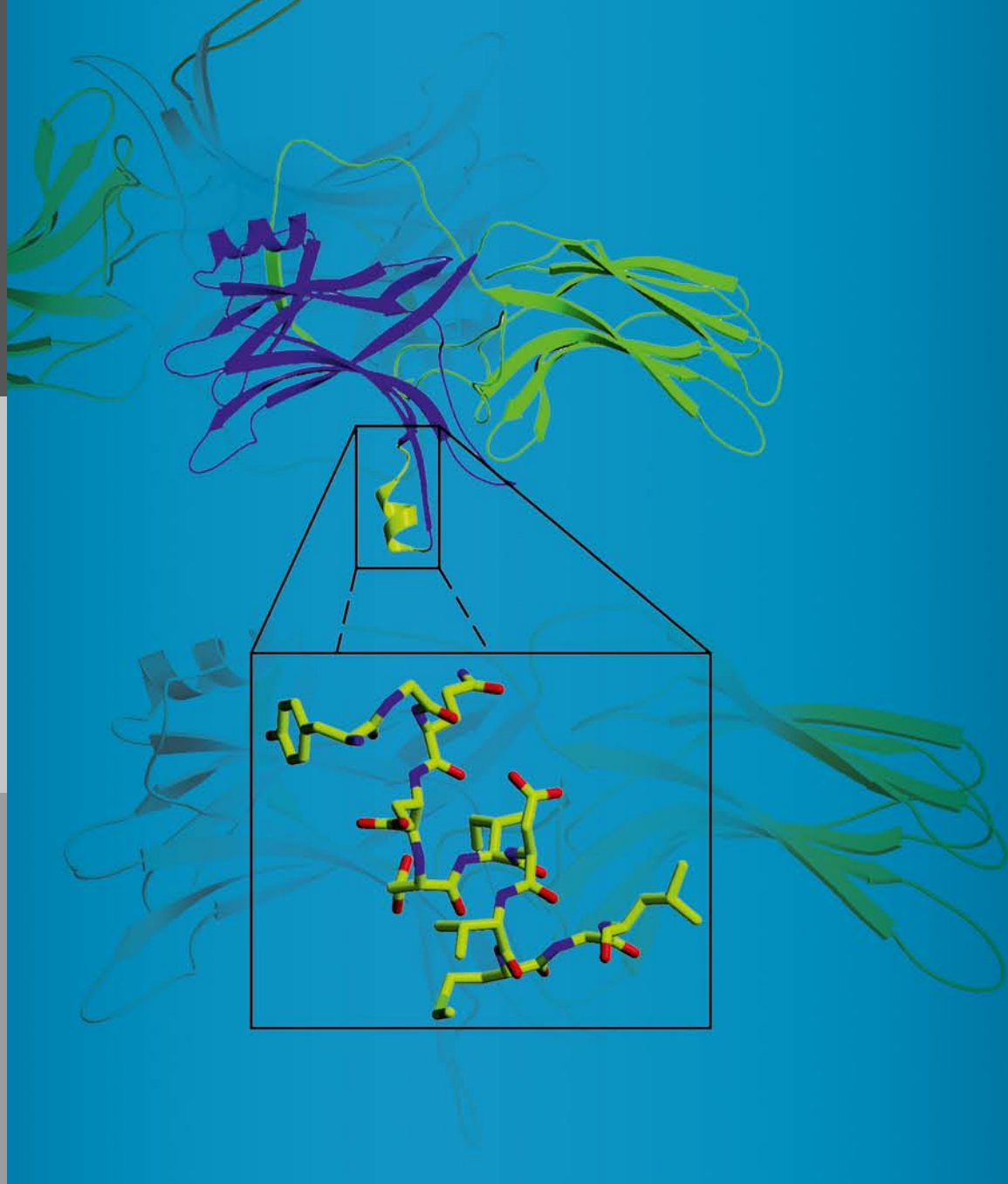




NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷- Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin

Sophie Feuerstein

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Strukturbiologie und Biophysik (ISB)
Strukturbiochemie (ISB-3)

NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷- Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin

Sophie Feuerstein

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 14

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-571-5

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten sind im Internet
über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

Herausgeber und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2009

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 14

D 61 (Diss., Düsseldorf, Univ., 2009)

ISSN 1866-1785
ISBN: 978-3-89336-571-5

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder
in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder
unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Summary

Rhodopsin, the visual pigment of rod outer segments of vertebrate photoreceptor cells, is the prototype of a G-protein coupled receptor (GPCR). Absorption of a single photon activates rhodopsin, which converts to a series of photointermediates. Metarhodopsin II (metaII) interacts with the G-protein transducin, thereby initiating the signaling cascade. The termination of the light response is accomplished by the phosphorylation of rhodopsin and the subsequent tight binding of arrestin to phosphorylated metaII. A sequential multi-site binding model for arrestin implicates engagement of two arrestin sites, the activation and the phosphorylation recognition sensor. Until now, there is no high resolution structure of transducin or arrestin in complex with light activated rhodopsin.

The aim of this work was the structure determination of a transducin or arrestin derived peptide in the rhodopsin bound state. Membrane embedded rhodopsin is not suitable for observation by liquid state NMR. However, transferred nuclear Overhauser effect (TrNOE) and transferred residual dipolar couplings (TrRDC) recorded on the free form of a peptide report on the membrane protein bound peptide conformation provided that there is sufficiently fast exchange between free and bound peptide.

A library of synthetic peptides was screened for candidates that bind to metaII with an affinity that is in the range most suitable for TrNOE/TrRDC experiments. The peptides mimic previously identified binding regions from the G-protein transducin and the regulatory protein arrestin which interact with metaII in visual signal transduction.

The loop region between β -strands V and VI of arrestin is currently discussed as part of the activation recognition site. TrNOE and TrRDC data showed that peptides which correspond to this loop region transiently bind to activated, unphosphorylated rhodopsin.

TrNOE-derived proton-proton distances characterising the receptor-bound peptide were used as restraints in molecular dynamics-based simulated annealing protocols implemented in Xplor-NIH for structure calculation of the arrestin derived peptide Arr(67-77). Additionally, TrRDC data of uniformly ^{15}N -labeled Arr(67-77) showed that the peptide seems to be appropriate for orientation determination, since $^1\text{J}_{\text{NH}}$ splittings measured directly after light activation showed the expected time dependent exponential decay.

It was possible to solve the structure of an arrestin peptide in the receptor bound state by TrNOE data for the first time. The peptide Arr(67-77) reflects the loop region between β -strands V and VI of the parent arrestin molecule. In the crystal structure of inactive arrestin

this region is unstructured and perhaps flexible. Binding to light activated rhodopsin induces an α -helical structure between residues E⁷⁰ and M⁷⁵. The presented data indicate that Arr(67-77) most probably is part of the activation recognition sensor in the multi-site mechanism of arrestin-rhodopsin-binding.

Zusammenfassung

Rhodopsin ist das Sehpigment der Stäbchenzellen der Vertebraten und der Prototyp eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Durch die Absorption eines Photons wird Rhodopsin aktiviert und dabei in eine Reihe von Zwischenzuständen umgewandelt. Metarhodopsin II (MetaII) interagiert mit dem G-Protein Transduzin und löst dadurch die Signalkaskade aus. Diese wird beendet, indem Rhodopsin phosphoryliert und anschließend von Arrestin mit hoher Affinität gebunden wird. Ein Modell beschreibt, dass zwei Arrestin-Erkennungsstellen an dieser Bindung beteiligt sind, die sogenannte Aktivierungserkennungsstelle und die Phosphorylierungserkennungsstelle. Bis heute gibt es jedoch noch keine hochaufgelöste Struktur von Transduzin oder Arrestin im Komplex mit lichtaktiviertem Rhodopsin.

Das Ziel dieser Arbeit war die Strukturaufklärung eines Transduzin- oder Arrestinpeptids im Rhodopsin gebundenen Zustand. Rhodopsin ist in den Diskmembranen der Stäbchenzellen lokalisiert und eignet sich nicht für die Flüssig-NMR-Spektroskopie. Der transferierte Kern-Overhauser-Effekt (TrNOE) und die transferierte Restdipolkopplung (TrRDC), die an der freien Form eines Peptids detektiert werden, enthalten jedoch Informationen über den gebundenen Zustand des Peptids. Voraussetzung dafür ist, dass sich die freie und gebundene Form des Peptids im schnellen Austausch befinden.

Eine Reihe synthetischer Peptide wurde auf deren Wechselwirkungsverhalten mit MetaII und deren Eignung für TrNOE/TrRDC-Experimente untersucht. Die Peptide entsprechen bereits identifizierten Bindestellen des G-Proteins Transduzin und des regulatorischen Proteins Arrestin, welche beide während der visuellen Signaltransduktion an MetaII binden.

Die Region des Loops zwischen den β -Strängen V und VI des Arrestins wird zur Zeit als Teil der Aktivierungserkennungsstelle diskutiert. Basierend auf den ermittelten TrNOE- und TrRDC-Daten konnte gezeigt werden, dass Peptide, die der Aminosäuresequenz dieser Loop-region entsprechen, an aktiviertes, unphosphoryliertes Rhodopsin binden.

Abstände zwischen Protonen, die über TrNOE ermittelt wurden, charakterisieren die Struktur des rezeptorgebundenen Peptids und wurden als struktureinschränkende Parameter für die Strukturberechnung des Arr(67-77)-Peptids durch in Xplor-NIH implementierte Moleküldynamik-Protokolle verwendet. Zusätzlich zeigten die TrRDC-Messungen des [U - ^{15}N]-angereicherten Arr(67-77), dass das Peptid sich für die Bestimmung der Orientierung im Rhodopsin gebundenen Zustand eignet, denn die $^1\text{J}_{\text{NH}}$ -Aufspaltungen, die direkt nach der Photoaktivierung gemessen wurden, zeigten den erwarteten zeitabhängigen exponentiellen Verlauf.

Es konnte das erste Mal die Struktur eines Arrestin-Peptids im Rhodopsin gebundenen Zustand mittels TrNOE gelöst werden. Das Peptid Arr(67-77) entspricht der Loopregion zwischen den β -Strängen V und VI des Arrestins. In der Kristallstruktur des inaktiven Arrestins ist diese Region unstrukturiert und möglicherweise flexibel. Die Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin induziert eine α -helikale Struktur zwischen den Aminosäuren E⁷⁰ bis M⁷⁵. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlußfolgert werden, dass Arr(67-77) höchstwahrscheinlich Teil der Aktivierungserkennungsstelle beim Mechanismus der Arrestin-Rhodopsin-Bindung ist.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	xiii
Abbildungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Das Auge - das Lichtsinnesorgan	1
1.1.1 Die Retina - ein komplexes neuronales Netzwerk	1
1.1.2 Stäbchen und Zapfen - die Photorezeptorzellen	2
1.2 Der Photozyklus - Signaltransduktion am Beispiel des Sehprozesses	4
1.3 Rhodopsin und dessen Wechselwirkungspartner Arrestin und Transduzin . . .	7
1.3.1 Rhodopsin - ein G-Protein gekoppelter Rezeptor	7
1.3.2 Transduzin - ein G-Protein	10
1.3.3 Arrestin - ein regulatorisches Protein	11
1.4 Die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) - eine Methode nicht nur zur Struktur- aufklärung	14
1.5 Austausch basierte NMR-Methoden	16
1.5.1 TrNOE - wie ist ein kleiner Ligand im Komplex mit einem großen Protein gefaltet?	17
1.5.2 TrRDC - wie ist ein Ligand im Komplex mit einem großen Protein orientiert?	18
1.5.3 Rhodopsin-Ligand-Komplexe - Strukturaufklärung anhand von TrNOE und TrRDC	21
1.6 Nanodisks - ein vielfältiges Modellmembran-System	23
2 Zielsetzung	25

3	Material und Methoden	27
3.1	Verwendete Materialien und Chemikalien	27
3.1.1	Verwendete Peptide	27
3.1.2	Bakterienstämme und Plasmide	28
3.2	Proteinnachweis	29
3.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	29
3.2.2	Coomassiefärbung	30
3.2.3	Silberfärbung	30
3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	31
3.3.1	Optische Methode	31
3.3.2	Gravimetrische Methode	31
3.4	Diskmembranpräparation	32
3.4.1	Gewinnung boviner Retinae	32
3.4.2	Präparation der äußeren Segmente der Stäbchenzellen	32
3.4.3	Präparation abgeflachter Diskmembranen	33
3.4.4	Überprüfung der Rhodopsin-Konzentration	34
3.5	Allgemeine Klonierungstechniken	35
3.5.1	Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Isolierung	35
3.5.2	DNA-Gelelektrophorese	35
3.5.3	Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen	36
3.5.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	37
3.5.5	Transformation der Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen	37
3.6	Klonierungstechniken zur Herstellung des pTKK19xb/ub_Jue2-Vektors	38
3.6.1	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA	38
3.6.2	Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA	38
3.6.3	Annealing der Oligonukleotide	39
3.6.4	DNA-Ligation	39
3.6.5	Kolonie-PCR	40
3.7	Herstellung des isopenangereicherten Arr(66-80)-Peptids	41
3.7.1	Anzucht der Bakterien und Expression des His ₁₀ -Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins	41
3.7.2	Zellaufschluss	42
3.7.3	Reinigung des Arr(66-80)-Peptids	42
3.8	Herstellung des isopenangereicherten Arr(67-77)-Peptids	46

3.9	Herstellung des <i>Membrane Scaffold Proteins</i> (MSP1)	46
3.9.1	Subklonierung des für MSP1 kodierenden Inserts in einen Expressi- onsvektor	46
3.9.2	Anzucht der Bakterien und Expression des MSP1	46
3.9.3	Zellaufschluss	47
3.9.4	Reinigung des MSP1	47
3.10	Herstellung und Charakterisierung scheibchenförmiger Modellmembranen (Na- nodisks)	48
3.10.1	Herstellung der Lipid-Detergenz-Stammlösung	48
3.10.2	Inkubationsansatz zur Bildung leerer Nanodisks	49
3.10.3	Inkubationsansatz zur Bildung Protein beinhaltender Nanodisks	49
3.10.4	Größenausschlusschromatographie	49
3.10.5	Stabilität der Nanodisks als Funktion der Zeit	50
3.10.6	Circular-Dichroismus-Spektroskopie	51
3.11	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	51
3.11.1	Probenvorbereitung	52
3.11.2	NMR-Experimente	52
3.11.3	Berechnung der TrRDC und der Regressionskurven des zeitlichen Ver- laufs	55
3.11.4	Berechnung der Differenzspektren	56
3.11.5	NOE-Zuordnung und Kalibrierung	56
3.11.6	Strukturberechnung	57
3.11.7	Strukturanalyse	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Etablierung der Diskmembranpräparation	59
4.1.1	UV/Vis-Spektroskopie an Diskmembranen	60
4.1.2	Reproduktion der TrRDC-Messungen am [U - ^{15}N]-S2-Peptid	62
4.2	^1H - ^1H -NOESY-Experimente zur Selektion von Transduzin- und Arrestin-Pep- tiden	64
4.2.1	1D- ^1H -Spektren der Peptide	64
4.2.2	^1H - ^1H -NOESY-Spektren ausgewählter Peptide	65
4.3	Herstellung des isotopeangereicherten Arr(66-80)-Peptids	70
4.3.1	Klonierung des Arr(66-80)-kodierenden Plasmids	70

4.3.2	Expression und Reinigung des His ₁₀ -Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins	72
4.3.3	Spaltung des Fusionsproteins zur Gewinnung des Arr(66-80)-Peptid	74
4.4	Sequenzspezifische ¹ H-Resonanzzuordnung	76
4.5	HSQC-Experimente zur Ermittlung der TrRDC	79
4.5.1	¹⁵ N- ¹ H-HSQC-Experimente am [<i>U</i> - ¹⁵ N]-Arr(66-80)-Peptid	79
4.5.2	¹³ C- ¹ H-CT-HSQC-Experimente am [<i>U</i> - ¹³ C]-Arr(66-80)-Peptid	82
4.5.3	Bestimmung und Analyse der ¹ J ^{exp} des Arr(66-80)-Peptides	83
4.5.4	¹⁵ N- ¹ H-HSQC-Experimente am [<i>U</i> - ¹⁵ N]-Arr(67-77)-Peptid	87
4.5.5	Bestimmung und Analyse der ¹ J ^{exp} des Arr(67-77)-Peptides	87
4.6	¹ H- ¹ H-NOESY-Experimente am Arr(67-77)-Peptid	89
4.6.1	Zuordnung der NOE-Korrelationen	89
4.6.2	NOE-Korrelationsintensitäten zur Distanzeinschränkung	91
4.7	Strukturberechnung und -analyse des Arr(67-77)-Peptids im Rhodopsin gebundenen Zustand	94
4.8	Nanodisks: künstliche Modellmembranen zur Untersuchung von Membranproteinen	96
4.8.1	Herstellung und Reinigung des <i>Membrane Scaffold Proteins</i> (MSP1)	96
4.8.2	Herstellung leerer und mit CD4mut-inkorporierter Nanodisks	98
4.8.3	Stabilität der Nanodisks	99
5	Diskussion	101
5.1	Erfolgreiche Etablierung der Diskmembranpräparation	101
5.2	TrRDC des S2-Peptids konnten qualitativ reproduziert werden	102
5.3	Auswahlkriterien der zu untersuchenden Peptide	103
5.4	Peptide der Loopregion zwischen den β-Strängen V und VI des Arrestins interagieren mit photoaktiviertem Rhodopsin	107
5.5	Arr(66-80) wird unter Bildung eines Diketopiperazins chemisch abgebaut	109
5.6	HSQC-Experimente bestätigen die Bindung der Peptide Arr(66-80) und Arr(67-77) an photoaktiviertes Rhodopsin	111
5.7	Arr(67-77) bindet unter Ausbildung einer α-helikalen Struktur an photoaktiviertes Rhodopsin	113
5.8	Warum bindet ein Arrestin-Peptid an unphosphoryliertes Rhodopsin?	114
5.9	Modelle des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes	117

5.10 Sind Nanodisks geeignet für die Untersuchung von Membranprotein-Ligand-Komplexen mittels Flüssig-NMR?	120
5.11 TrNOE- und TrRDC-Experimente sind eine leistungsstarke Methode zur Strukturaufklärung großer Komplexe	121
5.12 Ausblick	122
6 Anhang	123
6.1 NMR-chemische ^1H -Verschiebung des Arr(67-77)-Peptides	123
6.2 Aminosäuresequenz MSP1	124
7 Abkürzungsverzeichnis	125
7.1 Abkürzungen und Symbole	125
7.2 Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Code	128
Danksagung	141
Eidesstattliche Erklärung	143

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

3.1	Verwendete Peptide	28
3.2	Verwendete Bakterienstämme	28
3.3	Verwendete Plasmide	29
3.4	Ablauf der Silberfärbung	31
3.5	Akquisitionsparameter der NMR-Experimente	53
4.1	Restdipolkopplung $^1D_{NH}$ des Arr(67-77)	89

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das Auge	3
1.2	Der Photozyklus	5
1.3	Schematischer Aufbau des Rhodopsinmoleküls	9
1.4	Kristallstruktur des Arrestins	13
1.5	Schema des Prinzips eines TrRDC-Experimentes mit Diskmembranen	19
1.6	Modell der MetaII-Transduzin-Interaktion	22
1.7	Schematischer Aufbau einer leeren Nanodisk	24
4.1	UV/Vis-Absorptionsspektrum und SDS-Gel zur Überprüfung der Diskmembranpräparation	61
4.2	Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1\text{J}^{exp}$ -Aufspaltungen des S2-Peptids in Abhängigkeit der Zeit	63
4.3	^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Peptide $\text{T}_\alpha(311-323)$ und Arr(66-80) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen	66
4.4	^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Peptide Arr(152-170) und Arr(232-245) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen	68
4.5	^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Peptide Arr(251-262) und Arr(342-354) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen	69
4.6	^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(67-77) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen	71
4.7	Expression und Reinigung des His ₁₀ -Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins	74
4.8	Enzymatischer Verdau des His ₁₀ -Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins	75
4.9	Reversed Phase Chromatogramm der Arr(66-80)-Reinigung	76
4.10	TOCSY-Spektrum des Arr(66-80)-Peptids	77
4.11	TOCSY-Spektrum des Arr(67-77)-Peptids	78
4.12	^{15}N -HSQC-Spektren des Arr(66-80)-Peptids	81

Abbildungsverzeichnis

4.13	^{13}C - ^1H -CT-HSQC-Spektren des Arr(66-80)-Peptids	83
4.14	Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1\text{J}^{exp}$ -Aufspaltungen des Arr(66-80)-Peptids in Abhängigkeit der Zeit - Teil 1	85
4.15	Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1\text{J}^{exp}$ -Aufspaltungen des Arr(66-80)-Peptids in Abhängigkeit der Zeit - Teil 2	86
4.16	Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1\text{J}^{exp}$ -Aufspaltungen des Arr(67-77)-Peptids in Abhängigkeit der Zeit	88
4.17	Ausschnitte aus ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Arr(67-77)-Peptids	90
4.18	Sekundärstrukturtypische Kreuzkorrelationen des Arr(67-77)-Peptid	92
4.19	Ramachandran-Plot des Arr(67-77)-Peptids	93
4.20	Liniendarstellung der Strukturschar des Arr(67-77)-Peptids	94
4.21	Bändermodell der energieärmsten Struktur des Arr(67-77)-Peptids	95
4.22	Expression und Reinigung des MSP1	97
4.23	Größenausschluss-Chromatogramm der Nanodisk-Isolierung	99
5.1	Arrestin Kristallstruktur	105
5.2	Reaktionsschema der Diketopiperazin-Bildung	110
5.3	Modell des Arrestins in der gebundenen Form	115
5.4	Modell der Arrestin-Rhodopsin-Interaktion	119

1 Einleitung

1.1 Das Auge - das Lichtsinnesorgan

Im Tierreich gibt es eine Vielzahl verschiedener Augentypen, die sich in ihrer Morphologie, ihrem ontogenetischen Ursprung und ihrer Komplexität stark unterscheiden. Diese reichen von primitiven Pigmentbecheraugen über Komplexaugen bis hin zu komplizierten Einzellinsenaugen, die vor allem bei Vertebraten und Cephalopoden auftreten. Die essentielle Funktion, die alle Augen gemeinsam haben, ist Licht in chemische Energie umzuwandeln. Lange wurde vermutet, dass Augen sich während der Evolution phylogentisch unabhängig voneinander entwickelten. Genetische Studien zeigten jedoch, dass bei allen Organismen die *Pax*-Genfamilie bei der Augenentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Kozmik 2008).

Das Linsenauge der Vertebraten besteht aus dem Bulbus oculi (Augapfel) und dem Nervus opticus (Sehnerv). Der dioptrische Apparat des Auges ist ein zusammengesetztes Linsensystem, das auf der Retina (Netzhaut) ein umgekehrtes und verkleinertes Bild der Umwelt entwirft.

Die Lichtstrahlen müssen zunächst die Cornea (Hornhaut) und die vordere Augenkammer passieren. Mittels der zwischen Iris (Regenbogenhaut) und Glaskörper liegenden Linse werden sie unterschiedlich stark gebrochen, dann fokussiert und schließlich auf die Retina projiziert. Die Retina grenzt an die Chorioidea (Aderhaut), die wiederum die Sklera (Lederhaut) von innen auskleidet. Sie ist der Teil des Auges, in welchem die neuronale Verarbeitung des Lichtreizes stattfindet. In Abb. 1.1A ist der Querschnitt durch ein humanes Linsenauge, das elektromagnetische Strahlen mit einer Wellenlänge zwischen 400 bis 750 nm wahrnehmen kann, abgebildet.

1.1.1 Die Retina - ein komplexes neuronales Netzwerk

Die Retina entsteht während der Ontogenese aus einer Ausstülpung des Zwischenhirnbodens und kann deshalb als vorgelagerter Hirnteil betrachtet werden. Sie besteht aus zwei Teilen,

der lichtempfindlichen Pars optica und der blinden Pars iridica. Die Pars optica enthält ein komplexes neuronales Netzwerk spezialisierter Zellen, die in die Reizweiterleitung involviert sind (s. Abb. 1.1B).

Die Photorezeptorzellen wandeln den Lichtreiz in ein elektrisches Signal um und leiten die Information vertikal an die bipolaren Zellen der Retina weiter. Die Photorezeptor- und Bipolarzellen sind wiederum lateral mit den Horizontalzellen über Synapsen verknüpft. Diese beeinflussen den Informationsfluss, indem sie Signale einer Photorezeptorzelle an benachbarte Rezeptoren oder Bipolarzellen weiterleiten oder hemmen. Die Bipolarzellen senden das Signal vertikal an die Ganglienzellen. Diese beiden Zelltypen sind ebenfalls lateral über sogenannte Amakrinzellen verknüpft. Analog zu den Horizontalzellen, leiten Amakrinzellen die Signale einer Bipolarzelle an mehrere Ganglienzellen regulatorisch weiter. Die gebündelten Axone der Ganglienzellen bilden den Nervus opticus und sind schließlich die letzte Stufe der visuellen Signaltransduktion zum Gehirn.

Die Müller-Zellen der Retina sind Gliazellen, die einerseits eine Stützfunktion ausüben und die Neuronen untereinander isolieren. Andererseits tragen sie zur Homöostase bei, indem sie physiologische Aufgaben übernehmen.

Eine kleine Grube, die auf der Retina lokalisiert ist, wird als Fovea centralis oder auch als sogenannter gelber Fleck bezeichnet. Dies ist der Punkt des schärfsten Sehens. Er ist ausschließlich mit den Sehsinneszellen der Zapfen angereichert und deshalb für das Tageslichtsehen verantwortlich. An der Austrittsstelle der Axone aus der Retina sind keine Sinneszellen vorhanden. Deshalb wird diese sogenannte Papilla bzw. Discus nervi optici auch als blinder Fleck bezeichnet.

1.1.2 Stäbchen und Zapfen - die Photorezeptorzellen

Bei Vertebraten gibt es zwei Typen von Photorezeptorzellen, die aufgrund ihrer Form in Stäbchen und Zapfen untergliedert sind. Eine humane Retina besteht in etwa aus fünf Millionen Zapfen und 100 Millionen Stäbchen (Müller & Kaupp 1998).

Neben ihrer Form unterscheiden sich Stäbchen und Zapfen in deren Absorptionseigenschaften und der damit verbundenen Lichtsensitivität. Die Photorezeptoren der Stäbchenzellen haben ein Absorptionsmaximum bei 500 nm. Sie sind für das skotopische Sehen zuständig, bei welchem Helligkeitsunterschiede wahrgenommen werden. Die Zapfen werden in Rot-, Grün- und Blauzapfen untergliedert, da bei ihnen drei verschiedene Rezeptortypen mit unterschiedlichen

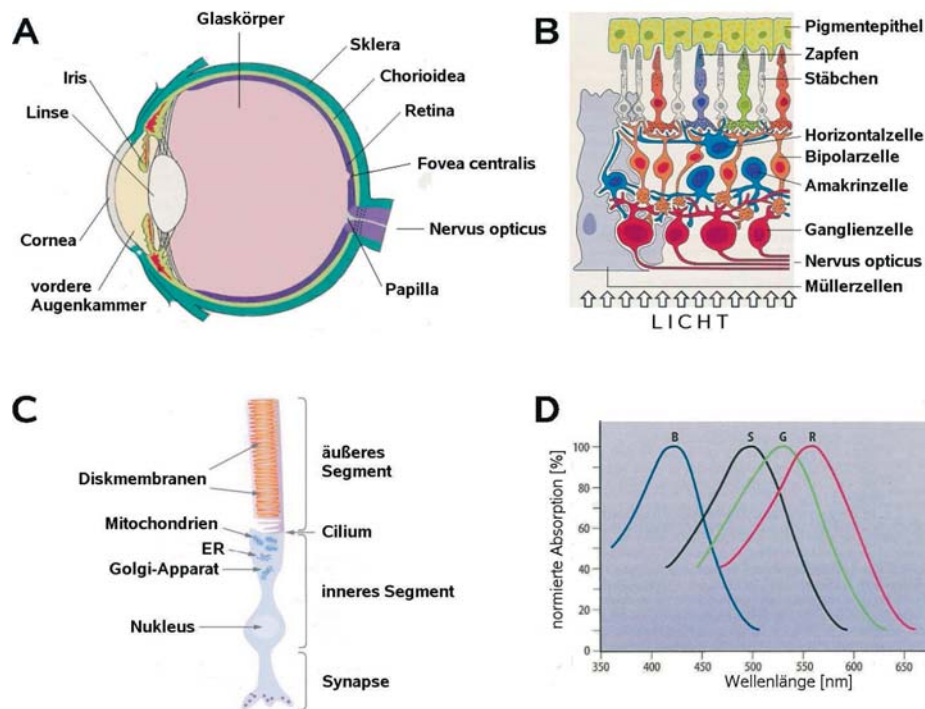


Abbildung 1.1: Das Auge. **A** Schematischer Horizontalschnitt durch das rechte Auge (verändert nach Schmidt et al. (2000)). **B** Aufbau der Primatennetzhaut (verändert nach Schmidt et al. (2000)) **C** Schematischer Aufbau eines Stäbchens (verändert nach Palczewski (2006)) **D** Normierte spektrale Absorptionskurven der Blauzapfen (B), Grünzapfen (G), Rotzapfen (R) und der Stäbchen (S) in der humanen Retina (verändert nach Schmidt et al. (2000)).

Absorptionsmaxima bei 570 nm, 535 nm und 440 nm auftreten. Sie übernehmen die Funktion des photopischen Sehens, d. h. der Farbwahrnehmung. In Abb. 1.1D sind Ausschnitte der Absorptionsspektren der verschiedenen Photorezeptortypen abgebildet.

Stäbchenzellen sind weitaus lichtempfindlicher als Zapfen. Sie haben die Fähigkeit, ein einzelnes Photon zu detektieren, während Zapfen mindestens 200 Lichtquanten brauchen, um ein Signal weiterzuleiten.

Beide Zelltypen bestehen aus einem inneren und einem äußeren Segment, die über ein Cilium miteinander verbunden sind (s. Abb. 1.1C). Im inneren Segment sind Mitochondrien, der Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum sowie der Nukleus lokalisiert. Es übernimmt

die Funktion der Proteinbiosynthese und ist an dessen Ende über eine Synapse mit einer bipolaren Zelle verknüpft.

Das langgestreckte äußere Segment des Stäbchens misst beim Menschen etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ im Durchmesser und $40\text{ }\mu\text{m}$ in der Länge. Es ist auf die Funktion der Photorezeption spezialisiert und enthält die dafür notwendigen Kompartimente, die sogenannten Diskmembranen. Sie bestehen aus scheibchenförmigen, abgeflachten Doppellipidschichten, in welchen das Photorezeptormolekül Rhodopsin zahlreich eingelagert ist. Die Diskmembranen sind stapelförmig sehr dicht angeordnet und werden von der Plasmamembran des äußeren Segmentes umhüllt. Die schmalen Zwischenräume zwischen den Diskmembranen selbst und der Plasmamembran sind mit Cytoplasma gefüllt. Die Zahl der ungefähr 16 nm dicken Diskmembranen variiert je nach Spezies zwischen 500 bis 2000 pro Stäbchenzelle.

Die verringerte Lichtempfindlichkeit der Zapfen liegt u. a. an deren Morphologie, sowie einer verminderten Verknüpfung mit den nachgeschalteten Zelltypen. Sie besitzen keine isolierten Diskmembranen. Die Lumina der Lamellen öffnen sich hier gegen das Zelläußere und sind ebenfalls stapelförmig angeordnet. Die Sehpigmente der Zapfen sind deshalb in der Plasmamembran lokalisiert.

Die Photorezeptorzellen sind mit ihrem äußeren Segment im Pigmentepithel verankert, das sich auf der vom Licht abgewandten Seite der Retina befindet. Die Retina der Vertebraten wird deshalb auch als inverse Retina bezeichnet.

1.2 Der Photozyklus – Signaltransduktion am Beispiel des Sehprozesses

Während des Photozyklus findet die visuelle Signaltransduktion statt. Dabei wird im neuronalen Netzwerk des Auges ein physikalisches Signal in Form einer elektromagnetischen Welle über ein biochemisches in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das dunkeladaptierte Sehpigment Rhodopsin besteht aus dem Apoprotein Opsin und dem inkorporierten Chromophor 11-*cis*-Retinal (s. Abb. 1.2). Durch die Absorption eines Photons isomerisiert 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal und induziert dadurch eine Strukturumwandlung des Photorezeptors. Rhodopsin relaxiert thermisch über mehrere spektroskopisch unterscheidbare Zwischenprodukte wie Bathorhodopsin und Lumirhodopsin zu Metarhodopsin I (MetaI). MetaI befindet sich im dynamischen Gleichgewicht mit der enzymatisch aktiven Form des Rhodopsins, dem Me-

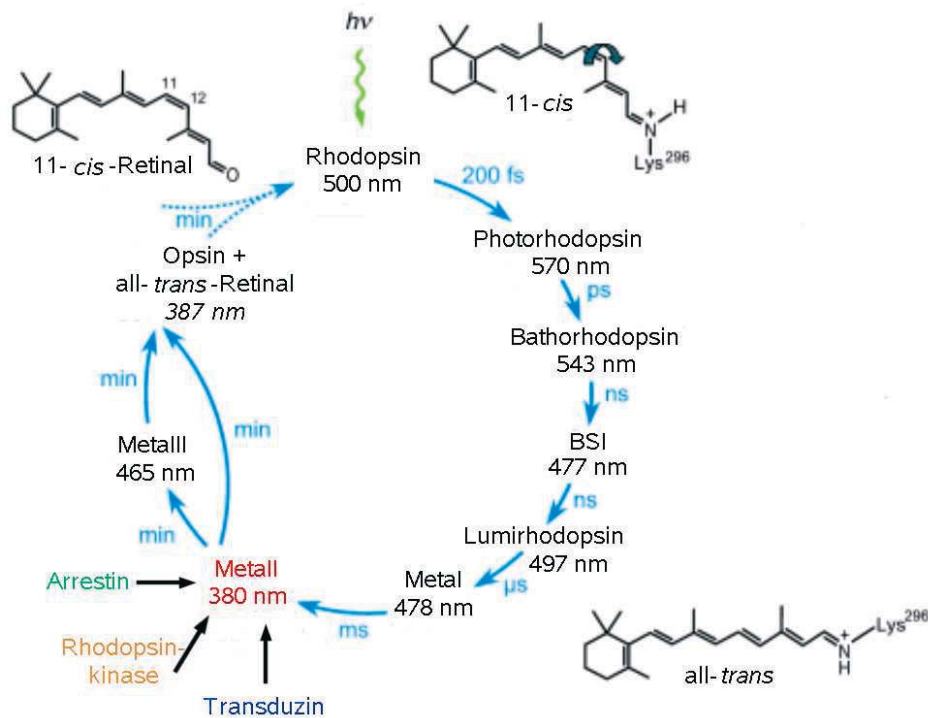


Abbildung 1.2: Der Photozyklus des Rhodopsins. Photozyklus des Rhodopsins mit spektroskopisch detektierbaren Zwischenstufen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Absorptionsmaxima über spektroskopische Methoden bei niedriger Temperatur oder durch Lichtimpuls induzierte Photolyse bei Raumtemperatur detektiert werden können. Durch die Absorption eines Photons isomerisiert 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal und induziert eine Strukturumwandlung des Rezeptors. Rhodopsin relaxiert thermisch über Photo-, Batho-, BSI und Lumirhodopsin zu Metal. Die größte Konformationsänderung findet beim Übergang in den Metall-Zustand statt, welcher sich im Gleichgewicht mit seinem Vorgänger Metal befindet. Metall ist die aktivierte und G-Protein Transduzin bindende Form des Rezeptors. Die Deprotonierung der Schiff'schen Base führt zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 380 nm. Metall wird entweder von der Rhodopsinkinase phosphoryliert (P-Metall) oder zerfällt thermisch entweder direkt oder über Metall zu Opsin und all-*trans*-Retinal. P-Metall hat eine hohe Affinität zu Arrestin. Bindet Arrestin an P-Metall wird die Interaktion mit Transduzin sterisch blockiert und die Enzymkaskade dadurch beendet (verändert nach Ernst & Bartl (2002)).

tarhodopsin II (MetaII). Bei diesem Übergang in die aktive Form erfährt das Photorezeptormolekül die stärkste Strukturumwandlung (s. u. Kap. 1.3.1). MetaII bindet und aktiviert das G-Protein Transduzin und löst dadurch die Signalamplifikation aus (Ernst & Bartl 2002).

Im inaktiven Zustand bildet Transduzin einen heterotrimeren Komplex aus der guanylnukleotidbindenden T_α -Domäne sowie den Untereinheiten T_β und T_γ . Als Folge der Lichtaktivierung binden Transduzinmoleküle an Rhodopsin, wobei das Signal konvertiert und amplifiziert wird. Dieser Vorgang ist mit dem Austausch von GDP durch GTP und dem Komplexzerfall zu T_α und dem Heterodimer $T_{\beta\gamma}$ verbunden. Freies GTP-gebundenes T_α aktiviert wiederum die Phosphodiesterase (PDE). Sie besteht aus vier Untereinheiten und zwar der PDE_α - und PDE_β -Untereinheit sowie zwei kleinen inhibitorischen PDE_γ -Untereinheiten. Die PDE_γ -Untereinheiten unterdrücken im dunkeladaptierten Zustand die katalytische Aktivität der strukturell ähnlichen PDE_α - und PDE_β -Untereinheiten.

T_α -GTP binden die PDE_γ -Untereinheiten, wodurch die PDE_α - und PDE_β -Untereinheiten aktiviert werden. Die aktivierte PDE hydrolysiert cGMP zu 5'-GMP. Durch das Absinken der cGMP-Konzentration schließen sich die cGMP-gesteuerten Na^+ -Ionenkanäle, was eine Hyperpolarisation der Stäbchenzelle zur Folge hat. Damit verbunden ist eine verringerte Transmitterausschüttung an der Synapse des inneren Segments, die von den nachgeschalteten Bipolarzellen realisiert wird. Das biochemische Signal ist zu einem elektrischen Signal geworden. Während des Photozyklus entsteht ein weiteres Zwischenprodukt, das Metarhodopsin III (MetaIII). MetaIII ist ein Seitenprodukt des MetaII-Zerfalls und wird deshalb als Speicherform des all-*trans*-Retinals diskutiert (Heck et al. 2003; Ritter et al. 2004; Zimmermann et al. 2004).

Um die Kaskade der visuellen Signaltransduktion zu beenden, ist es notwendig das Photointermediat MetaII zu inaktivieren. Daran sind zwei regulatorische Proteine beteiligt, die Rhodopsinkinase (RK) und Arrestin.

Die RK konkurriert mit Transduzin um die Bindung an MetaII. Die Konzentration an RK in der Stäbchenzelle ist ca. hundertfach geringer als die des Transduzins. Deshalb werden mehrere hundert Transduzin-Moleküle aktiviert, bevor ein RK-Molekül mit dem katalytisch aktiven MetaII wechselwirken kann. Sobald die RK an MetaII bindet, kann keine Aktivierung des Transduzins mehr stattfinden. Die RK phosphoryliert Serin-Reste am C-Terminus des aktivierten Rhodopsins. Phosphoryliertes Rhodopsin hat nun eine hohe Affinität zum Protein Arrestin. Bindet Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin, ist die Interaktion mit Transduzin sterisch blockiert. Die Enzymkaskade wird dadurch beendet.

Die Dissoziation des Arrestins vom inaktivierten Rezeptor ist mit der Freisetzung des Chromophors verbunden und Rhodopsin zerfällt in seine Komponenten Opsin und all-*trans*-Retinal.

Durch eine Proteinphosphatase wird Opsin dephosphoryliert. Opsin assoziiert schließlich wieder mit regeneriertem 11-*cis*-Retinal spontan zu einem neuen Rhodopsinmolekül im Grundzustand.

1.3 Rhodopsin und dessen Wechselwirkungspartner Arrestin und Transduzin

1.3.1 Rhodopsin - ein G-Protein gekoppelter Rezeptor

Rhodopsin ist der Prototyp eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR, engl. *G-protein coupled receptor*). GPCR stellen die größte und vielseitigste Familie von Membranrezeptoren dar. Sie sind heptahelikale Transmembranproteine, die über ein externes Signal eine Strukturumwandlung erfahren. In Folge der Konformationsänderung binden und aktivieren diese Rezeptoren heterotrimere G-Proteine, die schließlich für die Signalamplifikation innerhalb der Zelle verantwortlich sind.

Rhodopsin ist das Photorezeptormolekül der visuellen Signaltransduktion und dient schon seit Jahrzehnten als Modellprotein zur Erforschung der Struktur, Genetik und biochemischer Mechanismen der weitverbreiteten GPCR. Es nimmt 90 % des Proteinanteils einer Diskmembran ein, was in etwa 50 % der Diskmembranoberfläche entspricht. Bovines und humanes Rhodopsin weisen eine Sequenzhomologie von 93,4 % auf. Mittels relativ einfacher Präparationstechniken kann bovines Rhodopsin innerhalb seiner nativen Lipidumgebung isoliert und anschließend untersucht werden.

Rhodopsin ist der erste GPCR, dessen dreidimensionale Struktur im Grundzustand mittels Kristallstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte (Palczewski et al. 2000). Ebenfalls konnten die Kristallstrukturen verschiedener Photointermediate des Rhodopsins (Nakamichi & Okada 2006; Salom et al. 2006) sowie kürzlich die des ligandenfreien Opsins gelöst werden (Park et al. 2008). Neben der des Evertrebraten-Rhodopsins des Tintenfischs *Todarodes pacificus* (Murakami & Kouyama 2008) sind inzwischen auch die Strukturen zweier Isoformen eines weiteren GPCRs, des β -adrenergen Rezeptors bekannt (Cherezov et al. 2007; Warne et al. 2008).

Rhodopsin besteht aus dem 39 kDa großen Apoprotein Opsin und dem Chromophor 11-*cis*-Retinal. Das 348 Aminosäuren lange Protein enthält sieben die Membran durchspannende α -Helices (Helix I - VII) und eine kleine cytoplasmatische Helix VIII. Das Chromophor 11-

cis-Retinal befindet sich im hydrophoben Transmembranbereich. Im dunkeladaptierten Zustand ist es über eine protonierte Schiff'sche Base mit der Seitenkette K²⁹⁶ verbunden, die sich in der Mitte der Helix VII befindet. Die positive Ladung wird über das Gegenion der Aminosäure E¹¹³ neutralisiert, wodurch der Grundzustand stabilisiert wird. Es wurde postuliert, dass ein Aufbrechen der Salzbrücke, eine Bewegung der Helix VI zur Folge hat (Kim et al. 2004). Dabei findet ein Protonentransfer von E¹⁸¹ über ein H₂O-Molekül und S¹⁸⁶ auf E¹¹³ statt. Als Konsequenz fungiert E¹⁸¹ nun als Gegenion, welches eine neue Salzbrücke mit *all-trans*-Retinal ausbildet (Yan et al. 2003).

Die posttranslationalen Modifikationen bestehen aus einer Acetylierung des C-Terminus sowie zweier Glykosilierungen an den Asparagin-Resten N² und N¹⁵. Die Stabilität des α -helikalen Transmembranbereichs wird durch eine Disulfidbindung zwischen den Aminosäuren C¹¹⁰ und C¹⁸⁷, die unter den GPCR hoch konserviert sind, stabilisiert. Die Reste C³²² und C³²³ sind palmitoyliert und dadurch in der Membran verankert. Die intrazelluläre Helix VIII (K³¹¹ bis L³²¹) wird über diese Palmitoylreste an die Membran gezogen und über hydrophobe Seitenketten der Helices I und VII stabilisiert. Der C-Terminus von G³²⁴ bis A³⁴⁸ ist ebenfalls im Cytoplasma lokalisiert und im dunkeladaptierten Zustand flexibel (Getmanova et al. 2004). Innerhalb der C-terminalen Region befinden sich auch zahlreiche Serin und Threonin-Reste, die als fakultative Phosphorylierungsstellen dienen. Die Präferenz zur Phosphorylierung liegt jedoch bei den Aminosäuren S³³⁴, S³³⁸ und S³⁴³. Es konnte gezeigt werden, dass in einem phosphorylierten Peptidanalogen der C-terminalen Rhodopsinregion die Bildung einer α -Helix induziert wird, sobald es an Arrestin bindet (Kisselev et al. 2004).

Die sieben Transmembranhelices sind über drei extrazelluläre bzw. intradiskale Loops und drei cytoplasmatische Loops miteinander verbunden. Die intradiskalen Verbindungen bestehen aus einem kurzen Loop (EI) zwischen G¹⁰¹ und F¹⁰⁵, einer Schleife (EII) zwischen V¹⁷³ und T¹⁹⁸, die Helix IV und V miteinander verbinden und den Aminosäuren T²⁷⁷ bis P²⁸⁵ (EIII) zwischen Helix VI und VII. Der Loop EII könnte zusammen mit dem ebenfalls intradiskalen N-Terminus als „Verschlusskappe“ der Retinal-Bindungstasche dienen (Bourne & Meng 2000).

Die drei intrazellulären Verbindungen bestehen aus den Loops Q⁶⁴ bis P⁷¹ (CI), E¹³⁴ bis H¹⁵² (CII) und Q²²⁵ bis R²⁵² (CIII). Der Bereich zwischen Helix VII und den palmitoylierten C³²²- und C³²³-Resten, in welchem sich die kurze Helix VIII befindet, wird oftmals auch als cytoplasmatischer Loop CIV bezeichnet. In Abb. 1.3 wird der schematische Aufbau eines Rhodopsin-Moleküls gezeigt.

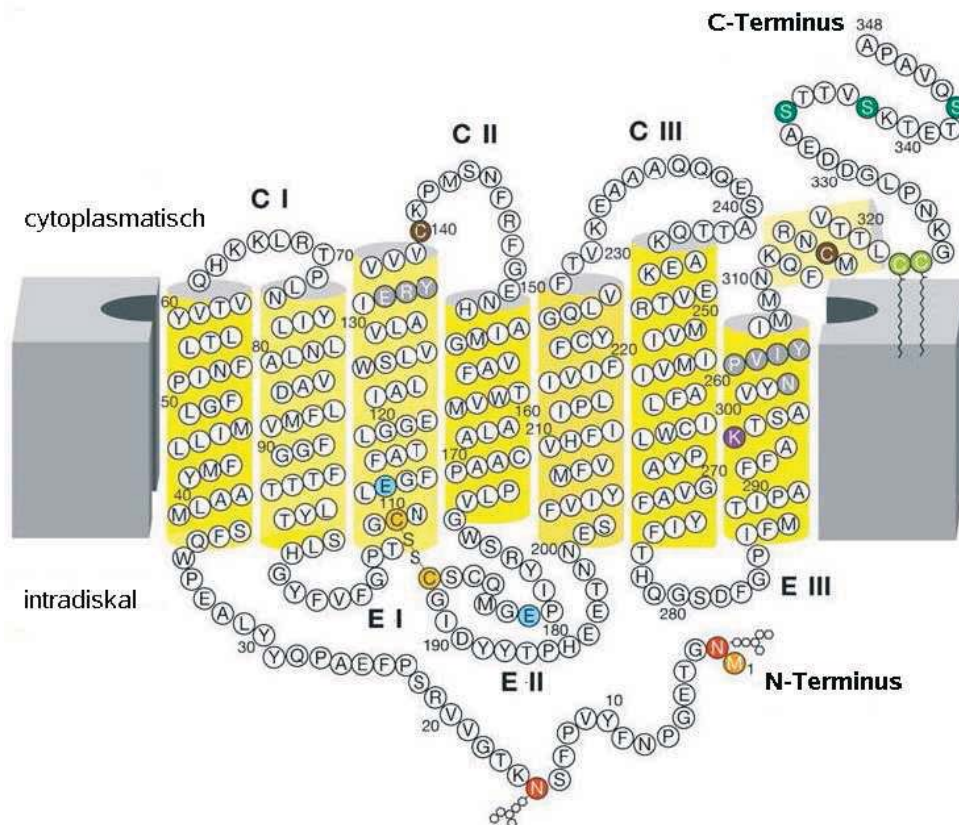


Abbildung 1.3: Schematischer zweidimensionaler Aufbau des Rhodopsinmoleküls. Rhodopsin besteht aus sieben Transmembranhelices und einer kleinen cytoplasmatischen Helix VIII, sowie drei cytoplasmatischen Loops (CI, CII, CIII) und drei intradiskalen Loops (EI, EII, EIII). Eine Disulfidbrücke zwischen C¹¹⁰ und C¹⁸⁷ (gelb) stabilisiert den Transmembranbereich. Das Chromophor 11-*cis*-Retinal ist im dunkeladaptierten Zustand über eine protonierte Schiff'sche Base mit K²⁹⁶ (violett) in Helix VII verbunden. Die positive Ladung wird durch das Gegenion E¹¹³ (blau) neutralisiert. Es wurde postuliert, dass infolge der Strukturumwandlung in den aktivierten Zustand E¹⁸¹ (blau) als neues Gegenion fungiert (Yan et al. 2003). Posttranslationale Modifikationen bestehen aus zwei Glykosilierungen der N² und N¹⁵ (rot), einer Acetylierung des M¹ (orange) und zwei Palmitoylierungen der C³²² und C³²³ (hellgrün). Die favorisierten Phosphorylierungsstellen S³³⁴, S³³⁸ und S³⁴³ liegen im flexiblen C-terminalen Bereich. Die Bereiche (D/E)R(Y/W) und NPXXY (grau) in Helix III bzw. Helix VII sind unter den GPCR hochkonserviert und gelten als wichtig für die Strukturumwandlung in die aktivierte Form des Rezeptors (verändert nach Palczewski (2006)).

