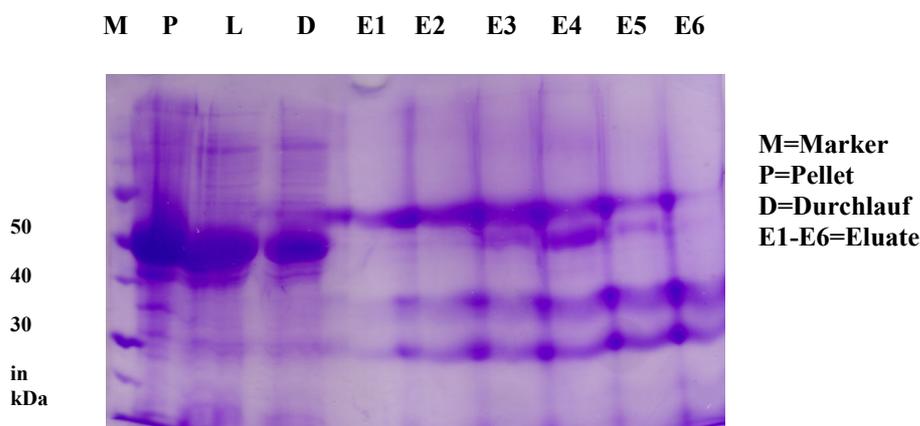


Abbildung 2.56: SDS-Page der StrepTaktin Reinigung von DLK aus inclusion bodies. Ein Pellet von 5 Gramm wurde mit 50ml Zellaufschlusspuffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5) in der Frenchpress aufgebrochen, der Überstand verworfen und das Pellet mit dem mit 50ml Zellaufschlusspuffer (100 mM Natrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5 inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Ultraschallnadel homogenisiert. Nach der homogenisierung wurde der Lösung 1% N-Laurosyl-Sacrosyl Na-Salt zugegeben und über Nacht bei 4C solubilisiert. Nach wiederholter Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 50 ml Lysat beladen. Es wurde mit 70ml Waschpuffer (100mMNatrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50ml Puffer (100mMNatrium-Chlorid, 50mM Tris pH 7.50 und Destiobiotin)

Durch Solubilisierung mit N-Laurosyl-Sacrosyl Na-Salz konnte das DLK-Protein von der unlöslichen in die lösliche Fraktion überführt werden. Das Protein ließ sich aber nur bis zu einer Konzentration von 1-1,5mg/ml konzentrieren und nicht einfrieren, da es beim Auftauen sofort präzipitierte.

2.2.5 Optimierung der Reinigung des DLK Proteins

Im nächsten Schritt wurde versucht, die Reinigung des Proteins zu optimieren, um ausreichend stabile Proteinmengen für Funktionalitätstest und die Kristallisation herzustellen. Nach mehreren Versuchen kristallisierte sich eine Kombination aus 1% N-Laurosyl-Sacrosyl Na-Salz und 1 M L-Arginin (Trockensubstanz) für die Solubilisierung heraus. Das Protein zeigte insbesondere in 100mM K-Citrat und 100mM NaCl mit jeweils 50mM Tris pH 7,5 eine hohe Löslichkeit. Der Ablauf der Reinigung blieb unverändert. In Abbildung 2.57 wurden die Proben der Reinigung auf ein SDS-Gel aufgetragen.

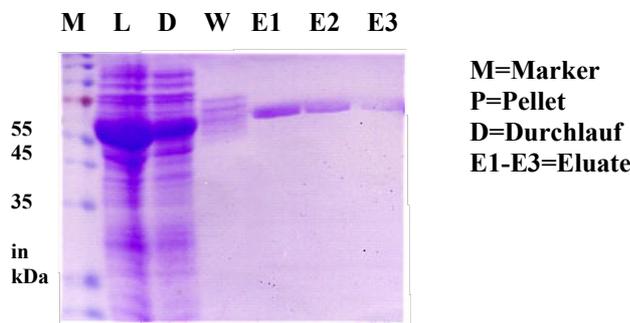


Abbildung 2.57: SDS-Page der StrepTaktin Reinigung von DLK aus inclusion bodies. Ein Pellet von 5 Gramm wurde mit 50ml Zellaufschlusspuffer (100 mM K-Citrat, 50mM Tris pH 7,5) in der Frenchpress aufgebrochen, der Überstand verworfen und das Pellet mit dem mit 50ml Zellaufschlusspuffer (100 mM K-Citrat, 50mM Tris pH 7,5 inkl. Proteaseinhibitoren) mit der Ultraschallnadel homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurde der Lösung 1% N-Laurosyl-Sacrosyl Na-Salt und 1m L-Arginin zugegeben und über Nacht bei solubilisiert. Nach wiederholter Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte Säule mit 50 ml Lysat beladen. Es wurde mit 70ml Waschpuffer (100mM K-Citrat, 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50ml Puffer (100mM K-Citrat, 50mM Tris pH 7,50 und Destiobiotin)

Die Solubilisierung scheint der Grund dafür zu sein, dass ein großer Teil des Proteins nicht an die Strep-Taktin Sepharose gebunden hat (s. Abbildung 2.57 Spur D). Jedoch konnte man 500µl à 19mg/ml reines Protein isolieren und es war somit in für die Kristallisation ausreichenden Mengen vorhanden.

2.2.6 Aktivitätstest der rekombinanten DLK

Um zu überprüfen inwieweit die in *E.coli* heterolog exprimierte DLK noch in der Lage ist sich selbst (DLK zeigt starke autokatalytische Aktivität) und Par-4 zu phosphorylieren, wurde ein *in vitro* Kinasetest mit radioaktiv markiertem [³²P]-γ ATP durchgeführt. In Abbildung 2.58 ist das Ergebnis der Autoradiographie abgebildet.

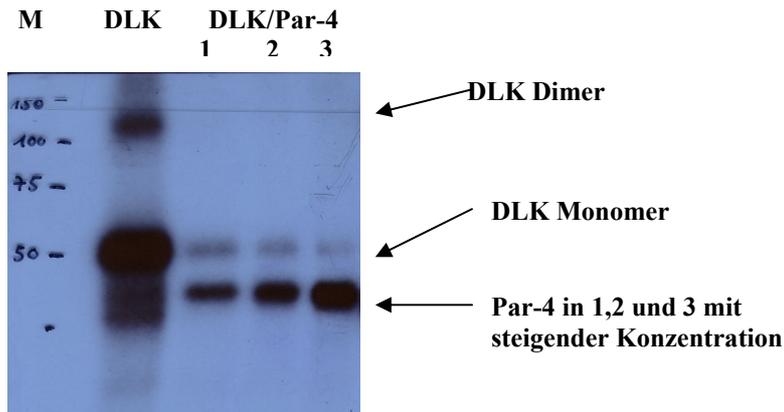


Abbildung 2.58: Autoradiographie des Kinasetest von heterolog exprimierter DLK und Par-4 als Substrat

In Abbildung 2.58 kann man sowohl die Autophosphorylierung der DLK selbst als auch die Phosphorylierung von Par-4 als Substrat erkennen. Auffällig ist eine zweite Bande bei ungefähr 110-120 kDa, was auf einen Homodimer der DLK hinweist. Dieser ist nur dann zu sehen, wenn dem Protein kein Substrat zur Verfügung steht. Zur korrekten Faltung von heterolog exprimierter DLK lässt sich nach diesen Ergebnissen folgendes sagen:

1. Kinasefunktion der DLK ist intakt
2. Par-4 wird phosphoryliert und als Substrat erkannt
3. Der für die Homodimerisierung verantwortliche, C-terminal gelegene Leucin-Zipper scheint korrekt gefaltet zu sein.

2.2.7 Kristallisation des DLK Proteins

Mit einer Konzentration von 22 mg/ml wurden die ersten Reihenversuche mit den Puffer Kits Wizard I und II, Hampton Screen I und II und Cryo-Screen I und II angesetzt und pro Ansatz einmal 0,3µl/0,3µl, 0,2/0,4 und 0,4/0,2 Protein/Puffer pipettiert. Nach zwei Monaten zeigten sich im Cryo-Screen unter den in der Abbildung 2.59 genannten Bedingungen die ersten Kristalle.

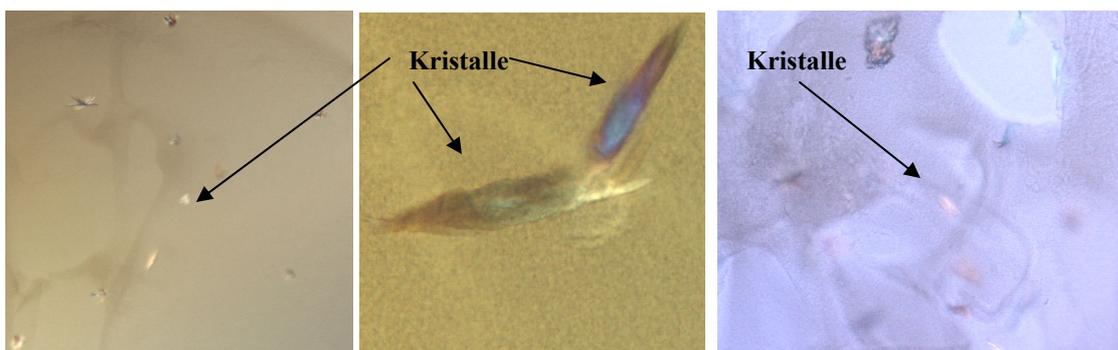


Abbildung 2.59: DLK Kristalle. Gezeigt sind Aufnahmen mit Polfilter von Sitting-Drop Ansätzen

2.3 Amida

Amida ist wie Untersuchungen gezeigt haben ein Interaktionspartner von Arc und wurde im Zeitraum meiner Dissertation mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems als neuer Interaktionspartner von Par-4 identifiziert (Boosen et al., 2005). Es konnte weiter gezeigt werden, dass eine homologe Koexpression von Par-4 und Amida, ähnlich wie bei der DLK, zu einer Translokation des nuklearen Proteins Amida in das Cytoplasma und zu einer Kolokalisation beider Proteine ans Aktin-Zytoskelett führte. Des Weiteren konnte nach Koexpression von Par-4 und Amida die Induktion der Apoptose beobachtet werden (Boosen et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Amida heterolog exprimiert, gereinigt und Kristallisationsexperimente durchgeführt.

Da die Kristallisation von Par-4 bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgreich war, bestand die Möglichkeit, einen Komplex aus Amida und Par-4 *in vitro* zu erhalten. Hierdurch könnte die Struktur stabilisiert werden um damit die Kristallisation von Par-4 zu erleichtern bzw. überhaupt erst zu ermöglichen.

Zusätzlich zu Amida sollte die in Bonn hergestellte Phosphorylierungsmutante Amida S200A heterolog exprimiert und gereinigt werden, um eine mögliche Phosphorylierungsstelle der DLK *in vitro* zu identifizieren.

2.3.1 Klonierung von Amida und seiner Phosphorylierungsmutante

Zunächst wurde das Amida Konstrukt JK020903 A1 mittels PCR hergestellt (s. Tabelle 2.60). Als Template diente die c-DNA, die von M.Boosen identifiziert wurde.

Konstrukt Bezeichnung	Produkt	Primer	Sites durch PCR	Plasmid
JK020903A1	His-Amida	BamrevH1/NDE1AmidaHisfor/AmidaHindStoprev	BamH1/NDE1	pET-23a
JK120704S1	His-AmidaS200A	umkloniert in pET-23a	BamH1/NDE1	pET-23a

Tabelle 2.60: Amida Konstrukte in *E.coli* Expressionsvektoren: Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch Standardmethoden. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in pCR-Blunt kloniert (Top10) und sequenziert. Die Umklonierung in den *E. Coli* Expressionsvektoren erfolgte über die oben genannten Restriktionsstellen.

2.3.2 Expression

Erste Studien zeigten, dass das Konstrukt JK020903 A1 in *E.coli* exprimiert wird. Der Nachweis erfolgte durch eine Westernblotanalyse von Zelllysaten einer 20ml Expressionskultur (s. Abbildung 2.61).

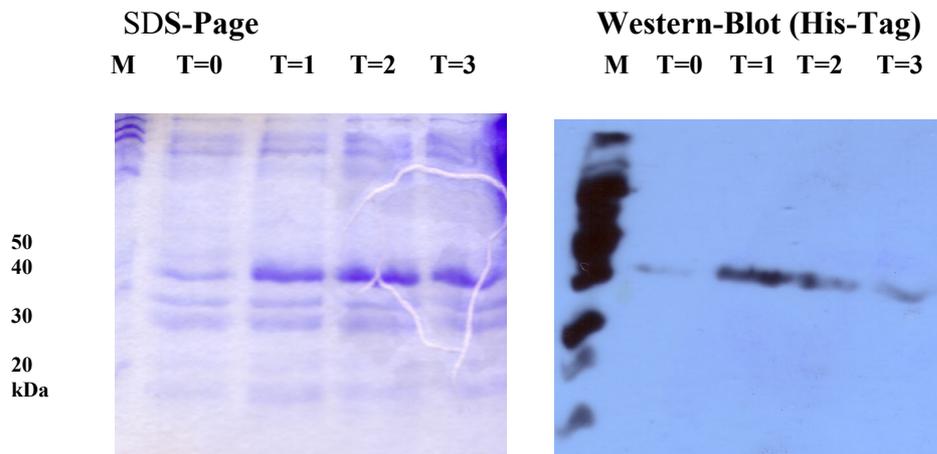


Abbildung 2.61: SDS-Page und His-Blot der Erstexpression von Amida Konstrukt JK020903 A1. Expression in *E.coli* nach Zeit. Mehrere Kolonien frisch transformierter *E.coli* –Zellen wurden in 20ml dYT-AMP Medium bis 0,6 angezogen und die Induktion mit 1mM IPTG gestartet. Die optische Dichte der Proben wurde gemessen und der Probe T= 0 Stunden angepasst, damit nur der Anstieg des überexprimierten Proteins deutlich wird. Parallel wurde eine Westernblotanalyse der Proben T=0 h bis T=3 h durchgeführt, um sicherzustellen, dass es sich um das Konstrukt His-Amida handelt.

Die Überexpression von Amida ähnelte stark der von Par-4. Stagnierte die Par-4 Expression (s. Abbildung 2.4) erst nach vier Stunden, so stellte sich dieser Effekt bei der Expression von Amida bereits nach drei Stunden Inkubationszeit ein (s. Abbildung 2.61). Dies ließ auch hier den Verdacht aufkommen, dass die heterologe Expression von Amida toxisch für *E.coli* ist. Da aber die Überexpression nach Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe für *E.coli* ausreichend war, wurde mit diesem System weitergearbeitet.

2.3.3 Reinigung

Diese Erstreinigung (s. Abbildung 2.61) zeigte, dass das Amida Protein in 100mM NaCl, 50mM Tris pH 7,5 löslich ist. Obwohl das Amida Protein ein errechnetes Molekulargewicht von 29 kDa hat, zeigt es im SDS-Page ein apparentes Molekulargewicht von 43 kDa. Wie in Spur D (Durchlauf) in Abbildung 2.62 zu sehen ist, bindet nur ein geringer Teil des exprimierten Proteins an das Säulenmaterial. Dies mag zum einen an der Zugabe von Imidazol im Aufschlusspuffer liegen. Dies ist aber unverzichtbar, da man durch Zugabe von Imidazol die Stringens der IMAC-Reinigung hinsichtlich der Sauberkeit des zu reinigenden

Proteins erhöhen kann. Zum anderen könnte es auch daran liegen, dass ein Teil des Proteins nicht richtig gefaltet und der His-Tag dadurch nicht zugänglich ist. Das Protein war insgesamt nicht sauber genug für den Einsatz in der Kristallisation. Die Möglichkeit, durch eine Gelfiltration (s. Abbildung 2.63) die niedermolekularen Banden der Eluate (s. Abbildung 2.62) vom Protein trennen zu können, scheiterten (s. Abbildung 2.64).

IMAC Reinigung von Amida

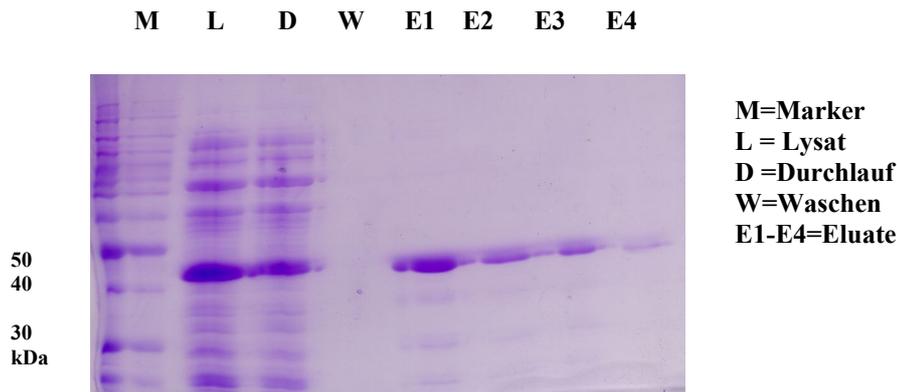


Abbildung 2.62: SDS-Page der Reinigung von Amida Konstrukt JK020903 A1. 4,5 g *E.coli* wurden mit 50ml Aufschlusspuffer (100mM NaCl 50mM Tris und 10mM Imidazol pH 7,5) mit der Frenchpress (2 Zyklen, 95% Aufschlussrate) aufgeschlossen. Nach Klärung der Überstände durch Zentrifugation wurde die voräquilibrierte IMAC Säule mit 55 ml Lysat beladen. Es wurde mit 70ml Waschlösung (200mM NaCl 50mM Tris pH 7,5) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 60ml Puffer (100mM NaCl, 50mM Tris und 500mM Imidazol pH 7,5)

2. Gelfiltration der Eluate der IMAC-Reinigung

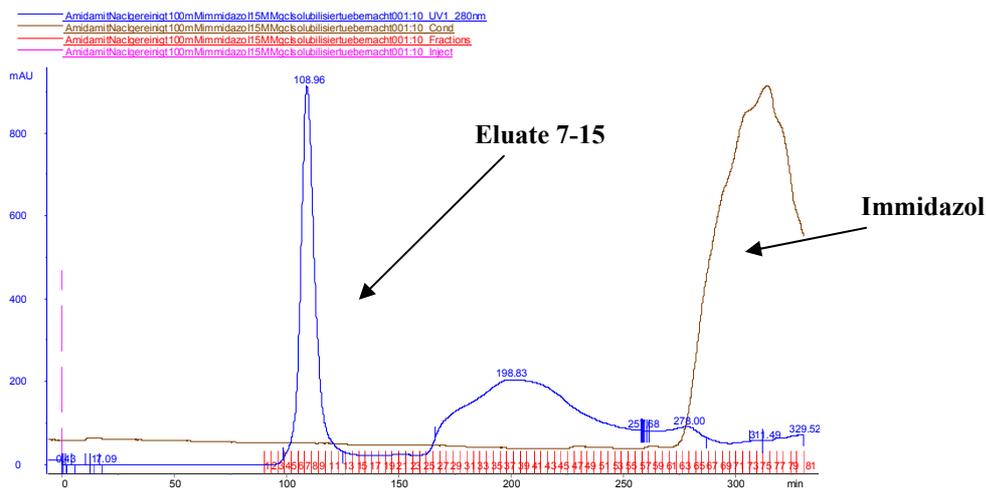


Abbildung 2.63: Gelfiltration der konzentrierten Eluate aus IMAC Reinigung von Amida mit einer Sephadex 75 Pregrade Warum keine Trennung der niedermolekularen Banden erfolgte, war zu diesem Zeitpunkt nicht festzustellen. Es fiel aber auf, dass das Amida Protein ähnlich wie der Nukleoproteinkomplex Par-4 im Ausschlussvolumen der Säule lief. Tests mit einer analytischen Sephadex 200 zeigten, dass das Amida Protein auch in dieser Säule im

Ausschlussvolumen lief, was aber bedeuten würde, dass die Proteinlösung eine Größe von 600 kDa hat (Abbildung nicht gezeigt). Daher musste die Reinigung hinsichtlich der Sauberkeit und des Laufverhaltens optimiert werden.

