

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 Expressionsvektor	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 (Nanodisks)	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 Verlaufs	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-Peptiden	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 ¹ H-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