Eine hochkonservierte Region in der Unterfamilie A der GPCRs ist das (D/E)R(Y/W) Motif des Loops CII, welches bei bovinem und humanem Rhodopsin aus dem Tripeptid E¹³⁴R¹³⁵Y¹³⁶ besteht (Mirzadegan et al. 2003). Die E¹³⁴-Carboxylgruppe bildet eine Salzbrücke mit R¹³⁵. Diese Aminosäure wiederum interagiert mit E²⁴⁷ und T²⁵¹. E¹³⁴ befindet sich direkt an der Lipid-Wasser-Grenzfläche und ist deshalb sehr sensitiv für kleine chemische Veränderungen in der direkten Umgebung. Wenn E¹³⁴ protoniert wird, kann Rhodopsin in den aktivierten Zustand umgewandelt werden (Periole et al. 2004). Das hochkonservierte NPXXY Motifs (NPVIY) zwischen Helix VII und Helix VIII spielt wohl ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung und ist wahrscheinlich an der G-Protein-Bindung beteiligt (Fritze et al. 2003).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die cytoplasmatischen Loops CII und CIII, sowie die cytoplasmatische Helix VIII an der Transduzin-Bindung beteiligt sind.

Diskutiert wird in den letzten Jahren eine Dimerisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Die Dimerisierung von Rhodopsinmolekülen in der Diskmembran konnte mittels Rasterkraftmikroskopie nachgewiesen werden (Fotiadis et al. 2003). Eine Dimerisierung wurde bereits auch für andere GPCR beobachtet (George et al. 2002; Angers et al. 2002). Ob Rhodopsin nur als Oligomer eine funktionelle Einheit bildet oder ein Monomer für die Signaltransduktion ausreichend ist, wird derzeit kontrovers diskutiert.

1.3.2 Transduzin - ein G-Protein

Transduzin gehört zu den GTP-bindenden Proteinen, die eine Schlüsselrolle bei der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und *Second-Messenger*-Systemen spielen. Man unterscheidet zwischen membranständigen heterotrimeren G-Proteinen und cytosolischen, sogenannten kleinen G-Proteinen.

Das G-Protein Transduzin ist ein Heterotrimer aus den Untereinheiten T_α (350 AS, 40 kDa), T_β (340 AS, 37,4 kDa) und T_γ (74 AS, 8,5 kDa) und ist über posttranslationale Modifikationen, d. h. einer Myristoylierung der T_α-Untereinheit und einer Farnesylierung der T_γ-Untereinheit in der Oberfläche der Diskmembran verankert.

Transduzin wird durch die Bindung an MetaII aktiviert. Diese Wechselwirkung katalysiert einen Austausch von GDP zu GTP an der T_α-Domäne. Das Heterotrimer dissoziiert dann in die Untereinheit GTP-T_α sowie das Heterodimer T_{βγ}. Transduzin übernimmt die Funktion

der Signalweiterleitung und Amplifikation in der Photorezeptorzelle. Die Kristallstruktur des heterotrimeren Holoproteins wurde bereits 1996 von Lambright et al. (1996) gelöst.

T_α besteht aus drei verschiedenen strukturellen Komponenten. Die *Ras-like* GTPase-Domäne wird aus einem sechssträngigen β -Faltblatt gebildet, welches von sechs α -Helices umgeben ist. Die sogenannte α -helikale Domäne besteht aus einer langen und fünf kurzen α -Helices sowie einer N-terminalen α -Helix. Die Nukleotidbindetasche befindet sich in einer tiefen Spalte zwischen der GTPase- und der helikalen Domäne.

Die T_β -Untereinheit besteht aus einer N-terminalen Helix, gefolgt von sieben β -Faltblättern mit jeweils vier antiparallelen Strängen. Aufgrund dieser Anordnung wird sie auch β -Propeller-Untereinheit genannt.

Die T_γ -Untereinheit besteht wiederum aus zwei α -Helices und bildet keine Tertiärstruktur aus. Die N-terminale Helix der T_γ -Untereinheit bildet eine Knäuel-Knäuel-Konformation mit der N-terminalen Helix der T_β -Untereinheit. Zusätzlich interagiert der Rest der T_γ -Untereinheit mit dem sogenannten β -Propeller und stabilisiert die Bindung der beiden Untereinheiten.

Die Interaktion zwischen T_α und T_β findet an zwei verschiedenen Grenzflächen statt. Diese Interaktionsstellen werden als *switch interface* und *N-terminal interface* bezeichnet. Erstere erfährt bei der Aktivierung der T_α -Untereinheit aufgrund des Nukleotidaustauschs eine Konformationsänderung. Dadurch werden die Kontakte zur T_β -Untereinheit unterbrochen und $T_{\beta\gamma}$ kann von T_α entlang der Membran wegdiffundieren.

Die C-terminalen Regionen T_α (340-350), T_α (311-328) und T_γ (60-71) sind hauptsächlich an der Rezeptorerkennung beteiligt (Hamm et al. 1988; Kisselev et al. 1999; Gautam et al. 1998). Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die Kontakte zwischen der N-terminalen Helix T_α (8-23) und dem aktivierten Rezeptor nachweisen (Hamm et al. 1988; Onrust et al. 1997).

1.3.3 Arrestin – ein regulatorisches Protein

Sämtliche Organismen, die zur Klasse der Mammalia gehören, exprimieren nur vier verschiedene Arrestine, die in die Regulation von über 1000 GPCR involviert sind. Sie übernehmen die Funktion der Termination zahlreicher Signalkaskaden. Zwei Arrestintypen werden ausschließlich in Photorezeptorzellen experimentiert. Das visuelle Arrestin (oder Arrestin 1) ist das Arrestin der Stäbchenzellen, während das *cone*-Arrestin (oder Arrestin 4) nur in Zapfenzellen vorkommt. Beide sind jeweils dafür verantwortlich, die visuelle Signaltransduktion zu terminieren, indem sie an phosphoryliertes Rhodopsin bzw. Zapfen-Opson binden. Diese Spezifität für nur einen Rezeptortypen liegt bei den beiden nicht-visuellen β -Arrestinen (Arrestin

2 u. 3) jedoch nicht vor. Sie regulieren die große Mehrheit der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Vishnivetskiy et al. 2004). Dreidimensionale Kristallstrukturen der freien Form liegen für visuelles Arrestin (Granzin et al. 1998; Hirsch et al. 1999), *cone* Arrestin (Sutton et al. 2005) und β -Arrestin 1 (Han et al. 2001; Milano et al. 2002) vor. Die Strukturen ähneln sich in ihrer globulären Faltung untereinander stark.

Visuelles Arrestin liegt in der inaktiven Form unter physiologischen Bedingungen als freies Tetramer überwiegend im Cytoplasma des inneren Segmentes der Stäbchenzelle vor (Hanson et al. 2007). Durch die Lichtaktivierung des Photorezeptors findet eine Translokation des Arrestins in das äußere Segment statt (Nair et al. 2005). Die Termination der Signalkaskade und die damit verbundene Bindung an phosphoryliertes Rhodopsin wird ausschließlich von monomeren Arrestin übernommen (Hanson et al. 2007). Bovines Arrestin ist ein 404 Aminosäuren langes Protein mit einem Molekulargewicht von 45,3 kDa. Bisher sind Daten von Röntgenstrukturanalysen bekannt, die sich hauptsächlich in der Auflösung der C- und N-Termini unterscheiden (Granzin et al. 1998; Hirsch et al. 1999). Die Arrestinstruktur wird von zwei konkaven Elementen dominiert, die jeweils aus zwei antiparallelen vier- bis fünfsträngigen β -Faltblättern bestehen (s. Abb. 1.4). Diese sogenannten Kuppeln sind über einen flexiblen Bereich, der als *hinge region* bezeichnet wird, miteinander verbunden. An der N-terminalen Kuppel befindet sich auf der konvexen Seite zusätzlich eine kurze α -Helix. Die N-terminale Kuppel hat eine Tiefe von 24 Å und einen Durchmesser von 35 Å, während die C-terminale Kuppel im Vergleich einen etwa 10 Å kleineren Durchmesser hat (Granzin et al. 1998).

Die Phosphaterkennungsstelle R¹⁷⁵ befindet sich am höchsten Punkt der N-terminalen Kuppel. R¹⁷⁵ ist Teil der zwischen beiden Domänen liegenden Region, die als *polar core* bezeichnet wird. R¹⁷⁵ bildet eine doppelte Salzbrücke mit D³⁰ und D²⁹⁶ sowie Wasserstoffbrücken zu D³⁰³. Geht Arrestin in die aktivierte Rezeptorbindende Konformation über, werden diese Wechselwirkungen gelöst. R¹⁷⁵ liegt nun in exponierter Lage vor (Granzin et al. 1998; Hirsch et al. 1999). Nach Vishnivetskiy et al. (1999) dient dieser *polar core* wahrscheinlich der Stabilisierung der inaktiven Arrestin-Konformation.

Nach Granzin et al. (1998) hat der Loop G⁶⁸ bis S⁷⁸ zwischen den β -Strängen V und VI eine Schalterfunktion bei der Rezeptorerkennung. Dieser Loop wird auch als „Finger-Loop“ bezeichnet und in der aktuellen Literatur stark diskutiert. Rekombinantes Arrestin, bei welchem zehn zusätzliche Aminosäuren zwischen I⁷² und D⁷³ inseriert wurden, zeigte eine deutlich verringerte Bindungsaffinität zum Rezeptor, obwohl die Spezifität für die lichtaktivierte Form erhalten blieb. Die Aktivität des Arrestins ging schließlich durch die Insertion des Decapeptids zwischen L⁷⁷ und S⁷⁸ vollständig verloren (Dinculescu et al. 2002). Neben der Phospho-

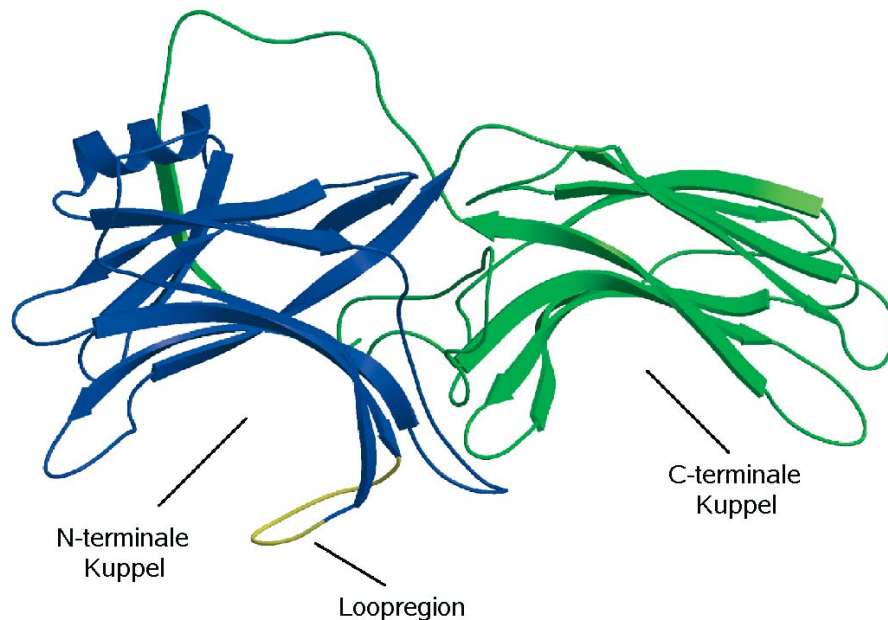


Abbildung 1.4: Kristallstruktur des Arrestins. Kristallstruktur des freien Arrestins (Aminosäuren 6 bis 388, J. Granzin, nicht publiziert) besteht aus einer N-terminalen Kuppel (blau) und einer C-Terminalen Kuppel (grün), die jeweils aus zwei antiparallelen vier- bis fünfsträngigen β -Faltblättern bestehen. An der N-terminalen Kuppel befindet sich auf der konvexen Seite zusätzlich eine kurze α -Helix. Die Loopregion G⁶⁸ bis S⁷⁸ zwischen den β -Strängen V und VI (gelb) wird zur Zeit als Teil der Aktivierungserkennungsstelle diskutiert.

rylierungserkennungsstelle scheint es deshalb noch eine weitere Rezeptorerkennungsstelle zu geben, die mit den cytoplasmatischen Loops des Rhodopsins interagiert. Sie wird auch Aktivierungserkennungsstelle genannt (Gurevich & Benovic 1993).

Über intramolekulares Fluoreszenzquenching und EPR-Analysen markierter Arrestinmutanten konnte gezeigt werden, dass der Loop zwischen den β -Strängen V und VI während der Bindung an aktiviertes Rhodopsin eine Konformationsänderung erfährt und in die Rezeptorbindung involviert ist (Sommer et al. 2005; Sommer et al. 2007).

Der genaue Mechanismus der Arrestin-Rhodopsin-Interaktion ist bisher nicht bekannt, allerdings werden in der Literatur verschiedene Modelle propagiert. Es wird u. a. diskutiert, ob Arrestin ein individuelles Rezeptormolekül oder ein Rhodopsindimer bindet. Sterisch könn-

ten beide Kuppeln des Arrestinmoleküls bei der Rezeptorbindung beteiligt sein, wobei jedoch die N-terminale Kuppel favorisiert wird. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, die darauf hindeuten, dass jedes Arrestinmolekül nur ein einzelnes Rhodopsinmolekül bindet (Hanson et al. 2007).

1.4 Die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) - eine Methode nicht nur zur Strukturaufklärung

Die hochauflösende NMR-Spektroskopie ist neben der Methode der Kristallstrukturanalyse ein Verfahren, das Informationen über die atomar aufgelöste dreimensionale Raumstruktur biologischer Makromoleküle liefert. Dreidimensionale Strukturen von Proteinen, Protein-komplexen und Protein-Nukleinsäurekomplexen können dazu beitragen, die Funktionen und Eigenschaften von Proteinen und die damit verbundenen physiologischen Mechanismen aufzuklären. Dazu zählen z. B. strukturelle Änderung, die infolge einer Komplexbildung oder -dissoziation auftreten. Dabei ist ein Verständnis der biochemischen Prozesse auf molekularer Ebene nicht nur von biologischem, sondern auch von medizinischem Interesse und kann die gezielte Suche pharmakologisch wirksamer Substanzen unterstützen.

Das Phänomen der kernmagnetischen Resonanz wurde 1946 erstmalig von Bloch und Purcell unabhängig voneinander nachgewiesen (Bloch et al. 1946; Purcell et al. 1946). Das Verfahren der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) hat sich seit dessen Entdeckung zu einer vielseitigen und leistungsstarken Methode entwickelt.

Der Vorteil der NMR-Spektroskopie gegenüber der Kristallstrukturanalyse liegt darin, dass das zu untersuchende Molekül unter physiologischen Bedingungen in Lösung untersucht werden kann. Neben der Strukturbestimmung können daher auch die dynamischen Eigenschaften innerhalb einer großen Zeitskala (ps bis s) untersucht werden, wie z. B. Faltungsprozesse und Ligandinteraktionen.

Bei der NMR-Spektroskopie werden möglichst viele strukturelle Informationen aus den aufgenommenen NMR-Spektren gesammelt (sogenannte struktureinschränkende Parameter), die den aufgrund der kovalenten Geometrie theoretisch möglichen Konformationsraum des Biopolymers weiter einschränken. Diese liegen vorwiegend in Form von Abstandseinschränkungen zwischen Protonen aus NOE-Kreuzresonanzen vor und werden aus Kern-Overhauser-Effekt-Experimenten (NOE-Spektroskopie) gewonnen. Beschränkungen der Torsionswinkel

aus skalaren Kopplungskonstanten können zusätzlich durch spezielle NMR-Experimente zur Einschränkung des theoretisch möglichen Konformationsraums beitragen. Im letzten Schritt werden mittels Distanzgeometrie bzw. Molekulardynamik-Simulationen Strukturmodelle berechnet, die im Einklang mit allen experimentell gewonnenen NMR-Daten stehen und bei denen im idealen Fall keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Strukturschar zu beobachten sind.

Eine weitere bedeutende Entwicklung der letzten Jahre ist die Verwendung von Restdipolkopplungen (RDC, engl. *residual dipolar coupling*) innerhalb partiell orientierter Proteine (Tjandra & Bax 1997). Diese sind eine wichtige Quelle der Strukturinformation und geben Auskunft über die relative Orientierung von Untereinheiten oder Liganden in Bezug zum Bindungspartner.

Die Größe der untersuchten Moleküle ist für die Flüssig-NMR nach oben beschränkt. Die effektive Rotationskorrelationszeit τ_c , welche die thermische Bewegung des untersuchten Biomoleküls charakterisiert, nimmt stark mit dem Molekulargewicht des untersuchten Moleküls zu. Die daraus resultierende transversale Spinrelaxation verursacht erhebliche Linienverbreiterungen und führt zur Verringerung der spektralen Auflösung oder sogar dem vollständigen Signalverlust. Zusätzlich limitiert die schnelle transversale Spinrelaxation die Länge der Pulssequenz, wodurch ein effizienter Polarisationstransfer verhindert wird. In erster Linie schränkt die schnelle transversale Spinrelaxation in großen protonierten Molekülen jedoch die Anwendung konventioneller Flüssig-NMR-Pulssequenzen auf Moleküle mit weniger als 30 kDa ein. Deshalb werden dreidimensionale Strukturen großer Moleküle oder Molekülkomplexe meistens mit der Röntgenkristallographie oder seit einiger Zeit auch mit der Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Methodische Entwicklungen auf dem Gebiet der Flüssig-NMR-Spektroskopie in den letzten Jahren eröffneten jedoch die Möglichkeit, immer größere Moleküle sowie Molekülkomplexe mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie zu analysieren und ließen eine präzisere Berechnung von Raumstrukturmodellen zu.

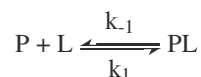
Die Entwicklung und Anwendung der 2D-NMR-Spektroskopie (Aue et al. 1976; Jeener 1976) ermöglichte zunächst die Auflösung überlagerter Resonanzen. Durch verschiedene Korrelationsmöglichkeiten zwischen einzelnen Kernspins wurden erstmals vollständige Resonanzzuordnungen ermöglicht (Wagner & Wüthrich 1982). Die Verfahren der uniformen Isotopenanreicherung, mit den in der Natur nur selten vorkommenden Isotopen ^{15}N und ^{13}C , durch bakterielle Überproduktion der Proteine (McIntosh & Dahlquist 1990; LeMaster 1994) und die Weiterentwicklungen in der Technik der verwendeten Spektrometer sowie stärkere Magnetfelder mit supraleitenden Magneten, gepulste Magnetfeld-Gradienten (Kay 1995) und ge-

formte RF-Pulse zur selektiven Anregung einzelner Spektralbereiche ermöglichten die Entwicklung neuartiger, höherdimensionaler (3D/4D) ^1H - ^{13}C - ^{15}N -Tripelresonanz-Experimente (Montelione & Wagner 1990; Kay et al. 1990; Bax 1994). Die Experimente erlauben durch eine weitere Erhöhung der Signaldispersion sowie durch konformationsunabhängige Spinkorrelationen sequentiell benachbarter Aminosäuren eine unkompliziertere und eindeutige Resonanzzuordnung gerade bei größeren, komplexen Molekülen.

Zu weiteren Entwicklungen, die der Größenlimitierung in der NMR-Spektroskopie entgegenwirken, tragen Methoden der partiellen oder vollständigen Deuterierung von Molekülen (LeMaster 1994; Gardner & Kay 1998) und die Anwendungen von TROSY (*transverse relaxation optimized spectroscopy*)-basierten NMR-Techniken (Pervushin et al. 1997; Wüthrich 1998), CRINEPT (Riek et al. 1999) oder CRIPT-TROSY (Fiaux et al. 2002) bei. Erst kürzlich konnte die Lösungsstruktur des 32 kDa großen Ionenkanals VDAC-1 in Detergenzmizellen gelöst werden (Hiller et al. 2008). Dieser Komplex hatte ein Gesamtmolekulargewicht von 75 bis 90 kDa. Des Weiteren konnten mit diesen Methoden Resonanzzuordnungen von Komplexen mit einem Molekulargewicht größer als 100 kDa erreicht werden (Fiaux et al. 2002). Die Identifikation von Bindungsflächen zwischen Proteinen größer als 150 kDa konnte mit *Cross-Saturation* (Takahashi et al. 2000) und *Transfer Cross-Saturation* (Nakanishi et al. 2002) ermöglicht werden.

1.5 Austausch basierte NMR-Methoden

Die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten struktureinschränkende Parameter waren der transferierte Kern-Overhauser-Effekt (TrNOE) und die transferierte Restdipolkopplung (TrRDC). Diese Parameter liefern Informationen über die Struktur und die Orientierung eines kleinen Liganden im Komplex mit einem großen Protein. Der Ligand muss in einem großen Überschuss vorliegen und sich im schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form befinden. Obwohl die Anzahl der freien Liganden in Lösung viel höher ist als die gebundene Form, erhält man trotzdem Informationen über den gebundenen Liganden. Das Austauschgleichgewicht wird beschrieben durch:



mit k_1 Hingeschwindigkeitskonstante und k_{-1} Rückgeschwindigkeitskonstante sowie P freies Protein, L freier Ligand und PL Komplex aus Protein und Ligand.

1.5.1 TrNOE - wie ist ein kleiner Ligand im Komplex mit einem großen Protein gefaltet?

Das TrNOE-Experiment liefert Information über die Struktur eines kleinen gebundenen Liganden, der sich im schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form befindet (Clare & Gronenborn 1983). Der gebundene Zustand liefert praktisch eine „chemische Amplifikation“ des NOEs.

Das Prinzip des TrNOE-Experimentes sei hier an einem einfachen Zweispinsystem erklärt. Beide Spins sind Protonen eines Liganden, der sich im schnellen Austausch zwischen einer freien und einer gebundenen Form befindet.

Die Kreuzrelaxationsrate σ^B eines langsam rotierenden Komplexes aus Protein und Ligand ist generell sehr viel größer als die Kreuzrelaxationsrate σ^F des schnell rotierenden freien Liganden. Befindet sich der Ligand im schnellen Austausch bezogen auf die Relaxationszeitskala wird die gemittelte Kreuzrelaxationsrate $\langle\sigma\rangle$ von σ^B dominiert. $\langle\sigma\rangle$ ist das gewichtete Mittel der Kreuzrelaxationsrate und wird beschrieben durch:

$$\langle\sigma\rangle = N^F \sigma^F + N^B \sigma^B \quad (1.1)$$

N^F bzw. N^B stehen dabei für die Anzahl der Liganden in der freien bzw. gebundenen Form. Um die Bedingung zu erfüllen, dass $\langle\sigma\rangle$ von σ^B dominiert wird, muss folgende Ungleichung gelten:

$$|N^B \sigma^B| \gg |N^F \sigma^F| \quad (1.2)$$

Diese Bedingung ist u. a. abhängig von der Dissoziationskonstanten K_D des Komplexes sowie dem Verhältnis der Korrelationszeiten τ_c des freien und gebundenen Liganden. τ_c ist die Zeit, die ein Molekül für eine Rotation um 1 rad um eine beliebige Achse benötigt.

Betrachtet man den Fall, dass der Ligand nur sehr schwach an das Protein bindet, dann ist die Anzahl der gebundenen Liganden N^B klein. Die Population der gebundenen Liganden ist zu gering, um signifikant zur Kreuzrelaxation beizutragen. Die Ungleichung wird nicht mehr

ausreichend erfüllt. Der TrNOE wird folglich verschwindend klein, so dass kein Signal mehr detektiert werden kann.

Die Grenzen des K_D , bei welchen ein TrNOE-Experiment durchgeführt werden kann, variieren jedoch von Fall zu Fall. Sie sind abhängig vom Verhältnis zwischen den Kreuzrelaxationsrate σ^B und σ^F . Je größer ein Komplex ist, desto langsamer bewegt er sich und desto größer wird τ_c (z. B. 200 kDa, $\tau_c \approx 90$ ns) und umso größer wird der Betrag von σ^B . In den meisten Fällen werden Peptidliganden mit kleinem τ_c verwendet (z. B. 1 kDa, $\tau_c \approx 0,4$ ns). Für einen relativ großen Komplex aus Protein und einem kleinen Peptidliganden sind diese Bedingungen demnach einfach erfüllt.

Betrachtet man nun den Fall, dass der Ligand zu stark bindet, ist der TrNOE ebenfalls von der Austauschrate zwischen freier und gebundener Form des Liganden abhängig. Sie sollte hinreichend groß sein, um einen ausreichenden Magnetisierungstransfer zwischen beiden Formen zu gewährleisten. D. h., dass die Geschwindigkeitsrate der Rückreaktion größer als die Spingitter-Relaxationsrate T_1 des gebundenen Zustands sein muss:

$$k_{-1} \gg T_1 \quad (1.3)$$

Der Bereich, in welchem der K_D und damit k_{-1} liegen kann, ist demnach stark limitiert. Um ein TrNOE-Experiment durchführen zu können, sollte der K_D im mikro- bis millimolaren Bereich liegen (Neuhaus & Williamson 2000).

1.5.2 TrRDC – wie ist ein Ligand im Komplex mit einem großen Protein orientiert?

Dipolare Spin-Spin-Kopplungen zweier interagierender Kerne sind abhängig von der Länge und Orientierung des Bindungsvektors in Bezug auf die Richtung des äußeren Magnetfeldes (Tjandra & Bax 1997). Proteine mit kleinem bis mittlerem Molekulargewicht mit einer kurzen Korrelationszeit τ_c verhalten sich im Magnetfeld isotrop, so dass anisotrope Spin-Spin-Wechselwirkungen vollständig ausgemittelt werden. Dies gilt auch für die dipolare Kopplung und deshalb sind keine Strukturinformationen erhältlich. Kleine sogenannte Restdipolarkopplungen (RDC, engl. *residual dipolar coupling*) können beobachtet werden, wenn sich das Molekül im Magnetfeld geringfügig ausrichtet, d. h. sich leicht anisotrop bewegt (Tolman et al. 1995).

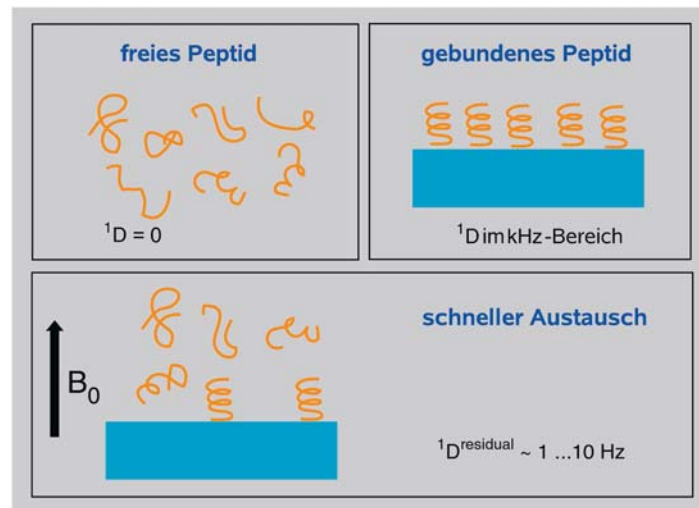


Abbildung 1.5: Schema des Prinzips eines TrRDC-Experimentes mit Diskmembranen. **A** Dipolare Kopplungen innerhalb eines sich isotrop bewegenden Peptids in Lösung mitteln sich aus. **B** Eine spezifische Bindung des Peptids an Rhodopsin kann eine definierte Struktur und dipolare Kopplungen im kHz-Bereich induzieren. Die dipolaren Kopplungen können mit Flüssig-NMR nicht detektiert werden. **C** Bindet das Peptid jedoch mit einem K_D im mikro- bis millimolaren Bereich an das makroskopisch ausgerichtete Rhodopsin, können Restdipolkopplungen beobachtet werden. Sie sind ein über die Zeit gewichtetes Mittel der freien und gebundenen Form und enthalten Information über Struktur und Orientierung des gebundenen Peptids. TrNOE-Experimente laufen nach einem ähnlichen Prinzip ab. Dafür ist jedoch eine makroskopische Ausrichtung des komplexbildenden Proteins nicht notwendig.

Richten sich die Moleküle sehr stark im Magnetfeld aus, nehmen die RDC Beträge in der Größenordnung einiger kHz an, die nur mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie gemessen werden können.

Um die Orientierung eines kleinen Liganden während der Bindung an ein großes makroskopisch ausgerichtetes Protein zu bestimmen, ist es möglich, sogenannte transferierte Restdipolkopplungen (TrRDC) zu messen. Dabei muss der Ligand in großem Überschuss vorliegen und sich im schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form befinden. Eine experimentell gemessene TrRDC ist ein über die Zeit gewichtetes Mittel der dipolaren Kopplung der freien und gebundenen Form. Die RDC des freien Liganden ist 0. Bei einem schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form, ist die gemessene TrRDC, die mit einem Skalierungsfaktor < 1 multiplizierte RDC des gebundenen Zustands. Sie enthält wichtige In-

formationen über die Struktur, vor allem aber über die Orientierung eines Liganden in seiner gebundenen Form.

Die gemessene RDC zweier Kerne P und Q ist direkt proportional zum Winkel θ zwischen dem durch die Kerne gespannten Vektor und der Orientierung des äußeren Magnetfeldes. Sie wird beschrieben durch:

$$D_{PQ}(\theta) = SD_a^{PQ}(3\cos^2\theta - 1) \quad (1.4)$$

Dabei ist S ein Ordnungsparameter der inneren Molekülbewegung und D_a^{PQ} die Größe des Restdipolkopplungstensors, welcher wiederum abhängig vom Grad der Ausrichtung des Peptids ist (Koenig et al. 2002). Dipolare Einbindungskopplungen können mit einem 2D-HSQC-Experiment gemessen werden, bei welchem kein refokussierender Puls in der indirekten Dimension integriert ist. Im NMR-Spektrum erscheinen RDC als Beitrag zur skalaren J-Kopplung, die Größe kann negativ oder positiv sein und wird ermittelt, indem die Differenz zwischen anisotropen und isotropen Bedingungen berechnet wird.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, Proteine im Magnetfeld auszurichten. Dazu werden u. a. filamentöse Bakteriophagen, Bicellen und Polyacrylamidgele verwendet (Stangler et al. 2006). Aufgrund der zahlreichen membrandurchspannenden α -Helices der in der Diskmembran inkorporierten Rhodopsinmoleküle richten sich auch Diskmembranen mit einem Molekulargewicht von einigen GDa im starken Magnetfeld spontan aus.

Im Falle der TrRDC-Messungen eines Peptid-Rhodopsin-Komplexes verhält es sich wie folgt. Im dunkeladaptierten Zustand verhält sich das Peptid isotrop und man detektiert nur die J-Kopplung. Bindet das Peptid nun nach der Lichtaktivierung an Rhodopsin ist es im anisotropen Zustand. Befindet es sich im schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form, entspricht die Differenz zwischen der Kopplung im dunkeladaptierten Zustand und der Kopplung nach der Photoaktivierung der TrRDC des Rhodopsin gebundenen Peptids (Koenig et al. 2000).

TrRDC und RDC im Allgemeinen geben zusätzliche Information zu den standardmäßig gemessenen struktureinschränkenden Parametern. Während der TrNOE Informationen über lokale Distanzeinschränkungen liefert, handelt es sich bei den TrRDC um Informationen zur relativen Orientierung von Bindungsvektoren, also um langreichweitige Strukturinformationen. Zusammen können sie wichtige Informationen über Struktur und Orientierung eines Liganden im Komplex mit einem Protein liefern.

1.5.3 Rhodopsin-Ligand-Komplexe - Strukturaufklärung anhand von TrNOE und TrRDC

Bisher konnten mit der TrNOE-Methode Strukturen von Transduzin-Peptiden im Komplex mit lichtaktiviertem Rhodopsin bestimmt werden.

Erstmals wurde von Dratz et al. (1993) die Struktur des C-terminalen T_α (340-350)-Peptids bestimmt. Sie konnten zeigen, dass eine α -helikale Konformationsänderung durch die Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin induziert wird und das Peptid die MetaII stabilisierende Wirkung der T_α -Untereinheit simuliert. Eine limitierte Anzahl an TrNOE aufgrund einer geringen Magnetfeldstärke sowie indirektem Magnetisierungstransfer wegen einer zu starken Bindung des Peptids an den Rezeptor verhinderten jedoch eine detaillierte Strukturbestimmung. Kisselev et al. (1998) konnten für das gleiche Peptid nach der Bindung an lichtaktiviertes Rhodopsin eine α -helikale Region gefolgt von einem α_L -type capping Motif beobachten.

Koenig et al. (2002) untersuchten ein T_α (340-350)-Analogon und konnten erstmals durch die zusätzliche Messung von TrRDC eine Orientierung des Peptids relativ zur Membrannormalen bestimmen. Das α_L -type capping Motif konnte bestätigt werden, jedoch traten kleine strukturelle Unterschiede bei den Seitenketten auf. Dies kann auf unterschiedliche Gründe zurückgeführt werden. Über die höhere Magnetfeldstärke und die damit verbundene höhere Auflösung der NOESY-Spektren konnten mehrere Signale erstmals eindeutig zugeordnet werden. Der Austausch zweier Aminosäuren (K341R und C347S) bedingte eine geringere Bindungsaffinität des Peptids zum lichtaktivierten Rezeptor und reduzierte so die Möglichkeit des indirekten Magnetisierungstransfers. Zusätzlich führte die Messung der TrRDC zu einer Verringerung der systematischen Messfehler, da Strukturparameter mit zwei unabhängigen Methoden bestimmt wurden, was ein entscheidender Faktor bei der Strukturverfeinerung war.

Bei einer weiteren Studie wurde mittels TrNOE-Experimenten ein Peptid untersucht, welches dem farnesylierten C-terminalen Ende der T_γ -Untereinheit entspricht (farnesyliertes T_γ (60-71)). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung an den photoaktivierten Rezeptor eine amphipatische Helix induziert wird (Kisselev & Downs 2003).

Des Weiteren wurde die Interaktion zwischen Arrestin und einem synthetischen C-terminalen Rhodopsin-Peptid mit sieben Phosphatgruppen (7PP) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass das freie Peptid in Lösung unstrukturiert ist und sich erst durch die Bindung an Arrestin signifikante Konformationsänderungen einstellen (Kisselev et al. 2004).

Neben der Kristallstruktur eines Komplexes aus Opsin mit einem C-terminalen T_α -Peptid (Scheerer et al. 2008), sind die über TrNOE und TrRDC gewonnenen Strukturinformationen, die

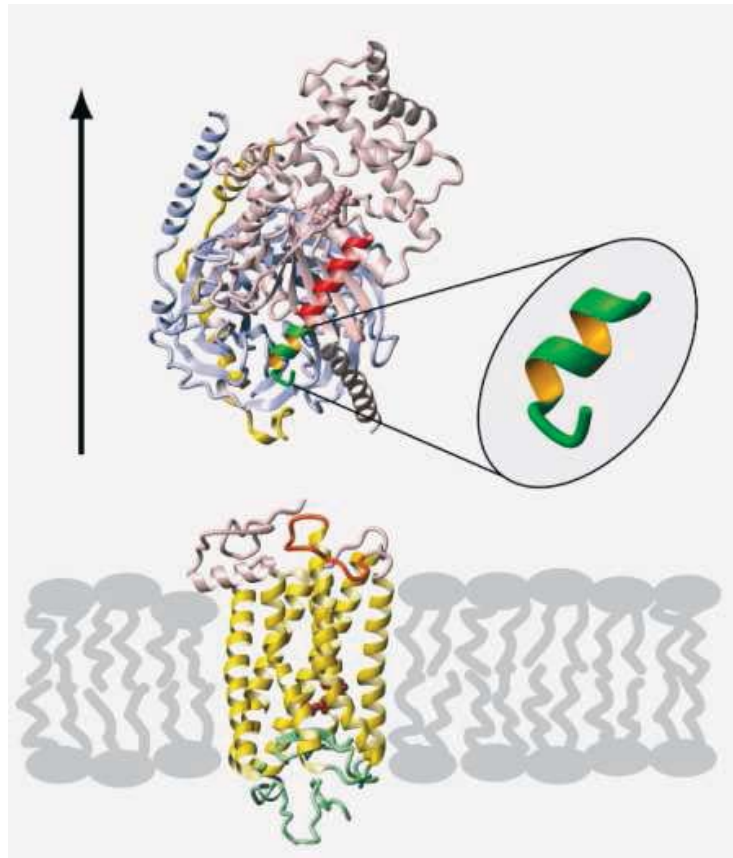


Abbildung 1.6: Modell der Metall-Transduzin-Interaktion. Die Bändermodelle basieren auf der Kristallstruktur des Rhodopsins im Grundzustand (Palczewski et al. 2000) und der Kristallstruktur des Transduzins (Lambright et al. 1996). In der Kristallstruktur ist der C-Terminus des Transduzins unstrukturiert. Hier wird die T_{α} (340-350)-Sequenz durch die NMR-Struktur des S2-Peptids (grün) ersetzt. Die relative Orientierung des Peptids zur Membrannormalen wurde über TrRDC-Messungen bestimmt (Koenig et al. 2002).

einzigsten Modelle, die zur Zeit zur dreidimensionalen Strukturaufklärung der Komplexe zwischen Rhodopsin und dessen Wechselwirkungspartnern beitragen. Die in dieser Arbeit mittels TrNOE-Experimenten ermittelte Struktur ist die erste eines Arrestin-Peptids im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin.

1.6 Nanodisks - ein vielfältiges Modellmembran-System

Nanodisks sind scheibchenförmige Modellmembranen mit einem Durchmesser von ungefähr 10 nm. Sie bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht mit ca. 150 bis 200 Lipidmolekülen, die durch das sogenannte *Membrane Scaffold Protein 1* (MSP1) zusammengehalten wird (Bayburt et al. 2002). MSP1 ist ein verkürztes Fragment des Apolipoproteins A1 und bildet zahlreiche amphipatische Helices. Festkörper-NMR-Messungen und Moleküldynamik-Rechnungen an leeren Nanodisks (d. h. ohne inkorporiertes Membranprotein) zeigten, dass diese Helices, ähnlich einem Gürtel, ein scheibchenförmiges Lipiddoppelschicht-Fragment umschließen. Zwei parallele MSP1-Moleküle bilden demnach die Peripherie einer Nanodisk (Li et al. 2006; Shih et al. 2008). Es konnten bereits mehrere Transmembranproteine, wie z. B. Bakteriorhodopsin (Bayburt et al. 2006), verschiedene Cytochrome P450 (Duan et al. 2004; Kijac et al. 2007) sowie der β -adrenerge Rezeptor (Leitz et al. 2006) inkorporiert und u. a. mittels Festkörper-NMR untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Membranproteine in der gewählten Lipidumgebung ihre enzymatische Aktivität behalten. Rhodopsin konnte ebenfalls erfolgreich in Nanodisks inkorporiert werden. Dabei wurden sowohl Modellmembranen mit Rhodopsinmonomeren als auch mit Rhodopsindimeren hergestellt. Diese Populationen wurden getrennt voneinander auf ihr Wechselwirkungsverhalten mit Transduzin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein einzelnes Rhodopsin die Fähigkeit besitzt, nach der Photoaktivierung einen stabilen Komplex mit Transduzin zu bilden. Im Falle der Nanodisk-Population, die ein integriertes Dimer enthielten, wurde gezeigt, dass nur ein Rhodopsin mit Transduzin wechselwirkt (Bayburt et al. 2006). Dies war u. a. ein Hinweis, dass eine Dimerisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren nicht unbedingt eine notwendige Rolle bei der Signaltransduktion spielt.

Nanodisks stellen ein sehr interessantes Modellmembransystem dar. Einerseits können Membranproteine in ihrer nativen Lipidumgebung untersucht werden, da die Lipidzusammensetzung einer Nanodisk variiert werden kann. Das besondere dieser Modellmembranen ist jedoch deren scheibchenförmige Gestalt. Dadurch sind die nicht transmembranen Domänen der inkorporierten Membranproteine auf beiden Seiten der Lipiddoppelschicht für mögliche Wechselwirkungspartner frei zugänglich. Bei einer klassischen Form der Modellmembranen, den Liposomen, verhält es sich anders. Hier muss man davon ausgehen, dass die Wahrscheinlichkeit der richtigen Orientierung des Membranproteins nur bei 50 % liegt.

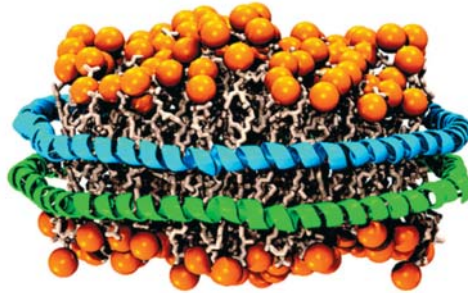


Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau einer leeren Nanodisk. Nanodisks sind künstliche Modellmembranen mit einem Durchmesser von ca. 10 nm. Sie bestehen aus einer Phospholipiddoppelschicht aus ca. 150 bis 200 Lipidmolekülen (rot und orange: hydrophile Lipidkopfgruppen), die durch das sogenannte *Membrane Scaffold Protein 1* (MSP1) zusammengehalten wird (Bayburt et al. 2002). Zwei MSP1-Moleküle (grün und blau), die zahlreiche amphipathische Helices bilden, umschließen das scheibchenförmige Lipiddoppelschichtfragment (Li et al. 2006; Shih et al. 2008).

Zur dreidimensionalen Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie werden Membranproteine meist nicht in ihrer nativen Lipidumgebung untersucht. Generell werden Detergenzien verwendet, um den hydrophoben Transmembranbereich abzuschirmen und die Membranproteine in Puffer löslich zu halten. Leider reagieren Membranproteine häufig sehr empfindlich auf Detergenzien und sind in Detergenzlösungen oft inaktiv oder instabil.

Eine weitere Möglichkeit für NMR-Untersuchungen von Membranproteinen in detergentfreier Lösung sind sogenannte Amphipol-Moleküle. Dies sind kurze amphipatische Polymere, die an die hydrophobe Transmembranoberfläche binden (Tribet et al. 1996). Bisher konnte gezeigt werden, dass die durch Amphipols komplexierten Membranproteine ihren nativen Charakter beibehalten und über längere Zeit stabil sind (Zoonens et al. 2005; Zoonens et al. 2007; Gohon et al. 2008). Nanodisks stellen eine Alternative zu Detergenzien, Liposomen und anderen amphiphilen Komponenten dar. Sie bewahren einerseits die Lipidumgebung der Membranproteine, andererseits sind Nanodisks kleine Modellmembranen, die aufgrund der umschließenden amphipatischen Helices des MSP1 in wässriger Lösung mit zahlreichen biophysikalischen Methoden untersucht werden können.

2 Zielsetzung

Im menschlichen Genom codieren mehr als 950 Gene für G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Sie erkennen extrazelluläre Signale und übermitteln diese ins Zellinnere. Erkrankungen, die mit diesen Rezeptoren in Verbindung gebracht werden, reichen über Allergien, Schmerzen, Bluthochdruck bis zur Schizophrenie. Aufgrund ihrer medizinischen Relevanz ist es von besonderem Interesse, die Regulationsmechanismen dieser Rezeptoren im Detail zu verstehen. Die dreidimensionale Strukturaufklärung gilt als Grundlage zum Verständnis biologischer Prozesse. Bisher sind jedoch noch keine dreidimensionalen Strukturen eines GPCR mit dessen regulatorischen Proteinen bekannt.

Bei der visuellen Signalkaskade sind die Interaktionen zwischen dem GPCR Rhodopsin und den Proteinen Transduzin und Arrestin von entscheidender Bedeutung. Transduzin bindet nach der Photoaktivierung des Rezeptors an die katalytisch aktive Form des Rhodopsins und übernimmt dadurch die Funktion der Signalamplifikation. Arrestin hingegen übernimmt gegen Ende des Photozyklus die Termination der Signalkaskade, indem es phosphoryliertes Rhodopsin bindet und eine Interaktion mit anderen Proteinen sterisch verhindert. Bisher wurde noch keine dreidimensionale Struktur der aktiven Komplexe zwischen Rhodopsin und Transduzin bzw. Arrestin bestimmt.

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung einer atomar aufgelösten Struktur einer Binderegion zwischen Transduzin bzw. Arrestin im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin. Dies sollte anhand eines Peptidanalogs zu dieser Binderegion mittels TrNOE-Messungen erfolgen. Voraussetzung für diese NMR-Methode war, dass sich das Peptid im schnellen Austausch zwischen einer freien und einer Rhodopsin gebundenen Form befindet. Zunächst sollten Peptide bereits bekannter Bindestellen des Transduzins und Arrestins ausgewählt und auf deren Eignung für TrNOE-Experimente geprüft werden.

Neben der Strukturaufklärung, sollte das geeignete Peptide zusätzlich isotonenangereichert rekombinant hergestellt werden. Mittels zweidimensionaler ^1H - ^{15}N -HSQC- und ^1H - ^{13}C -CT-HSQC-Spektren sollten die TrRDC des Peptides in Abhängigkeit der Zeit nach der Photoaktivierung des Rezeptors bestimmt werden. Damit sollte herausgefunden werden, ob sich dieses

Peptid für die Bestimmung der Orientierung im Komplex gebundenen Zustand eignet. Die gewonnenen Informationen über die Struktur der entsprechenden Binderegion sollte dazu beitragen, mögliche Modelle des Mechanismus der visuellen Signalkaskade zu diskutieren.

Des Weiteren sollte ein Modellmembran-System etabliert werden, das sich zu Untersuchung rekombinanter Membranproteine in deren nativer Lipidumgebung eignet. Dieses System sollte den Anforderungen entsprechen, NMR-Messungen an Ligand-Proteinkomplexen mittels TrNOE-Messungen in nativer Lipidumgebung durchführen zu können.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen, sofern nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad *pro analysi* (p. a.) und werden im Allgemeinen von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen. Das verwendete Wasser entstammt einer hauseigenen *Milli-Q-Biocell-System*-Wasseranlage mit einem nachgeschalteten Millipak-20-Filter (Millipore GmbH, Schwalbach) und wird im Folgenden als $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ bezeichnet. Angesetzte Lösungen werden durch 0,22 μm -Membranfilter (Schleicher & Schuell Bio Science GmbH, Dassel) sterilfiltriert und soweit möglich vor ihrer Verwendung 20 min bei 120 °C autoklaviert.

3.1.1 Verwendete Peptide

Die in Tabelle 3.1 aufgelisteten Peptide werden über Festkörpersynthese von der Gruppe von Dr. P. Henklein (Charité, Berlin) hergestellt. Dabei wird die Fmoc-Strategie (Chan & White 2000) an einem ABI Model 433 Peptidsynthesizer verwendet. Nach Abspaltung vom Trägerharz werden die Peptide per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gereinigt und anschließend mittels Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) überprüft. Bis zur Verwendung werden die Peptide in lyophilisierter Form bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.1: Verwendete Peptide zur Untersuchung des Wechselwirkungsverhaltens mit lichtaktiviertem Rhodopsin. Angegeben sind die Bezeichnungen der Peptide mit deren Sequenzpositionen in der α -Untereinheit des Transduzins (T_α)- bzw. im Arrestin (Arr)-Molekül, deren Aminosäuresequenzen sowie deren Molekulargewichte. Das mit * gekennzeichnete Peptid S2 weist die Mutationen K341R und C347S auf, *myr* bedeutet myristoylierter N-Terminus.

Peptid mit Arr-Sequenz	Aminosäuresequenz	M_W [Da]
Arr(51-70)	LVKGKRVYVSLTCAFRYGQE	2317,7
Arr(231-250)	EKTVKKIKVLVEQVTNVVLY	2330,8
Arr(66-80)	RYGQEDIDVMGLSFR	1785,9
Arr(152-170)	FATHSTDVEEDKIPKSSV	2118,3
Arr(232-245)	KTVKKIKVLVEQVT	1613,0
Arr(251-262)	SSDYIYIKTVAAE	1346,4
Arr(342-354)	LTSSEVATEVPFR	1435,6
Arr(65-77)	FRYGQEDIDVMGL	1542,7
Arr(65-76)	FRYGQEDIDVMG	1429,5
Arr(67-77)	YGQEDIDVMGL	1239,3
Peptid mit T_α -Sequenz		
T_α (2-28)	GAGASAEKHSRELEKKLKEDAEDAR	2983,0
T_α (2-25) <i>myr</i>	<i>Myr</i> -GAGASAEKHSRELEKKLKEDAEDAK	2851,0
T_α (311-323)	DVKEIYSHMTCAT	1497,7
T_α (340-350)*	IRENLKDSGLF	1293,5

3.1.2 Bakterienstämme und Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme gehören zu der Art *Escherichia coli* (*E. coli*). Zur Klonierung der Genkonstrukte sowie zur DNA-Gewinnung werden *E. coli* XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, USA) oder *E. coli* Mach1-T1 (Invitrogen, Karlsruhe) Bakterienzellen verwendet, während zur Proteinüberexpression *E. coli* BL21 DE3 (Invitrogen, Karlsruhe) Bakterienzellen verwendet werden. Die Genotypen der Bakterienstämme sind in Tabelle 3.2 beschrieben. Alle in dieser Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind inklusive ihrer

Tabelle 3.2: Genotypen und Referenzen der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
Mach1-T1	$F^- \phi 80(lacZ)\Delta M15 \Delta lacX74$ $hsdR(r_K^- m_K^-) \Delta recA1398 endA1 tonA$	Invitrogen
XL10-Gold	$Tet^r \Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1$ $supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$ [F ⁺ <i>proABlacI^qZ</i> $\Delta M15 Tn10$ (Tet ^r)Amy Cam ^r]	Stratagene
BL21DE3	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)	Grodberg & Dunn (1988)

Bezeichnungen, Antibiotikaresistenzen sowie deren Eigenschaften in Tabelle 3.3 aufgelistet. Das Plasmid pTKK19xb/ub_Jue2 wird zur Herstellung des Peptids Arr(66-80) (s. Kap. 3.7) verwendet, während das Plasmid pET28a_MSP1 für die Herstellung des Proteins MSP1 (s. Kap. 3.9) verwendet wird.