3. SDS-Page der Eluate

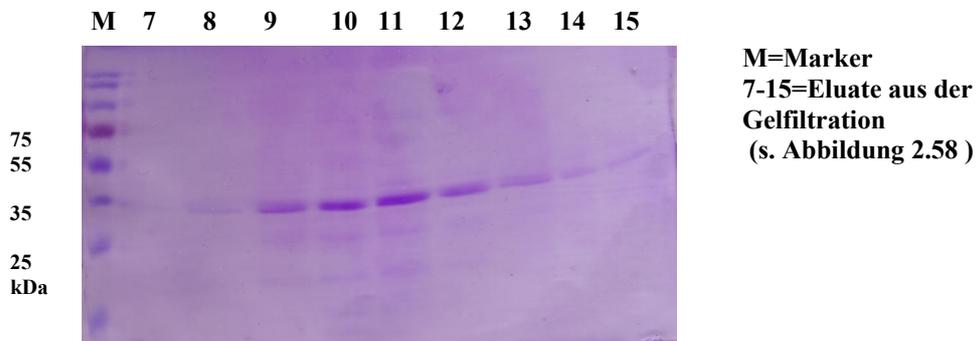


Abbildung 2.64: SDS-Page der Proben 7-15 aus der Gelfiltration der IMAC-Reinigung

2.3.4 Optimierung der Reinigung

Da Amida bei der homogenen Expression im Nukleus lokalisiert ist und durch DNA Bindung den Zellzyklus zu arrestieren vermag (Yehua Gan et al., 2003), lag auch hier die Vermutung nahe, dass es sich bei der Ursache des ungewöhnlichen Laufverhaltens um gebundene Nukleinsäuren aus *E.coli* handelt. Dies würde auch für die für *E.coli* kurze Induktionszeit von drei Stunden sprechen. Um den Grund für dieses Laufverhalten zu überprüfen, wurde die Reinigung von Amida wiederholt und in der Gelfiltration sowohl die Wellenlänge 280 als auch 260 detektiert. Kombiniert wurde die Reinigung mit einem höheren Imidazolgehalt, um die Stringens der IMAC-Reinigung zu erhöhen. Nach mehreren Tests erwies sich die Zugabe von 100mM Imidazol und 500mM NaCl oder K-Citrat im Aufschlusspuffer als am geeignetsten, um die Sauberkeit des Proteins zu erhöhen. Darüber hinaus wurden keine Veränderungen in den Reinigungsbedingungen durchgeführt (s. Abschnitt 2.7.3).

Die Eluate der Reinigung wurden bis auf 1 ml konzentriert und auf die Säule (Sephadex 75) aufgetragen (s. Abbildung 2.65).

Gelfiltration mit Sephadex 75 pregrade Säule:

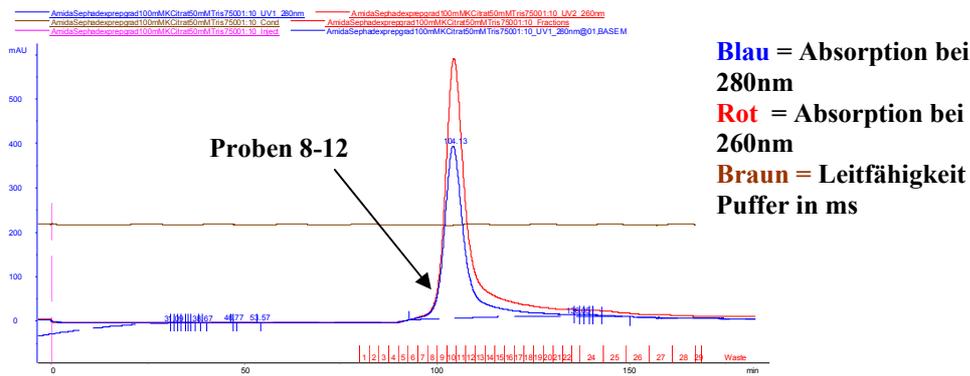


Abbildung 2.65: Gelfiltration Amida mit Sephadex 75 pregrade Säule

Anschließend wurden die Proben 8-12 sowohl auf SDS-Pages aufgetragen, um die Sauberkeit des Proteins festzustellen, als auch auf ein Aggarosegel, um zu sehen, ob an Amida Nukleinsäuren gebunden waren.

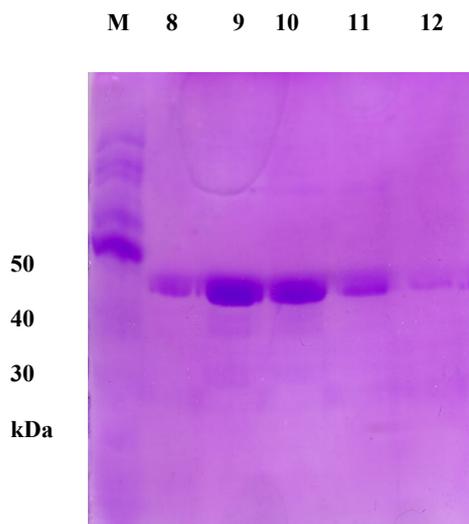


Abbildung 2.66: SDS-Page der Gelfiltration der Proben 8-12 aus Gelfiltration (s. Abbildung 2.65)

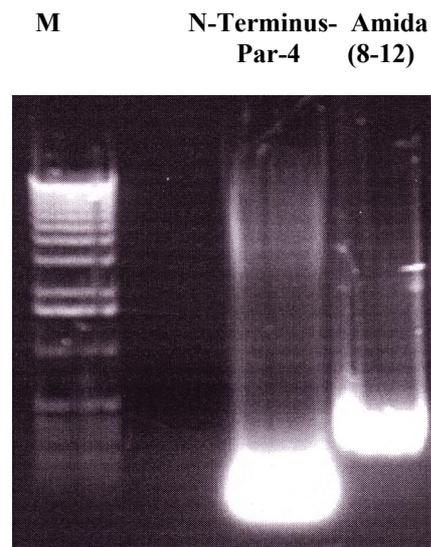


Abbildung 2.67: Aggarosegel der konzentrierten Proben 8-12 aus Gelfiltration (s. Abbildung 2.65)

Die Sauberkeit des Proteins hat sich im Gegensatz zur Reinigung in Abbildung 2.62 deutlich verbessert. Es konnten 400 µl à 8mg/ml eines Nukleoproteinkomplexes von Amida aus den Eluaten isoliert werden. Allerdings wurde auch deutlich, warum das Laufverhalten stark von der Größe von Amida abwich. Es handelt sich bei der eluierten Proteinlösung in Abbildung 2.66 wie bei Par-4 um einen Nukleoproteinkomplex (s. Abbildung 2.67).

Auch hier wurde versucht, das Protein von der Nukleinsäure abzulösen. Anders als bei Par-4 konnte für Amida die Trennung von Protein und Nukleinsäure nicht erreicht werden. Das

Protein scheint eine so starke Affinität zur Nukleinsäure zu besitzen, dass immer dann, wenn versucht wurde, die Nukleinsäure abzutrennen, das Protein präzipitierte.

In Tabelle 2.68 sind die Ansätze zur Nukleinsäureabtrennung zusammengefasst.

Zusatz	Reaktion
Micrococcus Nuclease	Präzipitiert
500mM MgCl ₂	Präzipitiert
1M MgCl ₂	Präzipitiert
pH-absenkung	Präzipitiert
L-Arginin	Präzipitiert
erhitzen	Präzipitiert

Tabelle 2.68: Tabelle über Zusatz und Reaktion bei der Nukleinsäureabtrennung

Da die in der Tabelle aufgelisteten Zusätze keine Trennung brachten, wurde Amida unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Dies lässt sich besonders bei der IMAC Reinigung gut bewerkstelligen, da man im Gegensatz zur Strep-Taktin Sepharose, der His-Tag für die Bindung an das Säulenmaterial nicht gefaltet sein muss. Die Reinigung erfolgte nach der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Methode mit dem Unterscheid, dass dem Aufschlusspuffer 8M Urea zugesetzt wurde. Das Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen, also ungefaltet, an die Säule gebunden, gewaschen, langsam zurückgefaltet und hat, wie in Abbildung 2.69 zu beobachten ist, gut funktioniert.

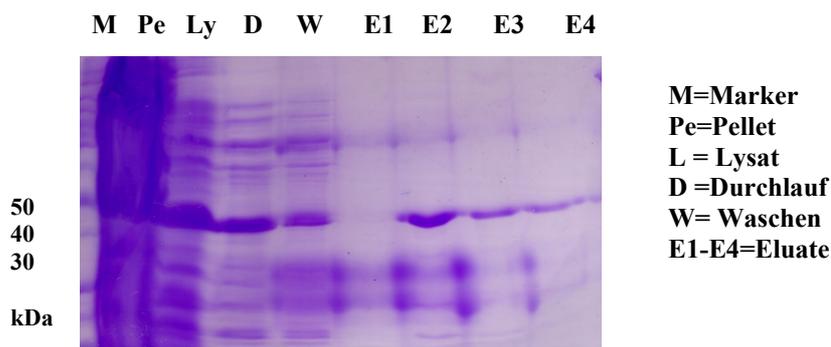


Abbildung 2.69: SDS-Page der Reinigung von Amida unter denaturierenden Bedingungen

Die anschließende Gelfiltration der konzentrierten Proben brachte ein überraschendes Ergebnis. Die Nukleinsäuren konnten durch die Denaturierung des Proteins nicht abgetrennt werden (s. Abbildung 2.70). Dies war umso mehr verwunderlich, da es sich bei der Bindung zwischen Nukleinsäure und Protein um schwache Bindungstypen handelte wie, z.B.

Ionenbindung oder Wasserstoffbrückenbindungen. Diese sollte sich in 8M Urea trennen, taten es aber nicht. Da es bis jetzt keine beschriebene kovalente Bindung zwischen Protein und Nukleinsäure gegeben hat, konnte das Resultat nicht erklärt werden.

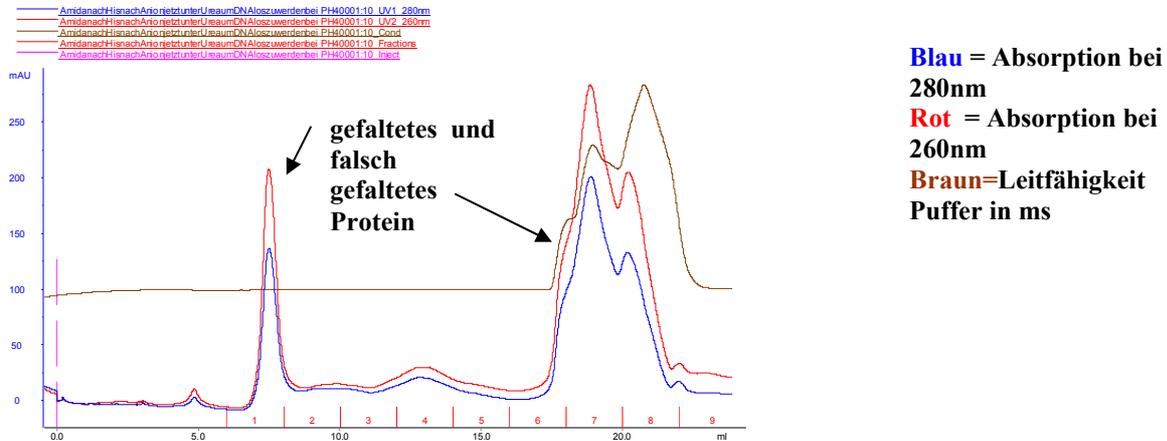


Abbildung 2.70: Gelfiltration Amida aus Reinigung in Abbildung 2.69

Als letzte Möglichkeit wurde versucht, Amida mit Hilfe der CDC2-Kinase zu phosphorylieren und so dessen Affinität zu Nukleinsäuren zu verringern (Yehua Ganet al., 2003). Eine Phosphorylierung der Serins 180 AS, im Amida Genom, sollte die Affinität von Amida zur DNA-Bindung verringern. Dieser Effekt konnte in den von mir durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurden in einem SDS-Page sowohl Par-4 als auch Amida aufgetragen (s. Abbildung 2.71), um den Größenvergleich der beiden Proteine zu visualisieren.

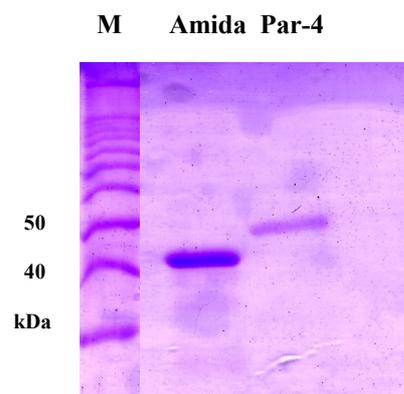


Abbildung 2.71: SDS-Page der heterolog exprimierten und gereinigten Proteine Amida und Par-4wt im Vergleich

2.3.5 Reinigung der Amida Phosphorylierungsmutante

Die Amida Mutante JK120704S1 S200A wurde bei exakt denselben Bedingungen gereinigt wie das Amida wt Protein (s. Abschnitt 2.3.4). Der Austausch des Serins gegen ein Alanin machte sich bei der heterologen Expression und bei der Reinigung nicht bemerkbar. Man konnte 350µl à 6mg/ml sauberes Protein aus 5,2g *E.coli* Zellen isolieren.

2.3.6 Kristallisation von Amida

Mit der Kristallisation von Amida wurde gestartet und die Evaluation der Kristallisationsansätze steht noch am Anfang. Mit der ersten Versuchsreihe des isolierten Proteins, bei einer Konzentration von 8mg/ml, wurden die ersten Reihenversuche mit den Puffer Kits Wizard I und II, Hampton Screen I und II und Cryo-Screen I und II durchgeführt. In den ersten Reihenversuchen wurden pro Ansatz zunächst 0,3µl Protein und 0,3µl Puffer pipetiert. Nach einem Monat wurde mit der ersten Auswertung begonnen. 85 % aller Ansätze sind als Präzipitat ausgefallen, 10% sind klar geblieben und in 5% hat sich Amida als flüssige Phase abgesetzt.

Da es sich bei Amida um ein DNA-bindendes Protein handelt und die eingesetzten Proteinlösungen demnach Nukleoproteinkomplexe waren, überraschten diese Ergebnisse nicht.

2.4 Charakterisierung des Nukleoproteinkomplexes von Par-4

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden in dieser Arbeit Experimente hinsichtlich der Etablierung und Optimierung der Reinigungen von heterologen Proteinen beschrieben. Es wurde festgestellt (s. Abschnitt 2.1.2.8), dass bei der Reinigung von Par-4 unter physiologischen pH-Bedingungen pH 7,5, nicht das reine Protein Par-4 isoliert wird, sondern ein Nukleoproteinkomplex. Damit wurde gezeigt, dass Par-4 eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren besitzt. Des Weiteren wurde detailliert die Abtrennung der Nukleinsäure unter physiologischen pH-Bedingungen beschrieben (s. Abschnitt 2.1.2.8) und so nukleinsäurefreies Par-4 (Nukleinsäure nicht mehr detektierbar) isoliert.

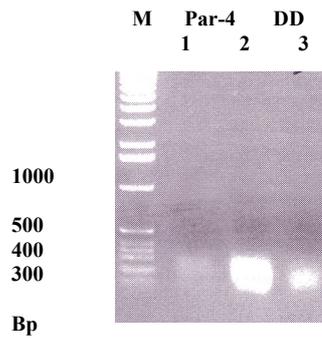
In diesem Kapitel geht es zum einen darum, die an den Nukleoproteinkomplex, der heterolog exprimiert und unter physiologischen pH-Bedingungen isoliert wurde, gebundenen Nukleinsäuren hinsichtlich der Art (DNA oder RNA), der Länge und der Spezifität zu charakterisieren.

Im zweiten Teil soll dem nukleinsäurefreien Gesamtprotein Par-4 (Nukleinsäure nicht mehr detektierbar) vorher behandelte wirtsspezifische (bezogen auf Par-4 aus *Rattus Norvegicus*) Ratten DNA zur Interaktion angeboten werden, um sie bei positiver, spezifischer Interaktion vom Par-4 Protein wieder abzutrennen und zu charakterisieren.

2.4.1 Isolierung der von DD und Par-4 gebundenen *E.coli* Nukleinsäuren

In diesem Versuch wurde die von der Par-4 gebundene Nukleinsäure durch eine Chloroformphenol-Fällung vom Protein abgetrennt. Dazu wurden Nukleoproteinlösungen genutzt, wie sie in Abschnitt 2.1.2.8 für Par-4 (s. Abbildung 2.27 Gelfiltration 1) und Abschnitt 2.1.2.5 für die Death Domain (s. Abbildung 2.14 Peak 1) hergestellt wurden. Dabei wurde in diesem Experiment vorausgesetzt, dass es sich um eine doppelsträngige Nukleinsäure handelt, da man diese sonst nicht direkt klonieren könnte. Mit Hilfe des Enzyms Mung-Bean-Nuclease wurden die möglichen überstehenden einsträngigen Nukleinsäurestränge für die Klonierung in den pCR-Blunt abgeschnitten, da dieser für die Ligation glatte Enden benötigt. Nach Fällung und Reinigung wurde die DNA zur Kontrolle auf ein Aggarosegel aufgetragen (s. Abbildung 2.72).

Es wurden insgesamt eine DD und zwei Par-4 Nukleoproteinlösungen auf die oben beschriebene Weise präpariert.



Abbildungen 2.72: Aggarosegel der durch Chloroformphenolfällung getrennten, gereinigten und mit MungBean-Nuclease geschnittenen Nukleinsäure.

Die in Abbildung 2.72 isolierten Nukleinsäuren wurden ab diesem Zeitpunkt wie PCR-Produkte behandelt. Jeweils vier Plasmide von jedem Ansatz wurden sequenziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2.73 zusammengefasst.

