

**Technische Universität München**

**Max-Planck-Institut für Biochemie**

Abteilung für Strukturforschung  
Biologische NMR-Spektroskopie

**Strukturelle Charakterisierung des Calpastatin  
und Untersuchung eines ATP-abhängigen  
Peptidtransports in *S. cerevisiae***

**Anja Jestel**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades  
eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr.h.c. R. Huber

2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 21.05.2002 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 03.09.2002 angenommen.

***Meinen Eltern***

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>A. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>B. EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
<b>1 Calpaine und Calpastatin .....</b>	<b>7</b>
1.1 Calpaine .....	7
1.2 Calpastatin, der endogene Inhibitor der Calpaine .....	10
1.3 NMR-Spektroskopie .....	12
<b>2 Das Endoplasmatische Retikulum und Transportprozesse.....</b>	<b>17</b>
2.1 Das Endoplasmatische Retikulum.....	17
2.2 Peptidtransport .....	24
<b>C. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
<b>1 Material .....</b>	<b>27</b>
1.1 Bakterienstämme und Medien.....	27
1.2 Hefestämme und Medien .....	28
1.3 Geräte .....	29
1.4 Enzyme .....	30
1.5 Antikörper .....	31
1.6 Größenstandards.....	31
<b>1.7 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>32</b>
<b>2 Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.1 Molekularbiologische Methoden .....	34
2.2 Immunologische Methoden .....	41
2.3 Zellbiologische Methoden.....	43
2.5 Proteinchemische Methoden .....	46
2.5.4 Peptidtransport in Hefe-Mikrosomen .....	48
2.6 Methoden des bakteriellen Expressionssystems.....	53
2.7 Reinigung von Proteinen .....	54

---

**D. STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG DES CALPASTATIN .... 57**

<b>1 Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>
1.1 Zielsetzung .....	57
1.2 Vollängen-Calpastatin.....	57
1.3 Inhibitorische Domäne 1 .....	65
<b>2 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
2.1 Etablierung eines bakteriellen Expressionsystems.....	75
2.2 Besondere physikochemische Eigenschaften des Calpastatin.....	80
2.3 Calpastatin ist unter physiologischen Bedingungen ungefaltet.....	84
2.3.3 Aktivität und Übergang in einen geordneten Zustand.....	87
2.3.4 Biologische Vorteile eines natürlich ungeordneten Proteins.....	89
2.4 Ausblick .....	90

**E. UNTERSUCHUNG EINES ATP-ABHÄNGIGEN****PEPTIDTRANSPORTS IN *S. CEREVISIAE*..... 91**

<b>1 Ergebnisse.....</b>	<b>91</b>
1.1 Hintergrund und Zielsetzung .....	91
1.2 Lokalisierung des ATP-abhängigen Peptidtransports.....	93
1.3 Charakterisierung des Peptidtransports .....	99
1.4 Lokalisierung von Mdl1p und Mdl2p .....	107
<b>2 Diskussion.....</b>	<b>111</b>
2.1 Charakterisierung des ATP-abhängigen Peptidtransports in Hefe	111
2.2 Mdl1p und Mdl2p sind in den Mitochondrien lokalisiert .....	117
2.3 Ausblick .....	119

---

<b>F. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>120</b>
<b>G. ANHANG .....</b>	<b>131</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>131</b>
<b>Oligonukleotide.....</b>	<b>132</b>
<b>Peptidsequenzen .....</b>	<b>132</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>133</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>134</b>

## A. Zusammenfassung

Im ersten Teilprojekt der vorliegenden Dissertation wurde das Calpastatin, der endogene Inhibitor der ubiquitären Calpaine, mittels NMR-Spektroskopie strukturell charakterisiert. Die Calpaine bilden eine Familie von Kalzium abhängigen Cysteinproteasen, die als Heterodimere aus einer katalytischen Untereinheit von 80 kDa und einer 30 kDa großen regulierenden Untereinheit vorliegen.

Das Calpastatin besitzt eine N-terminale Domäne mit bislang unbekannter Funktion und vier inhibitorisch aktive Domänen. Um Calpastatin der strukturellen Untersuchung zugänglich zu machen, wurde ein bakterielles Expressionssystem mit Reinigung etabliert. Sowohl das rekombinante Gesamtprotein als auch isolierte inhibitorische Domänen zeigten volle Aktivität gegenüber Calpain. Darüber hinaus wiesen sie ungewöhnliche physikochemische Eigenschaften auf: ein retardiertes Laufverhalten in PAA-Gelen, eine extreme Anfälligkeit gegenüber Proteasen und eine hohe Stabilität in Gegenwart denaturierender Einflüsse. Die NMR-spektroskopische Untersuchung der ersten inhibitorischen Domäne zeigte, dass das Protein in Lösung keine definierte Struktur besaß. Aufgrund der experimentellen Daten und einer eingehenden Analyse der Primärstruktur des Calpastatins, die eine hohe Nettoladung und eine geringe Hydrophobizität ergab, konnte der Inhibitor in die wachsende Familie der unter physiologischen Bedingungen ungefalteten Proteine eingeordnet werden.

Im zweiten Teilprojekt wurde ein Peptidtransport in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht, der während der heterologen Überexpression eines humanen Peptidtransporters (TAP) entdeckt worden war. Dieser Transportprozess ist strikt ATP-abhängig und weist im Gegensatz zu TAP keine ATP-unabhängige Peptidbindung auf. Durch subzelluläre Fraktionierungen konnte eine Lokalisierung der Transportaktivität für Peptide im Endoplasmatischen Retikulum der Hefe erfolgen. Die Volumenabhängigkeit des Transports an mikrosomalen Vesikeln und der Einsatz semi-intakter Hefezellen bewiesen, dass es sich bei der beobachteten Aktivität um einen Import von Peptiden handelte. Weiterhin wurde eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Peptidtransports von der Reaktionstemperatur und der Peptidkonzentration nachgewiesen.

Die TAP-Homologen „halben“ ABC („ATP-binding cassette“)-Transporter Mdl1p und Mdl2p der Bäckerhefe konnten durch Peptidantikörper in mitochondrialen Membranen detektiert und von einer Beteiligung an dem ATP-abhängigen Peptidimport ausgeschlossen werden.

## B. Einleitung

### 1 Calpaine und Calpastatin

#### 1.1 Calpaine

Die Calpaine (EC 3.4.22.17) zählen zur Familie der Kalzium abhängigen Cysteineproteasen, die sich bei Säugern in zwei Hauptklassen einteilen lassen: gewebespezifische (n-Calpaine) und ubiquitär vorkommende Calpaine (m- und  $\mu$ -Calpain). Zudem wurden in niederen Organismen wie Insekten, Pilzen, Hefen und Nematoden atypische Calpaine identifiziert (Sorimachi *et al.*, 1997).

##### 1.1.1 Die ubiquitären Calpaine

Die ubiquitären Formen  $\mu$ - und m-Calpain unterscheiden sich durch die zur Aktivierung *in vitro* benötigte Kalziumkonzentration:  $\mu$ -Calpain benötigt mikromolare (5 - 50  $\mu$ M), m-Calpain millimolare (200 - 1000  $\mu$ M)  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen für halbmaximale Aktivität (Suzuki & Sorimachi, 1998). Trotzdem sind beide Formen unter physiologischen Kalziumkonzentrationen von 100 bis 300 nM aktiv. Neben der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  werden weitere Faktoren zur Modulation der Calpainaktivität *in vivo* kontrovers diskutiert: die Existenz eines Aktivator-Proteins (Michetti *et al.*, 1991; Salamino *et al.*, 1993; Melloni *et al.*, 1998b; Melloni *et al.*, 1998c), die Assoziation mit Phospholipiden (Saido *et al.*, 1994; Melloni *et al.*, 1996; Arthur & Crawford, 1996; Tompa *et al.*, 2001), die Autoproteolyse im N-terminalen Bereich beider Untereinheiten (Suzuki & Sorimachi, 1998; Baki *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 1997; Elce *et al.*, 1997), die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Bootman *et al.*, 2001) und der endogene Inhibitor Calpastatin (Tullio *et al.*, 1999; Barnoy *et al.*, 1999).

##### 1.1.2 Die Struktur der Calpaine

Die klassischen Calpaine sind Heterodimere aus einer 80 kDa umfassenden großen Untereinheit (L, 80K) und einer kleinen Untereinheit, die ein Molekulargewicht von 30 kDa besitzt (S, 30K). Die große, katalytisch aktive Untereinheit lässt sich anhand der Aminosäuresequenz in vier Domänen (I bis IV) unterteilen, während sich die kleine, regulierende Untereinheit in zwei Domänen (V und VI) gliedert (Caraofoli & Molinari, 1998; Sorimachi & Suzuki, 2001). Diese Domänen-Organisation wurde durch die Röntgenstrukturanalyse (Hosfield *et al.*, 1999; Strobl *et al.*, 2000) von

nicht aktiviertem m-Calpain prinzipiell bestätigt und durch einige Details ergänzt. Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die Domänenstruktur von m-Calpain.

Die Gesamtstruktur des Calpains ähnelt einer ovalen Scheibe, deren Pole von der katalytischen Domäne II und den Calmodulin ähnlichen Domänen gebildet werden (Strobl *et al.*, 2000).

Domäne	Untereinheit	Faltungsmotiv	Funktion
I		$\alpha$ -Helix	Aktivierungspeptid
II	katalytische Untereinheit	Papain-ähnlich (IIa + IIb)	Katalytische Triade Substratbindungstasche
III		$\beta$ -Faltblatt	Kontakte zu allen Domänen Kalzium Bindung
IV		5 EF-Hand Motive	Kalzium Bindung
V	katalytische	-	?
VI	Untereinheit	5 EF-Hand Motive	Kalzium Bindung

Abbildung 1. **Domänenstruktur von humanem m-Calpain**

Die ubiquitären Calpaine sind Heterodimere aus einer katalytisch aktiven 80 kDa und einer regulierenden 30 kDa Untereinheit. Die große Untereinheit besteht aus 5 Domänen (I bis V), von denen DII, die aus zwei Subdomänen (IIa und IIb) aufgebaut ist, die Aminosäuren der katalytischen Triade enthält. Die regulierende Untereinheit besteht aus zwei Domänen (V und VI). Domäne V ist weitgehend uncharakterisiert. Die Domänen IV und VI ähneln Calmodulin und umfassen jeweils fünf EF-Hand Motive.

Die erste Domäne von Calpain besteht aus einer einzelnen  $\alpha$ -Helix, die im Inneren des Moleküls liegt und einen Kontakt zwischen den Domänen II und VI herstellt. Nach der Aktivierung des Proteins durch die Bindung von Kalzium wird diese Helix in einem autoproteolytischen Prozess entfernt, für den aufgrund der Distanz von 40 Å zum katalytischen Zentrum ein intramolekularer Mechanismus ausgeschlossen werden kann (Hosfield *et al.*, 1999). Die zweite Domäne ist die katalytisch aktive Domäne und zeigt eine Papain-ähnliche Faltung. Sie gliedert sich in zwei Subdomänen (IIa und IIb), die die Reste der katalytischen Triade enthalten: Cys105 in Subdomäne IIa und His262 und Asn286 in Subdomäne IIb. Die Subdomäne IIa zeigt eine neue Faltung, die sich strukturell signifikant von der entsprechenden Region des Papains unterscheidet, während Subdomäne IIb, ähnlich wie das Papain, eine Fass-ähnliche antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur besitzt. Im Kalzium freien Zustand sind beide Subdomänen gegeneinander verdreht, so dass zwischen



Cys205 und den Resten His262 und Asn286 ein Abstand von 10 Å besteht und die Substratbindungstasche in einer offenen Konformation vorliegt.

Die dritte Domäne des Calpains setzt sich aus zwei gegenüberliegenden viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammen. Sie besitzt eine besondere Stellung in der Gesamtstruktur der Protease, da sie Kontakte zu allen anderen Domänen ausbildet. Die Calmodulin ähnlichen Domänen IV und VI weisen jeweils fünf EF-Hand Motive auf, von denen vier Kalzium binden können (Blanchard *et al.*, 1997; Lin, 1997), und sind durch ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt zu einem Heterodimer verbunden.

Zur Aktivierung des Calpain ist eine Konformationsänderung in der katalytischen Domäne II notwendig, die durch die Bindung von Kalzium induziert wird. Eine konformationelle Änderungen durch die Bindung von Kalzium an die Calmodulin-ähnlichen Domänen kann über die Domäne III vermittelt werden, die zu allen anderen Domänen Kontakte ausbildet. Die Bindung von Kalzium ist dabei vermutlich nicht ausschließlich über die Calmodulin ähnlichen Domänen IV und VI möglich (Blanchard *et al.*, 1997), sondern auch über einen exponierten, stark negativ geladenen Bereich in der dritten Domäne (Strobl *et al.*, 2000). Auch die Untersuchungen von Moldoveanu *et al.* (2002) an einer inaktiven Mutante der katalytischen Domäne von  $\mu$ -Calpain legen nahe, dass die Bindung von Kalziumionen außerhalb der Calmodulin ähnlichen Domänen eine Rolle bei der Aktivierung von Calpain spielt. Diese Untersuchungen ergaben, dass die katalytischen Subdomänen IIa und IIb jeweils ein Kalziumion binden.

### 1.1.3 Physiologische Funktionen

Bislang konnte die exakte physiologische Rolle der Calpaine nicht geklärt werden. Allerdings wurde eine Beteiligung der Proteasen an verschiedenen zellulären Prozessen nachgewiesen (Suzuki *et al.*, 1995; Carafoli & Molinari, 1998). Eine Reihe von Calpain-Substraten sind Proteine des Zellskeletts, wie z.B. Spectrin, Talin, Paxillin, Integrine und Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAP), die den Calpainen eine Rolle bei der Morphologie und Mobilität von Zellen zuordnen (Glading *et al.*, 2002). Calpaine beeinflussen die Regulation des Zellzyklus durch die limitierte Proteolyse von Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Jun, c-Fos (Hirai *et al.*, 1997), Cyclin D1 (Choi *et al.*, 1997) und dem Tumorsuppressorprotein p53 (Pariat *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Kubbutat & Vousden, 1997). Darüber hinaus sind die Calpaine neben den Caspasen an der Vermittlung der Apoptose beteiligt (Wang, 2000; Squier *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 2000).

Die von Calpainen ausgeübte limitierte Proteolyse von Substraten spricht für ihre regulierende Funktion. Viele der bislang bekannten Substrate wurden durch *in vitro* Studien identifiziert. Die Verifizierung unter *in vivo* Bedingungen ist jedoch problematisch, da hochspezifische Inhibitoren oft nicht membranpermeabel sind und viele permeable Inhibitoren keine exklusive Spezifität für Calpaine aufweisen (Wang & Yuen, 1994).

Eine aberrante Funktion der Calpaine kann zu schwerwiegenden pathologischen Störungen führen (Huang & Wang, 2001). Die ubiquitären Calpaine zeigen nach traumatischen Hirnschädigungen oder mangelnder Sauerstoffversorgung des Gehirns nach einem Schlaganfall oder Herzstillstand eine erhöhte Aktivität (Wang & Yuen, 1994) in Neuronen. Dies führt zu einer unkontrollierten Degradation neuronaler Zytoskelett-Proteine und Enzyme und letztendlich zum Absterben von Nervenzellen. Auch im Rahmen der Alzheimer Krankheit wird eine vermehrte Aktivität von Calpainen diskutiert, die durch Aktivierung einer Kinase zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins führt (Kusakawa *et al.*, 2000).

Die Inaktivierung des Muskel-spezifischen Calpains p94 durch Mutationen ist die Ursache von LGMD2A, einer spezifischen Form der Muskeldystrophie („limb-girdle muscular dystrophy 2A“; Richard *et al.*, 1995). Weitere pathologische Rollen werden Calpainen bei der Entstehung von Katarakten, Diabetes mellitus Typ 2 und Magenkrebs zugeschrieben.

## 1.2 Calpastatin, der endogene Inhibitor der Calpaine

Calpastatin ist ein ubiquitär exprimierter, reversibler Inhibitor der Calpaine (Emori *et al.*, 1987). Er zeichnet sich durch seine hohe Spezifität aus, da er keine anderen Cysteinproteasen wie z.B. Papain oder Cathepsin B inhibiert, und ist der zentrale Regulator der Calpainaktivität (Kawasaki & Kawashima, 1996; Nixon *et al.*, 1994; Goll *et al.*, 1992; Ménard *et al.*, 1996).

Das Calpastatin besteht aus einer N-terminalen Domäne L, deren Funktion bislang ungeklärt ist, und vier repetitiven inhibitorisch aktiven Domänen (1 bis 4) (Abbildung 2). In Erythrozyten existiert eine spezielle Form des Inhibitors, der die N-terminale und die erste inhibitorische Domäne fehlt.

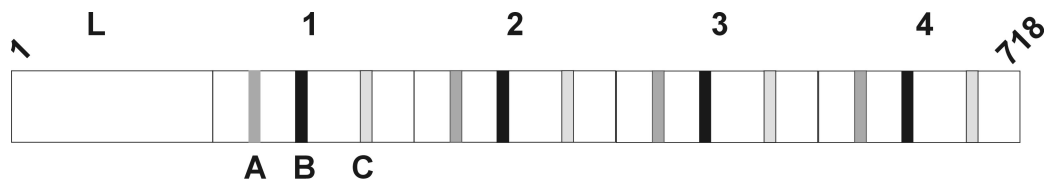


Abbildung 2: **Domänenstruktur des Calpastatins aus Kaninchen**

Der Inhibitor besteht aus einer N-terminalen Domäne L und vier repetitiven Domänen (1 – 4) mit inhibitorischer Aktivität. Jede dieser Domänen weist die drei hoch konservierten Subdomänen A, B und C auf. Das Calpastatin aus Kaninchen besteht aus 718 Aminosäuren.

Alle repetitiven Domänen können als funktionelle Einheit die ubiquitären Calpaine inhibieren (Maki *et al.*, 1987b), jedoch weist die erste Domäne die größte inhibitorische Aktivität auf (Kawasaki *et al.*, 1989). Die Bindung von Calpastatin an Calpain und seine inhibitorische Funktion sind strikt Kalzium abhängig. Eine inhibitorische Domäne umfasst etwa 140 Aminosäuren und hat drei hochkonservierte Bereiche A, B und C. Die funktionelle Charakterisierung dieser Subdomänen ergab, dass die zentrale Region B essentiell für die inhibitorische Aktivität ist (Maki *et al.*, 1989; Takano *et al.*, 1995). Kawasaki und Kollegen (1989) identifizierten das Motiv LGXK(R)D(E)XTIPPXYRXLL als zentrale Konsensussequenz dieser Subdomäne. Abgesehen von Calpastatin selbst sind Peptide, die auf dieser Sequenz basieren, die potentesten Inhibitoren für Calpaine (Wang & Yuen, 1994). Die flankierenden, konservierten Subdomänen A und C verstärken die inhibitorische Aktivität von B durch eine Interaktion mit den Calmodulin ähnlichen Domänen IV und VI des Calpains (Ma *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1995).

Calpastatin wurde aus einer Reihe von tierischen Geweben isoliert (Takano *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1984) und es gelang die Expression von inhibitorischen Domänen in *E. coli* (Maki *et al.*, 1988; Konno *et al.*, 1997; Melloni *et al.*, 1998; Uemori *et al.*, 1990; Després *et al.*, 1995). Sowohl die nativen als auch die rekombinanten Proteine zeigen auffällige physikochemische Eigenschaften: ein atypisches Laufverhalten in PAA-Gelen, eine hohe Sensitivität gegenüber Proteasen und eine hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen.

Die Strukturen von inhibitorischen Domänen wurden mittels Zirkular Dichroismus, eindimensionaler NMR-Spektroskopie und SAXS („small angle X-ray scattering“) untersucht (Uemori *et al.*, 1990; Konno *et al.*, 1997). Sie zeigten in Lösung eine ausgedehnte, hoch flexible Konformation und wiesen keinerlei Sekundär- und Tertiärstrukturen auf.

### 1.3 NMR-Spektroskopie

Neben der Röntgenstrukturanalyse ist die kernmagnetische Resonanz („Nuclear Magnetic Resonance“, NMR) derzeit die leistungsfähigste Methode zur Strukturaufklärung von Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren auf atomarem Niveau. Im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse bietet die NMR den Vorteil, dass auch zeitabhängige Prozesse wie intramolekulare Dynamik, Reaktionskinetiken, Faltungsprozesse oder molekulare Erkennung verfolgt werden können.

#### 1.3.1 Physikalische Grundlagen

Die kernmagnetische Resonanz beruht auf der Wechselwirkung des magnetischen Momentes  $\mu$  eines Atomkerns mit einem angelegten äußeren Magnetfeld. Das magnetische Moment eines Kerns  $\mu$  ist dem gequantelten Eigendrehimpuls  $P$  proportional und ist definiert als:

$$\mu = \gamma \cdot P = \gamma \cdot \hbar \cdot \sqrt{I \cdot (I+1)}$$

dabei sind  $\gamma$  das gyromagnetische Verhältnis,  $\hbar$  das Plancksche Wirkungsquantum und  $I$  die Kernspinquantenzahl ( $I = 0, \frac{1}{2}, 1 \dots 6$ ). Das magnetische Moment aller Kerne mit einer Kernspin-Quantenzahl  $I = 0$  (z.B.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$ ) ist gleich Null, so dass diese Kerne in der NMR nicht sichtbar sind. Die für die strukturelle Charakterisierung von Biomolekülen wichtigen Kerne  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{31}\text{P}$  weisen eine Kernspin-Quantenzahl  $I = \frac{1}{2}$  auf.

In einem statischen, äußeren Magnetfeld  $\mathbf{B}_0$  orientiert sich der Eigendrehimpuls so, dass die Komponente in Feldrichtung (z-Richtung) ein ganz- oder halbzahliges Vielfaches des Planckschen Wirkungsquantums annimmt:  $P_z = m \cdot \hbar$ , wobei  $m$  die magnetische Quantenzahl ist ( $m = -I, -I+1, \dots, +I$ ). Damit beträgt die Komponente des magnetischen Moments in Feldrichtung:

$$\mu_z = m \cdot \gamma \cdot \hbar .$$

Durch das äußere Magnetfeld kommt es somit zu einer Aufspaltung der Energiezustände des Kerns, den sog. Kern-Zeeman-Niveaus. Die Energie  $E$  dieser Niveaus entspricht der Energie eines magnetischen Dipols in einem Magnetfeld der Flussdichte  $\mathbf{B}_0$ :

$$E = -\mu_z \cdot B_z = -m \cdot \gamma \cdot \hbar B_z.$$

Entsprechend der Orientierung der Spins zum Magnetfeld ergibt sich eine Aufspaltung in  $(2I+1)$  Energieniveaus, d.h. für die Kerne  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  mit  $I=1/2$  ergeben sich zwei Energieniveaus.

Wird eine Probe in ein Magnetfeld  $\mathbf{B}_0$  gebracht, so kommt es zu einer Polarisierung der Kernspins. Diese orientieren sich unabhängig voneinander parallel oder antiparallel zum Magnetfeld  $B_0$  und präzedieren mit der sog. Larmorfrequenz  $\nu_0$  um die Richtung des äußeren Magnetfeldes. Die Verteilung der Kerne auf die Energieniveaus ist dabei durch die Boltzmann-Verteilung gegeben. Der Energieunterschied zwischen beiden Niveaus liegt in der Größenordnung der mittleren Wärmebewegung, so dass die Niveaus ungefähr gleichbesetzt sind. Der Überschuss an Kernen im energieärmeren Niveau liegt lediglich im ppm-Bereich und erklärt die geringe Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie.

Summiert man die z-Komponenten der magnetischen Momente aller Kerne auf, so ergibt sich eine makroskopische Magnetisierung  $M_0$ , die aufgrund des höheren Besetzungszustandes des energieärmeren Niveaus parallel zum äußeren Magnetfeld orientiert ist. Die zeitliche Entwicklung dieser makroskopischen Magnetisierung wird im Spektrometer gemessen.

In der gepulsten Fourier-Transformations-Spektroskopie werden alle Kerne gleichzeitig durch einen Radiofrequenzpuls (im  $\mu\text{s}$ -Bereich) angeregt. Durch dieses Anlegen eines zweiten Magnetfeldes  $B_1$  mit der Larmor-Frequenz  $\nu_0$  senkrecht zu  $B_0$  kommt es in Folge der Resonanzabsorption der Kerne zu einem Übergang zwischen den Energieniveaus. Darüber hinaus präzedieren die magnetischen Momente unter Einwirkung von  $B_1$  nicht mehr statistisch verteilt um die z-Achse des Magnetfeldes. Ein Teil von ihnen präzediert in Phase um die z-Achse, was als sog. Phasenkohärenz bezeichnet wird. Die Folge der Einstrahlung eines  $B_1$ -Feldes ist somit die Erzeugung einer transversalen Magnetisierung mit x- und y-Komponenten. Für den Nachweis der Kernresonanzsignale ist eine maximale Quermagnetisierung in y-Richtung erwünscht, da die Empfängerspule in dieser Richtung angeordnet ist.  $M_y$  wird maximal, wenn ein sog.  $90^\circ$ -Anregungspuls erfolgt.

### 1.3.2 Relaxation

Nach dem Abschalten des Pulses kehrt das Spinsystem durch Relaxationsprozesse in das thermodynamische Gleichgewicht zurück, wodurch die transversale Magnetisierung mit der Zeit abnimmt. Man unterscheidet zwischen der longitudinalen Relaxationszeit  $T_1$  und der transversalen Relaxationszeit  $T_2$ .  $T_1$ , die sog. Spin-Gitter-Relaxationszeit, ist auf die Wechselwirkung zwischen dem Spin und seiner Umgebung (dem sog. Gitter) zurückzuführen. Das lokale Magnetfeld eines Kernes ändert sich zeitlich, z.B. durch die Rotation des Moleküls, das den betrachteten Kern enthält, sowie der benachbarten Moleküle. Die fluktuierenden lokalen Magnetfelder führen zu einem Übergang von Spins aus dem energie-reicheren  $\beta$ - in den  $\alpha$ -Zustand.  $T_1$  beschreibt damit die Rate, mit der die makroskopische Magnetisierung in das thermodynamische Gleichgewicht zurückkehrt.

Die Spin-Spin-Relaxationszeit  $T_2$  beschreibt die Rate, mit der die transversale Magnetisierung  $M_y$  nach dem Anregungspuls abnimmt. Nach einem  $90^\circ$ -Puls präzedieren die Spins mit einer Phasenkohärenz. Diese wird nach Abklingen des Pulses dadurch aufgehoben, dass die Kerne aufgrund von Molekülbewegungen (z.B. Rotation) unterschiedliche lokale Magnetfelder erfahren. Die Kerne verlieren ihre Phasenbeziehung, wodurch sich  $M_y$  verringert.

In der NMR-Spektroskopie ist die durch  $T_2$  abnehmende Spannung, die von  $M_y$  in einer Empfängerspule induziert wird, die eigentliche Messgröße. Sie wird als freier Induktionszerfall („free induction decay“, FID) bezeichnet. Durch eine mathematische Operation, die sog. Fourier Transformation (FT), die den FID in die Frequenzdomäne überführt, wird schließlich das NMR-Spektrum erhalten.

### 1.3.3 Eindimensionale NMR-Spektroskopie

In einem äußeren Magnetfeld induzieren die den Kern umgebenden Elektronen ein Magnetfeld, das dem angelegten Magnetfeld entgegengesetzt orientiert ist und somit zu einer Abschwächung von  $B_0$  am Ort des Korns führt; der Kern ist abgeschirmt. Die Abschirmung eines Korns hängt von der Elektronendichte am Ort des Korns ab, und wird von den elektronegativen, induktiven und mesomeren Eigenschaften benachbarter Atome und Atomgruppen bestimmt. Chemisch nicht äquivalente Kerne erfahren eine unterschiedliche Abschirmung und zeigen unterschiedliche Resonanzfrequenzen. Dieser als chemische Verschiebung ( $\delta$ ) bezeichnete Effekt ist ein grundlegender Parameter in der NMR-Spektroskopie.

Die Protonen eines Proteins zeigen im eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum typischerweise chemische Verschiebungen im Bereich zwischen 12 bis -2 ppm:

aliphatische Protonen finden sich bei -2 bis ca. 3,5 ppm; C $\alpha$ -Protonen von Aminosäuren zeigen Übergänge bei Frequenzen, die den ppm-Werten von 3,5 bis 6 ppm entsprechen. In diesem Frequenzbereich finden sich ferner die  $\delta$ -Protonen von Prolinresten sowie die  $\beta$ -Protonen von Serinen und Threoninen. Die aromatischen Protonen zeigen Signale zwischen 6,5 und 7,5 ppm während Amidprotonen des Proteinrückgrats bei chemischen Verschiebungen von 6 bis 11 ppm auftreten.

Diese charakteristische Signaldispersion von Resonanzen ist ein sehr sensitiver Marker für die räumliche Faltung eines Proteins, da sich in einem gefalteten Protein nahezu jeder Kern in einer individuellen elektronischen Umgebung befindet. NMR-Spektren ungefalteter Proteine zeichnen sich im Gegensatz dazu durch eine geringe Signaldispersion aus, da sich aufgrund der uneingeschränkten Molekülbewegungen alle Kerne in einer ähnlichen chemischen Umgebung befinden.

### 1.3.4 Zweidimensionale NMR-Spektroskopie

Die große Anzahl und starke Überlagerung der Signale in einem eindimensionalen  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum macht eine Auswertung dieser Spektren für Proteine nahezu unmöglich. Deshalb werden zweidimensionale Spektren eingesetzt, die Signale in einer zweiten Dimension auflösen. Dies erlaubt die Aufklärung von Strukturen für Proteine mit einem Molekulargewicht bis zu ca. 20 kDa. Man unterscheidet zwischen homo- und heteronuklearen 2D-Spektren.

Die zweidimensionale heteronukleare NMR-Spektroskopie nutzt den Magnetisierungstransfer zwischen Protonen und Heterokernen ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ), die durch eine kovalente Bindung verknüpft sind. Eines der wichtigsten heteronuklearen 2D-Experimente ist das  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Experiment („Heteronuclear Single Quantum Coherence“). In diesem erfolgt die Korrelation der Stickstofffrequenz mit der eines gebundenen Amidprotons. Die Dispersion der erhaltenen Signale ist analog zum eindimensionalen Spektrum ein guter diagnostischer Marker, um den Faltungszustand eines Proteins zu beurteilen.

Die NMR-spektroskopische Analyse von Proteinen oder Komplexen, deren Molekulargewicht 30 kDa übersteigt, wird hauptsächlich durch zwei Faktoren limitiert: die schnelle transversale Relaxation der Spinsysteme und die Komplexität der Spektren. Diese Limitationen können nur bis zu einem gewissen Grad durch die Anwendung von Isotopenmarkierung ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^2\text{H}$ ), selektiver Reprotonierung oder 3D-NMR-Techniken überwunden werden. Die transversale Relaxation führt zu einer Vergrößerung der Linienbreite und nimmt mit dem Molekulargewicht der betrachteten Proteine zu.

---

Das 1997 von Pervushin und Kollegen entwickelte TROSY („Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy“) reduziert die transversale Relaxation. Diese wird bei hohen Feldstärken im wesentlichen durch die Beiträge der Dipol-Dipol-Wechselwirkung (DD) und der Anisotropie der chemischen Verschiebung („chemical shift anisotropy“, CSA) bestimmt. Die TROSY-Technik nutzt die gegenseitige Kompensation dieser Effekte aus. Weil die dipolare Relaxation von der Feldstärke unabhängig ist, während die CSA mit der Stärke des Magnetfeldes zunimmt, kann eine Bedingung gefunden werden, bei der die transversale Relaxation minimal ist. In Kombination mit einer Deuterierung kann das TROSY für die Strukturauflösung von Proteinen oder Proteinkomplexen mit einem Molekulargewicht von bis zu 100 kDa angewendet werden. Das TROSY kann darüber hinaus eingesetzt werden, wenn intramolekulare Kontaktbereiche durch die Kartierung chemischer Verschiebungen in großen Proteinaggregaten charakterisiert werden sollen.



---

## 2 Das Endoplasmatische Retikulum und Transportprozesse

### 2.1 Das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum ist ein dynamisches Organell (Powell, 2000), das essentiell für viele zelluläre Prozesse und die Integrität der Zellen ist. Es besteht aus einem membranösen Netzwerk, das in die Membran des Zellkerns übergeht. In sekretorischen Zellen stellt das ER 50% der Gesamtmembranen dar und umfasst mehr als 10% des Zellvolumens (Chevet *et. al.*, 2001).

Das ER ist der Hauptort für die Lipidbiosynthese und kann als gemeinsamer Vorläufer aller Organellen des sekretorischen Weges wie z.B. des Golgi-Komplex, der sekretorischen Vesikel, der Lysosomen und der Plasmamembran angesehen werden. Ferner stellt dieses Organell den Eintrittspunkt für Proteine in den sekretorischen Weg dar. Diese werden co- oder posttranslational über die ER-Membran transportiert (Corsi & Schekman, 1996; Rapoport *et. al.*, 1996) und erlangen im Lumen des ER in einem von Faltungshelfern („Chaperonen“) unterstützten Prozess ihre korrekte Faltung und Modifikation. In Membran-umgebenen Vesikeln werden sie über den Golgi-Komplex zu den Zielorganellen transportiert oder ins extrazelluläre Milieu entlassen.

