



Institut für Biologische Informationsverarbeitung 2

***Interaktionsbereiche von Arrestin
zu licht-aktiviertem P-Rhodopsin***

Darko Škegro

***Interaktionsbereiche von Arrestin
zu licht-aktiviertem P-Rhodopsin***

Darko Škegro

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 4209

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung 2 Jül-4209

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2004)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Interaktionsbereiche von Arrestin zu licht-aktiviertem P-Rhodopsin

Darko Skegro

Institut für Biologische Strukturforschung (IBI-2); Forschungszentrum Jülich

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Der Photorezeptor Rhodopsin

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

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

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

1.3. Die Signaltransduktion des Sehvorgangs

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

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

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Zubehör

Agarosegelelektrophorese

Power Pack P25, Biometra, Göttingen

Laufkammer Bio Max (QS710), Kodak,

Laufkammer GMA 200, Pharmacia, Uppsala, Schweden

DNA-Sequenzierung

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

Geldokumentationssystem

Gel Doc 1000, Molecular Analyst, BioRad, München

pH-Meter

pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin

mit pH-Elektrode von Schott Geräte, Hofheim a. Ts.

Photometer

UV-120-02, Shimadzu, Japan

UV-2101 PC, Shimadzu, Japan

UV-2401 PC, Shimadzu, Japan

Fermenter

Infors AG, Bottmingen, Schweiz

ÄKTA

Explorer, Amersham Biosciences

SDS-Gelelektrophorese

Power Supply EPS 3500, Pharmacia, Uppsala, Schweden

Model 1000/500 Power Supply, BioRad, München

Power Supply 2301 Macrodrive 1, LKB, Bromma, Schweden

Protean II xi Cell, BioRad, München

2050 Midget, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, U.S.A.

Ultraschallgeräte

Labsonic L mit Nadel 40TL, Braun, Melsungen

Ultraschallbad Transsonic Digital, Elma, Singen

UV-Tisch

TFL20M, Biometra, Göttingen

Mini-Transilluminator mit UV-Weißlicht-Konvertierungsplatte, BioRad, München

Zellaufschlußgeräte

French Press Hydraulikpresse, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.

French Press Zelle 40 K, SLM Aminco, Rochester, U.S.A.

Zentrifugen

Optima TL Ultrazentrifuge mit Rotor TLA 45, Beckman, Palo Alto, U.S.A.

Optima L-70K Ultrazentrifuge mit Rotor Ti70, Beckman, Palo Alto, U.S.A.

Amicon Mikrozentrifuge MC-13, Heraeus, Osterode

Zentrifuge 5414, Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Kühlzentrifuge Biofuge 13 R mit Rotor HFA 14.2, Heraeus, Osterode

Megafuge 1.0 R mit Rotor BS4402/A, Heraeus, Osterode

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

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

2.2. Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Reagenzien

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

Acrylamid-Bisacrylamid (Gel 30)	Roth
Agar	Difco, ICN
Agarose (Standard)	Sigma, Biozym
L-Alanin	Merck, Fluka
Ampicillin	Boehringer Mannheim
L-Arginin	Sigma
L-Asparagin	Sigma, Fluka
L-Asparaginsäure	Sigma
Bacto Pepton	Difco
Brain Heart Infusion (BHI) Broth	Difco

Material und Methoden

Brain Heart Infusion (BHI) Agar	Difco
Bromphenolblau	Bio-Rad
BSA	Serva
Calciumchlorid	Merck
Citronensäure	Merck
Complete™, EDTA-free	Boehringer Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
L-Cystein	Sigma, Merck
Desthiobiotin	Sigma
Dimethylformamid	Merck
DMSO	Merck
DTT	Merck
dNTPs	New England Biolabs
EDTA	Merck
Essigsäure	Riedel de Haen
Ethanol, absolut	Riedel de Haen
Ethanol, vergällt	Hoffmann
Ethidiumbromid	Sigma
D (+) Galaktose	Sigma, Aldrich
D (+) Glukose	Sigma
L-Glutamin	Sigma
L-Glutaminsäure	Sigma
GTP, Natriumsalz	Sigma
Glycerin	Sigma
L-Glycin	Sigma
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
HABA	Sigma
Harnstoff	Merck
HEPES	Sigma
Hefe-Extrakt (Yeast Extract)	Difco
L-Histidin	Sigma
Imidazol	Sigma
IPTG	Eurogentech
L-Isoleucin	Sigma

Material und Methoden

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

Material und Methoden

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

Enzyme

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

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

Filtereinheiten

- Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm PES, Nalgene, Rochester, U.S.A.
- Bottle Top Filter, 0,2 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.
- Bottle Top Filter, 0,45 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.
- Bottle Top Filter, PES 0,45 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.

Molekulargewichts-Standards für die Elektrophorese

Protein

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

DNA

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

Rotlichtquelle

Glühbirne PF712, Philips, Kassel

Säulenmaterialien für die Chromatographie

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

Ultrafiltrationseinheiten

Fugisep-Maxi 10.000, 30.000; Sevatec, Witten, Bodenheim
Fugisep-Midi 10.000, 30.000; Sevatec, Witten, Bodenheim
Fugisep-Mini 10.000, 30.000; Sevatec, Witten, Bodenheim
Ultra-15, -10; Amicon, Beverly, USA
Centricon-10, -30; Amicon, Beverly, USA
Microcon-10, -30; Amicon, Beverly, USA
Centriplus-10, -30; Amicon, Beverly, USA

2.3. Puffer, Lösungen und Medien

2.3.1. Puffer und Lösungen

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

Chromatographie

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

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

Agarosegelelektrophorese

Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ ml Ethidiumbromid
TAE: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA; pH 8,0
DNA-Probenpuffer: 50 % Saccharose, 1x TAE, 0,25 % Bromphenolblau
TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8,0
Trispuffer: 10 mM Tris; pH 8,5

Polyacrylamidgelelektrophorese

2x SDS-Probenpuffer:	124 mM Tris, 4 % (w/v) SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
5x Harnstoffprobenpuffer:	8 M Harnstoff, 0,2 M Tris/HCl, 2 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 M DTT
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS; pH 6,8
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS; pH 8,8
Laufpuffer:	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	0,05 % (w/v) Coomassie R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Ethanol
Entfärber:	10 % (v/v) Essigsäure