	Proteine an die die Nukleinsäure gebunden waren	Identifizierte Nukleinsäure hatte homologien (95-100 %) zu folgenden DNA-Stücken
1	Par-4	kein Ergebniss
1	Par-4	<i>E. coli</i> lsp-dapB interval
1	Par-4	<i>E.coli</i> adenylosuccinate lyase (purB) gene, complete cds; phoP gene
1	Par-4	Escherichia coli genomic DNA
2	Par-4	<i>E.coli</i> dacB gene for penicillin-binding protein 4 (PBP4)
2	Par-4	keinErgebniss
2	Par-4	<i>E.coli</i> dacB gene for DD-carboxypeptidase Length = 1884
2	Par-4	Escherichia coli CFT073 section 5 of 18 of the complete genome
3	Death Domain	Im <i>E.coli</i> Genom 175038-174673
3	Death Domain	Escherichia coli lactat aldehyddehydrogenase
3	Death Domain	Escherichia coli IspH (ispH) gene, complete cds
3	Death Domain	Vektor war leer

Tabelle 2.73: Ergebnis der Sequenzierung der isolierten Nukleinsäure aus Abbildung 2.67

Aus den Nukleoproteinkomplexen von Par-4 und der Death Domain konnten DNA-Stücke mit einer Größe von 70 bis 200 Bp isoliert werden. Diese DNA-Stücke hatten zwangsläufig (da heterologe Expression von Par-4 und DD in *E.coli*) alle eine Homologie zu Genen von *E.coli* oder zu Genregionen, die keinem spezifischen Gen zugeordnet werden konnte.

Durch intensive Vergleiche der Nukleotidabfolgen der einzelnen, isolierten DNA-Stücke, konnte aber keine Gemeinsamkeit oder im besten Falle eine Konsensus-Sequenz ausgemacht werden. Festgestellt wurde, dass die von den Proteinen gebundenen DNA-Stücke alle sehr guaninreich waren. Inwieweit das mit der Bindung an Par-4 und DD zusammen hängt, ließ sich zu diesem Zeitpunkt nicht sagen.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass Par-4 eine hohe Affinität zur DNA hat, denn es wurden keine RNA Nukleinsäuren gefunden.

2.4.2 Isolierung von an Par-4 gebundener Ratten DNA

Da das hier untersuchte Par-4 Protein aus *Rattus Norvegicus* stammt, wurde in diesem Experiment nukleinfreies Par-4 (s.Abschnitt 2.1.2.8 Abbildung 2.27 Gelfiltration 1) mit genomischer Ratten DNA aus pC-12 Zellen inkubiert.

Die chromosomale Ratten DNA musste durch eine Chloroformphenol-Fällung von den Proteinbestandteilen getrennt werden, da die DNA von Eukaryoten kein „nacktes“ Molekül ist, sondern mit einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen assoziiert ist. Diese Proteine machen etwa die zweifache Masse der DNA aus. Sie bestehen aus den Histonen, die zur Verpackung der DNA dienen, und einer weiteren Kollektion von Nicht-Histon-Chromatinproteinen, zu denen die HMG-Proteine (high mobility group), Topoisomerasen, RNA-Polymerasen und weitere Faktoren des Transkriptionsapparates gehören.

Nachdem die DNA von den Proteinbestandteilen getrennt war, wurde diese mit Multicuttern wie *Sau1* und *MSE1* geschnitten, um möglichst kleine DNA-Fragmente zu erzeugen (s. Abbildung 2.74).

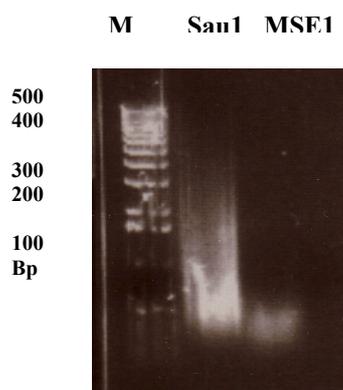


Abbildung 2.74: Agarosegel der durch Chloroformphenolfällung getrennten, gereinigten und geschnittenen Ratten DNA.

Mit 50µl der in Abbildung 2.74 gezeigten Ratten-DNA wurden 500 µl à 3mg nukleinsäurefreies Par-4 bei Raumtemperatur für fünf Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gelfiltration zur Trennung der gebundenen und nicht gebundenen Protein- und DNA-Fractionen (s. Abbildung 2.75).

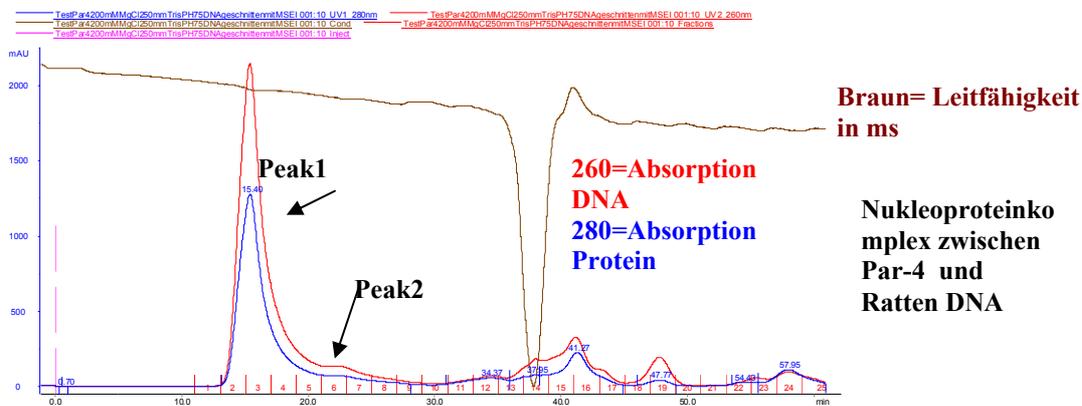


Abbildung 2.75: Gelfiltrationen der nukleinfreien Par-4 und Ratten-DNA Fraktion nach 5 stündiger Inkubation in 200mM MgCl₂ und 50mM Tris pH 7,5.

Die Proben aus Peak 1 und Peak 2 wurden aufkonzentriert und in einem SDS-Gel (s. Abbildung 2,76) miteinander und mit der Ausgangsprobe verglichen, um zu überprüfen, ob es sich um Par-4 handelt.

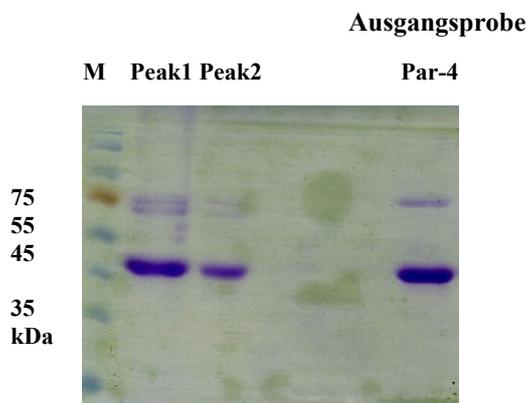


Abbildung 2.76: SDS-Page aus der Gelfiltration 2.75 gewonnen Proben.

Wie in Abbildung 2.75 deutlich zu erkennen ist, hat eine Interaktion zwischen nukleinsäurefreiem Par-4 und der Ratten DNA stattgefunden. Im Gegensatz zur Abbildung 2.27 Gelfiltration 1 läuft Par-4 in der Abbildung 2.75 nach der Interaktion wieder im Ausschlussvolumen der Säule.

Die Nukleoproteinfraktionen Peak 1 und Peak 2 wurden wie in Abschnitt 2.4.1 behandelt, um die an das Protein Par-4 gebundene DNA zu isolieren und sie zu sequenzieren.

In Tabelle 2.77 sind die Ergebnisse der Sequenzierungen zusammengefasst.

	DNA	Identifizierte Nukleinsäure
	isoliert aus	hatte homologien zu
1	Peak 1	GGGTTA (6 Wiederholungen)
2	Peak 1	Vektor war leer
3	Peak 1	Keine Homologie detektierbar
4	Peak 1	GGGTTA (15 Wiederholungen)
5	Peak 1	Vektor war leer
6	Peak 1	core DNA; satellite I DNA; satellite repeat. Rattus norvegicus (Norway rat)
7	Peak 1	Rat DNA highly repetitive component Sequence DNA fragments; consensus sequence of the rat satellite
8	Peak 1	Vektor war leer
9	Peak 1	Rattus norvegicus 7 BAC CH230-8O15 (Children's Hospital Oakland)
10	Peak 1	Vektor war leer
11	Peak 1	GGGTTA (14 Wiederholungen)
12	Peak 1	GGGTTA (9 Wiederholungen)
13	Peak 1	GGGTTA (20 Wiederholungen)
14	Peak 1	Rattus norvegicus 2 BAC CH230-9H16 (Children's Hospital Oakland)
15	Peak 1	Rattus norvegicus probasin (Pbsn) gene, promoter region and complete cds
16	Peak 1	GGGTTA
17	Peak 1	Vektor war leer
18	Peak 1	Rattus norvegicus 9 BAC CH230-42D23 (Children's Hospital Oakland)
19	Peak 1	GGGTTA (16 Wiederholungen)
20	Peak 1	Vektor war leer
1	Peak2	Rattus norvegicus growth arrest-specific 2 like 2
2	Peak2	<i>E.coli</i> DNA
3	Peak2	Rattus norvegicus similar to Actin, cytoplasmic 2
4	Peak2	Keine Homologie erkennbar
5	Peak2	<i>E.coli</i> DNA
6	Peak2	<i>E.coli</i> DNA
7	Peak2	Rattus norvegicus glutamate receptor subunit GluR4 (Gria4) gene, promoter region and partial cds
8	Peak2	Vektor war leer
9	Peak2	Homo sapiens tumor endothelial marker 4 (TEM4) mRNA, complete
10	Peak2	Rat DNA highly repetitive component Sequence derived from uncloned DNA fragments; consensus sequence of the rat satellite
11	Peak2	GGGTTA (12 Wiederholungen)
12	Peak2	Keine Homologie erkennbar
13	Peak2	<i>E.coli</i> DNA
14	Peak2	GGGTTA (14 Wiederholungen)
15	Peak2	Vektor war leer
16	Peak2	Vektor war leer
17	Peak2	GGGTTA (12 Wiederholungen)
18	Peak2	Vektor war leer
19	Peak2	Rattus norvegicus 7 BAC CH230-8O15 (Children's Hospital Oakland)
20	Peak2	<i>E.coli</i> DNA

Tabelle 2.77: Ergebnis der Sequenzierung der isolierten Nukleinsäure aus Peak 1 und 2 aus Abbildung 2.76

In der Tabelle 2.77 sind die in einem Sequenzabgleich gegen alle Organismen gefundenen Homologien zu den sequenzierten DNA-Stücken, die von Par-4 gebunden und abgelöst worden sind, aufgelistet. Neben einigen *E.coli* Verunreinigungen (3 von 40), leeren Vektoren (10/40), nicht weiter identifizierbaren Stellen im Ratten Genom auf verschiedene Chromosomen (4 von 40) konnten Homologien zu verschiedenen Genen, wie dem Tumor endothelial Marker, der Promotorregion einer Untergruppe des Glutamatrezeptors, dem Gen für Aktin, einem Gen für Wachstumshemmung, der Promotorregion des Probasin Gens sowie Konsensussequenzen von Satelliten DNAs hergestellt werden. Das Überraschendste aber war, dass neunmal dieselbe Sequenz isoliert werden konnte.

.....GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTA.....

Sie besteht aus einer Abfolge von einem Nukleotid Sextett, GGGTTA, die sich in der aus dem Nukleoproteinkomplex isolierten DNA unterschiedlich oft wiederholt. Diese Sequenz hat eine 100% Homologie zur Telomer Sequenz in Vertebraten. Sie schützen die Chromosome gegen Abbau und verhindern die Bindung der Chromosomenenden an das DNS-Reparatursystem. Zellen, deren Chromosome keine Telomere mehr besitzen, können sich nicht mehr teilen und werden durch Apoptose entsorgt. Ursprünglich hat jedes Chromosom einer Zelle ein Telomer von über ~1000 Wiederholungen der Basensequenz GGGTTA, die normalerweise nicht mehr verlängert werden. Da sich die Replikation nur auf die Chromosomen beschränkt, verkürzen sich die Telomere mit jeder Zellteilung. Dies ist auch der Grund, warum Zellen nach 40 bis 60 Zellteilungen absterben. Im Gegensatz dazu ist eine Krebszelle in der Lage, diese Telomere wieder zu verlängern, was eine endlose Zellteilung zur Folge hat.

Nach genauerer Analyse der isolierten DNA aus den Nukleoproteinkomplexen wurde deutlich, dass nicht nur neunmal die Sequenz GGGTTA isoliert wurde, sondern dass in fast allen anderen isolierten Sequenzen entweder GGGT, GGTA oder mindestens drei GGG ein Bestandteil dieser ist. Dies beschränkt sich nicht nur auf den Versuch mit der Ratten DNA, sondern konnte auch bei der isolierten DNA aus *E.coli* beobachtet werden. In einem Plasmid konnte sogar exakt dieselbe Sequenz GGGTTA aus *E.coli* isoliert werden.

Über die Funktion der Bindung von Par-4 an die Telomere lässt sich zur Zeit nur spekulieren und ist Bestandteil laufender Versuche.

2.5 *In vitro* Identifikation der Phosphorylierungsstellen von Par-4 und Amida

Phosphorylierungen spielen bei der Aktivierung und Deaktivierung von Proteinen eine zentrale Rolle. Um so wichtiger ist es, die Phosphorylierungsstellen der Proteine zu bestimmen, um dann die Auswirkungen auf die Funktion des Proteins sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachten zu können. In dieser Arbeit wurden Phosphorylierungsmutanten von Amida JK120704S1 (S200A) (s. Abschnitt 2.7.5) und auch von Par-4 JK191003O1 (S154A), JK191003P1 (T155A) und JK191003Q1 (S154A/T155A) (s. Abschnitt 2.1.2.13) heterolog hergestellt. Die Phosphorylierung wurde mit der heterolog exprimierten DLK durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.5).

2.5.1 *In vitro* Phosphorylierung von Amida und Amida S200A

Mit den rekombinant hergestellten Proteinen Amida wt und Amida S200A wurde ein *in vitro* Kinasetest durchgeführt (in Gruppe Preuß).

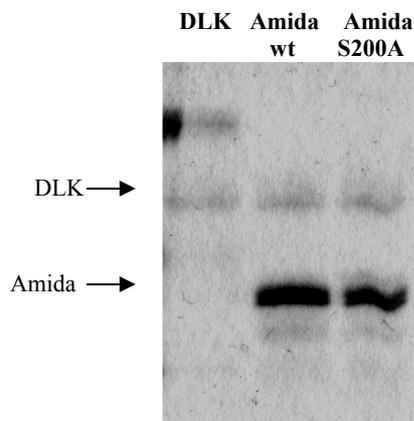


Abbildung 2.78 : SDS-Gel der Phosphorylierung von Amida und Amida S200A

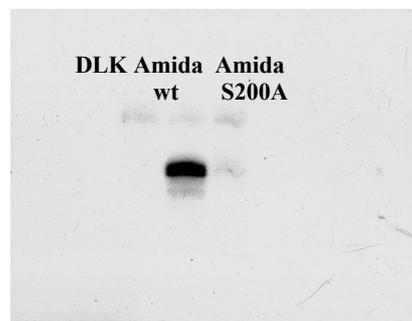


Abbildung 2.79: Autoradiographie der Phosphorylierungsreaktion von Amida und Amida S200A

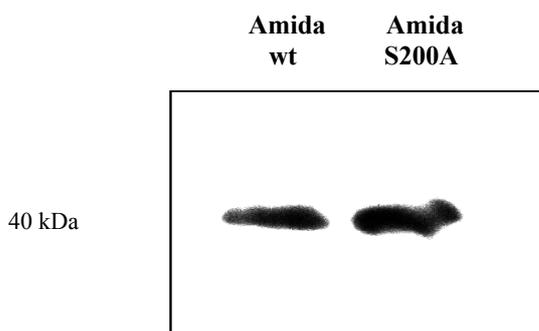


Abbildung 2.80: Westernblot von Amida und Amida S200A

Wie in Abbildung 2.79 zu sehen ist, wird die Amida S200A Mutante *in vitro* nicht mehr von der DLK phosphoryliert. Die Abbildung 2.78 (SDS-Page) und 2.80 (Westernblot) dienen als Kontrolle und zeigen das es sich das Protein Amida handelt. Somit ist die Phosphorylierungsstelle der DLK im Amida Gen identifiziert. Welche Auswirkungen das auf die Funktion *in vivo* haben wird, wird zur Zeit untersucht. Es wäre denkbar, dass die proapoptotische Wirkung bei Koexpression von Amida und DLK beeinträchtigt wird, da das proapoptotische Potential der DLK eng mit der Kinaseaktivität zusammenhängt.

2.5.2 *In vitro* Phosphorylierung von Par-4 Proteinen

Mit den rekombinant hergestellten Proteinen Par-4 und den Mutanten Par-4 S154A, T155A und S154A/T155A wurde ein *in vitro* Kinasetest durchgeführt (in Gruppe Preuß). Dass Par-4 von der DLK phosphoryliert wird, wurde schon in Abschnitt 2.2.6, Abbildung 2.58 gezeigt. Hier soll nun untersucht werden, ob die drei rekombinant hergestellten Par-4 Mutanten von der DLK phosphoryliert werden.

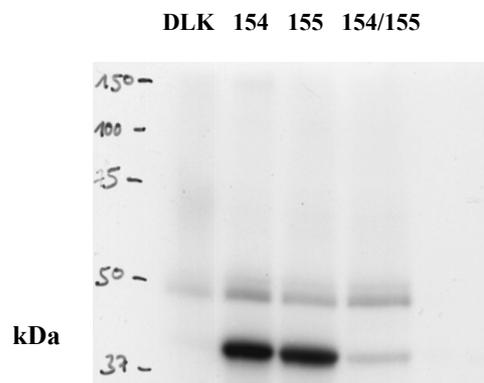


Abbildung 2.81: Autoradiographie der Phosphorylierungsreaktion von den Par-4 Mutanten S154A, T155A und S154A/T155A

Die Abbildung 2.81 zeigt, dass die Par-4 Mutanten S154A und T155A immer noch von der DLK phosphoryliert werden. Da es sich bei der DLK um eine Serin/Threonin Kinase handelt, scheint eine intakte Phosphorylierungsstelle ausreichend für eine Phosphorylierung zu sein. Die Doppelmutante zeigt dagegen nur noch eine sehr schwache Phosphorylierung. Da es noch anderer Serine und Threonine im Genabschnitt von Par-4 gibt, könnte eine Phosphorylierung an eine dieser Stellen der Grund dafür sein. Ebenso wie bei Amida sind die Auswirkungen dieser möglichen Phosphorylierungsstellen von Par-4 Gegenstand von Untersuchungen *in vivo und in vitro*.