Missgefaltete Proteine werden in einem als „Qualitätskontrolle des ER“ bezeichneten Prozess im ER zurückgehalten und können weitere Faltungszyklen durchlaufen, um ihre native Konformation anzunehmen. Sollte dieser Prozess überlastet sein reichern sich ungefaltete Proteine an. Das ER reagiert darauf durch die Aktivierung kompensatorischer Systeme. Dauerhaft missgefaltete Proteine werden selektiv retrograd ins Zytoplasma transportiert („Retrotranslokation“ oder „Dislokation“) und hier vom Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut (sog. „ER assoziierte Degradation“, ERAD). Abbildung 3 (nach Chevet *et al.*, 2001) gibt eine Übersicht über die im ER ablaufenden Prozesse und daran beteiligte Proteine, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

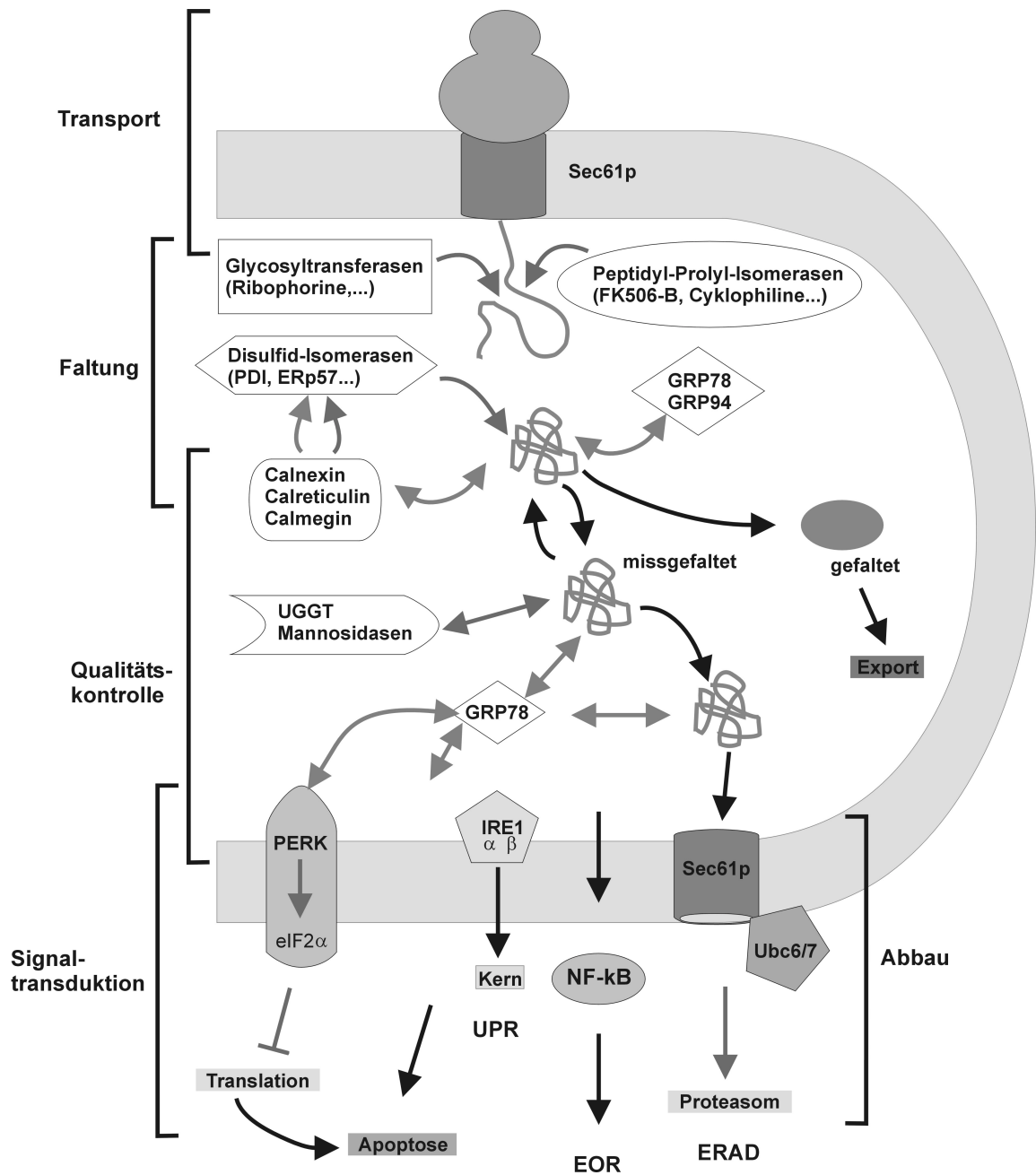


Abbildung 3. Proteinfaltung im ER

Die Proteine gelangen durch den Sec61-Komplex in das ER. Dort assoziieren sie mit einer Reihe von Faltungshelfern (umrahmt), um ihre native Konformation zu erlangen. Die Qualitätskontrolle sichert, dass ausschließlich korrekt gefaltete Proteine das ER verlassen. Dauerhaft missgefaltete Proteine werden in das Zytoplasma transportiert und durch das Proteasom degradiert (ERAD). Die Anreicherung von ungefalteten Proteinen im ER löst drei kompensatorische Systeme aus: UPR („Unfolded Protein Response“), EOR („ER Overload Response“) und die verminderte Translation sekretorischer Proteine.

### 2.1.1 Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum

Ein kritischer Schritt in der Biogenese vieler Proteine ist die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum. Proteine, die für bestimmte Organellen des sekretorischen Weges bestimmt sind, müssen in die Membran des ER integrieren oder diese überqueren, um das Lumen zu erreichen.

Der sog. Sec61-Komplex aus den Membranproteinen Sec61p, Sss1p und Sbh1p stellt die zentrale Komponente der Transportmaschinerie in *S. cerevisiae* dar. Die Membranpore wird aus drei bis vier Komplexen gebildet (Hanein *et al.*, 1996), wobei der hydrophile Kanal, der in Kontakt mit den transportierten Proteinen steht, von dem Protein Sec61p ausgekleidet wird. Dieser Kanal ist eine passive Pore und muss mit anderen Proteinen assoziieren, die den Transport energetisieren.

Der cotranslationale Proteintransport beginnt mit der Bindung des Signal-erkennungspartikels („Signal Recognition Particle, SRP“; Walter & Johnson, 1994) an die Signalsequenz des naszierenden Proteins, sobald diese das Ribosom verlässt. Durch die Interaktion des aus Ribosom und naszierendem Polypeptid bestehenden Komplexes mit Sec61p wird dessen Oligomerisierung und damit die Bildung des Transportkanals angeregt. Durch die Bindung der Ribosomen gelangt die an der Peptidyltransferasestelle des Ribosoms gebildete Polypeptidkette in einen kontinuierlichen Kanal, der einen direkten Zugang zum Lumen des ER bildet (Crowley *et al.*, 1993; Mothes *et al.*, 1994). Die Polypeptidkette kann sich nur in die Richtung des ER-Lumens bewegen, so dass für den Transport keine zusätzliche Energie benötigt wird.

In der Hefe werden Proteine sowohl co- als auch posttranslational in das ER transportiert. Die Voraussetzung für einen postrationalen Transport ist, dass die translatierten Proteine im Zytoplasma durch Chaperone in einem ungefalteten Zustand gehalten werden. Der Transport erfolgt durch den sog. Sec-Komplex, der durch Assoziation des Sec61-Komplex mit dem Sec62/63-Komplex, der aus drei Transmembranproteinen (Sec62p, Sec63p, Sec71p) und dem peripheren Membranprotein Sec72p besteht, entsteht. Das im ER-Lumen lokalisierte Hitzeschockprotein Kar2p (in Säugern BiP) interagiert mit der J-Domäne von Sec63p (Misselwitz *et al.*, 1999) und ist der Motor des Transports (Matlack *et al.*, 1999). Die Bindung an Sec63p induziert die Hydrolyse des von Kar2p gebundenen ATP und überführt das Chaperone in eine geschlossene Form, die das naszierende Polypeptid bindet und dessen Zurückgleiten in den Kanal verhindert. Dieser Vorgang wiederholt sich bis das Protein vollständig in das ER transportiert wurde.

### 2.1.2 Proteinfaltung im ER

Alle intrazellulären Faltungsprozesse haben gemeinsame Grundzüge, so z.B. die Prävention der Proteinaggregation und die ATP-Abhängigkeit der Faltung. Die Aggregation neu synthetisierter Proteine wird einerseits durch hohe Proteinkonzentrationen (im ER ca. 100 mg/ml) andererseits durch die Exposition hydrophober Proteinbereiche in Faltungsintermediaten gefördert.

Das Endoplasmatische Retikulum stellt durch den Proteintransport über die Membran, ein hohes oxidierendes Potential, temporär hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und die Präsenz einer Glykosylierungsmaschinerie (Stevens, 1999) besondere Anforderungen an die Faltung von Proteinen. Diesen wird die Zelle durch ein spezielles Sortiment von Faltungshelfern gerecht, die sich in fünf Klassen gliedern. Die Gruppe der klassischen Chaperone umfasst die Proteine BiP/GRP78 (in *S. cerevisiae* Kar2p) und GRP94/gp96, für das in Hefe kein Homolog identifiziert wurde. BiP (Kar2p; Übersichtsartikel Gething, 1999) ist ein Mitglied der Familie der 70 kDa-Hitzeschockproteine (Hsp70, Munro & Pelham, 1986). Durch die Bindung von ungefalteten oder nur partiell gefalteten Proteinen verhindert BiP die inter- bzw. intramolekulare Aggregation. Es wirkt ferner als Faltungshelfer und unterstützt die korrekte Assemblierung von Komplexen. Für das *S. cerevisiae* Homolog Kar2p wurde nachgewiesen, dass es dauerhaft missgefaltete, unvollständig glykosilierte oder assemblierte Proteine der Dislokation und damit dem Abbau durch das Proteasom zuführt. Das Glykoprotein GRP94 („Glucose Regulated Protein“, GRP) gehört der Familie der 90 kDa-Hitzeschockproteine (Hsp90). Es bindet wie BiP vorübergehend Peptide und ungefaltete Proteine (Melnick *et al.*, 1994), scheint sich von diesem aber funktionell zu unterscheiden.

Die Ausbildung von Disulfidbindungen ist eine wichtige Modifikation im oxidierenden Milieu des ER. Durch Disulfidbrücken wird die native Konformation eines Proteins stabilisiert. Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI, in *S. cerevisiae* Pdi1p, Übersichtsartikel Noiva, 1999) katalysiert im ER sowohl die Oxidation als auch die Isomerisierung von Disulfidbindungen. Die zweite Familie von Chaperonen, die in bei der Ausbildung nativer Disulfidbrücken eine Rolle spielt, sind die PDI-ähnlichen Proteine (ERp57, P5 sowie ERp72 und PDIR).

Die Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPI) bilden die dritte Klasse von verbreiteten Faltungshelfern. Diese Enzyme katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidbindungen aminoterminal von Prolinen. Diese Proteinklasse umfasst die FK506-bindenden Proteine (FKBPs) und die Cyclosporin bindenden Cyclophiline.

Neben den bislang genannten Faltungshelfern, die in allen Kompartimenten der Zelle die Proteinfaltung unterstützen, gibt es ER-spezifische Faltungshelfer. Zu diesen zählen in Säugerzellen die Lektin ähnlichen Proteine Calnexin und Calreticulin sowie in *S. cerevisiae* das Protein Cne1p (Parlati *et al.*, 1995). Calnexin, ein Typ-I-Membranprotein, und das lösliche Calreticulin binden bevorzugt Glykoproteine, die ein Oligosaccharidgerüst mit einem einzelnen Glukoserest tragen (Ware *et al.*, 1995; Vassilakos *et al.*, 1998) und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen.

### 2.1.3 Qualitätssicherung im sekretorischen Weg

Proteine verlassen das ER erst nachdem sie ihre native Konformation erreicht haben und korrekt co- und posttranslational modifiziert wurden. Missgefaltete und unvollständig assemblierte Proteine sind Nebenprodukte der Proteinsynthese und -faltung im ER. Ihre Anreicherung oder Sekretion kann zu einer massiven Störung zellulärer Funktionen bis hin zur Entstehung schwerwiegender Krankheiten wie z.B. der Mukoviszidose führen. Deshalb existieren spezielle Prozesse, die eine Qualitätssicherung der Proteine des sekretorischen Weges gewährleisten. Für alle Proteine existiert eine primäre Qualitätskontrolle, die für spezifische Proteine um einen zweiten Prozess erweitert wird (Ellgaard *et al.*, 1999).

Durch die primäre Qualitätskontrolle werden fehlerhafte Proteine im ER an einem weiteren Transport durch den sekretorischen Weg gehindert. Diese „ER Retention“ von Proteinen erfolgt hauptsächlich durch die Assoziation mit Faltungshelfern wie z.B. BiP, PDI oder ERp57. Für Glykoproteine wird dieser Mechanismus als Calnexin/Calreticulin-Zyklus bezeichnet (Parodi *et al.*, 1999).

Die Glykosylierung an Asparaginresten (Hubbard & Ivatt; 1981), die Teil des Sequenzmotivs N-X-S/T sind, erfolgt im Lumen des Endoplasmatischen Retikulum (Kukuruzinska, *et al.*, 1987). Dabei wird unter Ausbildung einer N-glykosidischen Bindung das Oligosaccharid  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{NAc}_2$  übertragen, das durch Glukosidasen und  $\alpha$ -Mannosidasen prozessiert wird (Esmon *et al.*, 1981; Kornfeld & Kornfeld, 1985; D'Alessio *et al.*, 1999). Die große strukturelle Vielfalt der N-gebundenen Glykane wird durch weitere Modifikationen im Golgi Apparat hervorgerufen.

Die Faltungshelfer Calnexin und Calreticulin binden bevorzugt an Oligosaccharide, die mehrerer Mannose- und einen Glukoserest enthalten (Zapun *et al.*, 1997; Allen & Bulleid, 1997). Die Glukosidasen I und II deglukosylieren die Oligosaccharideinheit, während das Enzym UDP-Glukose:Glykoprotein Glykosyltransferase (UGGT) einzelne Glukosereste auf ein bestehendes Oligosaccharidgerüst überträgt (Trombetta *et al.*, 1989).

Substrate für die UGGT sind unvollständig gefaltete Glykoproteine. Somit wirkt dieses Enzym in der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen als Faltungssensor und ermöglicht ungefalteten Glykoproteinen eine zyklische Reassoziierung mit Calnexin und Calreticulin. Für viele Glykoproteine ist dieser sog. Calnexin/Calreticulin-Zyklus essentiell für einen erfolgreichen Faltungsprozess.

Die direkte Rolle von Calnexin und Calreticulin bei der Faltung von Proteinen ist umstritten (Ellgaard *et al.*, 1999; Trombetta & Helenius, 1998; Zapun *et al.*, 1999). Mittlerweile konnte mit ERp57, das mit Calnexin und Calreticulin Komplexe ausbildet, eine dritte Komponente der Faltung von Glykoproteinen identifiziert werden (Oliver *et al.*, 1997; High *et al.*, 2000).

#### **2.1.4 Reaktionen des ER auf die Anreicherung ungefalteter Proteine**

Eine erhöhte Menge an ungefalteten Proteinen im ER kann durch verminderte Glykosylierung bei Nährstoffmangel, die Produktion mutierter Proteine, ein verändertes Redoxpotential oder eine erhöhte Ionenkonzentration hervorgerufen werden (Hampton, 2000). Das Endoplasmatische Retikulum verfügt über drei Signalwege, um darauf zu reagieren: die „Unfolded Protein Response“ (UPR; Übersichtsartikel Chapman *et al.*, 1998, Kaufman, 1999), die Inhibierung der Translation und die „ER Overload Response“ (EOR; Chevet *et al.*, 2001).

Die UPR reguliert nahezu alle Schritte des sekretorischen Weges (Travers *et al.*, 2000): vom Proteintransport, über die Prozessierung (Faltung, Modifikation, Sortierung) bis hin zur Ankunft im Zielorganell, der Sekretion oder Degradation. Durch eine vermehrte Transkription werden vermehrt Faltungshelfer produziert (Kotzumi *et al.*, 1988), die Lipidbiosynthese gesteigert und Proteine, die an der ER assoziierten Degradation beteiligt sind, induziert. Der zentrale Mediator dieses Prozesses in der Hefe ist die Serin/Threonin-Kinase Ire1p („Inositol requiring“; Nikawa *et al.*, 1992), die den Transkriptionsfaktor Hac1p aktiviert (Sidrauski & Walter, 1997).

Die verminderte Translation von sekretorischen Proteinen wird durch die Transmembrankinase PERK vermittelt (Harding *et al.*, 1999), die den Transkriptionsfaktor eIF2a stimuliert. In Säugerzellen tritt als dritter Signaltransduktionsweg die EOR auf, die über das Protein NF- $\kappa$ B verläuft und vermutlich der Abwehr von viralen Infektionen dient (Pahl & Baeuerle, 1985 und 1997).

Sollten ungefaltete Proteine auch nach mehrfacher und verlängerter Assoziation mit Chaperonen nicht ihre native Konformation annehmen, werden sie degradiert (Hammond & Helenius, 1995). Die hohe Zahl ungefalteter oder partiell gefalteter

Proteine im ER lässt sich nur schwer mit einem aggressiven proteolytischen System in diesem Organell vereinbaren (Plempner & Wolf, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Ubiquitin-Proteasom-System im Zytoplasma (Bonifacino & Weissman, 1998) für den ER assoziierten Abbau von Proteinen verantwortlich ist (Ward *et al.*, 1995; Jensen *et al.*, 1995). Sowohl lösliche als auch membranständige ER Proteine müssen retrograd in das Zytoplasma der Zelle transportiert werden, um für das Proteasom zugänglich zu sein. Dieser als Dislokation bezeichnete Vorgang wird wie auch der Proteinimport durch einen von Sec61p geformten Kanal ermöglicht (Pilon *et al.*, 1997; Plempner *et al.*, 1997; Zhou & Schekman, 1999). Ein Modell für die ER assoziierte Degradation von löslichen und Membranproteinen ist in Abbildung 4 skizziert.

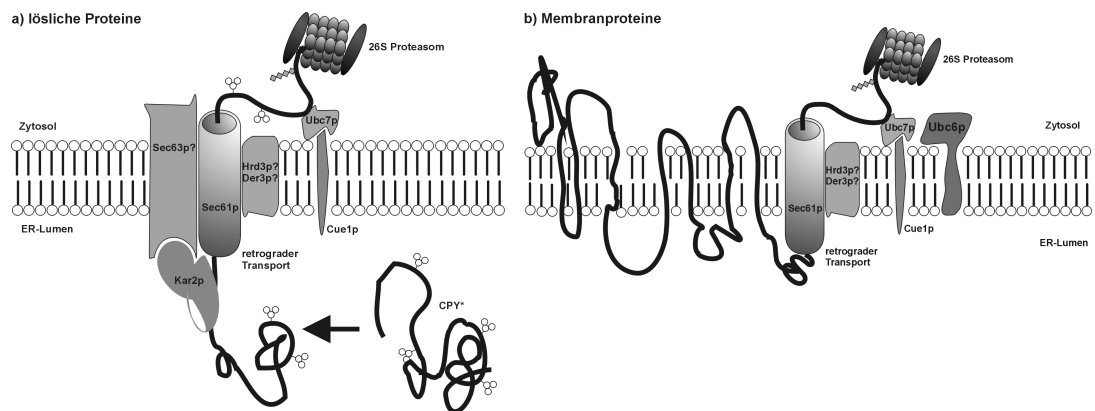


Abbildung 4. ER assoziierte Degradation von Proteinen (ERAD)

Modell des retrograden Transports a) einer Mutante der Carboxypeptidase Y (CPY\*) und b) eines Membranproteins aus dem ER ins Zytoplasma, wo die Proteine durch das Ubiquitin/Proteasom-System degradiert werden. Der Transportkanal wird von Sec61p gebildet, das vermutlich mit weiteren Komponenten der ER-Degradationsmaschinerie (Der3p, Hrd3p) assoziiert. Nach dem Transport werden die Proteine durch Ubc6p und Ubc7p, das an Cue1p gebunden ist, mit Ubiquitin verknüpft. An der Dislokation löslicher Proteine ist auch das Protein Kar2p beteiligt.

## 2.2 Peptidtransport

Peptidtransportsysteme spielen eine wichtige Rolle bei der Nährstoffaufnahme, in verschiedenen Signalwegen von Mikroorganismen wie z.B. der Chemotaxis, der Konjugation und der Sporulation und bei der Ausbildung von Resistenzen gegen antimikrobiell wirksame Peptide. Häufig sind ATP-abhängige Transporter an der Internalisierung oder Sekretion dieser Peptide beteiligt (Detmers *et al.*, 2001). In bakteriellen Systemen bilden sie häufig einen Komplex mit spezifischen Peptid bindenden Proteinen oder Rezeptoren, die die Spezifität des Systems bestimmen.

In eukaryontischen Zellen ist TAP („Transporter Associated with Antigen Processing“; für Übersichtsartikel siehe Lankat-Buttgereit & Tampé, 2001) für den Transport von Peptiden aus dem Zytoplasma in das ER verantwortlich. Diese Peptide werden durch das Proteasom erzeugt und nach ihrem Transport auf Klasse I Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes („MHC class I“) übertragen. Diese präsentieren die gebundenen Antigene an der Zelloberfläche den zytotoxischen T-Lymphozyten.

TAP ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 und gehört zur Familie der „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporter. ABC-Transporter (für Übersichtsartikel siehe Higgins, 2001; Dean *et al.*, 2001; Higgins, 1992) stellen mit derzeit mehr als 1000 bekannten Mitgliedern die größte Proteinfamilie dar und finden sich in allen Organismen (Higgins, 1992). Sie bestehen aus vier Einheiten, zwei Transmembran- und zwei ATP-bindenden Domänen, die auf separaten Polypeptidketten oder aber als Multidomänen-Polypeptide vorliegen können (Hyde *et al.*, 1990; Higgins, 1992) Die Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der möglichen Organisationsformen von ABC-Transportern.



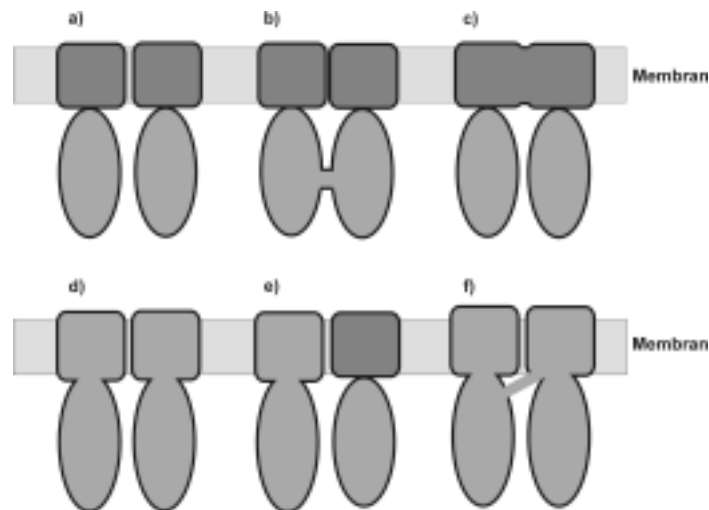


Abbildung 5. **Organisationsformen von ABC-Transportern**

ABC-Transporter bestehen aus zwei Transmembran-Domänen (TMD, Quadrate) und zwei ATP-bindenden Domänen (NBD, „Nucleotide Binding Domain“, Ovale). Diese 4 Domänen können auf unterschiedliche Arten miteinander verknüpft sein: a) vier separate Polypeptidketten, b) fusionierte NBD, c) fusionierte TMD, d) TMD mit NBD verschmolzen, Homodimer, e) eine TMD ist mit einer NBD verknüpft, die TMD und NBD der zweiten Einheit liegen separat vor und f) alle Domänen werden von einer Polypeptidkette gebildet.

Die Transmembrandomänen durchspannen die Membran jeweils mehrere Male, während die ATP-bindenden Domänen (NBDs, „Nucleotide Binding Domains“) peripher mit der Membran assoziiert sind. Die NBDs stellen durch Hydrolyse von ATP die Energie für den Transportprozess bereit. In allen ABC-Transportern sind die NBDs sehr ähnlich und enthalten drei charakteristische Motive: die „Walker A“- und „Walker B“-Motive bilden den hoch konservierten ATP-Bindungsereich (Walker *et al.*, 1982). Zwischen ihnen befindet sich das sechs bis acht Aminosäuren umfassende C-Motiv mit der Konsensussequenz *LSGGQ*, das ebenfalls hochkonserviert ist. ABC-Proteine fungieren als ATP-abhängige Transporter, Ionenkanäle, Kanalregulatoren, Rezeptoren, Proteasen und Signalproteine. Ihre Substrate sind z.B. Ionen, Schwermetalle, Gallensäuren, Antibiotika, Peptide, Proteine, Aminosäuren oder Medikamente.

Das Genom der Hefe *S. cerevisiae* offenbart 32 offene Leserahmen für ABC-Proteine, die sich in mehrere Subfamilien unterteilen lassen (Bauer *et al.*, 1999). Bislang konnte lediglich für einige dieser Proteine ein Substrat identifiziert werden. Die MDR-Subfamilie („Multi drug resistance“) besteht aus 4 Mitgliedern, unter denen sich der Paarungsfaktor-Transporter Ste6p findet (Kuchler *et al.*, 1989; McGrath & Varshavsky, 1989), eines der am besten charakterisierten ABC-Proteine der Hefe.

---

Er transportiert die reife Form des  $\alpha$ -Faktors über die Plasmamembran. Dabei handelt es sich um ein farnesyliertes Dodekapeptid, das durch einen komplizierten Reifungsprozess aus einem Vorläufer gebildet wird (Michaelis, 1993).

Das Wissen über den Transport von Peptiden über die Membran des ER in *S. cerevisiae* ist limitiert. Karin Römisch und Kollegen (1992; Ali *et al.*, 2000) beschreiben einen energieabhängigen Export von glykosilierten Tripeptiden aus dem ER in das Zytoplasma von Hefezellen, der Parallelen zum retrograden Transport von Proteinen aufweist. Ein analoger Prozess konnte auch an mikrosomalen Membranen aus Säugerzellen nachgewiesen werden (Römisch & Ali, 1997). Durch die heterologe Expression von TAP in der Bäckerhefe wurde darüber hinaus ein ATP-abhängiger Peptidtransport in Mikrosomen entdeckt (Urlinger *et al.*, 1997). Die Charakterisierung dieses neu entdeckten Transportweges ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

## C. Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Bakterienstämme und Medien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNS und zur Klonierung wurden die *Escherichia coli* Stämme DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) und XL10 Gold (Stratagene) verwendet. Die Expression von Proteinen wurde in den Stämmen BI21(DE3), BI21(DE3)pLysE und BI21(DE3)pLysS (Stratagene) durchgeführt.

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte routinemäßig in LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika. Zur Anreicherung von Proteinen mit dem Isotop  $^{15}\text{N}$  wurde Neues Minimal Medium (NMM) verwendet.

LB-Medium (Luria Bertani Medium)	1,0% Pepton 1% NaCl 0,5% Hefeextrakt Das Medium wurde für 20 min bei 120°C sterilisiert. Für die Herstellung von Platten wurden vor dem Autoklavieren 1,5% Agar zugesetzt.
Ampicillin	ad 100 mg/l
Kanamycin	ad 70 mg/l
Chloramphenicol	ad 34 mg/l

---

NMM	50 mM $K_2HPO_4$
(Neues Minimal Medium)	22 mM $KH_2PO_4$
	8,5 mM NaCl
	7,5 mM $(NH_4)_2SO_4$
	1 mM $MgSO_4$
	2 0mM Glukose
	1,0 $\mu g/ml$ $Ca^{2+}$
	1,0 $\mu g/ml$ $Fe^{2+}$
	0,001 $\mu g/ml$ Spurenelemente ( $Cu^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $MoO_4^{2-}$ )
	10 $\mu g/ml$ Thiamin und Biotin
	50 mg/l alle Aminosäuren

## 1.2 Hefestämme und Medien

In der vorliegenden Arbeit wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm W303-1A [MATa ura3-52 leu2-3,112 his3-11 trp1-1 ade2-1 can1-100] verwendet.

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte in YPD-Medium bei 30°C.

YPD	1,0% Hefeextrakt
(Vollmedium)	2,0% Pepton
	2,0% Glukose

### 1.3 Geräte

DNS-Synthesizer 380A, 381A	Applied Biosystems
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
$\gamma$ -Zähler MR480	Kontron
Milli Q-Wasser-Entionisierungsanlage	Millipore
Thermocycler	Techne Progene
	Perkin Elmer Cetus
	Eppendorf (Master Cycler Gradient)
Rotoren für die Ultrazentrifuge	Beckman Ti70.1, SW28, SW40Ti, SW41
Zentrifugen	Beckmann UZ
	Sorvall (RC-5B)
	Heraeus (2.0 RS)
	Eppendorf (5403)
	Eppendorf Kühlzentrifuge
	Sigma (K15, 3-K15 und 1-15)
	Beckmann (Avanti J25)
UV-Leuchtschirm	BilOS
Sofortbild-Kamarasystem	Polaroid
Eagle Eye	LTF
Gelelektrophorese-Apparaturen, vertikal	Eigenbau der Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried
Gelelektrophorese-Apparaturen, horizontal	Eigenbau der Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried
Semidry-Blot Apparaturen	BioRad (Trans-Blot SD)
	Eigenbau der Werkstatt des MPI für Biochemie, Martinsried
Tank-Blot-Apparatur	Amersham Pharmacia
Spektralphotometer (UV, VIS)	Perkin Elmer (Lambda 2)
	Amersham Pharmacia
Waagen	Sartorius
	Ohaus (Explorer)
Spannungsquellen	Amersham Pharmacia
	BioRad (Power Pac 2000)
Vortexer	Scientific Industries (Vortex Genie)
Peristaltikpumpe	Amersham Pharmacia (Pump P-1)

---

Kippschüttler	Heidolph
	LTF
Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel
pH-Meter und pH-Elektrode	WTW
Ultraschallgenerator	Branson
Brutschränke	Memmert
Mikroskop	Zeiss (Axiovert10)
Schüttelinkubatoren	Infors AG
Speed-Vac-Konzentrator	Buchofer
	Con-1000 LTF
Thermoblöcke	Eppendorf (5430)
	HLC BT130-2
BioLogic LP	BioRad
ÄKTA explorer	Amersham Pharmacia
ÄKTA prime	Amersham Pharmacia
Elektroporatoren	BioRad (Gene Pulser)
	Eppendorf (2510)
Autoklav	H+P (Varioklav)

### 1.4 Enzyme

Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase	Sigma
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs
T4-DNS-Ligase	Boehringer Mannheim
DNS-Polymerasen	Taq, Sigma; ExTaq, Takara; Pfu, Stratagene
DNaseI	Boehringer Mannheim
Apyrase (Grade IV, aus Kartoffel)	Sigma
Lyticase	Sigma
Zymolyase	Seikagaku Kogyo Co.
Lysozym	Sigma
m-Calpain	Sigma, Biomol

## 1.5 Antikörper

IgG-Peroxidase-Konjugate	Sigma
IgG-Alkalische Phosphatase-Konjugate	Sigma
pAb anti-Pmal (rabbit)	R. Serrano / B. Glaeser
pAb anti-Sec63 (rabbit)	R. Schekman
pAb anti-Sec61 (rabbit)	R. Schekman
pAb anti-vATPase (rabbit)	K. Kuchler
pAb anti-Tim44	W. Neupert / H.-C. Schneider
pAb anti-Mdl1p	eigene Herstellung
pAb anti Mdl2p	eigene Herstellung
Penta-His Antikörper	Qiagen

## 1.6 Größenstandards

DNS-Längenstandard 1kb-Leiter	PeqLab
DNS-Längenstandard 100bp-Leiter	PeqLab
DNS-Längenstandard $\lambda$ -HindIII	Appligene
Proteingrößenstandard M4	Serva
Proteingrößenstandard M6, vorgefärbt	Sigma
Prestained Protein Maker, broad range	New England Biolabs
Broad Range Marker f. Proteine	BioRad
Calibration Kit Gel Filtration HMW	Amersham Pharmacia

## 1.7 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

### 1.7.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Merck, Roth, Sigma oder Fluka im höchsten Reinheitsgrad bezogen.