Tabelle 3.3: Bezeichnungen, Antibiotikaresistenzen und Eigenschaften der verwendeten Plasmide

Plasmid	Resistenz	Eigenschaft	Referenz
pTKK19xb/ub	Kan	Expressionsvektor	Kohno et al. (1998)
pTKK19xb/ub_Jue2	Kan	kodierend für 10His-Ubi-Arr(66-80)	diese Arbeit
pET28a	Kan	Expressionsvektor	Novagen
pET28a_MSP1	Kan	kodierend für 6His-MSP1	diese Arbeit

3.2 Proteinnachweis

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteine erfolgt durch Trennung mittels einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970). Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an Proteine an, so dass die Proteinladung abgeschirmt wird und dadurch anionische Partikel entstehen. Durch das Anlegen einer Spannung erfolgt eine Trennung der Proteine im Polyacrylamidgel nach Ladung pro Masse. Es wird eine Gelelektrophoreseeinheit Hoefer Mighty Small SE 260 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) mit $10 \times 10,5 \text{ cm}^2$ Vertikalplatten verwendet. Zur Abschätzung der Proteinmasse der beobachteten Banden wird der *Protein Molecular Weight Marker* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet und jeweils 5 μl davon in einer zusätzlichen Spur auf das Gel aufgetragen. Folgende Gele und Puffer werden für die SDS-PAGE hergestellt und verwendet:

5% Sammelgel

16,8% (v/v)	Acrylamid (30%)
125 mM	Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v)	SDS
0,1% (w/v)	APS
0,1% (w/v)	TEMED

15% Trenngel

50% (v/v)	Acrylamid (30%)
375 mM	Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (w/v)	SDS
0,1% (w/v)	APS
0,4% (w/v)	TEMED

SDS-Laufpuffer

385 mM	Glycin
50 mM	Tris-HCl, pH 8,3
0,1% (w/v)	SDS

4x-Probenpuffer

200 mM	Tris-HCl, pH 6,8
40% (v/v)	Glyzerin
8% (w/v)	SDS
8% (v/v)	β -Mercaptoethanol
3 mg/ml	Bromphenolblau

3.2.2 Coomassiefärbung

Der Nachweis der Proteine im Gel erfolgt über eine Färbung mit dem Farbstoff Coomassie. Diese Färbemethode eignet sich für Proteinmengen oberhalb 200 ng/Bande (Rehm 2006). Nach der Elektrophorese wird das Trenngel in ca. 100 ml Coomassie-Färbelösung für 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird das Gel in $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ entfärbt. Der Entfärbevorgang kann durch Erhitzen des $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ in der Mikrowelle beschleunigt werden. Die Dokumentation erfolgt mit dem Gerät Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München).

Coomassie-Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol
	10 % Essigsäure
	0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250
	in $\text{H}_2\text{O}_{dest}$

3.2.3 Silberfärbung

Bei Proben, die weniger als 1 μg Protein pro Bande enthalten, erfolgt der Nachweis der Proteine im Gel über eine Silberfärbung nach Merrill et al. (1981) und Heukeshoven & Dernick (1985). Nach deren Angaben liegt die Nachweisgrenze bei ca. 0,5 bis 1 ng Protein/Bande, die jedoch nach eigener Erfahrung nicht vollständig erreicht wird. Die untenstehende Tabelle 3.4 zeigt die aufeinanderfolgenden Schritte, d. h. in welcher Lösung das zu färbende Gel entsprechend lange geschüttelt wird. Die Dokumentation erfolgt ebenfalls mit dem Gerät Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München).

Tabelle 3.4: Abfolge der Arbeitsschritte der Silberfärbung eines SDS-Polyacrylamid-Gels

Arbeitsschritt	Inkubationslösung	Inkubationsdauer
Fixierung	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure	mind. 1 h
SDS-Entfernung	10 % Ethanol, 5 % Essigsäure	10 min
Reduzieren und Entfärben	in 100 ml Farmers Reagenz: 50 mg Na ₂ CO ₃ 150 mg K ₃ Fe(CN) ₆ 300 mg Na ₂ S ₂ O ₃	1 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	3 x 20 s
Färben	0,012 M AgNO ₃	20 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	3 x 20 s
Entwickeln	0,28 M Na ₂ CO ₃ 0,05 % Formaldehyd frisch hinzugefügt	bis gewünschte Intensität eintritt
Stoppen	1 % Essigsäure	5 min

3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

3.3.1 Optische Methode

Proteinkonzentrationen werden bestimmt, indem ein UV/Vis-Spektrum im Bereich von 230 bis 350 nm mit einem UV/Vis-Spektrophotometer (Lambda 25, Perkin Elmer; Skelton, USA) aufgenommen wird. Dabei ist die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge $\lambda = 280$ nm für Proteine, die mindestens ein Tryptophan enthalten, bzw. bei einer Wellenlänge $\lambda = 276$ nm für Proteine, die kein Tryptophan aber mindestens ein Tyrosin enthalten von Bedeutung. Die Konzentration wird dann mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet:

$$E_{\lambda} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (3.1)$$

Dabei steht E_{λ} für die Extinktion bei einer Wellenlänge λ in nm, c für die Konzentration in M, ϵ für den molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ und d für die Schichtdicke der Küvette in cm.

3.3.2 Gravimetrische Methode

Die in lyophilisierter, salzfreier Form vorliegenden Peptide, die keine aromatischen Aminosäuren in ihrer Sequenz enthalten, werden mit einer Semimikrowaage CP225D (Sartorius, Göttingen) eingewogen und anschließend mit einem definierten Volumen Puffer versetzt, um eine Lösung mit der gewünschten Peptidkonzentration zu erhalten.

3.4 Diskmembranpräparation

Die nachfolgende Methode zur Präparation der Diskmembranen basiert auf einer Anzahl von 50 Retinae und findet ausschließlich unter Rotlicht (PF 712E, Philips, Niederlande) bzw. in lichtundurchlässigen Transportbehältern statt. Puffer, Lösungen und verwendete Gefäße werden auf 4 °C vorgekühlt und während der Präparation auf Eis gelagert. Die Zentrifugationen werden in einem JA 25.5-Festwinkelrotor (Beckman, Palo Alto, USA) in einer Avanti J-20 XP Zentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA), die Ultrazentrifugationen in einem SW-32Ti-Ausschwingrotor (Beckman, Palo Alto, USA) in einer OptimaXL-Zentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) durchgeführt.

3.4.1 Gewinnung boviner Retinae

Die zur Gewinnung boviner Retinae verwendeten Augen frisch geschlachteter Rinder werden vom Schlachthof Viersen bezogen. Die Augen werden in einem lichtdichten Behälter gesammelt und unmittelbar nach dem Transport unter Rotlicht weiterverarbeitet. Die Rinderaugen werden an der der Netzhaut abgewandten Seite aufgeschnitten. Dann wird der Bulbus umgestülpt, so dass Linse und Glaskörper herausfallen. Die Retina kann nun vorsichtig zum Sehnerv hin zusammengeschoben und dort mit einer Pinzette von diesem entfernt werden. Sie wird sofort in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend in Einheiten zu jeweils 25 Stück in 25 ml 45 %iger Saccharose-Lösung in ROS-Puffer (s. u.) in einem alufolieumwickelten Plastikbehälter bei -80 °C gelagert.

3.4.2 Präparation der äußeren Segmente der Stäbchenzellen

Die Präparation der äußeren Segmente der Stäbchenzellen (engl. *rod outer segments*, ROS) basiert auf einem Protokoll von Papermaster (1982).

Die in 45 %iger Saccharose-Lösung eingefrorenen Retinae werden unter kaltem fließenden Wasser aufgetaut und dann 2 min sanft mit der Hand geschüttelt. Anschließend wird die Suspension zur Abtrennung größerer Zellfragmente bei 3000 x g, 4 °C für 5 min in einem JA 25.5-Festwinkelrotor zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig durch einen MIRACLOTH-Filter (Calbiochem, Darmstadt) filtriert und in einem 200 ml Kolben gesammelt. Schaumbildung ist dabei zu vermeiden. Das Filtrat wird anschließend mit gleichem Volumen ROS-Puffer versetzt. Der Kolben wird mit Parafilm verschlossen und die Suspension durch vorsichtiges Schwenken gemischt und dann gleichmäßig auf 3 bis 4 Zentrifugationsgefäße (Nalge Nunc

Oak Ridge 3119-0050, Nalgene, Rochester, USA) verteilt. Nun erfolgt eine Zentrifugation bei 12000 x g, 4 °C für 10 min in einem JA 25.5-Festwinkelrotor. Der Überstand wird verworfen, die entstandenen Pellets mit jeweils 1 ml Gradientenlösung 0 (s. u.) homogenisiert. Die Zentrifugationsgefäße werden mit dem gleichen Puffer nochmals ausgespült, das gesamte Homogenisat vereinigt und anschließend zu gleichen Teilen auf diskontinuierliche Saccharosegradienten verteilt. Die Gradienten bestehen aus jeweils 6 ml Gradientenlösung 3, 10 ml Gradientenlösung 2 und 6 ml Gradientenlösung 1 und werden durch Unterschichten mit einer 2,50 x 150 mm langen Kanüle (Neolab, Heidelberg) und einer 10 ml-Spritze (Plastipak, Heidelberg) in jeweils 3 bis 4 *Polycarbonate thick wall* Zentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, USA) hergestellt. Im Anschluss erfolgt nun eine zonale Sedimentation mittels Dichtegradientenultrazentrifugation bei 26500 x g, 4 °C für 25 min in einem SW-32Ti-Ausschwingrotor. Nach abgeschlossener Ultrazentrifugation sammeln sich die ROS im Grenzschieblichbereich zwischen oberer und mittlerer Stufe des Gradienten als konzentrierte Bande. Diese Banden werden mit einer 2,0 x 100 mm langen Kanüle versehenen Spritze abgenommen und in einem 100 ml-Kunststoffmesszylinder gesammelt. Die Suspension wird wiederum mit gleichem Volumen ROS-Puffer versetzt, mit Parafilm verschlossen und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nun wird die Suspension auf 4 bis 6 Zentrifugationsgefäße verteilt und bei 12000 x g, 4 °C für 10 min in einem JA 25.5-Festwinkelrotor zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die ROS-Pellets können nun direkt zur eigentlichen Diskmembranpräparation (siehe Kapitel 3.4.3) weiterverwendet oder für einen späteren Präparationszeitpunkt bei -80 °C gelagert werden.

ROS-Puffer

67 mM	KP _i , pH 7,0
1 mM	MgAcetat
100 µM	EDTA
1 mM	DTT
100 mM	PMSF
0,1 µM	Aprotinin
5 µM	Leupeptin

Gradientenlösung 0

26 % (w/v) Saccharose in ROS-Puffer, $\rho = 1,10$ g/ml

Gradientenlösung 1

29 % (w/v) Saccharose in ROS-Puffer, $\rho = 1,11$ g/ml

Gradientenlösung 2

34 % (w/v) Saccharose in ROS-Puffer, $\rho = 1,13$ g/ml

Gradientenlösung 3

39 % (w/v) Saccharose in ROS-Puffer, $\rho = 1,15$ g/ml

3.4.3 Präparation abgeflachter Diskmembranen

Die Präparation abgeflachter Diskmembranen basiert auf einem Protokoll von Smith & Litman (1982). Frisch präparierte bzw. bei -80 °C gelagerte ROS werden mit 60 ml H₂O_{dest} versetzt,

resuspendiert, auf 4 Zentrifugationsgefäße verteilt und anschließend bei 37000 x g, 4 °C für 40 min in einem JA 25.5-Festwinkelrotor zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Pellets in ca. 3 ml H₂O_{dest} resuspendiert. Die Suspension wird zu 100 ml 3,5 %iger Ficoll-Lösung (Ficoll PM400, GE Healthcare, Freiburg) gegeben, vermischt und ü. N. im Kühlraum bei 4 °C unter sanftem Schütteln inkubiert. Der Inkubationsansatz wird anschließend auf 4 *Polycarbonate thick wall* Zentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, USA) verteilt und bei 125000 x g, 4 °C für 2 h in einem SW-32Ti-Ausschwingrotor ultrazentrifugiert. Intakte Diskmembranen flottieren im entstehenden kontinuierlichen Ficoll-Gradienten. Diese obere Bande wird sorgfältig mit einer Spritze mit 1,5 x 100 mm langer Kanüle abgezogen, im gleichen Volumen NMR-Puffer resuspendiert und auf 4 Zentrifugationsgefäße verteilt. Anschließend werden die geernteten Diskmembranen durch 2 Zentrifugationen à 48000 x g, 4 °C für 30 min in einem JA 25.5-Festwinkelrotor gewaschen und dadurch von Ficoll-Molekülen befreit. Die entstandenen Pellets werden dann in 500 µl NMR-Puffer gelöst und vereinigt. Diese Diskmembran-Suspension wird nun über 5-µm Nucleopore Track-Etch Membranfilter (Whatman, Kent, UK) in einer Pop-Top-Filtereinheit (Whatman, Kent, UK) filtriert und bis zur weiteren Verwendung unter Lichtausschluss auf Eis im Kühlraum bei 4 °C gelagert.

NMR-Puffer

10 mM	NaP _i , pH 6,6
20 mM	KCl

3.4.4 Überprüfung der Rhodopsin-Konzentration

Die Konzentration der verschiedenen Rhodopsin-Intermediate kann über ein UV/Vis-Spektrum im Wellenlängenbereich zwischen $\lambda = 250$ und 600 nm detektiert werden. Der Grundzustand des Rhodopsins absorbiert bei einer Wellenlänge $\lambda = 500$ nm, der MetaII-Zustand bei $\lambda = 380$ nm. Die UV/Vis-Extinktionsmessung wird mit einem HP 8453 UV/Vis-Spektrophotometer (Hewlett-Packard, Waldbronn) in der Dunkelkammer unter Rotlicht durchgeführt. Wie bereits in Kap. 3.3.1 beschrieben, wird die Konzentration des inaktivierten Rhodopsins nach dem Lambert-Beer'schen-Gesetz berechnet. Rhodopsin im Grundzustand hat einen molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{500\text{ nm}} = 40000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Da intakte Diskmembranen stark lichtstreuend sind und dadurch einen starken Hintergrund im UV/Vis-Spektrum verursachen, wird zur Konzentrationsbestimmung eine 20fache Verdünnung der Diskmembranlösung mit 3% N-N-Dimethyldodecylamin-N-Oxid-Lösung (LDAO) versetzt. LDAO ist ein Detergenz, dass

die Lipidschicht der Diskmembranen zerstört, jedoch keinen Einfluss auf die Absorptionseigenschaften des inaktiven Rhodopsins hat. Als Referenz wird NMR-Puffer mit 3 % LDAO verwendet. Zur Bestimmung des Anteils des Rhodopsins im Grundzustand am Gesamtproteingehalt der Probe wird das Extinktionsverhältnis α bestimmt:

$$\alpha = \frac{E_{280 \text{ nm}}}{E_{500 \text{ nm}}} \quad (3.2)$$

Dieses sollte zwischen $\alpha = 1,6$ und $2,2$ liegen, um die Integrität sowie den Reinheitsgrad der Diskmembranen mit Rhodopsin im Grundzustand zu bestätigen. Je kleiner das Extinktionsverhältnis, umso höher ist der Anteil an inaktivem Rhodopsin (Smith et al. 1975).

3.5 Allgemeine Klonierungstechniken

3.5.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Isolierung

Die Reinigung der Plasmid-DNA für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten sowie für die DNA-Sequenzierung wird je nach benötigter Menge mit dem *Nucleo Spin* Kit bzw. *Midi Nucleobond AX100* Kit (Machery-Nagel, Düren) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse nach Ish-Horowicz & Burke (1981). Dabei werden je nach Bedarf 5 bis 10 ml bzw. 50 bis 200 ml einer *E. coli*-Übernightkultur der Stämme *E. coli* Mach1-T1 oder *E. coli* XL10 Gold in LB-Medium verwendet.

LB-Medium (Luria Bertani)

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

3.5.2 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese in Agarosegelen dient der Trennung der DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe und kann zur DNA-Identifizierung sowie deren Reinigung verwendet werden. Maßgebend für die Trennschärfe der Elektrophorese ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA, die wiederum abhängig ist von Form, Größe und Ladung des DNA-Stranges als auch von pH-Wert, Temperatur und Viskosität des Agarosegels.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgt in Horizontalelektrophorese-Apparaturen (Pharmacia Biotech, Freiburg). Je nach Größe des zu analysierenden DNA-Stranges wird eine 1 bis 3 %ige Agaroselösung in TAE-Puffer auf 60 °C erhitzt, mit 1 mg/ml Ethidiumbromid versetzt und in der Gelkammervorrichtung abgekühlt (Sambrook et al. 1989). Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und kann unter UV-Licht detektiert werden.

Zur analytischen Auftrennung wird MP-Agarose (Applchem, Darmstadt), für die präparative Reinigung die NuSieve-GTG-Agarose (Cambrex Bioscience, Rockland, USA) verwendet. Die DNA-Proben werden mit DNA-Auftragspuffer versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 100 V für ca. 30 min getrennt. Die Detektion der DNA im Gel erfolgt unter UV-Licht und wird mit dem Gerät Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München) dokumentiert.

TAE-Puffer		5x-DNA-Auftragspuffer	
40 mM	Tris-Acetat, pH 8,0	50 mM	EDTA
1 mM	EDTA	50% (v/v)	Glyzerin
		0,15% (w/v)	Bromphenolblau
		0,15% (w/v)	Xylencyanol

3.5.3 Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen

Eine DNA-Extraktion aus Agarosegelen ist notwendig, um nach einem Vektorverdau oder einer PCR den gewünschten DNA-Strang von anderen DNA-Fragmenten zu trennen.

Zur Gewinnung der reinen DNA des gewünschten Fragmentes erfolgt zunächst eine Trennung im präparativen Agarosegel. Die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment wird anschließend unter UV-Licht aus dem Gel isoliert. Zur Reinigung der DNA von Gelresten wird das QIAEXII-Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die DNA-Elution erfolgt entweder in $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ oder in 10 mM TrisHCl, pH 8,5.

3.5.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung doppelsträngiger DNA erfolgt über UV-Extinktionsmessung bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ und einer optischen Weglänge von 1 cm. Die DNA-Konzentration wird über folgende Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\text{ml}] = E_{260 \text{ nm}} \cdot VF \cdot 50, \quad (3.3)$$

wobei $E_{260 \text{ nm}}$ für die Extinktion bei einer Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ und VF für den Verdünnungsfaktor stehen. Der Faktor 50 ist ein Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNA.

3.5.5 Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*-Zellen

Kompetente Bakterienzellen, die bei -80°C gelagert werden, werden für ca. 15 min auf Eis aufgetaut. Für die Transformation werden 200 μl Bakteriensuspension mit 5 μl Ligationsansatz bzw. mit 1 μl Plasmid-DNA-Lösung versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wird der Ansatz für 90 s bei 42°C erhitzt. Nach Zugabe von 600 μl LB-Medium erfolgt eine weitere Inkubation bei 37°C und 200 rpm in einem Minitron-Schüttler (HT-Infors, Einsbach). Anschließend werden 100 μl der Bakteriensuspension auf einer kanamycinhaltige LB-Agarplatte ausgestrichen. Die restliche Suspension wird für 5 min bei $1000 \times g$ in einer Eppendorf 5415D Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, das Pellet in ca. 100 μl Überstand resuspendiert und ebenfalls auf eine kanamycinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen. Die Platten werden dann ü. N. bei 37°C kultiviert. Nur Bakterien, die das Plasmid mit eingeseztem Kanamycin-Resistenzgen enthalten, können sich vermehren und sichtbare Kolonien bilden. Die Kolonien werden dann zur Inokulation des LB-Mediums zur Anzucht der Bakterien für die DNA-Isolierung (s. Kap. 3.5.1) oder die Proteinexpression (s. Kap. 3.7.1 und Kap. 3.9.2) bzw. für die Kolonie-PCR (s. Kap. 3.6.5) verwendet.

3.6 Klonierungstechniken zur Herstellung des pTKK19xb/ub_Jue2-Vektors

3.6.1 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl enthält 1 bis 10 µg des pTKK19xb/ub-Plasmids. Zuerst wird das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Mph*I 103I verdaut. Dafür wird eine Enzymmenge entsprechend einer Aktivität von 3 U dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Dieser wird für 2 h bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert, anschließend wird das Enzym bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert.

Zur Erzeugung eines sogenannten stumpfen Endes wird nach dem Verdau mit *Mph*I 103I dem Ansatz 0,6 µl 10 mM dNTPs sowie 25 U T4-DNA-Polymerase hinzugefügt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Enzym für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Dann wird das sogenannte Polylinkerfragment, das bei der Ligation stören würde, durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *Not*I freigesetzt. Das Enzym wird schließlich für 10 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Danach wird ein Aliquot des Ansatzes parallel zu einem DNA-Größenmarker in einem Agarosegel getrennt und die entstandenen DNA-Fragmente auf ihre Richtigkeit überprüft (s. Kap. 3.5.2).

3.6.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA

Nach dem Restriktionverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Dadurch würde eine Religation des Vektors ermöglicht werden. Die Dephosphorylierung linearisierter DNA-Moleküle verhindert eine Religation der Vektorenden. Dabei wird die 5'-Phosphatgruppe mit Hilfe der *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) entfernt.

Es werden 1 U SAP zu einem Verdauansatz hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird anschließend für 20 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Um die Enzyme anschließend von der DNA zu trennen, wird das QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

3.6.3 Annealing der Oligonukleotide

Die folgenden einzelsträngigen Oligonukleotide sind bei BioTeZ Berlin-Buch GmbH (Berlin) käuflich erworben:

```
5'CGTTATGGCCAGGAAGATATTGATGTGATGGGCCTGAGCTTTCGTtaage
3'ggccgcctaACGAAAGCTCAGGCCCATCACATCAATATCTTCCTGGCCATAACG
```

Nach dem *Annealing* entsteht ein doppelsträngiges DNA-Fragment, das für den Aminosäuresequenzabschnitt Arr(66-80) kodiert. Die Oligonukleotide werden mit einer Endkonzentration von jeweils 50 pmol/μl in H₂O_{dest} gelöst. Jeweils 200 pmol werden in 100 mM NaCl-Lösungen in einem Volumen von 100 μl gelöst. Die DNA-Lösung wird für 5 min bei 95 °C inkubiert, dann innerhalb von 5 min auf 25 °C abgekühlt und ü. N. bei RT stehengelassen. Die Reaktion erfolgt in einem MJ Research PTC 200 Thermal Cycler (GMI, Ramsey, USA).

3.6.4 DNA-Ligation

Für die Insertion der Oligonukleotide in den linearisierten pTKK19xb/ub-Vektor (s. Kap. 3.6.1) wird die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Für die verschiedenen Ligationsansätze werden jeweils 30 ng linearisierte pTKK19xb/ub-Vektor-DNA und ein zehn-, fünfzig- und hundertfach molarer Überschuss der zu insertierenden DNA eingesetzt. Die Konzentrationen werden nach folgender Formel berechnet:

$$m(\text{Insert}[ng]) = \frac{X \cdot m(\text{Vektor}[ng]) \cdot l(\text{Insert}[bp])}{l(\text{Vektor}[bp])} \quad (3.4)$$

mit $m(\text{Vektor}) = 30 \text{ ng}$, $l(\text{Insert}) = 54 \text{ bp}$, $l(\text{Vektor}) = 3000 \text{ bp}$ und X als Überschuss-Faktor.

Zusätzlich enthalten die Inkubationsansätze 1 mM ATP und 1 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Zur Kontrolle wird ebenfalls ein Ansatz ohne Oligonukleotide inkubiert (sogenannter Religationsansatz). Anschließend werden diese bei 16 °C für 11 h mit 300 rpm auf einem Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Nach der Inkubation werden *E. coli* Mach1-Zellen mit jeweils 5 μl des Ligationsansatzes transformiert (s. Kap. 3.5.5).

3.6.5 Kolonie-PCR

Eine Kolonie-PCR wird durchgeführt, um die mit den Ligationsansätzen transformierten *E. coli*-Klone auszuwählen, die die Vektoren mit dem gewünschten insertierten DNA-Fragment enthalten (s. Kap. 3.6.4). Dafür ist es nicht notwendig, die DNA zu isolieren.

Jeweils 10 *E. coli*-Kolonien einer Ligationskulturplatte werden gepickt und direkt jeweils in 50 µl Kolonie-PCR-Ansatz suspendiert.

Die Amplifikation der DNA erfolgt nun über eine anfängliche Denaturierung der DNA bei 95 °C für 4 min, gefolgt von einem 30fachen Zyklus von 30 s Denaturierung bei 95 °C, Anlagerung der Primer für 30 s bei 50 °C und einer Kettenverlängerung für 2 min bei 72 °C. Das Programm endet mit einer langsamen Abkühlung der Proben bis 4 °C. Die PCR wird in einem MJ Research PTC 200 Thermal Cycler (GMI, Ramsey, USA) durchgeführt.

Vor der Denaturierung werden Zellen aus jedem Kolonie-PCR-Ansatz auf LB-Platten mit Kanamycin ausgestrichen, um die DNA der positiven Klone später über DNA-Isolierung (s. Kap. 3.5.1) zu gewinnen.

Nach Beendigung der PCR wird jeweils ein Aliquot der Ansätze entnommen und die Amplifikation über Gelelektrophorese überprüft. Positive Klone, d. h. die PCR-Produkte, die im Gel auf insertierte DNA hinweisen, werden für die Sequenzierung zur Überprüfung der DNA-Sequenz durch Seqlab (Göttingen) weiterpräpariert.

Kolonie-PCR-Ansatz:

5 µl	10xTAQ-Puffer
2,5 mM	MgCl ₂
200 µM	dNTPs
10 pmol	T7-Promotor
10 pmol	T7-Terminator
0,5 U	TAQ-Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O _{dest}

3.7 Herstellung des isotonenangereicherten Arr(66-80)-Peptids

3.7.1 Anzucht der Bakterien und Expression des His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins

Die Anzucht der Bakterien zur Herstellung des isotonenangereicherten Arr(66-80)-Peptids erfolgt in M9-Minimalmedium nach Sambrook et al. (1989). Die Verwendung von ¹⁵N-Ammoniumchlorid als einziger Stickstoffquelle und ¹³C₆-Glukose als einziger Kohlenstoffquelle erlaubt eine einfach durchzuführende, nahezu vollständige Anreicherung mit den stabilen Isotopen ¹⁵N und ¹³C. Die Zellanzucht erfolgt in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben in einem Unitron-Schüttler (Infors-HT, Einsbach) bei 37 °C und 200 rpm. Eine Vorkultur von 5 ml LB-Flüssigmedium (s. Kap. 3.5.1) wird mit 5 µl des Antibiotikums Kanamycin mit einer Konzentration von 50 mg/ml versetzt, mit einer Kolonie einer LB-Agarplatte (siehe Kap. 3.5.5) inokuliert und für mindestens 12 h inkubiert. Mit dieser Vorkultur wird dann eine weitere Vorkultur à 100 ml M9-Minimalmedium, die zuvor mit 100 µl Kanamycin-Lösung versetzt wird, inokuliert und ü. N. inkubiert. Diese Vorkultur wiederum wird dazu verwendet, die eigentliche Expressionskultur à 1 l M9-Minimalmedium auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,1 anzuimpfen. Bei Erreichen einer Bakteriendichte von OD₆₀₀ 0,6 bis 0,8 wird die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und 4 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 8000 x g, 4 °C für 25 min in 1l-Beckman-Zentrifugenbecher in einem JLA 8.100 Festwinckelrotor in einer Avanti J-20 XP Zentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) pelletiert. Das Pellet wird mit 25 ml PBS-Puffer resuspendiert, in 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt, nochmals bei 8000 x g, 4 °C für 25 min in einer Eppendorf 5804R Zentrifuge gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Die Kontrolle der Überexpression des Proteins erfolgt durch Probenentnahme vor und zu bestimmten Zeitpunkten während der Expression, die über SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) analysiert werden.

M9-Minimalmedium

9,1 g/l	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O
3 g/l	KH ₂ PO ₄
0,5 g/l	NaCl
1 g/l	¹⁵ NH ₄ Cl
2 mM	MgSO ₄ (aus einer 1 M Stammlösung)
10 µM	Fe(III)citrat (aus einer 10 mM Stammlösung)

100 μ M	CaCl ₂ (aus einer 1 M Stammlösung)
2 g/l	¹³ C ₆ -Glukose
0,2% (v/v)	TS2-Lösung (aus einer 500x-Stammlösung)
1 ml	Vitamincocktail

TS2-Lösung

58,8 mg/l	ZnSO ₄ ·H ₂ O
30 mg/l	MnCl ₂ ·4H ₂ O
300 mg/l	H ₃ BO ₃
200 mg/l	CoCl ₂ ·6H ₂ O
20 mg/l	NiCl ₂ ·6H ₂ O
10 mg/l	CuCl ₂ ·2H ₂ O
900 mg/l	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
20 mg/l	Na ₂ SeO ₃

Vitamincocktail

1 mg/l	d-Biotin
1 mg/l	Cholinchlorid
1 mg/l	Folsäure
1 mg/l	Natrium-D-panthothenat
1 mg/l	Nicotinamid
1 mg/l	Pyridoxalhydrochlorid
0,1 mg/l	Riboflavin

3.7.2 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wird ein Zellpellet mit 3 ml Puffer A pro Gramm Nasszellgewicht versetzt und auf Eis resuspendiert. Die Zelllösung wird dann 5 x 20 s mit jeweils 10 s Pause mittels eines Ultraschallstabes (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) im Eiswasserbad sonifiziert. Anschließend werden die nichtlöslichen Bestandteile durch eine Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C für 40 min in einer Eppendorf 5804R Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wird für die Reinigung unter nativen Bedingungen, das Pellet für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen verwendet.

3.7.3 Reinigung des Arr(66-80)-Peptids

Das Arr(66-80)-Peptid wird als Fusionsprotein aus einem N-terminalen Histidinüberhang MG-HHHHHHHHHH, Ubiquitin und der Arrestinaminosäuresequenz der Positionen 66 bis 80 exprimiert. Der N-terminale *His*₁₀-Tag erlaubt eine Trennung des Fusionsproteins von Verunreinigungen unmittelbar aus dem Zelllysats über Ni²⁺-NTA (engl. *nickel-nitrilotriacetic acid*)-Agarose als Affinitätsmatrix. Das Fusionsprotein befindet sich nach Zentrifugation des Zelllysats in etwa gleichen Anteilen im löslichen als auch im unlöslichen Teil des Zellaufschlusses.

Deshalb wird das Fusionsprotein sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen gereinigt (Kohn et al. 1998).

Puffer A		Puffer B	
50 mM	Tris HCl, pH 8	50 mM	Tris HCl, pH 8
100 mM	NaCl	500 mM	NaCl
1 mM	β -Mercaptoethanol	1 mM	β -Mercaptoethanol

Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Das Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säulenmaterial (Qiagen, Hilden) wird mit 5 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Es werden 1 ml Säulenmaterial pro Gramm Nasszellgewicht verwendet. Der Überstand des zentrifugierten Zellsats wird auf das Säulenmaterial gegeben. Die Säule wird dicht verschlossen und zur effizienteren Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial für 1 h bei Raumtemperatur auf einem CAT RM5 Schüttler (Zipperer GmbH, Staufen) geschüttelt. Anschließend wird der Durchfluss abgelassen und gesammelt. Das Säulenmaterial wird nun mit 3 Säulenvolumen Puffer B, anschließend mit 6 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgt über einen fünfstufigen Imidazolgradienten mit 2 Säulenvolumen 10 mM Imidazol, 2 Säulenvolumen 100 mM Imidazol, 3 Säulenvolumen 200 mM Imidazol, 2 Säulenvolumen 400 mM Imidazol in Puffer A. Es werden Elutionsfraktionen entsprechend 1 Säulenvolumen gesammelt.

Die Reinigung wird anhand von Proben der Überstands-, Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen sowie des Säulenmaterials nach Elution über SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) analysiert und gegebenenfalls mittels einer Amiconkammer (Millipore, Schwalbach) konzentriert.

Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Das Pellet des zentrifugierten Zellsats wird in 100 ml Puffer A mit 6 M Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) resuspendiert und ü. N. bei 4 °C und 50 rpm auf einem Heidolph Polymax 1040 Schüttler (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Anschließend wird die Suspension bei 8000 x g und 4 °C für 40 min zentrifugiert. Der Überstand wird auf das mit 6 M GdnHCl in Puffer A äquilibrierte Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säulenmaterial (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Die Säule wird dicht verschlossen und zur effizienteren Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial für 1 h

bei Raumtemperatur auf einem CAT RM5 Schüttler (Zipperer GmbH, Staufen) geschüttelt. Anschließend wird der Durchfluss abgelassen und gesammelt. Das Säulenmaterial wird nun mit 6 Säulenvolumen 6 M GdnHCl in Puffer A gewaschen. Die Rückfaltung des Fusionsproteins, das an das Säulenmaterial gebunden ist, findet nun mit einem reversen Gradienten von 6 bis 0 M GdnHCl in Puffer A statt. Dabei werden Stufen von jeweils 1 Säulenvolumen 5 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M GdnHCl in Puffer A gewählt. Danach wird das beladene Säulenmaterial mit 6 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgt über einen fünfstufigen Imidazolgradienten mit 2 Säulenvolumen 10 mM Imidazol, 2 Säulenvolumen 100 mM Imidazol, 3 Säulenvolumen 200 mM Imidazol und 2 Säulenvolumen 400 mM Imidazol in Puffer A. Dabei werden Elutionsfraktionen entsprechend 1 Säulenvolumen gesammelt.

Die Reinigung wird anhand von Proben der Überstands-, Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen sowie des Säulenmaterials nach Elution über SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) analysiert und gegebenenfalls mittels einer Amiconkammer (Millipore, Schwalbach) konzentriert.

Spaltung des Fusionsproteins

Die Yeast-Ubiquitin-Hydrolase (YUH) ist eine Cystein-Protease, die zur Klasse der Ubiquitin-C-terminale-Hydrolasen gehört. Sie katalysiert sehr spezifisch die Proteolyse am C-terminalen Ende des Ubiquitins, das fusionierte Peptid wird dabei freigesetzt. Die vereinigten und konzentrierten Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie, die das His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsprotein enthalten, werden jeweils mit 50 bis 100 µg Yeast-Ubiquitin-Hydrolase pro ml Spaltansatz versetzt und für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert. Der zeitliche Verlauf der Proteolyse des Arr(66-80)-Peptids vom His₁₀-Ubiquitin-*Tag* wird mittels Probenentnahme vor Zugabe des Enzyms sowie zu Zeitpunkten $t = 0$, $t = 0,5$ h, $t = 1$ h und $t = 3$ h während des Spaltungsprozesses analysiert. Dabei werden jeweils 20 µl des Inkubationsansatzes entnommen, sofort mit 5 µl Laemmli-puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend werden die Proben mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) untersucht. Der Spaltansatz wird zum Abbruch der Proteolyse-reaktion in Aliquots à 25 ml fraktioniert und bei -80 °C gelagert.

Reversed-Phase-Chromatographie (RPC)

Bei der Reversed-Phase-Chromatographie dienen Hydroxygruppen, die mit langen Kohlenwasserstoffketten verethert sind als unpolare Trägermaterialien. Sie werden deshalb auch als Umkehrphasen oder reverse Phasen bezeichnet. Bei dieser Chromatographiemethode kommt

es zu einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem zu analysierenden Stoffgemisch mit der unpolaren stationären Phase im polaren, wässrigen Laufmittel. Mit Hilfe eines unpolaren organischen Lösungsmittels findet die Elution der Komponenten des Stoffgemisches statt. Das organische Lösungsmittel konkurriert dabei mit den adsorbierten Molekülen um Bindeplätze. Es werden bei dieser Methode häufig Gradiententrennungen verwendet. Durch Erhöhung der Konzentration des organischen Lösungsmittels in der wässrigen Phase wird die Polarität verringert und dadurch die Elutionswahrscheinlichkeit erhöht. Es kommt somit zur Trennung der Komponenten entsprechend ihrer Polarität (Lottspeich & Zorbas 1998).

Der Spaltansatz (s. Kap. 3.7.3) wird über 0,22 µm-Rotilabo-Spritzenfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) filtriert und in Aliquots à 5 ml auf eine 15RPC-3-ml-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg) injiziert. Die Trennung des Spaltansatzes und die damit verbundene Reinigung des Arr(66-80)-Peptids erfolgt über einen Stufengradienten an einer *Agilent 1200 Series* HPLC-Anlage (Agilent Technologies, Waldbronn). Der Gradient wird aus den Lösungen A und B, welche Acetonitril (ACN) als Lösungsmittel der mobilen Phase beinhalten, in entsprechenden Teilen zusammengesetzt. Dieser Gradient besteht aus einer isokratischen Phase für 10 min bei 2 % ACN, einem linearen Anstieg über 5 min auf 17,6 % ACN, einem linearen Anstieg über 30 min auf 56 % ACN, einem linearen Anstieg über 5 min auf 80 % ACN, einer isokratischen Phase für 3 min bei 80 % ACN und einem linearen Abfall innerhalb von 3 min zurück auf 2 % ACN. Dabei wird mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 40 °C gearbeitet. Die Trennung der Komponenten wird durch UV-Extinktionsmessungen bei 214 nm detektiert. Die Elutionsfraktionen werden manuell gesammelt.

Lösung A

2% (v/v) Acetonitril
0,065 % (v/v) Trifluoressigsäure
in H₂O_{dest}

Lösung B

80% (v/v) Acetonitril
0,05% (v/v) Trifluoressigsäure
in H₂O_{dest}

Aufbewahrung des Arr(66-80)-Peptids

Die RPC-Elutionsfraktion wird nach erfolgter Reinigung sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und ü. N. lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Peptid wird anschließend in 15 ml-Gefäßen (Greiner, Frickenhausen) bei -80 °C gelagert oder sofort für NMR-Messungen eingesetzt. Mit dieser Maßnahme kann der Abbau des relativ instabilen Peptids minimiert werden.

3.8 Herstellung des isotopenangereicherten Arr(67-77)-Peptids

Das isotopenangereicherte Arr(67-77)-Peptid wird innerhalb der Arbeitsgruppe nach einem Protokoll von Koenig et al. (2003) hergestellt und gereinigt.

3.9 Herstellung des *Membrane Scaffold Proteins* (MSP1)

Die in Kapitel 1.9 und 1.10 beschriebene Methode basiert auf den Arbeiten der Gruppe von Prof. S. G. Sligar (Bayburt et al. 2002). Das Protokoll wird modifiziert und für das in unserem Labor angewandte System optimiert. Das *Membrane Scaffold Protein* MSP1 besteht aus einem N-terminalen 6-fachen Histidin-Überhang MGSSHHHHHH, gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle ENLYFQG und der N-terminal-verkürzten Aminosäuresequenz des humanen Apolipoproteins A1 (Aminosäuresequenz des MSP1 s. 6.2). Die Synthese des Plasmids pUC57_MSP1, das für das MSP1 kodiert, erfolgt durch die Firma GenScript (Piscataway, NJ, USA).

3.9.1 Subklonierung des für MSP1 kodierenden Inserts in einen Expressionsvektor

Das für MSP1 kodierende Insert wird mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI aus dem pUC57-Vektor herausgeschnitten und anschließend über die Schnittstellen *Nco*I und *Sac*I in den Expressionsvektor pET28a ligiert. Dadurch wird das für MSP1 kodierende Plasmid pET28a_MSP1 erzeugt.

3.9.2 Anzucht der Bakterien und Expression des MSP1

Die Anzucht der Bakterien *E. coli* BL21DE3 zur Herstellung des MSP1 erfolgt in LB-Medium (s. Kap. 3.5.1) in mit Schikanen versehenen Erlenmeyerkolben bei 37 °C und 200 rpm in einem Unitron-Schüttler (Infors-HT, Einsbach). Eine Vorkultur von 20 ml LB-Flüssigmedium wird mit 20 µl des Antibiotikums Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 mg/l versetzt, mit einer Kolonie einer LB-Platte (s. Kap. 3.5.5) inokuliert und für mindestens 12 h inkubiert.

Diese Vorkultur wird dazu verwendet, die eigentliche Expressionskultur mit einem Volumen von 1 l mit 50 mg/l Kanamycin auf eine OD_{600} von etwa 0,1 anzuimpfen. Bei Erreichen einer Bakteriendichte von OD_{600} 0,6 bis 0,8 wird die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe mit einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Kultur wird 4 bis 5 h unter Schütteln bei 37 °C weiterinkubiert. Anschließend werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 8000 x g, 4 °C für 25 min in 1 l-Beckman-Zentrifugenbechern in einem JLA 8.100-Festwinkelrotor pelletiert. Das Pellet wird mit 25 ml PBS-Puffer resuspendiert, in 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und nochmals mit 8000 x g, 4 °C für 25 min in einer Eppendorf 5804R-Zentrifuge gewaschen und bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert. Die Kontrolle der Überexpression des Proteins erfolgt durch Probenentnahme vor und zu bestimmten Zeitpunkten während der Expression, die über SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) analysiert werden.

3.9.3 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wird ein Zellpellet mit 10 ml 10 mM NaP_i , 1 mM PMSF, pH 7,4 versetzt und auf Eis resuspendiert. Anschließend wird 1 % Triton hinzugefügt und die Zellsuspension 6 x 20 s mit jeweils 10 s Pause mittels eines Ultraschallstabes (Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, USA) im Eiswasserbad sonifiziert. Anschließend werden die nichtlöslichen Bestandteile durch eine Zentrifugation bei 8000 x g und 4 °C für 40 min pelletiert. Der Überstand wird über 0,45 µm-Rotilabo-Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe) filtriert und für die Reinigung weiterverwendet, das Pellet wird verworfen.

3.9.4 Reinigung des MSP1

Der Überstand des zentrifugierten Zelllysats wird auf 1 ml pro Gramm Nasszellgewicht mit Puffer C unter Zusatz von 1 % Triton äquilibriertem Ni^{2+} -NTA-Agarose-Säulenmaterial gegeben. Die Säule wird dicht verschlossen und zur effizienteren Bindung des MSP1 an das Säulenmaterial für 1 h bei Raumtemperatur auf einem CAT RM5 Schüttler (Zipperer GmbH, Staufen) geschüttelt. Anschließend wird der Durchfluss abgelassen und gesammelt. Das Säulenmaterial wird nun mit 4 Säulenvolumen Puffer C mit 1 % Triton, anschließend mit 4 Säulenvolumen Puffer C mit 50 mM Natriumcholat gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgt über einen dreistufigen Imidazolgradienten mit 4 Säulenvolumen 10 mM Imidazol, 4 Säulenvolumen 50 mM Imidazol, 4 Säulenvolumen 100 mM Imidazol, 4 Säulenvolumen 750 mM Imidazol in Puffer C mit 50 mM Natriumcholat wobei MSP1 bei ca. 100 mM Imidazol eluiert wird. Dabei werden Elutionsfraktionen entsprechend 1 Säulenvolumen gesammelt.

Die Reinigung wird anhand von Proben der Überstands-, Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen sowie des Säulenmaterials nach Elution über SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) analysiert. Die Elutionsfraktionen, die das gereinigte MSP1 enthalten, werden vereinigt, falls notwendig mit einer Amicon-Kammer (Millipore, Schwalbach) auf 1 mg/ml konzentriert und gegen 10 mM NaP_i, 1 mM EDTA, pH 7,4 dialysiert.

Puffer C

40 mM	TrisHCl, pH 8
300 mM	NaCl
1 mM	β-Mercaptoethanol

3.10 Herstellung und Charakterisierung scheibchenförmiger Modellmembranen (Nanodisks)

3.10.1 Herstellung der Lipid-Detergenz-Stammlösung

Zur Herstellung einer Lipid-Detergenz-Stammlösung wird das Lipid 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) verwendet. Das Lipid liegt bei einer Konzentration von 2 mg/ml in Chloroform gelöst vor und wird bei -80 °C gelagert. Zunächst werden 2 ml der Lipid-Chloroform-Lösung unter dem Abzug mit Stickstoff begast, um das Lösungsmittel zu verflüchtigen. Der entstandene Lipidfilm wird dann in 1 ml Cyclohexan aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und ü. N. lyophilisiert. Das nun vollständig von Lösungsmittelresten befreite POPC wird in einem molaren Verhältnis Lipid : Detergenz von 1 : 2 in wässriger Lösung aufgenommen. Als Detergenz wird im Regelfall Natriumcholat verwendet.

POPC-NaCholat-Stammlösung

50 mM	POPC
100 mM	NaCholat oder OG/OTG/NG
in 10 mM	NaP _i , pH 7,4

3.10.2 Inkubationsansatz zur Bildung leerer Nanodisks

Zur Herstellung leerer Nanodisks, d. h. ohne inkorporiertes Membranprotein, werden die Komponenten POPC, Natrium-Cholat, MSP1 im molaren Verhältnis 75 : 150 : 1 in 10 mM NaP_i, 1 mM EDTA, pH 7,4 gelöst eingesetzt. Dabei wird von einer Konzentration von 1 mg/ml MSP1 ausgegangen. Der Inkubationsansatz wird ü. N. bei 37 °C gelagert. Anschließend werden ca. 300 mg/ml *Biobeads SM-Adsorbent* (Biorad, Hercules, USA) hinzugefügt und die Suspension für weitere 4 h auf einem Taumel-Rollenschüttler CAT RM5 (Zipperer GmbH, Staufen) unter leichter Bewegung inkubiert. *Biobeads SM-Adsorbent* adsorbieren die gelösten Detergenzmoleküle mit hoher Affinität und eliminieren sie dadurch aus der Lösung. Das Eliminieren der Detergenzmoleküle induziert eine spontane Bildung der Nanodisks. Die *Biobeads SM-Adsorbent* werden zuvor in einem geringen Volumen 10 mM NaP_i, pH 7,4 angefeuchtet, so dass es bei Zugabe zum Nanodiskansatz nicht zu Volumenverlusten durch Flüssigkeitsaufnahme derselben kommt. Schließlich werden nach erfolgter Inkubation die *Biobeads SM-Adsorbent* mit Hilfe eines 0,45 µm Spritzenfilters von der Nanodisk-Lösung getrennt. Diese wird bis zur weiteren Reinigung über Größenausschlusschromatographie bei 4 °C gelagert.

3.10.3 Inkubationsansatz zur Bildung Protein beinhaltender Nanodisks

Das Verfahren zur Herstellung proteinbeinhaltender Nanodisks entspricht im Wesentlichen der unter Kap. 3.10.2 beschriebenen Methode. Zusätzlich wird zum Inkubationsansatz das [¹⁵N]-angereicherte CD4mut, welches der Transmembrandomäne des T-Zell-Korezeptors CD4 (cluster determinant 4) entspricht, hinzugefügt. Die Komponenten POPC, Natrium-Cholat, MSP1, CD4mut werden hier im molaren Verhältnis 100 : 200 : 1,3 : 1 eingesetzt. CD4mut wird nach Wittlich et al. (2007) exprimiert und gereinigt. Da das freie CD4mut in Puffer unlöslich ist, wird das in lyophilisierter Form vorliegende Protein zunächst mit dem in Chloroform gelösten POPC gemischt und dann wie unter Kap. 3.10.1 beschrieben zusammen getrocknet (Wittlich et al. 2007).

3.10.4 Größenausschlusschromatographie

Das Prinzip der Größenausschlusschromatographie beruht auf der Trennung der gelösten Moleküle nach Größe und Form. Dabei dringen die gelösten Moleküle unterschiedlich tief in eine Gelmatrix mit definierter Porengröße ein und legen dadurch einen unterschiedlich langen Weg

durch die Säule zurück. Je höher das Molekulargewicht der Moleküle ist, umso eher werden diese von der Säule eluiert.

Um intakte Nanodisks von den restlichen Komponenten wie freies MSP1, Lipidvesikel sowie Detergenzmolekülen zu trennen wird eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Diese dient ebenfalls zur groben Abschätzung des Molekulargewichts der gebildeten Modellmembranen.

Zur Reinigung der Nanodisks durch Größenausschlusschromatographie wird eine analytische Superdex 200 10/300 GL-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg) an einem Äkta-Purifier System (Amersham Bioscience, Freiburg) verwendet. Die Nanodisklösung wird vor der Injektion auf das Säulenmaterial für 10 min, 10000 x g bei RT zentrifugiert, um sicher zu gehen, dass keine größeren Partikel auf das Säulenmaterial injiziert werden und dieses dadurch beschädigen. Es werden 250 µl der zu analysierenden Lösung auf die zuvor mit 10 mM NaP_i, 150 mM NaCl pH 7,4 äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Trennung der Komponenten erfolgt mit einer Flussrate von 0,5 ml/min 10 mM NaP_i, pH 7,4 bei einem Gesamtdurchflussvolumen von 1,5 Säulenvolumina (ca. 45 ml) bei 12 °C. Die Elutionfraktionen werden in Volumina à 500 µl gesammelt. Die Elution der Komponenten wird mittels UV-Absorption bei Wellenlängen von 280 nm, 214 nm und 209 nm detektiert. Die Fraktionen, die einem Absorptionssignal zugeordnet werden können, werden mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) analysiert. Die Nanodisks enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, gegebenenfalls über Centricon YM-10 (Millipore, Schwalbach) konzentriert und für weitere Analysen bei 4 °C gelagert.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts wird ein Standardverfahren mit dem *High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit* (Amersham Bioscience, Freiburg) durchgeführt. Zur Kalibrierung der Säule wird nach Protokoll des Herstellers vorgegangen und die globulären Proteine Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA (67 kDa) und Chymotrypsin (25 kDa) verwendet. Anschließend wird eine Kalibrierungsgerade berechnet.

3.10.5 Stabilität der Nanodisks als Funktion der Zeit

Um die Stabilität der Nanodisks zu beurteilen, wird ebenfalls die Methode der Größenausschlusschromatographie angewendet. Dabei wird nach bestimmten Zeitintervallen zwischen 1 bis 34 Tagen jeweils 200 µl der Nanodisks enthaltenden und vereinigten Fraktionen auf eine Superdex 200 10/300-Säule injiziert und wie bereits in Kap. 3.10.4 beschrieben analysiert. In der Zwischenzeit werden die vereinigten Fraktionen bei 12 °C gelagert.