Protein

Rhodopsin-Puffer:	20 mM BTP: (1,3- Bis[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]- Propan, 130 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 ; pH 7,5
Arrestin-Puffer:	50 mM Kaliumphosphatpuffer; pH 8,0
Bat-Puffer:	200 mM NaCl, 10 mM Kaliumphosphat; pH 8,0

Herstellung transformationskompetenter Zellen

SOB (pro Liter):	20 g Trypton
	5,0 g Hefeextrakt
	0,6 g NaCl
	0,2 g KCl pH 6,8-7,0
vor Gebrauch 10 ml einer Lösung 1 M Magnesiumchlorid und 1 M Magnesiumsulfat zufügen	
TFB-I-Puffer:	30 mM NaAc
	50 mM MgCl_2
	100 mM NaCl
	10 mM CaCl_2
	15 % Glycerin; pH 6,0
TFB-II-Puffer:	10 mM MOPS
	75 mM CaCl_2
	10 mM NaCl
	15 % Glycerin; pH 7,0

Transformation von *S. cerevisiae*

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

Transformation von *H. salinarum*

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

Westernblotanalyse

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

2.3.2. Medien

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

Medienzusätze:

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

Bakterienmedien:

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

Halobakterienmedium:

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

Hefemedien:

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

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

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

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

2.3.3. Dokumentation der Ergebnisse

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

2.4. Organismen- und Wachstumsbedingungen

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

Escherichia coli

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

Saccharomyces cerevisiae

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

Halobacterium salinarum

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

2.4.2. Organismen

Verwendeter *Saccharomyces cerevisiae* Stamm und seine Eigenschaften:

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

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

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

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

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

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

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

2.6. Arbeiten mit DNA

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

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

2.6.1. Plasmide

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

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

2.6.2. Agarose-Gelelektrophorese

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

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

2.6.3. Enzymatische Reaktionen mit Nukleinsäuren

Restriktion:

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

Ligation:

Restriktionsverdaute DNA-Fragmente oder vorbehandelte PCR-Produkte wurden mit dem entsprechenden Plasmid mittels T4-DNA-Ligase (Fa. Promega) verknüpft.

Bei „*blunt-end*“-Klonierungen beträgt das molare Verhältnis von Insert zu Vektor-DNA 10:1 bis 20:1 und bei „*sticky-end*“-Klonierungen 3:1 bis 10:1.

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

2.6.4. Herstellung transformationskompetenter Zellen

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

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

5 bis 20 µl eines Ligationsansatzes bzw. 1 ng Plasmid-DNA werden zu 100 µl kompetenter Bakterien, die langsam auf Eis aufgetaut wurden, gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis erfolgt der Hitzeschock für 90 bis 120 s bei 42 °C. Nach weiteren zwei Minuten auf Eis wurden die Zellen in 1ml dYT-Medium bei 37°C für 45 bis 60 min geschüttelt um den Zellen die Möglichkeit zu geben, die neu erworbene Antibiotikaresistenz zu exprimieren. Anschließend wurden die Zellen auf entsprechenden Antibiotikanährböden ausgestrichen. Einzelkolonien werden in 3 ml Medium plus Antibiotikum angezüchtet. Die Präparation von Plasmid-DNA wird mittel QIA prep Spin Miniprep Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.6. Transformation von DNA in *S. cerevisiae*

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

2.6.7. Transformation von DNA in *H. salinarum*

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

2.6.8. PCR (Polymerase Ketten Reaktion)

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

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 MgCl_2 verwendet.

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

Standard-PCR:

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

Reaktionsbedingungen:

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

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

2.6.9. PCR-Primer

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

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

2.6.10. Sequenzierungsprimer

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

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

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

2.6.11. Mutageneseprimer

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

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

2.6.12. Reinigung von PCR- amplifizierten DNA-Fragmenten

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

2.6.13. DNA Sequenzierung

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

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

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

Denaturierung:	2 Minuten 94 °C
30 Zyklen:	40 Sekunden 94 °C
	40 Sekunden 50 °C
	60 Sekunden 70 °C

Bis zur manuellen Beendigung 4 °C

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

Sequenziergel:

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

nach Entgasen:

50 µl	TEMED
350 µl	10% APS

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

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

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

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

2.6.14.1. Klonierung in pYEX-GW

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

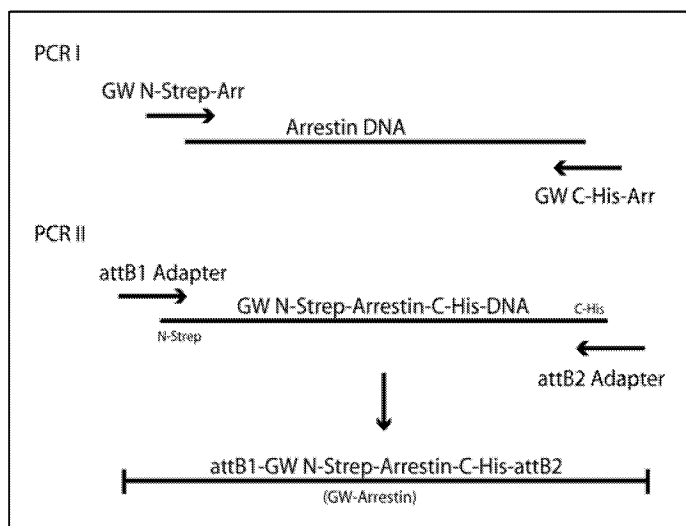


Abb. 2-1; PCR-Schema: Dargestellt sind die einzelnen Schritte der PCR, die zum PCR-Endprodukt GW-Arrrestin führt. Es handelt sich hier um eine Zwei-Stufen-PCR. Bei PCR I werden dem codierenden Arrestin-Gen N-terminal ein Strep-tag-II, sowie ein Teil des attB1 Adapters und C-terminal ein His-tag und ein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

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

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

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

2.6.14.2. Klonierung in pYEX-BX

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

Reaktionsansatz 1 (PCR I):

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

Reaktionsbedingungen:

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

attB Adapter PCR (PCR II):

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

Material und Methoden

Tag-Pwo-Pol: 0,5 µl
ad 100 µl H₂O

Reaktionsbedingungen:

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

BP-Reaktion:

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

LR-Reaktion:

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

2.7. Arbeiten mit Proteinen

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

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

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

Trenngel:

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

Sammelgel:

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

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

2.7.2. Färben von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen

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

2.7.3. Prinzip des Western-Blots

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

2.7.4. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

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

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

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

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

2.7.5. Immunochemische Detektion

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

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

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

2.7.6. Verwendete Antikörper und Konjugate

Tabelle 2-3: Konjugate und Antikörper

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

2.7.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.7.7.1. Methode nach Bradford

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

2.7.7.2. UV-Vis Spektroskopie

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

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

wobei c = Konzentration (mol/l)

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

d = Schichtdicke der Küvette

A = Absorption

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

2.8. Chromatographische Purifikation

2.8.1. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf dem folgenden Prinzip:

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

2.8.1.1. Proteinreinigung mit dem Strep-tag-II System

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

Das Strep-tag-II System nutzt die sehr hohe Affinität von StrepTactin zu dem Oktapeptid des Strep-tag-II, welches mittels molekularbiologischer Techniken N-terminal oder C-terminal an ein zu exprimierendes Protein angehängt werden kann. Ein entscheidender Vorteil gegenüber anderen affinitätschromatographischen Techniken besteht darin, dass die hier relevante Bindung biologischer Natur ist, was bedeutet, dass die gesamte Reinigung unter physiologischen und reduzierenden Bedingungen durchgeführt werden kann.

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

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

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

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

2.8.1.2. Proteinreinigung über immobilisierten Metallionen (IMAC)

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

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

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

2.8.2. Proteinreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

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

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

2.9. Modifikation von Proteinen

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

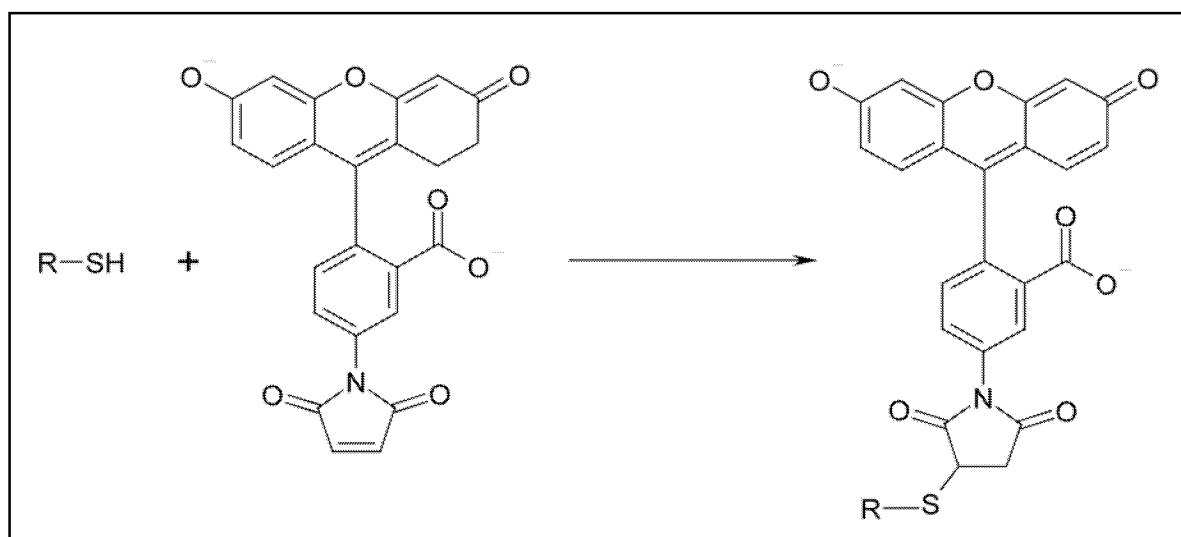


Abb. 2-2: Reaktion eines Maleimids (hier zum Beispiel Fluorescein-5-maleimid) mit einem Molekül, welches eine Sulfhydryl-Gruppe (wie zum Beispiel Cystein im Protein) enthält.

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

2.10. Spektroskopie

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

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

2.10.1. Zeitabhängige statische Lichtstreuung von Rhodopsin-Arrestin-Komplexen

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

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

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

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

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

- V ist das Volumen der Partikel

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

Es gelten hier folgende Vereinfachungen:

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

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

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

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

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

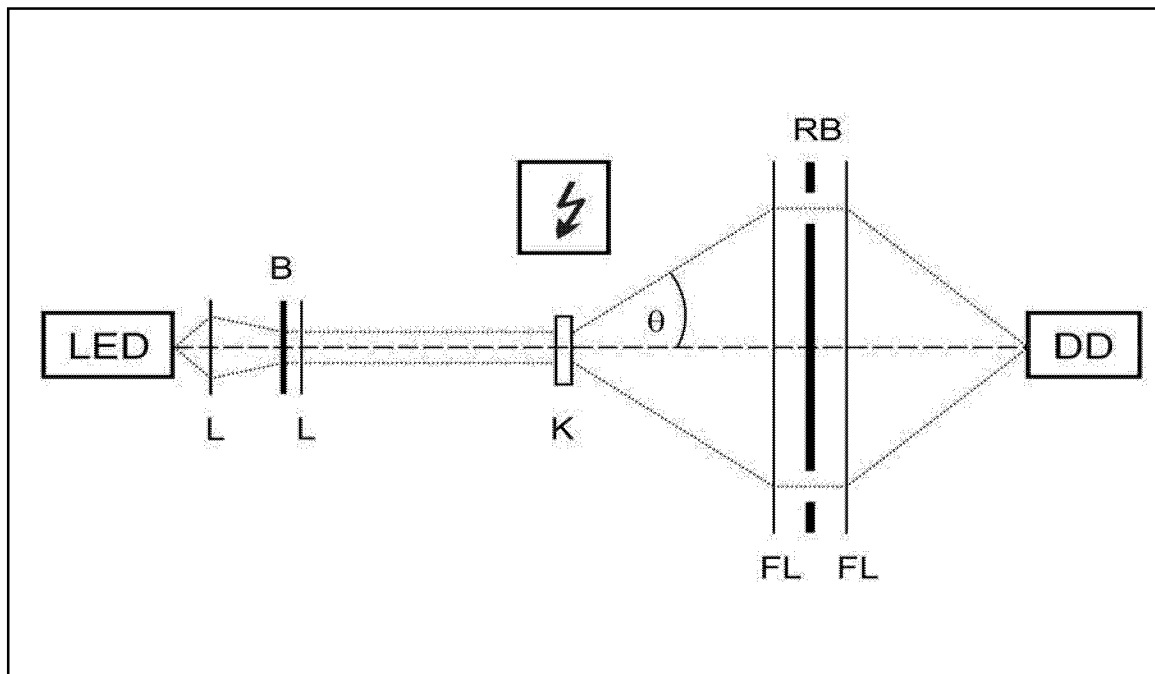


Abb. 2-3: Schematischer Aufbau der Lichtstreuapparatur: LED: Leuchtdiode, L: Linse, B: Blende, K: Küvette, FL: Fresnellinse, RB: Ringblende, DD: Detektor, θ : Streuwinkel (aus Heck et al., 2000; verändert).

Als Messlicht dient ein im nahen Infrarot emittierter Lichtstrahl (820 nm, Leuchtdiode: Hitachi HLP 60R), der mit Hilfe eines Linsensystems auf die Probe, in einer 10 mm Küvette, fokussiert wird. Das durch die Probe gestreute Licht wird mit einer Ringblende in einem Winkelbereich von 16° über Fresnellinsen auf den Detektor fokussiert. Die Signale werden durch einen nachgeschalteten Spannungsverstärker verstärkt, mit einem Digitaloszilloskop (Nicolet 4094C) aufgezeichnet, digital abgespeichert und mit den Programmen *Statgraphics Plus 5.0* und *Origin 6.1* visualisiert.

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

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

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

2.10.2. UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

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

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

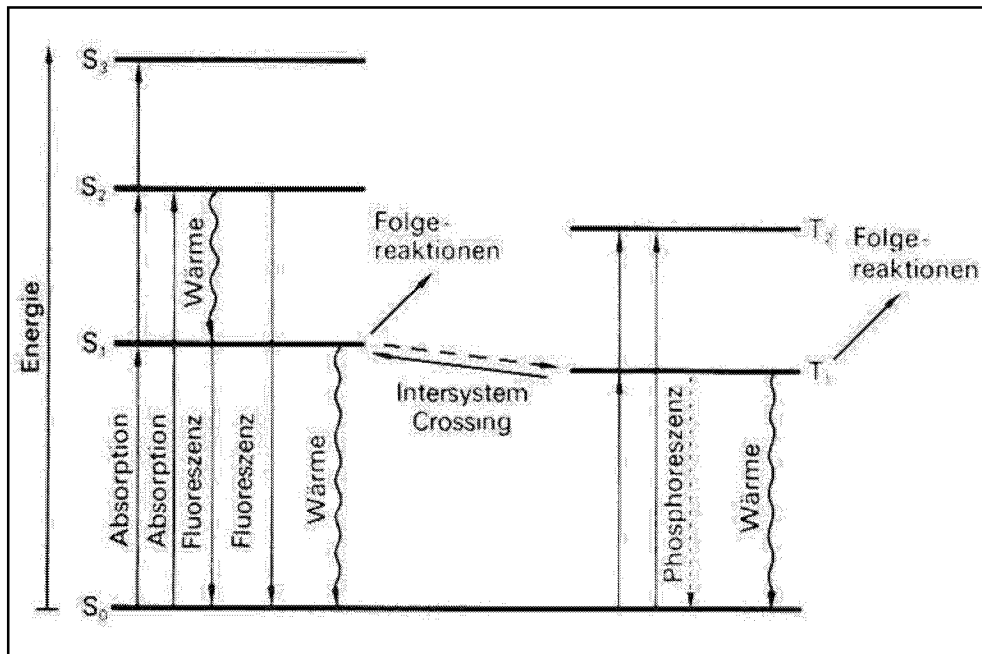


Abb. 2-4: Vereinfachtes Jablonski-Termschema

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

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

2.10.3. Fluoreszenzspektroskopie

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

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

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

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

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

2.10.4. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

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

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

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

3. Ergebnisse

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.4. Modifikation funktionaler Arrestine

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

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

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

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

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

3.4.1. Bestimmung des Markierungsgrads von Arrestin mit Fluoreszenz-maleimiden

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

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

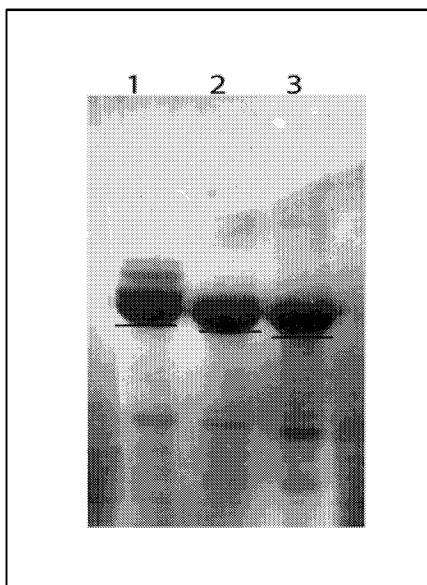


Abb. 3-5: Markierte und unmarkierte Proteinproben in einem mit Coomassie gefärbten 7,5 % SDS-Gel: Die Abbildung zeigt die unterschiedlichen Laufeigenschaften von Arrestin, am Beispiel von unmarkiertem und markiertem CA S60C/V244C **Spur 1:** CA S60C/V244C + A633; **Spur 2:** CA S60C/V244C + F-5-M; **Spur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

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

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

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

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

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Diffusionszeiten

4. Diskussion

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

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

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

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

al., 1988). Es sollte gewährleistet werden, dass nur die Zielamino­säure modifiziert wird. Es zeigte sich aber in Markierungsexperimenten (Diplomarbeit, 2001), dass alle drei wildtypischen Cysteine zugänglich waren. Hier wurde die Flexibilität der Arrestin-Struktur deutlich erkennbar. Es bestand deshalb die Notwendigkeit, die Cysteine 63, 126 und 143 gegen Aminosäuren auszutauschen, die keine Sulfhydrylgruppe besitzen und daher keine spezifischen Wechselwirkungen mit Maleinimiden eingehen können.