Acrylamid Protogel	National Diagnostics
Rotiphorese Gel 30	Roth
Protease Inhibitor Tablets, ohne EDTA	Roche
Agar	Gibco
Agarose	Appligene, Applichem
ATP, AMP, CDP, GTP, GDP, GTP, UTP	Sigma
Benzamidin	Sigma
BSA	Sigma
Concanavalin A-Sepharose	Sigma
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Merck
Hefeextrakt	Gibco, Difco
NiNTA Superflow	Qiagen
PMSF	Sigma
TEMED	Serva, Fluka
[ <sup>125</sup> I]-NaI (16 mCi/μl)	Amersham

### 1.7.2 Kits

Bradford Proteintest	Biorad
Qiagen Plasmid Midi/Mini/Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Spin Prep Kit	Qiagen
Qiagen Gelextraktion Kit	Qiagen
ECL Immunoblot Kit	Amersham
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
pCRScriptAmp Blunt Cloning Kit	Stratagene
Imject Activated Immunogen	Pierce
Conjugation Kit	
PCR Optimization Kit	Stratagene
Quick Change Mutagenesis Kit	Stratagene



### 1.7.3 Verbrauchsmaterialien

ECL-Hyperfilm	Amersham
Nitrocellulose-Membran, Optitran BSA-83	Schleicher und Schuell
PVDF-Membran	BioRad
Whatman-3MM-Filterpapier	Kobe
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Falcon
Petrischalen	Greiner
Fiter, Konzentratoren	Millipore
Pipettenspitzen	Peske

## 2 Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNS

##### 2.1.1.1 Schnellisolierung von Plasmid-DNS

Diese Methode dient der Schnellanalyse von Plasmid-DNS, die insbesondere beim Austesten von Kolonien, die nach Transformationen erhalten werden, erforderlich ist.

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (1 min, 10.000g) geerntet und der Mediumüberstand vollständig entfernt. Die Zellen wurden in 200 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl 1%-iger Lysozym-Lösung 60 s bei 95°C gekocht. Anschließend wurden die Proben rasch auf Eis abgekühlt. Das aus genomischer DNS und Zelltrümmern bestehende Präzipitat wurde nach zehnmütiger Zentrifugation (10.000g) mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt und die DNS im Überstand durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol 10 min bei -20°C gefällt. Die DNS wurde anschließend 10 min bei 10.000g abzentrifugiert und in 200 µl TE/NaCl aufgenommen. Nach Wiederholung der Isopropanol-Fällung wurde der DNS-Niederschlag mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, ohne das Pellet zu resuspendieren. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde die DNS 5 min im Vakuum getrocknet und anschließend in 20 µl sterilem Wasser aufgenommen.

STET Puffer	8% (w/v) Saccharose
	5% (v/v) Triton X-100
	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	50 mM EDTA

Lysozym-Lösung	1% (w/v) Lysozym
----------------	------------------

TE/NaCl-Lösung	10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	1 mM EDTA
	300 mM NaCl

### 2.1.1.2 Präparation von Plasmid-DNS in größeren Mengen

Um größere Mengen an Plasmid-DNS aus *E. coli* zu isolieren, wurden Kits der Firma Qiagen entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet. Die Kits beruhen auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen und anschließender Reinigung der DNS über eine Anionenaustauscher-Matrix. In allen Fällen wurde die DNS im letzten Schritt der Reinigung (Elution oder Resuspendieren der gefällten DNA) in sterilem Wasser gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.1.1.3 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von DNS

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNS 1:50 bis 1:100 verdünnt und die Optische Dichte in Quarzküvetten gemessen. Eine Absorption von eins entspricht ca. 40  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger bzw. 20  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNS (Oligonukleotide) (Sambrook *et al.*, 1989). Durch zusätzliche Messung der Probe bei 280 nm konnte auch die Reinheit der Präparation beurteilt werden, da bei dieser Wellenlänge überwiegend Proteine absorbieren. Reine DNS zeigt ein  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Verhältnis von etwa 1,8.

### 2.1.1.4 Ethanolfällung von DNS

Zur Anreicherung und Reinigung von DNS aus wässrigen Lösungen wird diese mittels Ethanol präzipitiert. Das Prinzip der Fällung beruht auf einem Entzug des Lösungsmittels durch einwertige Kationen wie z.B.  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Li}^{+}$ ,  $\text{NH}_4^{+}$ .

Die Salzkonzentration wird mit Ammoniumacetat auf etwa 0,2 M eingestellt und die DNS durch Zugabe des 2,5-fachen Volumen an absoluten Ethanol ausgefällt. Für eine quantitative Fällung wurde der Ansatz 15 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bzw. alternativ 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend bei 14.000g 15 min abzentrifugiert. Das DNS-Pellet wurde einmal mit eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, kurz im Vakuum getrocknet und im gewünschten Volumen sterilem Wasser resuspendiert.

### 2.1.2 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen wurde entsprechend den Herstellervorgaben für optimale Puffer- und Temperatur-Bedingungen durchgeführt. Pro Mikrogramm DNS wurden 2 - 10 Enzymeinheiten („Units“) eingesetzt. Die DNS wurde für 1,5 h mit den Restriktionsendonukleasen inkubiert und die Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

### 2.1.3 Dephosphorylierung von DNS

Um die Religation eines linearisierten Vektors mit komplementären überhängenden Enden zu verhindern, wurden die Phosphatgruppen an dessen 5'-Enden mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine alkaline phosphatase“, CIAP) abgespalten. Dazu wurde die benötigte Menge an linearisiertem Vektor mit der entsprechenden Menge an 10-fach Dephosphorylierungspuffer versetzt. Im Fall von überhängenden Enden gibt man pro 100 pmol bei glatten Enden pro 2 pmol Vektor 1 Unit Alkalische Phosphatase zu und inkubiert 15 min bei 37°C. Anschließend wird die Phosphatase durch 15-minütige Inkubation bei 56°C inaktiviert und im präparativen Agarosegel entfernt.

### 2.1.4 Ligation mittels „Rapid DNA Ligation Kit“ (Roche)

Vor jeder Ligation wurden sowohl vom präparierten Vektor als auch vom Insert 1 bis 2 µl auf ein Minigel aufgetragen, um die für die Ligation einzusetzenden Mengen abschätzen zu können. Das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert sollte dabei etwa 1:3 bis 1:5, die Gesamt-DNA-Menge etwa 200 bis 500 ng betragen.

Die zu ligierende Vektor- und Insert-DNS wurden in DNS-Verdünnungspuffer (5-fach konzentriert) in einem Volumen von 10 µl gelöst. Nach Zugabe von 10 µl Ligationspuffer (2-fach konzentriert) wird gründlich gemischt und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) zugesetzt. Der Ansatz wurde erneut gemischt und 5 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Hitzeinaktivierung der Reaktionsansätze vor der Transformation war nicht nötig.

### 2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung beliebiger DNS-Abschnitte ausgehend von einer Matrize, wobei Restriktionsschnittstellen bzw. andere DNS-Abschnitte angefügt werden können. Für die Herstellung spezifischer Oligonukleotide („Primer“) müssen kurze flankierende Sequenzen der zu amplifizierenden DNS bekannt sein. Die Reaktion findet in mehreren Zyklen statt. Einem ersten, längeren Denaturierungsschritt folgen 25 bis 30 Zyklen aus kurzer Denaturierung, Primerhybridisierung ('Annealing') und Kettenverlängerung (Elongation). Abschließend fügt sich ein 10-minütiger Polymerisationsschritt an, der der Vervollständigung teilweise einzelsträngiger Fragmente dient. Die Denaturierung erfolgt bei 95°C, die Polymerisation bei 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur für die eingesetzten thermostabilen Polymerasen. Diese stammen aus thermophilen

Organismen und bleiben auch nach dem Erhitzen auf über 90°C aktiv. Die Polymerasen wurden entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Die Anlagerungstemperatur sollte wenige Grad Celsius unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide liegen. Die Schmelztemperatur berechnet sich aus der Länge des Primers und seinem GC-Gehalt. Mittels folgender Formel kann die Schmelztemperatur der Primer näherungsweise abgeschätzt werden:

$$69,3^{\circ}\text{C} + 41 \times \text{GC}/(\text{AT}+\text{GC}) - 650/(\text{GC}+\text{AT})$$

Die Kalkulation der Elongationszeit richtet sich sowohl nach der Länge des zu amplifizierenden PCR-Fragments als auch nach der verwendeten Polymerase. Im Durchschnitt rechnet man 1 min Elongationszeit für 1000 bp. Die Korrektur-lesenden Polymerase arbeiten langsamer als z.B. die Taq-Polymerase, so dass für diese ca. 15% zusätzliche Elongationszeit gerechnet werden sollte.

Bei problematischen Amplifikationen, z.B. dem Auftreten von Nebenbanden, wurden Additiva aus dem PCR Optimization Kit (Stratagene) eingesetzt.

PCR-Ansatz	100 ng Ausgangs-DNS
	10 µl 10-fach Reaktionspuffer (Hersteller)
	10 µM jeder Primer
	250 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
	2 - 5 Units Polymerase
	mit sterilem Wasser auf 100 µl auffüllen

#### 2.1.5.1 Primer entschützen

Die vom Oligonukleotid-Syntheseservice (Max-Planck-Institut für Biochemie) hergestellten Primer mussten vor ihrer Verwendung von Schutzgruppen befreit werden. Dazu wurde die Oligonukleotid-Lösung in 2 ml Reaktionsgefäße portioniert und mit Parafilm versiegelt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 56°C im Thermoblock inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In der Speedvac mit Kühlfalle wurde der freigesetzte Ammoniak abgedampft und die Proben in 3 – 4 h bis zur Trockene einrotiert. Die Aliquots wurden in insgesamt 400 µl sterilem Wasser resuspendiert und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

#### 2.1.5.2 Direkte Klonierung von PCR-Fragmente

Mittels des „pCRScriptAmp Blunt Cloning Kit“ konnten PCR-Fragmente ohne Verdau mit Restriktionsenzymen direkt kloniert werden. Die Arbeiten wurden exakt nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (Stratagene).

### 2.1.5.3 Mutagenese

Der „Quick Change Mutagenesis Kit“ (Stratagene) wurde zur Einführung einer Punktmutation in die DNS-Sequenz von Calpastatin benutzt, um eine Verschiebung des Leserasters aufzuheben. Die Mutagenese wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt und durch DNS-Sequenzierung analysiert.

### 2.1.6 Agarosegel-Elektrophorese von DNS

Die Agarosegel-Elektrophorese dient der Auftrennung von DNS-Fragmenten und ihrer Reinigung. Dazu wurde Agarose in der erforderlichen Konzentration (x%) in TAE-Puffer unter mehrfachem Umschwenken aufgekocht, bis keine Partikel oder Schlieren mehr sichtbar waren. Die auf etwa 50°C abgekühlte Agarose-Lösung wurde mit Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,001% versetzt und in die seitlich abgedichtete Gelkammer gegossen. Das Gel sollte vor der Beladung mit DNS mindestens für 1 h erkalten.

Präparative und analytische Gele hatten eine Größe von 14x16cm<sup>2</sup> (Kämme mit 15 Zähnen). Für schnelle Analysen und Mengenbestimmungen wurden sog. Minigele mit einer Größe von 4,5x6cm<sup>2</sup> (Kamm mit 8 Zähnen) gegossen. Als Elektrodenpuffer diente TAE-Puffer.

Für den Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit einem zehntel Volumen 10-fach Probenpuffer versetzt und langsam in die Geltaschen pipettiert. Durch Abkleben einer entsprechenden Anzahl von Zähnen des Kammes konnte die Taschengröße dem jeweils aufzutragenden Probenvolumen angepaßt werden. Zusätzlich zu den Proben wurde in einer Spur des Gels 0,5 – 1 µg DNS-Längenstandard aufgetragen. Der Gellauf erfolgte im Fall präparativer Gele für 1,5 h bei 100 V. Minigele wurden mit einer Spannung von 70 V für 0,5 – 1 h gefahren. Die Dokumentation erfolgte anschließend auf dem UV-Transilluminator.

TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat (pH 8,0) 1 mM EDTA
------------	---

DNA- Probenauftragspuffer (10-fach)	eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau wird in 50 ml 87% Glycerin gelöst.
---	---

### 2.1.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel

Für die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen oder einer Lösung wurde der Gelextraktionskit der Firma Qiagen verwendet. Die Isolierung erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll.

### 2.1.8 Transformation von *E. coli*

#### 2.1.8.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Chemisch kompetente Zellen wurden nach der Calciumchlorid-Methode hergestellt. Dabei erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis oder im Kühlraum.

Mit 1 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37°C auf eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,5 angezogen. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend in vorgekühlten sterilen Zentrifugenröhrchen geerntet (10 min, 4°C, 4000 Upm). Das Medium wurde abdekantiert und die Gläschen zur vollständigen Entfernung des Mediumüberstandes für etwa eine Minute mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff gestellt. Das Pellet wurde in 10 ml eiskalter 0,1 M  $CaCl_2$  Lösung pro 100 ml Ausgangskultur resuspendiert und diese Zellsuspension 90 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut unter obigen Bedingungen pelletiert, der Überstand abdekantiert und die Gläschen zum Abtropfen für eine Minute auf Zellstoff gestellt. Die Pellets wurden pro 100 ml Ausgangskultur in 4 ml eiskalter 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und vor dem Einfrieren bei -80°C mit 800 µl sterilem 87%-igem Glycerin versetzt. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots à 200 µl eingefroren und konnten so für mehrere Monate unter Erhalt ihrer Kompetenz gelagert werden. Nach dieser Methode gewonnene kompetente Zellen hatten eine Transformations-effizienz von  $5 \times 10^6$  bis  $2 \times 10^7$  Transformanten pro Mikrogramm Plasmid.

### **2.1.8.2 Transformation chemisch kompetenter *E.coli***

Die chemisch kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Die gerade aufgetauten Zellen wurden mit der zu transformierenden DNS (Ligationsansatz, Plasmid-DNS) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Transformation durch einen Hitzeschock von 90 s bei 42°C abgeschlossen. Nachdem die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt waren, wurden die Zellen in LB-Medium für 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden in 1 min bei 10.000g geerntet und anschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikumzusatz ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.1.9 DNS-Sequenzierung mittels „Dye Terminator Mix“**

0,2 bis 0,5 µg DNA wurde mit 10 pmol Sequenzierprimer und 4 µl Terminator-Mix in einem Endvolumen von 10 µl versetzt. Die Reaktion wurde mit 10 µl PCR-Öl überschichtet und in einem Thermocycler für 25 Zyklen inkubiert. Jeder Zyklus bestand aus 30 s bei 95°C, 30 s bei 50°C und 4 min bei 60°C. Nach Ablauf der Zyklen wurden die Ansätze mit je 10 µl Wasser versetzt und zur Sequenzierung übergeben.



## 2.2 Immunologische Methoden

### 2.2.1 Immunoblots nach der ECL-Methode

Nach dem Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran und einer Ponceau S-Färbung wurde die Membran in TBST-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran für mindestens 2 h (längstens über Nacht) mit primärem Antikörper, der in Blockpuffer verdünnt wurde, inkubiert. Durch dreimal zehninütiges Waschen mit TBST-Puffer wurde nicht gebundener primärer Antikörper entfernt. Der sekundäre Antikörper war mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurde 1:10.000 in TBST-Puffer verdünnt eingesetzt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 45 min, anschließend wurde die Membran erneut dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit dem ECL-Kit nach Anleitung des Herstellers Amersham.

TBST-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,05% (v/v) Triton X-100
-------------	--

Blockpuffer	7% (w/v) Magermilchpulver 0,05% Natriumazid in TBST-Puffer
-------------	---

### 2.2.2 „Strippen“ von Immunoblots

Um mit dem ECL-System bereits entwickelte Blots erneut mit einem primären Antikörper behandeln zu können, müssen bereits gebundene Antikörper entfernt werden. Dazu wurden die Membranen für 30 min bei 50°C unter leichtem Schwenken in „Stripping-Puffer“ inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrfach in TBST-Puffer gewaschen.

Stripping-Puffer	60 mM Tris/HCl (pH 6,7) 2% (w/v) SDS 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol
------------------	--

### 2.2.3 Kopplung von Peptiden an KLH

Zur Herstellung von Peptidantikörpern wurden die Peptide an den Träger KLH („Keyhole Limpet Hemocyanin“) gekoppelt. Die Kopplung erfolgte über einen Cysteinrest am Peptid an das Maleimid-aktivierte Trägerprotein („Imject activated Immunogen Conjugation Kit“, Pierce) und wurde exakt nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Kontrolle der Reaktion wurde ebenfalls entsprechend den Hersteller-Angaben mit Ellman’s Reagenz (5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure; Pierce) durchgeführt.

### 2.2.4 Erzeugung polyklonaler Seren in Kaninchen

Die für die Immunisierung eingesetzten Kaninchen wurden vom Tierstall des Max-Planck-Instituts zur Verfügung gestellt und versorgt. Zur Gewinnung des Präimmunsersums wurde zwei Kaninchen vor der ersten Immunisierung ca. 5 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen. Bei der ersten Immunisierung wurde den Kaninchen dann insgesamt ein Milligramm KLH-gekoppeltes Peptid an 3 bis 5 Stellen am Rücken und Bauch subkutan injiziert. Dazu wurde das Antigen zuvor im Verhältnis 1:1 mit Freud’schem Adjuvans (Pierce) emulgiert. Die weiteren Immunisierungen erfolgten nach 4, 8 und 12 Wochen, wobei die gleiche Antigenmenge injiziert wurde, jedoch die Emulsion mit inkomplettem Freud’schen Adjuvans (Pierce) hergestellt wurde. Etwa 12 d nach jeder Immunisierung wurde den Tieren etwa 5 ml Blut entnommen und das Serum im Immunoblot getestet. Nachdem das Serum eine ausreichende Reaktion zeigte, wurden die Kaninchen ausgeblutet.

Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend filtriert. Das Serum wurde zentrifugiert und bei -20°C gelagert.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Subzelluläre Fraktionierung von Hefe-Zellen

Die Auftrennung von Hefe-Organellen erfolgte durch Sedimentation in einem linearen Saccharose-Gradienten (Roberg *et al.*, 1997). Der Nachweis der unterschiedlichen Zellorganellen erfolgte anschließend durch Bestimmung von Leitenzymen im Immunoblot oder durch enzymatische Reaktion.

200 ml einer Hefe-Übernachtkultur ( $OD_{600}=1$ ) wurden geerntet und das Zellpellet mit 30 ml 10 mM Natriumazid gewaschen. Die Zellen wurden zu 50  $OD_{600}/ml$  in Sphäroplastierungs-Medium (SPM) resuspendiert. Nach Zugabe von Lyticase ad 0,3 mg/ml wurde die Zellsuspension unter leichtem Schütteln bei 30°C für 45 min inkubiert. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig geerntet, in SPM gewaschen und in 5 ml eiskaltem Lysepuffer (LP) mit 1 mM PMSF und 2,5 mM Benzamidin resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 40 Stöße in einem 15 ml-Wheaton Homogenisator. Alternativ wurden die Zellen durch Glasperlen lysiert. Dazu wurde den in LP resuspendierten Zellen etwa 1/3 Volumen säuregewaschene Glasperlen zugesetzt. Die Proben wurden bei höchster Geschwindigkeit 6 mal für jeweils 30 s „gevortext“ und zwischendurch für 30 s auf Eis gekühlt.

Das Zellhomogenat wurde 10 min bei 2.000g und 4°C zentrifugiert, um Zellen, grobe Zelltrümmer und Zellkerne abzutrennen. Anschließend wurde das Zellhomogenat auf lineare Saccharose-Gradienten (20-60% Saccharose in Lysepuffer; Herstellung der Gradienten mittels einer Mischungskammer und Peristaltikpumpe oder Rotation eines zweistufigen Gradient für 4 min, 79,5°) verteilt. Die Gradienten wurden 3 h bei 34.000 Upm (150.000g) bei 4°C in einem SW41-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Anschließend wurden die Gradienten von der Oberfläche zum Boden mit einer Pipetten in Fraktionen zu 700 µl geerntet.

Um die Fraktionierung mit einem „ER-Shift“ zu kombinieren, wurde die Präparation parallel mit 4 mM  $Mg^{2+}$  bzw. 10 mM EDTA enthaltendem LP durchgeführt.

Für die Analyse im Immunoblot wurden jeweils 30 µl der Fraktionen, für enzymatische Reaktionen 25 – 50 µl der Fraktionen eingesetzt.

---

Sphäroplastierungs- Medium (SPM)	1,4 M Sorbitol 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH7,5) 10 mM Natriumazid 40 mM β-Mercaptoethanol
Lysepuffer (LP)	0,8 M Sorbitol 10 mM MOPS (pH7,2) 4 mM MgCl <sub>2</sub> bzw 10 mM EDTA

### 2.3.2 Präparation von *S. cerevisiae* Mikrosomen

1g Hefezellen (Naßgewicht) wurde mit eiskalter 10 mM Natriumazid-Lösung gewaschen und in 2 ml Lysepuffer (s. 2.3.1) mit 1 mM EDTA, 3 mM PMSF und 7,5 mM Benzamidin resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Glasperlen lysiert (s. 2.3.1) und das Zellhomogenat für 10 min bei 3.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen vorbereiteten 3-stufigen Saccharosegradienten aufgetragen, der aus 5 ml 60%, 10 ml 42% und 10 ml 24% (w/v) Saccharose in LP bestand. Die Zentrifugation der Gradienten erfolgte für 5 h bei 25.000 Upm in einem SW28-Rotor bei 4°C. Während der Ultrazentrifugation reicherten sich die Plasmamembranen hauptsächlich in der 60/42%-Interphase und die Mikrosomen in der 42/24%-Interphase an. Die bräunliche Mikrosomenschicht wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen, mit 2 Volumen PBS/2 mM DTT verdünnt und die Membranen für 30 min bei 100.000g und 4°C pelletiert. Die Membranpellets wurden in PBS/DTT resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Mikrosomen erfolgte bei -80°C.

PBS (pH7,4)	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 3 mM KCl 150 mM NaCl
-------------	---

### 2.3.3. Herstellung von semipermeabilisierten Hefezellen

Transportkompetente Membranen wurden nach Baker *et al.* (1988) hergestellt und haben gegenüber Mikrosomen den Vorteil, dass die Organellen der Zelle durch schonende Präparation intakt bleiben.

Eine 500 ml Übernachtskultur wurde in YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 2 bis 4 angezogen und in 5 min bei 1.000g und 24°C geerntet. Das Zellpellet wurde ad 50 OD<sub>600</sub>/ml in TP1-Puffer resuspendiert und erneut durch Zentrifugation geerntet. Die Pellets wurden in TP2-Puffer erneut zu einer Zelldichte von 50 OD<sub>600</sub>/ml aufgenommen und mit 20 Units Lyticase pro OD<sub>600</sub> versetzt. Die Späroplastierung erfolgte bei 30°C. Das Fortschreiten der Reaktion wurde in regelmäßigen Abständen durch Bestimmung der OD<sub>600</sub> einer 1:100 Verdünnung in Wasser verfolgt und abgebrochen, sobald der Wert auf weniger als 10% des Ausgangswertes gesunken war. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 24°C, 1.000 g) geerntet und anschließend ad 50 OD<sub>600</sub>/ml in TP3 resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde die Zellsuspension für 20 min bei 30°C inkubiert und im Anschluss erneut unter den genannten Bedingungen geerntet. Die Sphäroplasten wurden in TP3-Puffer gewaschen und zu 300 OD<sub>600</sub>/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis à 200 µl portioniert. Eine verschließbare Styroporbox wurde bis zur einer Höhe von 6 cm mit flüssigem Stickstoff gefüllt und im Abstand von 10 cm über dem Flüssigkeitsspiegel eine Halterung eingesetzt. In dieser wurden die Reaktionsgefäße mit den Sphäroplasten verankert. In der Gasphase über dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen in 45 min eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung von transportkompetenten Membranen wurden die Sphäroplasten in einem 25°C warmen Wasserbad unter leichtem Schütteln aufgetaut und dreimal mit Transportpuffer gewaschen (2.5.4.1; Zentrifugation für 10 s bei 4°C).

TP1	10 mM DTT 100 mM Tris/HCl (pH 9,4)
TP2	0,7 M Sorbitol 0,75% Hefeextrakt 1,5% Pepton 0,5 % Glukose 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)

---

TP3	0,7 M Sorbitol
	0,75% Hefeextrakt
	1,5% Pepton
	1% Glukose

## 2.5 Proteinchemische Methoden

### 2.5.1 Iodierung von Peptiden

Tyrosin-haltige Peptide wurden nach der Chloramin T-Methode nach McConahey (1980) mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert.

15 nmol eines Peptids wurden mit 1 mCi  $\text{Na}^{125}\text{I}$  und 0,1 mg ChloraminT in 90  $\mu\text{l}$  100 mM Natriumphosphatpuffer (pH7,4) 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 90  $\mu\text{l}$  Stop-Puffer wurde die Reaktion beendet. Die Reinigung der  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptide (Abtrennung von freiem Iod) erfolgte mittels Gelfiltration. Dazu wurden 4 g Sephadex G10-Material in 15 ml PBS mit 1% (w/v) dialysiertem BSA aufgeschlämmt und in eine 10 ml Einmal-Plastiksäule gepackt. Nach Äquilibration der Säule mit 10 ml 200 mM Natriumphosphatpuffer (pH7,4) wurde der Iodierungsansatz aufgetragen und mit 500  $\mu\text{l}$  Aliquots Natriumphosphatpuffer eluiert. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wurde im  $\gamma$ -Zähler quantifiziert und die Peptidkonzentration der einzelnen Fraktionen anhand der eingesetzten Peptidmenge berechnet. Iodierte Peptide wurden bei 4°C gelagert und konnten zwei Wochen verwendet werden.

Stop-Puffer	2,4 mg/ml Natriummetabisulfit
	10 mg/ml L-Tyrosin (gesättigt)
	10% (v/v) Glycerin in PBS

PBS (pH 7,0)	10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	3 mM KCl
	150 mM NaCl

### 2.5.2 Proteinbestimmung nach Lowry (modifiziert)

Zur Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen in subzellulären Fraktionen oder Membranpräparationen wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) leicht modifiziert durchgeführt. Dazu wurden 2 bis 5 µl der zu bestimmenden Proteinsuspension mit Wasser auf ein Endvolumen von 400 µl verdünnt. Jede Probe wurde mit 2 ml Lowry-Lösung versetzt und die Reaktionsansätze nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur mit 200 µl Folin-Ciocalteaus-Reagenz (Merck, 1:1 mit Wasser verdünnt) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Proben bei 500 nm bestimmt.

Die eingesetzte Lowry-Lösung wurde frisch aus den drei Stammlösungen A, B, C in einem Verhältnis von 98:1:1 hergestellt. Zur Solubilisierung von Membranproteinen wurde der Lowry-Lösung zusätzlich 0,47% SDS zugesetzt werden.

Lösung A                    0,4% (w/v) NaOH  
                                  2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Lösung B                    2% (w/v) Natriumtartrat

Lösung C                    1% (w/v) CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O

### 2.5.3 Photometrische Proteinbestimmung

Die Konzentration von gereinigten Proteinen kann in Lösung durch die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt werden, sofern die Proteine Chromophore besitzen, die in diesem Bereich absorbieren. Die Konzentration des Proteins ergibt sich nach folgender Gleichung:

$$c = \text{Abs}_{280} / (\epsilon \times d)$$

mit  $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient des Proteins,  $d$  = Schichtdicke der verwendeten Küvette.

## 2.5.4 Peptidtransport in Hefe-Mikrosomen

### 2.5.4.1 Transport von nicht glykosilierbaren Peptiden

Bei Peptidtransportstudien wird die ATP-abhängige Akkumulation eines radioaktiv markierten Peptides in Membranen untersucht.

Dazu wurden frisch aufgetaute Membranen wie z.B. Mikrosomen (ca. 40 µg Gesamtprotein) mit 70 µl Transportpuffer versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 100 nM radioaktivem Peptid gestartet. Alle Testansätze enthielten 3 mM ATP, die Kontrollansätze wurden ohne ATP in Gegenwart von Apyrase inkubiert. Nach 5 min. bei 37°C wurde der Peptidtransport durch Zugabe von 650 µl eiskaltem Transportpuffer und 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4°C gestoppt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800 µl kaltem Transportpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurde der Überstand vollständig entfernt und die Radioaktivität in den Vesikeln im  $\gamma$ -Zähler bestimmt.

Transportpuffer            0,1% BSA (gegen PBS dialysiert)  
                                  1 mM DTT  
                                  5 mM MgCl<sub>2</sub> in PBS

### 2.5.4.2 Transport von glykosylierbaren Peptiden

Glykosylierte Peptide können durch spezifische Bindung an Concanavalin A-Sepharose isoliert und durch Messung der Radioaktivität im  $\gamma$ -Zähler quantifiziert werden (Neefjes *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1994).

Die Ansätze wurden wie für den Transport von nicht glykosylierbaren Peptiden behandelt, allerdings wurde der Transportpuffer zusätzlich mit je 50 µM UDP-Glukose, GDP-Mannose und UDP-N-Acetylglukosamin versetzt (Meyer, 1996).

## 2.5.5 TCA-Fällung von Proteinen

Die Fällung von Proteinen aus Lösung zur Konzentrierung erfolgte mittels Trichloressigsäure (TCA). Dazu wurden 200 µl der Proteinlösung mit 200 µl einer 20%-igen TCA-Lösung gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden anschließend bei 12.000g für 20 min abzentrifugiert. Das Proteinpellet wurde mit 200 µl Aceton gewaschen und anschließend getrocknet. Die Proben wurden in Probenauftragspuffer gelöst und 10 min bei 95°C erhitzt.



### 2.5.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAA-Gel) wurden 12 oder 15%-ige Trenngele verwendet, die jeweils mit einem 5%-igen Sammelgel überschichtet waren. Die Größe der Minigele betrug  $10 \times 8 \times 0,5 \text{ cm}^3$ . In einem Gelgießblock wurden parallel 9 Gele gegossen, die nach dem Polymerisieren in feuchte Zellstofftücher verpackt und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Die Proben wurden vor dem Auftrag mit 1/10 Volumen des Auftragspuffers versetzt, 5 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt und 10 min bei 12.000g abzentrifugiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer konstanten Spannung von 160 V.

Trenngel 12%	28,8 ml dest Wasser 13,5 ml 2M Tris/HCl (pH8,8) 28,8 ml 30% Acrylamid 720 $\mu\text{l}$ 10% SDS 140 $\mu\text{l}$ 10% Ammoniumperoxodisulfat 36 $\mu\text{l}$ TEMED
Trenngel 15%	21,6 ml dest Wasser 13,5 ml 2M Tris/HCl (pH8,8) 36 ml 30% Acrylamid 720 $\mu\text{l}$ 10% SDS 140 $\mu\text{l}$ 10% Ammoniumperoxodisulfat 36 $\mu\text{l}$ TEMED
Sammelgel 5%	31,2 ml dest. Wasser 5,65 ml Tris/HCl (pH6,8) 7,5 ml 30% Acrylamid 450 $\mu\text{l}$ 10% SDS 210 $\mu\text{l}$ 10% Ammoniumperoxodisulfat 75 $\mu\text{l}$ TEMED

---

Probenauftragpuffer (10-fach)	100 mM Tris/HCl (pH6,7) 20% (v/v) Glycerin 20% /w/v) SDS 6 M Harnstoff 100 mM DTT 0,1% Bromphenolblau Lagerung nach Zusatz von DTT bei -20°C
Laufpuffer	192 mM Glycin (pH 8,3) 26 mM Tris 0,1% (w/v) SDS

## 2.5.7 Proteinfärbung

### 2.5.7.1 Coomassie-Färbung

Standardmäßig wurden PAA-Gele mittels Coomassie R250 angefärbt. Dazu wurden sie für 10 bis 30 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff mehrere Stunden oder über Nacht durch Inkubation in Entfärber-Lösung entfernt.

Färbelösung	2,5g Coomassie R250 werden in 900ml 1:1 Methanol:Wasser gelöst und die Lösung filtriert
Entfärber	12,5% Ethanol 4% Essigsäure

### 2.5.7.2 Kolloidale Coomassie-Färbung nach Neuhoff

Mit dieser Methode können Proteinmengen bis 1 ng Protein/mm<sup>2</sup> Gel detektiert werden. Das Gel wurde 20 min in 12% TCA fixiert und anschließend über Nacht unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert. Freier Farbstoff wurde mit Entfärber ausgewaschen.

Färbelösung	80 ml 10% (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 2% (v/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 20 ml Methanol 5% Coomassie G in Wasser
Entfärber	1% (w/v) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2% (v/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

### 2.5.7.3 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulose-Membranen

An Nitrocellulose-Membranen gebundene Proteine können durch Ponceau S-Färbung reversibel angefärbt werden. Diese Färbung wurde zur Kontrolle des Proteintransfers vor Entwicklung der Immunoblots durchgeführt.

Die Membranen wurden nach dem Transfer für ca. 2 min in Ponceau S-Lösung (1:10 Verdünnung einer konzentrierten Lösung, Sigma) inkubiert und anschließend ungebundener Farbstoff mit Wasser abgespült. Durch Inkubation in TBST-Puffer (2.2.1; mehrfacher Pufferwechsel) konnte die Membran vollständig entfärbt werden.

### 2.5.8 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Die im PAA-Gel aufgetrennten Proteine werden bei dieser Methode durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

#### 2.5.8.1 „Semidry-Blotting“

Bei dieser Methode des Transfers wird mit extrem geringen Puffermengen gearbeitet und der Transfer in einer speziellen Apparatur durchgeführt. Auf die Graphitanode werden drei mit Transferpuffer getränkte 3MM-Whatman-Filter, die angefeuchtete Nitrocellulose-Membran, das Gel und erneut drei angefeuchtete 3MM-Whatman-Filter aufgelegt. Es ist wichtig, dass beim Aufeinanderschichten keine Luftblasen eingeschlossen werden. Abschließend wird die Kathode aufgesetzt und die Transferapparatur geschlossen. Der Transfer erfolgt bei konstantem Strom von 120 mA pro 70 cm<sup>2</sup>-Membranfläche für 1 h 15 min.