3.10.6 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Um die Integrität des MSP1-Proteins zu überprüfen, werden Circular-Dichroismus (CD)-Spektren aufgenommen und darüber die Sekundärstrukturanteile des freien als aus des lipidassoziierten MSP1 bestimmt. Die Fern-UV-CD-Spektren werden mit einem Jasco J810 CD-Spektropolarimeter (Jasco, Groß-Umstadt) aufgenommen. Es werden rechtwinklige Quarzglas-Suprasil-Küvetten QS (Hellma, Müllheim) mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Die Fern-UV-CD-Spektren werden in einem Wellenlängenbereich von 260 nm bis 190 nm mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 20 nm/min, einer Bandbreite von 1 nm und einer Auflösung von 1 nm bei Raumtemperatur aufgenommen. Alle Proteinspektren werden um das entsprechende Pufferspektrum korrigiert und aus den gemessenen Elliptizitäten werden die mittleren molaren Elliptizitäten pro Aminosäurerest $[\Theta]_{MRW}$ nach folgender Formel berechnet.

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N} \quad (3.5)$$

Dabei ist $[\Theta]_{MRW}$ die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure in $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, Θ die gemessene Elliptizität in deg, c die Proteinkonzentration in M, d die Schichtdicke der Küvette in cm und N die Anzahl der Aminosäuren des Proteins.

Die quantitative Analyse der Sekundärstrukturanteile wird mit dem Software-Paket CDPro durchgeführt (Sreerama & Woody 2000). Es handelte sich dabei um die drei Programme SELCON3 (Sreerama & Woody 1993), CDSSTR (Johnson 1999) und CONTINLL (Provencher & Glöckner 1981) mit einem Satz von 56 Proteinen. Die spektrale Dekonvolution wird im Wellenlängenbereich von 240 - 190 nm mit 51 Datenpunkten durchgeführt. Die Anteile an α -Helix und β -Faltblatt werden durch Addition der korrespondierenden regulären und deformierten Anteile berechnet. Die resultierenden Daten sind die arithmetischen Mittel der Daten der drei Programme. Die untersuchten Proben haben eine MSP1-Konzentration von 5 - 15 μM .

3.11 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Experimente werden an Varian^{UNITY}INOVA-Spektrometern aufgenommen, die bei Protonenfrequenzen von 600 und 800 MHz betrieben werden.

Es werden Varian 5 mm Z-PFG- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ - und XYZ-PFG- $^1\text{H}\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ -Probenköpfe verwendet. Zur Verbesserung der Empfindlichkeit stehen kryogen gekühlte Probenköpfe zur Verfügung, bei welchen die Temperatur des Vorverstärkers und der Spule auf 25 K herabge-

setzt werden. Zur Prozessierung der NMR-Spektren werden die Programme VNMRJ (Version 1.1d; Varian, Inc.) oder NMRPipe (Version 2.3; Delaglio et al. 1995) verwendet. Die Programme NMRDraw (Version 1.7; Delaglio et al. 1995) und CARA (Version 1.3.1; Keller 2004) werden für die Visualisierung und Analyse der Spektren verwendet.

3.11.1 Probenvorbereitung

Peptidlösungen

Für die NMR-Messungen am freien Peptid werden Lösungen von 1 bis 2 mM des jeweiligen Peptids in $\text{H}_2\text{O}_{dest}$ mit 10 % D_2O (v/v) oder 10 mM NaP_i , pH 6,6, 20 mM KCl, 10 % D_2O (v/v) (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) verwendet. Der pH-Wert wird mit einer pH-Mikro-Elektrode (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) gemessen und gegebenenfalls mit 0,1 M NaOH angepasst. Es werden 350 μl der Lösung in 5 mm-Shigemi-Rundröhrchen (BMS-005V; Shigemi, Tokio, Japan) überführt.

Suspension aus Diskmembranen und Peptid

Die Vorbereitung der NMR-Proben, die dunkeladaptierte Diskmembranen enthalten, findet unter Rotlicht (PF 712E; Philips, Niederlande) in der Dunkelkammer statt. Die Probe für eine NMR-Messung besteht aus 50 bis 60 μM dunkeladaptiertem Rhodopsin mit 1 bis 2 mM Peptid und 10 % D_2O (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA) in 10 mM NaP_i , pH 6,6, 20 mM KCl. Ein Volumen von 350 bis 400 μl wird ebenfalls in ein 5 mm-Shigemi-Röhrchen (BMS-005V; Shigemi, Tokio, Japan) überführt. Der pH-Wert wird mit einer pH-Mikro-Elektrode (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) gemessen und gegebenenfalls mit 0,1 M NaOH angepasst. Das Shigemi-Röhrchen wird im Spinner so befestigt, dass sich die Flüssigkeit genau im Messfenster befindet. Der Spinner mit Messröhrchen wird dann in einem zweifach verschlossenen lichtdichten schwarzen Schlauch aufbewahrt und vorsichtig in das NMR-Spektrometer überführt, so dass die Probe nicht belichtet wird.

3.11.2 NMR-Experimente

Es werden neben 1D- ^1H -Spektren, zweidimensionale NMR-Spektren wie TOCSY, T-ROESY, ^1H - ^1H -NOESY, ^1H - ^{15}N - und ^1H - ^{13}C -HSQC aufgenommen. Die Aufnahmen der indirekten Dimension erfolgt auf der Basis der Quadraturdetektion mit der States-Methode (States et al.

Tabelle 3.5: Akquisitionsparameter der durchzuführenden NMR-Experimente

Experiment	sw [Hz]	np [Pkt]	sw1 [Hz]	ni [Pkt]	nt	d1 [s]	mix [ms]	t [min]
2D (^{15}N - ^1H)-HSQC	5000	500	720	120	2	1.0	-	9:49
2D (^{13}C - ^1H)-CT-HSQC (aliphatisch)	6000	510	2900	81	2	1.5	-	9:44
2D NOESY	10000	1800	9000	256	4	1.25	30/50	52:11
2D TOCSY	6000	641	6000	128	32	1.0	70	72:08
2D T-ROESY	6000	1200	6000	128	64	1.0	300	415:12

sw1, sw2: aufgenommene spektrale Breite in der direkten und indirekten Dimension in Hz
 np, ni: aufgenommene komplexe Punkte in der direkten und indirekten Dimension
 nt: Anzahl der Wiederholungsexperimente; d1: Delay zwischen zwei Einzelexperimenten in s;
 mix: Mischzeit in ms;

1982). Zur Unterdrückung des Wassersignals wird die WATERGATE-Sequenz verwendet (Piotto et al. 1992). Die chemischen Verschiebungen der NMR-Signale werden auf das Wassersignal referenziert, welches bei 10 °C bei 4,960 ppm und bei 20 °C bei 4,838 ppm relativ zu Trimethylsilylpropionat (TSP, 0 ppm) liegt. Die Parameter aller verwendeten NMR-Experimente sind in Tab. 3.5 aufgelistet.

Experimente zur Resonanzzuordnung

Für die sequenzspezifische Resonanzzuordnung der Protonensignale werden TOCSY und T-ROESY-Experimente am freien Peptid durchgeführt.

Das TOCSY-Experiment wird bei einer ^1H -Frequenz von 600 MHz bei 10 °C und einer Mischzeit von 70 ms aufgenommen. Es werden Datenmatrizen von 641 x 128 komplexen Punkten bei einer Aufnahmezeit von 107 ms in der direkten Dimension aufgenommen. Als Mischsequenz während TOCSY-Spinlockperioden wird das DIPSI-3-Schema genutzt (Shaka et al. 1988). Die Aufnahme eines TOCSY-Spektrums dauert 72 min. Das T-ROESY-Experiment wird bei einer Frequenz von 600 MHz bei 10 °C und einer Mischzeit von 300 ms aufgenommen. Es werden Datenmatrizen von 1200 x 128 komplexen Punkten bei einer Aufnahmezeit von 200 ms in der direkten Dimension aufgenommen. Die Aufnahmezeit eines T-ROESY-Spektrums beträgt 415 min.

Heteronuclear Single Quantum Coherence-Spektroskopie (HSQC)

Zur Bestimmung der ^{15}N - ^1H -transferierten Restdipolkopplung (TrRDC) des Proteinrückgrates werden Protonen gekoppelte ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren bei einer Frequenz von 600 MHz sowohl bei 10 °C als auch bei 20 °C gemessen. Die Datenmatrizen bestehen aus 500 x 120 komplexen Punkten mit einer Aufnahmezeit von 100 ms in der direkten Dimension. Es werden zwei Wiederholungsexperimente aufgezeichnet, was einer Gesamtdauer von 10 min pro Spektrum entspricht.

Zur Bestimmung der ^{13}C - ^1H -TrRDC werden Protonen gekoppelte ^{13}C - ^1H -CT-HSQC-Spektren mit einem CT-Delay von 28 ms bei einer Frequenz von 600 MHz sowohl bei 10 °C als auch bei 20 °C gemessen. Die Datenmatrizen bestehen aus 510 x 81 komplexen Punkten mit einer Aufnahmezeit von 85 ms in der direkten Dimension. Für die Breitband- $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Entkopplung während der direkten Detektionsperiode werden GARP-Sequenzen verwendet (Shaka & Keeler 1987). Es werden zwei Wiederholungsexperimente aufgezeichnet, was einer Gesamtdauer von 10 min pro Spektrum entspricht.

Pro Versuchreihe werden jeweils 10 Spektren im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins gemessen. Dann wird das Shigemi-Röhrchen aus dem NMR-Spektrometer entfernt und die Probe sofort für 30 s über eine Filtereinheit GG495 (Schott, Mainz) belichtet. Das Shigemi-Röhrchen wird anschließend direkt wieder in das NMR-Spektrometer eingesetzt. Nach einer kurzen Äquilibrationszeit von 2 min werden ohne Änderung jeglicher Parameter erneut 25 bis 30 Spektren aufgenommen.

Nuclear Overhauser Effect and Exchange-Spektroskopie (NOESY)

Zur weiteren Vervollständigung der Resonanzzuordnungen sowie zur Gewinnung von Informationen über Distanzeinschränkungen zwischen räumlich benachbarten Protonen in Form von Kern-Overhauser-Effekt-Signalen (NOE) werden ^1H - ^1H -NOESY-Spektren bei einer ^1H -Frequenz von 800 MHz bei 10 °C und einer Mischzeit von 50 bzw. 30 ms aufgenommen. Es werden Datenmatrizen von 1800 x 256 komplexen Punkten bei einer Aufnahmezeit von 100 ms in der direkten Dimension aufgenommen. Die Aufnahmezeit eines 2D-NOESY-Spektrums beträgt 52 min.

Eine Anzahl von 15 2D-NOESY-Spektren mit 4 Wiederholungsexperimenten werden in Präsenz dunkeladaptierten Rhodopsins vor der Lichtaktivierung aufgezeichnet. Dann wird das Shigemi-Röhrchen aus dem NMR-Spektrometer entfernt und die Probe sofort für 30 s über eine Filtereinheit GG495 (Schott, Mainz) belichtet. Das Shigemi-Röhrchen wird anschließend

sofort wieder in das NMR-Spektrometer eingesetzt. Nach einer kurzen Äquilibrationszeit von 2 min werden ohne Änderung jeglicher Parameter erneut 5 Spektren aufgenommen.

3.11.3 Berechnung der TrRDC und der Regressionskurven des zeitlichen Verlaufs

Dipolare Einbindungskopplungen (^1D) können in einem HSQC-Spektrum, bei welchem in der indirekten Dimension kein refokussierender Puls integriert ist, gemessen werden. Der Abstand zwischen den Dublett Komponenten entspricht dann der skalaren Kopplung plus der transferierten Restdipolkopplung $^1J + ^1D$. Die Berechnung der TrRDC findet mit bereits zur Verfügung stehenden *tcl*-Skripten statt, mit welchen automatisch die Differenz zwischen den Dublett Komponenten in Hz in zeitlicher Reihenfolge berechnet werden können. Es wird eine Tabelle erstellt, in welcher die Differenzen pro Aminosäure als Funktion der Zeit dargestellt werden. Die Differenz des Abstandes der gekoppelten Signale im lichtaktivierten Zustand des Rhodopsins zum Zeitpunkt t und dem Mittelwert des entsprechenden Abstandes der gekoppelten Signale der dunkeladaptierten Spektren entspricht der TrRDC.

Für jede Aminosäure wird dann der Verlauf der Änderung der Kopplungskonstanten in Abhängigkeit der Zeit mit gängigen Tabellenkalkulationsprogrammen visualisiert. Diese Vorgehensweise wird sowohl für die ^{15}N - ^1H - als auch für die ^{13}C - ^1H -Kopplungen angewendet.

Der Zeitverlauf der beobachteten Aufspaltung der Signale ($^1J^{exp}(t)$ in Hz) nach der Photoaktivierung wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$^1J^{exp}(t) = ^1J^{dunkel} + ^1D \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.6)$$

Dabei ist $^1J^{dunkel}$ die Kopplung im dunkeladaptierten Zustand, ^1D die Restdipolkopplung zum Zeitpunkt $t = 0$ und τ die exponentielle Zerfallskonstante des peptidbindenden Zustands.

Die Regressionskurve des exponentiellen Zerfalls, der für die jeweilige Aminosäure bestimmten $^1J^{exp}$, wurde mit der Software SigmaPlot (Systat Software, San Jose, USA) bestimmt. Über einen gekoppelten Datensatz aller ermittelten $^1J^{exp}(t)$ wird eine gemeinsame Zerfallskonstante τ berechnet, während die Anpassungsparameter $^1J^{dunkel}$ und ^1D für jede Aminosäure individuell bestimmt werden. Die Regressionskurven jeder Kopplung werden auf den Zeitpunkt $t = 0$, d. h. den Zeitpunkt der Photoaktivierung extrapoliert. Die Differenz dieser Kopplung zum Zeitpunkt $t = 0$ und der Kopplung des dunkeladaptierten Zustands $^1J^{dunkel}$ entspricht der transferierten Restdipolkopplung ^1D zum Zeitpunkt $t = 0$.

3.11.4 Berechnung der Differenzspektren

Die Dauer eines ^1H - ^1H -NOESY-Experiments entspricht in etwa der Halbwertszeit des MetaII-Zustands bei den gewählten Bedingungen. Deshalb können pro ^1H - ^1H -NOESY nur 4 Wiederholungsexperimente aufgenommen werden. Um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, werden die Signalintensitäten aus 15 Spektren im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins addiert und anschließend wieder durch 15 geteilt. Dabei sollten die NOE-Signale stabil bleiben, während das Rauschen sich ausmittelt und dadurch kleiner wird.

Aufgrund starker Kreuzrelaxation im gebundenen Zustand des Peptids ist die Diagonalmagnetisierung im Spektrum nach der Belichtung um ca. 30 % im Vergleich zu einem Spektrum vor Belichtung reduziert. Deshalb werden die Signalintensitäten des gemittelten Spektrums mit einem Faktor 0,7 multipliziert.

Um ein Differenzspektrum zu erhalten, werden die Signalintensitäten des mit 0,7 multiplizierten gemittelten Spektrums im dunkeladaptierten Zustand vom ersten Spektrum des lichtaktivierten Zustands des Rhodopsins abgezogen. Dieses Differenzspektrum wird anschließend zur NOE-Zuordnung für die Strukturanalyse verwendet.

3.11.5 NOE-Zuordnung und Kalibrierung

Die NOE-Signale werden auf Basis der erfolgten Resonanzzuordnung manuell zugeordnet. Dazu wird die Software CARA (Keller 2004) verwendet.

Für die Kalibrierung wird eine r^{-4} -Distanzabhängigkeit der NOE-Kreuzsignale gewählt, um den Effekt der potentiellen Spindiffusion zu minimieren (Güntert et al. 1991). Die qualitative Verteilung der beobachteten sequentiellen H^α -HN-Signale sind typisch für eine α -helikale Struktur. Deshalb werden als Referenz diese sequentiellen Abstände $d_{\alpha N}$ von 3,5 Å des helikalen Bereiches im Peptid gewählt. Schwache Kreuzsignale zwischen Protonen A und C werden dann nicht berücksichtigt, wenn starke Kreuzsignale zwischen den Protonen A und B sowie B und C existierten. Für die Strukturberechnung werden Distanzeinschränkungen von $r \pm 0,2 r$ Rückgrat-Rückgrat- und Rückgrat-Seitenketten-Interaktionen verwendet. Für Seitenketten-Seitenketten-Interaktionen werden Distanzeinschränkungen von $r \pm 0,3 r$ verwendet.

3.11.6 Strukturberechnung

Zur Bestimmung der dreidiemnsionalen Struktur der Peptide wird das Programmpaket Xplor-NIH (Schwieters et al. 2003) verwendet. Es wurden ausschließlich Standardprotokolle des Programms benutzt. Für alle Berechnungen wird die Parameterdatei *parallhdg.pro* verwendet, welche Teil des Xpor-NIH-Paketes ist. Die Datei enthält die Informationen über kolvalente und nicht-kovalente Geometrie der Peptidkette (Bindungslängen, Bindungswinkel, van-der-Waals-Radien etc.) sowie skalierbare Kraftkonstanten für alle Potentiale. Die konkrete Topologie der Peptidkette (d. h. die Struktur der Aminosäuren und deren Anordnung in der Peptidsequenz) wird mit Hilfe des Xplor-NIH-Skriptes *generate_template.inp* unter Verwendung der Topologiedatei *topallhdg.pro* generiert. Dabei wird eine gestreckte Peptidkette als Ausgangsmolekül für die Moleküldynamik erzeugt. Als experimentelle Struktureinschränkungen werden die in Kap. 3.11.5 beschriebenen Distanzeinschränkungen benutzt.

Die *simulated-annealing*-Moleküldynamik-Rechnung wird mit dem Protokoll *sa.inp* durchgeführt. Es werden Standardparameter mit folgenden Modifikationen verwendet. Zum Absuchen des Konformationsraumes beginnt das *sa.inp*-Protokoll mit einer Energieminimierung in 50 Schritten. Danach schließt sich eine Moleküldynamik (5 ps bei 1000 K) mit schwacher Gewichtung des biquadratischen van-der-Waal-Terms an. Diese schwache Gewichtung erlaubt den Atomen, sich gegenseitig zu passieren. Es folgt eine Moleküldynamik mit stärkerer Gewichtung der van-der-Waals-Interaktionen. Das Protokoll endet schließlich mit einer Abkühlphase von 5 ps in 50 K-Schritten auf 100 K und einer weiteren Energieminimierung in 1000 Schritten. Anschließend wird mit dem Protokoll *refine.inp* eine Verfeinerung der berechneten Strukturen durchgeführt.

Während der iterativen Vorgehensweise zur Eliminierung bzw. Minimierung der Verletzungen experimenteller Distanzeinschränkungen wird in der Regel eine Schar von 100 Molekülen berechnet, von welchen die 20 Strukturen mit den geringsten Energien zur Strukturanalyse verwendet werden.

3.11.7 Strukturanalyse

Die Visualisierung der Strukturen findet mit den Programmen MOLMOL (Koradi et al. 1996) und PyMOL (DeLano 2002) statt. Zur Analyse der Strukturen werden Ramachandran-Plots mit dem Programm MOLMOL oder der im Internet verfügbaren Software MolProbity (Lovell et al. 2003) erstellt. Zur Verifizierung der Sekundärstruktur wurde das Programm DSSP ver-

wendet (Kabsch & Sander 1983). Die rmsd (engl. *root mean square deviation*)-Werte wurden mit den Programmen Xplor-NIH (Schwieters et al. 2003) und MOLMOL berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Diskmembranpräparation

Rhodopsin ist ein Transmembranprotein, das zahlreich in den abgeflachten Diskmembranen der Stäbchenzellen vorkommt. Ziel dieser Arbeit war es, die dreidimensionale Struktur eines Peptidanalogs einer Arrestin- oder Transduzin-Bindestelle im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin mittels TrNOE-Experimenten zu bestimmen. Dazu war es notwendig, die Diskmembranen aus der Retina von Rinderaugen zu präparieren. Dafür wurde die unter Kapitel 3.4 beschriebene Methode angewendet.

Um zusätzlich TrRDC-Messungen am Peptid durchführen, war eine weitere Voraussetzung eine Vorzugsorientierung des Membranproteins im Magnetfeld. Abgeflachte Diskmembranen richten sich im starken Magnetfeld spontan aus, wodurch die partielle Orientierung des Rhodopsins gewährleistet ist.

Zur Präparation der Diskmembranen wurde die Ficoll-Methode nach Smith et al. (1975) angewendet. Ficoll PM 400 (GE Healthcare, Freiburg) ist ein stark verzweigtes, hydrophiles Polysaccharid, welches sich vollständig in Wasser lösen lässt. Es wird zur Bildung von Dichtegradienten für die zonale Zentrifugation verwendet, um Zellen oder Zellkompartimente zu trennen.

Eine 3,5 %ige Ficoll-Lösung ist für Diskmembranen eine hypotone Lösung, die intakte Diskmembranen leicht anschwellen, jedoch nicht platzen lässt. Deshalb flottierten diese während der Zentrifugation im entstehenden Gradienten und konnten dadurch von zerstörten Diskmembranen und restlichen Zellfragmenten getrennt werden. Durch geeignete Puffer, die für das weitere Vorgehen verwendet wurden, erreichte man, dass die Diskmembranen ihre abgeflachte Form beibehielten. Dabei musste ein Kompromiss gefunden werden, so dass die Diskmembranen weder aggregieren noch zu stark osmotisch anschwellen. Ersteres findet bei zu hoher, letzteres bei zu geringer Ionenstärke statt. Deshalb wurde für die NMR-Messungen ein 10 mM NaP_i -Puffer, 10 % D_2O , pH 6.6 mit 20 mM KCl gewählt.

4.1.1 UV/Vis-Spektroskopie an Diskmembranen

Die erfolgreiche Präparation intakter abgeflachter Diskmembranen wurde zunächst über ein UV-Vis-Spektrum im Wellenlängenbereich von 250 bis 600 nm überprüft. Dabei waren die Wellenlängen $\lambda = 280, 380$ bzw. 500 nm von besonderem Interesse. Bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde der Gesamtproteinanteil in der Suspension ermittelt. Bei 280 nm absorbieren das Protein Rhodopsin als auch noch zusätzliche in bzw. an den Diskmembranen assoziierte Proteine. Bei 500 nm absorbiert ausschließlich das in Rhodopsin inkorporierte Chromophor 11-*cis*-Retinal. Es ist das Isomer, das charakteristisch für den Grundzustand des Rhodopsins ist. Durch die Absorption eines Photons isomerisiert 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal, welches wiederum bei 380 nm absorbiert. Dies ist die charakteristische Wellenlänge für den MetaII-Zustand des Rhodopsins. Das Extinktionsverhältnis $\alpha = A_{280 \text{ nm}} : A_{500 \text{ nm}}$ (s. Kap. 3.4.4) stellt sowohl ein Maß für die Reinheit der Suspension als auch für die Integrität des dunkeladaptierten Rhodopsins dar. Es sollte bei einer erfolgreichen Präparation nach Smith et al. (1975) bei 1,6 bis 2,2 liegen.

Die Diskmembranpräparation konnte erfolgreich im Labor etabliert werden. Es konnten Diskmembransuspensionen mit Volumina zwischen 1 und 3 ml präpariert werden, die je nach Präparationsdurchgang Konzentrationen von 150 bis 300 μM dunkeladaptiertem Rhodopsin enthielten. Dies entsprach ausgehend von ca. 1 mg Rhodopsin pro Diskmembran und einer Menge von 50 Retinae einer Ausbeute von bis zu 70 %. Das Extinktionsverhältnis α lag in der Regel bei Werten ≤ 2 .

In Abb. 4.1 A ist als Beispiel das Spektrum einer mit Faktor 20 verdünnten Diskmembransuspension in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, pH 6,6 mit 3 % LDAO im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins (schwarz) als auch nach 30 s Belichtung (rot) abgebildet. Die schwarze Kurve hat ein Maximum von 0,55 Extinktionseinheiten (AU) bei einer Wellenlänge $\lambda = 500$ nm sowie ein Maximum von 1,09 AU bei einer Wellenlänge $\lambda = 280$ nm. Dies entspricht einem Extinktionsverhältnis $\alpha = 2,0$ und einer Konzentration von 270 μM dunkeladaptierten Rhodopsins. Nach 30 s Belichtung verschiebt sich das Maximum von $\lambda = 500$ nm hypsochrom zur Wellenlänge $\lambda = 380$ nm (siehe rote Kurve). Dies zeigt, dass durch die Belichtung neben anderen Photointermediaten hauptsächlich der MetaII-Zustand des Rhodopsins entsteht.

Zusätzlich konnte mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) bestätigt werden, dass Rhodopsin zu einem sehr hohen Reinheitsgrad in der Diskmembransuspension vorlag. In Abb. 4.1 B wird ein SDS-Gel gezeigt, mit welchem eine Probe der Diskmembransuspension nach der Präparation analysiert wurde. Der Anteil des Rhodopsins an der Proteinfraction betrug mindestens 95 %.

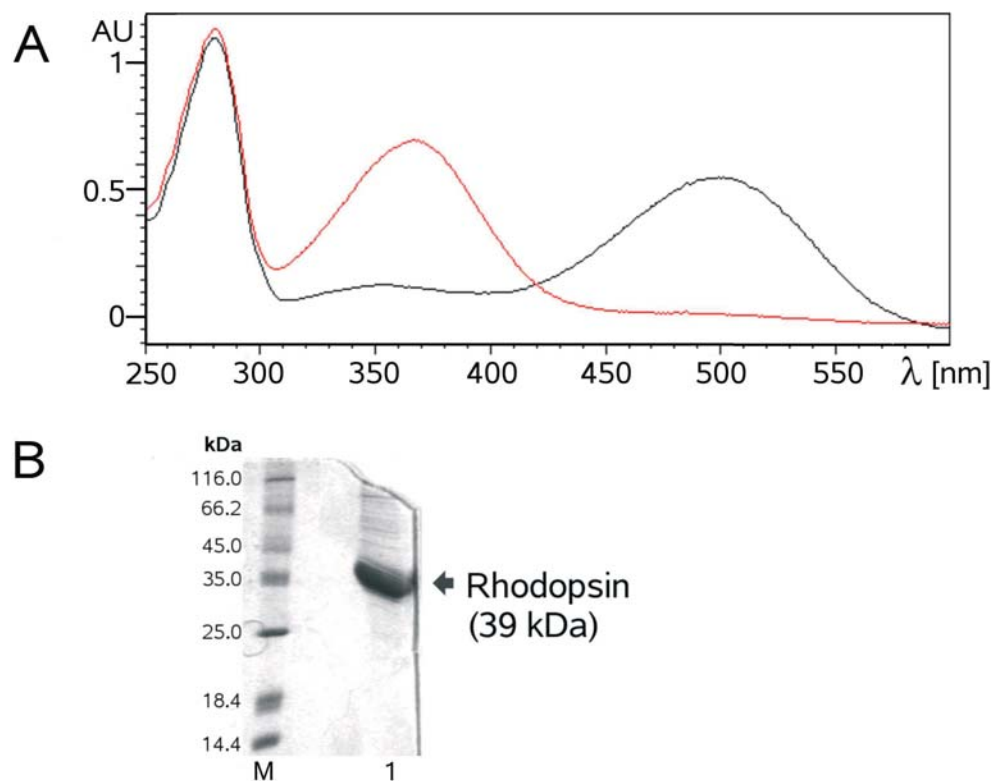


Abbildung 4.1: UV/Vis-Absorptionsspektrum dunkeladaptierter und lichtaktivierter Diskmembranen und SDS-Gel zur Überprüfung der Diskmembranpräparation. (A) 20fache Verdünnung einer Diskmembransuspension mit 275 μ M dunkeladaptiertem Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 3 % LDAO bei 6,6. Die schwarze Kurve entspricht dem UV/Vis-Absorptionsspektrum dunkeladaptierter Diskmembranen. Dunkeladaptiertes Rhodopsin hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 500$ nm. Die rote Kurve entspricht dem UV/Vis-Absorptionsspektrum der gleichen Probe nach 30 s Belichtung. Der aktivierte Zustand des Rhodopsins MetaII hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 380$ nm. Das Absorptionsverhältnis $A_{280\text{nm}}/A_{500\text{nm}}$ entspricht hier $1,09/0,55 = 2$. Die Qualität einer Diskmembranpräparation wird u. a. über diese Absorptionsverhältnis bestimmt und sollte im Bereich 1,6 bis 2,2 liegen. (B) 15 %iges SDS-Glyzin-Gel nach Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind 10 μ l einer Diskmembransuspension mit 100 μ M Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, pH 6,6. Der Anteil des Rhodopsins an den im Gel sichtbaren Proteinen beträgt ca. 95 %. Dies belegt die Reinheit der Diskmembransuspension.

4.1.2 Reproduktion der TrRDC-Messungen am $[U-^{15}\text{N}]\text{-S2-Peptid}$

Die verwendete Präparationsmethode wich teilweise von der von Koenig et al. (2002) verwendeten Methode zur Herstellung abgeflachter Diskmembranen ab. Ein weiteres Kriterium für die erfolgreiche Diskmembranpräparation war die Ausrichtung der mit Hilfe der modifizierten Methode hergestellten Diskmembranen im Magnetfeld. Als Indikator diente die Messbarkeit der TrRDC des S2-Peptids. Deshalb wurden ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren mit $50\text{ }\mu\text{M}$ Rhodopsin und 2 mM S2-Peptid aufgenommen, um den zeitlichen Verlauf der TrRDCs nach Lichtaktivierung des Rhodopsins zu bestimmen. Hiermit sollten die Messungen von Koenig et al. (2002) reproduziert und mit dessen Ergebnissen verglichen werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Präparation der Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen nach der oben beschriebenen Methode (Kap. 3.4) TrRDCs erfolgreich gemessen und qualitativ reproduziert werden konnten.

In Abb. 4.2 A sind exemplarisch die Änderung der TrRDCs bei einer Temperatur von $20\text{ }^\circ\text{C}$ in Abhängigkeit der Zeit der vier Aminosäuren E^{342} , K^{345} , G^{348} und F^{350} des S2-Peptids dargestellt. Die Punkte geben dabei die gemessenen Daten wieder, die durchgezogene Linie entspricht dem über einen gekoppelten Datensatz angepassten Zeitverlauf der einzelnen Kopplungen (s. Kap. 3.11.3). Die TrRDC der Aminosäuren N^{343} und S^{346} wurden ebenfalls bestimmt, während die der Aminosäuren L^{344} und D^{346} aufgrund von Signalüberlappungen nicht berücksichtigt wurden. Die J_{NH} -Kopplung hat ein negatives Vorzeichen, deshalb sind in der Abb. 4.2 A aus Gründen der Übersichtlichkeit lediglich die Beträge der J_{NH} -Kopplung angegeben. Die dipolare Kopplung ^1D zum Zeitpunkt $t = 0$ entspricht der Differenz der $^1J_{\text{dunkel}}$ und dem extrapolierten Wert $^1J^{\text{exp}}(0)$ der Regressionskurve. Die berechneten dipolaren Kopplungen ^1D entsprachen für die Aminosäuren E^{342} $-1,4\text{ Hz}$, für N^{343} $0,9\text{ Hz}$, für K^{345} $-2,3\text{ Hz}$, für S^{346} $0,2\text{ Hz}$, für G^{348} $-2,2\text{ Hz}$, für L^{349} $-0,2\text{ Hz}$ und für F^{350} $0,7\text{ Hz}$.

Im Histogramm in Abb. 4.2 B werden die berechneten dipolaren Kopplungen ^1D in blau im Vergleich zu den von Koenig et al. (2002) publizierten Daten in grün dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die entsprechenden TrRDCs zwar kleiner sind, jedoch qualitativ reproduziert werden konnten.

Die Methode der UV/Vis-Spektroskopie und die Messung der TrRDC des S2-Peptids bestätigten die Integrität der präparierten Diskmembranen und deren Ausrichtung im Magnetfeld. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Diskmembranen für TrNOE- und TrRDC-Messungen eignen.

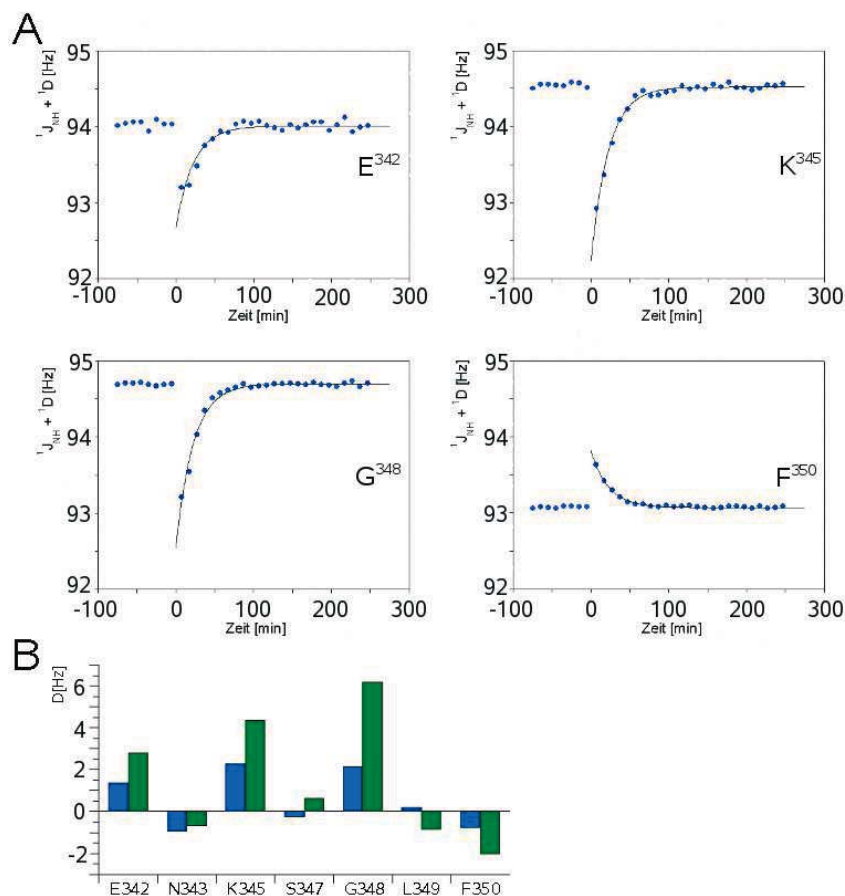


Abbildung 4.2: Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1J^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen des S2-Peptids in Abhängigkeit der Zeit nach der Photoaktivierung. A Die ^{15}N - ^1H - $^1J^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen der Aminosäuren E³⁴², K³⁴⁵, G³⁴⁸ und F³⁵⁰ wurden durch ^1H -gekoppelte ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren bei 20 °C und einer Magnetfeldstärke von 14,1 T gemessen. Die Probe enthielt 2 mM [U - ^{15}N]-S2, 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, 10 % D_2O , pH 6,6. Die Werte bei Zeitpunkten $t < 0$ entsprechen den gemessenen $^1J^{\text{dark}}$ -Aufspaltungen der Experimente mit dunkeladaptiertem Rhodopsin, die Werte bei Zeitpunkten $t > 0$ den gemessenen $^1J^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen der Experimente nach 30 s Belichtung der Probe. Die Zeitpunkte entsprechen dem zeitlichen Mittelpunkt eines HSQC-Experimentes. Die Regressionskurven wurden, wie unter Kap. 3.11.3 beschrieben, berechnet. B Histogramm der in dieser Arbeit ermittelten ^1D (blau) der Aminosäuren E³⁴², N³⁴³, K³⁴⁵, S³⁴⁷, G³⁴⁸, L³⁴⁹ und F³⁵⁰ im Vergleich zu Koenig et al. (2002) (grün).

4.2 ^1H - ^1H -NOESY-Experimente zur Selektion von Transduzin- und Arrestin-Peptiden

Die in Tab. 3.1 aufgeführten Peptide wurden getestet, um geeignete Kandidaten zu finden, die an lichtaktiviertes Rhodopsin im MetaII-Zustand binden und zur Strukturbestimmung mittels TrNOE-Spektroskopie und TrRDC-Messungen geeignet waren.

Die Peptide $T_\alpha(2-28)$ und $T_\alpha(2-25)_{\text{myr}}$ entsprechen den Sequenzabschnitten bereits bekannter Bindestellen des Transduzins, die Peptide Arr(51-70) und Arr(231-250) bereits bekannter Bindestellen des Arrestins. Sie waren auf ihr Wechselwirkungsverhalten mit MetaII von Dr. Oliver Ernst (Charité, Berlin) und Dr. Alexander Pulvermüller (Charité, Berlin) untersucht worden. Für die NMR-Testmessungen wurden diese Peptide freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Peptide Arr(66-80), Arr(152-170), Arr(232-245), Arr(251-262), Arr(342-354) wurden bei Dr. Peter Henklein (Charité, Berlin) zur Synthese in Auftrag gegeben. Kriterium zur Auswahl der Peptide waren auch hier bereits bekannte Bindestellen, sowie oberflächenexponierte Regionen im Arrestinmolekül, die als potentielle Bindestellen fungieren könnten. Zusätzlich wurde $T_\alpha(311-323)$ untersucht, ein T_α -Peptid, das eine Region enthält, die über Extra-MetaII-Versuche und Cross-Linking-Experimente als Bindestelle zu photoaktiviertem Rhodopsin identifiziert wurde (Hamm et al. 1988 und Cai et al. 2001).

4.2.1 1D- ^1H -Spektren der Peptide

Zunächst wurden 1D- ^1H -Spektren der freien Peptide aufgenommen. Dabei wurden Peptidkonzentrationen von 0,5 bis 2 mM in 10 mM NaP_i , 10 mM KCl und 10 % D_2O , pH 6.6 gewählt. Sofern ein für Peptide typisches Spektrum erkennbar war, konnte davon ausgegangen werden, dass die Peptide in Lösung weder aggregiert noch deaggregiert waren.

Im nächsten Schritt wurden 1D- ^1H -Spektren in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen aufgezeichnet. Diese Spektren wurden mit den 1D- ^1H -Spektren der freien Peptide verglichen. Zeigten die jeweiligen Spektren das gleiche Signalmuster, wurde das entsprechende Peptid für die NOESY-Experimente weiterverwendet.

Die Peptide Arr(51-70) und Arr(231-250) konnten unter den gewählten Bedingungen nicht gelöst werden. In den 1D- ^1H -Spektren waren nur wenige und im Verhältnis zu der eingesetzten Konzentration zu schwache Signale zu detektieren.

Bei Peptid $T_{\alpha}(2-25)_{myr}$ konnten nach Zugabe der Diskmembranen zum freien Peptid überhaupt keine Signale mehr detektiert werden.

Die drei bisher erwähnten Peptide wurden als nicht geeignete Kandidaten für weitere Untersuchungen mittels TrNOESY- und TrRDC-Mesungen ausgeschlossen.

Lag jedoch eine erkennbare Übereinstimmung des jeweiligen 1D ^1H -Spektrums des freien Peptids mit dem entsprechenden Spektrum in Anwesenheit der Diskmembranen vor, wurde dieses Peptid zunächst in die engere Auswahl zur Messung der TrNOESY-Spektren genommen. Es handelte es sich dabei um die Peptide Arr(66-80), Arr(152-170), Arr(232-245), Arr(251-262), Arr(342-354), $T_{\alpha}(311-323)$ und $T_{\alpha}(2-28)$.

4.2.2 ^1H - ^1H -NOESY-Spektren ausgewählter Peptide

Die Arrestin-Peptide Arr(66-80), Arr(152-170), Arr(232-245), Arr(251-262) und Arr(342-354) sowie die Transduzin-Peptide $T_{\alpha}(311-323)$ und $T_{\alpha}(2-28)$ wurden auf deren Wechselververhalten zu lichtaktiviertem Rhodopsin mittels ^1H - ^1H -NOESY-Spektren getestet. Um eine Bindung des jeweiligen Peptids an Rhodopsin zu detektieren, mußte sich das Peptid im schnellen Austausch zwischen gebundener und freier Form befinden. Die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion k_{-1} mußte deshalb im Bereich 10^5 s^{-1} sein. Dies entspricht einem K_D im Bereich von 10^{-3} M , wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine diffusionsabhängige Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion k_1 von $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ vorliegt. Peptide, die entweder schwächer oder stärker an Rhodopsin binden, konnten mit dieser Methode nicht als Wechselwirkungspartner des lichtaktivierten MetaII-Zustands identifiziert werden.

Ein NOESY-Spektrum des freien Peptids, d. h. ohne Diskmembranen sollte nur wenige oder keine Kreuzsignale aufweisen. Da das Peptid in freier Lösung keine definierte Raumstruktur hat, sind die NOE sehr klein und können deshalb nicht detektiert werden.

In Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen sollten die Peptide nicht an Rhodopsin im Grundzustand binden. Möglicherweise kam es bereits in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen jedoch zu Wechselwirkungen der Peptide mit der Membranoberfläche, wodurch aber keine Struktur induziert wurde. Deshalb sollten auch hier maximal sequentielle Kreuzsignale zu detektieren sein.

Bindet ein Peptid mit einer Dissoziationskonstanten im oben genannten milli- bis mikromolaren Bereich an lichtaktiviertes Rhodopsin, sollte es zu einer deutlichen Vermehrung der NOE-Signale kommen. Diese Kreuzsignale und die damit verbundenen Abstandsinformationen sind charakteristisch für die durch die Bindung induzierte Struktur.

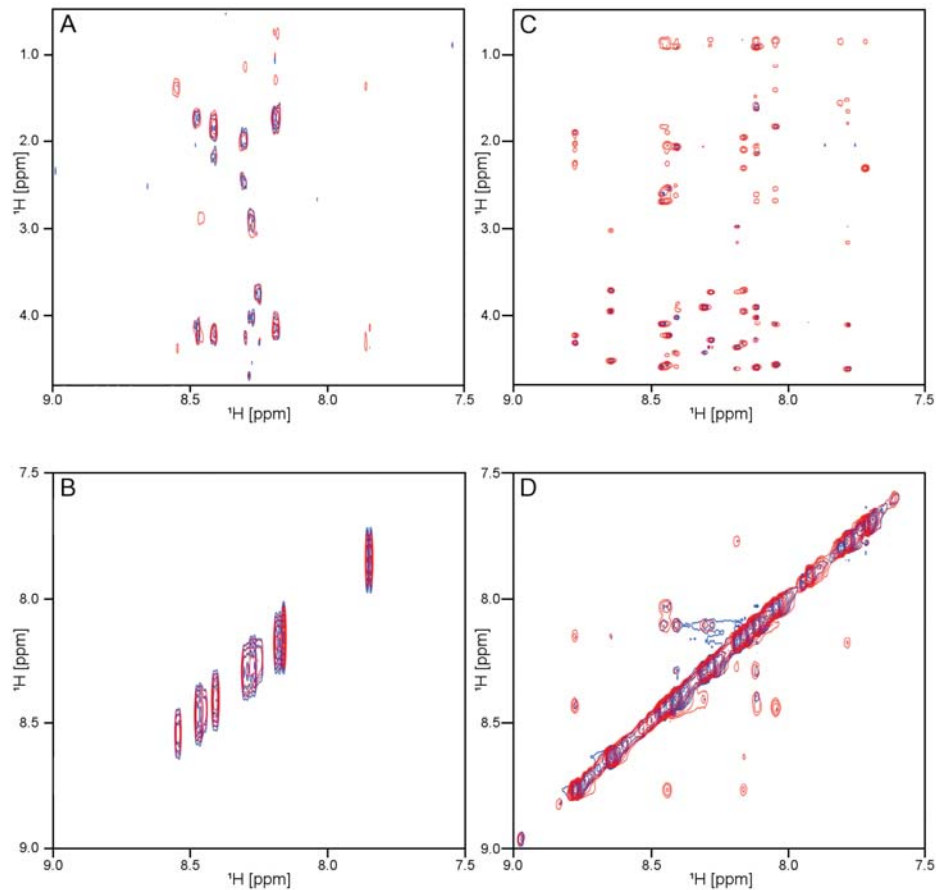


Abbildung 4.3: Überlagerte Ausschnitte aus ^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Peptide $\text{T}_\alpha(311-323)$ und $\text{Arr}(66-80)$ mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen. **A u. B** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (A) und der HN-HN-Bereiche (B) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids $\text{T}_\alpha(311-323)$ in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 1 mM $\text{T}_\alpha(311-323)$ mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern aufgezeichnet. **C u. D** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (C) und der HN-HN-Bereiche (D) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids $\text{Arr}(66-80)$ in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 1 mM $\text{Arr}(66-80)$ mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern bei 10 °C aufgezeichnet.

Es wurden NOESY-Spektren, wie unter Kap. 3.11.2 beschrieben aufgezeichnet. Die Proben hatten eine Konzentration von 60 μM Rhodopsin im Grundzustand und 1 mM des jeweiligen Peptids in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei einem pH-Wert von 6,6. Es wurde jeweils sowohl ein NOESY-Spektrum im dunkeladaptierten als auch im lichtaktivierten Zustand des Rhodopsins aufgezeichnet. Die Abb. 4.3, 4.4 und 4.5 zeigen Überlagerungen der Spektren des jeweiligen Peptids in Anwesenheit dunkeladaptierten und lichtaktivierten Rhodopsins. Abgebildet sind Ausschnitte des HN-aliphatischen Bereichs (oben) und des HN-HN-Bereichs (unten). Dabei entsprechen die blauen Signale den Kreuzkorrelationen des jeweiligen Peptids in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen. Die roten Signale entsprechen den Kreuzkorrelationen des Peptids nach Belichtung der Probe. In Abb. 4.3C/D ist deutlich zu erkennen, dass bei der Probe mit dem Peptid Arr(66-80) nach Belichtung des Rhodopsins zahlreiche zusätzliche Signale detektiert werden konnten.

Das Spektrum des T_α (311-323)-Peptids nach Lichtaktivierung des Rhodopsins in Abb. 4.3A/B zeigt einige wenige zusätzliche TrNOE-Signale im Vergleich zum Spektrum des dunkeladaptierten Zustands. Dies könnte daran liegen, dass das Peptid zwar an photoaktiviertes Rhodopsin bindet, die Austauschrate jedoch genau im oberen oder unteren Grenzbereich lag, bei welchen die TrNOE-Signale nicht mehr ausreichend messbar waren.

Vergleicht man die überlagerten Spektren der Peptide Arr(152-170), Arr(232-245), Arr(251-262), Arr(342-354) in den Abb. 4.4 und 4.5, sind jeweils keine signifikanten Unterschiede der detektierten NOE-Signale vor bzw. nach Belichtung des Rhodopsins zu erkennen. Auch die hier nicht abgebildeten Spektren des Peptids T_α (2-28) wiesen keine zusätzlichen Signale nach Belichtung des Rhodopsins auf.

Daraufhin wurde zunächst das Peptid Arr(66-80) als einziges zur Strukturberechnung mittels TrNOE- und TrRDC-Messungen im Rhodopsin gebundenen Zustand ausgewählt. Das Peptid wurde, wie in den Kap. 3.5 und 3.6 beschrieben, isopenangereichert rekombinant hergestellt. Zu einem späteren Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass das Peptid Arr(66-80) chemisch instabil ist und bereits vor bzw. während der NMR-Messungen abgebaut wurde (s. ebenfalls Kap. 4.3).

Es wurde recherchiert, dass Peptide, die in ihrer Aminosäuresequenz an dritter Stelle ein Glyzin aufweisen, dazu neigen, die ersten beiden Aminosäuren abzuspalten. Dabei kommt es durch einen nucleophilen Angriff des endständigen Amidstickstoffs auf das Carbonyl-C-Atom der zweiten Aminosäure zu einem Ringschluss. Es entsteht ein Laktam aus den Peptidbindungen der ersten beiden Aminosäuren R^{66} und Tyr^{67} , welches auch als Diketopiperazin bezeichnet wird. Durch die Abspaltung entsteht ein Peptid aus 13 Aminosäuren mit der Se-

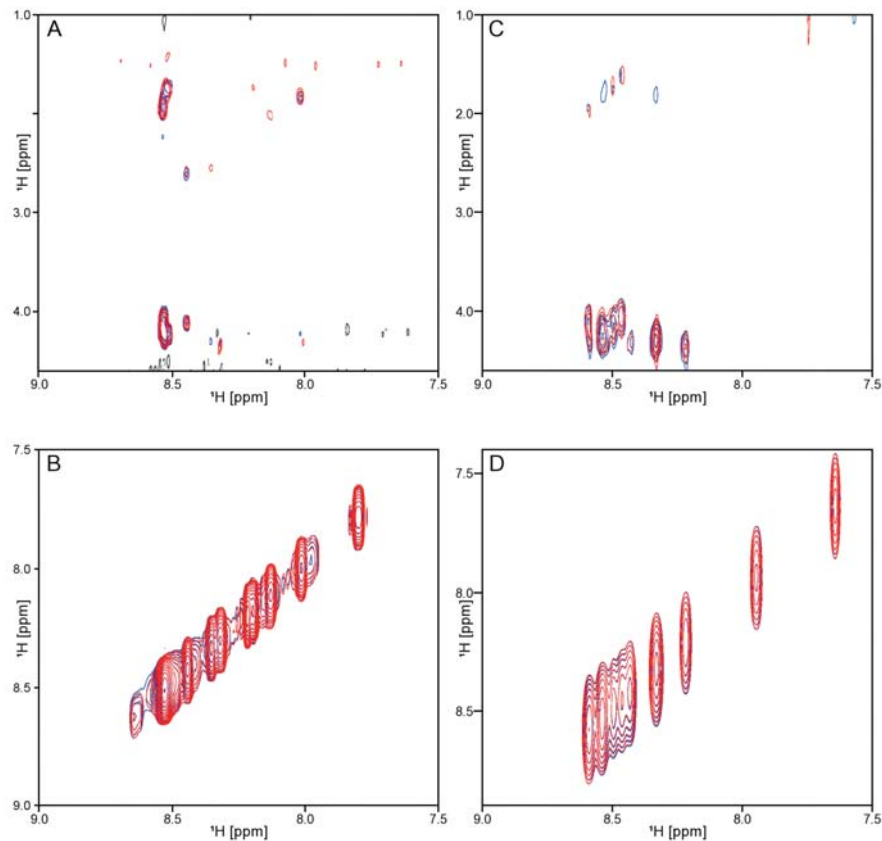


Abbildung 4.4: Überlagerte Ausschnitte aus ^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Peptide Arr(152-170) und Arr(232-245) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen. **A u. B** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (A) und der HN-HN-Bereiche (B) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(152-170) in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 1 mM Arr(152-170) mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern aufgezeichnet. **C u. D** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (C) und der HN-HN-Bereiche (D) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(232-245) in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 1 mM Arr(232-245) mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern bei 10 °C aufgezeichnet.