2.6 *In vitro* Proteininteraktion zwischen Par-4, Amida und DLK

Amida wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybridsystems als neuer Interaktionspartner von Par-4 identifiziert und bei einer Koexpression von Par-4, Amida und DLK konnte die Induktion der Apoptose beobachtet werden. Eine eindeutige *in vitro* Interaktion von Amida und Par-4 konnte aber weder in einem Hefe-Zwei-Hybridinteraktionstest, noch durch eine Koimmunpräzipitation (Amida konnte nach Präzipitation nicht mehr nachgewiesen werden.) gezeigt werden. In diesem Experiment sollten die Proteine Amida, Par-4 und DLK auf eine mögliche Interaktion untereinander *in vitro* getestet werden.

2.6.1 Interaktion der Proteine

Für die Interaktionsversuche der drei Proteine Par-4, Amida und DLK wurden die Konstrukte so gewählt, dass bei der Reinigung nur eines den zur Reinigung benötigten Tag besitzt. Konnte man bei der Elution von dem jeweils zu reinigenden Protein noch ein anderes nachweisen, war dies nur über eine Interaktion mit diesem zu erklären.

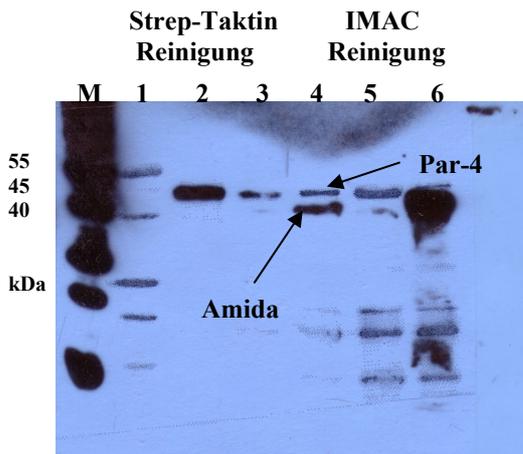
Die Experimente wurden mit verschiedenen Puffern und verschiedenen pH-Werten getestet. Die jeweilige Kombination der verschiedenen Konstrukte ist der Tabelle 2.82 zu entnehmen.

Kombination der Proteine	Art der Reinigung	Puffer
1. Strep-DLK + His-Amida	Strep-Taktin-Sepharose	100mM NaCl/Tris pH 7,0
2. His-Amida + His-Par-4-Strep	Strep-Taktin-Sepharose	100mM K-Citrat/Mes pH 6,5
3. His-Amida + His-Par-4-Strep	Strep-Taktin-Sepharose	100mM K-Citrat/Tris pH 7,0
4. Strep-DLK + His-Amida + Strep-Par-4	IMAC	100mM K-Citrat/Tris pH 7,0
5. Strep-DLK + His-Amida + Strep-Par-4	IMAC	100mM K-Citrat/Mes pH 6,5
6. Strep-DLK + His-Par-4-Strep	IMAC	100mM K-Citrat/Tris pH 7,0

Tabelle 2.82: Kombination der Proteine für *in vitro* Interaktion mit verschiedenen Puffer und pH-Werten

Die Lysate der jeweils verwendeten Proteine wurden einzeln hergestellt und zusammen mit Proteaseinhibitoren in einem Ansatz über Nacht bei 4 Grad inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Ansätze 1 bis 6 jeweils über die in der Tabelle 2.82 aufgeführten Säulen gereinigt, konzentriert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und einer Westernblotanalyse unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.83 abgebildet.

Bild 1: Bild 2 und Bild 3 übereinander gelegt



- 1= Strep-DLK +His-Amida
- 2= His-Amida+ His-Par-4-Strep
- 3= His-Amida+Strep-Par-4
- 4= Strep-DLK+His-Amida+Strep-Par-4
- 5= Strep-DLK+His-Amida+Strep-Par-4
- 6= Strep-DLK+His-Par-4-Strep

Jeweils das zu reinigende Protein ist Fett markiert.

Bild 3: His-Blot

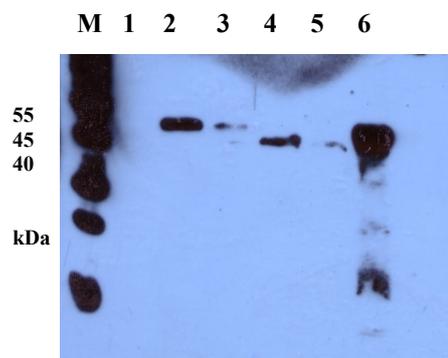
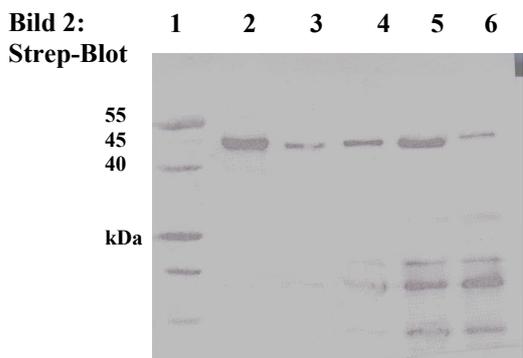


Abbildung: 2.83: Westernblots der Interaktion von Amida, Par-4 und DLK. Bild 1 (Bild 2 und Bild 3 übereinander gelegt), Bild 2 (Strep-Blot) und Bild 3 (His-Blot)

Weder in den Spuren 1 und 2 noch in Spur 3 war eine Interaktion mit dem jeweiligen Interaktionspartner zu beobachten. Dort konnte man im Westernblot (s. Abbildung 2.83 Bild 3) nur das zu reinigende Protein detektieren.

Strep-Tactin Reinigungen:

In Spur 1 das DLK Protein (Strep-Detektion mit Abbaubanden/ kein Signal im His-Blot)

In Spur 2 His-Par-4-Strep (Signal sowohl im His-Blot als auch im Strep-Blot)

In Spur 3 His-Par-4-Strep (Signal sowohl im His-Blot als auch im Strep-Blot)

Für die Strep-Tactin Reinigungen konnte keine Interaktion von DLK und Par-4 mit Amida gezeigt werden.

IMAC-Reinigungen :

In Spur 4 konnte sowohl Strep-Par-4 als auch His-Amida, aber kein Strep-DLK detektiert werden.

In Spur 5 konnte Strep-Par-4 und wenig His-Amida, aber kein Strep-DLK Protein detektiert werden.

In Spur 6 konnte His-Par-4-Strep detektiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter diesen Bedingungen weder Par-4 noch Amida einen stabilen Komplex mit der DLK bilden (Experiment 1 und 6). Es wird auch kein Komplex gebildet, wenn Amida und Par-4 alleine miteinander interagieren sollen (Experiment 2 und 3). Man konnte aber eine Interaktion zwischen Amida und Par-4 beobachten, wenn die DLK Bestandteil des Versuches war. (Experiment 4 und 5). Dieses Ergebnis ließ nur den einen Schluss zu, dass das DLK Protein eines oder beide Proteine phosphoryliert und sich deshalb ein stabiler und nachweisbarer Komplex aus Amida und Par-4 bildet.

2.6.2 Optimierung der Versuchsbedingungen der Interaktion

Die Lysate von Amida und Par-4 wurden mit dem Pellet (DLK inclusion bodies) der DLK in dem Puffer 100mM K-Citrat 50mM Tris pH 7,5 bei 4 Grad mit Proteaseinhibitoren solubilisiert. Im nächsten Schritt wurden dem Proteingemisch aus His-Amida, Strep-Par-4 und Strep-DLK 10mM ATP zugegeben und für eine Stunde bei 37 Grad inkubiert. Es folgte eine IMAC Reinigung und eine Gelfiltration.

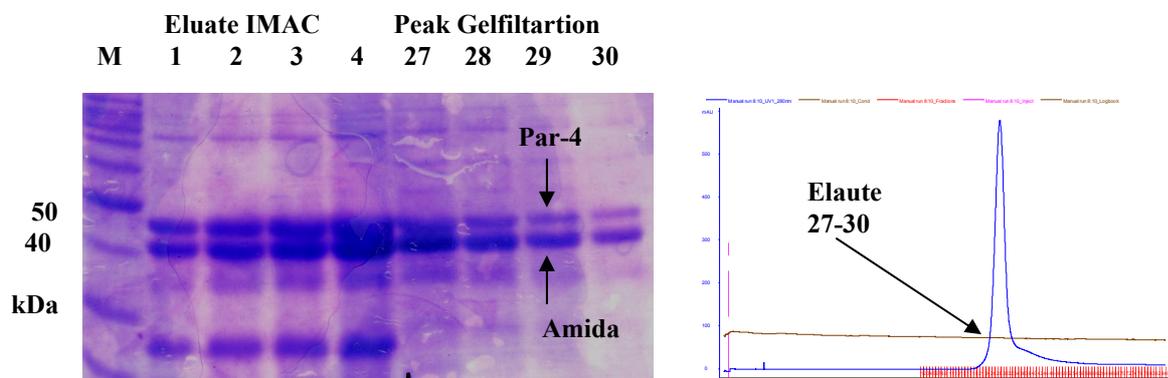


Abbildung 2.84: SDS-Page der Eluate aus der IMAC-Reinigung und aus der Gelfiltration des Amida/Par-4 Komplexes

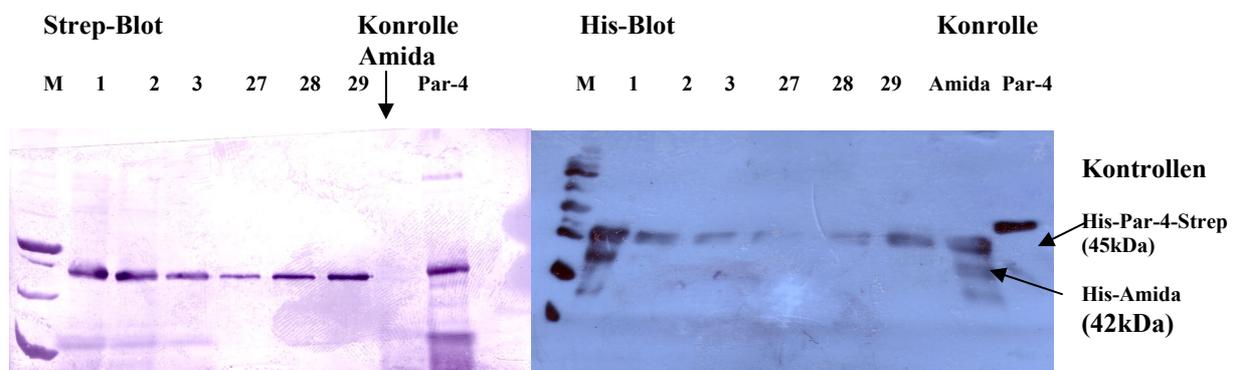


Abbildung 2.85: His und Strep Westernblot von SDS-Page (Gel hier nicht gezeigt) Amida/Par-4 Komplex

Die Komplexbildung von Amida und Par-4 konnte erfolgreich optimiert werden und wird in den Abbildungen 2.84 und 2.85 detailliert gezeigt. Als Beweis für die Komplexbildung dienen die Westernblots in Abbildung 2.85, wo im His-Blot nur His-Amida und im Strep-Blot nur Strep-Par-4 detektiert wurde. Als Kontrolle diente His-Amida (Kontrolle Amida), welches im Strep-Blot nicht detektiert wurde und im His-Blot His-Par-4-Strep, da dadurch im His-Blot ein deutlicher Höhenunterschied zu Amida zu erkennen ist.

Dass sich der Komplex aus Amida und Par-4 nur in Anwesenheit von der DLK bildet, war sehr überraschend. Es bestand der Verdacht, dass eines der beiden oder beide von der DLK phosphoryliert und damit aktiviert wurden und die Komplexbildung dadurch induziert wurde. Um dies zu überprüfen, wurde ein SDS-Page der Reinigung des Komplexes mit einer Lösung, der ProQ Diamond phosphoprotein gel stain and destain Solution, gefärbt und entfärbt. Im nächsten Schritt wurden die Proteine, die von der DLK phosphoryliert wurden im UV-Licht im Gel sichtbar.

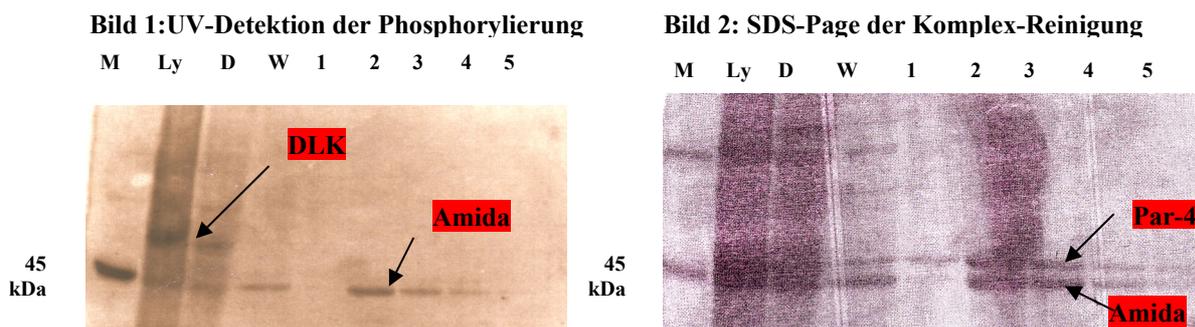


Abbildung 2.86: Bild 2: SDS-Page der Reinigung des Komplexes Amida/Par-4 mit der DLK. Bild 2: UV-Detektion der Phosphorylierung des SDS-Page aus Bild 1. Die gesammelten Proben der Reinigung wurden vor dem Auftrag nach Protokoll des Herstellers (ProQ Diamond) bearbeitet.

Wie nach den bisherigen Ergebnissen aus Abschnitt 2.6.1 zu erwarten war, korreliert die Phosphorylierung eng mit der Komplexbildung. Ganz deutlich sind die Autophosphorylierung der DLK und die Phosphorylierung von Amida nach der UV-Detektion zu beobachten (s. Abbildung 2.86 Bild der UV-Detektion)..

Es ist festzuhalten, dass sich ein Heterodimer aus Amida und Par-4 unter den gewählten Pufferbedingungen nur dann ausbildet, wenn Amida von der DLK phosphoryliert wird.

2.7 Charakterisierung der DLK und Par-4 induzierten Apoptose

Weder DLK noch Par-4 sind für sich alleine in der Lage, Apoptose auszulösen (Kögel et al., 1998; Sells et al., 1997; Guo et al., 1998). Bei Koexpression beider Proteine kolokalisiert die sonst nur im Kern lokalisierte DLK mit Par-4 an Aktinfilamenten der Zytoplasmas und führt zu den bekannten apoptotischen Kennzeichen. Wird die DLK im Überschuss zu Par-4 transfiziert, verbleibt ein größerer Teil der DLK im Zellkern und die Rate der apoptotischen Zellen wird auf ca. 40% verringert (Page et al., 1999). Wird eine DLK-Mutante, der die Kernlokalisationssequenzen fehlen, in Zellen transfiziert, verbleibt sie im Zytoplasma und ist alleine in der Lage effizient Apoptose auszulösen (Kögel et al., 1999). Transfizierte man Par-4 alleine, wurde das Protein an parallel verlaufenden Zytosklett-Strukturen lokalisiert.

Dass die Bindung von Par-4 ans Aktin-Zytosklett entscheidend für die Apoptoseinduktion ist, zeigte die Behandlung von Par-4- und DLK-koexprimierenden Zellen mit Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktin-Polymerisation. Die Zerstörung des Aktin-Zytoskletts führte in diesem Fall zu einer Reduktion der Par-4/DLK-vermittelten Apoptose und ist zugleich ein Hinweis darauf, dass das Aktin-Zytosklett direkt an der Par-4/DLK vermittelten Apoptose beteiligt ist (Vetterkind et al., 2005)

Das lässt darauf schließen, dass nur Par-4 für die Translokation der DLK vom Nukleus ins Zytoplasma und für die Aktinbindung verantwortlich ist. Da jedoch bisher nicht bekannt war, welcher Bereich von Par-4 für die Aktin-Bindung verantwortlich ist und ob die Bindung direkt oder indirekt über einen weiteren Interaktionspartner vermittelt wird, wurde die Interaktion von Par-4 mit dem Aktin-Zytosklett eingehend *in vitro* und *in vivo* untersucht.

2.7.1 *In vitro* Interaktion von Par-4 Proteinen und dem Aktin-Zytosklett

Um direkt eine Interaktion von Aktin und Par-4 zu zeigen, wurde ein *in vitro* Filament-Bindungsversuch mit aus *E.coli* heterolog exprimierten Par-4, N-Terminus-Par-4, der Death Domain und polymerisiertem Aktin durchgeführt (Versuch wurde durchgeführt von Dr. Illenberger, Universität Braunschweig). Die jeweiligen Proben wurden zwei Stunden bei 37 Grad in Sedimentationspuffer und nach Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Phalloidin für eine Stunde bei 37 Grad inkubiert. Die in Abbildung 2.87 gezeigte fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ansätze zeigte, dass sich nach Inkubation von Aktin mit Par-4 dicke Aktin-Filament-Bündel gebildet hatten (s. Abbildung 2.87 B), wohingegen in dem Kontrollansatz, der nur Aktin-Filament-Bündel enthielt, keine Filamente Bildung zu beobachten war

(Abbildung 2.87 A). Auch der N-Terminus-Par-4 (s. Abbildung 2.87 C) führte zu einer Bildung von Aktin-Bündeln, nicht dagegen die Death Domain (s. Abbildung 2.87 D).

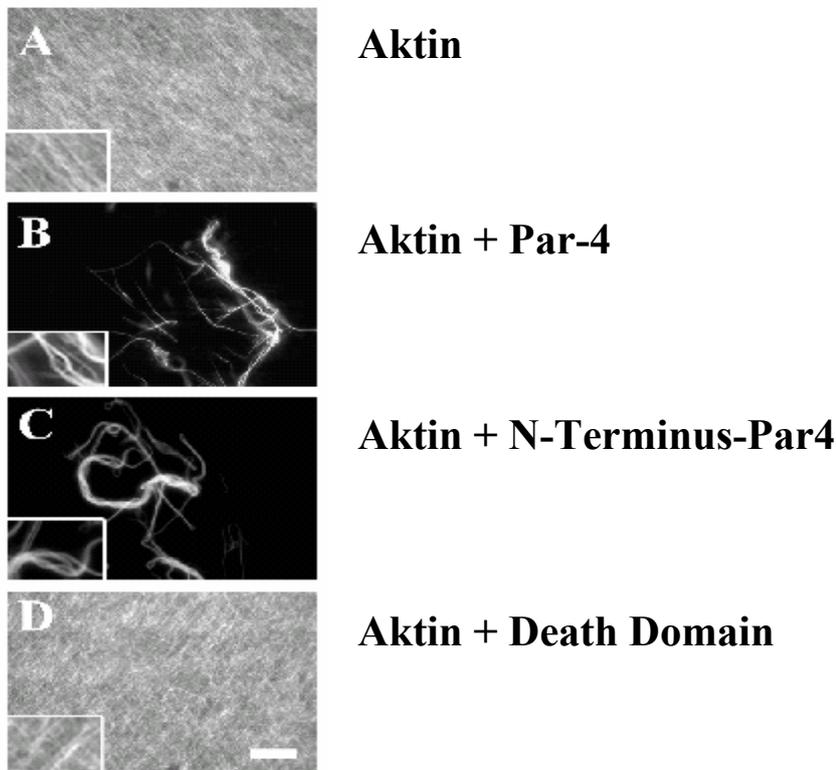


Abbildung 2.87: *In vitro* Filament-Bindeversuch mit Aktin und Par-4. Polymerisiertes Aktin wurde mit Par-4 Proteinen für 2 Stunden für 37 Grad inkubiert. Die Anfärbung der Aktin-Filamente erfolgte durch eine Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin für 1 Stunde bei 37 Grad. (Abbildung aus S.Vetterkind et al., 2005).