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

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

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

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

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

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

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

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

4.3. Modifikation interaktiver Arrestine

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

4.4. Bindungsstudien

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

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

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

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

5. Zusammenfassung

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

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

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

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

6. Bacterio-opsin activator (Bat)

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

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

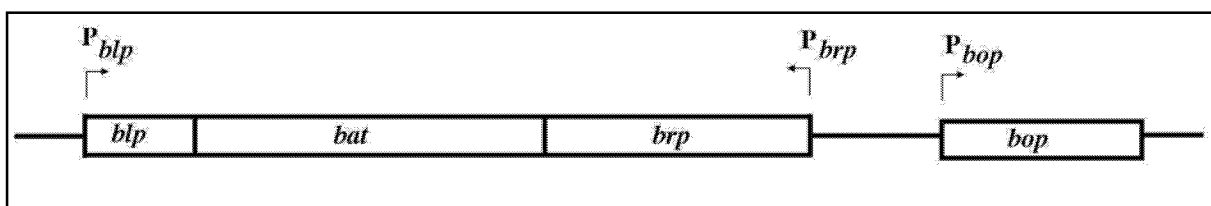


Abbildung 6-1: Mappe des *bop* Gen-Cluster. Dargestellt sind die relativen Größen und die Anordnung der vier Gene *blp*, *bat*, *brp* und *bop* in einem Gen-Cluster mit den Positionen der Promotoren (P). Die Orientierung der Promotoren ist schematisch durch Pfeile dargestellt (verändert aus Baliga, 2001).

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

Gesamtzellproteins betragen können (Fleer, 1992; De Baetselier et al., 1991). Eine präzise Regulation und Induktion der Expression wird durch IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid), einem nicht metabolisierbaren Substratanalogon der Lactose, ermöglicht. Die Verwendung der *E.coli*-B-Stämme hat gegenüber *E. coli* K zwei große Vorteile. Erstens können höhere Zelldichte erreicht werden und es fehlen die Proteasen Lon und OmpT, die in *E. coli* K zum cytosolischen Abbau rekombinanter Proteine bzw. zu einer Proteolyse während der Aufarbeitung führen können. *Bat* pET 27b #2 wurde in verschiedene BL 21 DE3 Expressionsstämme transformiert (siehe Kapitel 2.4.2.). Erste Studien zeigten, dass Bat in ausreichenden Mengen in allen *E. coli* B-Stämmen exprimiert wurde. Allerdings galt ein besonderes Interesse der Expression in pLysE. Die Zellen hatten nach der Expression in diesem *E. coli*-Stamm eine grüne Farbe, was auf einen eventuell vorhandenen Chromophor schließen ließ. Da das gewünschte Expressionsprodukt toxisch für die Zelle sein könnte, ist eine Überexpression in pLysE enthaltenen B-Stamm durchaus sinnvoll. Dieses Plasmid kodiert ein Lysozym, dass mit der T7-Polymerase assoziiert und deren Aktivität inhibiert. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Zellaufschluß durch die hohe Lysozymkonzentration bestenfalls durch einfaches Einfrieren und Auftauen der Zelle erfolgen kann.

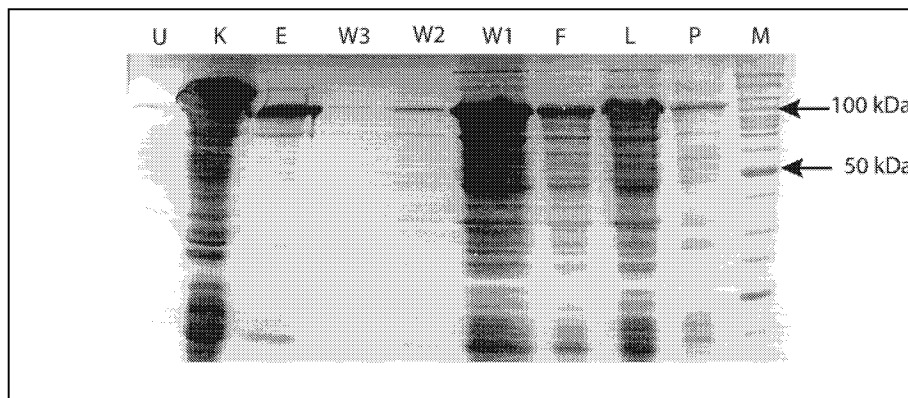


Abb. 6-3: Expression von Bat in *E.coli*: Strep-tag-II Reinigung (SDS-PAGE-Gel): ~ 1,5 g *E.coli* BL 21 (DE3) pLys E Zellen wurden in 30 ml Aufschlusspuffer (50mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer, pH 8,0 200mM NaCl; 1 Tablette Proteaseinhibitoren complete ohne EDTA, Aspartat-Protease 1:1000; 10 mM DDT) in der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

Die Fraktionen einer Reinigung über StrepTactin Sepharose nach einer *E. coli*-BL21(DE3)pLysE-Expression wurden zur Analyse in der SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 6-3). Die Expressionsbedingungen wurden mit 37°C, 130 Upm im Schüttler festgelegt. Nach Induktion mit 1 mM IPTG wurde die Expression nach 3 h gestoppt. 1 l der

Zellsuspension wurde pelletiert und in 30 ml Aufschlußpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in der French-Press aufgeschlossen und unlösliche von löslichen Bestandteilen mittels Zentrifugation getrennt. Nachdem das Pellet isoliert wurde, konnte der Überstand mittels StrepTactin Sepharose aufgearbeitet werden. Die Analyse zeigte, dass der lösliche Anteil des exprimierten Proteins nach Zellaufschluß bei ca. 80 % liegt (Vergleich: L und P). Allerdings überraschte es, dass Bat bei höheren Molekulargewichten (~100-110 kDa) lief (Spur L). Das kalkulierte Molekulargewicht von Bat liegt bei ~74 kDa, jedoch besitzt es einen niedrigen theoretischen pI von ~ 4, was das Laufverhalten des Proteins in der SDS-PAGE stark beeinflussen kann. Schon beim ersten Waschschrift wurde fast das ganze Protein von der Säule eluiert (Spur W1). Ein Teil des Proteins blieb jedoch haften. In den nachfolgenden Waschschriften wurde nur noch wenig Protein von der Säule gespült (Spuren W2 und W3). Die Reinigungseffizienz blieb jedoch niedrig, denn nach Konzentration (Spur K) der Eluate (Spur E) konnte man eine starke Verunreinigung durch andere Proteine und/oder durch Abbau von Bat feststellen. Veränderungen der Reinigungsbedingungen (Puffer, Ionenstärke, pH, Zusatz von Glycerin) brachten keinen nennenswerten Erfolg.