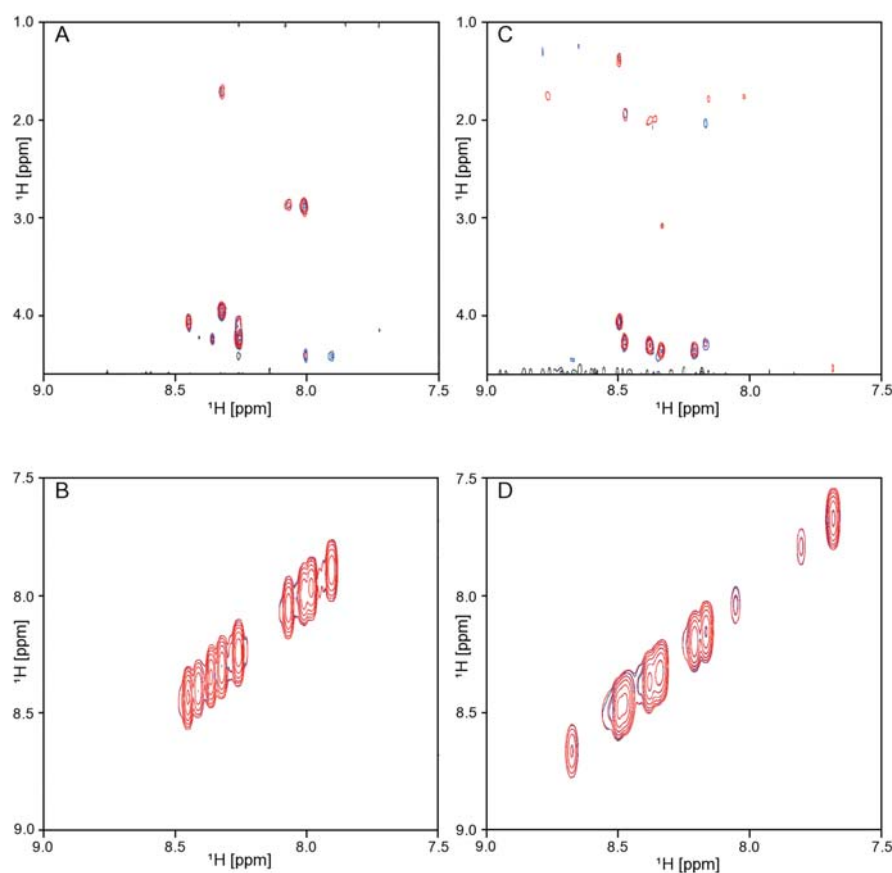


Abbildung 4.5: Überlagerte Ausschnitte aus ^1H - ^1H -NOESY-Spektren der Peptide Arr(251-262) und Arr(342-354) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen. **A u. B** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (A) und der HN-HN-Bereiche (B) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(251-262) in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 1 mM Arr(251-262) mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern aufgezeichnet. **C u. D** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (C) und der HN-HN-Bereiche (D) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(342-354) in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 1 mM Arr(342-354) mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern bei 10 °C aufgezeichnet.

quenz Arr(68-80). Des Weiteren traten bei diesem Peptid, wie unter Kap. 4.5.3 beschrieben, Schwierigkeiten auf, die TrRDC im Rhodopsin gebundenen Zustand zu bestimmen. Deshalb wurden drei weitere Peptide, die sich von der Sequenz des Arr(66-80)-Peptids ableiten ließen untersucht. Bei der Auswahl der Peptide wurde darauf geachtet, dass Glycin nicht an dritter Stelle der Aminosäuresequenz auftrat. Ebenfalls wurden die neuen Peptide im Vergleich zu Arr(66-80) C-terminal verkürzt. Die Peptide Arr(65-77), Arr(65-76) und Arr(67-77) wurden mittels Aufnahme der NOESY-Spektren in Anwesenheit sowohl dunkeladaptierter als auch lichtaktivierter Diskmembranen ebenfalls auf deren Wechselwirkungsverhalten zu photoaktiviertem Rhodopsin untersucht.

Es konnte festgestellt werden, dass alle drei Peptide ebenfalls an photoaktiviertes Rhodopsin binden. Es konnte jeweils eine deutlich höhere Anzahl an TrNOE-Kreuzsignalen im Spektrum nach der Lichtaktivierung im Vergleich zum Spektrum des dunkeladaptierten Zustands detektiert werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass auch die verkürzten Peptide an photoaktiviertes Rhodopsin binden und durch die Bindung eine wohldefinierte dreidimensionale Struktur induziert wird. Exemplarisch werden in Abb. 4.6 die Überlagerungen der Ausschnitte des HN-aliphatischen Bereichs (A) und des HN-HN-Bereichs (B) der aufgezeichneten ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Arr(67-77)-Peptids gezeigt. Die in blau abgebildeten Signale entsprechen den Kreuzkorrelationen vor, die in rot abgebildeten Signale den Kreuzkorrelationen nach der Belichtung des Rhodopsins. Da das Spektrum des Peptid Arr(67-77) im lichtaktivierten Zustand die wenigsten Signalüberlagerungen aufwies, wurde dieses Peptid für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Der Fokus dieser Arbeit lag somit auf den beiden Arrestin-Peptiden Arr(66-80) und Arr(67-77), die beide der Aminosäuresequenz der Region zwischen den β -Faltblättern V und VI (Loop V-VI) der Kristallstruktur des Arrestins entsprechen.

4.3 Herstellung des isotopenangereicherten Arr(66-80)-Peptids

4.3.1 Klonierung des Arr(66-80)-kodierenden Plasmids

Für die Herstellung des für Arr(66-80) kodierenden Plasmids pTKK19xb/ub_Jue2 wurde die Strategie nach Kohno et al. (1998) verwendet. Bei dieser Methode wurde das gewünschte Peptid als Fusionsprotein aus Ubiquitin und einem N-terminalen His₁₀-Überhang in *E. coli* expri-

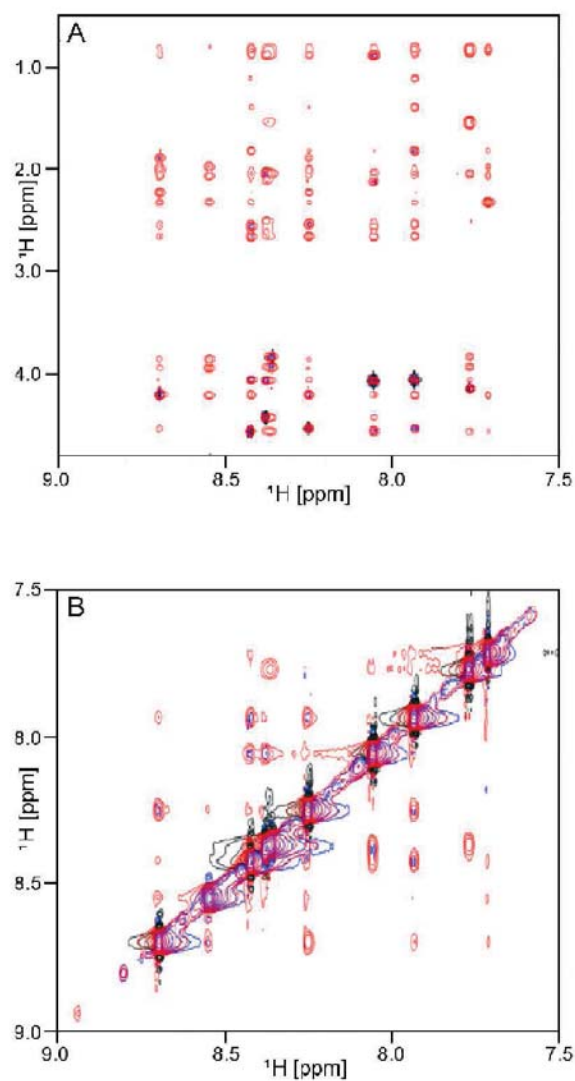


Abbildung 4.6: Überlagerte Ausschnitte aus ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(67-77) mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen. **A u. B** Überlagerte Ausschnitte der HN-aliphatischen Bereiche (A) und der HN-HN-Bereiche (B) zweier ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Peptids Arr(67-77) in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen (blau) und nach 30 s Belichtung (rot). Die Suspension enthielt 2 mM Arr(67-77) mit 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Beide Spektren wurden bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T mit gleichen Aufnahmeparametern bei 10 °C aufgezeichnet.

miert. Dieses Expressionssystem wurde ausgewählt, da es besonders für kleine Peptide geeignet und bereits im Labor etabliert war. Ein weiterer Vorteil war, dass Ubiquitin-Fusionsproteine einfach rückgefaltet werden können. Deshalb konnte sowohl das in löslicher Form als auch in Einschlusskörperchen exprimierte His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80) gereinigt und verwendet werden. Zusätzlich konnte das Fusionsprotein mit hoher Ausbeute hergestellt werden, während der His₁₀-Überhang eine einfache Reinigung über Ni²⁺-NTA-Agarose erlaubte.

Synthetische, einzelsträngige Oligonukleotide wurden mittels eines Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren (s. Kap. 3.6.3) zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment, das für Arr(66-80) kodiert hybridisiert. Die Reinigung dieses DNA-Fragmentes von verbliebener, einzelsträngiger DNA erfolgte über Gelelektrophorese (s. Kap. 3.5.2) und Gelextraktion (s. Kap. 3.5.3).

Als Vektor für die Klonierung wurde das Plasmid pTKK19xb/ub verwendet (Kohno et al. 1998). Für die Präparation der DNA, welche für das Fusionsprotein His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80) kodierte, wurde der Ausgangsvektor mit den Restriktionsenzymen *Mph*I 103I und *Not*I linearisiert. Nach Reinigung des linearisierten Vektors mittels Gelelektrophorese (s. Kap. 3.5.2) und Gelextraktion (s. Kap. 3.5.3) erfolgte die Ligation und eine anschließende Transformation in den Klonierungsstamm *E. coli* Mach1-T1 (s. Kap. 3.5.5). Zur Analyse der Transformanden wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt (s. Kap. 3.6.5). Zeigten die Amplifikate im analytischen Gel die erwartete Größe, wurde die Richtigkeit des Inserts mittels Sequenzierung überprüft. Erst dann erfolgte die Transformation des entstandenen pTKK19xb/ub_Jue2-Plasmids in den Expressionsstamm *E. coli* BL21DE3. Die erfolgreiche Klonierung des Plasmids wurde durch eine Testexpression im kleinen Maßstab bestätigt.

4.3.2 Expression und Reinigung des His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins

Die Herstellung des einheitlich mit ¹⁵N- bzw. ¹³C-Isotopen angereicherten Peptids Arr(66-80) war notwendig, um ¹⁵N-¹H-HSQC und ¹³C-¹H-CT-HSQC-Spektren aufnehmen zu können. Diese NMR-Spektren dienten der Bestimmung der ¹J^{exp}-Kopplungen der ¹⁵N-¹H- und ¹³C-¹H-Bindungen in Abhängigkeit der Zeit bezogen auf den Zeitpunkt der Lichtaktivierung des Rhodopsins.

Die Überexpression des 13,1 kDa großen His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins erfolgte in M9-Minimalmedium (s. Kap. 3.7.1). Als einzige Stickstoffquelle wurde Ammoniumchlorid, als einzige Kohlenstoffquelle Glukose verwendet. Zur Herstellung des [*U*-¹⁵N]-isotopen-

angereichertem Fusionsproteins wurde ^{15}N -Ammoniumchlorid zusammen mit unmarkierter Glukose verwendet, zur Herstellung des $[U\text{-}^{13}\text{C}]$ -isotopenangereicherten Fusionsproteins wurde herkömmliches Ammoniumchlorid und vollständig ^{13}C -isotopenangereicherte $^{13}\text{C}_6$ -Glukose verwendet.

Ein Volumen von 1 l M9-Minimalmedium wurde, wie bereits in Kap. 3.7.1 beschrieben mit einer Kolonie pTKK19xb/ub_Jue2 tragender *E. coli* BL21 DE3-Bakterienzellen inokuliert, um eine ausreichende Menge Peptid für eine NMR-Messung zu erhalten. Bei einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,6 und 0,8 wurde die Überexpression des His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins durch die Zugabe von IPTG induziert. Die Zellernte erfolgte nach vier Stunden. Der Erfolg der Überexpression des Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE (s. Kap. 3.2.1) überprüft. In Abb. 4.7 wird ein SDS-Glycin-Gel gezeigt, bei welchem neben dem Marker (M) in Spur Expr1 eine Probe der Expressionskultur vor Induktion und eine Probe in Spur Expr2 nach vierstündiger Überexpression aufgetragen wurde. Das Gel wurde nach der Methode der Coomassie-Färbung gefärbt (s. Kap. 3.2.2). Es ist zu erkennen, dass die Proteinbande, die entsprechend der Markerbande von 14,4 kDa im SDS-Gel wanderte, nach vierstündiger Überexpression stärker angefärbt wurde. Dies bedeutete, dass der Proteinanteil des Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von 13,1 kDa in dieser Probe im Vergleich zur Probe vor Induktion deutlich höher war. Dadurch wurde die erfolgreiche Herstellung des Fusionsproteins bestätigt.

Pro Liter Medium konnten nach Zentrifugation 2 bis 3 g Zellen (Nasszellgewicht) gewonnen werden. Für die Reinigung des Fusionsproteins wurden die Zellpellets mittels Ultraschall (s. Kap. 3.7.2) aufgeschlossen, das Lysat zentrifugiert und zunächst der Überstand für die Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen verwendet (s. Kap. 3.7.3). Das Lysatpellet wurde, wie in Kap. 3.7.3 beschrieben, in 6 M Guanidinhydrochlorid resuspendiert, ü. N. inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Es wurde ebenfalls der Überstand für die Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen verwendet (s. Kap. 3.7.3).

Die erfolgreiche Reinigung des Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert. In Abb. 4.7 werden beispielhaft SDS-Gele der Reinigung unter nativen Bedingungen gezeigt. Es wurden jeweils 15 μl einer Fraktion der verschiedenen Reinigungsschritte analysiert. Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mittels der Methode der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Von links nach rechts sind jeweils Proben des Überstandes (Ü), des Pellets (P), des Durchflusses (D) und der verschiedenen Waschschrte (W1a und b, W2a und c) aufgetragen. Auf der rechten Seite sind die Elutionsfraktionen E1 bis E9 abgebildet. Es ist zu

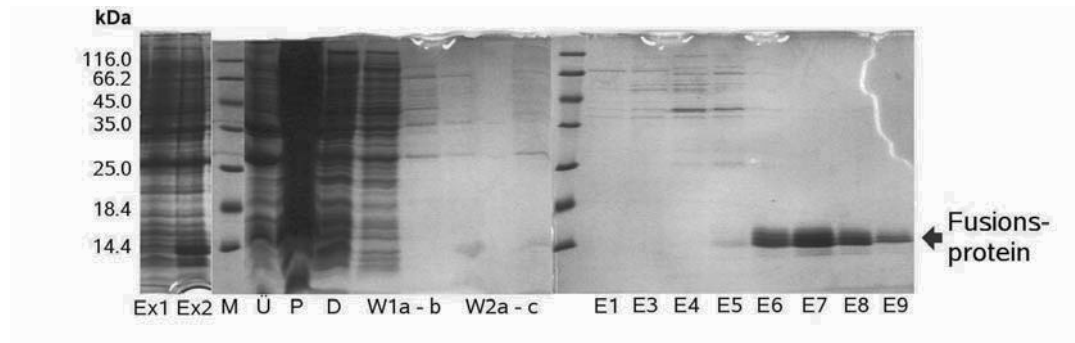


Abbildung 4.7: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression und der Reinigung unter nativen Bedingungen des His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins. 15 %ige SDS-Glyzin-Gele von Proben der Expression (A) und Reinigung (B) des His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins. **A** Spur M: 5 µl *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas), Spur Ex1: Zellsuspension vor Induktion, Spur Ex2: Zellsuspension nach 4 h Überexpression. **B** Spur M: 5 µl *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas), Spur Ü: Überstand des Rohextrakts nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur P: Pellet des Rohextrakts nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur D: Durchfluss des Säulenauftrages, Spuren W1a und b: Waschschrte mit Puffer A, Spuren W2a bis c: Waschschrte mit Puffer B, Spuren E1-E9: Elutionsfraktionen mit ansteigendem Imidazolgradienten. Das Fusionsprotein wurde bei einer Konzentration von 200 mM Imidazol eluiert. Pro Spur sind jeweils 10 µl der mit 4xProbenpuffer behandelten und anschließend bei 95 °C erhitzten Lösungen auf das Gel aufgetragen.

erkennen, dass das Fusionsprotein bei 200 mM Imidazol mit einem Reinheitsgrad von mehr als 95% eluiert wurde. Es konnten mit beiden Verfahren zusammen pro Liter Expressionskultur in etwa 40 mg Fusionsprotein gewonnen werden.

4.3.3 Spaltung des Fusionsproteins zur Gewinnung des Arr(66-80)-Peptid

Die Abspaltung des His₁₀-Ubiquitin vom fusionierten Arr(66-80)-Peptid erfolgte durch Proteolyse am C-terminalen Ende des Ubiquitins durch die Yeast-Ubiquitin-Hydrolase (YUH). Dabei wurden die Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein enthielten, vereinigt und mit 50 bis 100 µg YUH pro ml Spaltansatz versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Der zeitliche Verlauf des Spaltprozesses wurde, wie in Abb. 4.8 zu sehen, mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden im Anschluss an die Elektrophorese mittels der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Neben dem Marker (M) wurde in Spur 1 eine Probe der YUH-Stammlösung ana-

lysiert, um deren Integrität sicherzustellen. In Spur 2 wurde eine Probe des gereinigten Fusionsproteins aufgetragen, während die Proben in den Spuren 3, 4 und 5 jeweils nach 0,5 h, 1 h und 3 h dem Spaltansatz entnommen wurden. In Spur 3 ist im niedermolekularen Bereich am unteren Gelrand das abgespaltene Arr(66-80)-Peptid zu erkennen.

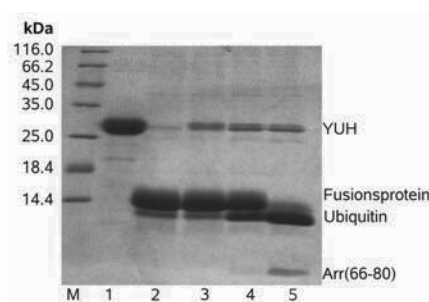


Abbildung 4.8: SDS-PAGE zur Überprüfung des enzymatischen Verdaus des His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsproteins. 15 %iges SDS-Glyzin-Gel mit Spur M: 5 µl *Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas), Spur 1: YUH-Stammlösung, Spur 2: Fusionsprotein vor Spaltung, Spur 3: Spaltansatz nach 0,5 h Spur 4: Spaltansatz nach 1 h Spur 5: Spaltansatz nach 3 h. Die Proben des Spaltansatzes wurden sofort nach Entnahme mit 4xProbenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden jeweils 15 µl auf das Gel aufgetragen.

Die Reversed-Phase-Chromatographie wurde im Anschluss angewendet, um das abgespaltene Arr(66-80)-Peptid in reiner Form zu erhalten (s. Kap. 3.7.3). Dazu mußte es sowohl von noch ungespaltenem Fusionsprotein, dem Spaltprodukt His₁₀-Ubiquitin und der YUH als auch von übrigen Pufferkomponenten getrennt werden. Das Arr(66-80) wurde bei 29 % ACN bei einem Retentionsvolumen von 24 ml eluiert. Im Chromatogramm in Abb. 4.9 sind die Absorptionssignale bei $\lambda = 214$ nm des Arr(66-80), sowie die der restlichen Komponenten des Spaltansatzes gekennzeichnet.

Die Fraktion des Arr(66-80) wurde sofort ü. N. lyophilisiert und das getrocknete Peptid anschließend bei -80 °C gelagert oder sofort für NMR-Messungen weiterverwendet. Nach dem abgeschlossenen Reinigungsverfahren erhielt man eine Ausbeute von ca. 4 mg Arr(66-80) pro Liter Expressionsmedium.

Des Weiteren konnten die Signale über die Bestimmung der Massen der eluierten Komponenten mittels MALDI-TOF (Dr. Sabine Metzger, BMFZ) zugeordnet und damit die erfolgreiche Herstellung und Reinigung des isotopenangereicherten Arr(66-80) bestätigt werden.

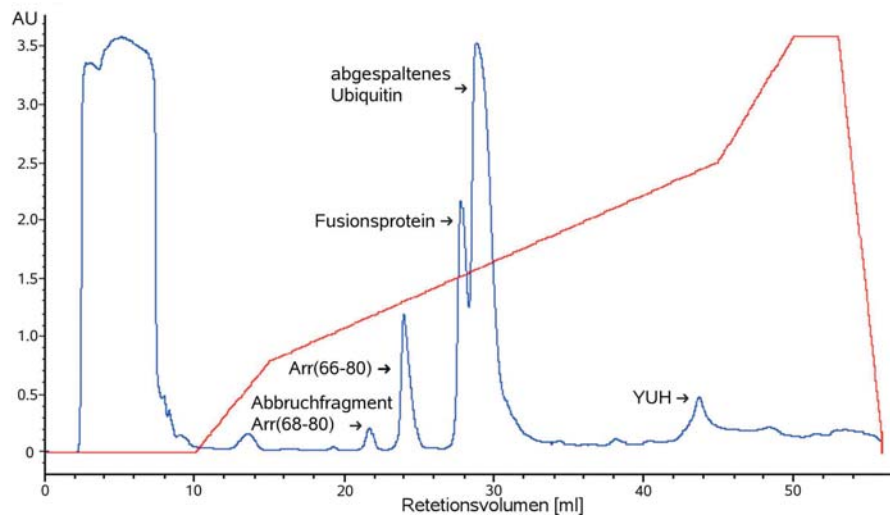


Abbildung 4.9: RPC-Chromatogramm nach enzymatischem Verdau des Fusionsproteins zur Reinigung des Arr(66-80)-Peptids 5 ml eines Spaltansatzes wurden auf eine 15RPC-3-ml-Säule (Amersham Bioscience) injiziert. Die Trennung erfolgte über einen ACN-Gradienten (rot). Das Peptid wurde bei einem Retentionsvolumen von 24 ml bei 29 % ACN eluiert. Die Detektion erfolgte bei einer $\lambda = 214$ nm.

Bei einem Retentionsvolumen von ca. 22 ml fällt in Abb. 4.9 ein kleines Signal auf, das zunächst nicht zugeordnet werden konnte. Die Massenbestimmung ergab 1484 Da. Dies entspricht dem Molekulargewicht des $[U-^{15}\text{N}]$ -isotopenangereicherten Peptidrestes des Arr(66-80), welches nach Bildung des Diketopiperazins entsteht. Dies bestätigte die These der Diketopiperazin-Bildung und zeigte, dass dieser Zerfallsprozess bereits während der Reinigung begann.

4.4 Sequenzspezifische ^1H -Resonanzzuordnung

Die Zuordnung der ^1H -Resonanzen der Peptide Arr(66-80) sowie Arr(67-77) erfolgte ausgehend von der Aminosäuresequenz über TOCSY (engl. *Total Correlation Spectroscopy*)- und ROESY (engl. *Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy*)-Spektren der freien Peptide in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl und 10 % D_2O bei pH 6,6. Bei einem TOCSY-Experiment werden die Protonen eines Spinsystems miteinander korreliert, d. h. man erhält für jeden Aminosäure-Typ ein charakteristisches Signalmuster. Über dieses Signalmuster kann eine

Aminosäure identifiziert oder auf wenige Möglichkeiten eingeschränkt werden. Eine Information über die Sequenzposition kann jedoch nicht ermittelt werden. In Abb. 4.10 wird der HN-aliphatische Bereich des TOCSY-Spektrums für das Peptid Arr(66-80), in Abb. 4.11 für das Peptid Arr(67-77) gezeigt. Oberhalb der 2-dimensionalen TOCSY-Spektren ist jeweils eine Projektion der direkten ^1H -Dimension mit der Bezeichnung der jeweiligen Aminosäure abgebildet. Zusätzlich wurde jeweils ein ROESY-Spektrum zur sequentiellen Zuordnung

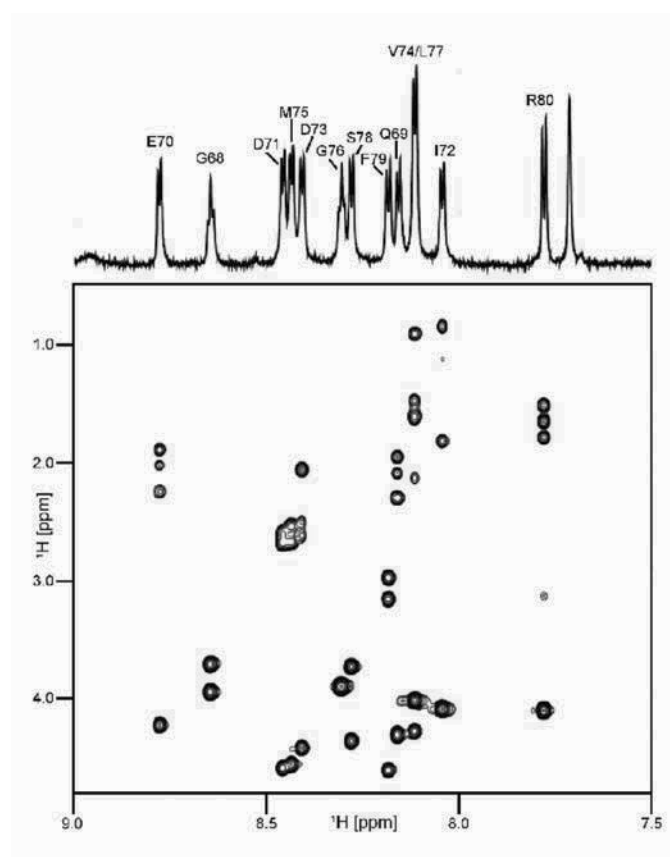


Abbildung 4.10: Ausschnitt eines TOCSY-Spektrums des Arr(66-80)-Peptids. Ausschnitt des HN-aliphatischen Bereichs eines TOCSY-Spektrums von 1 mM Arr(66-80) in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, 10 % D_2O bei pH 6,6 zur ^1H -Resonanzzuordnung des Peptids. Oberhalb des TOCSY-Spektrums ist eine Projektion der direkten ^1H -Dimension mit der Bezeichnung der Aminosäuren abgebildet. Das Spektrum wurde bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T bei 10 °C aufgezeichnet.

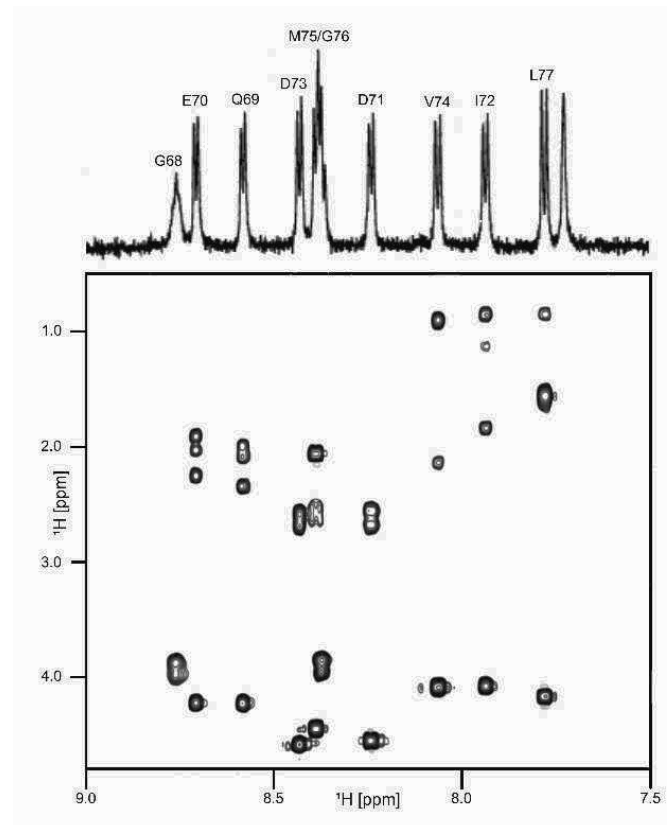


Abbildung 4.11: Ausschnitt eines TOCSY-Spektrums des Arr(67-77)-Peptids. Ausschnitt des HN-aliphatischen Bereichs eines TOCSY-Spektrums von 1 mM Arr(67-77) in 10 mM NaP_i, 20 mM KCl, 10 % D₂O bei pH 6,6 zur ¹H-Resonanzzuordnung des Peptids. Oberhalb des TOCSY-Spektrums ist eine Projektion der direkten ¹H-Dimension mit der Bezeichnung der Aminosäuren abgebildet. Das Spektrum wurde bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T bei 10 °C aufgezeichnet.

der Spinsysteme verwendet. Im ROESY-Experiment erfolgt der Verstärkungseffekt nicht, wie im konventionellen NOESY zwischen Elementen der longitudinalen Magnetisierung, sondern durch transversale Magnetisierung während der Spinlock-Phase. Der besondere Vorteil des ROE gegenüber dem NOE ist der Unterschied in der Abhängigkeit von der Korrelationszeit. Die ROE-Intensität ist immer positiv, unabhängig von der Korrelationszeit, d. h. es gibt keinen Bereich für $\omega\tau_c$, in welchem der ROE 0 oder annähernd 0 wird (Neuhaus & Williamson 2000). Deshalb können ROE-Signale des freien Peptids, trotz des kleinen Molekulargewichts

detektiert werden. Im ROESY-Spektrum wurden Kreuzsignale zwischen dem $H\alpha$ (das Proton des Proteinrückgrates, das an C^α gebunden ist) der Aminosäure i und dem Amidproton der Aminosäure $i+1$ detektiert. Darüber war es möglich die Spinsysteme der Aminosäurekette über den sogenannten *sequential walk* sequentiell zuzuordnen. Der *sequential walk* ist am Beispiel des Peptids Arr(67-77) in Abb. 4.17 in einem NOESY-Spektrum nach Belichtung des Rhodopsins abgebildet.

Mit den TOCSY- und ROESY-Spektren des freien Peptids konnten im Falle des Arr(66-80) alle Spinsysteme und die dazugehörenden ^1H -Frequenzen ab der dritten Aminosäure, im Falle des Arr(67-77) bereits ab der zweiten Aminosäure zugeordnet werden. Zusätzlich konnten die chemischen Verschiebungen der H^δ und H^ϵ des N-terminalen Y^{67} im TOCSY ebenfalls bestimmt werden.

4.5 HSQC-Experimente zur Ermittlung der TrRDC

Bei einem HSQC-Experiment werden Korrelationen zwischen einer Protonenfrequenz mit der Frequenz des an das jeweilige Proton gebundenen Heteronukleus beobachtet. Jedes Signal in einem HSQC-Spektrum repräsentiert ein kovalent an einen ^{15}N - bzw. ^{13}C -Kern gebundenes Proton.

^{15}N - ^1H -HSQC- und ^{13}C - ^1H -CT-HSQC-Spektren wurden ohne Entkopplung in der indirekten Dimension aufgenommen. Daraus resultiert eine Aufspaltung des Signals zu einem Dublett in der indirekten Dimension. Die Differenz der chemischen Verschiebungen entspricht der Summe aus der ^1J -Kopplung und der Restdipolkopplung ^1D .

4.5.1 ^{15}N - ^1H -HSQC-Experimente am $[U-^{15}N]$ -Arr(66-80)-Peptid

Die NMR-Proben zur Bestimmung der TrRDC enthielten 2 mM $[U-^{15}N]$ -isotopenangereichertes bzw. $[U-^{13}C]$ -isotopenangereichertes Arr(66-80) und 50 μM dunkeladaptiertes Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, pH 6,6 und 10 % D_2O . Die Messungen wurden sowohl bei 20 °C als auch bei 10 °C durchgeführt.

Im Falle der ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren konnten bei beiden Temperaturen 13 ^1H - ^{15}N -Kopplungen des Peptidrückgrats detektiert werden. Die Kopplungen der ersten beiden Aminosäuren R^{66} und Y^{67} konnten aufgrund eines zu schnellen Protonenaustauschs mit dem Lösungsmittel nicht gemessen werden. Es traten keine Signalüberlappungen auf, so dass die Voraussetzung

gegeben war, für alle 13 detektierten Aminosäuren die ^{15}N - ^1H -Kopplungen zu bestimmen. In Abb. 4.12 werden Ausschnitte aus drei ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren gezeigt, die bei einer Temperatur von 20 °C aufgezeichnet wurden. Es ist jeweils der Bereich abgebildet, in welchem die ^{15}N - ^1H -Kopplungen des Peptidrückgrates detektiert wurden. Zusätzlich werden Projektionen der indirekten Dimension auf Höhe der Amidprotonenfrequenzen der Aminosäuren G⁶⁸, E⁷⁰, I⁷² und S⁷⁸ gezeigt.

Abb. 4.12 A zeigt einen Ausschnitt eines ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektrums im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins. Man erkennt scharfe Signale mit Linienbreiten in der direkten Dimension zwischen 12 und 16 Hz sowie ein hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Die Intensitätsverhältnisse der Dubletts, die sogenannte Dublett-Asymmetrie, liegt zwischen 1,02 und 1,12. Alle 13 detektierten ^{15}N - ^1H -Kopplungen sind entsprechend der zugehörigen Aminosäuren gekennzeichnet.

Abb. 4.12 B zeigt den gleichen Ausschnitt des ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektrums, welches direkt nach der Photoaktivierung aufgezeichnet wurde. Die Signalintensitäten nehmen ab und die Linienbreiten vergrößern sich auf 17 bis 24 Hz. Die Dublett Komponenten der Aminosäure G⁷⁶ konnten nicht mehr zuverlässig detektiert werden. Die Signalintensitäten der Aminosäure D⁷³ waren im Verhältnis zu den anderen detektierten Aminosäuren deutlich verkleinert. Ebenfalls kam es zu einer Signalüberlappung der hochfeldverschobenen L⁷⁷- und der tieffeldverschobenen V⁷⁴-Dublett Komponenten. Außerdem war eine, aufgrund von Interferenz zwischen der dipolaren Kopplung mit der Anisotropie der chemischen Verschiebung im gebundenen Zustand auftretende Dublett-Asymmetrie zwischen 1,14 und 1,57 zu beobachten. Ebenfalls ist bei den Projektionen ein deutlich verschlechtertes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erkennen.

Abb. 4.12 C zeigt den gleichen Ausschnitt des dritten Experimentes nach der Photoaktivierung, d. h. zu einem Zeitmittelpunkt von $t = 30$ min. Die Signalintensitäten nehmen wieder zu, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist wieder erhöht und die Linienbreiten der Signale nehmen wieder ab. Die Dublett-Asymmetrie nähert sich wieder dem Verhältnis an, das in den Ausgangsspektren zum Zeitpunkt vor der Belichtung gemessen wurde. Die Signaldubletts der Aminosäuren D⁷³ und G⁷⁶ sind ebenfalls wieder deutlich erkennbar. Die zu beobachteten Änderungen und die Annäherung an die Spektren des dunkeladaptierten Zustands lassen sich mit einer Abnahme der Konzentration des peptidbindenden Rhodopsinzustands durch spontane Umwandlung in andere, nicht bindende Intermediate erklären. Dieser Prozess ist temperaturabhängig und findet bei 10 °C langsamer als bei 20 °C statt. Spektren, die nach $t > 70$ min bei 10 °C und $t > 50$ min bei 20 °C aufgezeichnet wurden, entsprachen wieder nahezu den Spektren des dunkeladaptierten Zustands.

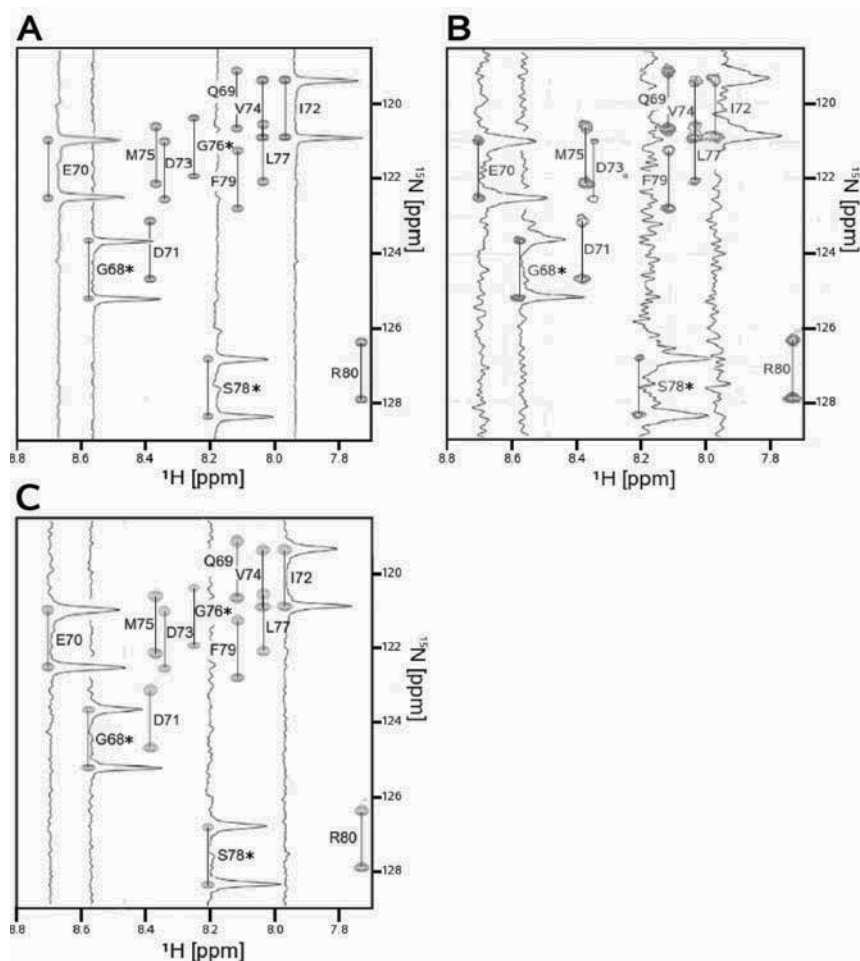


Abbildung 4.12: ^1H -gekoppelte ^{15}N -HSQC-Spektren zum Nachweis der TrRDC des ^{15}N -angereicherten Arr(66-80)-Peptids im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin. Ausschnitt aus gefalteten ^{15}N -HSQC-Spektren mit ^1H -Kopplung in der indirekten Dimension mit Projektionen der indirekten Dimension auf Höhe der Amidprotonenfrequenzen der Aminosäuren G⁶⁸, E⁷⁰, I⁷² und S⁷⁸. Die mit * gekennzeichneten Signale der Aminosäuren G⁶⁸, G⁷⁶ und S⁷⁸ entsprechen aufgrund des Aliasings nicht den zugeordneten ^{15}N -Resonanzen sondern sind um -11,9 ppm in der indirekten Dimension verschoben. Die Probe enthielt 2 mM [U - ^{15}N]-Arr(66-80) und 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, 10 % D_2O bei pH 6,6. Die Spektren wurde bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T bei 20 °C aufgezeichnet. **A** Spektrum einer dunkeladaptierten Probe **B** 1. Spektrum direkt nach 30 s Photoaktivierung **C** 3. Spektrum nach der Photoaktivierung ($t = 30 \text{ min}$).

Die hier beschriebenen Änderungen in Signalintensität, Linienbreite, Dublett-Asymmetrie und Signal-zu-Rausch-Verhältnis direkt nach der Photoaktivierung und die zu beobachtende zeitabhängige Wiederherstellung der Ausgangswerte wurden sowohl bei 10 °C als auch bei 20 °C beobachtet. Sie zeigten, dass Arr(66-80) an photoaktiviertes Rhodopsin bindet und sich im schnellen Austausch mit der freien Form des Peptids befindet. Dadurch konnten die ^1H - ^1H -NOESY-Experimente bestätigt werden.

4.5.2 ^{13}C - ^1H -CT-HSQC-Experimente am $[U\text{-}^{13}\text{C}]\text{-Arr(66-80)-Peptid}$

Im Falle der ^{13}C - ^1H -CT-HSQC-Spektren konnten bei beiden Temperaturen (10 °C und 20 °C) alle 15 ^{13}C - ^1H -Kopplungen des Peptidrückgrates detektiert werden. Auch hier traten im Bereich der Kopplungen des Peptidrückgrates keine Signalüberlappungen auf.

In Abb. 4.13 werden zwei ^{13}C - ^1H -HSQC-Spektren gezeigt, die bei einer Temperatur von 10 °C aufgezeichnet wurden. Es sind die Bereiche abgebildet, in welchen die ^1H - $^{13}\text{C}^\alpha$ -Kopplungen des Peptidrückgrates detektiert wurden. Zusätzlich werden Projektionen der indirekten Dimension der $^{13}\text{C}^\alpha$ -Protonenfrequenzen der Aminosäuren D⁷¹, L⁷⁷ und R⁸⁰ gezeigt. Die Abb. 4.13 A zeigt ein Spektrum, das im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins detektiert wurde, während Abb. 4.13 B das Spektrum direkt nach der Photoaktivierung zeigt. Auch bei diesen Spektren sieht man Unterschiede in Linienbreite, Signalintensität, Dublett-Asymmetrie und Signal-zu-Rausch-Verhältnis vor und nach der Belichtung des Rhodopsins. Analog der ^{15}N - ^1H -Spektren nehmen nach der Photoaktivierung die Signalintensitäten zu Gunsten der Linienbreite ab, die Dublett-Asymmetrie ist verstärkt und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich geringer. Die Signale der $^{13}\text{C}^\alpha$ - ^1H -Bindung des M⁷⁵ verschwinden vollständig.

Wie im Falle der ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren nähern sich diese Messwerte über einen bestimmten Zeitraum t wieder den Ausgangswerten an. Nach einem vollständigen Zerfall des peptidbindenden Zustands sind auch hier keine Unterschiede mehr in Bezug auf Linienbreite, Signalintensität, Dublettasymmetrie und Signal-zu-Rausch-Verhältnis zwischen einem Spektrum im dunkeladaptierten Zustand und einem Spektrum nach einer ausreichend langen Zeit > 70 min mehr erkennbar. Die gleichen Beobachtungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C gemacht. Die Angleichung der Spektren nach der Lichtaktivierung an die Spektren des dunkeladaptierten Zustand erfolgte hier bereits nach $t > 50$ min.

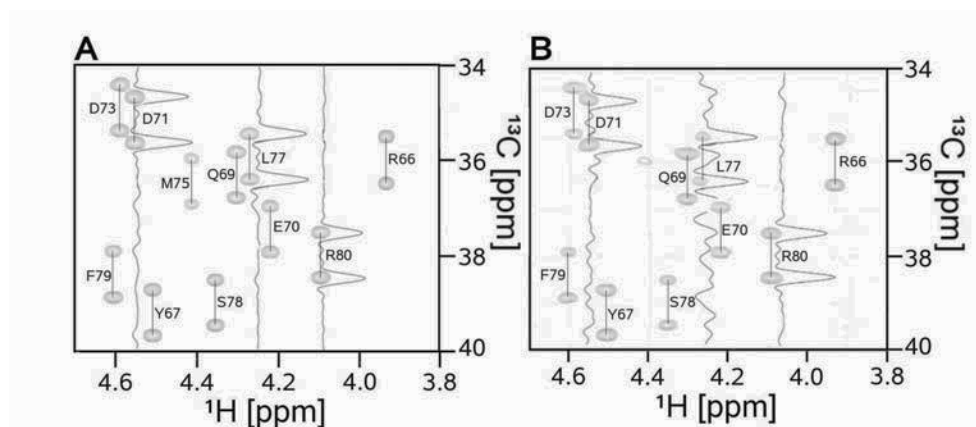


Abbildung 4.13: ^1H -gekoppelte ^{13}C - ^1H -CT-HSQC-Spektren zum Nachweis der TrRDC des ^{13}C -angereicherten Arr(66-80)-Peptids im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin. Ausschnitt aus ^{13}C -CT-HSQC-Spektren mit ^1H -Kopplung in der indirekten Dimension mit Projektionen der indirekten Dimension auf Höhe der $^{13}\text{C}^\alpha$ -Protonenfrequenzen der Aminosäuren D⁷¹, L⁷⁷ und R⁸⁰. Die Probe enthielt 2 mM [U - ^{13}C]-Arr(66-80) und 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i, 20 mM KCl, 10 % D₂O bei pH 6,6. Die Spektren wurde bei einer Magnetfeldstärke von 14,1 T bei 10 °C aufgezeichnet. **A** Spektrum einer dunkeladaptierten Probe **B** 1. Spektrum direkt nach 30 s Photoaktivierung.

4.5.3 Bestimmung und Analyse der $^1\text{J}^{\text{exp}}$ des Arr(66-80)-Peptides

Die ermittelten TrRDCs waren bei beiden Temperaturen (10 °C bzw. 20 °C) jedoch nicht reproduzierbar. Abb. 4.14 und Abb. 4.15 zeigen exemplarisch zwei Messreihen (rote und blaue Punkte) zur Bestimmung der ^{15}N - ^1H -TrRDC des Arr(66-80), die bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt wurden. Die gemessenen Beträge der ^{15}N - ^1H -Kopplungen der einzelnen Aminosäuren sind jeweils in einem eigenen Diagramm dargestellt. Die roten Punkte entsprechen den bestimmten $^1\text{J}^{\text{exp}}$ einer Messreihe, die blauen Punkte einer unabhängigen zweiten Messreihe. In den Diagrammen ist die gemessene Kopplung $^1\text{J}^{\text{exp}}$ in Abhängigkeit der Zeit t vor und nach der Photoaktivierung dargestellt.

Es konnte bei sämtlichen Messreihen gezeigt werden, dass sich die $^1\text{J}^{\text{exp}}$ -Kopplungen der verschiedenen Aminosäuren bei einer Temperatur von 10 °C spätestens nach 70 min bzw. bei einer Temperatur von 20 °C bereits spätestens nach 50 min wieder auf den Ausgangswert der $^1\text{J}^{\text{dark}}$ -Kopplung einstellten. Die eigentlich erwartete exponentielle Abnahme der gemessenen TrRDC als Funktion der Zeit nach der Photoaktivierung wurde nicht beobachtet. Statt dessen

zeigten die ermittelten $^1J^{exp}$ -Kopplungen sowohl innerhalb einer als auch zwischen aufeinanderfolgenden Messreihen eine starke Streuung. In vier Messreihen (bei 10 °C und 20 °C) zur Bestimmung der ^{15}N - ^1H -Kopplungen war zu beobachten, dass die Signale der C-terminalen Aminosäuren M⁷⁵ bis R⁸⁰ direkt nach der Photoaktivierung vollständig verschwunden waren. Erst im dritten Experiment nach der Belichtung waren diese wieder als schwache Signale detektierbar.

Die ermittelten ^{13}C - ^1H -Kopplungen waren ebenfalls weder bei 20 °C noch bei 10 °C reproduzierbar. Auch hier kam es zu starken Streuungen der Messwerte bei den Experimenten direkt nach der Photoaktivierung. Es konnte weder eine systematische Zeit- noch Temperaturabhängigkeit der ^1D festgestellt werden. Die $^1J^{exp}$ -Kopplung pendelte sich zwar ebenfalls wieder auf den Ausgangswert der $^1J^{dunkel}$ -Kopplung ein, streute aber deutlich stärker (d. h. $\pm 0,4$ Hz) als vor der Belichtung (d. h. $\pm 0,2$ Hz).

Es war weder für die ^{15}N - ^1H - noch für die ^{13}C - ^1H -Kopplungen möglich, sinnvolle Regressionskurven der Messreihen zu berechnen und die jeweils auf den Zeitpunkt $t = 0$ extrapolierte ^1D -Kopplungen zu bestimmen. Entsprechend konnte für das Peptid Arr(66-80) kein Ausrichtungs-Tensor (engl. *alignment tensor*) und schließlich keine Orientierung des Peptides zur Membrannormalen bestimmt werden.

Desweiteren konnte in den HSQC-Experimenten der Abbau des Arr(66-80)-Peptides beobachtet werden. Neben den zu erwarteten Korrelationen der ^{15}N - ^1H - und ^{13}C - ^1H -Kerne, traten in einigen HSQC-Spektren zusätzliche Kopplungssignale auf. Sie waren jeweils um weniger als 0,1 ppm zu den ursprünglich beobachteten Dublett Komponenten verschoben. Die zusätzlichen Signale traten nicht bei allen Dublett Komponenten auf. Waren die Signale vor dem Belichten noch sehr schwach, konnten sie nach der Photoaktivierung eindeutig detektiert werden. Die Erfahrung zeigte, dass das Auftreten der zusätzlichen Signale durch die Belichtung über eine Filtereinheit GG495 (Schott, Mainz) gering gehalten, jedoch nicht vollständig verhindert werden konnte. Diese Filtereinheit ist nahezu undurchlässig für Lichtstrahlen mit einer Wellenlänge $\lambda < 480$ nm. Die neu auftretenden Signale wurden schließlich mit der Abspaltung des Diketopiperazins und der damit verbundenen Bildung des Peptides Arr(68-80) in Verbindung gebracht.