Das Ergebnis dieses Versuches verdeutlicht, dass Par-4 die Fähigkeit besitzt, *in vitro* direkt mit Aktin zu interagieren und die Bildung von Aktin-Filament-Bündeln zu induzieren, wobei die Aktin-Bindungsdomäne offensichtlich im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist.

2.7.2 Modell der von Par-4 und DLK vermittelten Apoptoseinduktion

Durch die Ergebnisse aus Abschnitt 3.4.1, weiteren *in vivo* Experimenten und der Erkenntnis, dass die DLK die leichte Kette von Myosin phosphoryliert, welche *in vivo* zu apoptotischen Anzeichen wie die Ausbildung von Membranbläschen führt (J.C. Mills et al., 1998), konnte ein mögliches Modell für die von Par-4 und DLK vermittelte Apoptose entwickelt werden (Vetterkind et al., 2005). In diesem Modell rekrutiert Par-4 die DLK aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Mechanismus ist nicht bekannt) und bindet mit dem N-Terminus ans Aktin-

Zytosklett. Dort angekommen phosphoryliert die DLK die leichte Kette von Myosin und induziert die Apoptose.

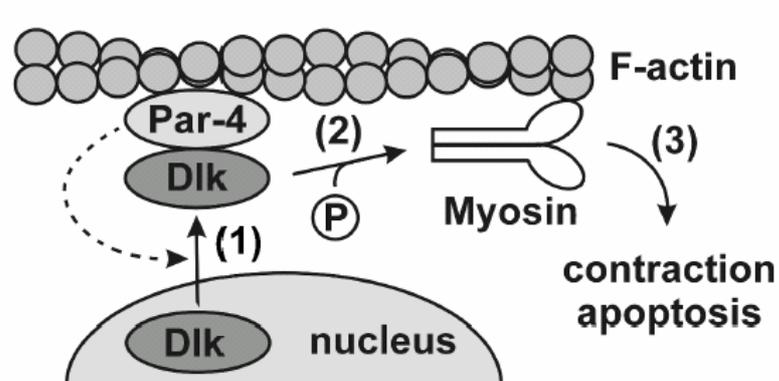


Abbildung 2.88: Modell der Par-4/DLK induzierten Apoptose (Abbildung aus S. Vetterkind et al., 2005).

Nach den neuen Erkenntnissen, die in dieser Arbeit über Par-4 im Zusammenhang mit der DNA-Bindung und seiner Funktion im Zellkern vorliegen, ist es auch denkbar, dass Par-4 mit der DLK zusammen aus dem Zellkern transloziert und ans Zytosklett bindet.

2.8 Ergebnistabelle

Par-4	Abs.	Seite
His-Par-4-Strep kloniert	2.1.1.1	21
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa, Nukleoproteinkomplex, Aggregation;	2.1.2.2	24
DLK phosphoryliert Par-4;	2.2.6	67
<i>E.coli</i> DNA abgetrennt und sequenziert;	2.4.1	77
Kristallisation, Würfelförmig;	2.1.2.15.2	57
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa, Protein ohne DNA, keine Aggregation;	2.1.2.8	39
Interaktion mit Ratten DNA, Isolierung, Sequenzierung, GGGTTA (Telomer-DNA);	2.4.2	79
Exprimiert in <i>S.cerevisiae</i>, gereinigt, Größe 45 und 55 kDa;	2.1.3.2	27
Par-4 mit 55 kDa ist sumoyliert;	2.1.3.2	27
Strep-Death Domain kloniert	2.1.1.1	21
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 12 kDa, Nukleoproteinkomplex, Aggregation;	2.1.2.4	27
<i>E.coli</i> DNA abgetrennt und sequenziert;	2.4.1	77
Kristallisation, bipyramidal, pseudohexagonal;	2.1.2.15.1	56
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 12 kDa, Protein ohne DNA, keine Aggregation;	2.1.2.7	34
Strep-N-Terminus-840 kloniert	2.1.1.1	21
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 40 kDa, Nukleoproteinkomplex, Aggregation;	2.1.2.9	43
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 40 kDa, Protein ohne DNA, keine Aggregation;	2.1.2.10	44
Cysteinmutanten kloniert	2.1.1.2	22
Strep-Par-4MutC82A	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa, Aggregation wie Par-4;	2.1.2.12	48
Strep-Par-4MutC103A	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa, Aggregation wie Par-4;	2.1.2.12	48
Strep-Par-4MutC165A	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa, Aggregation wie Par-4;	2.1.2.12	48
Strep-Par-4MutC82A/C103A/165A Expression nicht möglich	2.1.2.12	48
Phosphorylierungsmuatnten kloniert	2.1.1.2	22
Strep-Par-4S154A	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa;	2.1.2.13	51
DLK phosphoryliert Mutante	2.5.2	84
Strep-Par-4T155A	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa;	2.1.2.13	51
DLK phosphoryliert Mutante	2.5.2	84
Strep-Par-4ST154/155AA	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa;	2.1.2.13	51
keine Phosphorylierung durch DLK, somit Phosphorylierungsstelle identifiziert	2.5.2	84
Leucinmutanten kloniert	2.1.1.2	22
Strep-Par-4L295A/L316A/L330A	2.1.1.2	22
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 45 kDa, Aggregation wie Par-4;	2.1.2.14	52

DLK

Strep-DLK kloniert	2.2.1	62
Exprimiert in <i>E.coli</i> in <i>inclusion Bodies</i>, gereinigt, Größe 55 kDa;	2.2.4	65
Aktivitätstest der rekombinanten DLK;	2.2.6	67
Komplex mit Amida und Par-4 ist transient		

Amida

His-Amida kloniert	2.3.1	69
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 43 kDa, Nukleoproteinkomplex, Aggregation;	2.3.3	70
DLK phosphoryliert Amida;	2.5.1	83
Phosphorylierungsmutante kloniert	2.3.1	69
His-AmidaS200A	2.3.1	69
Exprimiert in <i>E.coli</i>, gereinigt, Größe 43 kDa;	2.3.5	76
keine Phosphorylierung durch DLK, somit Phosphorylierungsstelle identifiziert	2.5.1	83

In vitro Komplex Amida/Par-4

Komplexbildung von Strep-Par-4/His-Amida, wenn DLK Amida phosphoryliert;	2.6.2	87
--	-------	----

DLK/Par-4 induzierte Apoptose

N-terminale Domäne von Par-4 ist für Interaktion an Aktin verantwortlich;	2.7.1	89
Model der Par-4/DLK vermittelte Apoptose;	2.7.2	90

2.9 Ausblick

Die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Par-4 ein Protein ist, das nicht nur an apoptotischen Prozessen beteiligt ist, sondern an deren Regulation aktiv teilnimmt. Betrachtet man die Auswirkungen einer Deregulation des apoptotischen Vorgangs, so lässt sich erahnen, was für eine medizinische Relevanz die hier erlangten Ergebnisse für das Verständnis des apoptotischen Vorgangs haben können.

Als einer der ersten Schritte sollte die hier erstmalig gezeigte DNA-Bindung von Par-4 weiter charakterisiert und die Bindungskonstante des Nukleoproteinkomplexes bestimmt werden. Informationen über die Stabilität der Nukleoproteinkomplexe, speziell die Größe der DNA, wird es erlauben diese zu kristallisieren.

Die Strukturlösung der Death Domain ist bereits in Arbeit und sollte den Wirkungsmechanismus des Proteins erhellen.

Der Komplexbildung von Amida/Par-4 ist nur durch eine Phosphorylierung von Amida durch die DLK möglich. Der Einsatz der von mir in dieser Arbeit hergestellten Phosphorylierungsmutanten von Amida und Par-4 wird Klarheit über die Vorgänge bei der Komplexbildung von Amida und Par-4 bringen.

Die in dieser Arbeit erstmals identifizierte DNA-Bindung und Sumoylierung von Par-4 ist *in vivo* zu zeigen, um den Einfluss von Par-4 bei der Kernregulation zu untersuchen.

Eine interessante Option wäre es auch, das sumoylierte Par-4 kristallographisch zu charakterisieren.

Die Größe und Qualität der DLK Kristalle muss weiter optimiert werden. Mit der erfolgreichen Kristallisation ist jedoch die größte Hürde auf dem Weg zur Strukturaufklärung dieses für die Apoptoseregulation wichtigen Enzyms genommen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

Agarosegelelektrophorese

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

DNA-Sequenzierung

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

Geldokumentationssystem

Gel Doc 1000, Molecular Analyst, BioRad, München

pH-Meter

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

Photometer

UV-120-02, Shimadzu, Japan
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 13.2, 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 23.50 und JLA-8.1000, Palo Alto, U.S.A.

Kristallisation

Tecan-Kristallisationsroboter

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Reagenzien

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

Acrylamid-Bisacrylamid (Gel 30)	Roth
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

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

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
L-Arginin	Sigma
SDS	BioRad
TEMED	BioRad
L-Threonin	Sigma

Tris (Base)	Sigma
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
Sephacryl 200	Amersham
Superdex 200 prepgrade	Amersham
Superdex 75 prepgrade	Amersham
Superdex 200 analytisch	Amersham
Superdex 75 analytisch	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

3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

3.1.3.1 Puffer und Lösungen

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

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

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

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

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

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

3.1.3.2 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
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

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

3.1.4 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 *Adobe Photoshop 5*, *Adobe Illustrator 10.0.3*.

3.1.5 Organismen und Wachstumsbedingungen

3.1.5.1 Wachstumsbedingungen für *E. coli*, und *S. cerevisiae*

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.

3.1.5.2 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 3.1: 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
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 ZAM15 Tn10 (tet^R) Amy</i> <i>Cam^R]^a</i>	Greener and Jerpseth, 1993	Stratagene

3.1.5.3 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.

3.2 Methoden

3.2.1 Überexpression von Protein

3.2.1.1 Kulturbedingungen und Herstellung von klaren Lysaten von *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 Zelllysat 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.

3.2.1.2 Kulturbedingungen und Herstellung von klaren Lysaten von *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 Zelllysat wird durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C, 20000 Upm (JA 23.50 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.

3.2.1.3 Fraktionierung in Triton X-100-lösliche und -unlösliche Zellextrakte

Die Zellkulturschalen wurden zweimal mit 37°C warmem PEM-Puffer (Preuss et al.,1995) gewaschen und dann für 3 min unter Schwenken mit je 500 µl PEM-Puffer mit 0,5 % Triton X-100 bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand (= TX-100-lösliche Fraktion) abgenommen und für 3 min zentrifugiert (14000 rpm, 4°C). Die Proteine im Überstand

wurden ÜN mit 2 Volumen 100%igen Ethanol bei -20°C gefällt, am nächsten Tag durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C) pelletiert und in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die auf der Kulturschale verbliebene TX-100-unlösliche Fraktion wurde mit einem Gummischaber in 50 µl PLP abgeschabt und resuspendiert.

PEM-Puffer

PIPES pH 6,8.....80 mM

EGTA.....1 mM

MgCl₂.....1 mM

PEG-6000.....4 %

3.2.2 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

3.2.2.1 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
pET 11 a	Amp ^r	Novagen
pET 27 b	Kan ^r	Novagen
pET 23 a	Amp ^r	Novagen

3.2.2.2 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).

3.2.2.3 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:

Restriktionsverdaut DNA-Fragmente oder vorbehandelte PCR-Produkte wurden mit dem entsprechendem 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.

3.2.2.4 Herstellung transformationskompetenter Zellen

Kolonien des entsprechenden Bakteriums, werden in 300 ml SOB-Medium gegeben und bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert, bis $4-7 \times 10^7$ Zellen pro ml erreicht sind; das entspricht einer OD_{600} 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.

3.2.2.5 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.

3.2.2.6 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 OD_{600} 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.

3.2.2.7 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 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

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

3.2.2.8 PCR-Primer

Als PCR-Primer werden hier Oligonukleotide bezeichnet, welche die kodierende Sequenzen von Par-4, Amida und DLK nicht verändern und lediglich zur Modifikation der Randbereiche dienen. Mit diesen Primern werden Restriktionsschnittstellen und kodierende DNA Sequenzen für Affinitätspeptide hinzugefügt.

Par-4 :

1. PAR4hisFORSal

5'GGT CGA CAT GCA CCA TCA CCA TCA CCA TGC GAC CGG CTA TCG-3'

2. Sal/NdeStartPAR4

5'GGT CGA CCA TAT GGC GAC CGG CGG CTA TC-3'

3. PAR265Strep/revSTOP

5'GGC TAC TTC TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAG CTA GCT TCA ATT CTC TTT
TCC AAG GTG-3'

4. Par-4Stoprev

5'GG CTC GAG CTA CCT TGT CAG CTG CCC AAC-3'

5. NDEStartStrepPar-4FOR

5'GG CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAG AAG GCG GCG
ACCGGC GGC TAT CGG AGC-3'

Amida :

1. BamH1/NDE1AmidHISfor

5'GGG GAT CCA TAT GCA CCA TCA CCA TCA CCA TGA GTT GGA ACA GAG AGA
AGG G-3'

2. AMIDAHindStoprev

5'GGA AGC TTA GTC AAA GGG TGG GCT AGC TAG TGG-3'

DLK :

1. DLK(896)for(600KB)

5'GAG GAG GAT GAC CAT CGC ACA GA-3'

2. DLK(1040)rev(1040KB)

5'CGG CAT GCT TGA GTG CGA CTT G-3'

3. DLKStoprev(kürzer)

5'GC CTA GCG CAC GCC GCA CTC-3'

4. BamH1/NDEStartStrepDLKfor

5'G GGG ATC CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAG AAG GCG
TCC ACG TTC AGG CAG GAG GAC-3'

3.2.2.9 Mutageneseprimer

1. Par-4Mut245rev

5'CGA GCC GTG AGC AGC GTT CAG GGC GCC-3'

2. Par-4Mut308rev

5'CC AGC GGC AAT AGG AGC CTC GCT CTC CGG-3'

3. Par-4Mut495rev

5'GTA CTC ATC TAA AGC CTC CGC CGC GGG-3'

4. Par-4-Xho-StoprevMUT-Leu

5'GG CTC CTA CCT TGT CGC CTG CCC AAC-3'

3.2.2.10 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'

3.2.2.11 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.

3.2.2.12 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.

3.2.2.13 Denaturierende Proteinfällung für die Nukleinsäure Isolierung (Wessel and Flugge, 1984)

Eine Proteinfällung wurde durchgeführt, um Proteine, Ionen und Agenzien, welche die Ligation der Nukleinsäuren in den pCR-Blunt stören könnten, zu entfernen. Für Proben < 500 µl ist die Chloroform/Methanol-Fällung nach Wessel und Flugge (Wessel and Flugge, 1984) die Methode der Wahl. Zur Probe wurde ein 3/4 Volumen 100 % Methanol und 1/4 Volumen 100 % Chloroform gegeben und kräftig gemischt. Danach wurde die Probe 10 min in einer Eppifuge bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Es erfolgte eine Phasentrennung, wobei die Interphase die Proteine enthielt. Die obere Phase, in der sich die vom Protein gebundene Nukleinsäuren abgesetzt haben, wurde vorsichtig abgenommen ohne dabei die Interphase zu berühren. Zu dieser wurden 3/4 Volumen 100 % kaltes Ethanol gegeben, das ganze gemischt und die Nukleinsäuren bei -20 Grad gefällt. Im nächsten Schritt wurde die Lösung lyophilisiert, in 100µl H₂O aufgenommen, und mit der Mung-Bean.Nuclease glatte

Enden eingeführt . Danach wurde die Nukleinsäuren nochmals gereinigt und auf einem Agarosegel kontrolliert.

3.2.3 Arbeiten mit Proteinen

3.2.3.1 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.

3.2.3.2 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.

3.2.3.3 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.

3.2.3.4 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.

3.2.3.5 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.

3.2.3.6 Verwendete Antikörper und Konjugate

Tabelle 3.2: Konjugate und Antikörper

Name	Antigen Epitop	Eigenschaft	Herkunft	Verwendung
Sumo (small ubiquitin-like-modifier)	Sumo	Polyclonal Antibody to Sumo (Yeast)	Acris Antibodies Rabbit	1 : 1000
SA-AP-Konjugat	Strep-tag Biotin	Streptavidin an Alkalischer Phosphatase	GATC	2,81944444
Anti-poly-Histidin, Peroxidase Konjugat	poly-Histidin	monoklonal, IgG2a aus Maus, Peroxidase Konjugat	Sigma	3,51388889

3.2.3.7 *In vitro* Kinasetest

Es ist bekannt, dass die "DAP-like-Kinase" DLK in der Lage ist, an Par-4 zu binden und es zu phosphorylieren (Page et al, 1999). Die spezifische Bindung von DLK an Par-4 setzt zumindest

teilweise strukturelle Integrität beider Proteine voraus. Von daher wurde die Phosphorylierung von Par-4 durch die DLK als Hinweis auf Funktionalität und Faltung der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten DLK gewertet. Mit diesem Kinasetest wurde auch die Phosphorylierungsmutanten von Amida und Par-4 getestet werden. Jeweils geringe Mengen an gereinigten Proteinen werden zusammen mit radioaktiv markierten γ -ATP für 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12 μ l Probenpuffer (2x) mit 50 mM EDTA gestoppt. Die Proben wurden für die SDS-PAGE aufbereitet und anschließend autoradiographisch analysiert. Hierzu wurde das Gel getrocknet und einem Röntgenfilm so lange exponiert, bis eine hinreichende Intensität der Signale erreicht war.

In vitro Kinase-Tests wurden im Labor Dr.Ute Preuß an der Universität Bonn in durchgeführt. Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,2µl DLK (ca. 0,4 ng)

0,2µl γ -ATP (300Ci/nmol)

0,2µl Protein (verschiedener Herkunft Konzentration ~ 1µg)

14,4µl Kinasepuffer

3.2.3.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Methoden 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.

UV-Vis Spektroskopie

Die Bestimmung der Konzentration der Proteinproben von Par-4, Amida und DLK erfolgte 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

3.2.4 Chromatographische Techniken

3.2.4.1 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.

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 Zellysate 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.

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 oktahedraler 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 ($pK_a = 6$) 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 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.