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

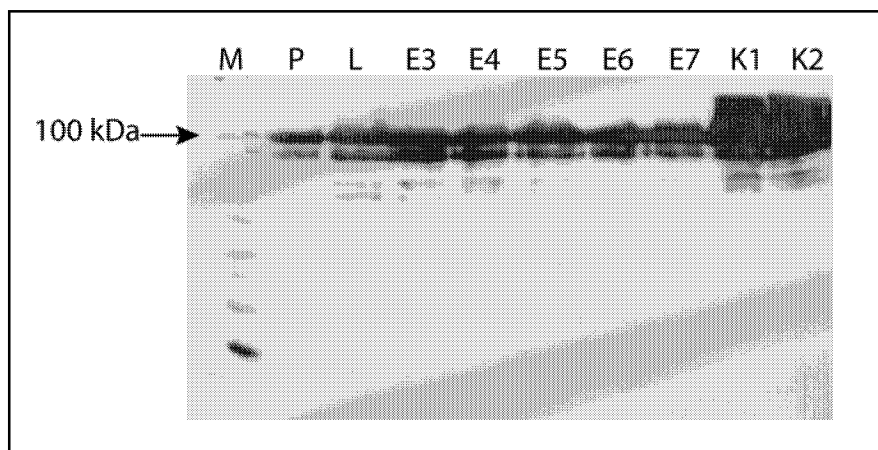


Abb. 6-4: Löslichkeit des exprimierten Bat: (Western Blot)

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

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

Insgesamt kann allerdings eine genaue Aussage über einen Co-Faktor nicht getroffen werden, da die signifikanten Banden im Absorptionsspektrum auch von einem Protein stammen können, welches durch Bat induziert wurde. Die Möglichkeit besteht, dass die Expression von Bat, aufgrund der transkriptionsregulierenden Eigenschaften, die Expression eines Häm-bindenden Proteins, wie z. B. Cytochrom, bewirkt. Um diese Hypothese auszuschliessen, ist die Etablierung eines effizienten Reinigungssystems deshalb unumgänglich.

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

Die Expression in *S. cerevisiae* war für verschiedene Arten von Protein, wie lösliche cytoplasmatische Proteine, integrale Membranproteine und sekretorische Proteine erfolgreich (Valenzuela et al., 1982; Dhanabal et al., 1999). Zu diesem Zweck wurde das *bat*-Gen in den *S. cerevisiae* Vektor pYEX-BX kloniert. Die kodierenden Sequenzen wurden aus dem Plasmid bat pBlunt #3 mit EcoRI herausgeschnitten und in das zuvor mit demselben Enzym geschnittene Plasmid pYEX-BX kloniert. Korrekte Klone, in denen die Insert-DNA in der richtigen Orientierung eingebaut wurde, wie Bat-pYEX-BX #, wurden anschließend in den *S. cerevisiae* Stamm F11 α transformiert. Eine ausreichende Expression in Hefe wurde allerdings nicht erreicht.

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

Homologe Expression von Bat in *H. salinarum* sollte gewährleisten, dass zum einen der native Chromophor der Zelle exprimiert wird und zum anderen, dass Mechanismen die für die Faltung und Rekonstitution mit dem Co-Faktor verantwortlich sind, zur Verfügung stehen. Für die homologe Expression von Bat wurde das Gen unter die Kontrolle des nativen Promotors des Bacterioopsingens (*bop*) gestellt. Das ~ 400 Bp lange Fragment des *bop* Promotors lag als BamHI/ NdeI Fragment in dem Vektor pBlunt (pblunt-bprom: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Schlesinger) vor. Der *bop* Promotor ist der stärkste Promotor der vier Rhodopsine (BR, HR, SR I, SR II) aus *H. salinarum* und wird in der späten logarithmischen Phase des Wachstums der Bakterien durch Sauerstoffmangel induziert (Yang und DasSarma, 1990; Shand und Betlach, 1991). Ziel der Verknüpfung des *bat*-Gens mit dem Promotor war, die Expression von Bat in *H. salinarum* zu erhöhen. Das *bat*-Gen aus bat-pBlunt-#3 wurde mit den Restriktionsendonukleasen NdeI/ HindIII

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

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

wäre hierbei Bat mit der DNA zu cokrystallisieren und die Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse zu lösen.