### 2.5.8.2 Tank-Blot

Für diesen Transfer wurden Gel und Membran zwischen 3MM-Whatman-Filterpapieren und Schaumstoffpolstern in ein Plastikgitter eingespannt und in die mit Transferpuffer gefüllte Tank-Blot-Apparatur gesetzt. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 16 V und Raumtemperatur oder unter Kühlung bei 4°C für insgesamt 3 h bei 45 V. Dieser Transfermethode wurde angewendet, wenn ein effizienter Transfer von Proteinen im hohen Molekulargewichtsbereich erforderlich war.

Transferpuffer	39 mM Glycin
	48 mM Tris
	0,0375% (w/v) SDS
	20% (v/v) Methanol

### 2.5.9 GDPase/CDPase Aktivitätsbestimmung

GDPase diente bei der Isolierung von Organellen als Markerenzym für das Golgi-Kompartiment (Abeijon *et al.*, 1989). Dabei muss jedoch die unspezifische CDPase Aktivität subtrahiert werden.

25 µl einer Hefe-Organellfraktion wurden mit 75 µl NDPase-Puffer versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 7 mM GDP oder CDP gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurden die Reaktionen mit 100 µl 5% (w/v) SDS-Lösung gestoppt.

Die GDPase- bzw. CDPase-Aktivitäten wurden anschließend durch die kolorimetrische Bestimmung des freigesetzten Phosphates ( $P_i$ ) (Sarkadi *et al.*, 1992) bestimmt. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 300 µl Molybdat-Reagens und 750 µl 20% (v/v) Essigsäure versetzt und der gebildete Phosphat-Molybdat-Komplex durch Zugabe von 150 µl 1% (w/v) Ascorbinsäure reduziert. Über eine Eichkurve mit definierten Phosphatmengen konnte die absolute Menge an freigesetztem Phosphat errechnet werden.

NDPase-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 7,4)
	2 mM $CaCl_2$
	1% (v/v) Triton X-100
Molybdat-Reagens	2,5 M $H_2SO_4$
	1% (w/v) Ammoniummolybdat
	0,014% (w/v) Kaliumantimontartrat

### 2.5.10 Aktivitätstest für Calpastatin

Der Abbau von Casein durch Calpain setzt Peptide frei, die bei einer TCA-Fällung im Überstand verbleiben und durch eine Farbreaktion photometrisch quantifiziert werden können.

X µl Calpastatin-Lösung wurden mit 40 µl Casein, 20 µl 50 mM Cystein und 2 µg m-Calpain (Sigma oder Biomol) in einem Reaktionsvolumen von 180 µl für 5 min bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 µl 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde die Proteolyse gestartet und für 20 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis durch Zugabe von 200 µl 5% TCA gestoppt und für 20 min gefällt. Die Ansätze wurden bei 12.000g, 4°C für 10 min zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die Überstände wurden mit 0,5 M NaOH-Lösung neutralisiert und mit 50 µl frischer 2 M Iodacetat-Lösung 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die carboxymethylierten Peptide wurden nach Lowry bei 750 nm quantifiziert.

Casein	2% (w/v) Casein (nach Hammarsten, VMR)
	0,5 M Imidazol, pH7,5

## 2.6 Methoden des bakteriellen Expressionssystems

### 2.6.1 Expression

Für alle bakteriellen Expressionen wurde der Vektor pet15b (Novagen) eingesetzt. In diesem Plasmid steht die Proteinexpression unter der Kontrolle eines T7-Phagenpromotors, der von einem *lac*-Operator-Element kontrolliert wird. Die Erkennung des Promotors erfolgt durch die T7-Polymerase, die im Genom des *E. coli* Stammes BI21(DE3) codiert ist, nachdem ihre Produktion durch Zugabe von IPTG induziert wurde.

Eine Übernachtskultur, die mit einer Einzelkolonie des Expressionsstammes inokuliert worden war, wurde am nächsten Tag 1:20 in LB/Amp-Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,6 bis 0,8 angezogen. Durch Zugabe von IPTG ad 1 mM wurde die Transkription induziert und durch stündliche Entnahme einer Probe kontrolliert (OD<sub>600</sub>-Messung und PAA-Gel Analyse. Die Kulturen wurden nach der Induktion für weitere 4 bis 12 h inkubiert und anschließend durch Zentrifugation bei 3.500g, 10 min, 4°C geerntet. Die Zellpellets wurden bei -20°C gelagert.

Die Anreicherung von Proteinen mit dem Isotop  $^{15}\text{N}$  erfolgte durch Expression in NMM-Medium, das mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid angesetzt wurde. Da das Wachstum der Zellen auf dem Minimalmedium deutlich verlangsamt war, wurde die Expression nach der Induktion über Nacht fortgesetzt (12 bis 16 h).

### **2.6.2 Zellaufschluss mittels „French Pressure Cell“**

Bei diesem Gerät handelt es sich um eine hydraulische Presse, die einen Kolben in einen Stahlzylinder drückt, der eine Bakteriensuspension enthält. In den Zellen wird durch die Kompression ein hoher Druck erzeugt. Beim geregelten Austritt aus der Kammer kommt es zu einem plötzlichen Druckabfall, der die Zellen Platzen läßt.

Die Zellen einer 4 L Expressionskultur werden in 50 ml kaltem Aufschlusspuffer (s. 2.7.1) resuspendiert und mit einer Proteaseinhibitor-Tablette, die kein EDTA enthält (Roche), versetzt. Die Zellsuspension wird in den vorgekühlten Stahlzylinder gefüllt und der aufgesetzte Kolben in die Presse eingespannt. Sobald ein Druck von  $1,3 \times 10^7$  Pa erreicht war, wurde das Auslaßventil geöffnet und die austretende Bakteriensuspension aufgefangen. Um einen effektiven Aufschluss zu erzielen, wurde der Vorgang einmal wiederholt. Anschließend wurde das Lysat für 1 min Ultraschallwellen ausgesetzt, um die bakterielle DNS zu scheren, und durch Zentrifugation (30 bis 45 min, 30.000g, 4°C) geklärt.

## **2.7 Reinigung von Proteinen**

### **2.7.1 Native Nickelionen-Affinitätschromatographie**

Proteine mit einer Hexahistidinfusion binden mit hoher Affinität an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarosesäulen, da die Histidine mit den immobilisierten Nickelionen Chelate bilden. Für die Affinitätschromatographie wurde das „NiNTA-Superflow“-Material der Firma Qiagen verwendet, das 5 bis 10 mg Protein pro Milliliter binden kann und aufgrund der dicht vernetzten Agarose bei Flussraten bis 20 ml/min stabil ist.

Das Zellpellet einer 4 L-Expressionskultur wurde in 40 ml Aufschlusspuffer mit Proteaseinhibitoren (Roche) resuspendiert und mit der „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Der Überstand der Zentrifugation, der die löslichen Proteine enthält, wurde auf pH8 eingestellt und mit 6 ml NiNTA-Material, das zuvor zweimal mit Aufschlusspuffer gewaschen wurde, versetzt. Die Suspension wurde für 1 h auf einem Überkopf-Rad inkubiert und anschließend in eine leere Säule gepackt. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min mit Aufschlusspuffer gespült, bis mit einem UV-Detektor bei 280 nm kein Protein im Durchfluss nachweisbar war. Entsprechend wurde mit dem Waschpuffer verfahren. Zur Elution wurde die Säule

direkt mit dem Elutionspuffer oder einem Gradienten aus Wasch- und Elutionspuffer gespült und der Durchlauf in Fraktionen à 1,5 ml gesammelt. Die Fraktionen wurden im PAA-Gel analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten wurden dialysiert und eingengt.

Aufschlusspuffer      50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8,0  
                                 300 mM NaCl,  
                                 10 mM Imidazol

Waschpuffer            50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8,0  
                                 300 mM NaCl,  
                                 25 mM Imidazol

Elutionspuffer        50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH8,0  
                                 300 mM NaCl,  
                                 250 mM Imidazol

### 2.7.2 Denaturierende Nickelionen-Affinitätschromatographie

Da Zellpellet einer 4 L-Expressionskultur wurde mit 40 ml D-Aufschlusspuffer versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Zellsuspension wurde für 45 min bei 30.000g zentrifugiert und der pH-Wert des Überstandes kontrolliert. Dieser wurde mit 6 ml äquilibriertem NiNTA-Material versetzt und für 1 h auf einem Überkopf-Rad inkubiert. Nachdem das Material in eine leere Säule gepackt war, wurde die Säule nacheinander mit den D-Waschpuffern 1 und 2 gespült (1,5 ml/min), bis im Durchlauf kein Protein mehr detektierbar war. Die Elution erfolgte mit dem D-Elutionspuffer durch eine Änderung des pH-Wertes und wurde in Fraktionen à 1 ml aufgefangen.

Die Fraktionen wurden im PAA-Gel analysiert. Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten wurden dialysiert und eingengt.

D-Aufschlusspuffer 1    100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                                 10 mM Tris/HCl, pH8,0  
                                 6 M Guanidinium-Hydrochlorid

D-Waschpuffer 1        100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

---

	10 mM Tris/HCl, pH8
	8 M Harnstoff
D-Waschpuffer 2	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Tris/HCl, pH6,3
	8 M Harnstoff
D-Elutionspuffer	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	10 mM Tris/HCl, pH4,5
	8 M Harnstoff

### 2.7.3 Molekularsieb-Chromatographie

Eine Molekularsieb-Chromatographie von Calpastatin-Fragmenten wurde mit einer Superdex 200-Säule (Amersham Pharmacia) durchgeführt, die eine Analyse im Molekulargewichtsbereich von 10 bis 600 kDa zulässt. Über NiNTA-Affinitätschromatographie gereinigte Proteine wurden gegen GF Puffer A dialysiert. Mit diesem Puffer wurde auch die Säule über Nacht bei einer Flussrate von 0,7 ml/min gespült.

Das dialysierte Protein wurde aufgetragen und der Säulenlauf bei einer Flussrate von 0,5 ml/min betrieben; die Fraktionsgröße betrug 2 ml. Die Fraktionen wurden im PAA-Gel analysiert. Unter analogen Bedingungen wurde eine Chromatographie zur Kalibrierung durchgeführt („Gel Filtration HMW Calibration Kit“, Amersham Pharmacia)

GF Puffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH8
	100 mM NaCl, 2 mM EDTA,
	3 mM β-Mercaptoethanol



## D. Strukturelle Charakterisierung des Calpastatin

### 1 Ergebnisse

#### 1.1 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war die strukturelle Charakterisierung von Calpastatin. In der Literatur beschriebene Strukturuntersuchungen an isolierten inhibitorischen Domänen ergaben, dass das Protein in Lösung unstrukturiert vorliegt. Um auszuschließen, dass sich isolierte Domänen nicht korrekt falten können, sollten die Experimente mit dem Gesamtprotein durchgeführt werden. Dazu war es zunächst nötig ein bakterielles Expressionssystem zu etablieren, das die Produktion ausreichender Mengen des Vollängenproteins zulässt.

Weiterhin sollten unterschiedliche Konstrukte der ersten inhibitorischen Domäne expremiert und mittels NMR-Spektroskopie im Hinblick auf ihre Faltung analysiert werden. Damit könnten Aussagen über einen möglichen Einfluss der Domänengrenzen auf die Faltung getroffen werden.

#### 1.2 Vollängen-Calpastatin

##### 1.2.1 Herstellung von rekombinantem Calpastatin

###### 1.2.1.1 Untersuchung der cDNS

Für die Arbeiten zur Untersuchung von Calpastatin wurde eine cDNS im Vektor pcDNA1/Neo (Invitrogen) von Marc Piechazyk (Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier) zur Verfügung gestellt. Bei dieser cDNS sollte es sich um die codierende Sequenz des humanen Calpastatin handeln, die im 5' und 3'-Bereich von untranslatierten Regionen flankiert ist.

Das Plasmid aus dem Klon PM194 (pcDNA1/Neo in *E. coli* MC1061/P3) wurde durch Restriktionsanalysen und DNS-Sequenzierung charakterisiert. Beide Analysen ergaben, dass es sich bei der zur Verfügung gestellten cDNS um die Sequenz von Calpastatin aus Kaninchen (*Oryctogalus cunnigulus*) handelte. Die Sequenzierung zeigte ferner, dass die cDNS sechs Punktmutationen, die z. T. zu Aminosäuresubstitutionen führten, und eine Verschiebung des Leserasters aufwies. Ein Vergleich der Primärsequenzen (Abbildung 6) ergab, dass die Proteine eine Identität von 74% und eine Homologie von 84% aufweisen.

Human	MNPTEKAI PVSQQMEGPHLPNKKKHKQAVKTEPEKKSQSTKLSVVEHEKKSQEGKPKEH	60
Kaninchen	MNPAEAKAVPISKEMEGPHPHSKKRHRRDQAKTEPEK-SQSTKPPVDHEKKAQEGKPKEH ***:	59
Human	TEPKSLPKQASDTGSNDAHNNKAVSRSAEQQPSEKSTEPKTKPQDMISAGGESVAG-ITA	119
Kaninchen	TKPKSTHKHASDGEKGHRNEKTASRSKEPVTPAKRTEPETKPKQDTPKAGGKSVAAAGTTA *:*:* *:*:* : ::*:* * * * * * ::*:* * * *:*:* * *	119
Human	ISGKPGDKKKEKSLTPAVPVESKPKPSGKSGMDAALDDLIDTLGGPEETEENTTYTG	179
Kaninchen	APGKAGDPKKEKSLPAAALAEPKPDEPSGKSGMDAALDDLIDTLGEPSETQEDSTAYTG *	179
Human	PEVSDPMSSTYIEELGKREVTIPPKYRELLAKKEGITGPPADSSKPIGPDDAIDALSSDF	239
Kaninchen	PEISDPMSSTYIEELGKREVTIPPKYRELLEKKTGVAGPPDSVTPLGPDDAIDALSSDF *:	239
Human	TCGSPTAAGKKTEKEEST--EVLKAQSAGTVRSAAPPQEKKRKVEKDTMSDQALEALSA	296
Kaninchen	TCSSPVASGKEAGKEAKSAGEVLEAESAKVMRAAAPQEKKRKVEEDAMSDQALEALSA *	299
Human	SLGTRQAEPELDLRSIKEVDEAKAKEEKLKCGEDETIPSEYRLKPATDKDGKPLLPEP	356
Kaninchen	SLGTRMAEPELDLSSIKEVAEAKRKEEKVEKCGEDETVPAEYRLKPATDKDGKPLLPEP *	359
Human	EKPKRSESELIDELSEDFDRSECKEKPTEKTEESKAAAPAVSEAVSRTSMCSIQ	416
Kaninchen	AEKPKRSESELIDELSKDFSQAKSNEKQPKPTGKTEESKAAVPAPVAEAVPRTSMCSIQ *	419
Human	SAPPEPATLKG-TVPDDAVEALADSLGKKEADPEDGKPVMDKVKEKAKEEDREKLGEKEE	475
Kaninchen	PVPPKPSLQKSTVPDDAVEALAGSLGRKKEADPEEGKPVADKIKEKSKEEREKLGEKEE *	479
Human	TIPPDYRLEEVDKDKGKPLPKESKEQLPPMSEDFLLDALSEDGSGPQNASSLKFDKAKL	535
Kaninchen	TIPPDYRLEEAKDKDKGKPLPSEPTAQLPALSEDLLLDALSEDGSGPSASSLKFDKAKL *	539
Human	AAASEVVSQTPASTTQAGAPPRDTSQSDKDLDDALDKLSDSLGQRQPPDENKPMGDKV	595
Kaninchen	SAAVSEVVSQSPASITRATAPPDTRPSNDELDDALDKLSDSLGQRQPPDENKPMEDKV :*:	599
Human	KEKAKAEHRDKLGERDDTIPPEYRHLDDNGQDKPVKPPTKKSEDSKKPADDQDPIDALS	655
Kaninchen	KERAKKEHKDKLGERDDTIPPEYRHLDDQGEQDKPEKPPTKKSKIKKAGDQDPIDALS *:*:* *:	659
Human	GDLDCPSTTETSQNTAKDKCKK-AASSKAPKNGGKAKDSAKTTEETSKPKDD-----	708
Kaninchen	GDLDCPPAAETSQATEKDKSKTTTASSKAAKHGDKAKDSAQTTTEETSKPKANENAS *	718

Abbildung 6. Vergleich der Proteinsequenzen von Calpastatin aus Mensch und Kaninchen

Die aus der Swiss-Prot Datenbank entnommenen Sequenzen (P20810, P08855) wurden mit Hilfe des Programms ClustalW verglichen. Identische Aminosäuren sind durch \*, homologe Reste durch : gekennzeichnet. Das Calpastatin aus Kaninchen zeigt eine Identität von 74% und eine Homologie von 84% zum Protein humanen Ursprungs.

### 1.2.1.2 Konstruktion des *E. coli* Expressionsvektors (pet15/RCstn)

Die cDNS für Calpastatin aus Kaninchen lag in dem Säuger-Expressionsvektor pcDNA1/Neo vor. Für die Expression des Volllängen-Proteins in *E. coli* wurde die kodierende Sequenz von 2154 Basenpaaren in den *E. coli* Expressionsvektor pet15b (Novagen) kloniert. Dieser stellt die Expression des Calpastatin-Gens unter Kontrolle eines T7-Promotors und das Protein wird N-terminal mit einer Hexahistidin-Fusion verknüpft („His<sub>6</sub>-Tag“), die durch die Protease Thrombin abspaltbar ist. Der His<sub>6</sub>-Tag ermöglicht eine Reinigung des rekombinanten Proteins über eine Metallionen-Affinitätschromatographie.

Für die Klonierung des Gens erfolgte zunächst eine PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden CstnN und CstnC (s. Anhang). Das isolierte DNS-Fragment wurde mittels „pCRScriptAmp Cloning Kit“ (Stratagene) kloniert. Anschließend wurde eine Deletionsmutation mit Hilfe des „Quick Change Mutagenesis Kits“ (Stratagene) und den Oligonukleotiden CstnMut1 und CstnMut2 durchgeführt, um die durch Insertion einer Base hervorgerufene Verschiebung des Leserahmens aufzuheben. Nach Überprüfung der Mutagenese durch Sequenzierung erfolgte eine Subklonierung in den Vektor pet15b über die Restriktionsschnittstellen NdeI und BamHI. Die Sequenzierung des Plasmids pet15b/RCstn ergab, dass die Mutagenese erfolgreich war.

### 1.2.1.3 Expression in *E. coli*

Zur Expression wurde das Plasmid pet15b/RCstn in die *E. coli* Stämme BI21(DE3), BI21(DE3)pLysS und BI21(DE3)pLysE transformiert. Die Analyse von Gesamtzell-extrakten nach der Induktion mit IPTG in einem 10%-igen PAA-Gel zeigte eine Stunde nach Induktion eine an Stärke zunehmende Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa (Abbildung 7).

Da das berechnete Molekulargewicht von Calpastatin bei 76,9 kDa liegt, wurde die Identität des induzierten Proteins durch eine Immunoblot-Analyse mit einem gegen die Histidin-Fusion gerichteten Antikörper (Penta-His Antikörper, Qiagen) überprüft. Dieser Antikörper zeigte eine Reaktion mit dem induzierten Protein. Zusätzlich wurden einige Proteine mit geringerem Molekulargewicht detektiert, die vermutlich auf die Degradation des Proteins während der Expression zurückzuführen sind, da diese Banden im zeitlichen Verlauf der Expression an Stärke zunahmen.

Die durchgeführten Testexpressionen ergaben eine maximale Proteinproduktion in dem Stamm BI21(DE3)pLysE bei 37°C und einer Induktion der Zellen bei OD<sub>600</sub>=0,6 mit 1 mM IPTG. Die Expression in *E. coli* wurde drei Stunden nach Induktion ab-

gebrochen, um die intrazelluläre Degradation des Calpastatins möglichst gering zu halten.

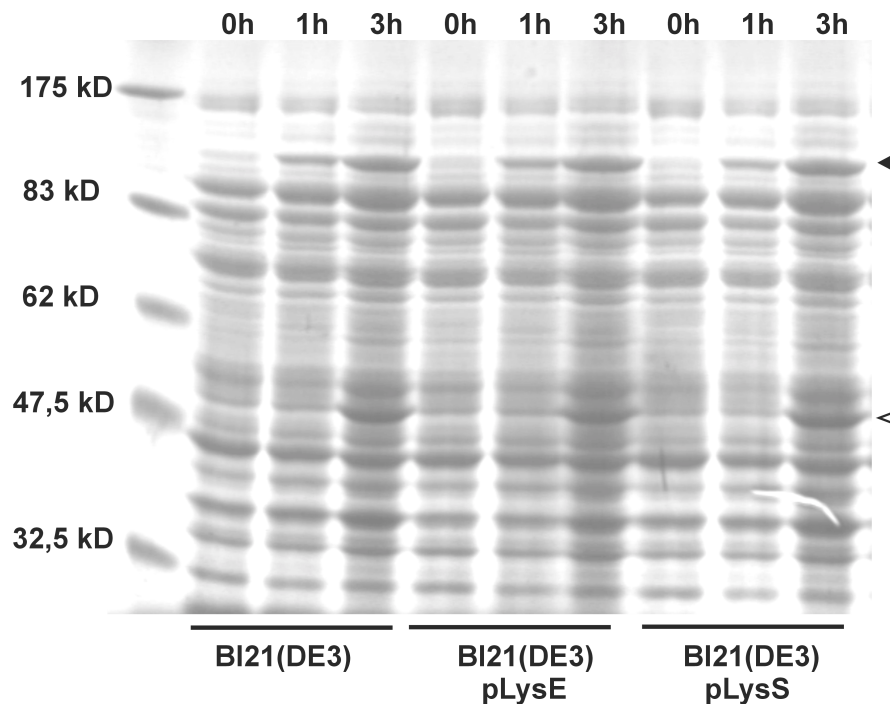


Abbildung 7. **Bakterielle Expression von Calpastatin**

Die Proteinexpression wurde in den *E. coli* Stämmen BI21(DE3), BI21(DE3)pLysE und BI21(DE3)pLysS, die mit dem Plasmid pet15b/RCstn transformiert waren, durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Zum Induktionszeitpunkt (0h), sowie nach 1, 2 und 3 Stunden nach Induktion wurden Proben entnommen und die Gesamtzellextrakte im 10%igen PAA-Gel analysiert. Alle getesteten Bakterienstämme zeigten eine deutliche Überexpression (▶) des Calpastatins. Verlängerte Inkubationszeiten führten zu vermehrter Degradation (▷).

#### 1.2.1.4 Native Reinigung über Nickelionen-Affinitätschromatographie

Das Zellpellet einer ein Liter Expressionskultur wurde in Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren und 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol mittels einer „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Das geklärte Lysat wurde wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben über eine NiNTA-Säule (Qiagen) gereinigt.

Die Analyse der Proben im Coomassie gefärbten PAA-Gel ergab, dass das Volllängen-Calpastatin aus Kaninchen in Bakterien löslich expremiert wird und sich über die Metallionen-Affinitätschromatographie anreichern lässt. Mittels Edman-Sequenzierung (Abteilung Prof. Lottspeich) konnte die Identität des Calpastatins bestätigt werden. Neben dem Volllängenprotein mit 110 kDa wurden während der Reinigung auch Proteine von etwa 50 und 35 kDa angereichert. Die Analyse der Elutionsfraktionen im Immunoblot zeigte, dass es sich bei diesen Proteinen um N-

terminale Fragmente des Calpastatins handelt. Fragmente ähnlicher Größe wurden bereits während der Expression nachgewiesen und sind vermutlich auf die Degradation des Proteins während der bakteriellen Expression zurückzuführen. Die Affinitätsreinigung von Calpastatin ergab unter nativen Bedingungen im Durchschnitt eine Ausbeute von 7,5 mg Vollängen-Calpastatin mit einer Reinheit von etwa 80%. Wurde die Reinigung zusätzlich um eine Hitzedenaturierung und eine Molekularsieb-Chromatographie (Superdex 200, Amersham Pharmacia) erweitert, konnte ein Reinheitsgrad von ca. 95% im Coomassie gefärbten PAA-Gel erzielt werden.

## 1.2.2 Charakterisierung des rekombinanten Calpastatins

### 1.2.2.1 Bestimmung der Aktivität

Die Aktivität von Calpain kann durch das Ausmaß der Hydrolyse von Casein bestimmt werden. Die Proteolyse in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch Zugabe von TCA gestoppt und die Menge der aus der Casein-Spaltung hervorgegangenen säurelöslichen Peptide nach der Lowry-Methode quantifiziert. Zur Bestimmung der Aktivität von Calpastatin wurden dem Reaktionsansatz (s. Abschn. 2.5.10) unterschiedliche Mengen des Inhibitors zugesetzt und die Restaktivität des Calpains bestimmt.

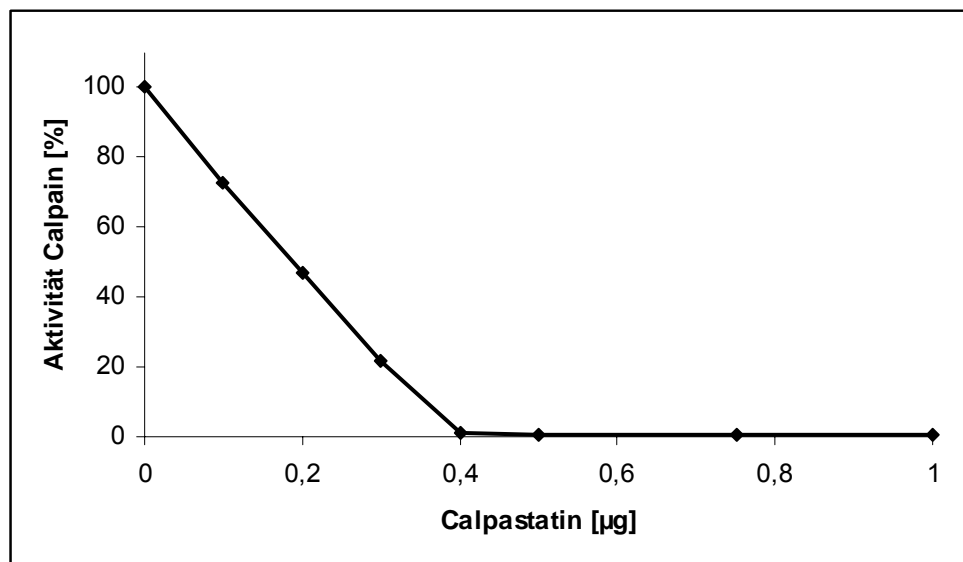


Abbildung 8: **Aktivität des rekombinanten Calpastatins**

M-Calpain (2 µg) wurde in Gegenwart von Kalzium mit Casein und zunehmenden Mengen Calpastatin inkubiert. Die durch Proteolyse entstandenen Peptide wurden nach einer TCA-Fällung quantifiziert. Die Aktivität von Calpain in Abwesenheit des Inhibitors wurde auf 100% gesetzt, alle anderen Aktivitäten wurden auf diesen Wert bezogen.

Die Ergebnisse zeigten, dass schon der Zusatz geringer Mengen des Inhibitors (0,1 µg) eine deutliche Reduktion der Calpain-Aktivität bewirkt. Der Zusatz von  $\geq 0,4\mu\text{g}$  Calpastatin inhibierte das eingesetzte Calpain vollständig. Diese Menge entspricht einem molaren Calpain : Calpastatin Verhältnis von 4 : 1. Das rekombinant hergestellte Calpastatin wies damit volle inhibitorische Aktivität auf.

### 1.2.2.2 Proteolytischer Verdau mit Thrombin

Die N-terminale Hexahistidin-Fusion des rekombinante Calpastatins ist durch die Protease Thrombin abspaltbar. Durch die Inkubation des Proteins mit Thrombin sollte einerseits die Protease-Stabilität des rekombinanten Proteins untersucht werden. Zum anderen sollte die Entfernung des Affinitätstags zu einer weiteren Aufreinigung des Proteins ausgenutzt werden.

Je ein Milligramm Calpastatin wurde mit 0,5, 1 und 2 Einheiten Thrombin (Roche) bei 37°C inkubiert. Um den Fortschritt des proteolytischen Verdau zu beobachten, wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen. Die Analyse im PAA-Gel (Abbildung 9) zeigte, dass bereits der Zusatz sehr geringer Mengen Thrombin (0,5 U/mg Protein) innerhalb weniger Minuten eine nahezu vollständige Degradation des Calpastatins bewirkte. Mit der Abnahme der Bande des Volllängenproteins traten neue Proteinbanden auf, die jedoch im weiteren Verlauf der Inkubation vollständig abgebaut wurden.

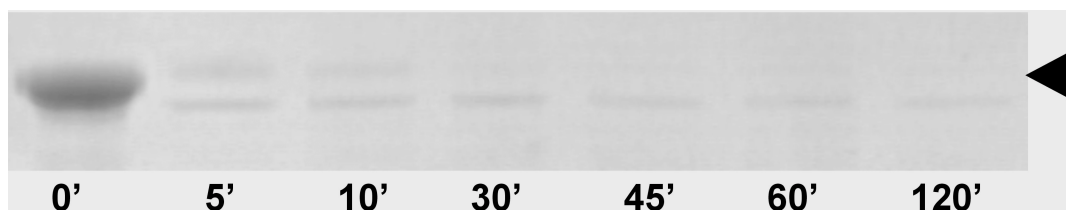


Abbildung 9. **Limitierte Proteolyse von Calpastatin durch Thrombin**

Ein Milligramm gereinigtes Calpastatin wurde mit 0,5 Einheiten Thrombin (Roche) versetzt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und im 10 % PAA-Gel analysiert.

### 1.2.2.3 Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen

Zu einer weiteren Charakterisierung des rekombinanten Calpastatins sollte seine Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen untersucht werden. Dazu wurde nativ gereinigtes Calpastatin durch Hitze denaturiert und in Gegenwart von Guanidinium-Hydrochlorid denaturierend gereinigt. Nach Entfernung des denaturierenden Einflusses wurde mit dem renaturierten Protein ein Aktivitätstest durchgeführt.

#### 1.2.2.3.1 Hitzedenaturierung

Unter nativen Bedingungen angereinigtes Calpastatin wurde 10 min bei 95°C inkubiert und die Lösung anschließend für 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Eine Analyse (Abbildung 10) von Überstand und Pellet der so behandelten Proteinlösung zeigte, dass die Verunreinigungen durch Hitzebehandlung nahezu vollständig denaturierten und in der Pelletfraktion nachzuweisen waren. Das rekombinant hergestellte Calpastatin hingegen verblieb im Überstand.

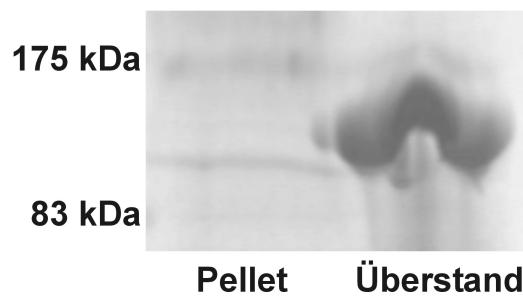


Abbildung 10. **Hitzedenaturierung von Calpastatin**

Nativ gereinigtes Calpastatin wurde 10 min bei 95°C inkubiert und denaturierte Fremdproteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Im 10% PAA-Gel wurden die in der löslichen und unlöslichen Fraktion enthaltenen Proteine aufgetrennt.

#### 1.2.2.3.2 Denaturierende Agenzien

Das Pellet einer ein Liter Expressionskultur wurde über Nacht unter Rühren in Guanidinium-Hydrochlorid-haltigem Puffer aufgeschlossen, und die Lösung durch Zentrifugation geklärt. Eine NiNTA-Säule wurde mit dem Lysat beladen und anschließend mit jeweils 10 Säulenvolumen denaturierendem und nativem Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte unter nativen Bedingungen durch Senkung des pH-Wertes. Die gelelektrophoretische Analyse der Elutionsfraktionen zeigte, dass das zuvor denaturierte Calpastatin unter nativen Bedingungen eluiert werden konnte und stabil in Lösung blieb. Im Vergleich zu nativ durchgeführten

Affinitätsreinigungen konnte unter denaturierenden Bedingungen 25% mehr Protein gereinigt werden (9,3 mg/L). Der Reinheitsgrad lag im PAA-Gel bei etwa 85%.

### 1.2.2.3.3 Aktivität nach Renaturierung

Entsprechend Abschnitt 1.2.2.1 wurden Aktivitätsuntersuchungen denaturiertem Calpastatin durchgeführt (Abbildung 11). Sowohl durch Hitze als auch durch Chemikalien denaturiertes Calpastatin zeigte nach Renaturierung eine dem nativen Inhibitor vergleichbare Aktivität.