3.2.4.2 Gelfiltrationen

Gelfiltration ist eine Methode bei der Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden. Das Gelmaterial besitzt verschieden große Poren. Große Teilchen können nicht in diese Poren eindringen. Ihnen steht beim Durchlaufen der Säule (des "Gelbetts") nur das Volumen zwischen den Gelteilchen (Ausschlussvolumen V_0) zur Verfügung. Sie treten mit dem geringsten Elutionsvolumen V_e aus der Säule wieder aus. Kleine Teilchen können sich im gesamten Ausschlussvolumen plus Porenraum (V_t) bewegen, für sie hat die Säule ein größeres (zugängliches) Volumen, sie werden später eluiert. Da die Probe (fast) unabhängig vom Puffer nicht mit dem Gelmaterial wechselwirkt, benötigt man nur einen Puffer

(isokratisch). Für die praktische Anwendung ist ein geringes Ausschlussvolumen (keine Flüssigkeit zwischen Gelbett und Stempel, dichte Packung), eine gleichmäßige Packung und eine lange Säule günstig. Für die Versuche wurden fertig gepackte Säulen an einem Äkta-Chromatographie-System verwendet. Die Einheit beinhaltet Puffervorratsgefäße, Pumpen, Probeninjektor, Säule, UV-Detektor und Fraktionssammler. Die Anlage wird über eine Computer gesteuert. Alle Puffer wurden gefiltert und entgast. Die verschiedenen Säulen sind Abschnitt 3.2 aufgelistet.

3.2.5 Kristallisation von Proteinen

Bei der Kristallisation scheidet sich Protein nach initialer Keimbildung aus einer übersättigten Lösung so lange aus, bis das thermodynamische Löslichkeitsprodukt erreicht ist. Die Schwierigkeit besteht bei Proteinen allerdings darin, diesen Abscheidungsprozess so zu kontrollieren, dass das Protein nicht mehr oder minder ungeordnet als Präzipitat ausfällt sondern, seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften entsprechend, geordnete, periodische Strukturen ausbildet, also kristallisiert. Die Parameter, über die die Kristallisation von Proteinen beeinflusst werden kann, sind u.a die Konzentration des Proteins, der umgebende Puffer und der pH-Wert. Entscheidend für die Größe und Anzahl an Kristallen (verhält sich meist umgekehrt proportional zueinander) ist die Kristallisationskeimbildungsrate im Kristallisationsansatz sowie die Wachstumsgeschwindigkeit der Kristalle. In der Praxis wird zumeist eine hochkonzentrierte oder bereits überkonzentrierte, metastabile Proteinlösung mit einem Fällungsmittel versetzt. Dies geschieht entweder in einem Schritt als „Batch“-Versuch oder mittels Methoden, die über eine langsame Äquilibrierungsphase die Bedingungen für die Kristallisation schaffen.

3.2.5.1 Dampfdiffusionsmethode

3.2.5.1.1 Hanging-Drop und Sitting-Drop

Bei dieser Methode wird eine Proteinlösung mit dem Fällungsmittel vermengt, welches dadurch verdünnt wird. Dieser Ansatz mit einem kleinen Volumen (2µl bis 20 µl) steht in einem abgeschlossenen System über den Dampfdruck mit einem großen Reservoir des unverdünnten Fällungsmittels in Verbindung (meist 1 ml) (s. Abbildung 3.3). Die Äquilibrierung des Systems, d.h. der Zustand in dem kein weiterer Netto-Austausch über die Gasphase stattfindet, vollzieht sich in der Regel binnen 24 bis 48 Stunden. Diese Zeit kann

durch eine "Isolationsschicht" über dem Reservoir, z.B. Silikonöl, verlängert werden. Nach Äquilibration sollte das Protein überkonzentriert vorliegen, damit sich in Abhängigkeit von der Keimbildungsrate Kristalle ausbilden können.

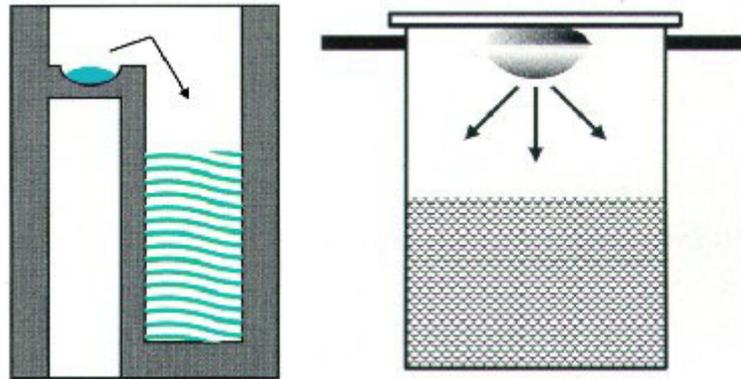


Abbildung 3.3: Kristallisation: links: Sitting-Drop- und rechts Hanging-Drop-Verfahren (Abbildung aus McPherson 1999).

3.2.5.1.2 Die Methode des "Sparse-Matrix-Screen"

Die ersten Kristallisationsarbeiten wurden in „24-well“-Titerplatte (Fa. Falcon) durchgeführt. Die Ansätze wurden mit mittellviskosem Silikonfett (Fa. Bayer) und Deckgläschen (18mm, Fa. Hampton) abgedichtet, die bei „Hanging drop“-Experimenten silikonisiert waren. Kristallisationsexperimente wurden bei RT angesetzt und bei 17°C gelagert. Als erster Schritt in der Bestimmung initialer Kristallisationsbedingungen der in dieser Arbeit behandelten Proteine wurde der "Sparse-Matrix-Screen" (Jancarik & Kim, 1991; Cudney et al., 1994) durchgeführt. Hierzu wurden Sets von je 50 verschiedenen Fällungsmittel-Puffern verwendet, die in ihrer Zusammensetzung verschiedenste, bereits erfolgreiche Kristallisationsbedingungen repräsentieren. Folgende „Screening-Kits“ (Hampton Research) fanden Anwendung :

Crystal Screen I

1. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.02 M Calcium Chloride
2. 0.4 M K, Na Tartrate
3. 0.4 M Ammonium Phosphate
3. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
5. 30% MPD, 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.2 M Na Citrate
6. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Mg Chloride

7. 1.4 M Na Acetate, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5
8. 30% 2-Propanol, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5, 0.2 M Na Citrate
9. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate
10. 30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.2 M Ammonium Acetate
11. 1.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
12. 30% 2-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Mg Chloride
13. 30% PEG 400, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Na Citrate
13. 28% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Ca Chloride
15. 30% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2M Ammonium Sulfate
16. 1.5 M Li Sulfate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
17. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Li Sulfate
18. 20% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5, 0.2 M Mg Acetate
19. 30% 2-Propanol, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Ammonium Acetate
20. 25% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.2 M Ammonium Sulfate
21. 30% MPD, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Mg Acetate
22. 30% PEG 4000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5, 0.2 M Na Acetate
23. 30% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Mg Chloride
23. 20% 2-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.2 M Ca Chloride
25. 1.0 M Na Acetate, 0.1 M Imidazole pH 6.5
26. 30% MPD, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.2 M Ammonium Acetate
27. 20% 2-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Na Citrate
28. 30% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate, pH 6.5, 0.2 M Na Acetate
29. 0.8 M K, Na Tartrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
30. 30% PEG 8000, 0.2 M Ammonium Sulfate
31. 30% PEG 4000, 0.2 M Ammonium Sulfate
32. 2.0 M Ammonium Sulfate
33. 3.0 M Na Formate
33. 2.0 M Na Formate, 0.1 M Na Acetate pH 3.6
35. 1.6 M Na, K Phosphate, 0.1 M Na- Hepes pH 7.5
36. 8% PEG 8000, 0.1 M Tris HCl pH 8.5
37. 8% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 3.6
38. 1.4 M Na Citrate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
39. 2% PEG 400, 2.0 M Annonium Sulfate, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
40. 20% 2-Propanol, 20% PEG 4000, 0.1 M Na Citrate pH 5.6
41. 10% 2-Propanol, 20% PEG 4000, 0.1 M Na Hepes pH 7.5
42. 20% PEG 8000, 0.05 M K Phosphate
43. 30% PEG 1500
43. 0.2 M Mg Formate
45. 18% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Zn Acetate
46. 18% PEG 8000, 0.1 M Na Cacodylate pH 6.5, 0.2 M Ca Acetate
47. 2.0 M Ammonium Sulfate, 0.1 M Na Acetate pH 3.6
48. 2.0 M Ammonium Phosphate, 0.1 Tris HCl pH 8.5
49. 2% PEG 8000, 1.0 M Li Sulfate
50. 15% PEG 8000, 0.5 M Li Sulfate

Crystal Screen II

1. 10% PEG 6000, 2.0 M Na chloride
2. 0.5 M NaCl, 0.01 M CTAB, 0.01 M Mg chloride
3. 25% Ethylene glycol

3. 35% Dioxane
5. 5% Isopropanol, 2.0 M Ammoniumsulfate
6. 1.0 M Imidazole pH 7.0
7. 10% PEG 1000, 10% PEG 8000
8. 10% Ethanol, 1.5 M Na chloride
9. 2.0 M Na chloride, 0.1 M Na acetate pH 3.6
10. 30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.2 M NaCl
11. 1.0 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.01 M Co chloride
12. 30% PEG 400, 0.1 M Na acetate pH 3.6, 0.1 M Cd chloride
13. 30% PEG MME 2000, 0.1 M Na Acetate pH 3.6, 0.2 M Ammoniumsulfate
13. 2.0 M Ammonium sulfate, 0.1M Na Citrate pH 5.6 0.2 M K/Na Tartrate
15. 1.0 M Li sulfate, 0.1M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M Ammonium sulfate
16. 2% Polyethyleneimine, 0.1 M Na Citrate pH 5.6, 0.5 M Na chloride
17. 35% tert-butanol, 0.1 M Na citrate pH5.6
18. 10% Jeffamine M-600, 0.1 M Na citrate pH 5.6, 0.01M Ferric chloride
19. 2.5 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Na citrate pH 5.6
20. 1.6 M Mg sulfate, 0.1 M MES pH 6.5
21. 2.0 M Na chloride, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Na/K Phosphate
22. 12% PEG 20,000, 0.1 M MES pH 6.5
23. 10% Dioxane, 0.1 M MES pH 6.5, 1.6 M Ammonium sulfate
23. 30% Jeffamine M-600, 0.1 M MES pH6.5, 0.05 M Cs chloride
25. 1.8 M Ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M Co chloride
26. 30% PEG MME 5000, 0.1 M MES pH 6.5, 0.2 M Ammonium sulfate
27. 25% PEG MME 550, 0.1 M MES pH 6.5, 0.01 M Zn sulfate
28. 1.6 M Sodium citrate pH 6.5
29. 30% MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.5 M Ammonium sulfate
30. 10% PEG 6000, 0.1 M Hepes pH 7.5, 5% MPD
31. 20% Jeffamine M-600, 0.1 M Hepes pH 7.5
32. 1.6 M Ammonium sulfate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.1 M Na chloride
33. 2.0 M Ammonium formate, 0.1 M Hepes pH 7.5
33. 1.0 M Na acetate, 0.1 M Hepes pH 7.5, 0.05 M Cd sulfate
35. 70% MPD, 0.1 M Hepes pH 7.5
36. 3.3 M Na chloride, 0.1 M Hepes pH 7.5
37. 10% PEG 8000, 0.1 M Hepes pH 7.5, 8% Ethylene glycol
38. 20% PEG 10,000, 0.1 M Hepes pH 7.5
39. 3.4 M 1,6 Hexanediol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M Mg chloride
40. 25% tert-butanol, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.1 M Ca chloride
41. 1.0 M Li sulfate, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.01 M Ni chloride
42. 12% Glycerol, 0.1 M Tris pH 8.5, 1.5 M Ammonium sulfate
43. 50% MPD, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.2 M Ammonium phosphate
43. 20% Ethanol, 0.1 M Tris pH 8.5
45. 20% PEG MME 2000, 0.1 M Tris pH 8.5, 0.01 M Ni chloride
46. 30% PEG MME 550, 0.1 M Bicine pH 9.0, 0.1 M Nachloride
47. 2.0 M Mg chloride, 0.1 M Bicine pH 9.0
48. 10% PEG 20,000, 0.1 M Bicine pH 9.0, 2% Dioxane

3.2.5.1.3 Kristallisation mit dem Kristallisationsroboter

Nach Anschaffung eines Kristallisationsroboters von Tecan wurden alle Kristallisationsarbeiten in 96 Sitting-Drop Platten durchgeführt. Bei der Evaluierung der Kristallisationsbedingungen wurden ein Maximimalvolumen von 0,7µl für das Protein/Reservoir Gemisch und 100µl ins Reservoir als das am Geeignetesten festgelegt. Die Kristallisation mit einem Kristallisationsroboter hatte zum einen den Vorteil, das man viel kleinere Proteinmengen für die Kristallisation einsetzen konnte. Zum anderen stellte sich die Äquilibrierung des Systems in einer viel kürzeren Zeit ein. Gerade bei der Evaluierung von Kristallisationsbedingungen neuer Proteine bietet das System einen immensen Vorteil gegenüber der Hanging Drop Verfahren.

Folgende „Screening-Kits“ fanden Anwendung :

Cryo I sparse matrix crystallization screen

crystallant	buffer (0.1 M)	additive(s)
1 40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	phosphate-citrate pH 4.2	none
2 40% (v/v) ethylene glycol	acetate pH 4.5	none
3 50% (v/v) PEG-200	citrate pH 5.5	none
4 40% (v/v) PEG-300	HEPES pH 7.5	0.2 M NaCl
5 40% (v/v) PEG-400	citrate pH 5.5	0.2 M MgCl ₂
6 40% (v/v) PEG-600	cacodylate pH 6.5	0.2 M Ca(OAc) ₂
7 40% (v/v) ethanol	Tris pH 8.5	0.05 M MgCl ₂
8 35% (v/v) 2-ethoxyethanol	cacodylate pH 6.5	none
9 35% (v/v) 2-propanol	phosphate-citrate pH 4.2	none
10 45% (v/v) glycerol	imidazole pH 8.0	none
11 35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	Tris pH 8.5	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
12 50% (v/v) ethylene glycol	acetate pH 4.5	5% (w/v) PEG-1000
13 30% (v/v) PEG-200	MES pH 6.0	5% (w/v) PEG-3000
14 20% (v/v) PEG-300	phosphate-citrate pH 4.2	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
15 50% (v/v) PEG-400	CHES pH 9.5	0.2 M NaCl
16 30% (v/v) PEG-600	MES pH 6.0	5% (w/v) PEG-1000, 10% (v/v) glycerol
17 40% (v/v) 1, 2-propanediol	HEPES pH 7.5	none
18 35% (v/v) 2-ethoxyethanol	imidazole pH 8.0	0.05 M Ca(OAc) ₂
19 35% (v/v) 2-propanol	Tris pH 8.5	none
20 30% (v/v) 1,2-propanediol	citrate pH 5.5	20% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol
21 40% (v/v) 1,2-propanediol	acetate pH 4.5	0.05 M Ca(OAc) ₂
22 40% (v/v) ethylene glycol	Na/K phosphate pH 6.2	none
23 40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	Tris pH 7.0	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
24 40% (v/v) PEG-400	Na/K phosphate pH 6.2	0.2 M NaCl
25 30% (v/v) PEG-200	Tris pH 8.5	0.2 M (NH ₄) ₂ HPO ₄

MATERIAL UND METHODEN

26	40% (v/v) PEG-300	CHES pH 9.5	0.2 M NaCl
27	30% (v/v) PEG-400	CAPS pH 10.5	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
28	30% (v/v) PEG-600	HEPES pH 7.5	0.05 M Li ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
29	40% (v/v) PEG-300	CHES pH 9.5	0.2 M sodium citrate
30	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	citrate pH 5.5	none
31	35% (v/v) 2-propanol	citrate pH 5.5	5% (w/v) PEG-1000
32	40% (v/v) 1,2-propanediol	CHES pH 9.5	0.2 M sodium citrate
33	25% (v/v) 1, 2-propanediol	imidazole pH 8.0	0.2 M Zn(OAc) ₂ , 10% (v/v) glycerol
34	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	imidazole pH 8.0	0.2 M MgCl ₂
35	40% (v/v) ethylene glycol	HEPES pH 7.5	5% (w/v) PEG-3000
36	50% (v/v) PEG-200	Tris pH 7.0	0.05 M Li ₂ SO ₄
37	40% (v/v) PEG-300	cacodylate pH 6.5	0.2 M Ca(OAc) ₂
38	40% (v/v) PEG-400	Tris pH 8.5	0.2 M Li ₂ SO ₄
39	40% (v/v) PEG-600	phosphate-citrate pH 4.2	none
40	40% (v/v) ethanol	phosphate-citrate pH 4.2	5% (w/v) PEG-1000
41	25% (v/v) 1, 2-propanediol	phosphate-citrate pH 4.2	5% (w/v) PEG-3000, 10% (v/v) glycerol
42	40% (v/v) ethylene glycol	Tris pH 7.0	none
43	50% (v/v) ethylene glycol	Tris pH 8.5	0.2 M MgCl ₂
44	50% (v/v) PEG-200	cacodylate pH 6.5	0.2 M Zn(OAc) ₂ 5% (w/v) PEG-8000, 10% (v/v) glycerol
45	20% (v/v) PEG-300	Tris pH 8.5	5% (w/v) PEG-3000
46	40% (v/v) PEG-400	MES pH 6.0	0.2 M Li ₂ SO ₄
47	50% (v/v) PEG-400	acetate pH 4.5	0.2 M Zn(OAc) ₂
48	40% (v/v) PEG-600	imidazole pH 8.0	

Cryo II sparse matrix crystallization screen

	crystallant	buffer (0.1 M)	additive(s)
1	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	cacodylate pH 6.5	5% (w/v) PEG-8000
2	50% (v/v) PEG-200	CHES pH 9.5	none
3	40% (v/v) ethylene glycol	phosphate-citrate pH 4.2	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
4	40% (v/v) PEG-400	HEPES pH 7.5	0.2 M Ca(OAc) ₂
5	40% (v/v) PEG-300	Tris pH 7.0	5% (w/v) PEG-1000
6	30% (v/v) PEG-600	cacodylate pH 6.5	1 M NaCl, 10% (v/v) glycerol
7	40% (v/v) ethanol	Tris pH 7.0	none
8	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Na/K phosphate pH 6.2	0.2 M NaCl
9	35% (v/v) 2-propanol	imidazole pH 8.0	0.05 M Zn(OAc) ₂
10	40% (v/v) 1,2-propanediol	acetate pH 4.5	none
11	25% (v/v) 1, 2-propanediol	Na/K phosphate pH 6.2	10% (v/v) glycerol
12	40% (v/v) 1,2-propanediol	citrate pH 5.5	0.2 M NaCl
13	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	cacodylate pH 6.5	0.05 M Zn(OAc) ₂
14	40% (v/v) ethylene glycol	imidazole pH 8.0	0.2 M Ca(OAc) ₂
15	50% (v/v) PEG-200	Na/K phosphate pH 6.2	0.2 M NaCl
16	20% (v/v) PEG-300	imidazole pH 8.0	1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
17	50% (v/v) PEG-400	MES pH 6.0	none
18	40% (v/v) PEG-300	phosphate-citrate pH 4.2	none
19	40% (v/v) PEG-600	acetate pH 4.5	0.2 M MgCl ₂
20	50% (v/v) ethylene glycol	CHES pH 9.5	0.5 M K/Na tartrate