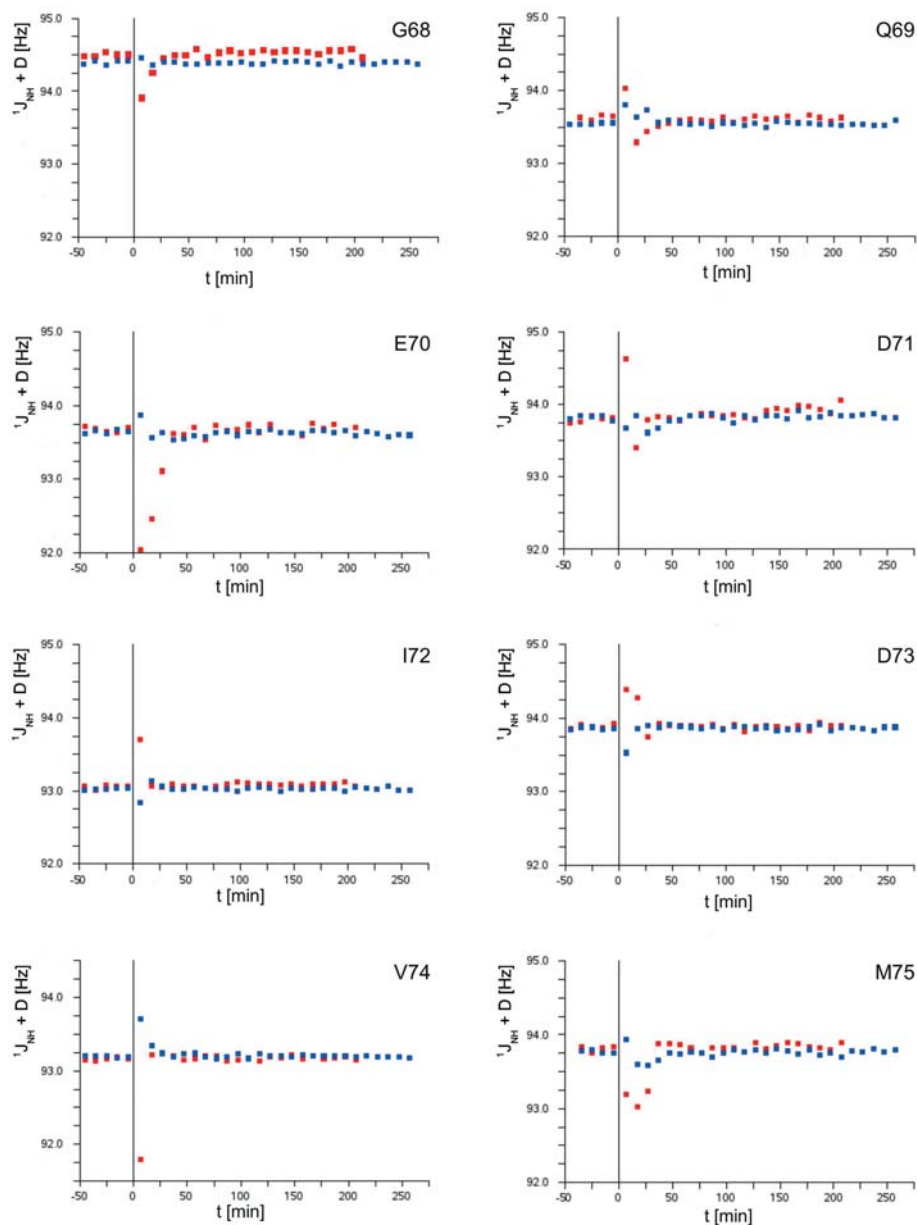


Abbildung 4.14: Gemessene ^{15}N - ^1H J^{exp} -Aufspaltungen des Arr(66-80)-Peptids in Abhängigkeit der Zeit nach der Photoaktivierung - Teil 1. Text siehe Abb. 4.15

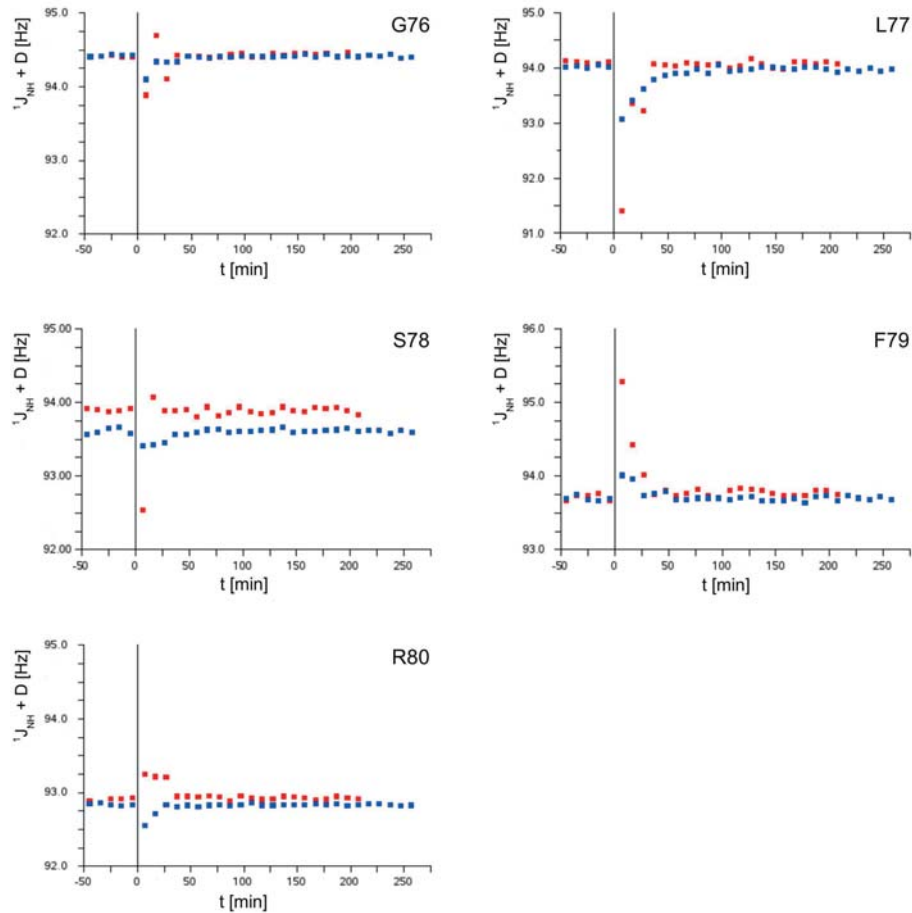


Abbildung 4.15: Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1J^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen des Arr(66-80)-Peptids in Abhängigkeit der Zeit nach der Photoaktivierung - Teil 2. ^{15}N - ^1H - $^1J^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen der Aminosäuren G⁶⁸, Q⁶⁹, E⁷⁰, D⁷¹, I⁷², D⁷³, V⁷⁴ und M⁷⁵ (siehe Abb. 4.14) sowie der Aminosäuren G⁷⁶, L⁷⁷, S⁷⁸, F⁷⁹ und R⁸⁰ wurden durch ^1H -gekoppelte ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren bei 20 °C und einer Magnetfeldstärke von 14,1 T gemessen. Die Probe enthielt 2 mM [U - ^{15}N]-Arr(66-80), 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaPi , 20 mM KCl , 10 % D_2O , pH 6,6. Die Punkte auf der Zeitskala < 0 entsprechen den gemessenen $^1J^{\text{dark}}$ -Aufspaltungen der Experimente mit dunkeladaptiertem Rhodopsin, die Punkte auf der Zeitskala > 0 den gemessenen $^1J^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen der Experimente nach 30 s Belichtung der Probe. Die Zeitpunkte entsprechen dem zeitlichen Mittelpunkt eines HSQC-Experimentes. Es sind in blau und rot zwei unabhängige Messreihen abgebildet, die Messpunkte einer Farbe entsprechen einer Messreihe.

4.5.4 ^{15}N - ^1H -HSQC-Experimente am $[U\text{-}^{15}\text{N}]$ -Arr(67-77)-Peptid

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren zur Messung der TrRDC der Amidbindung des Arr(67-77)-Peptides durchgeführt. Es wurden ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren mit den gleichen Parameter-Sätzen wie unter Kap. 4.5.1 aufgezeichnet. Die Messungen wurden sowohl bei 20 °C als auch bei 10 °C durchgeführt. Die NMR-Proben zur Bestimmung der TrRDC enthielten 2 mM $[U\text{-}^{15}\text{N}]$ -isotopenangereicherten Arr(67-77), 60 μM dunkeladaptiertes Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, pH 6,6 und 10 % D_2O .

Bei einer Messtemperatur von 10 °C konnten neun der elf Kopplungssignale detektiert werden. Die Amidprotonen-Signale des Y⁶⁷ konnte erwartungsgemäß nicht detektiert werden, während die Signale der G⁶⁸ bei tiefen Schnittebenen schwach erkennbar waren. Sie wurden jedoch für die Auswertung nicht in Betracht gezogen.

Bei einer Temperatur von 20 °C konnten die Signale der ersten beiden Aminosäuren nicht gemessen werden. Hinzu kam, dass die Dublett Komponenten der dritten Aminosäure Q⁶⁹ bereits im dunkeladaptierten Zustand deutlich schwächer als die restlichen Signale waren. Es wurden Linienbreiten in der direkten Dimension von 12 -16 Hz gemessen, das Verhältnis der Signalintensitäten der Dublett Komponenten lag zwischen 1,02 -1,10.

Die Spektren nach der Lichtaktivierung zeigten bei beiden Temperaturen die gleichen Effekte wie die des Arr(66-80)-Peptides. Die Signalintensitäten nahmen ab, gleichzeitig nahmen die Linienbreiten zu und lagen im ersten Spektrum nach der Belichtung zwischen 16 und 20 Hz. Die Dublett-Asymmetrie vergrößerte sich auf Werte von 1,2 bis 1,4 während das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ebenfalls schlechter wurde. Vergleichbar mit den Messreihen des Arr(66-80) glichen sich die Spektren nach Zerfall des peptidbindenden Zustands wieder den Spektren des dunkeladaptierten Zustands an.

4.5.5 Bestimmung und Analyse der $^1\text{J}^{exp}$ des Arr(67-77)-Peptides

Die Berechnung der $^1\text{J}^{exp}$ in den ersten Experimenten nach der Photoaktivierung bei einer Temperatur von 10 °C ergaben für alle detektierten Aminosäuren minimale Abweichungen von maximal 0,4 Hz vom $^1\text{J}^{dunkel}$ -Wert. Die Komplexdissoziation war bei dieser Temperatur offenbar zu langsam, d. h. während einer einzelnen Komplexbildung geht die ^{15}N -transversale Magnetisierung verloren, bevor das Peptid Arr(67-77) wieder zurück in die Lösung dissoziiert. Dies wurde bereits für das S2-Peptid bei einer Temperatur von 3 °C von Koenig et al. (2000) beobachtet. Im Gegensatz dazu konnten bei 20 °C für das Peptid Arr(67-77) Änderun-

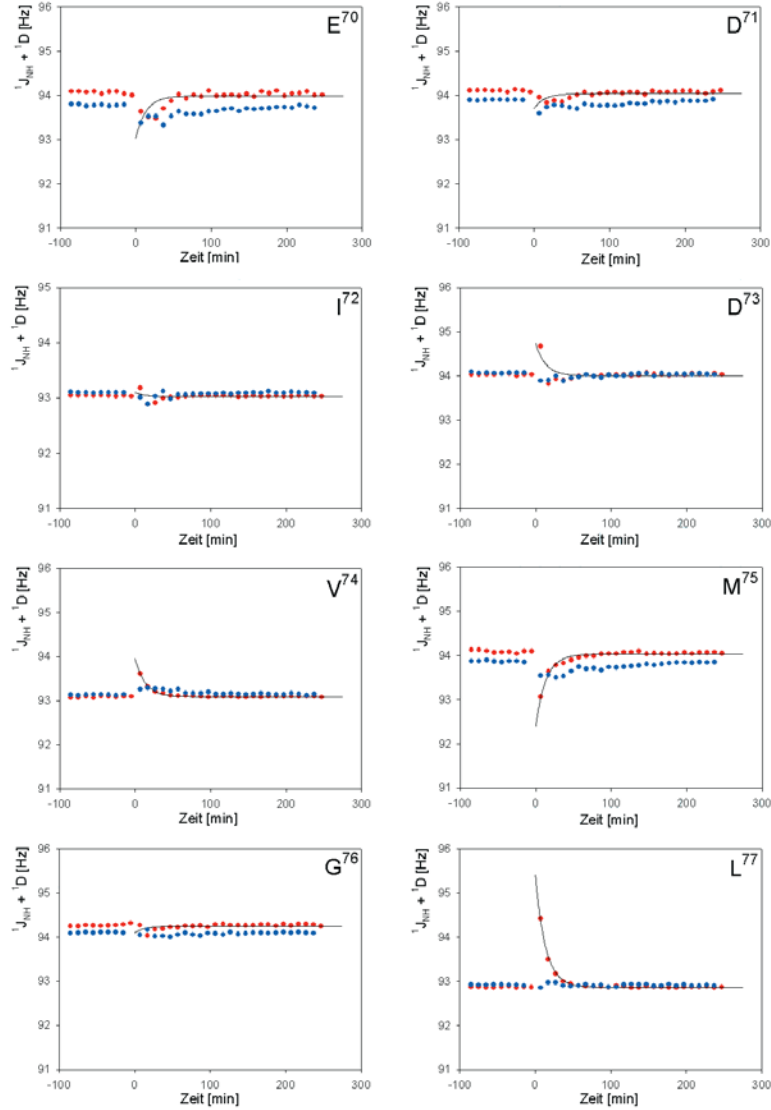


Abbildung 4.16: Gemessene ^{15}N - ^1H - $^1\text{J}^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen des Arr(67-77)-Peptids in Abhängigkeit der Zeit nach der Photoaktivierung. ^{15}N - ^1H - $^1\text{J}^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen der Aminosäuren E⁷⁰, D⁷¹, D⁷³, I⁷², V⁷⁴, M⁷⁵, G⁷⁶ und L⁷⁷ wurden durch ^1H -gekoppelte ^{15}N - ^1H -HSQC-Spektren bei 20 °C (rot) bzw. 10 °C (blau) und einer Magnetfeldstärke von 14,1 T gemessen. Die Probe enthielt 2 mM [U - ^{15}N]-Arr(67-77), 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, 10 % D_2O , pH 6,6. Die Punkte auf der Zeitskala < 0 entsprechen den gemessenen $^1\text{J}^{\text{dark}}$ -Aufspaltungen der Experimente mit dunkeladaptiertem Rhodopsin, die Punkte auf der Zeitskala > 0 den gemessenen $^1\text{J}^{\text{exp}}$ -Aufspaltungen der Experimente nach 30 s Belichtung der Probe. Die Messpunkte einer Farbe entsprechen einer Messreihe. Die Regressionskurve für die Datenpunkte bei 20 °C wurde, wie unter Kap. 3.11.3 beschrieben, berechnet.

gen der $^1J^{exp}$ in Abhängigkeit der Zeit nach Belichtung des Rhodopsins beobachtet werden. Über Regressionskurven wurden die Messreihen so angepaßt, dass $^1J^{exp}(0)$ über Extrapolation bestimmt werden konnte (s. Kap. 3.11.3). Bei der Berechnung der Regressionskurven konnten die ersten Datenpunkte nach der Belichtung der Aminosäuren D⁷³, M⁷⁵ und G⁷⁶ aufgrund von Signalüberlappungen nicht berücksichtigt werden. Die Datenreihe der Aminosäure Q⁶⁹ wurde wegen zu starker Streuung nicht in die Berechnung einbezogen. Die Signale weisen bereits im dunkeladaptierten Zustand im Vergleich zu den anderen eine sehr geringe Intensität auf. Es wurde eine MetaII-Zerfallskonstante $\tau = 17,1$ min berechnet.

Die Restdipolkopplung $^1D_{NH}$ entspricht der Differenz $^1J^{exp}(0) - ^1J^{dunkel}$. In Abb 4.16 sind die experimentell bestimmten Beträge der beobachteten Kopplung $^1J^{exp}$ in Abhängigkeit der Zeit abgebildet sowie die jeweilige Regressionskurve für die Messwerte bei einer Temperatur von 20 °C. Die blauen Datenpunkte entsprechen den Messwerten bei einer Temperatur von 10 °C, die roten Datenpunkte den Messwerten bei einer Temperatur von 20 °C. Die ermittelten Restdipolkopplungen ^1D für den Zeitpunkt $t = 0$ für die Amidbindungen der einzelnen Aminosäuren sind in Tab. 4.5.5 aufgelistet.

Tabelle 4.1: Ermittelte Restdipolkopplung $^1D_{NH}$ der Amidbindungen des Arr(67-77)-Peptides

Aminosäure	E ⁷⁰	D ⁷¹	I ⁷²	D ⁷³	V ⁷⁴	M ⁷⁵	G ⁷⁶	L ⁷⁷
$^1D_{NH}$	-0,96	-0,38	0	0,59	0,74	-1,27	-0,62	2,12

4.6 ^1H - ^1H -NOESY-Experimente am Arr(67-77)-Peptid

4.6.1 Zuordnung der NOE-Korrelationen

In den ^1H - ^1H -NOESY-Spektren, die nach Belichtung des Rhodopsins aufgezeichnet wurden, konnten die Zuordnungen der ^1H -Resonanzen nahezu vervollständigt werden. Da durch die Bindung eine Struktur des Peptides induziert wurde, konnten TrNOEs zwischen den Protonen der räumlich benachbarten Aminosäuren detektiert werden und zur Vervollständigung der Zuordnung beitragen. Im Falle des Arr(67-77) konnten die Protonenresonanzen zu 95,2 % zugeordnet werden. Im ^1H - ^1H -NOESY war es möglich, zusätzlich die Protonenfrequenzen der

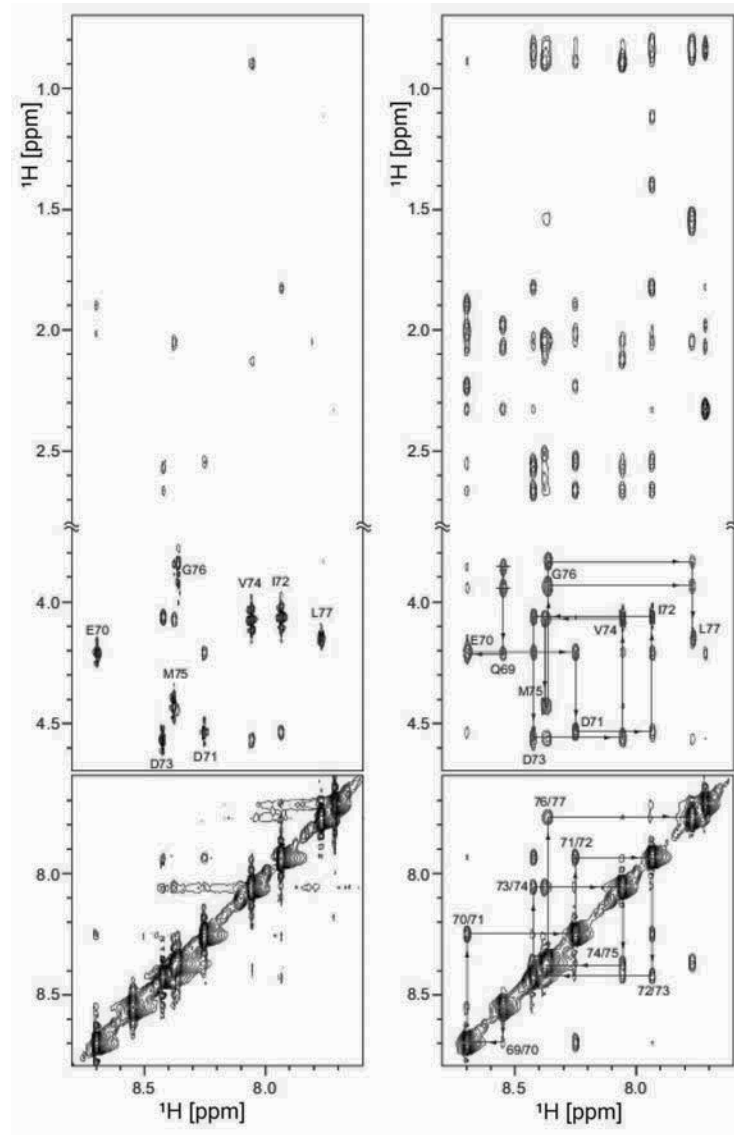


Abbildung 4.17: Ausschnitte aus ^1H - ^1H -NOESY-Spektren des Arr(67-77)-Peptids mit Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen. Ausschnitte aus HN-aliphatischen Bereichen (oben) und HN-HN-Bereichen (unten) zweier ^1H - ^1H -Spektren des Peptids Arr(67-77) mit dunkeladaptierten Diskmembranen (links) und nach 30 s Belichtung (rechts). Die Suspension enthielt 2 mM Arr(67-77), 50 μM Rhodopsin in 10 mM NaP_i , 20 mM KCl, 10 % D_2O , pH 6,6. Die Spektrum wurde bei einer Magnetfeldstärke von 18,8 T bei 10 °C aufgezeichnet.

H^α und H^β -Resonanzen der ersten Aminosäure Y^{67} zu ermitteln. Es kam außerdem zu einer Dispersion der zuvor überlagerten Signale der Methengruppen sowie der H^γ -Methylgruppensignale des I^{72} und V^{74} . Beim Arr(66-80) war es durch die Abspaltung des Diketopiperazins nicht möglich die Protonensignale der ersten beiden Aminosäuren R^{66} und Y^{67} eindeutig zuzuordnen. Deshalb konnte die Resonanzzuordnung nur zu 80 % vervollständigt werden.

4.6.2 NOE-Korrelationsintensitäten zur Distanzeinschränkung

Die Intensitäten der distanzeinschränkenden NOE-Signale wurden ermittelt, in dem wie unter Kap. 3.11.5 beschrieben, ein Differenzspektrum berechnet wurde. Es wurde eine Reihe von dunkeladaptierten Spektren zunächst addiert, anschließend wieder durch die Anzahl der addierten Spektren geteilt und mit einem Faktor 0,7 multipliziert. Dann wurden die Differenz dieser Intensitäten und den Intensitäten im lichtaktivierten Zustand berechnet (s. Kap. 3.11.4). Die Zahl 0,7 war ein empirischer Faktor. Er diente der Skalierung, um eine optimale Unterdrückung der NOE der freien Form zu gewährleisten. Dieser Faktor war kleiner als eins, da die Signale des gebundenen Peptids breiter und deshalb schwächer waren. Ebenfalls war die Diagonalmagnetisierung im Spektrum nach der Belichtung um ca. 30 % im Vergleich zu einem Spektrum vor Belichtung reduziert.

In Abb. 4.17 sind Ausschnitte der HN-HN-Bereiche (unten) und der HN-alphatischen Bereiche (oben) eines ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins (links) und eines ^1H - ^1H -NOESY-Spektrum direkt nach Belichtung des Rhodopsins (rechts) abgebildet.

Die Zuordnung der Resonanzen ergab, dass im Spektrum vor der Lichtaktivierung lediglich 12 sequentielle Kreuzsignale auftraten. Es konnten keine NOE-Signale zwischen Protonen von Aminosäuren, die mehr als eine Position in der Sequenz voneinander entfernt waren, detektiert werden. Im dunkeladaptierten Zustand der Diskmembranen bindet das Peptid Arr(67-77) nicht an Rhodopsin. Das Peptid war trotz Anwesenheit der Diskmembranen frei in Lösung und deshalb unstrukturiert. Zur Überprüfung der These, dass das Peptid in freier Lösung unstrukturiert vorliegt, wurden als Kontrolle ebenfalls NOESY- und ROESY-Experimente mit unterschiedlichen Mischzeiten zwischen 30 ms und 300 ms ohne Diskmembranen aufgezeichnet. Es konnten keine struktureinschränkende Signale detektiert werden. Ein CD-Spektrum des freien Peptids unter gleichen Lösungsbedingungen ergab ebenfalls ein typisches Spektrum einer *random coil*-Sekundärstruktur. Erst nach 30 s Belichtung der Probe konnte im direkt im Anschluss aufgezeichneten Spektrum eine deutlich erhöhte Anzahl an NOE-Signalen detek-

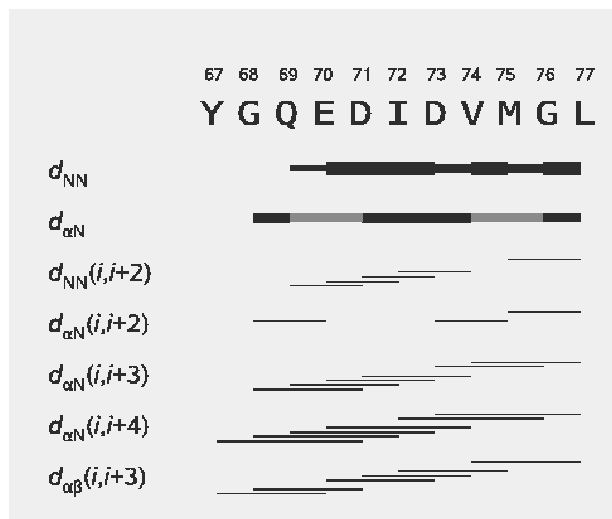


Abbildung 4.18: Sequenz des Arr(67-77)-Peptids mit sekundärstrukturtypischen Kreuzkorrelationen.

α -helikal typische Korrelationen (z. B. $d_{NN}(i, i+1)$, $d_{\alpha N}(i, i+3)$, $d_{\alpha B}(i, i+3)$) sind für den Bereich E⁷⁰ und M⁷⁵ der α -Helix der mit Xplor-NIH berechneten Struktur des Arr(67-77) zu finden. Die Linienbreite ist proportional zu den beobachteten Intensitäten, graue Balken entsprechen überlagerten Signalen, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

tiert werden. Im Falle des Arr(67-77) konnten 61 sequentielle, 33 ($i, i+2$), 38 ($i, i+3$) und 19 ($i, i+4$) NOE identifiziert werden. NOE, die darauf schließen ließen, dass Aminosäuren, die mindestens fünf Reste voneinander entfernt sind, sich in räumlicher Nähe befanden, traten nicht auf.

Bei genauerer Betrachtung des Signal-Musters, konnten sekundärstrukturtypische Signale festgestellt werden, die auf einen α -helikalen Bereich hinwiesen. Es konnten sechs $d_{\alpha N}(i, i+3)$, sechs $d_{\alpha B}(i, i+3)$ und fünf $d_{NN}(i, i+2)$ detektiert werden. Diese Kreuzsignale sind typische NOE-Signale, die auf eine α -helikale Struktur hindeuten.

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Intensitäten der d_{NN} Kreuzsignale im Vergleich zu den $d_{\alpha N}$ -Kreuzsignalen höher waren. Das Fehlen der Kreuzsignale $d_{\alpha N}(i, i+2)$ neben dem Vorhandensein der Kreuzsignale $d_{\alpha N}(i, i+4)$ gab den Hinweis, dass es sich um eine α -Helix und nicht um eine 3_{10} -Helix handelt. In Abb. 4.18 sind in einem Diagramm die beobachteten NOE-Kreuzsignale schematisch dargestellt.

Die Intensitäten der distanzeinschränkenden NOE-Signale wurden ebenfalls für das Arr(66-80)-Peptid ermittelt und ausgewertet. Auch bei diesem Peptid gab es eindeutige Hinweise einer Helixbildung, die durch die Photoaktivierung des Rhodopsins und der damit verbundenen Bindung des Peptids an den MetaII-Zustand induziert wurde. Aufgrund der Instabilität des Arr(66-80) und der damit verbundenen Verkürzung des Peptids wurde auf eine Strukturrechnung verzichtet. Die Abspaltung der ersten beiden Aminosäuren ließ keine eindeutige Auswertung der NOE-Intensitäten zu.

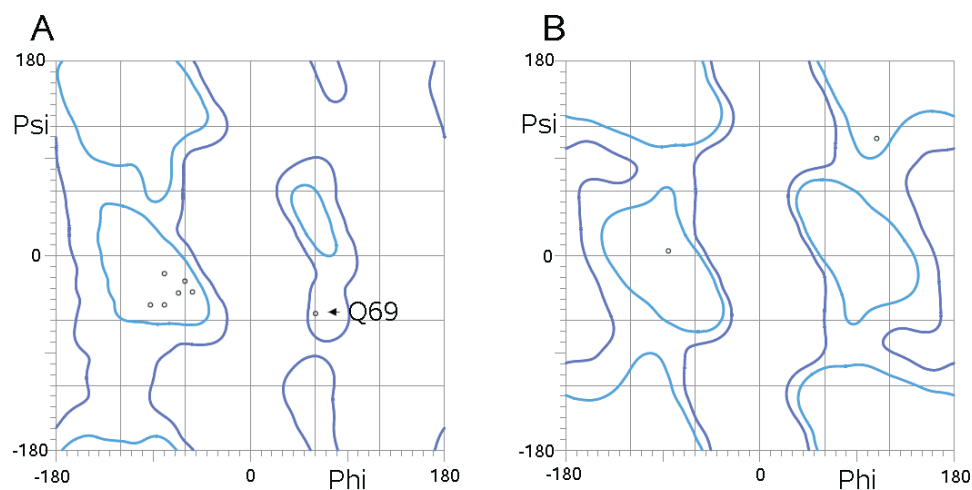


Abbildung 4.19: Ramachandran-Plot der Struktur des Arr(67-77)-Peptids mit geringster Energie. Dargestellt sind die Φ - und Ψ -Torsionswinkel des energieärmsten Konformers der berechneten Strukturschar in Grad. Dunkelblau umkreiste Bereiche sind erlaubte Regionen, hellblau umkreiste Bereiche sind bevorzugte Regionen. **A** Torsionswinkelkorrelation der Aminosäuren außer Glyzine **B** Torsionswinkelkorrelationen der Glyzine. Der Ramachandran-Plot wurde mit der Software Molprobit erstellt (Lovell et al. 2003).

4.7 Strukturberechnung und -analyse des Arr(67-77)-Peptids im Rhodopsin gebundenen Zustand

Die dreidimensionale Struktur des Arr(67-77)-Peptids wurde über ein in das Programm Xplor-NIH implementiertes *simulated annealing*-Protokoll berechnet. Als struktureinschränkende Parameter wurde eine Liste der oben beschriebenen detektierten NOEs verwendet. Jeder Signalintensität wurde darin eine wie unter Kap. 3.11.5 beschriebene Distanz mit entsprechenden Fehlergrenzen zugeordnet. Sieben NOE-Kreuzsignale wurden als zweideutig klassifiziert. Aufgrund von Signalüberlappungen konnte diesen Signalen kein eindeutiges Protonenpaar zugeordnet werden. Das Programmpaket machte es über die Wahl geeigneter Parameter möglich, beide in Frage kommenden Protonenpaare anzugeben (Nilges 1995). Über verschiedene Stufen einer Moleküldynamik (s. Kap. 3.11.6) wurden 100 Strukturen berechnet, welche sämtliche Distanzeinschränkungen erfüllten. Die 20 Strukturen, die die geringsten totalen Energien aufwiesen, wurden für die Analyse ausgewählt.

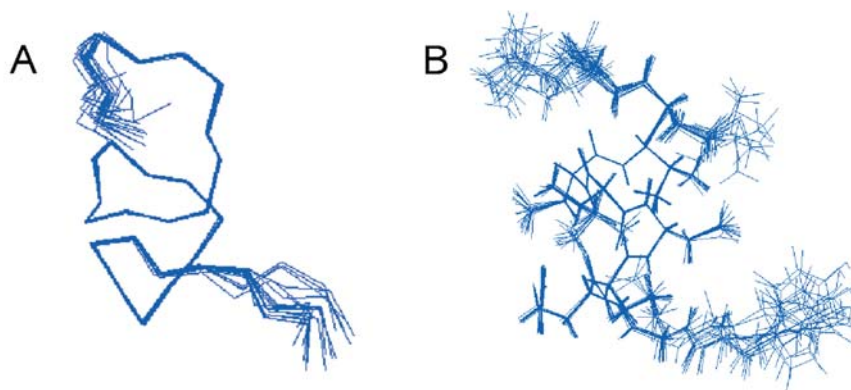


Abbildung 4.20: Liniendarstellung der 20 energieärmsten Konformationen der berechneten Strukturschar des Arr(67-77)-Peptids im Rhodopsin gebundenen Zustand. **A** Darstellung des Peptidrückgrates der 20 Strukturen. Die hohe Übereinstimmung der Koordinaten ist deutlich zu erkennen (rmsd für gesamtes Rückgrat: 0,28 Å; rmsd für gesamtes Rückgrat ohne erste und letzte Aminosäure: 0,11 Å). **B** Darstellung des Peptidrückgrates und der Seitenkettenatome (außer ^1H). rmsd für gesamtes Peptid: 0,77 Å; rmsd für gesamtes Peptid ohne erste und letzte Aminosäure: 0,46 Å).

Die Geometrie der berechneten Strukturen wurden mit der Software Molprobität überprüft (Lovell et al. 2003). Ein Ramachandran-Plot aller 20 Strukturen ergab, dass sich die Winkel ϕ und ψ des Peptidrückgrates zu 100 % in erlaubten und zu 88,9 % in favorisierten Regionen befanden. In Abb. 4.19 ist exemplarisch der Ramachandranplot der energieärmsten Struktur des Ensembles abgebildet. Nur die Korrelation der Torsionswinkel der Aminosäure Q⁶⁹ lag außerhalb der favorisierten Region. Die Sekundärstruktur einer α -Helix ist für die Reste E⁷⁰ bis M⁷⁵ erfüllt und wurde mit der Software DSSP (Kabsch & Sander 1983) verifiziert.

Zur Berechnung der Standardabweichungen (*rmsd* engl. *root mean square deviation*) wurde aus den 20 ausgewählten Strukturen eine sogenannte mittlere Struktur, d. h. eine über die 20 Konformationen gemittelte Struktur berechnet. Sie diente als Referenz bei der Bestimmung der *rmsd*-Werte des Strukturenensembles. Der *rmsd* der 20 Strukturen bezogen auf das gesamte Peptidrückgrat lag bei 0,28 Å, der für die schweren Atome (alle außer ¹H) inklusive der Seitenketten bei 0,77 Å. Wurde die erste und letzte Aminosäure nicht berücksichtigt lag der *rmsd* bei 0,11 Å bzw. 0,46 Å. In Abb. 4.20 ist die Überlagerung des Ensembles aus 20 Strukturen in Liniendarstellung dargestellt, Abb. 4.21 zeigt ein Bändermodell der berechneten Struktur des Arr(67-77)-Peptids mit der geringsten Energie.

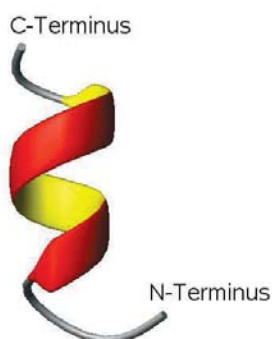


Abbildung 4.21: Bändermodell der energieärmsten Konformation des Arr(67-77) aus der Structureschar. Zwischen den Aminosäuren E⁷⁰ und M⁷⁵ bildet sich durch die Bindung an photoaktiviertes Rhodospin eine α -Helix. Das Peptid ist in Anwesenheit dunkeladaptierten Rhodopsins unstrukturiert.

4.8 Nanodisks: künstliche Modellmembranen zur Untersuchung von Membranproteinen

Nanodisks sind scheibchenförmige Modellmembranen, die aus einer Phospholipiddoppelschicht bestehen, die wiederum von zwei MSP1-Molekülen zusammengehalten wird (s. Kap. 1.6). Dieses Modellmembransystem eröffnet zahlreiche Möglichkeiten, Membranproteine in ihrer natürlichen Lipidumgebung mit biophysikalischen Methoden zu untersuchen.

Das Protokoll zur Herstellung der Nanodisks nach Bayburt et al. (2002) sollte im Labor etabliert werden. Sie sollten als künstliche Modellmembranen dienen, um bereits im Labor vorhandene isopenangereicherte Membranproteine auf deren Wechselwirkungsverhalten mit potentiellen Liganden mit biophysikalischen Methoden zu untersuchen sowie mittels NMR Informationen über deren Struktur in ihrer natürlichen Lipidumgebung zu erhalten.

4.8.1 Herstellung und Reinigung des *Membrane Scaffold Proteins* (MSP1)

MSP1 besteht aus einem N-terminalen 6-fachen Histidin-Überhang MGSSHHHHHH, gefolgt von einer TEV-Protease-Schnittstelle ENLYFQG und der N-terminal verkürzten Aminosäuresequenz des humanen Apolipoproteins A1 (Aminosäuresequenz s. 6.2).

Das für MSP1 kodierende Insert wurde, wie unter Kap. 3.9.1 beschrieben, in den Expressionsvektor pET28a ligiert und dadurch das für MSP1 kodierende Plasmid pET28a_MSP1 erzeugt. Die Expression erfolgte, wie unter Kap. 3.9.2 beschrieben, für 4 h bei einer Temperatur von 37 °C in *E. coli* BL21DE3-Zellen. Die erfolgreiche Überexpression wurde anschließend über SDS-PAGE (Kap. 3.2.1) kontrolliert.

In Abb. 4.22A wird ein Gel gezeigt, bei welchem in der Spur Ex1 eine Probe vor Induktion mit IPTG analysiert wurde. In den Spuren Ex2, Ex3 und Ex4 wurden Proben nach 1, 3 bzw. 4 h Überexpression analysiert. Die stärkere Anfärbung der Banden entsprechend einem Molekulargewicht von 25 kDa nach Induktion im Vergleich zu der Bande vor Induktion, belegt die erfolgreiche Überexpression des MSP1. Aufgrund des His₆-Überhangs konnte dieses Protein einfach über Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulenmaterial gereinigt werden. Dabei wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll nach Bayburt et al. (2002) verwendet (s. Kap. 3.9.4). Nach dem publizierten Protokoll erfolgt die Elution des MSP1 mit einem ansteigenden Imidazolgradienten in 40 mM TrisHCl, 300 mM NaCl bei pH 8 ohne Natriumcholat. Da bei einer Vorgehens-

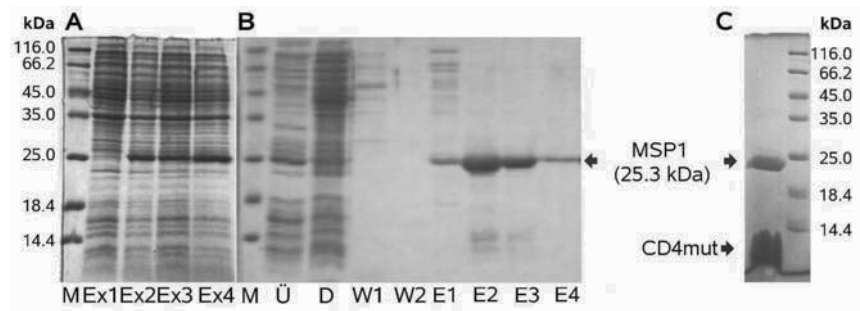


Abbildung 4.22: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression und der Reinigung des MSP1. 15 %ige SDS-Glycin-Gele von Proben der Expression (A) und Reinigung (B) des MSP1. **A** Spur M: 5 μ l *Protein Molecular Weight* Marker (Fermentas), Spur Ex1: Zellsuspension vor Induktion, Spur Ex2: Zellsuspension nach 1 h Überexpression, Spur Ex3: Zellsuspension nach 3 h Überexpression, Spur Ex4: Zellsuspension nach 4 h Überexpression. **B** Spur M: 5 μ l *Protein Molecular Weight* Marker (Fermentas), Spur Ü: Überstand des Rohextrakts nach Zellaufschluss und Zentrifugation, Spur D: Durchfluss des Säulenauftrages, Spuren W1 und 2: Waschschrte, Spur E1: Elutionsfraktion mit 50 mM Imidazol, Spuren E2 und 3 Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, Spur E4: Elutionsfraktion mit 750 mM Imidazol. MSP1 wurde bei einer Konzentration von 100 mM Imidazol eluiert. Pro Spur sind jeweils 10 μ l der mit 4xProbenpuffer behandelten und anschließend bei 95 °C erhitzten Lösungen auf das Gel aufgetragen. **C** 20 μ l einer Größenausschluss-Elutionsfraktion eines Nanodisk-CD4mut-Ansatzes.

weise nach diesem Protokoll eine Präzipitation des MSP1 beobachtet werden konnte, wurde das MSP1 mit einem ansteigenden Imidazolgradienten im gleichen Puffer mit zusätzlich 50 mM Natriumcholat eluiert. Die erfolgreiche Reinigung wurde über SDS-PAGE dokumentiert. In Abb. 4.22B wird ein Gel gezeigt bei welchem jeweils 15 μ l der verschiedenen Reinigungsschritte analysiert wurden. In den Spuren E2 bis E4 ist zu erkennen, dass das Protein MSP1 mit einer Reinheit von mindestens 95 % bei einer Konzentration von 100 mM Imidazol eluiert werden konnte. Pro Liter Expressionskultur erhielt man eine Ausbeute von mind. 20 mg MSP1 pro Liter Expressionsmedium.

Das wildtypische humane Apolipoprotein A1 besteht zu 55 % aus einer α -helikalen Sekundärstruktur (Fang et al. 2003). Um die Integrität des hergestellten MSP1 zu bestätigen, wurde mittels CD-Spektroskopie die Sekundärstrukturverteilung des MSP1 in NaP_i -Puffer, pH 7,4 bestimmt. Das CD-Spektrum des freien MSP in Lösung zeigte die typischen Minima bei 208 nm und 222 nm, die bei einer α -helikalen Sekundärstruktur auftreten. Mit dem Software-Paket CDPro (Sreerama & Woody 2000) wurde berechnet, dass MSP1 einen 50 %igen α -helikalen Anteil aufweist, was darauf hinwies, dass das Protein in einer nativ gefalteten Form vorlag.

4.8.2 Herstellung leerer und mit CD4mut-inkorporierter Nanodisks

Die Herstellung leerer Nanodisks, d. h. ohne ein inkorporiertes Membranprotein, konnten erfolgreich nach dem Protokoll von Bayburt et al. (2002) etabliert werden. In einem Versuchsansatz wurden die Komponenten POPC, Natrium-Cholat und MSP1 in einem molaren Verhältnis von 75 : 150 : 1 inkubiert (s. Kap. 3.10.2). Durch die Eliminierung der Detergenzmoleküle über adsorbierende sogenannte *Biobeads* wurde eine spontane Bildung der Nanodisks induziert. Anschließend wurden über eine Größenausschlusschromatographie (s. Kap. 3.10.4) die gebildeten Nanodisks von den restlichen Komponenten im Ansatz wie freies MSP1, Lipidvesikel, Detergenzmoleküle und restlichen Verunreinigungen der MSP-Reinigung isoliert. Mit der Größenausschlusschromatographie konnte zusätzlich eine Abschätzung des Molekulargewichts der gebildeten Modellmembranen erfolgen. Nach Bayburt et al. (2002) wird eine Nanodisk aus ca. 150 Lipidmolekülen und 2 MSP1-Molekülen gebildet. Mit 760 Da pro POPC-Molekül und 25,5 kDa pro MSP1-Molekül ergibt sich für eine Nanodisk ein theoretisches Molekulargewicht von 165 kDa. Wie in Abb. 4.22 zu sehen, wurden die gebildeten Nanodisks bei einem Retentionsvolumen zwischen 12,8 und 13,1 ml eluiert. Die Gelfiltrationssäule wurde über ein Standardverfahren des Herstellers kalibriert (s. Kap. 3.10.4). Demnach eluieren bei einem Retentionsvolumen zwischen 12,8 und 13,1 ml Moleküle in einer Größenordnung von 160 bis 180 kDa. Darüber konnte die erfolgreiche Herstellung leerer Nanodisks bestätigt werden. Zusätzlich wurden sämtliche Elutionsfraktionen, die einem UV-Signal bei $\lambda = 280$ nm zuzuordnen waren, über SDS-PAGE auf deren Proteingehalt überprüft. Bei den Elutionsfraktionen des potentiellen Nanodisk-Signals konnte im Gel nach der Silberfärbung (s. Kap. 3.2.3) signifikant MSP1 detektiert werden. Zusätzlich wurden von den Fraktionen, die die Nanodisks enthielten, CD-Spektren aufgezeichnet und der Sekundärstrukturanteil des Proteins bestimmt. Über die Messungen wurde ein α -helikaler Sekundärstrukturanteil von 53 % ermittelt. Dies kann als Hinweis interpretiert werden, dass sich amphipatische Helices ausbilden, die sich wie ein Gürtel um die Lipidfragmente legen. Ebenfalls konnte die erfolgreiche Inkorporation von [U - ^{15} N]-angereichertem CD4mut in Nanodisks mittels Größenausschlusschromatographie und SDS-PAGE gezeigt werden. Dabei wurde wie unter Kap. 3.10.3 beschrieben, vorgegangen. Die Elution der Nanodisks mit inkorporiertem [U - ^{15} N]-CD4mut erfolgte bei einem Retentionsvolumen von 12,6 ml. Dies entspricht einem Molekulargewicht von ungefähr 200 kDa. Eine Probe dieser Elutionsfraktion wurde mit SDS-PAGE überprüft. In Abb. 4.22C ist ein 15 %iges SDS-Glycin-Gel abgebildet, auf welches 20 μ l einer potentiellen CD4mut-

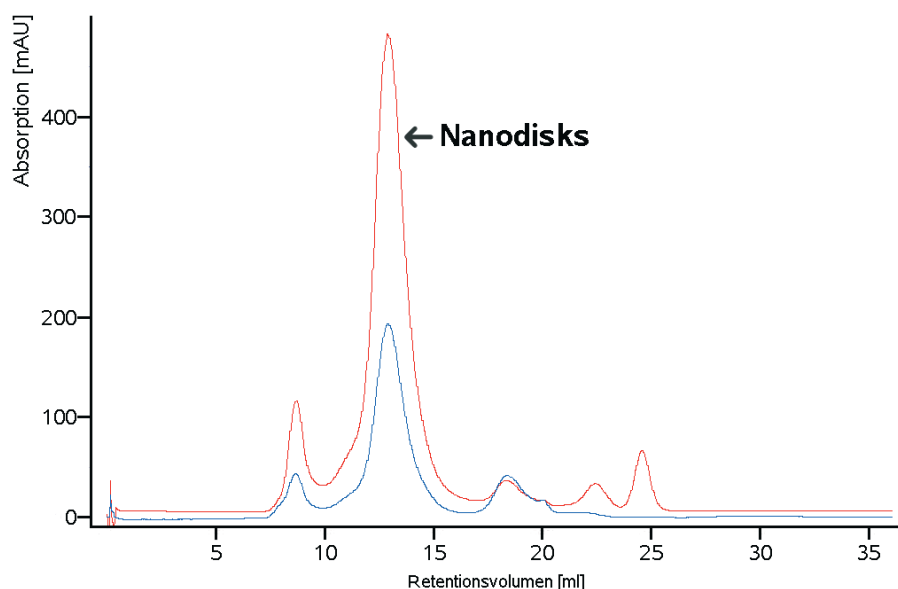


Abbildung 4.23: Größenausschluss-Chromatogramm der Nanodisk-Isolierung Zur Trennung der gebildeten Nanodisks von anderen Komponenten des Versuchsansatzes wurde eine Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule (Amersham, Freiburg) verwendet. Aufgetragen wurden 250 μ l der zu analysierenden Lösung (s. Kap. 3.10.3 und 3.10.4). Die Elution der Komponenten wurde bei 280 nm (blau) und 214 nm (rot) detektiert. Die Nanodisks wurden bei einem Retentionsvolumen zwischen 12,8 und 13,1 ml eluiert.

Nanodisk-Elutionsfraktion aufgetragen wurden. Es ist zu erkennen, dass MSP1 zusammen mit CD4mut eluiert wird. Aufgrund des entsprechenden Molekulargewichts von 200 kDa konnte davon ausgegangen werden, dass die Inkorporation von [U - ^{15}N]-CD4mut in Nanodisks erfolgreich war. Die [U - ^{15}N]-CD4mut-Nanodisk-Fraktion wurde konzentriert und für ^{15}N - ^1H -HSQC-Experimente weiterverwendet.

4.8.3 Stabilität der Nanodisks

Anhand einer Zeitreihe wurde die Stabilität leerer Nanodisks über einen längeren Zeitraum überprüft. Die Nanodisks wurden nach der erfolgreichen Herstellung bei 12 °C gelagert und nach 3 d, 6 d, 11 d, 15 d und 34 d erneut über Größenausschluss-Chromatographie analysiert. Mit dieser Zeitreihe (s. Kap 3.10.5) konnte gezeigt werden, dass die bei 12 °C gelagerten Nan-

odisks zu den Zeitpunkten zwischen 3 und 15 d bei dem gleichen Retentionsvolumen eluiert wurden und keine weiteren Absorptionssignale, die auf Abbauprodukte hinweisen könnten, zu beobachten waren. Nach 3, 6, 11 und 15 d konnte stets ein UV-Signal bei einem Retentionsvolumen von 12,8 ml detektiert werden. Dies ließ darauf schließen, dass die Nanodisk nach diesen Zeitpunkten intakt in Lösung vorlagen, d. h. weder aggregiert noch zersetzt waren. Nach 34 d jedoch konnten neu entstandene Komponenten in Form zusätzlicher Signale beobachtet werden. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass der Zerfallsprozess der Modellmembranen bereits stattgefunden hat.

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollte die dreidimensionale Struktur eines Peptidanalogs einer Arrestin- oder Transduzin-Bindestelle im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin bestimmt werden. Dies sollte anhand der NMR-Methoden zur Messung transferierter NOE durchgeführt werden. Dazu mußten zunächst Peptidliganden identifiziert werden, die an photoaktiviertes Rhodopsin binden und sich gleichzeitig im schnellen Austausch zwischen gebundener und freier Form befinden.

5.1 Erfolgreiche Etablierung der Diskmembranpräparation

Die Präparation abgeflachter Diskmembranen aus der Retina von Rinderaugen war notwendig, um Peptidliganden zu finden, die an photoaktiviertes Rhodopsin binden. Sie erfolgte nach einem Protokoll, das teilweise von der von Koenig et al. (2002) verwendeten Methode abwich. Ein Unterschied zur Methode von Koenig et al. (2002) war, neben der geringfügig verringerten Ficoll-Konzentration von 3,5 % statt 5 %, eine reduzierte Anzahl an Waschschritten nach der Isolierung der intakten Diskmembranen. Dies verhinderte einen zu hohen Verlust an intakten Diskmembranen durch wiederholtes Zentrifugieren und trug so zu einem spektralen Absorptionsverhältnis < 2 und einer hohen Ausbeute von bis zu 70 % dunkeladaptierten Rhodopsins bei.