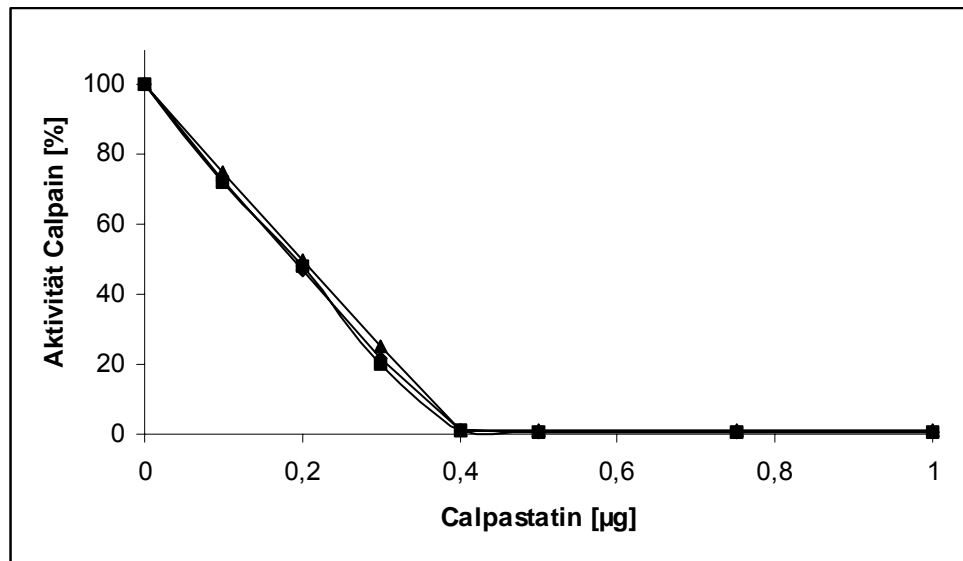


Abbildung 11. **Aktivität von renaturiertem Calpastatin**

M-Calpain (2 µg) wurde in Gegenwart von Kalzium mit Casein und zunehmenden Mengen renaturiertem Calpastatin inkubiert. Die durch Proteolyse entstandenen Peptide wurden nach einer TCA-Fällung quantifiziert. Die Aktivität von Calpain in Abwesenheit des Inhibitors wurde auf 100% gesetzt, alle anderen Aktivitäten wurden auf diesen Wert bezogen. Das durch Hitze (▲) oder Guanidinium-Hydrochlorid (■) denaturierte Calpastatin zeigte die gleiche Aktivität wie natives Protein (♦).

### 1.2.2.4 Versuche zur Kristallisation des Vollängenproteins

Für die Kristallisation wurde rekombinant exprimiertes Kaninchen-Calpastatin zunächst mittels nativer NiNTA-Chromatographie gereinigt. Nach einer sich anschließenden Hitzedenaturierung und einer Gelfiltrations-Chromatographie (Superdex 200, Amersham Pharmacia) wurde für das Calpastatin ein Reinheitsgrad von ca. 95% erreicht. Das gereinigte Protein wurde auf 9,8 mg/ml konzentriert und für die Kristallisation eingesetzt.

Die Kristallisationsversuche mit Calpastatin wurden nach der Methode des „hängenden Tropfens“ („hanging drop“) in einem Tropfenverhältnis von 1 : 1 und 1 : 2 (µl) durchgeführt. Als Präzipitanzlösung wurden die gebrauchsfertigen Puffer



des „Crystal Screen“ und „Crystal Screen 2“ (Hampton Research) eingesetzt. Die Kristallisationsansätze wurden sowohl bei 4°C als auch bei 20°C inkubiert und im wöchentlichen Abstand mikroskopisch auf Präzipitation und Kristallbildung untersucht.

Nach sechs Wochen zeigten einige Ansätze zwar deutliche Präzipitation, jedoch keine Nadel- oder Kristallbildung. Auch durch die Herstellung von „Feinscreens“, in denen die Zusammensetzung der Puffer, die eine Präzipitation des Proteins hervorriefen, leicht variiert wurde und den Einsatz höher konzentrierter Proteinlösungen (12 mg/ml) konnte keine Kristallisation von Calpastatin erreicht werden.

## **1.3 Inhibitorische Domäne 1**

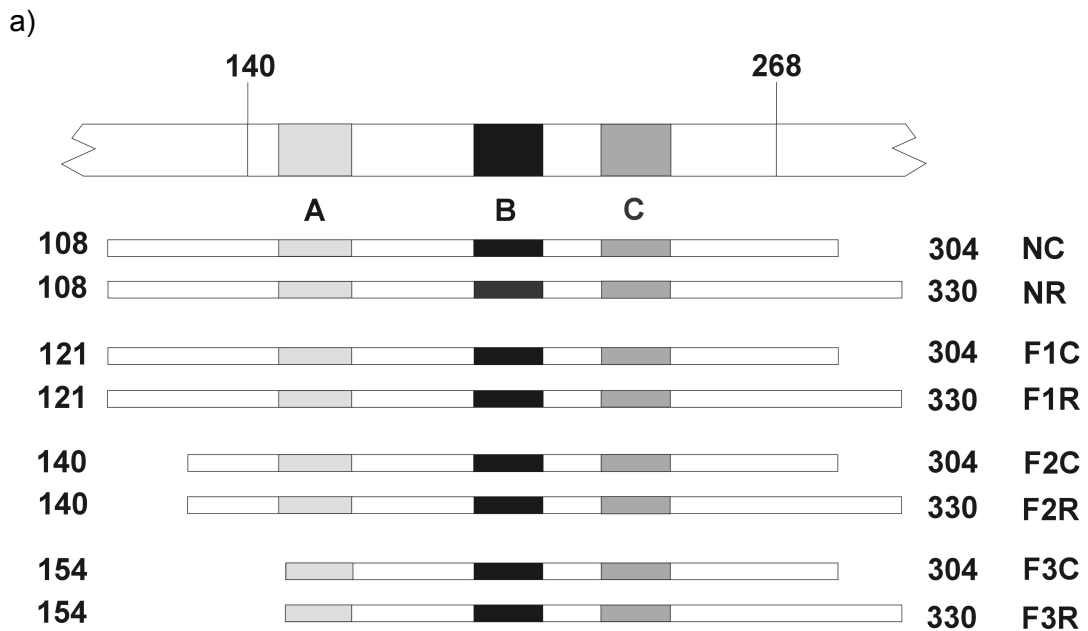
### **1.3.1 Herstellung von rekombinantem Protein**

#### **1.3.1.1 Klonierung der Expressionskonstrukte**

Für die Expression der ersten inhibitorischen Domäne von Kaninchen-Calpastatin wurden insgesamt acht Konstrukte in den *E. coli* Expressionsvektor pet15b kloniert. Diese Konstrukte unterscheiden sich in ihrer N- und C-terminalen Länge, beinhalten jedoch alle die drei hochkonservierten, für die Aktivität unablässigen Sequenzbereiche A, B und C. Abbildung 12 zeigt eine Übersicht der erstellten Konstrukte und gibt analog der Aminosäurenummerierung des Volllängenproteins die erste und letzte Aminosäure des jeweiligen Konstrukts an. Es wurden vier amino- (Aminosäuren 108/121/140/154) und zwei carboxyterminale (Aminosäuren 304/330) Begrenzungen der inhibitorischen Domäne gewählt, die im Hinblick auf die Faltungseigenschaften der Domäne charakterisiert werden sollten.

Für die Amplifikation der unterschiedlichen Konstrukte mittels PCR wurden Oligonukleotide entworfen, die in den 5'-Bereich der amplifizierten DNS die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NdeI und in den 3'-Bereich für BamHI einfügten. In Abbildung 12b sind die für die Amplifikation der Konstrukte eingesetzten Oligonukleotid-Kombinationen wiedergegeben.

Die amplifizierte DNS wurde zunächst in den Vektor pCRScriptAmp kloniert. Anschließend erfolgte eine Subklonierung der Konstrukte in den Expressionsvektor pet15b. Hierbei wurden für alle Fragmente die Restriktionsenzyme NdeI und BamHI verwendet. Alle erstellten Konstrukte wurden durch DNS-Sequenzierung überprüft.



b)

Konstrukt	NC	NR	F1C	F1R	F2C	F2R	F3C	F3R
CstnN108	X	X						
CstnN121			X	X				
CstnN140					X	X		
CstnN154							X	X
CstnC304	X		X		X		X	
CstnC330		X		X		X		X

Abbildung 12. Konstrukte für die Expression der inhibitorischen Domäne 1

a) Es wurden acht Expressionskonstrukte für die inhibitorische Domäne 1 von Calpastatin aus Kaninchen kloniert. Alle Konstrukte umfassten die konservierten Regionen A, B und C, hatten jedoch unterschiedliche N- und C-terminale Begrenzungen. Die Ziffern geben die erste und letzte Aminosäure der Konstrukte an.

b) Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Oligonukleotid-Kombinationen, die zur Amplifikation der unterschiedlichen Konstrukte eingesetzt wurden. Die Sequenzen der Oligonukleotide finden sich im Anhang.

### 1.3.1.2 Expression in *E. coli* und Reinigung

Die Expression der inhibitorischen Domäne erfolgte in dem *E. coli* Stamm BI21(DE3) pLysE bei 37°C. Mit Ausnahme der Konstrukte NR und F2R konnte im PAA-Gel für alle Konstrukte eine Überexpression nachgewiesen werden. Auch durch eine Variation der Expressionsbedingungen (Expressionsstamm, Temperatur, IPTG-Konzentration) konnte keine Überexpression dieser Konstrukte induziert werden.

Die Reinigung der Konstrukte der inhibitorischen Domäne 1 erfolgte analog zum Volllängenprotein durch native NiNTA-Affinitätschromatographie. Die Elutionsfraktionen wurden gegen PBS dialysiert und auf eine Konzentration von 0,5 bis 1,15 mM angereichert.

### 1.3.1.3 Aktivitätsanalyse der Expressionskonstrukte

Die Aktivität der unterschiedlichen Expressionskonstrukte wurde über das Ausmaß der Casein-Proteolyse durch m-Calpain bestimmt. Dazu wurden die Protease und der rekombinante Inhibitor in einem äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Die Analysen ergaben (Abbildung 13), dass die Konstrukte NR, F1C, F1R und F2C eine vergleichbare inhibitorische Aktivität aufwiesen. Sie führten in einer äquimolaren Mischung zu einer nahezu vollständigen Inhibition des Calpains.

Die mit Aminosäure 154 beginnenden Konstrukte F3C und F3R zeigten im Gegensatz dazu eine verminderte inhibitorische Aktivität. Sie führten bei einem molaren Verhältnis von 1 : 1 lediglich zu einer Reduktion der Calpain-Aktivität um 70%.

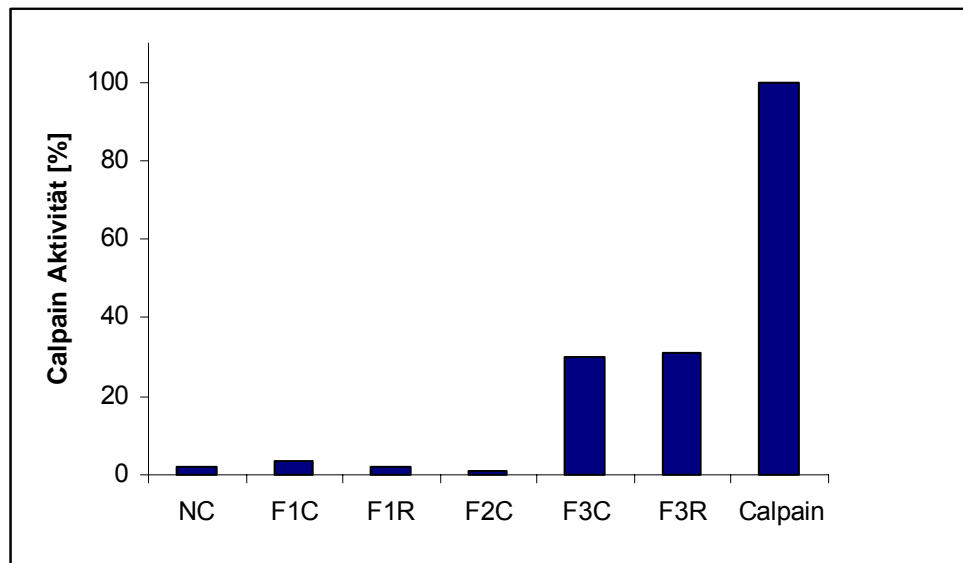


Abbildung 13. **Aktivität der rekombinanten inhibitorischen Domäne**

M-Calpain (2 µg) wurde in Gegenwart von Kalzium mit Casein und einer äquimolaren Menge der inhibitorischen Domäne 1 inkubiert. Die durch Proteolyse entstandenen Peptide wurden nach einer TCA-Fällung quantifiziert. Die Aktivität von Calpain in Abwesenheit des Inhibitors wurde auf 100% gesetzt, alle anderen Aktivitäten wurden auf diesen Wert bezogen.

### 1.3.2. Strukturuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie

#### 1.3.2.1 Eindimensionale NMR Untersuchungen

Die einfachste Form der NMR-Spektroskopie ist das eindimensionale (1D-) Experiment (s. Abschn. 1.3.3), das zu einer ersten spektroskopischen Charakterisierung von Proben herangezogen wird. Anhand der Signaldispersion kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob ein Protein in Lösung gefaltet ist. Einzelne Aminosäuren in Lösung oder ungefaltete Proteine zeigen lediglich eine geringe Signaldispersion, da alle Protonen eine ähnliche chemische Umgebung aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die Protonen strukturierter Proteine aufgrund der dreidimensionalen Faltung unterschiedliche chemische Verschiebungen auf.

Zur Charakterisierung der unterschiedlich langen Konstrukte der ersten inhibitorischen Domäne des Calpastatin wurden 1 D  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Abbildung 14 zeigt exemplarisch die 1 D-Spektren der Konstrukte F1R, F2C und F3R, die mit einem Bruker DRX-600 NMR-Gerät bei 298 K aufgenommen wurden. Alle Spektren zeigten sowohl im Bereich der chemischen Verschiebung der Amidprotonen (6 bis 11 ppm) als auch der aliphatischen Protonen (0 bis 3,5 ppm) keine ausgeprägte Signaldispersion. In den Spektren der Konstrukte F1R und F3R fallen die Resonanzen der Amidprotonen in einem engen Frequenzfenster von 6,8

---

bis 8,5 ppm zusammen. Ebenso wiesen die Spektren beider Konstrukte im Resonanzbereich unter 1,2 ppm keinerlei Signale auf. Lediglich das 1D-Spektrum von F2C hatte einige schwache Signale bei diesem für aliphatische Protonen charakteristischen Werten. Für die Amidprotonen kann bei dem Konstrukt F2C keine Aussage getroffen werden, da die Messung des 1D-Spektrums in einem Tris-haltigen Puffer erfolgte, dessen Aminprotonen in diesem Bereich Resonanzfrequenzen besitzen und die Proteinsignale überlagern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die geringe Signaldispersion der Amid- und aliphatischen Protonen darauf hinweist, dass keines der Konstrukte der ersten inhibitorischen Domäne von Kaninchen-Calpastatin unter physiologischen Bedingungen *in vitro* eine definierte Konformation annimmt.

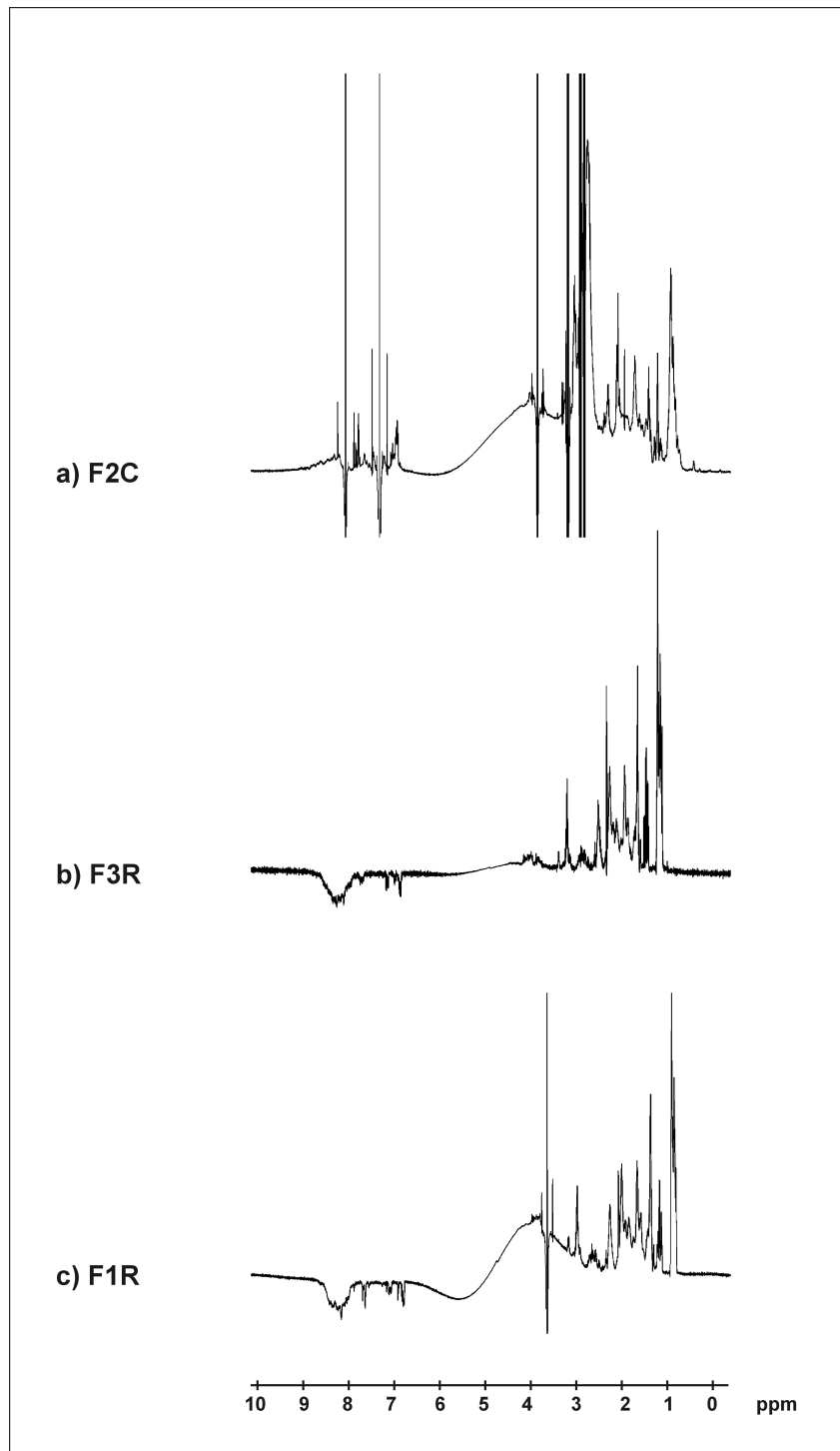


Abbildung 14. **1D  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren**

Die Spektren wurden von den Proteinen F2C, F3R und F1R bei 298 K mit einem Bruker DRX-600 Spektrometer aufgenommen. Die Proteine F3R und F1R lagen in PBS vor. Für die Messung von F2C wurden aufkonzentrierte Elutionsfraktionen der NiNTA-Reinigung eingesetzt. Die im Elutionspuffer enthaltenen Chemikalien Imidazol und Tris sind Ursache der starken Signale bei 8,5 – 9,5 sowie 3 – 4 ppm.

### 1.3.2.2 Zweidimensionale heteronukleare NMR-Untersuchungen

Eindimensionale NMR-Spektren von Peptiden und Proteinen weisen aufgrund der Vielzahl von Protonen starke Überlagerungen der Signale auf. Das Problem der spektralen Überlappung kann für Proteine, die ein Molekulargewicht bis 15 - 20 kDa haben, durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie gelöst werden. Bei größeren Proteinen eignen sich 2D-Spektren nicht mehr zur Identifikation der einzelnen Spinsysteme. Diesen Schwierigkeiten kann durch die Aufnahme heteronuklearer NMR-Experimente z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren begegnet werden.

Ohne eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Signale vorzunehmen, kann anhand der Dispersion der Signale vergleichbar zum 1D-Spektrum eine Aussage über die Faltung des Proteins gemacht werden. Eine starke Dispersion der Signale in einem  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum gibt einen Hinweis darauf, dass das untersuchte Protein eine definierte, nicht zufällige Faltung aufweist.

Zur Aufnahme von HSQC-NMR-Spektren war eine uniforme Markierung der Proteine mit dem stabilen Stickstoff Isotop  $^{15}\text{N}$  nötig. Dazu wurden die Expressionszellen auf Minimalmedium mit  $^{15}\text{N}$ -Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle angezogen. Die Zellen wurden, wie für LB-Medium beschrieben induziert. Allerdings wurde die Induktion über Nacht fortgesetzt, da das Wachstum der Kulturen auf Minimalmedium deutlich verlangsamt war.

Die Zellen wurden nach der Ernte lysiert und über eine NiNTA-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen in Gegenwart von  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgereinigt. Alle Konstrukte lieferten auch auf Minimalmedium lösliches Protein, jedoch verringerte sich die Proteinausbeute im Durchschnitt um ca.15% im Vergleich zur Expression auf Vollmedium. Die Elutionsfraktionen wurden in PBS dialysiert und aufkonzentriert. Die Endkonzentrationen der gereinigten Präparationen betragen 0,85 bis 0,9 mM.

Abbildung 15 zeigt exemplarisch das  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum einer uniform mit  $^{15}\text{N}$ -angereicherten Probe des Konstrukts F1R. Entsprechend den eindimensionalen NMR-Untersuchungen fand sich auch im HSQC-Spektrum lediglich eine geringe Signaldispersion. Fast alle Signale erscheinen im Frequenzbereich zwischen 8,8 und 8,2 ppm. Die HSQC-Spektren der anderen Expressionskonstrukte wiesen ebenfalls eine reduzierte Signaldispersion auf. Somit wurde die Faltung der inhibitorischen Domäne in den analysierten Konstrukten nicht von den gewählten Domänengrenzen beeinflusst. Vielmehr ist das Zusammenfallen der NMR-Signale ein deutliches Zeichen dafür, dass die inhibitorische Domäne von Calpastatin in Lösung keine definierte Struktur annimmt.

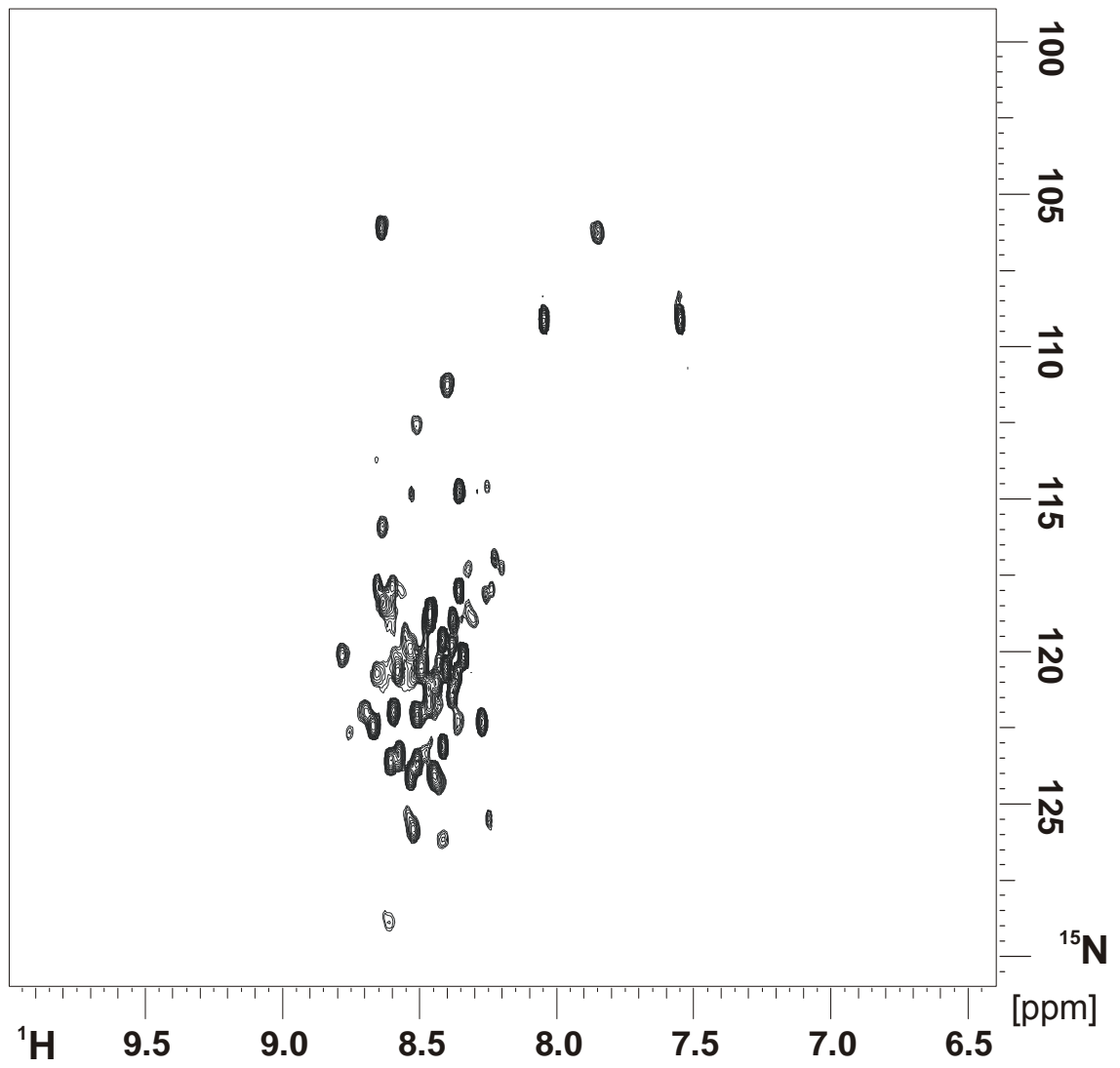


Abbildung 15.  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC des Konstrukts F1R der inhibitorischen Domäne 1



#### 1.3.2.4 Untersuchung der Interaktion mit Calpain (TROSY)

Obwohl die isolierte inhibitorische Domäne in Lösung unstrukturiert vorlag, zeigte sie inhibitorische Aktivität. Die Inhibition setzt eine Bindung an Calpain voraus, die mit einem Übergang in einen strukturierten Zustand verknüpft sein könnte. Die NMR-Spektroskopie erlaubt die Analyse struktureller Veränderungen, da die Faltung eines Proteins zu einer Veränderung der Resonanzfrequenzen führt.

Aufgrund der Größe der Protease Calpain, die sich aus einer katalytisch aktiven Einheit von 80 kDa und einer regulierenden Untereinheit von 30 kDa zusammensetzt, sowie der resultierenden Größe des Gesamtkomplexes mit inhibitorischen Domänen von Calpastatin wurden für diese Untersuchungen die TROSY-Methode eingesetzt.

Dazu wurde eine uniform  $^{15}\text{N}$ -markierte Probe des Konstrukts F1R der ersten inhibitorischen Domäne von Calpastatin mit einer Konzentration von 0,5 mM in einem NMR-Röhrchen vorgelegt. Zur Charakterisierung der Probe wurden an einem Bruker DRX-750 Spektrometer zunächst ein  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum sowie die TROSY-Referenz aufgezeichnet. Anschließend wurde das Calpastatin mit Kalzium und Calpain (Dr. S. Strobl) in einem molaren Verhältnis von 1 : 0.5 gemischt und erneut ein TROSY-Experiment durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Überlagerung der in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart (rot) des Bindungspartners Calpain aufgenommenen Spektren für Calpastatin.

Die Überlagerung ergibt dass es nach Zugabe von Calpain kaum zu Veränderungen der Resonanzfrequenzen des Calpastatins kommt. Im Fall einer Wechselwirkung mit dem zugesetzten Calpain sollten einzelne Signale des TROSY von Calpastatin eine Frequenzverschiebung erfahren oder sich durch eine Zunahme der Linienbreite in ihrer Intensität verändern. Dieses ist im Vergleich der Spektren nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt erkennbar. In Abbildung 16 sind die Bereiche, in denen eine Änderung von Signalen zu beobachten ist, durch einen Rahmen gekennzeichnet. Da derartige Signalveränderungen nur in geringem Maße auftreten, kann man davon ausgehen, dass das Calpastatin im Verlauf des durchgeführten Experiments keine Faltung erfährt.

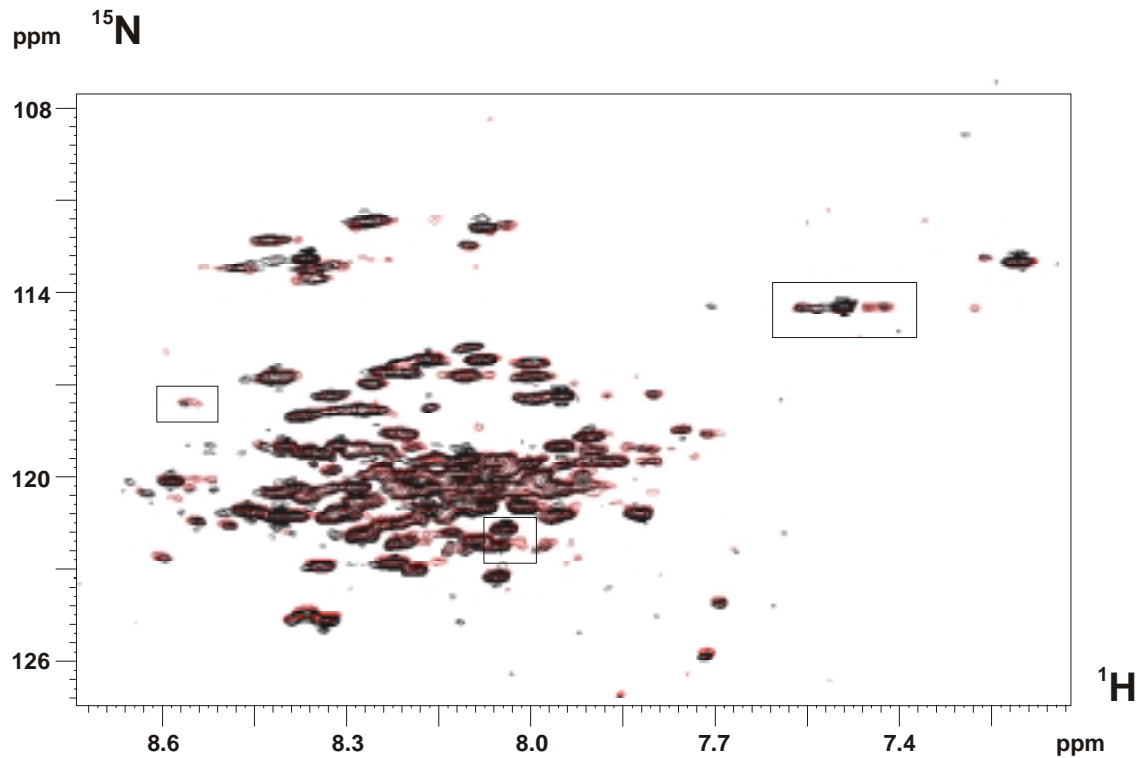


Abbildung 16. **TROSY**

Es wurden TROSY-Untersuchungen der inhibitorischen Domäne 1 (Konstrukt F1R) in Abwesenheit (schwarz) und in Gegenwart (rot) von Calpain durchgeführt und überlagert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte an einem Bruker DRX-750 Spektrometer. Bereiche, die veränderte Signale zeigen, wurden mit einem Rahmen versehen.

## 2 Diskussion

### 2.1 Etablierung eines bakteriellen Expressionssystems

#### 2.1.1 Vollängen-Calpastatin

##### 2.1.1.1 Expression in *E. coli*

Das Protein Calpastatin ist der endogene Inhibitor der ubiquitär vorkommenden Calpaine, einer Familie von Kalzium-abhängigen Cysteinproteasen, die an einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt ist. Das 718 Aminosäuren umfassende Calpastatin aus *Oryctogalus cunnigulus* konnte erfolgreich als N-terminale Hexahistidin-Fusion in Bakterien expremiert werden. Das Protein lag in der zytoplasmatischen Fraktion vor und konnte sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen über eine NiNTA-Affinitätschromatographie mit Ausbeuten von 7,5 bis 9,3 mg/L gereinigt werden.

Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen zeigen diese Ergebnisse, dass der Calpain-Inhibitor Calpastatin auch in seiner gesamten Länge, bestehend aus L-Domäne und vier inhibitorischen Untereinheiten, in Bakterien expremiert werden kann. Die Expression von rekombinantem Calpastatin war zu Beginn dieser Studien für das Vollängenprotein ausschließlich in eukaryontischen Zellen beschrieben worden. So gelang die Überexpression des Inhibitors u. a. in den Säugerzellen MCF-7 (Pariat *et al.*, 1997), NIH 3T3 (Choi *et al.*, 1997; Hirai *et al.*, 1991) und PC-3-M (Jang *et al.*, 1999) nach transienter Transfektion, die im Rahmen von *in vivo* Studien zur Identifizierung bzw. Verifizierung von Substraten der ubiquitären Calpaine erfolgte. Darüber hinaus wird vielfach die bakterielle Expression einzelner inhibitorischer Domänen des Calpastatins aus unterschiedlichen Organismen berichtet [Schwein (Maki *et al.*, 1988; Konno *et al.*, 1997); Kaninchen (Kawasaki *et al.*, 1989); Ratte (Melloni *et al.*, 1998) und Homo sapiens (Uemori *et al.*, 1990; Després *et al.*, 1995)].