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

7. Literaturverzeichnis

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

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

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

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

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

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

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

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

- Steinberg, R.H., Fisher, S.K., Anderson, D.H.:** "Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors." J Comp Neurol 190, (1980) 501-508.
- Stryer L.:** "Biochemie." (1996) 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- Taylor & Zhulin:** "PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light." Microbiol Mol Biol Rev. 63(2) (1999):479-506.
- Vinos et al.:** "A G protein-coupled receptor phosphatase required for rhodopsin function." Science 1;277(5326) (1997):687-90.
- Vishnivetskiy, S. A. et al.:** "An additional phosphate-binding element in arrestin molecule - Implications for the mechanism of arrestin activation." Journal of Biological Chemistry 275.52 (2000) 41049-57.
- Vishnivetskiy, S. A. et al.:** "Transition of arrestin into the active receptor-binding state requires an extended interdomain hinge." Journal of Biological Chemistry 277.46 (2002): 43961-67.
- Vishnivetskiy, S. A. et al.:** "Mapping the arrestin-receptor interface - Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins." Journal of Biological Chemistry 279.2 (2004): 1262-68.
- Vishnivetskiy, S. K. et al.:** "How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin?" Journal of Biological Chemistry 274.17 (1999) 11451-54.
- Voss, S. & Skerra, A.:** Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. Protein Eng 10, (1997) 975-982.
- Wald, G. & Brown, P.K.:** "Human rhodopsin." Science 127, (1958) 222-226.
- Wald, G. & Brown, P.K.:** "The molar extinction of rhodopsin." J Gen Physiol 37, (1953) 189-200.
- Wald, G.:** "The molecular basis of visual excitation." Nature 219, (1968) 800-807.
- Weyand, I. & Kühn, H.:** Subspecies of arrestin from bovine retina. Equal functional binding to photoexcited rhodopsin but various isoelectric focusing phenotypes in individuals. Eur J Biochem 193, (1990) 459-467.
- Wilden, U.:** "Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding." Biochemistry 34, (1995) 1446-1454.
- Wilson & Copeland:** "Spectroscopic characterization of arrestin interactions with competitive ligands: study of heparin and phytic acid binding." J Protein Chem. 16(8) (1997):755-63.

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

8. Anhang

8.1. Aminosäuresequenz von Arrestin aus dem Rinderauge

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

```
1/1                                31/11
atg aag gcc aat aag ccc gca cca aac cac gtt atc ttc aag aag
atc tcc cgt gat aaa
Met lys ala asn lys pro ala pro asn his val ile phe lys lys
ile ser arg asp lys

61/21                              91/31
tcg gtg acc atc tac ctg ggg aag aga gat tac ata gac cac gtt
gaa cga gta gag cct
ser val thr ile tyr leu gly lys arg asp tyr ile asp his val
glu arg val glu pro

121/41                             151/51
gtg gat ggc gtc gtg ctg gtg gat cct gag ctc gtg aag ggc aag
aga gtg tac gtg tct
val asp gly val val leu val asp pro glu leu val lys gly lys
arg val tyr val ser

181/61                             211/71
ctg acg tgt gcc ttc cgc tac ggc cag gaa gac atc gac gtg atg
ggc ctc agc ttc cgc
leu thr cys ala phe arg tyr gly gln glu asp ile asp val met
gly leu ser phe arg

241/81                             271/91
agg gac ctc tac ttc tcc cag gtc cag gtg ttc cct ccc gtg ggg
gcc tcg ggc gcc acc
```

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

301/101

331/111

acg agg ctg cag gag **agc** ctc atc aag aag ctg ggg **gcc** aac acc
tac ccc ttc ctg ctc
thr arg leu gln glu **ser** leu ile lys lys leu gly **ala** asn thr
tyr pro phe leu leu

361/121

391/131

acg ttt **cct** gac tac ttg ccc **tgt** tcg gtg atg ctg cag cca gct
ccg caa gat gtg ggc
thr phe **pro** asp tyr leu pro **cys** ser val met leu gln pro ala
pro gln asp val gly

421/141

451/151

aag agc **tgt** ggg gtc gac ttt gag atc aaa gca ttc gcc acg cac
agc aca gat gtg gaa
lys ser **cys** gly val asp phe glu ile lys ala phe ala thr his
ser thr asp val glu

481/161

511/171

gag gac aaa att ccc aag aag agc **tcc** gtg cgt ttg ctg atc cgg
aag gta cag cac gcg
glu asp lys ile pro lys lys ser **ser** val arg leu leu ile arg
lys val gln his ala

541/181

571/191

cca cgc gat atg ggt ccc cag ccc cga gcc gag gcc tcc tgg cag
ttc ttc atg tcg gac
pro arg asp met gly pro gln pro arg ala glu ala ser trp gln
phe phe met ser asp

601/201

631/211

aag ccc ctg cgc ctc gcc gtc tcg ctc agc aaa gag atc tat tac
cac ggg gaa ccc att
lys pro leu arg leu ala val ser leu ser lys glu ile tyr tyr
his gly glu pro ile

661/221

691/231

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

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

721/241

751/251

gtg gag caa gtg acc aac gtg gtt ctc tac tcg agt gat tat tac
atc aag acg gtg gct
val glu gln val thr asn val val leu tyr ser ser asp tyr tyr
ile lys thr val ala

781/261

811/271

gcc gag gaa gca cag gaa aaa gtg ccg cca aac agc tcg ctg acc
aag acg ctg acg ctg
ala glu glu ala gln glu lys val pro pro asn ser ser leu thr
lys thr leu thr leu

841/281

871/291

gtg ccc ttg ctg gcc aac aac cgt gag aga agg ggc atc gcc ctg
gat ggg aaa atc aag
val pro leu leu ala asn asn arg glu arg arg gly ile ala leu
asp gly lys ile lys

901/301

931/311

cac gag gac acg aac ctg gcc tcc agc acc atc ata aag gag gga
ata gac aag acc gtc
his glu asp thr asn leu ala ser ser thr ile ile lys glu gly
ile asp lys thr val

961/321

991/331

atg ggg atc ctg gtg tct tac cag atc aag gtg aag ctc acg gtg
tca ggc ctt ctg gga
met gly ile leu val ser tyr gln ile lys val lys leu thr val
ser gly leu leu gly

1021/341

1051/351

gag ctc aca tcc agt gaa gtg gcc act gag gtg **ccg** ttc cgc ctc
atg cat ccc cag cca
glu leu thr ser ser glu val ala thr glu val **pro** phe arg leu
met his pro gln pro