Des Weiteren unterschied sich die Vorgehensweise in einer anderen Pufferwahl. Anstelle des von Koenig et al. (2002) verwendeten 10 mM HEPES-Puffers wurde in dieser Arbeit ein 10 mM NaP_i-Puffer verwendet. Auf die Zugabe von DTPA als chelatisierender Komplexbildner wurde verzichtet. Die Salzkonzentration von 20 mM KCl und der pH-Wert 6,6 wurden beibehalten. HEPES ist ein zwitterionisches Pufferagens mit der Summenformel C₈H₁₈N₂O₄S. Bei den NMR-Experimenten hätte sowohl deuteriertes DTPA als auch deuteriertes HEPES eingesetzt werden müssen, um die ¹H-Signale dieser Komponenten zu unterdrücken. Da sich

der NaP_i-Puffer als genauso geeignet erwies, konnte auf deuterierte Chemikalien, die sehr teuer sind, verzichtet werden.

5.2 TrRDC des S2-Peptids konnten qualitativ reproduziert werden

Die Messung der TrRDC eines an Rhodopsin bindenden Peptidliganden erfordert, dass sich die präparierten Diskmembranen im Magnetfeld ausrichten. Um zu überprüfen, ob die nach dem modifizierten Protokoll hergestellten Diskmembranen die erwünschte spontane Orientierung im Magnetfeld aufwiesen, wurden die TrRDC-Messungen am S2-Peptid von Koenig et al. (2000, 2002) wiederholt.

Die ^{15}N - ^1H -HSQC-Experimente zeigten, dass das S2-Peptid an photoaktiviertes Rhodopsin bindet. Die $^1\text{J}^{\text{exp}}$ -Kopplungen gingen in Abhängigkeit der Zeit bezogen auf den Zeitpunkt der Photoaktivierung in einem exponentiellen Verlauf wieder auf den Wert der $^1\text{J}^{\text{dunkel}}$ -Kopplung zurück. Die exponentiellen Zerfallsdatenpunkte aller einbezogenen Kopplungen wurden simultan so angepasst, dass die Regressionskurven der jeweiligen Datenpunkte mit einem gemeinsamen Wert τ für die Halbwertszeit des bindenden Rhodopsinzustandes berechnet wurden (s. Kap. 3.11.3). Über die Regressionskurve wurde für die jeweiligen Aminosäuren die $^1\text{J}^{\text{exp}}(0)$ für den Zeitpunkt $t = 0$ extrapoliert. Nach Berechnungen der ^1D zum Zeitpunkt $t = 0$ über die Differenz $^1\text{J}^{\text{exp}}(0) - ^1\text{J}^{\text{dunkel}}$ konnte festgestellt werden, dass die entsprechenden TrRDC-Werte zwar kleinere Beträge annahmen, jedoch qualitativ reproduziert werden konnten (s. Abb. 4.2). Damit wurde gezeigt, dass die Diskmembranen sich im Magnetfeld ausrichteten und zur Messung der TrRDC geeignet waren.

Die quantitative Abweichung der Messwerte kann viele Ursachen haben. Die gemessene Größe einer TrRDC hängt von vielen Faktoren wie z. B. Temperatur, Konzentration des Liganden im Verhältnis zum Protein oder der Effizienz der Ausrichtung des Proteins ab. Bei den Experimenten zur Reproduktion der TrRDC des S2-Peptids wurden die Messungen bei gleicher Temperatur und dem gleichen molaren Ligand-Protein-Verhältnis (40-facher Überschuss des Liganden) durchgeführt. Des Weiteren wurde bei einem pH-Wert von 6,6 gearbeitet. Dieser pH-Wert verschiebt das Gleichgewicht zwischen MetaI und MetaII auf die Seite des MetaII-Zustands. Minimale pH-Abweichungen können jedoch das Gleichgewicht wieder auf die Seite des MetaI-Zustands verschieben (Parkes & Liebman 1984). Das hätte zur Folge, dass weniger

MetaII, d. h. weniger freie Bindeplätze für das S2-Peptid zur Verfügung stünden. In diesem Fall würden deshalb weniger Peptide im gebundenen Zustand zu der Verstärkung der TrRDC beitragen können. Die TrRDC fiel dann vom Betrag entsprechend kleiner aus.

Andererseits wäre es auch möglich, dass die Effizienz der Belichtung über die Filtereinheit GG495 verringert war. Bei einer Wellenlänge von $\lambda = 500$ nm werden damit nur 62 % der Lichtstrahlen transmittiert. Dadurch könnte während der gleichen Belichtungszeit von 30 s weniger photoaktiviertes Rhodopsin entstanden sein. Das würde bedeuten, dass weniger freie Bindestellen des Rezeptors zur Verfügung stünden und deshalb ebenfalls weniger Peptide im gebundenen Zustand zu der Verstärkung der TrRDC beitragen könnten.

Ein weitere Möglichkeit, für die kleineren gemessenen TrRDC im Vergleich zu Koenig et al. (2002) wäre eine geringere Ausrichtung der Rezeptormoleküle im Magnetfeld. Für den Fall, dass die Diskmembranen weniger abgeflacht sind als bei den Messungen von Koenig et al. (2002), hätte dies zur Folge, dass der Anteil sich isotrop verhaltender Rhodopsin-Moleküle anstiege. Schlussfolgernd würde die Anzahl gleich orientierter Peptidliganden im gebundenen Zustand nicht mehr überwiegen. Dieser Anteil an Peptiden würde aufgrund des isotropen Verhaltens trotz einer Bindung an lichtaktiviertes Rhodopsin nicht zur Signalamplifikation beitragen und demnach zu einer verringerten gemessenen TrRDC führen.

Für die hier beschriebene Einzelmessung wurde eine Halbwertszeit von $\tau = 19$ min bei 20 °C berechnet. Sie ist um ca. 30 % länger als die von Koenig et al. (2002) bei gleicher Temperatur ermittelte Halbwertszeit von $\tau = 15$ min. Dies deutet daraufhin, dass nicht genau die gleichen Messbedingungen in der Probenlösung vorlagen. Dies könnte eine Erklärung für die vom Betrag signifikant kleineren Kopplungen, die für die Aminosäuren E³⁴², K³⁴⁵, G³⁴⁸ und F³⁵⁰ bestimmt wurden, sein.

5.3 Auswahlkriterien der zu untersuchenden Peptide

Ein wichtiges Kriterium bei der Auswahl der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Peptide waren bereits in der Literatur bekannte Bindestellen des Transduzins und Arrestins an lichtaktiviertes Rhodopsin.

Die Auswahl der N-terminalen Transduzin-Peptide T _{α} (2-28) und T _{α} (2-25)*myr* beruhte auf einer Publikation von Hamm et al. (1988). Darin wurde beschrieben, dass ein Peptid des Bereichs T _{α} (8-23) mit Transduzin um die Wechselwirkung mit MetaII konkurriert, jedoch keinen

stabilisierenden Effekt auf MetaII ausübt. Der N-terminale Bereich der T α -Untereinheit bildet in der Kristallstruktur bereits eine α -Helix (Lambright et al. 1996).

Die Motivation, diese Peptide zu untersuchen lag darin, im Rhodopsin gebundenen Zustand TrRDC zu messen. Über die daraus abgeleitete Orientierung des Peptids zur Membrannormalen der Diskmembran zusammen mit den Daten über die Orientierung des C-terminalen T α -Analogons von Koenig et al. (2002) hätte eine mögliche Gesamtorientierung der T α -Untereinheit zum aktivierten Rezeptor abgeleitet und diskutiert werden können.

In der Arbeit von Hamm et al. (1988) wurde ebenfalls erstmals die Aminosäuresequenz T α (311-328) als Binderegion an photoaktiviertes Rhodopsin beschrieben. Ein Peptid, das diesem Sequenzabschnitt entspricht konkurriert ebenfalls mit Transduzin um die Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin. Gleichzeitig zeigte dieses Peptid auch einen stabilisierenden Effekt auf den MetaII-Zustand. In der Kristallstruktur befindet sich in dieser Region neben unstrukturierten Bereichen ein kurzer β -Strang und Teile einer α -Helix. Das in dieser Arbeit untersuchte Peptid T α (311-323) leitet sich von dieser Region ab, ist jedoch um den α -helikalen Bereich verkürzt. Interessant wäre gewesen, ob die unstrukturierten Bereiche des Peptids durch die Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin eine Konformationsänderung erfahren. Auch hier wäre die Bestimmung einer Orientierung des Peptids über TrRDC ein weiterer Schritt zur Auflösung der Komplexstruktur zwischen Transduzin und aktiviertem Rhodopsin gewesen.

Die weiteren aus der Literatur bekannten Transduzin-Bindestellen wurden bereits strukturell an den Peptiden T α (340-350) und T γ (60-71)*farnesyl* auf der Grundlage von TrNOE-Messungen untersucht (Dratz et al. 1993, Kisselev et al. 1998, Koenig et al. 2002, Kisselev & Downs 2003).

Die Auswahl der Arrestin-Peptide basierte größtenteils auf der Arbeit von Pulvermüller et al. (2000). Diese Untersuchung beruht auf einem spektrophotometrischen Kompetitionsassay, bei welchem die Stabilisierung des MetaII durch Transduzin bzw. des phosphorylierten MetaII (P-MetaII) durch Arrestin mittels eines Extra-MetaII-Versuchs nach Hofmann (1985) detektiert werden kann. Als Kompetitoren zu Transduzin und Arrestin wurden drei Sätze an 10 bis 30 Aminosäuren langen Peptiden verwendet. Die Peptide entsprachen überlappenden Bereichen der gesamten Arrestinsequenz. Es konnten dadurch Arrestin-Regionen identifiziert werden, die wahrscheinlich an der Rezeptorbindung beteiligt sind.

Zusätzlich sollten die ausgewählten Peptide möglichst oberflächenexponierten Bereichen innerhalb der Kuppeln des Arrestinmoleküls entsprechen. Es wird diskutiert, dass eine oder vielleicht auch beide Kuppeln an der Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin beteiligt sind.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sequenzabschnitte des Arrestins sind in der Kri-

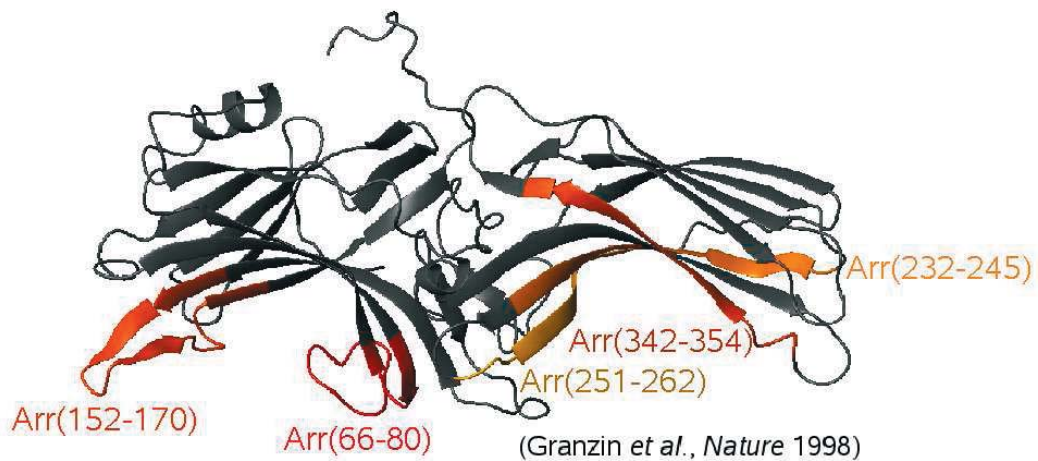


Abbildung 5.1: Arrestin-Kristallstruktur der freien Form. Arrestin-Kristallstruktur (PDB-ID: 1AYR) der freien inaktiven Form. Gekennzeichnet sind die Regionen, von welchen die in dieser Arbeit untersuchten Peptide abgeleitet wurden und zum Teil bereits zuvor als Bindestellen zu photoaktiviertem Rhodopsin identifiziert wurden (Pulvermüller et al. 2000). Die Peptide wurden mittels TrNOE-Experimenten auf deren Wechselwirkungsverhalten mit photoaktiviertem Rhodopsin untersucht.

stallstruktur in Abb. 5.1 farblich gekennzeichnet. Die Peptide Arr(51-70) und Arr(231-250) wurden ausgewählt, da sie nach den Konkurrenzexperimenten als potentielle Bindestelle in Frage kommen (Pulvermüller et al. 2000). Für die Interaktion dieser Peptide mit P-MetaII wurden Dissoziationskonstanten von 10 μM bzw. 54 μM bestimmt (Pulvermüller et al. 2000). Diese Dissoziationskonstanten liegen noch im unteren Grenzbereich, in welchem TrNOE- und TrRDC-Messungen prinzipiell möglich sein sollten.

Leider waren beide Peptide bei den hier verwendeten Pufferbedingungen nicht löslich und wurden deshalb nicht weiter berücksichtigt. Um den Bereich der Binderegion Arr(51-70) trotzdem untersuchen zu können, sollte ein weiteres Arrestin-Peptid hergestellt werden, das um fünf Aminosäuren in C-terminaler Richtung verschoben war. Das Peptid (56-75) konnte jedoch wegen zu hoher Hydrophobizität der Aminosäuresequenz mittels der Fmoc-Strategie nicht hergestellt werden (Dr. P. Henklein, persönliche Mitteilung).

Die Peptide Arr(232-245) und Arr(251-262) sind aus der von Pulvermüller et al. (2000) identifizierten Arrestin-Region 231-260 abgeleitet. Die Peptide Arr(231-250), Arr(231-260) und

Arr(241-260) dieser Region waren ebenfalls fähig, Arrestin zu verdrängen und den durch die Arrestin-Bindung an P-MetaII stabilisierenden Effekt zu vermindern.

Der Sequenzabschnitt des Peptids Arr(152-170) zeigte ebenfalls einen, jedoch geringeren Effekt bei der Konkurrenz mit Arrestin. Er wurde deshalb auch als potentielle Bindestelle zu photoaktiviertem Rhodopsin in Betracht gezogen. Der für diesen Bereich berechnete K_D von 150 μM (Pulvermüller et al. 2000) schien besonders geeignet, um potentielle TrNOE- und TrRDC-Messungen durchführen zu können.

Das Peptid Arr(342-354) entspricht der Aminosäuresequenz des Loops zwischen den β -Strängen XVIII und XIX und Teilen des β -Stranges XIX. Dieses Peptid wurde ausgewählt, da die Region sehr exponiert am äußeren Ende der C-terminalen Kuppel liegt. Sofern die C-terminale Kuppel des Arrestins mit aktiviertem Rhodopsin interagiert, könnte dieser Bereich an der Bindung beteiligt sein.

Besonders interessant erschien jedoch die Loopregion zwischen den β -Strängen V und VI der N-terminalen Kuppel. Die asymmetrische Einheit der in der Literatur beschriebenen Arrestin-Kristalle besteht aus vier Arrestinmolekülen (Granzin et al. 1998; Hirsch et al. 1999). Die Loopregion nimmt in der Kristallstruktur dabei zwei unterschiedliche Konformationen ein. Zwei Moleküle befinden sich in einer sogenannten „geschlossenen“ Konformation. Aufgrund fehlender Elektronendichte konnte dem Loop zwischen G⁶⁸ und S⁷⁸ in dieser Konformation keine definierte Struktur zugeordnet werden. In dieser Konformation ist der Loop wahrscheinlich nach innen in die N-terminale Kuppel geklappt und hindert dadurch den C-terminalen Loop des aktivierten phosphorylierten Rhodopsins, mit der bevorzugten Phosphatbindestelle des Arrestins zu interagieren. Bei den beiden anderen Molekülen der Kristallstruktur befindet sich der Loop in einer sogenannten „offenen“ Konformation. Diese ist durch eine ungestörte Elektronendichte wohl definiert. Der Loop scheint hier kein Hindernis für eine Bindung an phosphoryliertes Rhodopsin darzustellen. Diese Region könnte deshalb die Rolle einer möglichen Schalterfunktion zwischen inaktivem und aktivem Arrestin übernehmen (Granzin et al. 1998). Es konnte bereits über EPR- und Mutationsstudien gezeigt werden, dass dieser Loop eine zentrale Rolle bei der Rezeptorbindung (Sommer et al. 2007) und der spezifischen Rezeptorererkennung (Dinculescu et al. 2002) spielt.

Bis jetzt liegen jedoch keine dreidimensionalen strukturellen Untersuchungen des Loops im aktiven Zustand vor. Diese Region erwies sich deshalb als besonders interessant, im Rhodopsin gebundenen Zustand mittels NMR-Untersuchungen aufgeklärt zu werden.

5.4 Peptide der Loopregion zwischen den β -Strängen V und VI des Arrestins interagieren mit photoaktiviertem Rhodopsin

Bei einem homonuklearen NOESY-Experiment werden struktureinschränkende Parameter in Form des Kern-Overhauser-Effektes (NOE) bestimmt. Der NOE enthält Information über den Abstand zweier Protonen, die räumlich benachbart sind. In dieser Arbeit wurde eine spezielle Form der NOE-Spektroskopie verwendet, das TrNOESY-Experiment. Das Experiment wird mit einem hohen Überschuss an Liganden im Verhältnis zum komplexbildenden Protein durchgeführt. Der Ligand muss sich im schnellen Austausch zwischen gebundener und freier Form befinden. Bei diesem Experiment erhält man schließlich Strukturinformationen über den Liganden im Komplex gebundenen Zustand (s. Kap 1.5.1).

Für fast alle getesteten Peptide konnte nach der Photoaktivierung des Rhodopsins keine Veränderungen in den NOESY-Spektren beobachtet werden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben.

Bindet ein Peptid nicht an den lichtaktivierten Rezeptor, können folglich auch keine TrNOE-Signale beobachtet werden. Das Peptid liegt sowohl im dunkeladaptierten als auch im photoaktivierten Zustand als kleines, schnell rotierendes Molekül frei in der Lösung vor. Aufgrund der hohen Rotationkorrelationszeit τ_c sind die NOE-Signale sehr schwach und können nicht detektiert werden.

Bindet das jeweilige Peptid nur sehr schwach, ist die Population an gebundenem Liganden zu klein, um ausreichend zur Signalamplifikation beizutragen. In dem Falle wird der TrNOE verschwindend klein, so dass hier auch keine zusätzlichen Signale nach der Photoaktivierung detektiert werden können.

Eine dritte Möglichkeit wäre, dass das Peptid zu stark bindet. Die Austauschrate wäre in diesem Falle kleiner als die Spin-Gitter-Relaxationsrate. Es findet kein ausreichender Magnetisierungstransfer zwischen gebundener und freier Form mehr statt. Auch hier können keine TrNOE-Signale detektiert werden.

Wie bereits in Kap. 1.5.1 beschrieben, hängt die Durchführbarkeit eines TrNOE-Experimentes u. a. von der Dissoziationskonstanten K_D , im Besonderen von der Rückgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} ab. Die Dissoziationskonstanten K_D sollte bei TrNOE-Experimenten im mikrobis millimolaren Bereich liegen. Über diese Experimente kann demnach nur eine Bindung festgestellt werden, wenn die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion k_{-1} diesen An-

forderungen entspricht. Wenn im NOESY-Spektrum keine Signale zu beobachten sind, kann nicht geschlußfolgert werden, dass das Peptid nicht bindet. Möglicherweise bindet es auch zu stark oder zu schwach.

Für die Peptide, die den Sequenzbereichen $T_\alpha(311-323)$, $T_\alpha(2-28)$ und $T_\alpha(2-25)_{myr}$ entsprechen, konnten Wechselwirkungen mit photoaktiviertem Rhodopsin bereits mit anderen Methoden nachgewiesen werden (Hamm et al. 1988). Die Dissoziationskonstanten K_D des N-terminalen Peptids $T_\alpha(2-28)$ und des Peptids $T_\alpha(311-323)$ mit photoaktiviertem Rhodopsin lagen jedoch beide nicht in dem Bereich, in welchem man strukturelle Untersuchungen mittels TrNOE-Messungen durchführen kann. In den NOESY-Spektren konnten nach der Belichtung keine zusätzlichen Signale beobachtet werden.

Eine interessante Beobachtung war bei den $1D-^1H$ -Spektren des Peptids $T_\alpha(2-25)_{myr}$ zu beobachten. Im $1D-^1H$ -Spektrum der freien Forms war ein für Peptide typisches Signalmuster zu beobachten. Nach Hinzugabe der Diskmembranen verschwanden diese Signale vollständig (s. Kap. 4.2). Eine Erklärung dafür ist, dass der Myristoylrest am N-Terminus des Peptids sich sofort in der Diskmembran verankert und dadurch das Peptid bereits im dunkeladaptierten Zustand fest mit der Membran verbunden ist und ein schneller Austausch zwischen gebundener und freier Form nicht mehr möglich ist. Deshalb erübrigte sich eine weitere Untersuchung anhand von TrNOE-Messungen.

Für die Sequenzbereiche Arr(152-170), Arr(232-245) und Arr(251-262) wurden ebenfalls bereits Wechselwirkungen mit photoaktiviertem Rhodopsin nachgewiesen und Dissoziationskonstanten im unteren mikromolaren Bereich bestimmt (Pulvermüller et al. 2000). In den NOESY-Spektren dieser Peptide waren vor und nach Belichtung der Probe ebenfalls keine Unterschiede zu erkennen. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Peptide zu stark an den aktivierten Rezeptor binden und deshalb keine TrNOE beobachtet werden können.

Sterisch bestünde die Möglichkeit, dass es bei der Bindung des photoaktivierten Rhodopsins mit der C-terminalen Kuppel zu einer Interaktion zwischen dem Sequenzabschnitt des Bereichs Arr(342-354) und den cytoplasmatischen Loops des Rezeptors kommt. Für diese Region wurde bisher jedoch keine Interaktion mit photoaktiviertem Rhodopsin nachgewiesen. Auch mit den TrNOE-Experimenten mit dem Peptid Arr(342-354) konnte keine Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin detektiert werden.

Für die Peptide Arr(66-80), Arr(67-77), Arr(65-76) und Arr(65-77) der Loopregion zwischen den β -Strängen V und VI hingegen, konnte eine Bindung, die durch die Aktivierung des Rhodopsins induziert wurde, festgestellt werden. Die NOESY-Spektren in Anwesenheit dunkeladaptierter Diskmembranen zeigten nur wenige sequentielle NOE, während nach der Licht-

aktivierung des Rhodopsins die Anzahl der NOE-Signale stark anstieg und vor allem NOE zwischen sequentiell nicht benachbarten Aminosäuren detektiert werden konnten. Dies zeigt, dass dieser Sequenzabschnitt des Arrestins mit einer Affinität im mikro- bis millimolaren Bereich an den aktivierten, unphosphorylierten Rezeptor bindet. Dadurch können frühere Untersuchungen bestätigt werden, die zeigen, dass dieser Loop bei der Erkennung des aktivierten Rezeptors eine wichtige Funktion übernimmt. Ebenfalls ist es ein weiterer Hinweis, dass der Vorgang der Aktivierungserkennung über eine schwache Bindung erfolgt (Gurevich & Gurevich 2006).

5.5 Arr(66-80) wird unter Bildung eines Diketopiperazins chemisch abgebaut

Das Peptid Arr(66-80) sollte zunächst als einziges weiter untersucht werden. Die TrNOE-Messungen wurden am unmarkierten Peptid durchgeführt, das über eine Fmoc-Synthese hergestellt wurde (Dr. P. Henklein, Charié, Berlin). Um ^{15}N - ^1H - und ^{13}C - ^1H -HSQC-Spektren aufzeichnen zu können, war es notwendig, das Peptid Arr(66-80) ^{15}N - bzw. ^{13}C -isotopenangereichert rekombinant herzustellen. Diese Spektren dienen der Ermittlung der TrRDC, um darüber eine Aussage über die Orientierung des Peptids im Rhodopsin gebundenen Zustand machen zu können.

Die Klonierung des für das His₁₀-Ubiquitin-Arr(66-80)-Fusionsprotein kodierende Plasmids sowie die Expression des Fusionsproteins verliefen unproblematisch. Das Fusionsprotein konnte mit einer hohen Ausbeute von 40 mg/pro Liter Expressionsmedium gereinigt werden. Die anschließende Spaltung durch die YUH und die Trennung des Peptids Arr(66-80) von den restlichen Komponenten im Spaltansatz ergab eine Ausbeute von 4 mg/pro Liter Expressionsmedium. Diese Ausbeute entsprach in etwa der eingesetzten Peptidmenge für zwei NMR-Experimente.

Leider musste jedoch ein chemischer Abbau des Peptids bereits während des Reinigungsprozesses festgestellt werden. Durch einen Ringschluss der ersten beiden Aminosäuren aufgrund eines nukleophilen Angriffs des endständigen Stickstoffs auf das Carbonyl-C-Atom der zweiten Aminosäure, bildet sich ein Diketopiperazin. Die restlichen 13 Aminosäuren werden abgespalten. Vor allem Peptide, die wie Arr(66-80) an dritter Stelle der Aminosäuresequenz ein Glycin haben, neigen zu dieser Abbaureaktion, die in Abb. 5.2 schematisch dargestellt ist.

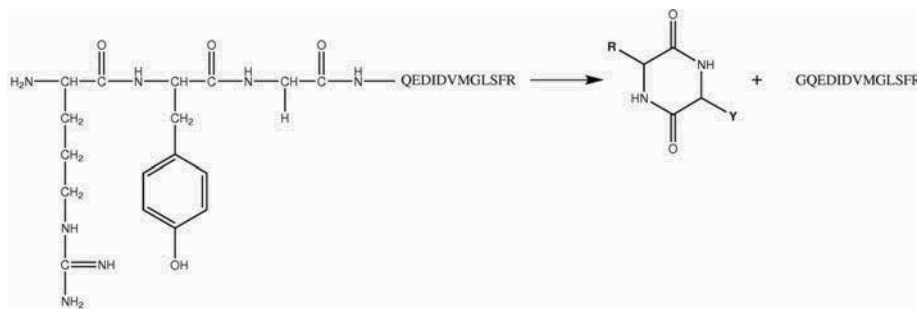


Abbildung 5.2: Reaktionsschema der Diketopiperazin-Bildung. Befindet sich bei einem Protein an dritter Position der Aminosäuresequenz ein Glycin, kann es durch einen nukleophilen Angriff des endständigen N-Atoms auf das Carbonyl-C-Atom der zweiten Aminosäure zu einem Ringschluss unter Abspaltung eines Diketopiperazins kommen.

Sowohl in den HSQC-Spektren als auch in den HPLC-Chromatogrammen und anschließender Massebestimmung über MALDI-TOF (Dr. Sabine Metzger, BMFZ Düsseldorf) konnte das abgespaltene Peptid Arr(68-80) nachgewiesen werden. Das Diketopiperazin aus R⁶⁶ und Y⁶⁷ selbst konnte aufgrund seiner geringen Masse erwartungsgemäß im Massenspektrum nicht detektiert werden.

Es konnte beobachtet werden, dass diese Abbaureaktion sehr temperatur- und lichtempfindlich war. Nur bei einer Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff und einer Lagerung bei -80 °C direkt im Anschluss an den letzten Reinigungsschritt konnte dieser Abbauprozess sehr gering gehalten werden.

In den HSQC-Spektren konnte ebenfalls der Einfluss von Licht auf den Abbauprozess beobachtet werden. Im dunkeladaptierten Zustand der Probe waren keine bis sehr schwache zusätzliche Signale des N-terminal verkürzten Peptids zu beobachten, sofern das Peptid unter den oben genannten Bedingungen gelagert wurde. Nach einer ungefilterten Belichtung der Probe waren im HSQC-Spektrum, welches direkt im Anschluss gemessen wurde deutliche zusätzliche Signale, die nicht dem intakten Arr(66-80) zugeordnet werden konnten zu beobachten. Dieser Prozess konnte durch eine Belichtung über eine Filtereinheit GG495, die undurchlässig für Wellenlängen $\lambda < 480$ nm ist, stark reduziert werden. Das wäre ein möglicher Hinweis, dass dieser Prozess eine photoinduzierte Eliminierungsreaktion ist. Durch die UV-Strahlung können möglicherweise Zwischenzustände angeregt werden, die die Abspaltung begünstigen. Da dieser Abbauprozess unter den Messbedingungen trotz korrekter Lagerung des Peptids und

Filtern des Lichtes bei der Photoaktivierung stattfand, wurde auf die weitere Untersuchung des Arr(66-80) schließlich verzichtet.

Aufgrund dessen wurden weitere Peptide der Loopregion synthetisiert. Bei den ausgewählten Peptiden Arr(65-77), Arr(65-76) und Arr(67-77) wurde deshalb darauf geachtet, dass die Glycine nicht an der dritten Position in der Aminosäuresequenz stehen. Der Fokus dieser Arbeit wurde schließlich auf das Peptid Arr(67-77) gelegt.

5.6 HSQC-Experimente bestätigen die Bindung der Peptide Arr(66-80) und Arr(67-77) an photoaktiviertes Rhodopsin

Mit den Experimenten zur Ermittlung der TrRDC konnte bestätigt werden, dass die Peptide Arr(66-80) und Arr(67-77) an photoaktiviertes, unphosphoryliertes Rhodopsin binden.

In den ^{15}N - ^1H -HSQC- und ^{13}C - ^1H -HSQC-Spektren war nach der Photoaktivierung des Rhodopsins eine deutliche Linienverbreiterung der Signale im Vergleich zu den Signalen des dunkeladaptierten Zustands zu beobachten. Dies sind ebenfalls Hinweise, dass die Peptide Arr(66-80) und Arr(67-77) der Loopregion zwischen den β -Strängen V und VI des Arrestins an aktiviertes Rhodopsin binden.

Im dunkeladaptierten Zustand des Rhodopsins liegt das jeweilige Peptid isotrop und frei in Lösung vor. Detektiert werden die Korrelationen der kovalenten ^{15}N - ^1H - bzw. ^{13}C - ^1H -Bindungen. Der Abstand der Dublett Komponenten entspricht im dunkeladaptierten Zustand der $^1J_{\text{NH}}$ - bzw. $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung. Durch die Lichtaktivierung erfährt Rhodopsin eine Strukturänderung. Dadurch werden offensichtlich Bereiche freigelegt oder so verändert, dass die Peptide der Loopregion binden können. Die Rhodopsin enthaltenden Diskmembranen sind im Magnetfeld ausgerichtet. Sobald ein Peptid an Rhodopsin bindet, verhält es sich ebenfalls anisotrop. Da das Peptid nur schwach an Rhodopsin bindet, befindet es sich im schnellen Austausch zwischen freier und gebundener Form. In dem kurzen Augenblick der Bindung trägt eine mehrere kHz große dipolare Kopplung zur Signalaufspaltung bei. Der Abstand im HSQC-Spektrum zwischen den Kopplungskomponenten nach der Belichtung entspricht nun der skalaren Kopplung zuzüglich der transferierten RDC. Die TrRDC einer ^{15}N - ^1H - bzw. ^{13}C - ^1H -Bindung entspricht einem gewichteten Mittel der entsprechenden Kopplung aller Peptide und trägt so zu einer Li-

nienverbreiterung der Kopplungssignale bei. Mit der Linienverbreiterung war gleichzeitig eine Intensitätsabnahme zu beobachten. Durch den hohen Überschuss an freiem Peptid wird die dipolare Kopplung so skaliert, dass sie anhand von HSQC-Spektren gemessen werden kann.

Der MetaII-Zustand des Rhodopsins hat bei den gewählten Messbedingungen von 10 °C bzw. 20 °C und einem pH-Wert von 6,6 eine Halbwertszeit von 54 min bzw. 15 min (Koenig et al. 2002). In den HSQC-Spektren der jeweiligen Temperatur war zu beobachten, dass sich die Signalintensitäten und Linienbreiten nach vergleichbaren Zeiten wieder den Werten des dunkeladaptierten Zustands annäherten. Auch die ermittelten $^1J^{exp}$ fielen wieder auf den Ausgangswert der $^1J^{dunkel}$ zurück. Der Wert der $^1J^{dunkel}$ war bei einer Temperatur von 20 °C entsprechend schneller erreicht als bei 10 °C.

Diese Beobachtungen zeigten, dass die Peptide Arr(66-80) und Arr(67-77) an photoaktiviertes Rhodopsin binden und bestätigten die Ergebnisse der TrNOE-Experimente.

Wie unter Kap. 4.5 beschrieben, konnte für das Peptid Arr(66-80) keine exponentielle Abnahme der TrRDC in Abhängigkeit der Zeit bestimmt werden. Die ermittelten $^1J^{exp}$ in den Experimenten direkt nach der Photoaktivierung streuten stark und wiesen keine eindeutige Tendenz auf. Systematische Fehler sowohl bei der Präparation der Diskmembranen, der rekombinanten Herstellung des Peptids als auch bei den Messbedingungen während der NMR-Experimente konnten weitestgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigte die Reproduktion der TrRDC des S2-Peptids (s. Kap. 4.1.2), dass die Diskmembranen sich im Magnetfeld anisotrop verhielten.

Die Signale der C-terminalen Aminosäuren M⁷⁵ bis R⁸⁰ waren in einigen Messreihen in den ersten drei Experimenten nach der Belichtung nicht mehr bzw. nur sehr schwach detektierbar. Es handelt sich bei diesen Resten um überwiegend hydrophobe Aminosäuren. Es wurde deshalb vermutet, dass der C-Terminus des Arr(66-80) möglicherweise eine starke hydrophobe Wechselwirkung mit aktiviertem Rhodopsin eingeht. Diese Interaktion des C-Terminus scheint jedoch zu stark zu sein und damit die Austauschrate entsprechend zu gering, um TrRDC zu messen, die einer definierten Orientierung des Moleküls relativ zur Membrannormalen entsprechen.

Für das Peptid Arr(67-77) hingegen zeichnet sich bei einer Temperatur von 20 °C die Tendenz einer definierten Orientierung ab. Die Bestimmung der TrRDC dieses Peptids und die Berechnung der jeweiligen Regressionskurven ergab für die Aminosäuren E⁷⁰, D⁷³, V⁷⁴, M⁷⁵ und L⁷⁷ einen exponentiell abfallenden bzw. ansteigenden Verlauf der $^1J^{exp}$ nach der Photoaktivierung des Rhodopsins, was dem Zerfall des aktivierten und peptidbindenden Rhodopsinzustandes entsprach. Über einen gekoppelten Datensatz konnte eine Halbwertszeit des bindenden Zu-

stands von $\tau = 17$ min bestimmt werden. Dies ist im Einklang mit den Daten von Koenig et al. (2002), die eine Halbwertszeit anhand der TrRDC des S2-Peptids von $\tau = 15$ min bei einer Temperatur von 20 °C berechneten.

Bei einer Temperatur von 10 °C konnte keine signifikante Änderung der $^1J^{exp}$ im Vergleich zu $^1J^{dunkel}$ direkt im Anschluss an die Photoaktivierung des Rezeptors beobachtet werden. Dies könnten Hinweise sein, dass bei der niedrigeren Temperatur die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion k_{-1} und damit die Austauschrate zu klein ist, um TrRDC detektieren zu können. Ähnliches konnte Koenig et al. (2000) für das S2-Peptid bei 3 °C beobachten.

Die Messungen bei 20 °C zeigen jedoch, dass für das verkürzte Peptid die Bestimmung eines Ausrichtungstensors möglich sein sollte und eine Orientierung des Peptids relativ zur Membrannormalen bestimmt werden kann.

5.7 Arr(67-77) bindet unter Ausbildung einer α -helikalen Struktur an photoaktiviertes Rhodopsin

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peptide der Loopregion an photoaktiviertes Rhodopsin binden. Zusätzlich konnte über TrNOE-Experimente gezeigt werden, dass durch die Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin eine Struktur induziert wird. Das Peptid frei in Lösung und nach Hinzufügen dunkeladaptierter Diskmembranen weist keine Präferenz für eine Sekundärstruktur auf. In der Kristallstruktur des inaktiven Arrestins nimmt diese unstrukturierte Loopregion zwei unterschiedliche Konformationen ein, was auf eine hohe Flexibilität des Loops hindeutet (Granzin et al. 1998). Auch die Arbeiten von Sommer et al. (2007) konnten dies belegen und ebenfalls zeigen, dass nach der Bindung eine Konformationsänderung stattfindet. Bisher gab es jedoch noch keine atomar aufgelöste Struktur dieser Binderegion im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin.

Die Vermutung, dass Arrestin eine globale Konformationsänderung erfährt, wird durch die hohe apparente Aktivierungsenergie von 140 kJ/mol der Arrestin-Rhodopsin-Wechselwirkung erhärtet (Schleicher et al. 1989; Pulvermüller et al. 1997). Teile dieser postulierten Konformationsänderung konnten in dieser Arbeit aufgeklärt werden. Die Auswertung der NOE-Intensitäten (s. Abb. 4.18 und Kap. 4.7) deuteten bereits auf eine helikale Sekundärstruktur

hin. Die Strukturberechnung mittels Xplor-NIH ergab, dass das Peptid Arr(67-77) nach der Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin eine wohldefinierte α -helikale Struktur im Bereich E⁷⁰ bis M⁷⁵ ausbildet. In Abb. 5.3 wird ein Modell dargestellt, in welchem die unstrukturierte Loopregion der inaktiven Arrestin-Kristallstruktur (links) durch die α -helikale Struktur des Peptids Arr(67-77) im Rhodopsin gebundenen Zustand ersetzt wurde (rechts).

Eine Präferenz einer Aminosäure für eine Sekundärstruktur kann über eine statistische Auswertung bekannter Kristallstrukturen vorhergesagt werden (Williams et al. 1987). Interessanterweise haben nach dieser Statistik nur die Aminosäuren E⁷⁰ und M⁷⁵ eine Präferenz für eine helikale Sekundärstruktur. D. h. die Bindung des Peptids an aktiviertes Rhodopsin ist entscheidend für die Induktion der helikalen Sekundärstruktur. Es findet praktisch durch die Bindung an den Rezeptor eine Prägung dieser α -Helix statt.

Die Ausbildung einer α -Helix in der Loopregion deutet auf eine Wechselwirkung mit einer hydrophoben Tasche hin. Leider können über die TrNOE-Experimente keine Aussagen über die Binderegion des Rhodopsins getroffen werden. Untersuchungen der Kristallstruktur eines Komplexes aus Rhodopsin und Arr(67-77) könnte darüber Informationen liefern. In einer Kristallstrukturanalyse des Opsins im Komplex mit T α (340-350) konnte gezeigt werden, dass das α -helikale Peptid an eine hydrophobe Oberfläche zwischen Helix V und VI bindet. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung mit Arr(67-77) nach einem ähnlichen Prinzip verläuft.

5.8 Warum bindet ein Arrestin-Peptid an unphosphoryliertes Rhodopsin?

Innerhalb der Signaltransduktion des Photozyklus übernimmt Arrestin die Funktion der Termination der Signalkaskade, indem es an phosphoryliertes Rhodopsin bindet. Die Phosphorylierung des Rhodopsins durch die Rhodopsinkinase ist ein entscheidender Schritt zur Beendigung der Signalkaskade.

Arrestin bindet sehr spezifisch an phosphoryliertes, aktiviertes Rhodopsin (P-R*). Die Bindung an inaktives, phosphoryliertes Rhodopsin (P-R) oder photoaktiviertes, unphosphoryliertes Rhodopsin (R*) ist 10 bis 20fach schwächer. Die Bindung an dunkeladaptiertes, unphosphoryliertes Rhodopsin (R) ist nahezu überhaupt nicht zu detektieren (Gurevich & Gurevich 2006). Aufgrund dessen wurde 1993 erstmals von Gurevich & Benovic postuliert, dass die

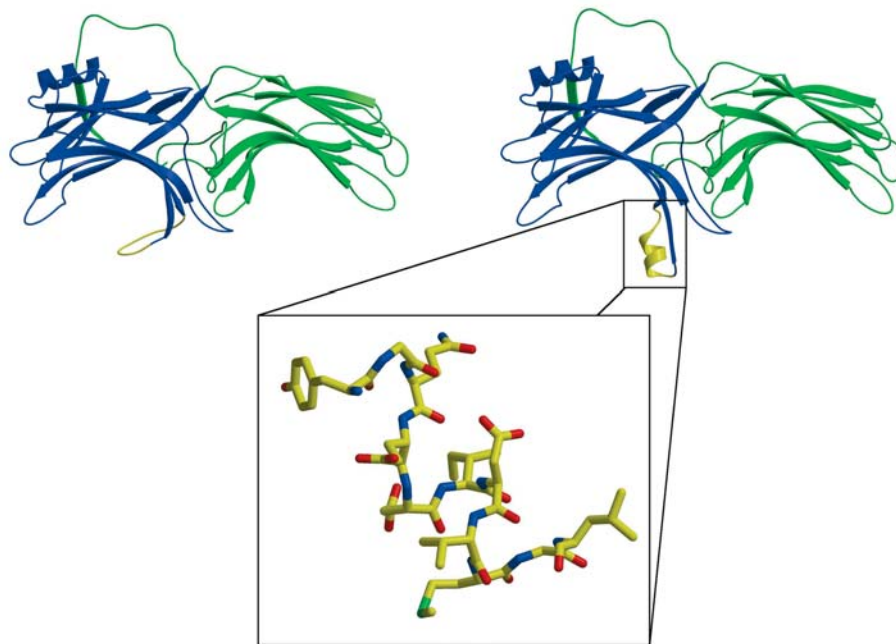


Abbildung 5.3: Arrestin-Kristallstruktur im Vergleich zu einem Modell des Arrestins in der gebundenen Form. In der Kristallstruktur des inaktiven Arrestins (links) nimmt die unstrukturierte Loopregion (gelb) zwischen den β -Strängen V und VI zwei unterschiedliche Konformationen ein, was auf eine hohe Flexibilität des Loops hindeutet (Granzin et al. 1998). Nach der Photoaktivierung des Rhodopsins bindet das Peptid Arr(67-77), das dieser Loopregion entspricht an den Rezeptor. Durch die Bindung wird eine α -helikale Struktur zwischen den Aminosäuren E⁷⁰ bis M⁷⁵ induziert. Rechts ist in einem Modell die Loopregion der inaktiven Form des Arrestins durch die Struktur des Arr(67-77)-Peptids (gelb) im Rhodopsin gebundenen Zustand ersetzt. Dabei wurden die randständigen Aminosäuren an den Verbindungspositionen für das Modell geringfügig modifiziert. Im Vordergrund ist die Vergrößerung der Arr(67-77)-Struktur der energieärmsten Konformation dargestellt.

Rhodopsin-Arrestin-Interaktion auf zwei Erkennungsstellen beruht. Eine sogenannte Aktivierungserkennungsstelle bindet Rezeptorelemente, die aufgrund der Aktivierung ihre Struktur ändern. Diese Erkennungsstelle überprüft praktisch, ob Rhodopsin im aktivierten oder inaktivierten Zustand vorliegt. Eine zweite Region im Arrestinmolekül, die sogenannte Phosphorylierungserkennungsstelle überprüft, ob Rhodopsin am C-Terminus phosphoryliert ist

(Gurevich & Benovic 1993). Die Überprüfung der Aktivität des Rhodopsins erfolgt über eine schwache Bindung. Falls Rhodopsin als R, P-R oder R* vorliegt, kann Arrestin schnell wieder dissoziieren. Wird jedoch festgestellt, dass Rhodopsin gleichzeitig phosphoryliert und photoaktiviert ist, erfährt Arrestin eine globuläre Konformationsänderung und geht in einen aktiven Zustand über. Diese Konformationsänderung erlaubt eine hochaffine Bindung an P-R* mit einem $K_D = 50$ nM (Schleicher et al. 1989).

Die untersuchten Peptide Arr(66-80), Arr(65-77), Arr(65-76) und Arr(67-77) der Loopregion zwischen den β -Strängen V und VI binden alle an unphosphoryliertes R*. Sie binden nicht an dunkeladaptiertes, unphosphoryliertes Rhodopsin. MetaII zerfällt unter den gewählten Bedingungen von 10 °C mit einer Halbwertszeit von 54 min thermisch in Opsin und all-*trans*-Retinal. Während der Abnahme der Konzentration an R*, gleichen sich die HSQC-Experimente mit der Zeit wieder den dunkeladaptierten Spektren an. Auch in einem NOESY-Spektrum, welches nach einer Zeit von 4 h, nach welcher kein aktiviertes Rhodopsin mehr vorhanden sein sollte, aufgenommen wurde, ist wieder mit den Spektren des dunkeladaptierten Zustands nahezu identisch. Es treten wie zuvor nur einige sequentielle NOE auf. Daraus kann geschlußfolgert werden, dass die Peptide nicht an deaktiviertes Opsin binden.

Die Phosphorylierungserkennungsstelle des Arrestins ist hinreichend gut untersucht und besteht höchstwahrscheinlich aus zwei Elementen. Die Aminosäure R¹⁷⁵ innerhalb des *polar core* und die Aminosäuren R¹⁴ und R¹⁵ spielen dabei eine zentrale Rolle (Gurevich & Benovic 1995; Vishnivetskiy et al. 2000). Der Loop V-VI reicht in der Kristallstruktur von G⁶⁸ bis S⁷⁸ und ist nicht in der unmittelbaren Umgebung der Phosphorylierungserkennungsstelle. Die in dieser Arbeit nachgewiesene Bindung an R* ist ein wichtiger Hinweis, dass diese Region zur Aktivierungserkennungsstelle des Arrestins gehört. Dieser Region wurde bereits von Granzin et al. (1998) eine wichtige Rolle in der Rezeptorerkennung zugeschrieben.

Mit der vorliegenden Arbeit können ebenfalls die Ergebnisse von Dinculescu et al. (2002) und Sommer et al. (2007) unterstrichen werden. Dinculescu et al. (2002) konnte durch die Insertion eines 10 Aminosäure langen *c-Myc-Tags* (EQKLISEEDL) zeigen, dass die Loopregion eine zentrale Rolle in der Rezeptorerkennung spielt. Eine Insertion der 10 Aminosäuren zwischen L⁷⁷ und S⁷⁸ produzierte ein vollständig inaktives Arrestin, während die Insertion zwischen die Reste I⁷² und D⁷³ zu einer deutlich verminderten Rezeptorerkennung führte. Sommer et al. (2007) konnten über ortsspezifische Cysteinmutagenese und intramolekulare Fluoreszenzauslöschung ebenfalls zeigen, dass die Loopregion an der Bindung an P-R* betei-

ligt ist. Zusätzlich wiesen sie eine Änderung der Beweglichkeit des Loops nach, welche durch die Rezeptorbindung ausgelöst wurde.

Innerhalb eines Kooperationsprojektes mit Alexander Pulvermüller (Charité, Berlin) wurde die Bindung des Arr(67-77) an R* und P-R* mittels des Extra-MetaII-Versuchs (Hofmann 1985) untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Arr(67-77) mit einem $K_D = 1,9$ mM an unphosphoryliertes R* bindet. Die Bindung an phosphoryliertes Rhodopsin P-R* war mit einem $K_D = 1,0$ mM geringfügig stärker.

Neben der Verifizierung der Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Arr(67-77) eine stabilisierende Wirkung sowohl auf den MetaII- als auch auf den P-MetaII-Zustand ausübt. Diese stabilisierende Wirkung konnte zum ersten Mal für eine synthetisches Arrestin-Peptid gezeigt werden. Bisher wurde dies nur für die Transduzin-Peptide T $_{\alpha}$ (340-350) und T $_{\gamma}$ (50-71) nachgewiesen (Kisselev et al. 1999). Aufgrund dieser Messungen kann davon ausgegangen werden, dass Arr(67-77) an den MetaII-Zustand und nicht an ein anderes Intermediat des Photozyklus bindet.

5.9 Modelle des Arrestin-Rhodopsin-Komplexes

Der genaue Mechanismus der Arrestin-Rhodopsin-Interaktion und die dreidimensionale Struktur des Komplexes ist bisher nicht geklärt. Es wird jedoch diskutiert, dass Arrestin eine Konformationsänderung vollzieht, sobald es an photoaktiviertes Rhodopsin bindet. Dies wurde bereits von Schleicher et al. (1989) aufgrund einer hohen apparenten Aktivierungsenergie der Rhodopsin-Arrestin-Bindung postuliert. Wie diese Konformationsänderung genau abläuft ist nicht bekannt. Verschiedene Modelle werden jedoch kontrovers diskutiert.

Das traditionelle Modell ist das einer 1:1 Stöchiometrie, wobei die cytoplasmatischen Loops des Rhodopsins jeweils von einer der Kuppeln des Arrestins umschlossen werden. Dabei wird das Modell favorisiert, bei welchem Rhodopsin mit der N-terminalen Kuppel interagiert. In dieser Domäne befindet sich auch die Phosphorylierungserkennungsstelle. Modelling-Studien zeigten, dass die Interaktion mit der N-terminalen Domäne energetisch begünstigt ist und die größte Interaktionsfläche bietet. Erstaunlicherweise wurde ein 1:1 Modell, bei welchem Rhodopsin mit dem Zentrum des Arrestins interagiert ebenfalls favorisiert. Diese Interaktion scheint ebenfalls energetisch begünstigt zu sein und weicht in der Berechnung der Energien nur minimal vom Modell der N-terminalen Kuppelinteraktion ab (Modzelewska et al. 2006).

Dieses Modell wäre auch im Einklang mit den Untersuchungen von Skegro et al. (2007). Die Kuppeln der Arrestinmoleküle wurden spezifisch durch Fluorophor-Moleküle blockiert. Sofern jeweils nur eine Kuppel blockiert wurde, behielt Arrestin seine Funktionalität. Wurden beide Kuppeln gleichzeitig mit je einem Farbstoffmolekül blockiert, war trotzdem noch eine, wenn auch reduzierte Bindung zwischen Arrestin und photoaktiviertem Rhodopsin zu beobachten. Die Interaktion konnte nur durch die sterische Blockierung beider Kuppeln mit jeweils zwei Fluorophor-Molekülen unterbunden werden.