Die hohe Anfälligkeit gegenüber Proteasen wurde bislang dafür verantwortlich gemacht, dass eine bakterielle Überexpression des Gesamtproteins problematisch ist. Die vorliegenden Untersuchungen ergeben, dass auch das rekombinante Kaninchen-Calpastatin bereits während der Expression degradiert wird, jedoch konnten Expressionsbedingungen gefunden werden, die einen Kompromiss zwischen maximaler Synthese des Vollängenproteins und minimaler Degradation darstellen. Von besonderer Bedeutung erwiesen sich der Einsatz eines Protease defizienten Expressionsstammes (BI21(DE3)) und eine kurze Expressionszeit.

Während der Etablierung des bakteriellen Expressionssystems für das Kaninchen-Calpastatin wurde von Hitomi und Kollegen (1998) die Expression von humanem Calpastatin in *E. coli* und Insektenzellen beschrieben. In beiden Expressionssystemen konnte die Vollängenform des Proteins überexprimiert und anschließend gereinigt werden. Für die bakterielle Expression zeigten sich vergleichbare Ausbeuten (10 mg/L) zu dem hier etablierten System, die Expression in Insektenzellen lieferte mit 1 mg/L vergleichsweise geringe Ausbeuten.

#### 2.1.1.2 Reinigung

Die native Reinigung von inhibitorisch aktivem Calpastatin ist aus einer Vielfalt von Organismen und Geweben beschrieben: so z. B. aus Rattenleber (Emori *et al.*, 1987) und humanen Erythrozyten (Takano & Murachi, 1982; Piette *et al.*, 1988; Castellazi *et al.*, 1990). Diese erfolgt in der Regel mittels drei bis vier säulenchromatographischen Stufen, die häufig mit einem denaturierenden Reinigungsschritt (Hitze, Säure, denaturierende Agenzien) kombiniert werden (Geesinke *et al.*, 1998).

Das in *E. coli* exprimierte Kaninchen-Calpastatin trägt eine N-terminale Histidin-Fusion, die eine Aufreinigung über Metallionen-Affinitätschromatographie ermöglicht. Dieser Reinigungsschritt lieferte unter nativen Bedingungen etwa 80% reines Vollängenprotein. Eine weitere Anreicherung konnte durch Hitze-denaturierung und Gelfiltration erreicht werden. Unabdingbar für die Reinigung erwies sich der Zusatz von Proteaseinhibitoren und eine schnelle Prozessierung der Probe, da das exprimierte Protein sehr leicht proteolytisch degradiert wurde. Diese Vorgehensweise lieferte eine homogene Präparation von Kaninchen-Calpastatin mit einer Reinheit von etwa 95% und einer Ausbeute von 7,5 mg pro Liter Expressionskultur. Wurde die Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, so konnte die Ausbeute auf 9,3 mg/L erhöht werden. Damit können mit dem hier vorgestellten rekombinanten Expressionssystem mit wesentlich geringerem Aufwand deutlich höhere Ausbeuten an Calpastatin gewonnen werden als es die Aufreinigung aus tierischem Gewebe zulässt. Geesinke und Kollegen (1998) erzielten bei der nativen Reinigung in Abhängigkeit von der Art des Gewebes Ausbeuten von 4,9 mg (Schweineherz) und 1,8 mg (Rinderskelettmuskel) Calpastatin aus einem Kilogramm Ausgangsmaterial. Das rekombinante Expressionssystem lässt die Gewinnung ausreichender Proteinmengen für die Strukturaufklärung zu.

### 2.1.1.3 Aktivität

Die Aktivität des aus *E. coli* isolierten Calpastatins wurde indirekt über die Inhibition des proteolytischen Verdaus von Casein durch Calpain bestimmt. Das rekombinant produzierte Calpastatin hatte inhibitorische Aktivität, wobei der Titrationsassay zeigte, dass ein Mol des Volllängenproteins *in vitro* vier Mol m-Calpain vollständig inhibieren konnte (Abb. 8). Dieses molare Verhältnis stimmt gut mit der Tatsache überein, dass ein Calpastatin-Molekül vier inhibitorische Domänen umfasst (Emori *et al.*, 1987), die jede für sich volle Aktivität besitzen (Maki *et al.*, 1987 a, b). In der Literatur existiert keine Einigkeit über die Stöchiometrie der Inhibition von Calpain durch Calpastatin. Alle experimentellen Daten deuten daraufhin, dass ein Mol Calpastatin mehrere Mol Calpain inhibieren kann; die Werte schwanken jedoch zwischen zwei und acht Mol Calpain. Vielen dieser Kalkulationen liegt eine Molekulargewichtsabschätzung von 110 bis 120 kDa für Calpastatin zu Grunde, die aus PAA-Gelen abgeleitet wurde. Werden die experimentellen Daten mit dem berechneten Molekulargewicht ausgewertet, so ergeben sich Werte von 1,8 bis 4,9 Mol Calpain (Emori *et al.*, 1987; Takano *et al.*, 1988). Hitomi und Kollegen (1998) beschreiben für das rekombinante humane Calpastatin ebenfalls die Inhibition von 4 Mol Calpain durch ein Mol Calpastatin, wenn mit dem berechneten Molekulargewicht kalkuliert wird. Da bislang alle Daten auf *in vitro* Analysen beruhen, lässt sich derzeit keine Aussage über die *in vivo* herrschende Situation machen.

### 2.1.2 Inhibitorische Domäne 1

#### 2.1.2.1 Expression und Reinigung

Ein Calpastatin-Molekül besteht aus einer N-terminalen Domäne L und vier inhibitorischen Domänen. Jede dieser repetitiven Domänen kann als funktionelle Einheit Calpain inhibieren (Maki *et al.*, 1987 a, b), wobei die erste inhibitorische Domäne die höchste Aktivität aufweist (Kawasaki *et al.*, 1989).

Es wurden acht Konstrukte der ersten inhibitorischen Domäne von Kaninchen-Calpastatin kloniert, die sich in der N- und C-terminalen Begrenzung der Domäne unterscheiden (vgl. Abbildung 7a). Der N-Terminus der Konstrukte F3C und F3R beginnt mit Aminosäure 154 des Volllängen-Proteins, die nach der Sekundärstrukturvorhersage den Beginn einer Helix im hochkonservierten A-Bereich darstellt. Die Konstrukte F2C und F2R beginnen mit Aminosäure 140, die den Beginn der ersten inhibitorischen Domäne definiert. Die weiteren Konstrukte umfassen eine N-terminale Verlängerung um 19 (Konstrukte F1C bzw. F1R) bzw. 32 Aminosäuren

(NC, NR) des carboxyterminalen Bereichs der L-Domäne. Für den C-Terminus der Konstrukte wurden zwei Varianten gewählt, die die Konstrukte mit den Aminosäuren 304 (C) bzw. 330 (R) beschließen. Konstrukte, die mit Aminosäure 304 enden, umfassen zusätzlich zur ersten inhibitorischen Domäne die vorhergesagte helikale Region der konservierten A-Region von Domäne 2; Aminosäure 330 befindet sich vor dem inhibitorisch aktiven Bereich der B-Region in der zweiten Domäne. Die C-terminalen Bereiche der Domäne wurden sehr weit gefasst und um einige Bereiche der nachfolgenden inhibitorischen Einheit erweitert, um mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Domänen während der Faltung zu ermöglichen.

Mit Ausnahme von NR und F2R konnten alle Konstrukte in *E. coli* löslich überexprimiert und mittels Hexahistidin-Fusion gereinigt werden.

### 2.1.2.2 Aktivität

Abgesehen von den Konstrukten F3C und F3R, die mit Asp154 in Subdomäne A der Domäne 1 beginnen, zeigten die Domänen vergleichbare inhibitorische Aktivitäten (siehe Abb. 13) gegenüber m-Calpain. Die zuletzt genannten Konstrukte inhibieren die Aktivität von Calpain bei einem äquimolaren Verhältnis vollständig. Im Gegensatz dazu verringern die Konstrukte F3C und F3R die Aktivität von Calpain nur um etwa 70%.

In jeder inhibitorischen Domäne von Calpastatin finden sich drei kurze, hochkonservierte Subdomänen (A, B, C; Abbildung 17). Die funktionelle Charakterisierung ergab, dass Subdomäne B für die inhibitorische Aktivität der Calpastatine verantwortlich ist (Maki *et al.*, 1989; Takano *et al.*, 1995). Kawasaki *et al.* (1989) identifizierten die Sequenz LGXK(R)D(E)XTIPPXYRXLL als hinreichend für die Inhibition von Calpain. Die Subdomänen A und C verstärken die inhibitorische Aktivität von B durch ihre Kalzium-abhängige Interaktion mit den Calmodulin-ähnlichen Domänen von Calpain (Ma *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Takano *et al.*, 1995).

Der N-Terminus der Konstrukte F3C und F3R (Asp 154) liegt im Bereich der Subdomäne A und stellt den Anfang einer potentiellen amphiphilen Helix dar, die vermutlich für die Bindung an die Calmodulin-ähnliche Domäne (IV) der 80 kDa-Untereinheit von Calpain verantwortlich ist. Untersuchungen an der inhibitorischen Domäne 1 von Schweine-Calpastatin, bei denen ein konserviertes Leucin in Region A durch den Helixbrecher Prolin substituiert wurde, zeigten für die Mutante eine drastisch verminderte Bindung an Domäne IV von Calpain (Ma *et al.*, 1994). In den Konstrukten F3C und F3R könnte es aufgrund der Deletion des flankierenden Bereiches der potentiellen Helix zu einer Störung der helikalen Sekundärstruktur

und damit zu einer verminderten Bindung an Calpain kommen. Diese verringerte Interaktion könnte der Grund für die abgeschwächte inhibitorische Aktivität der Konstrukte F3C und F3R sein.

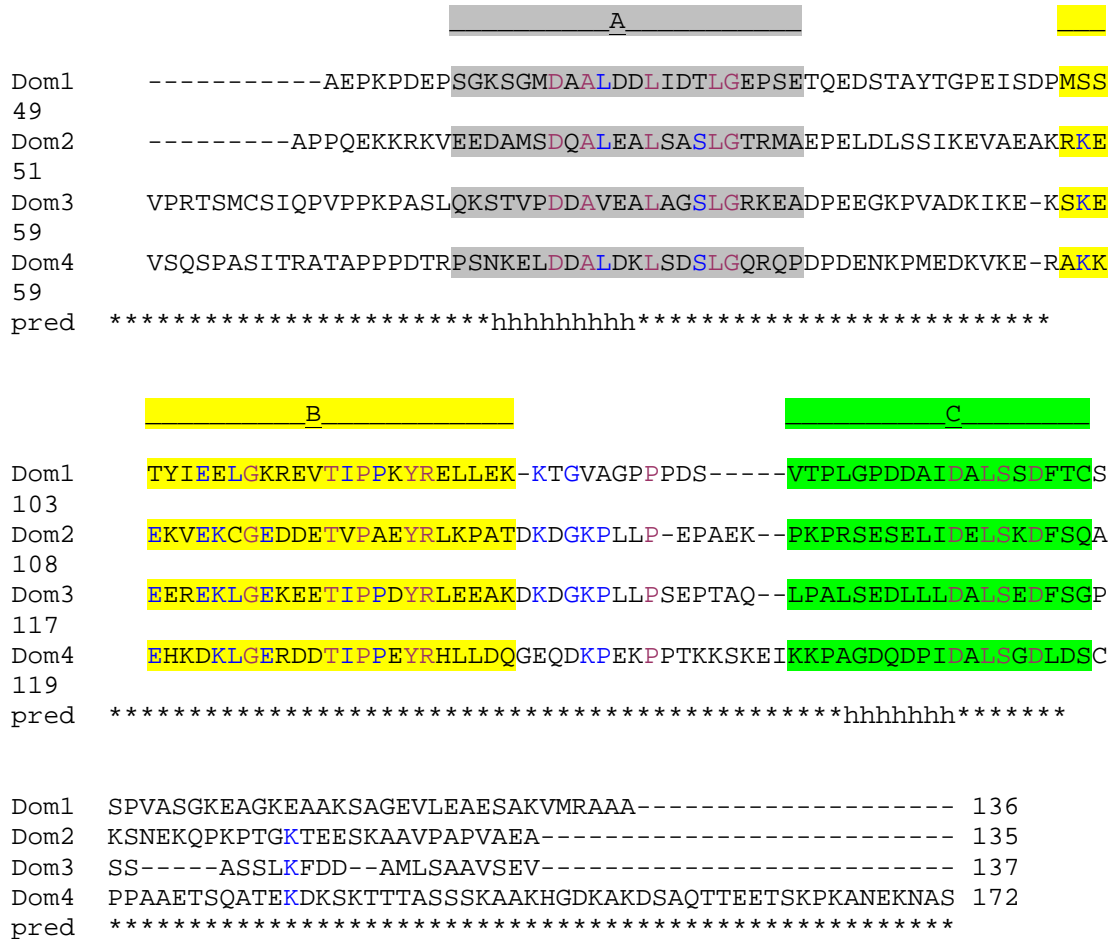


Abbildung 17. Sequenzvergleich der inhibitorischen Domänen (Dom 1-4) von Calpastatin aus Kaninchen

Die Proteinbereiche wurden mit Hilfe des Programmes ClustalW verglichen. Die hoch konservierten Subdomänen A, B, C sind farbig unterlegt. Zusätzlich wurde das Ergebnis einer Sekundärstrukturvorhersage (pred) mit dem Programm „nnpredict“ (Kneller et al., 1990) wiedergegeben. Für mit einem „h“ gekennzeichneten Bereich wird mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Helix vorhergesagt, während mit \* markierte Regionen keine Sekundärstrukturelemente aufweisen sollen.

## 2.2 Besondere physikochemische Eigenschaften des Calpastatin

### 2.2.1 Hohes apparentes Molekulargewicht im PAA-Gel

Das Volllängenprotein wies im denaturierenden PAA-Gel ein höheres Molekulargewicht auf als es die Berechnung erwarten ließ. Auch das von Hitomi *et al.* (1998) rekombinant expremierte humane Calpastatin zeigte in der gelelektrophoretischen Analyse ein erhöhtes Molekulargewicht. Diese ungewöhnliche Eigenschaft wurde ebenfalls für nativ isoliertes humanes und tierisches Calpastatin [Schwein (Takano *et al.*, 1986); Kaninchen (Nakamura *et al.*, 1985)] sowie für rekombinant expremierte Domänen von Schweineherz-Calpastatin (Takano *et al.*, 1988) beschrieben.

Eine mögliche Ursache für dieses Charakteristikum kann die außergewöhnliche Aminosäure Zusammensetzung dieser Proteine sein. Die Aminosäureanalyse für Calpastatin aus verschiedenen Organismen ist in Abbildung 18 dargestellt.

Während die Primärsequenzen einen hohen Anteil an Prolinen (10,1%) aufweisen, stellen aromatische Aminosäuren lediglich einen geringen Anteil (1,6%) dar. Ferner enthalten die Primärsequenzen einen hohen Anteil an den geladenen Aminosäuren Glutamat (14,6%), Lysin (13,7%) und Aspartat (8,9%).

In denaturierenden PAA-Gelen erfolgt die Auftrennung der Proteine primär aufgrund ihrer Masse. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten, wobei ein SDS-Molekül an zwei Aminosäureresten bindet. Die so gebildeten Komplexe aus denaturiertem Protein und SDS-Molekülen haben eine hohe negative Ladung, die der Proteinmasse proportional ist. Der hohe Anteil an sauren Aminosäureresten kann die Bindung von SDS-Anionen verringern (Takano *et al.*, 1988), so dass die elektrophoretische Beweglichkeit der Calpastatine ihrer Masse nicht proportional ist, sondern auch von der Ladung des Proteins und anderen Eigenschaften abhängig ist.

Auch andere Proteine zeigen in PAA-Gelen eine atypische Beweglichkeit: Manganstabilisierendes Protein (Lidakis-Simantiris *et al.*, 1999); Histon-bindendes Protein (Kleinschmidt *et al.*, 1986). All diesen Proteinen ist ein hoher Anteil an Prolinen und sauren Aminosäuren gemeinsam.



	Kaninchen	Homo sapiens	Ratte	Schwein	Schaf	Ø Cstn	Ø SwissProt
<b>Ala</b>	11,3	8,6	7,2	8,0	7,9	8,6	7,58
<b>Arg</b>	3,3	2,5	2,6	2,5	4,6	3,1	5,16
<b>Asn</b>	1,0	1,4	1,8	1,0	1,4	1,3	4,44
<b>Asp</b>	8,2	9,5	9,5	9,4	7,7	8,9	5,27
<b>Cys</b>	0,6	0,8	0,8	0,7	1,0	0,8	1,66
<b>Gln</b>	2,8	3,4	3,7	2,7	3,7	3,3	3,97
<b>Glu</b>	12,0	11,7	11,9	11,5	11,3	11,7	6,36
<b>Gly</b>	5,2	5,2	4,9	4,8	4,6	4,9	6,84
<b>His</b>	1,5	1,0	1,7	1,5	1,8	1,5	2,24
<b>Ile</b>	2,1	2,5	2,6	1,8	1,7	1,7	5,81
<b>Leu</b>	6,3	6,4	8,0	6,9	6,5	6,8	9,43
<b>Lys</b>	13,2	14,1	13,0	14,7	13,4	13,7	5,94
<b>Met</b>	1,4	1,4	0,9	0,8	0,7	1,0	2,37
<b>Phe</b>	0,6	0,7	0,9	0,7	0,8	0,7	4,10
<b>Pro</b>	10,9	9,7	8,9	10,4	10,8	10,1	4,92
<b>Ser</b>	9,6	10,0	9,6	10,2	10,2	9,9	7,13
<b>Thr</b>	5,8	6,5	6,3	7,0	6,4	6,4	5,67
<b>Trp</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0	1,24
<b>Tyr</b>	0,8	0,8	1,1	0,8	0,8	0,9	3,19
<b>Val</b>	3,5	3,5	4,7	4,5	4,6	4,2	6,58

Abbildung 18. Aminosäurezusammensetzung von Calpastatin

In der Tabelle sind die prozentualen Anteile der einzelnen Aminosäuren an der Primärstruktur von Calpastatin aus Kaninchen, Homo sapiens, Ratte, Schwein und Schaf dargestellt. Die Spalte ‚Ø Cstn‘ gibt die daraus berechneten Durchschnittswerte an. In der Spalte ‚Ø Swiss Prot‘ wurde die durchschnittliche Aminosäurezusammensetzung für die in dieser Datenbank verzeichneten globulären Proteine wiedergegeben.

### 2.2.2 Hohe Proteasesensitivität

Neben der retardierten Beweglichkeit in PAA-Gelen zeigte sich das Calpastatin sowohl während der Expression als auch der Reinigung extrem anfällig gegenüber intrazellulären Proteasen. Diese Proteasesensitivität bestätigte sich auch bei dem Versuch, die durch Thrombin abspaltbare Hexahistidin-Fusion zu entfernen. Sogar geringe Mengen an Thrombin führten zu einer nahezu vollständigen Degradation des Inhibitors.

Eine hohe Anfälligkeit von Proteinen gegenüber Proteasen, die Sequenz-spezifisch agieren, kann ein Anzeichen für Unstrukturiertheit oder aber eine sehr ausgedehnte, wenig kompakte Faltung sein.

### 2.2.3 Hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen

Im Gegensatz zur Proteasesensitivität besaß das Calpastatin eine hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Einflüssen wie z.B. Hitze oder Guanidinium-Ionen. Sowohl hitzebehandeltes als auch denaturierend gereinigtes Calpastatin hatten nach der Entfernung des denaturierenden Agens eine inhibitorische Aktivität, die der des nativ gereinigten Proteins entsprach (Abb. 6). Dies läßt vermuten, dass das Protein nach Denaturierung schnell seine native Konformation zurückerlangt. Darüber hinaus konnte die Ausbeute der Reinigung durch eine denaturierende Nickelionen-Affinitätschromatographie auf 9,3 mg pro Liter *E. coli* Kultur gesteigert werden. Dies kann auf eine bessere Zugänglichkeit der Hexahistidin-Fusion im entfalteten Zustand des Proteins vor allem aber auf die rasche Inaktivierung von Proteasen unter denaturierenden Bedingungen zurückführen.

### 2.2.3 Aktives Protein ist in Lösung unstrukturiert

Ein weiterer Hinweis auf eine hoch flexible Struktur des Calpastatins sind Kristallisationsansätze für das Vollängen-Protein. Das in die Kristallisation eingesetzte Calpastatin wurde zusätzlich über eine Molekularsiebsäule gereinigt, um eine homogene Präparation zu erreichen. Das abnormale physikochemische Verhalten von Calpastatin zeigte sich bei diesem Verfahren darin, dass das Protein bei etwa 450 kDa im Ausschlussvolumen der Säule eluierte. Entsprechendes wurde ebenfalls für Calpastatin beobachtet, das aus tierischem Gewebe isoliert wurde und kann auf eine extrem ausgedehnte Konformation und/oder einen hohen Oligomerisierungsgrad in Lösung zurückgeführt werden.

Da eine kristallographische Untersuchung des Gesamtproteins nicht möglich war, wurde die erste inhibitorischen Domäne mittels NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die eindimensionalen NMR-Spektren der Konstrukte F1R, F2C und F3R (Abb. 14)

zeigten keine oder lediglich eine geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen von Amid- und aliphatischen Protonen. Ein entsprechendes Ergebnis lieferte auch das  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum einer  $^{15}\text{N}$ -markierten Präparation von F1R (Abb. 15).

Liegt ein Protein mit definierter Faltung vor, so erfahren die Protonen aufgrund der lokal variierenden chemischen Umgebung eine unterschiedliche Abschirmung vom Magnetfeld, wodurch sich im Spektrum Hoch- und Tieffeldverschiebungen der Resonanzfrequenzen ergeben. Im Gegensatz dazu zeigen ungefaltete Protein lediglich eine geringe Signaldispersion, da sich alle Protonen aufgrund der Molekülbewegungen in einer ähnlichen chemischen Umgebung befinden.

Die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren der Konstrukte F1R, F2C, F3R beweisen, dass die inhibitorische Domäne 1 von Kaninchen-Calpastatin in Lösung ungefaltet vorliegt und die Domänengrenzen den Faltungszustand nicht beeinflussen.

Dieses Ergebnis stimmt mit den bislang veröffentlichten strukturellen Untersuchungen an Calpastatin überein. Uemori und Kollegen (1990) untersuchten humanes Calpastatin (As 109-242) mittels CD- und 1D NMR-Spektroskopie. Beide Methoden lieferten keinen Anhaltspunkt für eine geordnete Struktur. Auch die Charakterisierung einer Domäne des Calpastatin aus Schweinen mit Hilfe der NMR-, der CD-Spektroskopie im nahen und fernen UV-Bereich sowie durch SAXS („small-angle X-ray scattering“) bestätigten in Lösung eine ausgedehnte, flexible Konformation ohne Sekundär- und Tertiärstrukturen (Konno *et al.*, 1997).

## 2.3 Calpastatin ist unter physiologischen Bedingungen ungefaltet

### 2.3.1 Natürlich ungeordnete Proteine und ihre physiologische Funktion

Proteine oder Proteinbereiche, die unter physiologischen Bedingungen *in vitro* keine geordnete Struktur annehmen (Uversky *et al.*, 2000), aber dennoch volle Funktionalität besitzen, werden einer Proteinfamilie zugeordnet, deren Mitglieder als „natürlich denaturierte“ („natively denatured“; Schweers *et al.*, 1994), „natürlich ungefaltete“ („natively unfolded“, Weinreb *et al.*, 1996), „intrinsisch unstrukturierte“ („intrinsically unstructured“, Wright & Dyson, 1999) oder „intrinsisch ungeordnete“ („intrinsically disordered“, Dunker *et al.*, 2001) Proteine bezeichnet werden.

Zur Charakterisierung von Proteinen im Hinblick auf möglicherweise unstrukturierte Bereiche können folgende Methoden eingesetzt werden (Dunker *et al.*, 2001; Uversky, 2002b): Röntgenstrukturanalyse, NMR-Spektroskopie, CD-Spektroskopie im nahen und fernen UV-Bereich, proteolytischer Verdau, Bestimmung des Stokeschen Radius durch Molekularsiebchromatographie oder SAXS, Fluoreszenzeigenschaften, oder kalorimetrische Schmelzkurven. Allerdings lässt sich erst durch die Kombination mehrerer Untersuchungsmethoden eine endgültige Aussage über die Zugehörigkeit zur Familie der natürlich unstrukturierten Proteine treffen. Bislang wurden einhundert Proteine und Proteindomänen, die aus mehr als 50 Aminosäuren bestehen, als natürlich ungeordnet beschrieben. Eine Auflistung dieser Proteine und ihrer physikochemischen Charakterisierung findet sich in Übersichtsartikeln von Vladimir Uversky (2002 a & b, 2000).

Die von Dunker und Kollegen entwickelten Algorithmen zur Vorhersagen von natürlich unstrukturierten Bereichen in Proteinen wurden auf die in der Swiss-Prot Datenbank verzeichneten Aminosäuresequenzen angewendet (Dunker *et al.*, 1998; Romero *et al.*, 1998a). Dabei wurden für mehr als 15.000 Proteine längere, mindestens 40 Aminosäuren umfassende, ungeordnete Bereiche vorhergesagt. Die Untersuchung von 31 Genomen von Eukaryonten, Prokaryonten und Archaeobakterien (Dunker *et al.*, 2001) zeigte, dass mehr als 30% der eukaryontischen Proteine ungeordnete Regionen enthalten und sich damit deutlich von Prokaryonten und Archaeobakterien unterscheiden.

Nicht nur der vorhergesagte hohe Anteil ungeordneter Bereiche für noch zu charakterisierende Proteine, sondern vor allem die Funktionen der bekannten Mitglieder zeigen die biologische Bedeutung dieser Proteinfamilie (eine Übersicht gegeben Wright & Dyson, 1999; Dunker *et al.*, 2001). Sie sind an grundlegenden zellulären Prozessen wie der Bindung von Nukleinsäuren, der Transkription, der

Translation, der Regulation des Zellzyklus, dem Membrantransport und der Fusion von Membranen beteiligt, wobei die unstrukturierten Proteinbereiche entscheidend für die Funktion sind.

### 2.3.2 Die Primärstruktur von Calpastatin ist charakteristisch

Alle natürlich unstrukturierte Proteine oder Proteinbereiche weisen aufgrund vieler unkompensierter, geladener Seitenketten eine hohe Nettoladung sowie einen geringen Anteil hydrophober Aminosäuren auf (Uversky, 2002a und darin genannte Referenzen). Diese Kombination ist eine wichtige Voraussetzung für die Abwesenheit einer kompakten Struktur, da die Abstoßung zwischen geladenen Resten den ungefalteten Zustand stabilisiert und nur wenige hydrophobe Wechselwirkungen bestehen. Auch Calpastatine aus verschiedenen Organismen zeigen diese besonderen Eigenschaften, die in Abbildung 19 zusammengefasst sind. Für alle Calpastatine ergibt sich ein deutlicher Überschuss negativ geladener Aminosäuren. Die Hydrophobizität, die nach einem von Kyte & Doolittle (1982) berechneten Algorithmus bestimmt wurde, liegt mit Ausnahme des Calpastatin aus Schafen unterhalb des kritischen Wertes von 0,41. Proteine mit einer durchschnittlichen Hydrophobizität von weniger als 0,41 liegen nach Dunker et al. (2001) immer ungefaltet vor.

	pl	Nettoladung	Hydrophobizität
<b>Kaninchen</b>	5,21	-26	0,393
<b>Homo sapiens</b>	4,99	-32	0,376
<b>Ratte</b>	4,91	-38	0,315
<b>Schwein</b>	5,21	-26	0,389
<b>Schaf</b>	6,08	-8	0,568

Abbildung 19. **Physikochemische Eigenschaften des Calpastatin**

Anhand der Aminosäuresequenzen wurden die isoelektrischen Punkte (pl), die Nettoladung und die durchschnittliche Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle für Calpastatin aus verschiedenen Organismen berechnet.

Dunker und Kollegen untersuchten den Zusammenhang zwischen Aminosäuresequenz und ungeordneter Struktur und führten Vergleiche zu globulären Proteinen durch, um eine Methode zur Vorhersage natürlich ungeordneter Proteinbereiche zu entwickeln (PONDRs, „Predictors Of Natural Disordered Regions“; Dunker *et al.*, 1998 & 2001, Garner, 1998, Romero *et al.*, 1998a&b). Die Analysen ergaben eine geringe Komplexizität der Sequenz und sagten eine hohe Flexibilität für natürlich

ungeordnete Proteine voraus. Im Vergleich zu Proteine mit geordneter Struktur weisen sie einen hohen Anteil an den Aminosäuren A, R, G, Q, S, P, E und K und einen geringeren Prozentsatz von W, C, F, I, Y, V, L und N auf. Die Aminosäuren H, M, T und D waren gleichmäßig verteilt.

In Abbildung 20 wurde für jede Aminosäure die Differenz zwischen ihrer durchschnittlichen Häufigkeit (SWISS-PROT; Bairoch, 1999) und ihrem Auftreten in Kaninchen-Calpastatin dargestellt. Negative Werte bedeuten, dass eine Aminosäure weniger häufig als im Durchschnitt vorkommt, positive Werte stehen für einen überdurchschnittlich hohen Anteil an der Primärsequenz. Es ergibt sich ein im wesentlichen den Analysen von Dunker *et al.* (2001) entsprechendes Resultat: die Aminosäuren N, C, R, I, M, F, W und Y sind unter-, D, E, K, P, S dagegen überrepräsentiert. Lediglich die Häufigkeit von Argininen und Methioninen ist für natürlich ungefaltete Proteine untypisch.

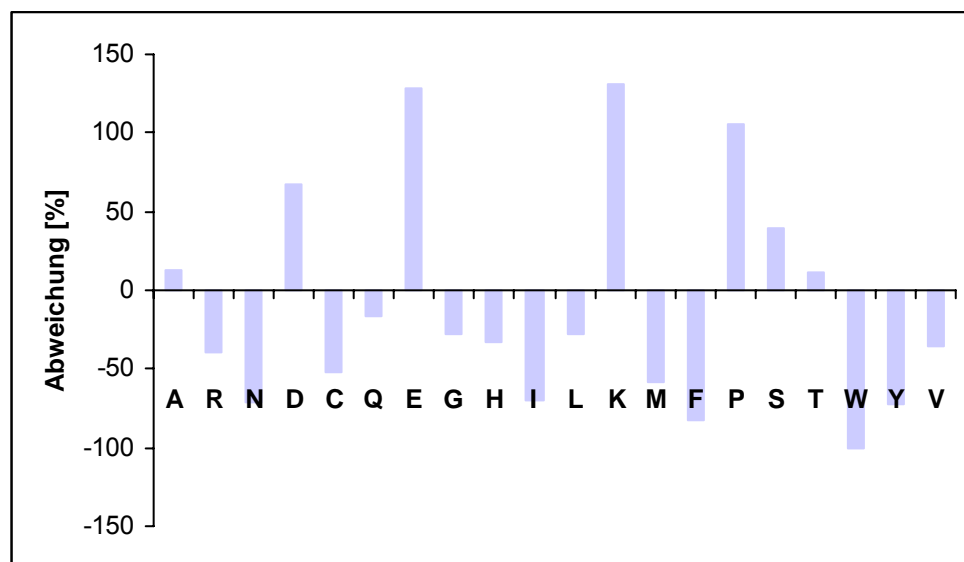


Abbildung 20. **Vergleichende Aminosäureanalyse des Kaninchen-Calpastatin**

Es wurde die Abweichung zwischen der Häufigkeit einer Aminosäure in der Sequenz von Calpastatin und der durchschnittlichen Häufigkeit einer Aminosäure (Bairoch, 1999) dargestellt. Negative Werte zeigen minder repräsentierte, positive Werte überdurchschnittlich häufige Aminosäuren an.

Anhand der aufgezeigten großen Parallelen in der Primärstruktur, der *in vitro* beobachteten besonderen physikochemischen Eigenschaften und dem Fehlen von Sekundär- und Tertiärstrukturen bei voller inhibitorischer Aktivität kann Calpastatin aus Kaninchen in die Familie der unter physiologischen Bedingungen ungefalteten Proteine eingeordnet werden, in die aufgrund der Untersuchungen von Konno *et al.* (1997) bereits die erste inhibitorische Domäne von Schweine-Calpastatin als Mitglied aufgenommen wurde.

### 2.3.3 Aktivität und Übergang in einen geordneten Zustand

In vielen Fällen nehmen natürlich unstrukturierte Proteinbereiche bei der Bindung an ein Partnermolekül eine Struktur an. Der Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> ist dafür ein eindrucksvolles Beispiel (Kriwacki *et al.*, 1996; Pavletich, 1999). Das isolierte Protein wies in NMR- und CD-spektroskopischen Untersuchungen keinerlei Sekundär- oder Tertiärstruktur in Lösung auf. Durch den Zusatz von Cdk2 wurde jedoch die Faltung von p21 induziert. Ein solcher Übergang aus dem ungeordneten Zustand in eine geordnete Struktur wurde für viele Mitglieder dieser Proteinfamilie beschrieben und spielt eine entscheidende Rolle bei der molekularen Erkennung.

Um zu klären, ob auch die inhibitorische Domäne von Calpastatin in Gegenwart von Calpain eine definierte Struktur annimmt, wurden NMR-spektroskopische Untersuchungen mittels der TROSY-Technologie durchgeführt. Die Bindung von Calpastatin an Calpain sollte im Spektrum an einer Verschiebung von Signalen und einer vermehrten Dispersion sichtbar werden.