MATERIAL UND METHODEN

21	35% (v/v) 2-ethoxyethanol	Tris pH 8.5	0.2 M Li ₂ SO ₄
22	35% (v/v) 2-propanol	cacodylate pH 6.5	0.2 M MgCl ₂
23	30% (v/v) 1,2-propanediol	HEPES pH 7.5	20% (v/v) PEG-400
24	25% (v/v) 1, 2-propanediol	Tris pH 8.5	0.2 M MgCl ₂ , 10% (v/v) glycerol
25	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	CAPS pH 10.5	none
26	40% (v/v) ethylene glycol	MES pH 6.0	0.2 M Zn(OAc) ₂
27	50% (v/v) PEG-200	Tris pH 7.0	none
28	40% (v/v) PEG-300	imidazole pH 8.0	0.2 M Zn(OAc) ₂ 5% (w/v) PEG-3000, 10% (v/v) glycerol
29	30% (v/v) PEG-400	HEPES pH 7.5	glycerol
30	40% (v/v) PEG-600	citrate pH 5.5	none
31	40% (v/v) PEG-600	CHES pH 9.5	none
32	35% (v/v) 2-propanol	acetate pH 4.5	none
33	45% (v/v) glycerol	cacodylate pH 6.5	0.2 M Ca(OAc) ₂
34	25% (v/v) 1, 2-propanediol	Tris pH 7.0	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
35	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	citrate pH 5.5	none
36	50% (v/v) PEG-200	cacodylate pH 6.5	0.2 M MgCl ₂
37	50% (v/v) ethylene glycol	imidazole pH 8.0	none
38	40% (v/v) PEG-400	acetate pH 4.5	none
39	30% (v/v) PEG-600	Tris pH 7.0	0.5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10% (v/v) glycerol
40	40% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	CHES pH 9.5	none
41	50% (v/v) ethylene glycol	HEPES pH 7.5	0.2 M Li ₂ SO ₄
42	30% (v/v) PEG-200	acetate pH 4.5	0.1 M NaCl
43	40% (v/v) PEG-400	imidazole pH 8.0	none
44	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	acetate pH 4.5	10% (v/v) glycerol
45	40% (v/v) PEG-300	acetate pH 4.5	0.2 M NaCl
46	30% (v/v) PEG-200	CAPS pH 10.5	0.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄
47	50% (v/v) PEG-200	HEPES pH 7.5	none
48	50% (v/v) PEG-200	phosphate-citrate pH 4.2	0.2 M NaCl

Wizard I random sparse matrix crystallization screen

	crystallant	buffer (0.1 M)	salt (0.2 M)
1	20% (w/v) PEG-8000	CHES pH 9.5	none
2	10% (v/v) 2-propanol	HEPES pH 7.5	NaCl
3	15% (v/v) ethanol	CHES pH 9.5	none
4	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	imidazole pH 8.0	MgCl ₂
5	30% (v/v) PEG-400	CAPS pH 10.5	none
6	20% (w/v) PEG-3000	citrate pH 5.5	none
7	10% (w/v) PEG-8000	MES pH 6.0	Zn(OAc) ₂
8	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	citrate pH 5.5	none
9	1.0 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	acetate pH 4.5	none
10	20% (w/v) PEG-2000 MME	Tris pH 7.0	none
11	20% (v/v) 1,4-butanediol	MES pH 6.0	Li ₂ SO ₄
12	20% (w/v) PEG-1000	imidazole pH 8.0	Ca(OAc) ₂
13	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄	cacodylate pH 6.5	none
14	1.0 M sodium citrate	cacodylate pH 6.5	none
15	10% (w/v) PEG-3000	imidazole pH 8.0	Li ₂ SO ₄
16	2.5 M NaCl	Na/K phosphate pH 6.2	none
17	30% (w/v) PEG-8000	acetate pH 4.5	Li ₂ SO ₄

MATERIAL UND METHODEN

18	1.0 M K/Na tartrate	imidazole pH 8.0	NaCl
19	20% (w/v) PEG-1000	Tris pH 7.0	none
20	0.4 M NaH ₂ PO ₄ /1.6 M K ₂ HPO ₄	imidazole pH 8.0	NaCl
21	20% (w/v) PEG-8000	HEPES pH 7.5	none
22	10% (v/v) 2-propanol	Tris pH 8.5	none
23	15% (v/v) ethanol	imidazole pH 8.0	MgCl ₂
24	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	Tris pH 7.0	NaCl
25	30% (v/v) PEG-400	Tris pH 8.5	MgCl ₂
26	10% (w/v) PEG-3000	CHES pH 9.5	none
27	1.2 M NaH ₂ PO ₄ /0.8 M K ₂ HPO ₄	CAPS pH 10.5	Li ₂ SO ₄
28	20% (w/v) PEG-3000	HEPES pH 7.5	NaCl
29	10% (w/v) PEG-8000	CHES pH 9.5	NaCl
30	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄	acetate pH 4.5	NaCl
31	20% (w/v) PEG-8000	phosphate-citrate pH 4.2	NaCl
32	10% (w/v) PEG-3000	Na/K phosphate pH 6.2	none
33	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	CAPS pH 10.5	Li ₂ SO ₄
34	1.0 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	imidazole pH 8.0	none
35	20% (v/v) 1,4-butanediol	acetate pH 4.5	none
36	1.0 M sodium citrate	imidazole pH 8.0	none
37	2.5 M NaCl	imidazole pH 8.0	none
38	1.0 M K/Na tartrate	CHES pH 9.5	Li ₂ SO ₄
39	20% (w/v) PEG-1000	phosphate-citrate pH 4.2	Li ₂ SO ₄
40	10% (v/v) 2-propanol	MES pH 6.0	Ca(OAc) ₂
41	30% (w/v) PEG-3000	CHES pH 9.5	none
42	15% (v/v) ethanol	Tris pH 7.0	none
43	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	Na/K phosphate pH 6.2	none
44	30% (v/v) PEG-400	acetate pH 4.5	Ca(OAc) ₂
45	20% (w/v) PEG-3000	acetate pH 4.5	none
46	10% (w/v) PEG-8000	imidazole pH 8.0	Ca(OAc) ₂
47	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Tris pH 8.5	Li ₂ SO ₄
48	20% (w/v) PEG-1000	acetate pH 4.5	Zn(OAc) ₂

Wizard II random sparse matrix crystallization screen

	<u>crystallant</u>	<u>buffer (0.1 M)</u>	<u>salt (0.2 M)</u>
1	10% (w/v) PEG-3000	acetate pH 4.5	Zn(OAc) ₂
2	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	MES pH 6.0	Li ₂ SO ₄
3	20% (w/v) PEG-8000	Tris pH 8.5	MgCl ₂
4	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	cacodylate pH 6.5	NaCl
5	20% (v/v) 1,4-butanediol	HEPES pH 7.5	NaCl
6	10% (v/v) 2-propanol	phosphate-citrate pH 4.2	Li ₂ SO ₄
7	30% (w/v) PEG-3000	Tris pH 7.0	NaCl
8	10% (w/v) PEG-8000	Na/K phosphate pH 6.2	NaCl
9	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	phosphate-citrate pH 4.2	none
10	1.0 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	Tris pH 8.5	none
11	10% (v/v) 2-propanol	cacodylate pH 6.5	Zn(OAc) ₂
12	30% (v/v) PEG-400	cacodylate pH 6.5	Li ₂ SO ₄
13	15% (v/v) ethanol	citrate pH 5.5	Li ₂ SO ₄
14	20% (w/v) PEG-1000	Na/K phosphate pH 6.2	NaCl
15	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄	HEPES pH 7.5	none

MATERIAL UND METHODEN

16	1.0 M sodium citrate	CHES pH 9.5	none
17	2.5 M NaCl	Tris pH 7.0	MgCl ₂
18	20% (w/v) PEG-3000	Tris pH 7.0	Ca(OAc) ₂
19	1.6 M NaH ₂ PO ₄ /0.4 M K ₂ HPO ₄	phosphate-citrate pH 4.2	none
20	15% (v/v) ethanol	MES pH 6.0	Zn(OAc) ₂
21	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	acetate pH 4.5	none
22	10% (v/v) 2-propanol	imidazole pH 8.0	none
23	15% (v/v) ethanol	HEPES pH 7.5	MgCl ₂
24	30% (w/v) PEG-8000	imidazole pH 8.0	NaCl
25	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	HEPES pH 7.5	NaCl
26	30% (v/v) PEG-400	CHES pH 9.5	none
27	10% (w/v) PEG-3000	cacodylate pH 6.5	MgCl ₂
28	20% (w/v) PEG-8000	MES pH 6.0	Ca(OAc) ₂
29	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄	CHES pH 9.5	NaCl
30	20% (v/v) 1,4-butanediol	imidazole pH 8.0	Zn(OAc) ₂
31	1.0 M sodium citrate	Tris pH 7.0	NaCl
32	20% (w/v) PEG-1000	Tris pH 8.5	none
33	1.0 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	citrate pH 5.5	NaCl
34	10% (w/v) PEG-8000	imidazole pH 8.0	none
35	0.8 M NaH ₂ PO ₄ /1.2 M K ₂ HPO ₄	acetate pH 4.5	none
36	10% (w/v) PEG-3000	phosphate-citrate pH 4.2	NaCl
37	1.0 M K/Na tartrate	Tris pH 7.0	Li ₂ SO ₄
38	2.5 M NaCl	acetate pH 4.5	Li ₂ SO ₄
39	20% (w/v) PEG-8000	CAPS pH 10.5	NaCl
40	20% (w/v) PEG-3000	imidazole pH 8.0	Zn(OAc) ₂
41	2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄	Tris pH 7.0	Li ₂ SO ₄
42	30% (v/v) PEG-400	HEPES pH 7.5	NaCl
43	10% (w/v) PEG-8000	Tris pH 7.0	MgCl ₂
44	20% (w/v) PEG-1000	cacodylate pH 6.5	MgCl ₂
45	1.26 M (NH ₄) ₂ SO ₄	MES pH 6.0	none
46	1.0 M (NH ₄) ₂ HPO ₄	imidazole pH 8.0	NaCl
47	2.5 M NaCl	imidazole pH 8.0	Zn(OAc) ₂
48	1.0 M K/Na tartrate	MES pH 6.0	none

4. Literatur

4.1 Literatur

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (1989) *Molecular Biology of The Cell*. 2nd Edt. Garland Publishing, New York

Ausubel, F.M., Brent, A., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols im Molecular Biology*. Vol 1-Vol 4 Wiley & Sons, New York

Berra, E., Municio, M.M., Sanz, L., Frutos, S., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J. (1997) Positioning Atypical Protein Kinase C Isoforms in the UV-Induced Apoptotic Signaling Cascade. *Mol. Cell. Biol.* 17(8), 4346-4354

Boghaert, E.R., Sells, S.F., Walid, A.J., Malone, P., Williams, N.M., Weinstein, M.H., Strange, R. and Rangnekar, V.M. (1997) Immunohistochemical analysis of the Proapoptotic Protein Par-4 in Normal Rat Tissues. *Cell Growth Differ.* 8(8), 881-890

Boosen, M. (2005). Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

Boehrer, S., Chow, K. U., Beske, F., Kukoc-Zivojnov, N., Puccetti, E., Ruthardt, M., Baum, C., Rangnekar, V. M., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Weidmann, E. (2002). In lymphatic cells par-4 sensitizes to apoptosis by down-regulating bcl-2 and promoting disruption of mitochondrial membrane potential and caspase activation. *Cancer Res.* 62, 1768-1775.

Camandola, S. and Mattson, M.P. (2000) Pro-apoptotic Action of PAR-4 involves Inhibition of NF-Kappa B Activity and Suppression of BCL-2 Expression. *J. Neurosci. Res.* 61(2), 134-139

Chakraborty, M., Qiu, S. G., Vasudevan, K. M., Rangnekar, V. M. (2001). Par-4 drives trafficking and activation of Fas and FasL to induce prostate cancer cell apoptosis and tumor regression. *Cancer Res.* **61**, 7255-7263.

Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R., Lopez-

Berestein, G. (2003). Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 19995-20005.

Cohen, O., Feinstein, E., Kimchi, A. (1997). DAP-Kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death inducing functions that depend on its catalytic activity. *EMBO J.* **16**, 998-1008.

Cook, J., Krishnan, S., Ananth, S., Sells, S. F., Shi, Y., Walther, M. M., Linehan, W. M., Sukhatme, V. P., Weinstein, M. H., Rangnekar, V. M. (1999). Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. *Oncogene* **18**, 1205-1208.

Diaz-Meco, M.T., Municio, M.M., Fruto, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. and Moscat, J. (1996) The Produkt of Par-4, a Gene Induced during Apoptosis, Interacts Selectively with the Atypical Isoforms of Protein Kinase C. *Cell* **86**(5), 777-786

Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang. (2000) X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome-c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42

Duan, W., Zhang, Z., Gash, D.M. and Mattson, M.P. (1999) Participation of Prostate Apoptosis Response-4 in Degeneration of Dopaminergic Neurons in Models of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **46**(4), 587-597

Eidhoff, U. (2000) Dissertation, Heterologe Expression, Kristallisation und Untersuchungen zur Struktur von Bos taurus β -Arrestin und Rattus norvegicus PAR-4

Erhard, E. and Hollenberg, C.P. (1983) The Presence of a Defective LEU 2 Gene on 2 μ DNA Recombinant Plasmids in *Saccharomyces cerevisiae* is Responsible for Curing and High Copy Number. *J. Bacteriol.* 156, 625-635

Gan Y, Taira E, Irie Y, Fujimoto T, Miki N. (2003) Arrest of cell cycle by amida which phosphorylated by Cdc-2 kinase. *Mol Cell Biochem.* Apr;246(1-2):179-85

Groberg, J. and Dunn, J.J. (1988) OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170,1245-1253

Guo, Q., Fu, W., Xie, J., Luo, H., Sells, S.F., Geddes, J.W., Bondada, V., Rangnekar, V.M. and Mattson, M.P. (1998) Par-4 is a Mediator of Neuronal Degeneration Associated with the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Nat. Med.* 4(8), 957-962

Hengartner Michael O. Cold Spring Harbor Laboratory, 1 Bungtown Road, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA (Nature, October 2000)

Irie, Y., Yamagata, K., Gan, Y., Miyamoto, K., Do, E., Kuo, C., Taira, E., Miki, N. (2000).Molecular cloning and characterisation of Amida, a novel protein which interacts with a neuron-specific immediate early gene product Arc, contains novel nuclear localization signals, and causes cell death in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 2647-2653.

Jancarik, J. and Kim, S.H. (1991) *J. Appl. Cryst.* 24, 409-411

Jeong, E.-J., Bang, S.H., Lee, T.H., In Park, Y., Sim, W.-S. and Kim, K.-S. (1999) The Solution Structure of FADD Death Domain. *J. Biol. Chem.* 274, 16337-16342

Johnstone, R.W., See, R.H., Sells, S.F., Wang, J., Muthukkumar, S., Englert, C., Haber, D.A., Licht, J.D., Sugrue, S.P., Roberts, T., Rangnekar, V.M. and Shi, Y. (1996) A Novel Repressor, Par-4, Modulates Transcription and Growth Suppression Functions of the Wilms' Tumor. *Mol. Cell. Biol.* 16(12), 6945-6956

Kawai T., Matsumo M., Takeda K., Sanjo H. and Akira S. (1998) ZIP kinase, a novel serin/threonin kinase which mediates apoptosis. *Mol Cell Biol* 18:1642-1651

Kerr J.F.R. (1972) Wyllie A.H., Currie A.R., Br. J. Cancer Research 26, 239.

Kim, J., Lee, K. and Pelletier, J. (1998) The DNA Binding Domains of the WT1 Tumor Suppressor Gene Product and Chimeric EWS/WT1 Oncoprotein are Functionally Distinct. *Oncogene* 16(8), 1021-1030

Krug HF. (Nachrichten 2001) ITG Institut für Toxikologie und Genetik Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft

Kögel, D., Plöttner, O., Landsberg, G., Christian, S., Scheidtmann, K. H. (1998). Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* 17, 249-256.

Kögel, D., Bierbaum, H., Preuss, U., Scheidtmann, K. H. (1999). C-terminal truncation of Dlk/ZIP kinase leads to abrogation of nuclear transport and high apoptotic activity. *Oncogene* 18, 7212-7218.

Leroy I, de Thonel A, Laurent G, Quillet-Mary A. (2005) Protein kinase C zeta associates with death inducing signaling complex and regulates Fas ligand-induced apoptosis. *Cell Signal.* Sep;17(9):1149-57.

Lucas, T., Pratscher, B., Krishnan, S., Fink, D., Gunsberg, P., Wolschek, M., Wachek, V., Muster, T., Romirer, I., Wolff, K., Pehamberger, H., Eichler, H. G., Rangnekar, V. M., Jansen, B. (2001). Differential expression levels of Par-4 in melanoma. *Melanoma Res.* 11, 379-383.

Macreadie, I.G., Jagadish, M.N., Azad, A.A., Vaughan, P.R. (1989) Versatile Cassettes Designed for the Copper Inducible Expression of Foreign Genes in Yeast. *Plasmid* 21, 147-150

Mattson, M.P. and Goodman Y. (1995) Different Amyloid Peptides Share a Similar Mechanism of Neurotoxicity Involving Reactive Oxygen Species and Calcium. *Brain. Res.* 676, 219-224

Mattson, M.P., Duan, W., Chan, S.L. and Camandola, S. (1999) Par-4: An Emerging Pivotal Player in Neuronal Apoptosis and Neurodegenerative Disorders. *J. Mol. Neuroscience* 13, 17-28

Mitraki, A. and King, J. (1998) Purification of Calf Prochymosin (prorennin) Synthesized in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* 2, 800-804

Page, G., Kögel, D., Rangnekar, V. M., Scheidtmann, K. H. (1999a). Interaction partners of Dlk/ZIP kinase: co-expression of Dlk/ZIP kinase and Par-4 results in cytoplasmic retention and apoptosis. *Oncogene* 18, 7265-7273.

Page, G., Lödige, I., Kögel, D., Scheidtmann, K. H. (1999b). AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS letters* 462, 187-191.

Page, G. (2000) Identifizierung von Interaktionspartnern der Dlk-Kinase mit dem Hefe-Two Hybrid-System. Dissertation Uni-Bonn

Page, G., Kögel, D., Rangnekar, V. and Scheidtmann, K.H. (1999) Interaction Partners of Dlk/ZIP Kinase: Coexpression of Dlk/ZIP Kinase and Par-4 Results in Cytoplasmic Retention and Apoptosis. *Oncogene* 18, 7265-7273

Qing Guo, Weiming Fu, Jun Xie, Hong Luo, Stephen F.Sells, J.W. Geddes, Vimala Bondada, Vivek M. Rangnekar & Mark P. Mattson (1998) Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease.