Man könnte deshalb daraus ein Modell ableiten, bei welchem Arrestin u. a. mit der zentralen Region, in welcher sich auch der Loop V-VI befindet, mit Rhodopsin wechselwirkt und eine globale Konformationsänderung erfährt. Dies könnte ein Umklappen der *hinge region* bedeuten, wodurch eine einzige große Kuppel entstehen könnte. Durch die sterische Blockade mit nur zwei Farbstoffmolekülen wären die Bindungsstellen immer noch verhältnismäßig frei zugänglich, so dass es noch zu einer reduzierten Bindung kommen könnte. Erst durch ein vollständiges Abdecken der Bindestellen durch vier Farbstoffmoleküle wäre Rhodopsin an der Bindung zu Arrestin gehindert. Dieses Modell würde auch die Bedeutung des Loops V-VI hervorheben, da er sich hier direkt im Zentrum der Interaktion befände. Geht man davon aus, dass die induzierte α -Helix mit einer hydrophoben Tasche zwischen den cytoplasmatischen Loops des Rhodopsins interagiert, wäre dies in selbigem Falle sterisch ohne Hindernisse zu bewältigen.

In einem Modell des Arrestins, bei welchem der Loop V-VI der Kristallstruktur durch die α -helikale Struktur des Arr(67-77) ersetzt wurde, zeigt die Helix in die Richtung der N-terminalen Kuppel. Wechselwirkt diese Region als Aktivierungserkennungsstelle mit photoaktiviertem Rhodopsin, könnte man davon ausgehen, dass die N-termiale Kuppel des Arrestins als favorisierte Bindedomäne gilt (s. Abb. 5.4).

Ein weiteres Modell, das diskutiert wird beruht auf der Dimerisierung des Rhodopsins in Diskmembranen (Fotiadis et al. 2003; Fotiadis et al. 2004). Sterisch wäre es möglich, dass Arrestin jeweils mit einer Kuppel ein Rhodopsinmolekül eines Dimers umschließt. Auch in diesem Fall würde sich der Loop V-VI in direkter räumlicher Nähe zu den cytoplasmatischen Loops des Rhodopsins befinden, so dass eine Interaktion und vor allem das Überprüfen der Lichtaktivierung möglich wäre.

Findet die Rezeptorbindung über die C-terminale Kuppel des Arrestins statt, wäre es eher unwahrscheinlich, dass der Loop V-VI mit aktiviertem Rhodopsin interagiert. Dazu wäre eine globale Konformationsänderung des Arrestinmoleküls nötig, die die Ausbildung der α -Helix einschließen würde.

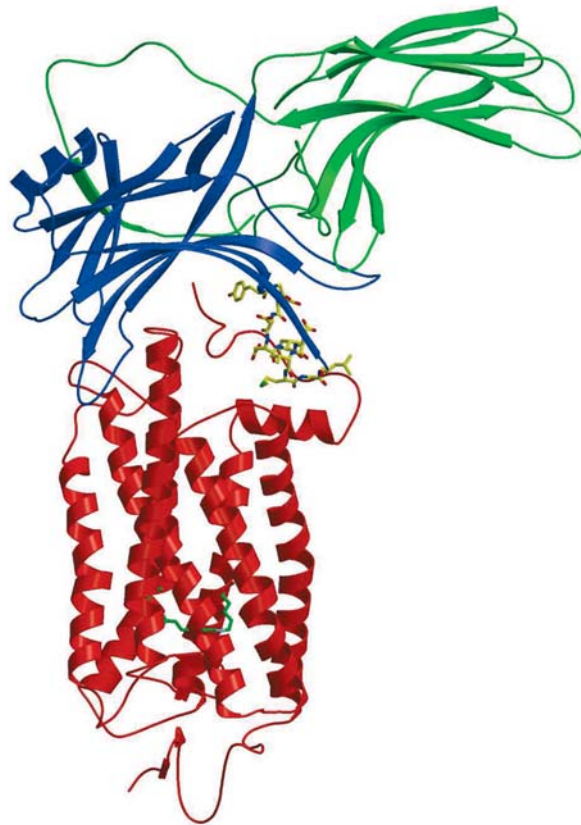


Abbildung 5.4: Modell der Arrestin-Rhodopsin-Interaktion. Eine mögliche Anordnung der Proteine Arrestin und Rhodopsin während der Wechselwirkung. Bei Arrestin wurde für das Modell die Kristallstruktur (Aminosäuren 6 bis 388, J. Granzin, nicht publiziert) mit ersetzter Loopregion durch die Struktur des Arr(67-77)-Peptids im Rhodopsin gebundenen Zustand (gelb) verwendet. Bei Rhodopsin (rot) wurde die Struktur mit der PDB-ID 1U19 (Okada et al. 2004) verwendet. Die C-terminale Region des Rhodopsins wurde so modifiziert, dass eine Bindung mit der Phosphorylierungsstelle in der N-terminalen Kuppel des Arrestins möglich ist. Das Modell wurde manuell und ohne Energieminimierung erstellt. In diesem Modell ist nur die N-terminale Domäne (blau) des Arrestins an der Rhodopsin-Bindung beteiligt.

5.10 Sind Nanodisks geeignet für die Untersuchung von Membranprotein-Ligand-Komplexen mittels Flüssig-NMR?

Die Etablierung des Protokolls zur Präparation von Nanodisks nach Bayburt et al. (2002) eröffnet viele Möglichkeiten Membranproteine in ihrer nativen Lipidumgebung zu untersuchen. Dieses Modellmembransystem ist ebenfalls dafür geeignet, mit zahlreichen biophysikalischen Methoden Membranproteine zusammen mit deren potentiellen Wechselwirkungspartnern zu charakterisieren. Membranproteine können in ihrer nativen Lipidumgebung in detergentenfreier Lösung untersucht werden. Aufgrund ihrer Größe je nach inkorporiertem Membranprotein von ungefähr 150 bis 250 kDa bewegen sich Nanodisks mit einer im Vergleich zu kleinen Liganden eher großen Rotationskorrelationszeit τ_c . Deshalb sind sie potentielle Kandidaten zur dreidimensionalen Strukturaufklärung von Membranprotein-Ligand-Komplexen mittels TrNOE-Experimenten.

Eine spontane Ausrichtung der Nanodisks im Magnetfeld findet jedoch nicht statt. Deshalb müssten zur Bestimmung von TrRDC kleiner gebundener Liganden, die Orientierung der Nanodisks mittels verschiedener etablierter Methoden herbeigeführt werden. Dann wäre ebenfalls die Bestimmung einer Orientierung des gebundenen Liganden relativ zur Ausrichtung des äußeren Magnetfelds möglich.

Dieses Modellmembransystem bietet auch die Möglichkeit, dreidimensionale Strukturen isotonenangereicherter Membranproteine oder einzelner Domänen mittels TROSY-basierter NMR-Verfahren aufzuklären. In dieser Arbeit wurden erste Testmessungen an Nanodisks mit inkorporiertem, isotonenangereichertem CD4 durchgeführt, die die Eignung des Systems für solche NMR-Experimente zeigten (Daten hier nicht gezeigt).

Die zeitliche Stabilität leerer Nanodisks wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht und zeigte, dass die Modellmembranen mindestens 14 Tage bei einer Temperatur von 12 °C stabil sind. Die Voraussetzung zur Aufnahme zeitintensiver 3D-NMR-Spektren ist dadurch gegeben.

5.11 TrNOE- und TrRDC-Experimente sind eine leistungsstarke Methode zur Strukturaufklärung großer Komplexe

Die NMR-Experimente zur Ermittlung von TrNOE und TrRDC sind leistungsstarke Methoden, mit welchen dreidimensionale Strukturinformationen über Liganden im Komplex mit großen Proteinen gewonnen werden können. Leider gibt es zur Zeit noch kein standardisiertes Verfahren, Komplexe über 50 kDa mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie vollständig aufzuklären. Deshalb bieten die Austausch basierten NMR-Methoden gerade für kleine Liganden mit eher kleiner Affinität zu ihrem Bindungspartner viele Möglichkeiten. Außerdem ist das Molekulargewicht des ligandbindenden Proteins nach oben nicht limitiert. Deshalb sind die Experimente zur Bestimmung von TrRDC und TrNOE zwei der wenigen NMR-Methoden, bei welchen die Größe des Proteins keine Rolle spielt.

Ein Vorteil gegenüber der Röntgenkristallographie ist, dass gerade Komplexe, die schnell wieder dissoziieren untersucht werden können. Bei solchen Komplexen ist es meist schwierig Kristalle zu bilden. Das gleiche gilt für Komplexe, bei welchen aktivierte Zustände, wie z. B. Rhodopsin eine sehr begrenzte Halbwertszeit haben. Sie sind deshalb für die Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet. Vor allem Strukturinformationen flexibler Regionen können mit der Röntgenstrukturanalyse schwer bestimmt werden, da meist keine Elektronendichten für solche Bereiche detektiert werden können.

Ein weiterer Vorteil ist, dass relativ schnell und eindeutig der Unterschied zwischen gebundener und freier Form eines Liganden bestimmt werden kann, da die Unterschiede in den NOESY-Spektren deutlich erkennbar sind.

Diskmembranen bieten den Vorteil, dass sie sich spontan im Magnetfeld ausrichten. Deshalb sind sie für Interaktionsstudien zwischen Peptiden und Rhodopsin zur Ermittlung der TrRDC besonders geeignet. Es bestehen jedoch zahlreiche andere Methoden wie z.B. filamentöse Bakteriophagen, Bicellen oder Polyacrylamidgele, große Proteine im Magnetfeld auszurichten. Deshalb eignet sich diese Methode nicht nur für Rhodopsin, sondern auch für andere Proteine im Komplex mit kleinen Molekülen.

5.12 Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Aufklärung der Konformationsänderung des Arrestins infolge der Bindung an photoaktiviertes Rhodopsin geleistet werden. Die Ausbildung einer α -Helix im Loop zwischen den β -Strängen V und VI, die durch die Bindung an den lichtaktivierten Rezeptor induziert wird, deutet darauf hin, dass noch mehrere Sequenzbereiche eine strukturelle Änderung erfahren. Interessant wäre deshalb, noch weitere Peptide zu finden, deren Strukturen mittels TrNOE-Bestimmungen aufgeklärt werden können. Zusätzlich können über TrRDC-Messungen Informationen über die Orientierung der Peptide zur Membrannormalen ermittelt werden. Das Peptid Arr(67-77) scheint dafür geeignet zu sein. Die TrRDC-Messungen müssten mehrfach reproduziert werden, um über die gemittelten Daten einen Ausrichtungstensor zu berechnen, der schließlich Aufschluss über die Orientierung des Moleküls relativ zur Membrannormalen gibt.

Über die jeweiligen Strukturen und Orientierungen könnte dann ein Modell der Gesamtstruktur und -orientierung des vollständigen Arrestinmoleküls relativ zum Rezeptor im gebundenen Zustand entstehen. Interessant wäre dann ein Vergleich zur Kristallstruktur des inaktiven Arrestins, um darüber Informationen über die globale Konformationsänderung des aktiven Arrestins zu erhalten.

Um die genauen Bindestellen am Rezeptormolekül zu identifizieren, wäre eine Kristallstrukturanalyse, bei welcher das Peptid im Komplex mit aktiviertem Rhodopsin oder Opsin untersucht wird, vergleichbar der kürzlich publizierten Struktur des Opsins im Komplex mit T_{α} (340-350) von Scheerer et al. (2008), interessant.

Falls es in Zukunft möglich sein sollte, mittels Röntgenkristallographie oder weiterentwickelter NMR-Methoden dreidimensionale Strukturen der Gesamtkomplexe zwischen Transduzin oder Arrestin mit lichtaktiviertem Rhodopsin zu bestimmen, würde man daraus beachtliche Informationen über den genauen Mechanismus zwischen GPCR und ihren regulatorischen Proteinen erhalten. Dies ist gerade aus biochemischer und medizinischer Hinsicht ein erstrebenswertes Ziel.

6 Anhang

6.1 NMR-chemische ^1H -Verschiebung des Arr(67-77)-Peptides

Aminosäure	Probe	HN	$H\alpha$	$H\beta$	andere
Y67	belichtet	ND	4.14	3.05	$\delta(2,6)$ 7.11, $\epsilon(3,5)$ 6.82
	dunkel	ND	4.13	(3.02)	$\delta(2,6)$ 7.11, $\epsilon(3,5)$ 6.82
	frei	ND	4.22	3.09	$\delta(2,6)$ 7.14, $\epsilon(3,5)$ 6.85
G68	belichtet	8.80	3.85, 3.94	-	-
	dunkel	8.80	3.85, 3.94	-	-
	frei	8.76	3.87, 3.98	-	-
Q69	belichtet	8.55	4.21	2.07, 1.98	γCH_2 2.32, ϵCH_3 7.712, 6.89
	dunkel	8.55	4.21	2.06, 1.97	γCH_2 2.32, ϵNH_2 7.71, 6.89
	frei	8.58	4.22	2.09, 1.99	γCH_2 2.35, ϵNH_2 7.73, 6.90
E70	belichtet	8.70	4.22	2.00, 1.98	γCH_2 2.23
	dunkel	8.70	4.20	2.01, 1.89	γCH_2 2.23
	frei	8.70	4.22	2.03, 1.91	γCH_2 2.25
D71	belichtet	8.25	4.53	2.66, 2.54	-
	dunkel	8.25	4.53	2.63, 2.54	-
	frei	8.24	4.55	2.68, 2.56	-
I72	belichtet	7.93	4.06	1.82	γCH_2 1.39, γCH_3 1.12, δCH_3 0.84
	dunkel	7.93	4.06	1.82	γCH_2 1.39, γCH_3 1.11, δCH_3 0.842
	frei	7.94	4.07	1.84	γCH_2 1.42, γCH_3 1.14, δCH_3 0.86
D73	belichtet	8.42	4.56	2.66, 2.56	-
	dunkel	8.42	4.56	2.65, 2.56	-
	frei	8.43	4.58	2.68, 2.59	-
V74	belichtet	8.06	4.07	2.12	γCH_3 0.89, 0.80
	dunkel	8.06	4.07	2.12	γCH_3 0.89
	frei	8.06	4.09	2.14	γCH_3 0.91
M75	belichtet	8.38	4.43	2.04	γCH_2 2.51, ϵCH_3 2.61
	dunkel	8.38	4.43	2.05	γCH_2 2.50, ϵCH_3 ND
	frei	8.38	4.45	2.06	γCH_2 2.58, ϵCH_3 ND
G76	belichtet	8.36	3.83, 3.93	-	-
	dunkel	8.36	3.84, 3.92	-	-
	frei	8.37	3.85, 3.95	-	-
L77	belichtet	7.77	4.15	1.58, 1.53	γCH ND, δCH_3 (0.86, 0.81)
	dunkel	7.77	4.15	1.58, 1.53	γCH ND, δCH_3 ND
	frei	7.78	4.17	1.56	γCH ND, δCH_3 0.86

6.2 Aminosäuresequenz MSP1

$M_W = 25309,5$ Da

MGSSHHHHHENLYFQGLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETE
GLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQK
LHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELQRRLAARLEALKENGGA
RLAEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

7 Abkürzungsverzeichnis

7.1 Abkürzungen und Symbole

1D, 2D, 3D	ein-, zwei-, dreidimensional
α	Absorptionsverhältnis A_{280nm}/A_{500nm}
Å	Ångström (0,1 nm)
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Arr	Arrestin
AS	Aminosäure
CARA	engl. <i>computer aided resonance assignment</i>
CD	Circulardichroismus
CT	engl. <i>constant time</i>
^1D	Restdipolkopplung
D ₂ O	Deuteriumoxid, ^2H_2O
d. h.	das heißt
DIPSI-3	engl. <i>decoupling in the presence of scalar interactions</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EPR	Elektronenparamagnetische Resonanz <i>electron paramagnetic resonance</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i>)
g	Erdbeschleunigung
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GDP	Guanosindiphosphat

GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoff (in wässriger Lösung: Salzsäure)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethansulfonsäure
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
HSQC	heteronukleare Einkanzenkohärenz (engl. <i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
¹ J	skalare Kopplung
¹ J _{dunkel}	beobachtete Aufspaltung in Hz der Dublett Komponenten im dunkeladaptierten Zustand
¹ J _{exp}	beobachtete Aufspaltung in Hz der Dublett Komponenten im lichtaktivierten Zustand
K	Kelvin
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton; Molekulargewichtsangabe für Biopolymere
M9-Medium	künstliches Minimalmedium zur Isotopenanreicherung
MALDI-TOF	engl. <i>matrix assisted laser desorption/ionisation- time of flight</i>
MetaI	Metarhodopsin I
MetaII	Metarhodopsin II
MSP1	engl. <i>membrane scaffold protein 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaP _i	Natriumphosphat
NaOH	Natriumhydroxid (in wässriger Lösung: Natronlauge)
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (engl. <i>nickel nitrilotriacetic acid</i>)
NMR	kernmagnetische Resonanz (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (engl. <i>nuclear Overhauser effect</i>)
NOESY	NOE-Spektroskopie (engl. <i>NOE spectroscopy</i>)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge λ = 600 nm
P-MetaII	phosphoryliertes Metarhodopsin II
P-R	phosphoryliertes, inaktiviertes Rhodopsin
P-R*	phosphoryliertes, aktiviertes Rhodopsin

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PFG	gepulster Magnetfeld-Gradient (engl. <i>pulsed field gradient</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	1-Palmitoyl-2-Oleyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin
ppm	Einheit der NMR-chemischen Verschiebung (engl. <i>part per million</i>)
RK	Rhodopsinkinase
R	dunkeladaptiertes Rhodopsin
R*	photoaktiviertes Rhodopsin
RDC	Restdipolkopplung (engl. <i>residual dipolar coupling</i>)
rmsd	Quadratwurzel aus den mittleren Abweichungsquadranten (engl. <i>root mean square residue</i>)
ROE	engl. <i>rotated frame Overhauser effect</i>)
ROESY	ROE-Spektroskopie (engl. <i>ROE spectroscopy</i>)
ROS	äußeres Segment des Stäbchens (engl. <i>rod outer segment</i>)
RT	Raumtemperatur
σ^B	Kreuzrelaxationsrate des gebundenen Zustands
σ^F	Kreuzrelaxationsrate des freien Zustands
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
τ_c	Rotationskorrelationszeit
T	Tesla
T_α	α -Untereinheit des Transduzins
$T_{\alpha\beta\gamma}$	Holoprotein des Transduzins aus α -, β - und γ -Untereinheit
$T_{\beta\gamma}$	Heterodimer des Transduzins aus β - und γ -Untereinheit
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TOCSY	engl. <i>total correlated spectroscopy</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrNOE	transferierter Kern-Overhauser-Effekt
TROSY	engl. <i>transvers relaxation optimized spectroscopy</i>
TrRDC	transferierte Restdipolkopplung
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett

Vis	visuell
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WATERGATE	engl. <i>water supression by gradient-tailored exitation</i>
z. B.	zum Beispiel

7.2 Ein- und Dreibuchstaben-Aminosäure-Code

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Literatur

- Angers, S., A. Salahpour, & M. Bouvier (2002). Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 409–435.
- Aue, W. P., E. Bartholdi, & R. R. Ernst (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* 64, 2229.
- Bax, A. (1994). Multidimensional nuclear magnetic resonance methods for protein studies. *Curr Opin Struct Biol* 4, 738–744.
- Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova, & S. G. Sligar (2002). Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Letters* 2(8), 853–856.
- Bayburt, T. H., Y. V. Grinkova, & S. G. Sligar (2006). Assembly of single bacteriorhodopsin trimers in bilayer nanodiscs. *Arch Biochem Biophys* 450(2), 215–222.
- Bloch, F., W. Hansen, & M. Packard (1946). The nuclear induction. *Phys Rev* 69, 127.
- Bourne, H. R. & E. C. Meng (2000). Structure. Rhodopsin sees the light. *Science* 289, 733–734.
- Cai, K., Y. Itoh, & H. G. Khorana (2001). Mapping of contact sites in complex formation between transducin and light-activated rhodopsin by covalent crosslinking: use of a photoactivatable reagent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9), 4877–4882.
- Chan, W. C. & P. D. White (2000). *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford University Press Oxford New York.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, M. A. Hanson, S. G. F. Rasmussen, F. S. Thian, T. S. Kobilka, H.-J. Choi, P. Kuhn, W. I. Weis, B. K. Kobilka, & R. C. Stevens (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* 318, 1258–1265.

- Clore, G. M. & A. M. Gronenborn (1983). Sequence-dependent structural variations in two right-handed alternating pyrimidine-purine DNA oligomers in solution determined by nuclear Overhauser enhancement measurements. *EMBO J* 2, 2109–2115.
- Delaglio, F., S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, & A. Bax (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6(3), 277–293.
- DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific., San Carlos, CA.
- Dinculescu, A., J. H. McDowell, S. A. Amici, D. R. Dugger, N. Richards, P. A. Hargrave, & W. C. Smith (2002). Insertional mutagenesis and immunochemical analysis of visual arrestin interaction with rhodopsin. *J Biol Chem* 277(14), 11703–11708.
- Dratz, E. A., J. E. Furstenau, C. G. Lambert, D. L. Thireault, H. Rarick, T. Schepers, S. Pakhlevanians, & H. E. Hamm (1993). NMR structure of a receptor-bound G-protein peptide. *Nature* 363, 276–281.
- Duan, H., N. R. Civjan, S. G. Sligar, & M. A. Schuler (2004). Co-incorporation of heterologously expressed Arabidopsis cytochrome P450 and P450 reductase into soluble nanoscale lipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 424(2), 141–153.
- Ernst, O. P. & F. J. Bartl (2002, Oct). Active states of rhodopsin. *Chembiochem* 3(10), 968–974.
- Fang, Y., O. Gursky, & D. Atkinson (2003). Structural studies of N- and C-terminally truncated human apolipoprotein A-I. *Biochemistry* 42(22), 6881–6890.
- Fiaux, J., E. B. Bertelsen, A. L. Horwich, & K. Wüthrich (2002). NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* 418, 207–211.
- Fotiadis, D., Y. Liang, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel, & K. Palczewski (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature* 421, 127–128.
- Fotiadis, D., Y. Liang, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel, & K. Palczewski (2004). The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane. *FEBS Lett* 564(3), 281–288.
- Fritze, O., S. Filipek, V. Kuksa, K. Palczewski, K. P. Hofmann, & O. P. Ernst (2003). Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation.

- Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5), 2290–2295.
- Gardner, K. H. & L. E. Kay (1998). The use of ^2H , ^{13}C , ^{15}N multidimensional NMR to study the structure and dynamics of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 357–406.
- Gautam, N., G. B. Downes, K. Yan, & O. Kisselev (1998). The G-protein betagamma complex. *Cell Signal* 10(7), 447–455.
- George, S. R., B. F. O'Dowd, & S. P. Lee (2002). G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1(10), 808–820.
- Getmanova, E., A. B. Patel, J. Klein-Seetharaman, M. C. Loewen, P. J. Reeves, N. Friedman, M. Sheves, S. O. Smith, & H. G. Khorana (2004). NMR spectroscopy of phosphorylated wild-type rhodopsin: mobility of the phosphorylated C-terminus of rhodopsin in the dark and upon light activation. *Biochemistry* 43(4), 1126–1133.
- Gohon, Y., T. Dahmane, R. W. H. Ruigrok, P. Schuck, D. Charvolin, F. Rappaport, P. Timmins, D. M. Engelman, C. Tribet, J.-L. Popot, & C. Ebel (2008). Bacteriorhodopsin/amphipol complexes: structural and functional properties. *Biophys J* 94(9), 3523–3537.
- Granzin, J., U. Wilden, H. W. Choe, J. Labahn, B. Krafft, & G. Büldt (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature* 391, 918–921.
- Grodberg, J. & J. J. Dunn (1988). ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol* 170(3), 1245–1253.
- Gurevich, V. V. & J. L. Benovic (1993). Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *J Biol Chem* 268(16), 11628–11638.
- Gurevich, V. V. & J. L. Benovic (1995). Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *J Biol Chem* 270(11), 6010–6016.
- Gurevich, V. V. & E. V. Gurevich (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 110(3), 465–502.
- Güntert, P., W. Braun, & K. Wüthrich (1991). Efficient computation of three-dimensional protein structures in solution from nuclear magnetic resonance data using the program

- DIANA and the supporting programs CALIBA, HABAS and GLOMSA. *J Mol Biol* 217(3), 517–530.
- Hamm, H. E., D. Deretic, A. Arendt, P. A. Hargrave, B. Koenig, & K. P. Hofmann (1988). Site of G protein binding to rhodopsin mapped with synthetic peptides from the alpha subunit. *Science* 241, 832–835.
- Han, M., V. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, & C. Schubert (2001). Crystal structure of beta-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane Translocation. *Structure* 9(9), 869–880.
- Hanson, S. M., N. V. Eps, D. J. Francis, C. Altenbach, S. A. Vishnivetskiy, V. Y. Arshavsky, C. S. Klug, W. L. Hubbell, & V. V. Gurevich (2007). Structure and function of the visual arrestin oligomer. *EMBO J* 26(6), 1726–1736.
- Hanson, S. M., E. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, M. R. Ahmed, X. Song, & V. V. Gurevich (2007). Each rhodopsin molecule binds its own arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(9), 3125–3128.
- Heck, M., S. A. Schädel, D. Maretzki, F. J. Bartl, E. Ritter, K. Palczewski, & K. P. Hofmann (2003). Signaling states of rhodopsin. Formation of the storage form, metarhodopsin III, from active metarhodopsin II. *J Biol Chem* 278(5), 3162–3169.
- Heukeshoven, J. & R. Dernick (1985). Characterization of a solvent system for separation of water-insoluble poliovirus proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 326, 91–101.
- Hiller, S., R. G. Garces, T. J. Malia, V. Y. Orekhov, M. Colombini, & G. Wagner (2008). Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent micelles. *Science* 321, 1206–1210.
- Hirsch, J. A., C. Schubert, V. V. Gurevich, & P. B. Sigler (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* 97(2), 257–269.
- Hofmann, K. P. (1985). Effect of GTP on the rhodopsin-G-protein complex by transient formation of extra metarhodopsin II. *Biochim Biophys Acta* 810(2), 278–281.
- Ish-Horowicz, D. & J. F. Burke (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9(13), 2989–2998.
- Jeener, J. (1976). Lecture. *Ampere International Summer School, Basco Polje, Yugoslavia*.

- Johnson, W. C. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins* 35(3), 307–312.
- Kabsch, W. & C. Sander (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22(12), 2577–2637.
- Kay, L. E., M. Ikura, R. Tschudin, & A. Bax (1990). Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins. *J Magn Reson* 89, 495–514.
- Kay, L. E. (1995). Field gradient techniques in NMR spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* 5(5), 674–681.
- Keller, R. (2004). *Optimizing the process of nuclear magnetic resonance analysis and computer aided resonance assignment*. Ph. D. thesis, ETH Zürich.
- Kijac, A. Z., Y. Li, S. G. Sligar, & C. M. Rienstra (2007). Magic-angle spinning solid-state NMR spectroscopy of nanodisc-embedded human CYP3A4. *Biochemistry* 46(48), 13696–13703.
- Kim, J.-M., C. Altenbach, M. Kono, D. D. Oprian, W. L. Hubbell, & H. G. Khorana (2004). Structural origins of constitutive activation in rhodopsin: Role of the K296/E113 salt bridge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34), 12508–12513.
- Kisselev, O. G. & M. A. Downs (2003). Rhodopsin controls a conformational switch on the transducin gamma subunit. *Structure* 11(4), 367–373.
- Kisselev, O. G., M. A. Downs, J. H. McDowell, & P. A. Hargrave (2004). Conformational changes in the phosphorylated C-terminal domain of rhodopsin during rhodopsin arrestin interactions. *J Biol Chem* 279(49), 51203–51207.
- Kisselev, O. G., J. Kao, J. W. Ponder, Y. C. Fann, N. Gautam, & G. R. Marshall (1998). Light-activated rhodopsin induces structural binding motif in G protein alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8), 4270–4275.
- Kisselev, O. G., C. K. Meyer, M. Heck, O. P. Ernst, & K. P. Hofmann (1999). Signal transfer from rhodopsin to the G-protein: evidence for a two-site sequential fit mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9), 4898–4903.
- Koenig, B. W., G. Kontaxis, D. C. Mitchell, J. M. Louis, B. J. Litman, & A. Bax (2002). Structure and orientation of a G protein fragment in the receptor bound state from residual dipolar couplings. *J Mol Biol* 322(2), 441–461.

- Koenig, B. W., D. C. Mitchell, S. König, S. Grzesiek, B. J. Litman, & A. Bax (2000). Measurement of dipolar couplings in a transducin peptide fragment weakly bound to oriented photo-activated rhodopsin. *J Biomol NMR* 16(2), 121–125.
- Koenig, B. W., M. Rogowski, & J. M. Louis (2003). A rapid method to attain isotope labeled small soluble peptides for NMR studies. *J Biomol NMR* 26(3), 193–202.
- Kohn, T., H. Kusunoki, K. Sato, & K. Wakamatsu (1998). A new general method for the biosynthesis of stable isotope-enriched peptides using a decahistidine-tagged ubiquitin fusion system: an application to the production of mastoparan-X uniformly enriched with ^{15}N and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$. *J Biomol NMR* 12(1), 109–121.
- Koradi, R., M. Billeter, & K. Wüthrich (1996). MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph* 14(1), 51–5, 29–32.
- Kozmik, Z. (2008). The role of Pax genes in eye evolution. *Brain Res Bull* 75, 335–339.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambright, D. G., J. Sondek, A. Böhm, N. P. Skiba, H. E. Hamm, & P. B. Sigler (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311–319.
- Leitz, A. J., T. H. Bayburt, A. N. Barnakov, B. A. Springer, & S. G. Sligar (2006). Functional reconstitution of β_2 -adrenergic receptors utilizing self-assembling Nanodisc technology. *Biotechniques* 40(5), 601–2, 604, 606, passim.
- LeMaster, D. M. (1994). Isotope labeling in solution protein assignment and structural analysis. *Prog NMR Spectroscopy* 26, 371–419.
- Li, Y., A. Z. Kijac, S. G. Sligar, & C. M. Rienstra (2006). Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* 91(10), 3819–3828.
- Lottspeich, F. & H. Zorbas (1998). *Bioanalytik* (1 ed.). Spektrum Akad. Verl. Heidelberg Berlin.
- Lovell, S. C., I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, & D. C. Richardson (2003). Structure validation by C α geometry: ϕ , ψ and C β deviation. *Proteins* 50(3), 437–450.
- McIntosh, L. P. & F. W. Dahlquist (1990). Biosynthetic incorporation of ^{15}N and ^{13}C for

- assignment and interpretation of nuclear magnetic resonance spectra of proteins. *Q Rev Biophys* 23(1), 1–38.
- Merril, C. R., M. L. Dunau, & D. Goldman (1981). A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 110(1), 201–207.
- Milano, S. K., H. C. Pace, Y.-M. Kim, C. Brenner, & J. L. Benovic (2002, Mar). Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis. *Biochemistry* 41(10), 3321–3328.
- Mirzadegan, T., G. Benkö, S. Filipek, & K. Palczewski (2003). Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin. *Biochemistry* 42(10), 2759–2767.
- Modzelewska, A., S. Filipek, K. Palczewski, & P. S.-H. Park (2006). Arrestin interaction with rhodopsin: conceptual models. *Cell Biochem Biophys* 46(1), 1–15.
- Montelione, G. T. & G. Wagner (1990). Triple resonance experiments for establishing conformation-independent sequential NMR assignments in isotope-enriched polypeptides. *J Magn Reson* 87, 183–188.
- Murakami, M. & T. Kouyama (2008). Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* 453, 363–367.
- Müller, F. & U. B. Kaupp (1998). Signal transduction in photoreceptor cells. *Naturwissenschaften* 85(2), 49–61.
- Nair, K. S., S. M. Hanson, A. Mendez, E. V. Gurevich, M. J. Kennedy, V. I. Shestopalov, S. A. Vishnivetskiy, J. Chen, J. B. Hurley, V. V. Gurevich, & V. Z. Slepak (2005). Light-dependent redistribution of arrestin in vertebrate rods is an energy-independent process governed by protein-protein interactions. *Neuron* 46(4), 555–567.
- Nakamichi, H. & T. Okada (2006). Local peptide movement in the photoreaction intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(34), 12729–12734.
- Nakanishi, T., M. Miyazawa, M. Sakakura, H. Terasawa, H. Takahashi, & I. Shimada (2002). Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation measurements. *J Mol Biol* 318(2), 245–249.
- Neuhaus, D. & M. P. Williamson (2000). *The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis*. Wiley-VCH.

- Nilges, M. (1995, Feb). Calculation of protein structures with ambiguous distance restraints. Automated assignment of ambiguous NOE crosspeaks and disulphide connectivities. *J Mol Biol* 245(5), 645–660.
- Okada, T., M. Sugihara, A.-N. Bondar, M. Elstner, P. Entel, & V. Buss (2004, Sep). The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol* 342(2), 571–583.
- Onrust, R., P. Herzmark, P. Chi, P. D. Garcia, O. Lichtarge, C. Kingsley, & H. R. Bourne (1997). Receptor and betagamma binding sites in the alpha subunit of the retinal G protein transducin. *Science* 275, 381–384.
- Palczewski, K. (2006). G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 75, 743–767.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. L. Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, & M. Miyano (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739–745.
- Papermaster, D. S. (1982). Preparation of retinal rod outer segments. *Methods Enzymol* 81, 48–52.
- Park, J. H., P. Scheerer, K. P. Hofmann, H.-W. Choe, & O. P. Ernst (2008). Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183–187.
- Parkes, J. H. & P. A. Liebman (1984, Oct). Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions. *Biochemistry* 23(21), 5054–5061.
- Periole, X., M. A. Ceruso, & E. L. Mehler (2004). Acid-base equilibria in rhodopsin: dependence of the protonation state of glu134 on its environment. *Biochemistry* 43(22), 6858–6864.
- Pervushin, K., R. Riek, G. Wider, & K. Wüthrich (1997). Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23), 12366–12371.
- Piotto, M., V. Saudek, & V. Sklenár (1992). Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2(6), 661–665.

- Provencher, S. W. & J. Glöckner (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20(1), 33–37.
- Pulvermüller, A., D. Maretzki, M. Rudnicka-Nawrot, W. C. Smith, K. Palczewski, & K. P. Hofmann (1997). Functional differences in the interaction of arrestin and its splice variant, p44, with rhodopsin. *Biochemistry* 36(30), 9253–9260.
- Pulvermüller, A., K. Schroder, T. Fischer, & K. P. Hofmann (2000). Interactions of metarhodopsin II. Arrestin peptides compete with arrestin and transducin. *J Biol Chem* 275(48), 37679–37685.
- Purcell, E., H. Torrey, & R. Pound (1946). Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid. *Phys Rev* 69, 37–38.
- Rehm, H. (2006). *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics* (5 ed.). Spektrum Akad. Verl. Heidelberg Berlin.
- Riek, R., G. Wider, K. Pervushin, & K. Wüthrich (1999). Polarization transfer by cross-correlated relaxation in solution NMR with very large molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9), 4918–4923.
- Ritter, E., K. Zimmermann, M. Heck, K. P. Hofmann, & F. J. Bartl (2004, Nov). Transition of rhodopsin into the active metarhodopsin II state opens a new light-induced pathway linked to Schiff base isomerization. *J Biol Chem* 279(46), 48102–48111.
- Salom, D., D. T. Lodowski, R. E. Stenkamp, I. L. Trong, M. Golczak, B. Jastrzebska, T. Harris, J. A. Ballesteros, & K. Palczewski (2006). Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(44), 16123–16128.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning* (2 ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scheerer, P., J. H. Park, P. W. Hildebrand, Y. J. Kim, N. Krauss, H.-W. Choe, K. P. Hofmann, & O. P. Ernst (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature* 455, 497–502.
- Schleicher, A., H. Kühn, & K. P. Hofmann (1989). Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II. *Biochemistry* 28(4), 1770–1775.

- Schmidt, R. F., G. Thews, & F. Lang (2000). *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Schwieters, C. D., J. J. Kuszewski, N. Tjandra, & G. M. Clore (2003). The Xplor-NIH NMR molecular structure determination package. *J Magn Reson* 160(1), 65–73.
- Shaka, A. J. & J. Keeler (1987). Broadband spin decoupling in isotropic lipids. *Prog NMR Spectroscopy* 19, 49–192.
- Shaka, A. J., C. J. Lee, & A. Pines (1988). Iterative schemes for bilinear operators: application to spin couplings. *J Magn Reson* 77, 274–293.
- Shih, A. Y., S. G. Sligar, & K. Schulten (2008). Molecular models need to be tested: the case of a solar flares discoidal HDL model. *Biophys J* 94(12), L87–L89.
- Skegro, D., A. Pulvermüller, B. Krafft, J. Granzin, K. P. Hofmann, G. Büldt, & R. Schlesinger (2007). N-terminal and C-terminal domains of arrestin both contribute in binding to rhodopsin. *Photochem Photobiol* 83(2), 385–392.
- Smith, H. G. & B. J. Litman (1982). Preparation of osmotically intact rod outer segment disks by Ficoll flotation. *Methods Enzymol* 81, 57–61.
- Smith, H. G., G. W. Stubbs, & B. J. Litman (1975). The isolation and purification of osmotically intact discs from retinal rod outer segments. *Exp Eye Res* 20(3), 211–217.
- Sommer, M. E., D. L. Farrens, J. H. McDowell, L. A. Weber, & W. C. Smith (2007). Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: loop movement is involved in arrestin activation and receptor binding. *J Biol Chem* 282(35), 25560–25568.
- Sommer, M. E., W. C. Smith, & D. L. Farrens (2005). Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: arrestin and retinal release are directly linked events. *J Biol Chem* 280(8), 6861–6871.
- Sreerama, N. & R. W. Woody (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* 209(1), 32–44.
- Sreerama, N. & R. W. Woody (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* 287(2), 252–260.
- Stangler, T., R. Hartmann, D. Willbold, & B. W. Koenig (2006). Modern High Resolution NMR for Study of Structure, Dynamics and Interactions of Biological Macromolecules. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 220, 567–613.

- States, D. J., R. A. Haberkorn, & D. J. Ruben (1982). A two-dimensional Nuclear Overhauser Experiment with pure absorption phase in four quadrants. *J Magn Reson* 48, 286–292.
- Sutton, R. B., S. A. Vishnivetskiy, J. Robert, S. M. Hanson, D. Raman, B. E. Knox, M. Kono, J. Navarro, & V. V. Gurevich (2005, Dec). Crystal structure of cone arrestin at 2.3 Å: evolution of receptor specificity. *J Mol Biol* 354(5), 1069–1080.
- Takahashi, H., T. Nakanishi, K. Kami, Y. Arata, & I. Shimada (2000). A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes. *Nat Struct Biol* 7(3), 220–223.
- Tjandra, N. & A. Bax (1997). Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium. *Science* 278(5340), 1111–1114.
- Tolman, J. R., J. M. Flanagan, M. A. Kennedy, & J. H. Prestegard (1995). Nuclear magnetic dipole interactions in field-oriented proteins: information for structure determination in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20), 9279–9283.
- Tribet, C., R. Audebert, & J. L. Popot (1996). Amphipols: polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(26), 15047–15050.
- Vishnivetskiy, S. A., M. M. Hosey, J. L. Benovic, & V. V. Gurevich (2004). Mapping the arrestin-receptor interface. Structural elements responsible for receptor specificity of arrestin proteins. *J Biol Chem* 279(2), 1262–1268.
- Vishnivetskiy, S. A., C. L. Paz, C. Schubert, J. A. Hirsch, P. B. Sigler, & V. V. Gurevich (1999). How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *J Biol Chem* 274(17), 11451–11454.
- Vishnivetskiy, S. A., C. Schubert, G. C. Climaco, Y. V. Gurevich, M. G. Velez, & V. V. Gurevich (2000). An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *J Biol Chem* 275(52), 41049–41057.
- Wagner, G. & K. Wüthrich (1982). Sequential resonance assignments in protein ¹H nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol* 155(3), 347–366.
- Warne, T., M. J. Serrano-Vega, J. G. Baker, R. Moukhametzianov, P. C. Edwards, R. Henderson, A. G. W. Leslie, C. G. Tate, & G. F. X. Schertler (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486–491.

- Williams, R. W., A. Chang, D. Juretić, & S. Loughran (1987). Secondary structure predictions and medium range interactions. *Biochim Biophys Acta* 916(2), 200–204.
- Wittlich, M., K. Wiesehan, B. W. Koenig, & D. Willbold (2007). Expression, purification, and membrane reconstitution of a CD4 fragment comprising the transmembrane and cytoplasmic domains of the receptor. *Protein Expr Purif* 55(1), 198–207.
- Wüthrich, K. (1998). The second decade - into the third millenium. *Nat Struct Biol* 5.
- Yan, E. C. Y., M. A. Kazmi, Z. Ganim, J.-M. Hou, D. Pan, B. S. W. Chang, T. P. Sakmar, & R. A. Mathies (2003). Retinal counterion switch in the photoactivation of the G protein-coupled receptor rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16), 9262–9267.
- Zimmermann, K., E. Ritter, F. J. Bartl, K. P. Hofmann, & M. Heck (2004). Interaction with transducin depletes metarhodopsin III: a regulated retinal storage in visual signal transduction? *J Biol Chem* 279(46), 48112–48119.
- Zoonens, M., L. J. Catoire, F. Giusti, & J.-L. Popot (2005). NMR study of a membrane protein in detergent-free aqueous solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(25), 8893–8898.
- Zoonens, M., F. Giusti, F. Zito, & J.-L. Popot (2007). Dynamics of membrane protein/amphipol association studied by Förster resonance energy transfer: implications for in vitro studies of amphipol-stabilized membrane proteins. *Biochemistry* 46(36), 10392–10404.

Danksagung

Herrn PD Dr. Bernd König möchte ich für die interessante Themenvergabe, für seine zahlreichen Ideen, seine Hilfsbereitschaft, vor allem aber für seine gewissenhafte Betreuung danken. Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die Aufnahme in seinem Labor, ganz besonders jedoch für seine stets optimistische Haltung, seine außergewöhnliche Unterstützung in finanzieller und fachlicher Hinsicht, sowie für seine strategischen Ratschläge.

Prof. Dr. Georg Büldt danke ich für die Bereitstellung seiner Laborkapazitäten und für die Möglichkeit, einen Einblick in die kubanische Forschung vor Ort zu erhalten.

Herrn PD Dr. Joachim Granzin gilt mein Dank für seine Hilfsbereitschaft, seine spannenden Ideen und wichtigen Diskussionsbeiträge zu dieser Arbeit. Auch Dr. Darko Škegro möchte ich an dieser Stelle für die sehr nette Zusammenarbeit danken.

Dr. Peter Henklein vom Institut für Biochemie sowie Dr. Alexander Pulvermüller, Dr. Martin Heck und PD Dr. Oliver Ernst vom Institut für Medizinische Physik und Biophysik der Charité Berlin danke ich für die bereichernde Kooperation, insbesondere jedoch Frau Ingrid Semjonow für die guten Ratschläge zur Diskmembranpräparation.

Herrn Rudolf Esser, Frau Doris Höppner-Heitmann und Frau Nadine Jordan vom INB-1 am Forschungszentrum Jülich danke ich für die freundliche Koordination und Hilfsbereitschaft bei der Beschaffung der Rinderaugen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Rudolf Hartmann für seine geduldige Einführung in die NMR-Spektroskopie, für seine Besonnenheit und Hilfe, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ebenfalls ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Matthias Stoldt für seine vielen Ratschläge und Beiträge bedanken, vor allem aber für seine aufbauenden Worte und seine stille Unterstützung in manch endlos erscheinenden Situationen. Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. Thomas Stangler für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Fragen, insbesondere für die Einführung in das Linux-Betriebssystem und den Start in die Xplor-Strukturrechnung, vor allem aber für sein begeistertes Interesse auch nach seinem Weggang. Frau Dr. Katja Wiesehan danke ich für die außerordentlich gute Stimmung im Chaos-Büro 2010, ihre Hilfe beim Einstieg in molekularbiologi-

sche Methoden und ganz besonders für ihre aufbauende Unterstützung auch nach ihrer Jülicher Zeit. Auch Frau Dr. Silke Hofmann, Frau Esther Jonas und Herrn Peixiang Ma danke ich u. a. für die stets angenehme Atmosphäre im Büro.

Frau Lisa Fransson danke ich für die zahlreichen Mitfahrgelegenheiten nach Düsseldorf, die mit vielen wichtigen und spannenden Gesprächsthemen verbunden waren. Herrn Sven Schünke danke ich für seine stetige Bereitschaft, mir bei so manchen Software-Problemen zu helfen und Frau Melanie Schwarten für ihre Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Frau Pallavi Thiagarajan danke ich für das zur Verfügung gestellte ^{15}N -CD4mut.

Für die nötige Abwechslung in Jülich-City und Umgebung möchte ich allen im Institut danken. Ein großes Dankeschön für diskussionsreiche Abende im *Liebevoll*, ereignisreiche Parties und schöne Ausflüge geht jedoch besonders an die kulinarische Prominenz Dirk, Katja, Stoldti, Melanie und Victor sowie an Lisa, Thomas, Sven, Julian, Pallavi, Aileen, Henrike & Imke. Meinen Freunden und meiner Familie, ganz besonders Annette Feuerstein danke ich für deren Interesse, deren Unterstützung und Ablenkung. Vor allem aber meinem Opa Herbert Feuerstein für seinen ungebändigten Willen, den Abschluss dieser Arbeit erleben zu dürfen.

Herrn Philipp Neumann danke ich von ganzem Herzen für seinen Humor, seine stets optimistische Unterstützung und seine wichtigen Ratschläge, Situationen aus der richtigen Perspektive zu betrachten.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und Zitate kenntlich gemacht habe.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Jülich, den

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GABARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**
by S. Vossel (2008), XIV, 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-539-5

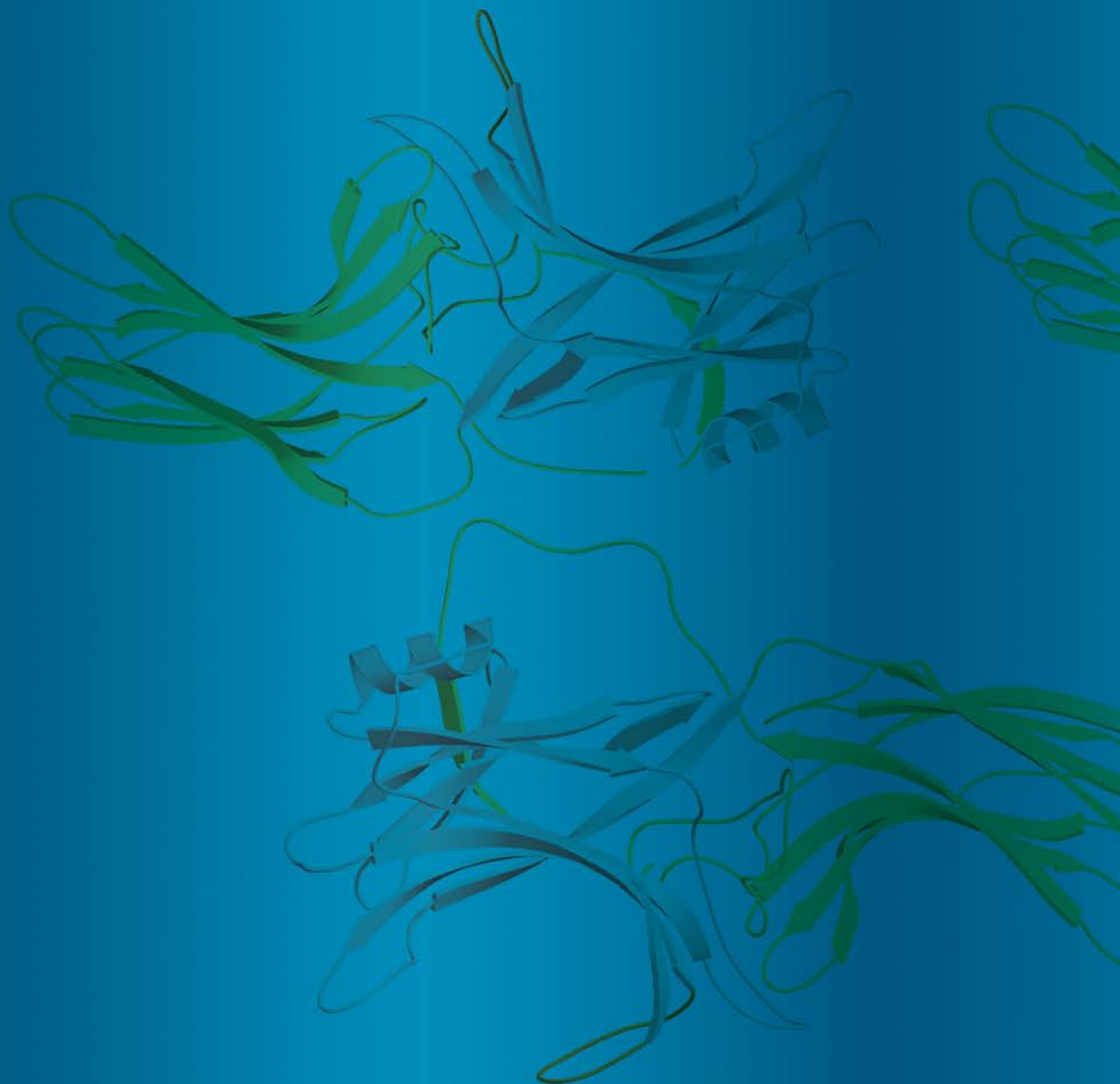
10. **Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9

11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-561-6

12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-563-0

13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**
by T. Felder (2009), 97 pages
ISBN: 978-3-89336-566-1

14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷ - Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-571-5



Band | Volume 14
ISBN 978-3-89336-571-5