Die Überlagerung der Spektren in Gegenwart und in Abwesenheit von Calpain (Abbildung 16) lässt keine signifikante Änderung der Signaldispersion erkennen. Lediglich an einigen Stellen treten zusätzliche Signale auf, die jedoch vermutlich auf eine unspezifische Wechselwirkung mit dem zugesetzten Calpain zurückzuführen sind. Die gezeigten TROSY-Untersuchungen lassen weder auf eine Faltung noch auf eine spezifische Bindung beider Proteine schließen. Die Inhibitionsstudien haben gezeigt, dass das Konstrukt F1R spezifisch an Calpain binden kann. Verschiedene Faktoren können dafür verantwortlich sein, dass sich diese Bindung in dem durchgeführten Experiment nicht nachweisen ließ.

In der NMR-Spektroskopie wird aufgrund der geringen Empfindlichkeiten mit hohen Proteinkonzentrationen gearbeitet. Da das für die Untersuchungen eingesetzte Calpain nur in einer begrenzten Menge zur Verfügung stand, wurden die Proteine Calpastatin und Calpain für die TROSY Experimente in einem molaren Verhältnis von 1 : 0.5 eingesetzt. Damit könnte im optimalen Fall jedes zweite Calpastatin-Molekül an ein Calpain-Molekül binden, womit zwar keine vollständige Änderung der Resonanzen im Spektrum zu erwarten wäre, jedoch eine deutliche Änderung von Signalen hätte sichtbar werden müssen.

Neben der geringen Konzentration des eingesetzten Calpain muss seine mangelnde Stabilität während der Messung als kritisch angesehen werden. Nach Abschluss der Messung zeigte die Messlösung ein Präzipitat, das sowohl Calpain als auch Calpastatin enthielt und Fragmente geringeren Molekulargewichts enthielt. Diese

Präzipitation könnte die Zahl der gebildeten Calpastatin/Calpain-Komplexe weiter reduzieren, wodurch die Empfindlichkeit der Messung unterschritten sein könnte. Entsprechend würden lediglich die nicht gebundenen Calpastatin-Moleküle detektiert, was dem Spektrum in Abbildung 16 entsprechen würde. Ein Grund für die Instabilität des Calpains könnte die Autoproteolyse in der kleinen als auch in der großen Untereinheit des Proteins nach Kalzium-Aktivierung sein.

Weiterhin könnte die Degradation des Calpastatin durch das Calpain problematisch für die Experimente sein. DeTullio *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass Calpastatin *in vivo* ein Substrat der Calpaine darstellt. Die langen Aufnahmezeiten für NMR-Spektren könnten einen entsprechenden Vorgang *in vitro* begünstigen. Durch den Einsatz von Calpain-Mutanten, die sich zwar durch Kalzium aktivieren lassen, jedoch proteolytisch inaktiv sind (z.B. Cys -> Ser), könnten diese Probleme in zukünftigen Experimenten umgangen werden.

Die Röntgenstrukturanalyse von nicht aktiviertem Calpain wurde von Hosfield *et al.* (1999) und Strobl *et al.* (2000) aufgeklärt. Dabei zeigte sich, dass die Struktur einer ovalen Scheibe entspricht, deren gegenüberliegenden Pole von der katalytischen Domäne (II) einerseits und den zwei Calmodulin-ähnlichen Domänen (IV und VI) andererseits gebildet werden. Von der Interaktion zwischen Calpastatin und Calpain ist bekannt, dass die Subdomäne B des Calpastatin mit der katalytischen Domäne des Calpains in Kontakt tritt (Croall & McGrody, 1994). Diese Wechselwirkung wird durch die Bindung der Regionen A und C an die Calmodulin-ähnlichen Domänen (Takano *et al.*, 1995) der großen und kleinen Untereinheit des Calpains verstärkt. Für die Bindung von Calpastatin, die vermutlich mit einem Übergang aus dem ungeordneten in den geordneten Zustand verbunden ist, bedeutet dies, dass eine inhibitorische Domäne zweimal die Länge des Calpains überspannen muss. Dies spricht für eine ausgedehnte Konformation des Calpastatins. In den Subdomänen A und C, die mit den Calmodulin-ähnlichen Domänen des Calpains interagieren, sind helikale Sekundärstrukturelemente vorhergesagt (siehe Abb. 17). Diese Vorhersage wird durch Strukturaufklärung von Calmodulin-Peptid-Komplexen, die ebenfalls helikale Strukturen aufweisen (Meador *et al.*, 1992 & 1993) gestützt.



### 2.3.4 Biologische Vorteile eines natürlich ungeordneten Proteins

Die natürlich ungeordnete Struktur des Calpastatin verleiht dem Protein eine hohe Plastizität, die eine Reihe von biologischen Vorteilen bieten kann. Calpastatin inhibiert hoch spezifisch die ubiquitär vorkommenden  $\mu$ - und m-Calpaine. Durch die natürliche Plastizität ist der Inhibitor in der Lage, an beide Formen, die sich vor allem in ihrer großen Untereinheit unterscheiden, zu binden und sie zu inhibieren. Dieses als „one-to-many“-bezeichnete Prinzip der molekularen Erkennung findet sich auch bei anderen natürlich unstrukturierten Proteinen, so z.B. bei dem Zellzyklusregulator p21<sup>Waf1p/Cip1p/Sid</sup>, der unterschiedliche Cdk/Cyclin-Komplexe binden und inhibieren kann.

Der natürlich ungeordnete Zustand eines Proteins ermöglicht bei der Bindung an einen Partner die Überwindung von sterischen Restriktionen und damit eine größere Interaktionsfläche zwischen beiden Proteinen. Dies könnte die für Calpastatin beobachtete sehr hohe Spezifität für Calpaine erklären. Zum anderen kann ein Calpastatin-Molekül potentiell über jede inhibitorische Einheit an ein Calpain-Molekül binden. Aufgrund der Größe der Calpaine, die in diesem Fall auf kleinem Raum zusammenkommen müssen, wäre eine hohe Plastizität von Vorteil, um den sterischen Anforderungen in diesem Komplex gerecht zu werden.

Wie alle natürlich unstrukturiert vorliegenden Proteine zeichnet sich auch das Calpastatin *in vitro* durch eine hohe Sensitivität gegenüber Proteasen aus. Diese Eigenschaft könnte *in vivo* eine effektive Möglichkeit zur Regulation der Aktivität des Proteins und auch der Protease Calpain darstellen. Bisher wurde Calpastatin *in vivo* als Substrat der Calpaine (DeTullio *et al.*, 2000) und Capasen (Wang *et al.*, 1998) identifiziert.

## 2.4 Ausblick

Sowohl die NMR-Spektroskopie unter Anwendung der TROSY-Technik als auch die Röntgenstrukturanalyse nach Kristallisation eines Komplexes aus Calpain und Calpastatin bieten die Möglichkeit, um die Struktur des Komplexes aufzuklären. Bislang konnte keine Kokristallisation von Calpain und Calpastatin erreicht werden, da sowohl die Aktivierung des Calpains, seine Autoproteolyse als auch die große Flexibilität des Calpastatins Probleme darstellen. Entsprechend ist die Autoproteolyse des aktivierten Calpains vermutlich hinderlich für NMR-spektroskopische Untersuchungen des Komplexes. Für beide Ansätze zur Strukturlösung könnte der Einsatz einer aktivierbaren, aber proteolytisch inaktiven Calpain-Mutante diese Probleme umgehen. Durch die Etablierung eines rekombinanten Expressionssystems für Calpastatin und die Verfügbarkeit von rekombinantem Calpain kann für beide Methoden ausreichend Protein produziert und gegebenenfalls auch mit Isotopen oder Selenomethionin angereichert werden.

## E. Untersuchung eines ATP-abhängigen Peptid- transports in *S. cerevisiae*

### 1 Ergebnisse

#### 1.1 Hintergrund und Zielsetzung

##### 1.1.1 Hintergrund

Die heterologe Expression des humanen ATP-abhängigen Peptidtransporters TAP in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und Studien zu seiner Funktion hatten gezeigt, dass auch in TAP-defizienten Mikrosomen ein ATP-abhängiger Transport von radioaktiv markierten Peptiden stattfindet (Urlinger *et al.*, 1997). Eine weitergehende Charakterisierung dieser Hefe-eigenen Transportaktivität hatte gezeigt, dass im Gegensatz zu TAP keine mechanistische Unterscheidung zwischen Peptidbindung und -transport möglich ist (Van Endert *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995; Neumann & Tampé, 1999).

Kompetitionsexperimente mit Peptiden unterschiedlicher Länge ergaben, dass der Peptidtransporter der Bäckerhefe eine minimale Peptidlänge von acht Aminosäuren für die Erkennung benötigt. Die maximale Größe transportierter Peptide konnte nicht bestimmt werden, allerdings kompetierte ein 50 Aminosäuren umfassendes Polypeptid noch effizient um den Transport des radioaktiven Reporterpeptids. Damit besitzt der Hefe-eigene Peptidtransporter ein breiteres Substratspektrum als der TAP-Transporter, der Peptide von 8 bis 16 Aminosäuren Länge bevorzugt (Van Endert *et al.*, 1994).

Der Einsatz von Ionophoren wie Gramicidin oder Ionomycin hatten keinen Einfluss auf den intrinsischen Transport (Urlinger, 1997). Somit ließ sich ausschließen, dass es sich bei dem Peptidtransport um einen sekundären Transportprozess handelt, der durch einen ATP-abhängig aufgebauten Ionengradienten angetrieben wird. Eine Hemmung des Transports war durch klassische Inhibitoren von Mitgliedern der ABC-Transporter Familie wie z.B. Vanadat oder Erythrosin möglich. Verschiedene Mutantenstämme der Bäckerhefe, die alle *in vitro* eine verminderte Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum zeigten, wiesen eine unveränderte Peptidtransportrate auf.

### 1.1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeiten war es, die vermutete Lokalisierung der endogenen Peptid-Transportaktivität im Endoplasmatischen Retikulum von *S. cerevisiae* zu überprüfen.

Einen zweiten Schwerpunkt stellte die weitere Charakterisierung des beobachteten Transportprozesses im Hinblick auf dessen Orientierung, Kinetik und Substratspezifität dar.

Durch die Lokalisierung des Transporters und die Untersuchung von TAP-Homologen in *S. cerevisiae* sollten darüber hinaus Hinweise auf die Identität des oder der am Peptidtransport beteiligten Proteine gewonnen werden.

## 1.2 Lokalisierung des ATP-abhängigen Peptidtransports

Um die vermutete ER-Lokalisierung (Urlinger, 1997) des Transporters zu überprüfen, sollten die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten von Ribosomen-besetztem (rER) und Ribosomen-freiem ER (sER) ausgenutzt werden. Verschiedene Faktoren unterstützen die Assoziation bzw. Dissoziation von Ribosomen und Membranen des ER. Roberg und Kollegen (1997) nutzten die Magnesium-Abhängigkeit der Ribosomen-Bindung, um das ER von Hefezellen während subzellulärer Fraktionierungen an verschiedenen Stellen des Dichtegradienten zu lokalisieren (sog. „ER-Shift“): Zeigt das Auftreten eines Proteins oder einer enzymatischen Aktivität eine dem ER entsprechende Verschiebung in Abhängigkeit von der  $Mg^{2+}$ -Konzentration, so kann dies als Beweis für eine ER-Lokalisation herangezogen werden.

### 1.2.1 Präparation mikrosomaler Membranen

Mikrosomale Membranen wurden durch Ultrazentrifugation von Lysaten in dreistufigen Saccharose-Gradienten (24%, 42%, 60% Saccharose) isoliert und mittels Immunoblots und Transportassays mit dem radioaktiv markierten Peptid R9L\* analysiert. Die immunologische Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen Sec61p als Markerprotein für das Endoplasmatische Retikulum und Pdr5 als Marker für die Plasmamembran.

In Abwesenheit von Magnesium (10 mM EDTA) wurden die Mikrosomen in der 24/42-Interphase des Gradienten angereichert, wohingegen sich die Plasmamembranen in der 42/60-Interphase sammelten (Abbildung 21a). Im Transportassay zeigten die Membranen der 24/42-Interphase eine um 60% höhere Peptidakkumulation als diejenigen der 42/60-Interphase. Waren  $Mg^{2+}$ -Ionen während der Membranisolierung vorhanden, so ergab sich im Immunoblot eine annähernde Gleichverteilung von ER und Plasmamembran zwischen beiden Interphasen. Unter diesen Bedingungen lag also ein Teil des ER mit Ribosomen assoziiert vor und fand sich aufgrund der resultierenden höheren Sedimentationsgeschwindigkeit in der 42/60-Interphase. Die Analyse der Transportaktivitäten (Abbildung 21b) zeigte eine entsprechende Verteilung: die Membranen der 42/60-Interphase besaßen nun die höhere Aktivität, wobei der Unterschied zwischen beiden Interphase-Membranen nur knapp 25 % betrug.

Insgesamt zeigte das Experiment eine gute Übereinstimmung zwischen der Verteilung des ER-Markerproteins Sec61p und dem Auftreten der Peptid-Transport-

aktivität. Darüber hinaus war die Anreicherung radioaktiver Peptide für beide Präparationen strikt ATP-abhängig.

In beiden Präparationen konnte allerdings in allen analysierten Fraktionen auch der Plasmamembran-Marker Pdr5 nachgewiesen werden. Zwar zeigte sich keine Parallele zwischen dem Auftreten von Plasmamembran und Transportaktivität, jedoch wurde deutlich, dass die Mikrosomen mit anderen Organellen verunreinigt vorliegen und somit die Beteiligung anderer zellulärer Kompartimente am Transport nicht ausgeschlossen werden kann.

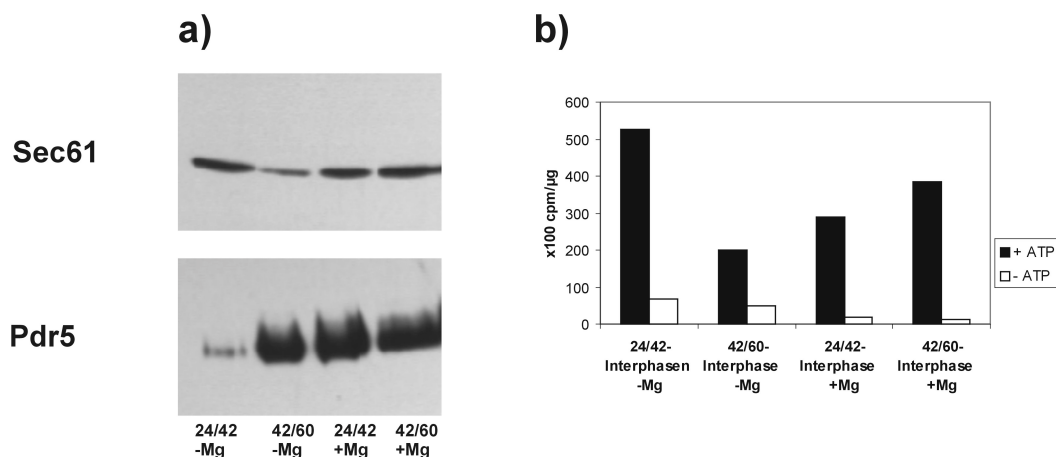


Abbildung 21. **Transportaktivität von Mikrosomen**

Die Präparation mikrosomaler Membranen wurde in dreistufigen Gradienten (24, 42, 60% Saccharose) in Gegenwart von 10 mM EDTA (-Mg) und 2 mM  $Mg^{2+}$  (+Mg) durchgeführt. Die in den Interphasen angereicherten Membranen wurden a) im Immunoblot mit anti-Sec61- und anti-Pdr5-Antikörper und b) im Transportassay mit und ohne ATP analysiert. Für alle Analysen wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt.

### 1.2.2 Optimierung der subzellulären Fraktionierung mit Verschiebung des ER

Um eine eindeutige Aussage über die vermutete Beteiligung des ER am ATP-abhängigen Peptidtransport machen zu können, wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit einer Verschiebung des ER kombiniert.

Die Präparationen der Organellen wurden zunächst entsprechend dem Protokoll von Roberg *et al.* (1997) durchgeführt, indem Hefekulturen in Gegenwart von 2 mM  $Mg^{2+}$  bzw. 10 mM EDTA lysiert und die Zellkompartimente in linearen Saccharosegradienten (20 bis 60 %) aufgetrennt wurden. Die Analyse der Gradientenfraktionen im Immunoblot mit anti-Sec61p Antikörper zeigte einen deutlichen Unterschied für die Verteilung des Endoplasmatischen Retikulums (Abbildung 22): in Gegenwart von Magnesiumionen fanden sich mikrosomale Membranen vorrangig in den

Fraktionen 9 bis 14 und in geringerer Menge in den flankierenden Fraktionen 6 bis 8 und 15 bis 17. Ferner zeigten die Fraktionen 1 bis 3 an der Oberfläche des Gradienten eine positive Reaktion. In Anwesenheit von EDTA ließen sich ER-Membranen in den Fraktionen 1 bis 10 nachweisen, wobei Maxima in den Fraktionen 5 und 8 auftraten.

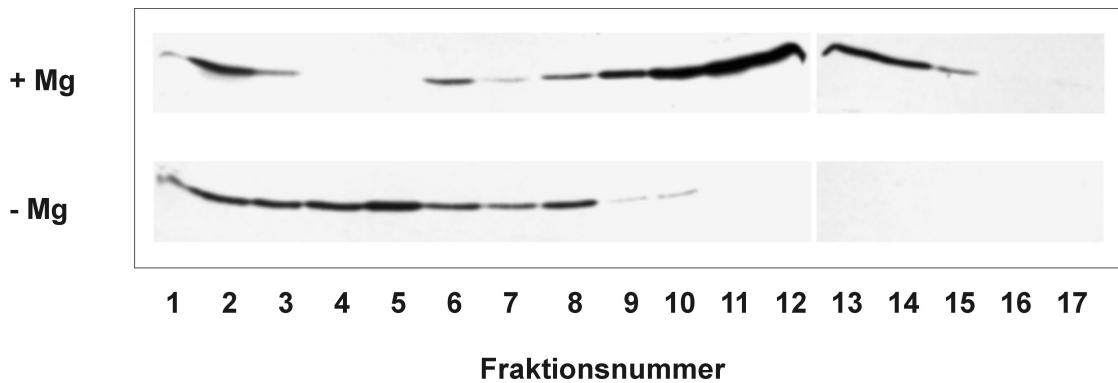


Abbildung 22. **Mg<sup>2+</sup>-abhängige Verteilung des ER in Saccharosegradienten**

Lysierte Hefezellen wurden im Saccharosesegradienten mit und ohne Mg<sup>2+</sup> aufgetrennt. Die Gradienten wurden in 17 Fraktionen aufgeteilt und im Immunoblot mit anti-Sec61p-Antikörper analysiert.

Die für beide Präparationen beobachtete breite Verteilung der ER-haltigen Fraktionen über die Gradienten war für eine eindeutige Lokalisation des Peptidtransporters problematisch. Einerseits ergaben sich vielfach Überlappungen mit anderen Zellorganellen. Andererseits ist die Verschiebung des ER nicht derart signifikant, dass sie nicht auch aus experimentellen Schwankungen z. B. bei der Herstellung oder Fraktionierung der Gradienten resultieren könnte.

Durch die Variation der experimentellen Parameter konnte die Verschiebung des ER optimiert werden. Die Verdoppelung der Magnesiumionen-Konzentration auf 4 mM bewirkte eine Fokussierung des ER auf drei Fraktionen (Abbildung 23b), während eine Erhöhung der EDTA-Konzentration keine Auswirkungen zeigte. Die Linearität und Reproduzierbarkeit der Saccharose-Gradienten konnte verbessert werden, indem für ihre Herstellung anstelle einer Mischungskammer ein Gradientenmischer eingesetzt wurde. Dieser erzeugt nahezu lineare Saccharose-Verteilungen (Abbildung 23a) durch Rotation eines zweistufigen Gradienten in einem festgelegten Winkel bei konstanter Geschwindigkeit (20, 60% Saccharose, Rotationswinkel 79,5°, 4 min). Die Auftrennung der Organellen erfolgte durch Ultrazentrifugation der Gradienten für 3 h bei 34.000 Upm in einem SW41-Rotor (Beckman).

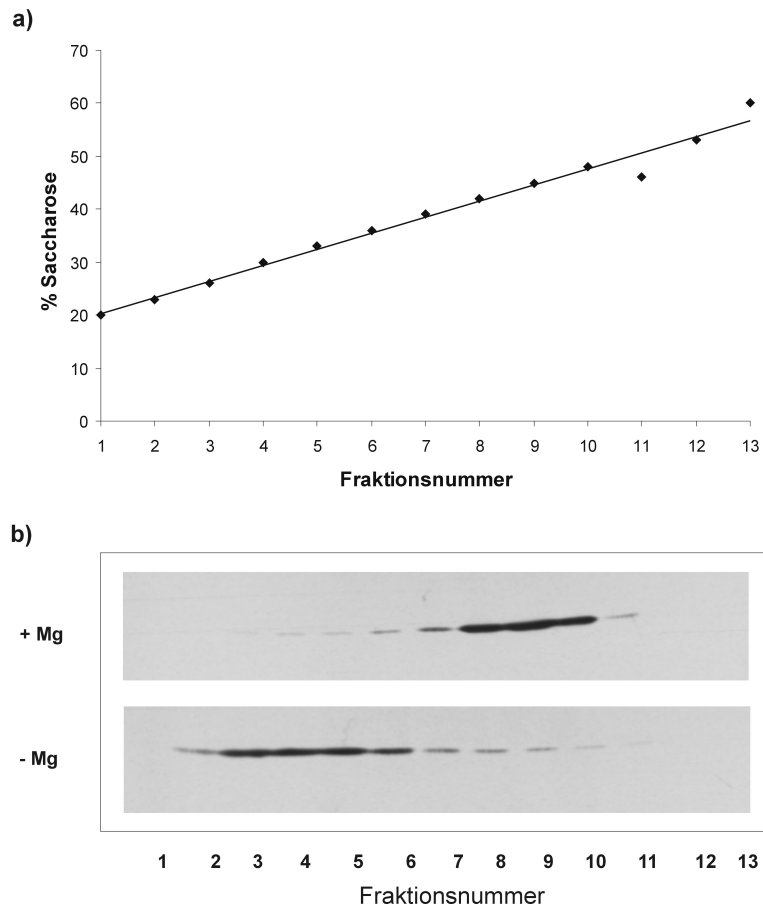


Abbildung 23. **Optimierung der ER-Verschiebung**

a) Die Saccharose-Verteilung eines mittels Rotation im Gradientenmischer (4 min, 79,5°) hergestellten Gradienten wurde bestimmt, indem 60%-ige Saccharoselösung mit Bromphenolblau angefärbt wurde. Die Saccharose-Konzentration der einzelnen Fraktionen wurde anhand des photometrisch bestimmten Bromphenolblau-Anteils berechnet.

b) Immunoblot-Analyse (mit anti-Sec61p-Antikörper) der ER-Verteilung in der subzellulären Fraktionierung nach Optimierung der Auftrennung.



### 1.2.3 Lokalisierung der endogenen Peptidtransportaktivität

Zur Lokalisation der ATP-abhängigen Peptidtransportaktivität wurden subzelluläre Fraktionierungen in Gegenwart und Abwesenheit von Magnesium durchgeführt und im Hinblick auf die Verteilung der Zellorganellen und der Transportaktivität verglichen.

Die Gradientenfraktionen wurden immunologisch auf die Markerproteine der Vakuole (vATPase), der Plasmamembran (PMA1) und des ER untersucht. Der Golgi-Komplex wurde enzymatisch über die GDPase-Aktivität nachgewiesen. Zur Bestimmung der Transportaktivität wurden für die einzelnen Fraktionen Assays mit und ohne ATP sowie Proteinbestimmungen zur Normierung der Aktivität durchgeführt. Aus den normierten Aktivitäten wurde anschließend für jede Fraktion der prozentuale Anteil an der Gesamtaktivität berechnet. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Analysen für beide Gradienten dargestellt.

In Gegenwart von Magnesium befand sich der Großteil des Endoplasmatischen Retikulums in den Fraktionen 10 bis 12, die auch 45 % der gesamten Transportaktivität aufwiesen (Abbildung 24a). Allerdings wurde auch eine Kolokalisierung mit den Markerenzymen des Golgi-Kompartiments, der Plasmamembran und der Mitochondrien beobachtet.

Der Vergleich mit der Präparation in Abwesenheit von Magnesium (Abb. 24b) gibt Klarheit über eine Beteiligung anderer Organellen an der Transportaktivität. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine Verschiebung der Peptid-Transportaktivität in die Fraktionen 3 bis 7, die wiederum identisch mit dem Auftreten des ER-Markerproteins Sec61p ist.

Der Vergleich der Peptidtransportaktivität mit dem Auftreten von ER-, Golgi-, Plasmamembran- und Vakuolen-Markern in den Gradientenfraktionen, ergab demnach eine eindeutige Kolokalisation mit den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums. Dies lässt den Schluß zu, dass das für den Peptidtransport verantwortliche Protein(system) in den Membranen des Hefe-ER lokalisiert ist.

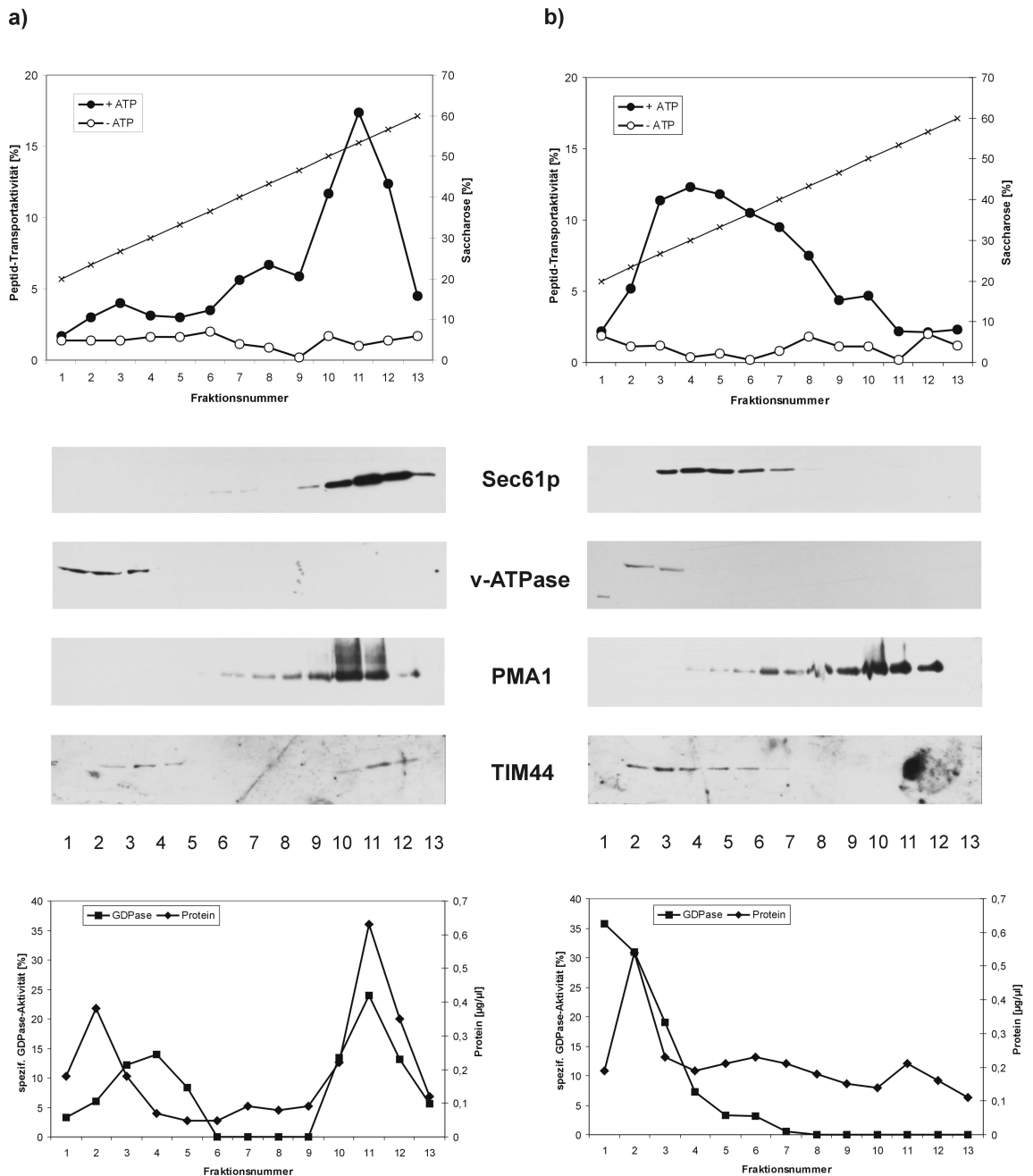


Abbildung 24. **Subzelluläre Lokalisierung des ATP-abhängigen Peptidtransports**

Subzelluläre Fraktionierung wurden in Gegenwart (a) und Abwesenheit (b) von Magnesiumionen durchgeführt und charakterisiert. Mit den einzelnen Fraktionen wurden Transportstudien mit (●) bzw. ohne (○) ATP durchgeführt und als prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität dargestellt. Im Immunoblot wurden ER (Sec61p), Vakuole (vATPase), Plasmamembran (PMA1) und Mitochondrien (TIM44) nachgewiesen. Die Bestimmung der GDPase-Aktivität diente der Lokalisation des Golgi-Kompartiments. Ferner wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt.

## 1.3 Charakterisierung des Peptidtransports

### 1.3.1 Volumenabhängigkeit

Zur Bestimmung der Transportaktivität werden Membranen mit radioaktivem Peptid inkubiert und die Membran-assoziierte Radioaktivität im  $\gamma$ -Counter quantifiziert. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob das Peptid an die Außenseite der Vesikel gebunden oder nach einem Transportprozess intravesikulär vorliegt.

Um zwischen einer Bindung an die Aussenseite der Membranen und einem Transport in das Vesikelinnere zu unterscheiden, wurden Transportstudien mit Mikrosomen durchgeführt, die zuvor in Gegenwart steigender Saccharose-Konzentrationen inkubiert worden waren. In Gegenwart von Saccharose kommt es aufgrund des osmotischen Gefälles zwischen dem Inneren und der Umgebung der Vesikel zu einem Ausstrom von Wasser, wodurch sich das intravesikuläre Volumen verringert. Die Auftragung der Membran-assoziierten Radioaktivität gegen die reziproke Saccharosekonzentration ergab eine Gerade mit Ursprung annäherungsweise im Nullpunkt (Abb. 25). Das Ausmaß der Peptidakkumulation sank also mit steigender Saccharosekonzentration.

Der lineare Zusammenhang zwischen Peptidaufnahme und innerem Volumen legt nahe, dass es bei dem beobachteten Vorgang tatsächlich um einen Transport der Peptide über die mikrosomalen Membranen in das Vesikelinnere handelt.

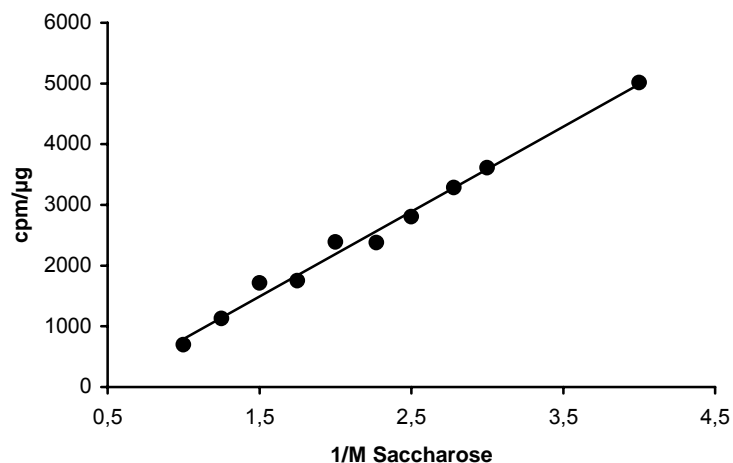


Abbildung 25. **Volumenabhängigkeit der Peptid-Akkumulation**

Mikrosomale Membranen wurden mit steigenden Saccharose-Konzentrationen inkubiert und in Transportassays eingesetzt. Die Membran-assoziierte Radioaktivität wurde gegen die reziproke Saccharose-Konzentration aufgetragen.

## 1.3.2 Kinetik

### 1.3.2.1 Temperaturabhängigkeit des Peptidtransports

In weiteren Experimenten sollte die Kinetik des ATP-abhängigen Transportsystems im Endoplasmatischen Retikulum von *S. cerevisiae* untersucht werden. Dazu wurden Mikrosomen isoliert und mit dem radioaktiv markierten Peptid R9L\* bei verschiedenen Temperaturen (37°C, 30°C, 20°C und 4°C) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die in den Mikrosomen angereicherte Radioaktivität quantifiziert. Ferner wurde die zeitliche Abhängigkeit der Transportrate in Abwesenheit von ATP und in Gegenwart eines Kompetitorpeptids bestimmt. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen.