1081/361

1111/371

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

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

1141/381

1171/391

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

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

1201/401

gct atg gat gag tga

ala met asp glu OPA

8.2. Aminosäuresequenz von Bat aus *H. salinarum*

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

1/1

31/11

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

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

61/21

91/31

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

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

121/41

151/51

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

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

181/61

211/71

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

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

241/81

271/91

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

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

301/101

331/111

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

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

361/121

391/131

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

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

421/141

451/151

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

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

481/161

511/171

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

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

541/181

571/191

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

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

601/201

631/211

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

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

661/221

691/231

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

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

721/241

751/251

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

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

781/261

811/271

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

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

841/281

871/291

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

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

901/301

931/311

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

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

961/321

991/331

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

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

1021/341

1051/351

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

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

1081/361

1111/371

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

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

1141/381

1171/391

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

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

1201/401

1231/411

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

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

1261/421

1291/431

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

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

1321/441

1351/451

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

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

1381/461

1411/471

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

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

1441/481

1471/491

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

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

1501/501

1531/511

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

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

1561/521

1591/531

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

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

1621/541

1651/551

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

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

1681/561

1711/571

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

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

1741/581

1771/591

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

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

1801/601

1831/611

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

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

1861/621

1891/631

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

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

1921/641

1951/651

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

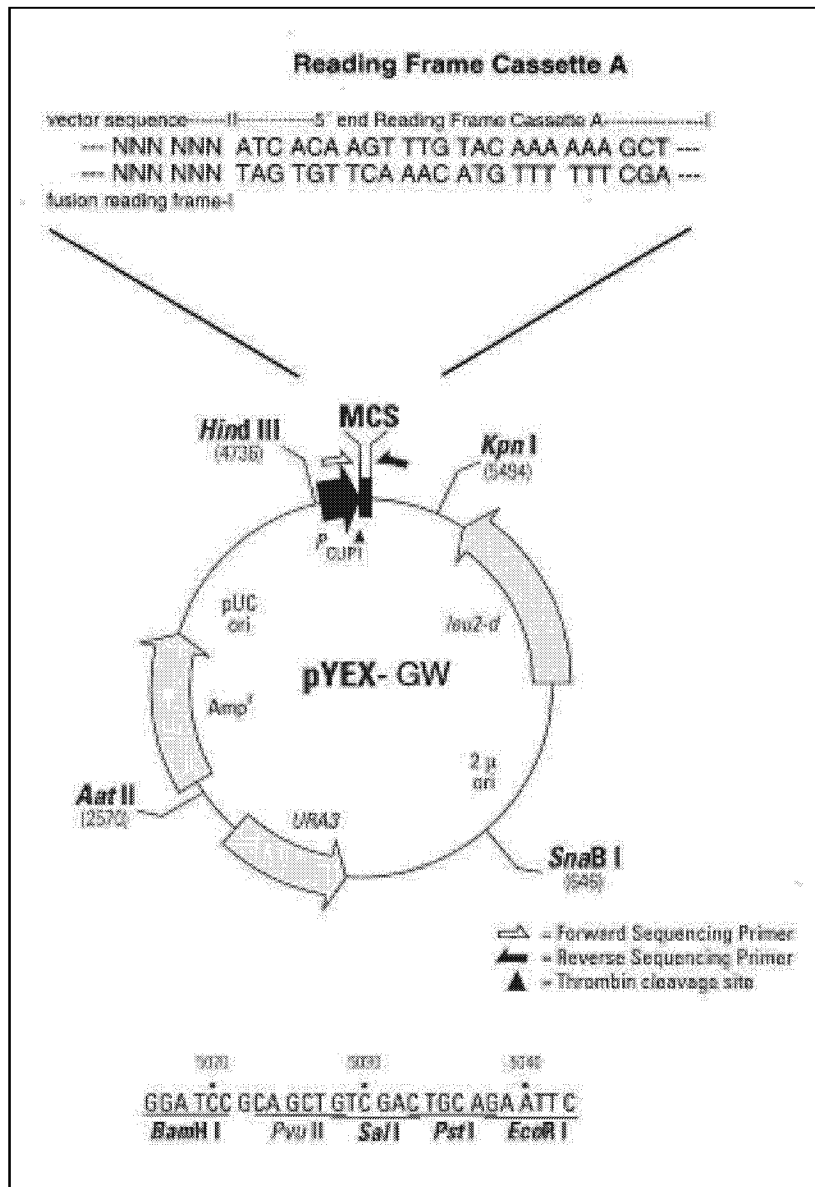
glu gly lys gln leu ala glu ser met asp ile val pro ser thr tyr
his gln his leu

1981/661

2011/671

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

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



8.4. Abkürzungen

3D	dreidimensional
48K	Arrestin
A	Adenosin
Å	Angström
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxy-Nukleosid Triphosphat
EDTA	N, N-Ethylendiamintetraacetat
E	Eluat
F	Durchfluss
g	Gramm
G	Guanosin
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GuCl	Guanidiniumhydrochlorid
h	Stunde
HABA	4-Hydroxybenzen-2-carboxysäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IMAC	Immobilised Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalaktosid
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter

LiAc	Lithiumacetat
L	Lysat
M	Molar
min	Minute
N-	Amino-
NADPH	Nikotinadenindinukleotidphosphat
NADH	Nikotinadenindinukleotid
OD _x	Optische Dichte bei x Nanometern
P	Pellet, unlösliche Fraktion
p44	Protein, Spleißvariante von Arrestin
pH	negativer dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
P-Rhodopsin	phosphoryliertes Rhodopsin im Grundzustand
P-Rhodopsin*	phosphoryliertes, licht-aktivierte Rhodopsin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rho*	Rhodopsin in Meta II (licht-aktiviert)
ROS	Rod Outer Segments (Stäbchenaußensegmente)
RT	Raumtemperatur
S-Antigen	Arrestin
SA-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
T	Thymidin, Transducin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris gepufferte Saline
TEMED	N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tween 20	Polyoxybenzethylensorbitanmonolaureat
U	Unit (μmol Substrat min ⁻¹ mg Protein), Urea

ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIS	Visible (sichtbares Licht)
v/v	Volumenanteil
w/v	Masse pro Volumen
x	mal
YP	Yeast Pepton

Danksagung

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

Mein Dank gilt:

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

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

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

Jörg Labahn und Ulf Eidhoff für die vielen Diskussionen und die knallharten Exkursionen...

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

Ilona Ritter, Sascha Lehmann und Christian Baeken für die immer währende Hilfsbereitschaft
Britta Person, Teresa Bednarz und Ken Ataka, sowie dem Kopf der Gruppe Joachim Heberle für die Diskussions- und Hilfsbereitschaft

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

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

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jül-4209
Februar 2006
ISSN 0944-2952