Qiu, S.G., Krishnan, S., el-Guendy, N. and Rangnekar, V.M. (1999) Negative Regulation of Par-4 by Oncogenic Ras is Essential for Cellular Transformation. *Oncogene* 18(50), 7115-7123

Rangnekar, V.M. (1998) Apoptosis Mediated by a Novel Leucine Zipper Protein Par-4. *Apoptosis* 3, 61-66

Richard, D.J.; Schumacher, V.; Royer-Pokora, B. and Roberts, S. G. E. (2001) Par-4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev.* 15: 328-339

Roussigne, M., Cayrol, C., Clouaire, T., Amalric, F., Girard, J.-P. (2003). THAP1 is a nuclear proapoptotic factor that links prostate-apoptosis-response-4 (Par-4) to PML nuclear bodies. *Oncogene* 22, 2432-2442.

Sanchez, P., De Carcer, G., Sandoval, I.V., Moscat, J. and Diaz-Meco, M.T. (1998) Localization of Atypical protein Kinase C Isoforms into Lysosome-targeted Endosomes Interaction with p62. *Mol. Cell. Bio.* 18(5) 3069-3080

Sang Ki Park, Minh Dang Nguyen, André Fischer, Margaret Po-Shan Luke, El Bachir Affar, Paul Brian Dieffenbach, Huang-Chun Tseng, Yang Shi and Li-Huei Tsai. (2005) Par-4 links dopamine signaling and depression. *Cell* July 29;122(2):275-87

Scholten, J. (2004). Molekulargenetische und zellbiologische Untersuchung des Par-4-Interaktionspartners Amida. Diplomarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Seeler J.S. and Dejean A. (1999) The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:362-367

Sells, S.F., Wood, D.P. Jr., Joshi-Barve, S.S., Muthukumar, S., Jakob, R.J., Crist, S.A., Humphreys, S. and Rangnekar, V.M. (1994) Commonality of the Gene Programs Induced by Effectors of Apoptosis in Androgen-dependent and -independent Prostate Cells. *Cell Growth Differ.* 5, 457-466

Verhagen, A. M. Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., Vaux, D. L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43–53.

Vetterkind, S., Illenberger, S., Kubicek, J., Boosen, M., Appel, S., Scheidtmann, K. H., Preuss, U. (2005b). Binding of Par-4 to the actin cytoskeleton is essential for Par-4/Dlk-mediated apoptosis. *Exp. Cell Res.*,

Vetterkind, S., Boosen, M., Scheidtmann, K. H., Preuss, U. (2005a). Ectopic Expression of Par-4 leads to induction of apoptosis in CNS tumor cell lines. *Int. J. Oncol.* **26**, 159-167.

Wang Z.G., Ruggero D., Ronchetti S., Zhong S., Gaboli M., Rivi R. and Pandolfi P. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathway. *Nat. Genet.* 20:266-272

Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Johnson-Browne, B. and Vaillancourt, P. (1994) *Strategies* 7(2) 41-43

Zhou, P., Chou, J., Olea, R.S., Yuan, J. and Wagner, G. (1999) Solution Structure of Apaf-1, CARD and its Interaction with Caspase-9 CARD: A Structural Basis for Specific Adaptor/Caspase Interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11265-11270

5. Anhang

5.1 Sequenz von *Rattus norvegicus* PAR-4

1/1
 ATG GCG ACC GGC GGC TAT CGG AGC AGC GGC AGC ACC ACG GAC TTC CTG GAG GAG TGG AAA
 Met ala thr gly gly tyr arg ser ser gly ser thr thr asp phe leu glu glu trp lys

31/11
 AGC GGC AGC ACC ACG GAC TTC CTG GAG GAG TGG AAA
 ser gly ser thr thr asp phe leu glu glu trp lys

61/21
 GCG AAG CGC GAG AAG ATG CGC GCC AAG CAG AAC CCC GTG GGC CCG GGT TCG AGC GGC GGG
 ala lys arg glu lys met arg ala lys gln asn pro val gly pro gly ser ser gly gly

91/31
 AAG CAG AAC CCC GTG GGC CCG GGT TCG AGC GGC GGG
 lys gln asn pro val gly pro gly ser ser gly gly

121/41
 GAT CCA GCC GCC AAG TCC CCT GCG GGA CCG CTC GCC CAG ACT ACG GCC GCG GGG ACC TCG
 asp pro ala ala lys ser pro ala gly pro leu ala gln thr thr ala ala gly thr ser

151/51
 GGA CCG CTC GCC CAG ACT ACG GCC GCG GGG ACC TCG
 gly pro leu ala gln thr thr ala ala gly thr ser

181/61
 GAA CTC AAC CAC GGC CCC GCC GGC CGC GCC GCA CCT GCC GCC CCC GGG CCG GGC GCC CTG
 glu leu asn his gly pro ala gly ala ala ala pro ala ala pro gly pro gly ala leu

211/71
 CGC GCC GCA CCT GCC GCC CCC GGG CCG GGC GCC CTG
 ala ala ala pro ala ala pro gly pro gly ala leu

241/81
 AAC TGC GCT CAC GGC TCG TCC GCG CTG CCC CGC GGG GCT CCC GGC TCC CGG CGG CCG GAG
 asn cys ala his gly ser ser ala leu pro arg gly ala pro gly ser arg arg pro glu

271/91
 CGC GGG GCT CCC GGC TCC CGG CGG CCG GAG
 pro arg gly ala pro gly ser arg arg pro glu

301/101
 GAC GAG TGT CCT ATT GCC GCT GGG GCC GCG GGA GCA CCC GCG TCC CGG GGA GAC GAG GAG
 asp glu cys pro ile ala ala gly ala ala gly ala pro ala ser arg gly asp glu glu

331/111
 GCC GCG GGA GCA CCC GCG TCC CGG GGA GAC GAG GAG
 ala ala gly ala pro ala ser arg gly asp glu glu

361/121
 GAG CCG GAT AGC GCC CCG GAG AAG GGC CGC AGC TCG GGG CCC AGC GCC AGG AAA GGC AAA
 glu pro asp ser ala pro glu lys gly arg ser ser gly pro ser ala arg lys gly lys

391/131
 GGC CGC AGC TCG GGG CCC AGC GCC AGG AAA GGC AAA
 gly arg ser ser gly pro ser ala arg lys gly lys

421/141
 GGG CAG ATC GAG AAG AGG AAG CTG CGG GAG AAG CGC CGC TCC ACC GGC GTG GTC AAC ATC
 gly gln ile glu lys arg lys leu arg glu lys arg arg ser thr gly val val asn ile

451/151
 CGG GAG AAG CGC CGC TCC ACC GGC GTG GTC AAC ATC
 arg glu lys arg arg ser thr gly val val asn ile

481/161
 CCC GCG GCG GAG TGC TTA GAT GAG TAC GAA GAT GAC GAA GCA GGA CAG AAG GAA CGG AAG
 pro ala ala glu cys leu asp glu tyr glu asp asp glu ala gly gln lys glu arg lys

511/171
 TAC GAA GAT GAC GAA GCA GGA CAG AAG GAA CGG AAG
 tyr glu asp asp glu ala gly gln lys glu arg lys

541/181
 CGA GAG GAT GCT ATC ACA CAG CAG AAC ACC ATC CAG AAT GAA GCT GCG AGC CTC CCA GAT
 arg glu asp ala ile thr gln gln asn thr ile gln asn glu ala ala ser leu pro asp

571/191
 AAC ACC ATC CAG AAT GAA GCT GCG AGC CTC CCA GAT
 asn thr ile gln asn glu ala ala ser leu pro asp

601/201
 CCA GGA ACC TCC TAC CTG CCC CAG GAC CCG TCG AGA ACA GTC CCA GGC AGA TAC AAA AGC
 pro gly thr ser tyr leu pro gln asp pro ser arg thr val pro gly arg tyr lys ser

631/211
 GAC CCG TCG AGA ACA GTC CCA GGC AGA TAC AAA AGC
 asp pro ser arg thr val pro gly arg tyr lys ser

661/221
 ACA ATC AGT GCC CCA GAA GAA GAA ATC TTA AAT AGA TAT CCC CGA ACA GAT AGA AGT GGC
 thr ile ser ala pro glu glu glu ile leu asn arg tyr pro arg thr asp arg ser gly

691/231
 ATC TTA AAT AGA TAT CCC CGA ACA GAT AGA AGT GGC
 ile leu asn arg tyr pro arg thr asp arg ser gly

721/241
 TTC AGT AGA CAC AAC AGA GAT ACC AGT GCG CCT GCT AAC TTC GCT TCA AGT AGC ACC TTG
 phe ser arg his asn arg asp thr ser ala pro ala asn phe ala ser ser ser thr leu

751/251
 AGT GCG CCT GCT AAC TTC GCT TCA AGT AGC ACC TTG
 ser ala pro ala asn phe ala ser ser ser thr leu

781/261
 GAA AAG AGA ATT GAA GAT CTT GAG AAG GAA GTC TTG AGA GAA AGG CAA GAA AAC CTT CGA
 glu lys arg ile glu asp leu glu lys glu val leu arg glu arg gln glu asn leu arg

811/271
 AAG GAA GTC TTG AGA GAA AGG CAA GAA AAC CTT CGA
 lys glu val leu arg glu arg gln glu asn leu arg

841/281
 CTT ACG AGG CTG ATG CAA GAT AAA GAA GAA ATG ATT GGA AAA CTC AAG GAA GAG ATT GAT
 leu thr arg leu met gln asp lys glu glu met ile gly lys leu lys glu glu ile asp

871/291
 GAA GAA ATG ATT GGA AAA CTC AAG GAA GAG ATT GAT
 glu glu met ile gly lys leu lys glu glu ile asp

901/301
 TTG TTA AAT AGA GAC CTC GAT GAC ATG GAA GAC GAA AAC GAG CAA CTA AAG CAG GAA AAT
 leu leu asn arg asp leu asp asp met glu asp glu asn glu gln leu lys gln glu asn

931/311
 ATG GAA GAC GAA AAC GAG CAA CTA AAG CAG GAA AAT
 met glu asp glu asn glu gln leu lys gln glu asn

961/321
 AAA ACT CTT TTG AAA GTT GTT GGG CAG CTG ACA AGG TAG
 lys thr leu leu lys val val gly gln leu thr arg AMB

991/331
 CAG CTG ACA AGG TAG
 gln leu thr arg AMB

5.2 Sequenz von *Rattus norvegicus* Amida

1/1

atggagttggaacagagagaagggaccatggcagccgtgggctttgaagagttctcagcg
MetGluLeuGluGlnArgGluGlyThrMetAlaAlaValGlyPheGluGluPheSerAla

ccaccaggctcagagctggctctgcctcccttgtttggggccacatcctagaaagtgag
ProProGlySerGluLeuAlaLeuProProLeuPheGlyGlyHisIleLeuGluSerGlu

ctagagacagaagtggaatttgtgtccgggtggtctgggcgattcaggactccgggagcgg
LeuGluThrGluValGluPheValSerGlyGlyLeuGlyAspSerGlyLeuArgGluArg

gatgaagaggaagaggcagcccggggtcgaggcgtcgccaacgggaattaaaccgtaga
AspGluGluGluGluAlaAlaArgGlyArgArgArgGlnArgGluLeuAsnArgArg

aagtaccaggcactaggtcggcgctgccgggagatcgagcaggtgaatgagcgagtctta
LysTyrGlnAlaLeuGlyArgArgCysArgGluIleGluGlnValAsnGluArgValLeu

aacaggctccatcaggtgcaaaggataactcggagactccagcaggagcgcagattcctc
AsnArgLeuHisGlnValGlnArgIleThrArgArgLeuGlnGlnGluArgArgPheLeu

atgcgagtgctggactcatcggggatgactaccgggatagccagttcaccattgtgttg
MetArgValLeuAspSerTyrGlyAspAspTyrArgAspSerGlnPheThrIleValLeu

gaggatgatggcagccaaggcactgatgtccctaccccaggcaatggtgagaatgaacct
GluAspAspGlySerGlnGlyThrAspValProThrProGlyAsnValGluAsnGluPro

ccagagaaagagggactttccccaccacaaaggacaactgcaaccctagaccccagcagc
ProGluLysGluGlyLeuSerProProGlnArgThrThrAlaThrLeuAspProSerSer

ccagcccctggcgagggggccagtgggcggaagagggcggcgggcaccacgagcagcatct
ProAlaProGlyGluGlyProSerGlyArgLysArgArgAlaProArgAlaAlaSer

tcattgactccagaactggccccagtgccaggtgggagccgagggctggggccaaggcgtg
SerLeuThrProGluLeuAlaProValGlnValGlyAlaGluGlyTrpGlyGlnGlyVal

attaaggtcgaggaagactttggctttgaagcagatgaggccttgattcaagttggggtt
IleLysValGluGluAspPheGlyPheGluAlaAspGluAlaLeuAspSerSerTrpVal

260/260

tcccagggccagacaaattgctaccctaccctaccctagctagcccaccctttgactaa
SerArgGlyProAspLysLeuLeuProTyrProThrLeuAlaSerProProPheAspAMB

5.3 Sequenz von *Rattus norvegicus* DLK

1/1

Atgtccacggttcaggcaggaggacggtgaggaccattatgagatgggagaggagcttggc
MetSerThrPheArgGlnGluAspValGluAspHisTyrGluMetGlyGluGluLeuGly

agcggccagttcgccatcgtgcgcaagtgccagcagaagggcaccggcatggagtacgcg
SerGlyGlnPheAlaIleValArgLysCysGlnGlnLysGlyThrGlyMetGluTyrAla

gccaaagttcataaagaagcggcgctgccgtccagccggcgcggtgtgagccgtgaggag
AlaLysPheIleLysLysArgArgLeuProSerSerArgArgGlyValSerArgGluGlu

atcgagcgcgaggtgagcatcctgcgcgagatccgccaccccaacatcatcacgctgcac
IleGluArgGluValSerIleLeuArgGluIleArgHisProAsnIleIleThrLeuHis

gatgtgttcgagaacaagacagatgtggtgctgatcttggagctggtgtccggcggcgaa
AspValPheGluAsnLysThrAspValValLeuIleLeuGluLeuValSerGlyGlyGlu

cttttcgactttctggctgagaaggagtcactgacagaggatgaggccacgcagttcctc
LeuPheAspPheLeuAlaGluLysGluSerLeuThrGluAspGluAlaThrGlnPheLeu

aagcagatcctggacgggtgtccactacctgcactccaagcgcacgcgactttgacctg
LysGlnIleLeuAspGlyValHisTyrLeuHisSerLysArgIleAlaHisPheAspLeu

aagccggagaacatcatggttgctggacaagcatgcagccagcccacgcattaagctcatc
LysProGluAsnIleMetLeuLeuAspLysHisAlaAlaSerProArgIleLysLeuIle

gactttggcatcgcgcacaggatcgaggccggtagcgagttcaagaacatctttggcagc
AspPheGlyIleAlaHisArgIleGluAlaGlySerGluPheLysAsnIlePheGlyThr

ccagagttcgtcgcccctgagattgtaaactatgaaccacttggttggagctgatatg
ProGluPheValAlaProGluIleValAsnTyrGluProLeuGlyLeuGluAlaAspMet

tggagcatcggcgtcatcacctacatcctcctgagcggggcttccccattcctgggggag
TrpSerIleGlyValIleThrTyrIleLeuLeuSerGlyAlaSerProPheLeuGlyGlu

accaagcaggaaacgctgacaaacatctcggctgtgaactatgactttgatgaagagtac
ThrLysGlnGluThrLeuThrAsnIleSerAlaValAsnTyrAspPheAspGluGluTyr

ttcagcagcaccagtgaaactggccaaggacttcatccgaaggctgctgggtcaaagatccc
PheSerSerThrSerGluLeuAlaLysAspPheIleArgArgLeuLeuValLysAspPro

aagaggaggatgaccatcgcacagagcctggagcattcctggatcaaggttcgccggcgt
LysArgArgMetThrIleAlaGlnSerLeuGluHisSerTrpIleLysValArgArgArg

gaggacggcgcccgggaagccagagcgcagcgcgactgcgcgcgggcgcgctgcgcgagtac
GluAspGlyAlaArgLysProGluArgArgArgLeuArgAlaAlaArgLeuArgGluTyr

agtctcaagtgcgactcaagcatgccgcgaaacacgagctacgccagcttcgagcgcttc
SerLeuLysSerHisSerSerMetProArgAsnThrSerTyrAlaSerPheGluArgPhe

tcgcgcggtgctggaggacgtggcggcggcggagcaggggctgcgcgagctgcagcggggc
SerArgValLeuGluAspValAlaAlaAlaGluGlnGlyLeuArgGluLeuGlnArgGly

cggcggcagtgccgggagcgcgtgtgcgcgctgcgcggtggctgcggaacagcgggaggcg
ArgArgGlnCysArgGluArgValCysAlaLeuArgValAlaAlaGluGlnArgGluAla

cgctgccgcgacgggagcgcgggctaggccgcgacctgcgacgcctgcgcacggagctg
ArgCysArgAspGlySerAlaGlyLeuGlyArgAspLeuArgArgLeuArgThrGluLeu

ggtcgcaccgaggctctgcgcacgcgcgcgcaggaggaggcacgggcagcgctcttgggc
GlyArgThrGluAlaLeuArgThrArgAlaGlnGluGluAlaArgAlaAlaLeuLeuGly

gctggtggcctgaaacgtcgctgtgtgccttgagaaccgctacgacgcgctagccgca
AlaGlyGlyLeuLysArgArgLeuCysArgLeuGluAsnArgTyrAspAlaLeuAlaAla

caggtggctgctgaggtgcagttcgtgcgcgatctggtacgcgcgctggagcaggagcgg
GlnValAlaAlaGluValGlnPheValArgAspLeuValArgAlaLeuGluGlnGluArg

499/499

ctgcaggccgagtgccggcgtgcgctaa
LeuGlnAlaGluCysGlyValArgAMB

5.4 Abkürzungen

Δ	Deletion
A	Adenosin, Ampere
Å	Angström
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Da	Dalton
DD	Death Domain
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTPs	Desoxy-Nukleosid Triphosphat
EDTA	N, N-Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(b-Aminoethylether) N', N', N', N' Tetraessigsäure
Ex	Expressionsvektor
g	Gramm, Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
h.	Stunde
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxysäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
i.A.	im Allgemeinen
IMAC	Immobilised Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl b-D-Thiogalaktosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
reinst.	reinstes
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat

sek	Sekunde
t	Stunden
T	Thymidin, Transducin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween	20 Polyoxybenzethylensorbitanmonolaureat
U Unit	($\mu\text{mol Substrat min}^{-1} \text{mg Protein}$)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
w/v	Masse pro Volumen
YGSC	Yeast Genetics Stock Center
YNB	Yeast Nitrogen Base (Hefe Stickstoffbase)
YP	Yeast Pepton

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