Eine zeitabhängige Peptidaufnahme in die Mikrosomen konnte ausschließlich für ATP-enhaltende Reaktionsansätze detektiert werden, mit Apyrase, einem Enzym das ATP spaltet, wurden über den gesamten Zeitverlauf nur Hintergrundwerte gemessen. Dabei zeigte sich lediglich ein minimaler Unterschied zwischen den bei 30°C und 37°C aufgenommenen Kinetiken. Eine Senkung der Reaktionstemperatur auf 20°C führte jedoch zu einer deutlichen Verlangsamung des Transportes. Bei 4°C kam die Aktivität des Transportes praktisch völlig zum Erliegen.

Die bei 4°C gemessenen Werte lagen in der Größenordnung des Transportes in Gegenwart von hohen Konzentrationen des unmarkierten Peptids R9L, das mit dem radioaktiven Peptid R9L\* um die Bindung an den Transporter kompetiert.

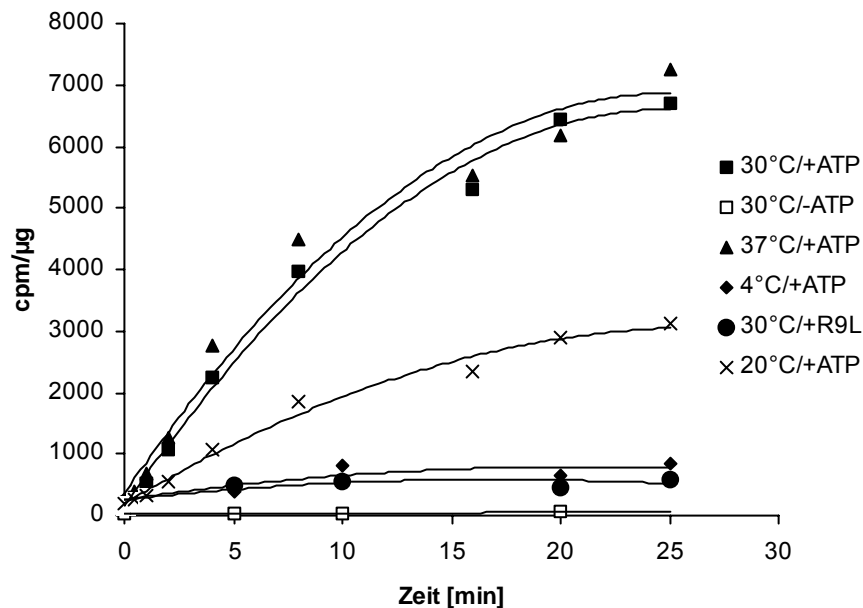


Abbildung 26. **Temperaturabhängigkeit des Peptidtransports**

Mikrosomen wurden bei 37°C (▲), 30°C (■), 20°C (×) und 4°C (◆) mit radioaktivem Peptid (R9L\*) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und die Membran-gebundene Radioaktivität quantifiziert. Entsprechend wurden Mikrosomen bei 30°C ohne ATP (□) sowie mit ATP und nicht markiertem R9L (\*) inkubiert.

### 1.3.2.2 Einfluss der Peptidkonzentration

Um die Abhängigkeit des Hefe-eigenen Peptidtransporters von der Konzentration des Substratpeptids zu bestimmen, wurden Mikrosomen in Gegenwart von ATP bei 20°C mit zunehmenden Mengen radioaktiv markierten Peptids (R9L\*) inkubiert. Die Reaktion wurde nach vier Minuten gestoppt und die Membran-assoziierte Radioaktivität quantifiziert. Durch die Verringerung der Inkubationstemperatur konnte eine Verlangsamung des Transports (s. Abschn. 1.3.2.1) erreicht und damit die lineare Transportperiode verlängert werden. Somit konnte für alle Peptidkonzentrationen die initiale Transportrate bestimmt werden. In Ansätzen mit erhöhten Peptidkonzentrationen wurde eine Mischung aus iodiertem und nicht markiertem Peptid eingesetzt.

Die graphische Darstellung der gemessenen Transportaktivitäten in Abhängigkeit von den eingesetzten Peptidkonzentrationen ergab eine Sättigungskurve (Abbildung 27). Die Transportraten nahmen zunächst mit steigender Peptidmenge zu, gingen jedoch ab einer Konzentration von etwa 0,4 mM Peptid in eine Parallele zur x-Achse über. Die Transportrate konnte dann durch eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration nicht mehr gesteigert werden.

Die hyperbole Kurve kann durch die Michaelis-Menten-Gleichung angenähert werden. Die der halbmaximalen Transportrate zugehörige Substratkonzentration gibt den  $K_M$ -Wert des Transporters für das Peptid R9L an. Dieser wurde anhand der Meßwerte zu 27  $\mu\text{M}$ .

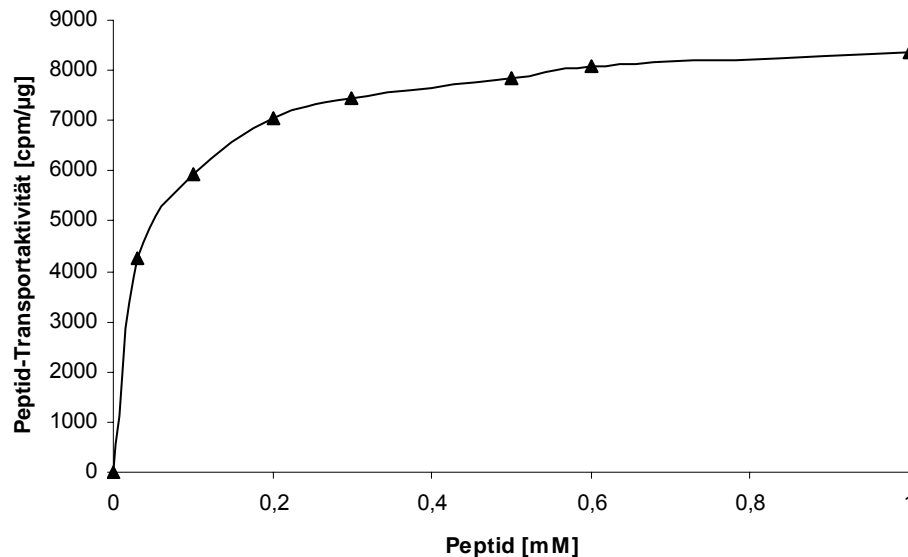


Abbildung 27: **Abhängigkeit des Transports von der Peptidkonzentration**

Mikrosomen wurden bei 20°C mit steigenden Konzentrationen an R9L\* inkubiert und die initiale Transportaktivität gegen die eingesetzte Peptidkonzentration aufgetragen. Für Peptidkonzentrationen  $\geq 0,4$  mM wurde eine Mischung aus radioaktiv markiertem und unmarkiertem Peptid eingesetzt.

Bei dem gemessenen Transport von radioaktiv markierten Peptiden in mikrosomale Vesikel kann es sich sowohl um einen Import als auch um einen Export handeln, da aufgrund der Herstellung mikrosomaler Vesikel die Möglichkeit besteht, dass sich sog. „inside out“-Vesikel bilden. Das Endoplasmatische Retikulum der Zellen ist eine zelluläres Kompartiment, das ein großes mit der Kernhülle verknüpftes Membrangeflecht darstellt. Beim Zellaufschluss und der Isolierung des ER zerreißen diese Membranen und schließen sich in der Folge zu Vesikeln, in denen die lumenale ER-Flüssigkeit eingeschlossen ist, den sog. Mikrosomen. Während der Vesikelbildung, kann es zu einer Umkehrung der Membranorientierung kommen, so dass sich die lumenale Seite der ER-Membran außen und die zytoplasmatische Membranseite im Inneren der Vesikel befindet. Diese sog. „inside out“-Vesikel zeigen gegenüber den „right side out“-Vesikeln auch eine Umkehrung der Transporteigenschaften. D.h. Transportvorgänge, die im zellulären ER zu einem Export von Substanzen führen, würden im Fall von „inside out“-Vesikeln einen Import darstellen.

### 1.3.3 Peptidtransport an semi-intakten Hefezellen

Um auszuschließen, dass der beobachtete Peptidimport an 'inside out' Mikrosomen gemessen wurde und somit unter *in vivo* Bedingungen einen Export darstellt, wurden Transportstudien an semipermeabilisierten Zellen durchgeführt.

Semipermeabilisierte Hefezellen oder transportkompetente Membranen wurden nach dem Protokoll von Baker *et al.* (1988) hergestellt. Bei dieser Methode werden sphäroplastierte Zellen langsam über flüssigem Stickstoff eingefroren, so dass die Sphäroplasten erhalten bleiben. Erst beim raschen Auftauen brechen die Zellen auf, wodurch zytosolische Proteine freigesetzt werden, aber die Zellorganellen intakt und voll funktionsfähig bleiben.

Die semipermeabilisierten Zellen zeigten analog den isolierten mikrosomalen Membranen eine strikt ATP-abhängige Akkumulation von radioaktiv markierten Peptiden (Abbildung 28). Diese Anreicherung konnte durch Zusatz eines Überschusses an unmarkiertem Peptid kompetiert werden. Damit konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem an isolierten Mikrosomen beobachteten Transport tatsächlich um einen Peptidimport handelt.

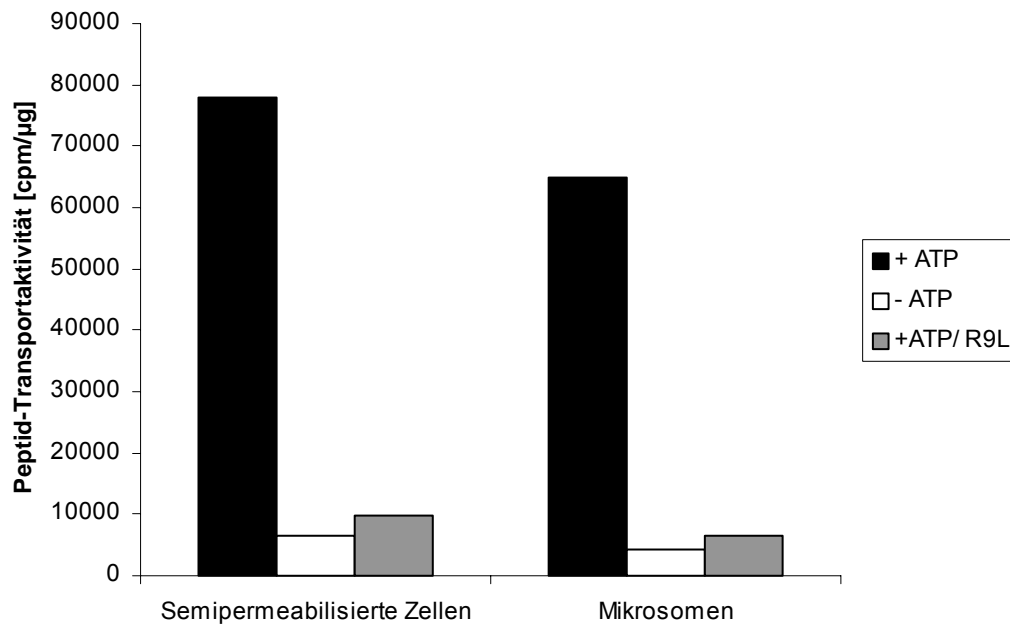


Abbildung 28. **Peptidtransport in semi-intakten Hefezellen**

Semipermeabilisierte Hefezellen und Mikrosomen wurden mit radioaktivem Peptid (R9L\*) mit und ohne ATP sowie mit ATP und Kompetitorpeptid (R9L) inkubiert. Die Membran-assoziierte Radioaktivität wurde im  $\gamma$ -Zähler bestimmt.

### 1.3.4 N-Glykosilierung von Peptiden

Die Glykosilierung von Proteinen an Asparaginresten dient als gängiger Nachweis für ihren Transport in das Endoplasmatische Retikulum. Die in Hefeproteinen gefundenen vielfältigen N-gebundenen Oligosaccharideinheiten gehen auf eine gemeinsame Kerneinheit aus zwei N-Acetylglucosamin-, neun Mannose- und drei Glukosemolekülen zurück, die im ER angefügt wird und anschließend durch Prozessierung ihre endgültige Zusammensetzung erhält.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Oligosaccharide zu detektieren: durch eine veränderte Mobilität glykosilierter Proteine im PAA-Gel, durch Immunpräzipitation mit einem Antikörper, der z.B.  $\alpha 1 \rightarrow 6$ -verknüpfte Mannosereste erkennt oder durch Präzipitation mit Concanavalin A (Con A). Concanavalin A ist ein Lektin, das Mannose-haltige Oligosaccharide erkennt und bindet.

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem untersuchten Peptidtransport um einen ER-Import handelt, wurden zwei Peptide mit einer N-Glykosilierungssequenz eingesetzt: R9L(QN) [RRYQNSTEL] oder R10T [RYWANATRST]. Im Anschluss an den Transport wurden die Mikrosomen mit SDS-haltigem Puffer lysiert und mit Concanavalin A-Agarose inkubiert. Nach mehrfachem Waschen wurde die Concanavalin A-gebundene Radioaktivität bestimmt.



Für das Peptid R10T wurde sowohl in Mikrosomen als auch semipermeabilisierten Hefezellen ein ATP-abhängiger Transport nachgewiesen (Abbildung 29). Allerdings konnte in keinem der Systeme eine ATP-abhängige Anreicherung von glykosiliertem Peptid an Concanavalin A-Agarose detektiert werden. Lediglich etwa 5% des in Gegenwart von ATP in die ER-Membranen aufgenommenen radioaktiv markierten Peptids konnte an Concanavalin A gebunden nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit von einer Energetisierung durch ATP.

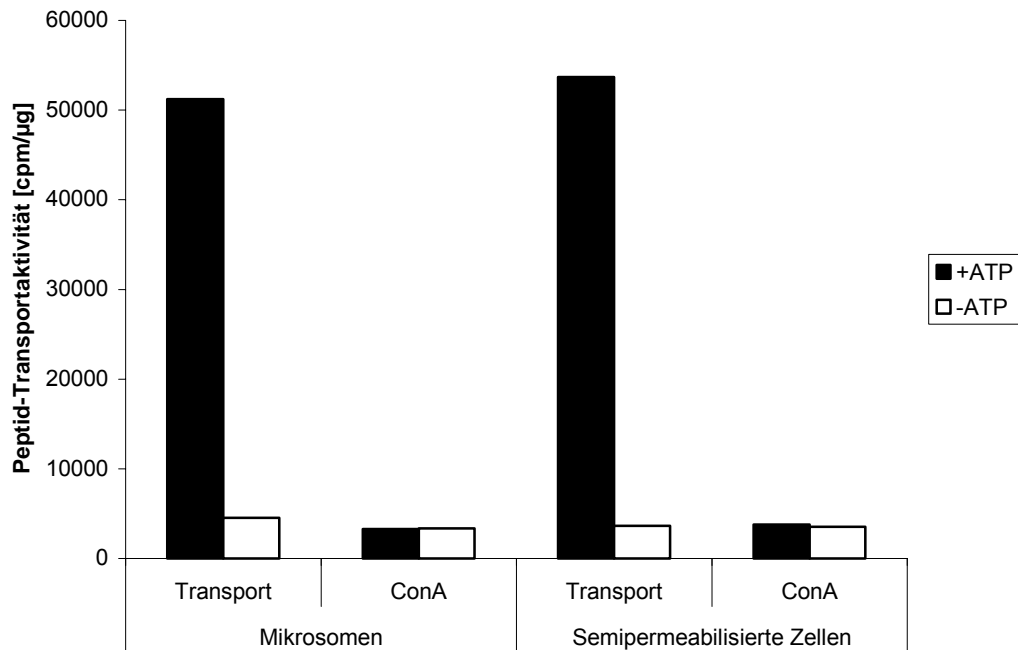


Abbildung 29. **Glykosilierung von Peptiden in Mikrosomen und semi-intakten Zellen**

Mikrosomen bzw. semipermeabilisierte Hefezellen wurden mit radioaktivem Peptid R10T\* inkubiert. Die Transportraten wurden mit und ohne ATP bestimmt. Anschließend wurde die Membran-assoziierte Peptidmenge mit Con A-Agarose inkubiert und nach dem Waschen die Con A-gebundene Radioaktivität bestimmt.

Um zu überprüfen ob es in den für Glykosilierungsstudien eingesetzten Membransysteme (Mikrosomen und semipermeabilisierte Zellen) prinzipiell zu einer Glykosilierung von geeigneten Substraten kommen kann, wurden die Untersuchungen mit dem Tripeptid NYT wiederholt. Dieses Peptid wird ohne aktiven Transport in mikrosomale Membranen aufgenommen (Römisch & Schekman, 1992), umfasst die minimal nötige Sequenz für eine N-Glykosilierung und lässt sich mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markieren. Wie erwartet zeigte sich in Transportassays eine hohe Anreicherung von NYT\* sowohl in Mikrosomen als auch in semipermeabilisierten Zellen, die völlig unabhängig von dem Zusatz von ATP war (Abbildung 29).

Der Nachweis von N-glykosiliertem Peptid durch Bindung an Concanavalin A-Sepharose zeigte für beide Membransysteme eine deutliche Glykosilierung des Tripeptids NYT\*, mit Glykosilierungsraten von bis zu 70% des transportierten Peptids für semipermeabilisierte Zellen und etwa 60% wenn mikrosomale Membranen eingesetzt wurden (Abb. 29). Damit war bewiesen, dass die für die Transportstudien eingesetzten Membransysteme N-Glykosilierung durchführen können und auch eine für die Detektion ausreichende Menge Peptid glykosiliert wird.

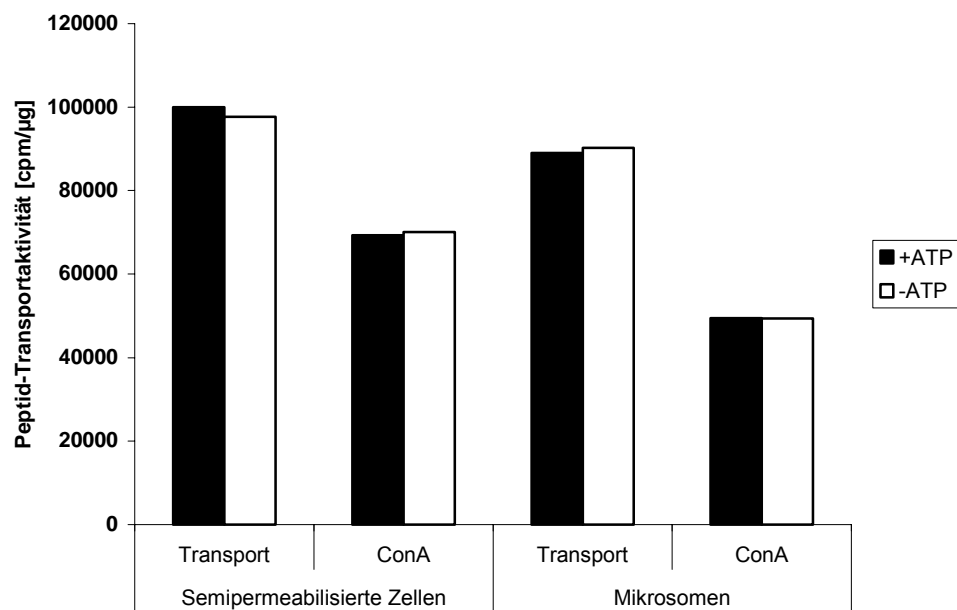


Abbildung 30: **Glykosilierung von NYT\* in Mikrosomen und semi-intakten Zellen**

Das Tripeptid NYT wurde iodiert und in Transportstudien mit semipermeabilisierten Zellen bzw. Mikrosomen eingesetzt. Die Transportraten wurden mit und ohne ATP bestimmt. Anschließend wurde die Membran-assoziierte Peptidmenge mit Con A-Agarose inkubiert und nach dem Waschen die Con A-gebundene Radioaktivität bestimmt.

## 1.4 Lokalisierung von Mdl1p und Mdl2p

Die vollständige Aufklärung des Genoms von *S. cerevisiae* im Jahr 1996 erlaubte es, anhand der Sequenz des humanen heterodimeren Peptidtransporters TAP (bestehend aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2) nach homologen Proteinen in der Hefe zu suchen. Im Hefegenom wurden 28 offene Leseraster (ORFs, „open reading frames“) identifiziert, die für 'ATP-binding cassette' Transporter (ABC-Transporter) codieren. Vor allem die Gene MDL1 und MDL2 („multidrug resistance like“) besitzen eine hohe Sequenzhomologie zu TAP1 und TAP2 und weisen alle Sequenzmerkmale eines ABC-Transporters auf (vergleiche Diskussion, Abb. 33). Damit lag die Vermutung nahe, dass diese ebenfalls „halben“ ABC-Proteine am Transport von Peptiden beteiligt sein könnten (Decottignies und Goffeau, 1997).

Die Disruption der Gene MDL1 bzw. MDL2 sowie beider Gene (Urlinger, 1997) in dem Hefestamm WT303 zeigte keinen Einfluss auf die endogene Peptidtransportaktivität. Mikrosomale Membranen aller Disruptanten zeigten einen dem Wildtyp-Stamm vergleichbare ATP-abhängige Akkumulation radioaktiver Peptide. Damit war bereits nachgewiesen, dass diese Proteine nicht für die Peptidtransportaktivität in das ER der Hefe verantwortlich sind. Da die ABC-Proteine Mdl1p und Mdl2p jedoch eine derart hohe Sequenzhomologie zu TAP aufwiesen und bislang uncharakterisiert waren, sollten ihre subzelluläre Lokalisation sowie eine mögliche Dimerisierung dieser halben ABC-Transporter näher untersucht werden.

Um die Lokalisation von Mdl1p und Mdl2p zu analysieren, wurden polyklonale Peptidantikörper erzeugt. Mittels dieser Antikörper sollten subzelluläre Fraktionierungen untersucht werden und durch Koimmunopräzipitation die Art der Dimerisierung (Homo- oder Heterodimerisierung) dieser Proteine charakterisiert werden.

Zur Erzeugung eines Peptidantikörpers gegen Mdl1p wurde das aus 15 Aminosäuren bestehende Peptid K<sub>581</sub>GGVIDLDNSVAREV<sub>695</sub> eingesetzt. Die Peptidsynthese und die Herstellung der Antikörper wurde von der Firma Dianova durchgeführt. Nach 10 Wochen konnte aus einem der immunisierten Kaninchen (R6) ein Serum mit Antikörpern gegen das Protein Mdl1p gewonnen werden, das im Immunoblot eine ausreichend spezifische Reaktion zeigte. Entsprechende Arbeiten wurden auch zur Herstellung eines anti-Mdl2p-Serums durchgeführt, lieferten jedoch kein ausreichend spezifisch reagierendes Serum. Deshalb wurden die Arbeiten selbständig mit einem Peptid (CA<sub>810</sub>KEANPITPQP<sub>820</sub>) wiederholt. Dazu wurde das Peptid über ein C-terminal ergänzten Cysteinrest an den Träger KLH gekoppelt. Die nach Immunisierung von zwei Kaninchen erhaltenen anti-Mdl2p-Seren zeigten im

Western Blot von Gesamtmembranen einen hohen unspezifischen Hintergrund und lediglich eine schwache Reaktion mit dem Protein Mdl2p.

Zur Lokalisation von Mdl1p und Mdl2p wurden Immunoblots der in Abbildung 24 dargestellten subzellulären Fraktionierung mit den gewonnenen polyklonalen Seren analysiert. Für das anti-Mdl2p-Serum konnte aufgrund der schwachen spezifischen und der ausgeprägten unspezifischen Reaktion keine subzelluläre Lokalisation erfolgen. Für Mdl1p zeigte die Immunoblot Analyse eine deutliche positive Reaktion für die Fraktionen eins bis vier und schwächer für die flankierenden Fraktionen 5 bis 7. Weiterhin ergab sich kein Unterschied für die Lokalisation des Proteins Mdl1p in Abhängigkeit von der Magnesium Konzentration (Abbildung 31).

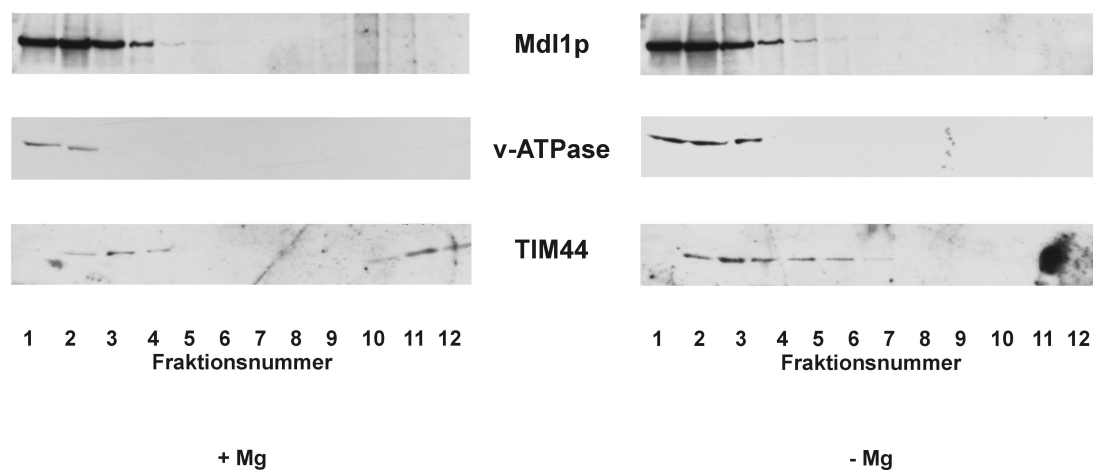


Abbildung 31. **Subzelluläre Lokalisierung von Mdl1p**

Immunoblots der subzellulären Fraktionierung mit und ohne Magnesium aus Abschnitt 1.2.3 wurden mit anti-Mdl1p-Serum (R6/10) analysiert und mit der Lokalisation von Vakuole (v-ATPase) bzw. Mitochondrien (TIM44) verglichen.

Aufgrund der subzellulären Fraktionierung konnte damit eine Lokalisation von Mdl1p im Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi Apparat und der Plasmamembran ausgeschlossen werden; hingegen zeigte sich eine Kolokalisation mit den Markerproteinen der Vakuole (v-ATPase) und der Mitochondrien (TIM44), die jedoch keine eindeutige Zuordnung von Mdl1p zu einem dieser Organelle erlaubte.

---

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Roland Lill in Marburg wurde eine mögliche mitochondriale Lokalisation der Proteine näher untersucht. Dazu wurden mikrosomale und mitochondriale Membranpräparationen auf das ER-Markerprotein Sec61p und das mitochondriale Markerprotein TIM44 sowie mittels der polyklonalen Seren auf Mdl1p und Mdl2p untersucht. Die Ergebnisse dieser immunochemischen Untersuchungen sind in Abbildung 32a dargestellt. Die im Arbeitskreis von Prof. Lill gereinigten Mitochondrien waren kaum mit ER-Membranen verunreinigt, die mikrosomalen Präparationen wiesen jedoch einen deutlichen Anteil mitochondrialer Membranen auf. Immunologische Analysen mit den Antikörpern gegen Mdl1p und Mdl2p ergaben eine schwache, jedoch ausschließlich mit den mitochondrialen Membranen assoziierte positive Reaktion. Dieses Ergebnis bekräftigte die aus der subzellulären Fraktionierung und verschiedenen Experimenten der Arbeitsgruppe von Prof. Lill (persönliche Mitteilung) resultierende Hypothese, dass die „halben“ ABC-Transporter Mdl1p und Mdl2p in den Mitochondrien lokalisiert sind.

Darüber hinaus wurden die Membranpräparationen auf einen ATP-abhängigen Transport von Peptiden untersucht. Die Resultate dieser Studien sind in Abbildung 32b dargestellt. Während die mikrosomalen Membranen einen ATP-abhängigen Peptid-Transport zeigten, konnte für mitochondriale Membranen kein Transport nachgewiesen werden. Damit konnte in Übereinstimmung mit den Transportstudien an Mdl1p und Mdl2p defizienten Hefestämmen und den subzellulären Fraktionierungen gezeigt werden, dass die Hefe-eigene Peptid-Transportaktivität weder den ABC-Transportern Mdl1p und Mdl2p noch einem anderen mitochondrial lokalisierten Proteinsystem zuzuordnen ist.

Nach Abschluss dieser Arbeiten wurde das Protein Mdl1p von der Arbeitsgruppe von T. Langer als ein in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierter Peptid-Exporter charakterisiert (Young *et al.*, 2001).

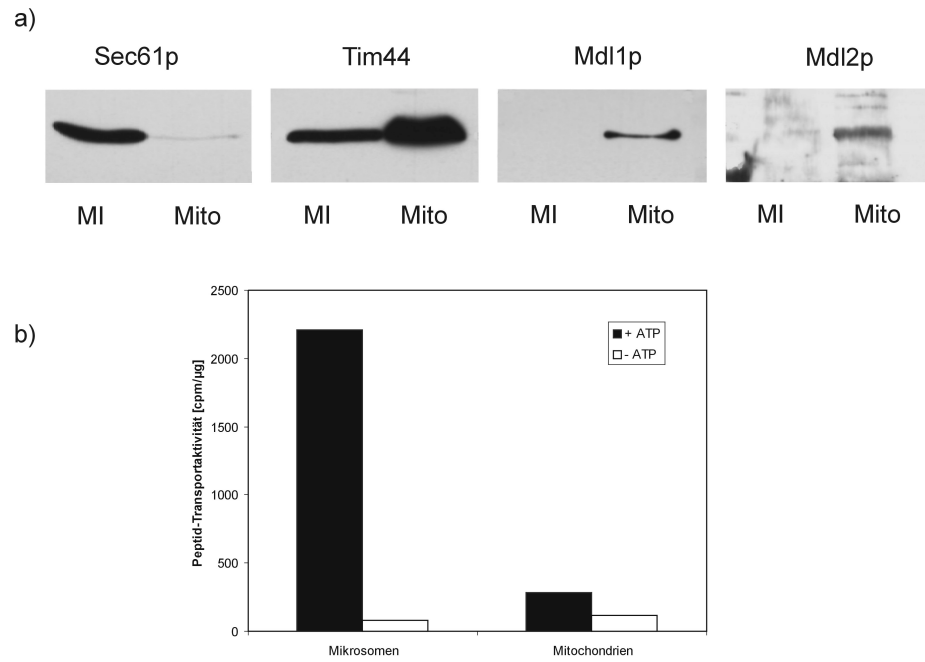


Abbildung 32. **Peptidtransport an Mikrosomen und Mitochondrien**

a) Mikrosomen (MI) und Mitochondrien (Mito) (Prof. Lill) wurden im Immunoblot mit Antikörpern gegen die Proteine Sec61p (ER) und TIM44 (Mitochondrien) sowie gegen die Proteine Mdl1p und Mdl2p untersucht.

b) Mit den in a) charakterisierten Membranen wurden Transportstudien mit und ohne ATP durchgeführt.

## 2 Diskussion

Membranpräparationen, die Mikrosomen enthalten, zeigen in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* eine ATP-abhängige Anreicherung von Peptiden (Urlinger *et al.*, 1997). Die Lokalisierung dieser Peptidtransportaktivität und die Untersuchung der Richtung des Transports waren der Schwerpunkt der geschilderten Arbeiten. Darüber hinaus wurden die „halben“ ABC-Transportermoleküle Mdl1p und Mdl2p charakterisiert.

### 2.1 Charakterisierung des ATP-abhängigen Peptidtransports in Hefe

#### 2.1.1 Der Peptidtransport ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert

Um die vermutete Lokalisierung des Peptidtransporters im Endoplasmatischen Retikulum der Hefe zu überprüfen, wurde eine subzelluläre Fraktionierung mit einem Magnesium abhängigen „ER-Shift“ kombiniert. Roberg und Kollegen (1997) beobachteten in Magnesium freien Gradienten eine breite Überlappung der Lokalisierung von ER und Golgi Komplex. In Gegenwart von Magnesium verlagerte sich das ER im Gradienten, während die Golgi-Membranen nahezu unverändert verteilt waren. Dieses spezifische Verhalten des ER ist vermutlich auf die Bindung von Ribosomen zurückzuführen, die in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  stabilisiert wird. Der „ER-Shift“ kann somit herangezogen werden, um in subzellulären Fraktionierungen einen eindeutigen Nachweis für die Lokalisierung ER assoziierter Proteine oder Aktivitäten zu erbringen.

Zunächst erwies sich die Übertragung der Experimente von Roberg *et al.* als problematisch, da sich mit und ohne Magnesium zwar eine deutlich unterschiedliche, jedoch insgesamt breite Verteilung der ER-haltigen Fraktionen im Gradienten ergab. Dies führte zu einer ausgeprägten Überlappung mit anderen Zellorganellen wie der Plasmamembran, den Mitochondrien und auch der Vakuole. Durch die Optimierung verschiedener Parameter der Auftrennung wurden ER-haltige Fraktionen in beiden Gradienten fokussiert. Im Gegensatz dazu veränderte sich die Verteilung der übrigen Zellorganellen nicht. Die Markerenzyme der Mitochondrien und des Golgi Komplexes traten jedoch in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  auch ER-Membranen enthaltenden Fraktionen auf. Vermutlich handelte es sich dabei um ein Artefakt, das während der Präparation durch eine unspezifische Assoziation mit dem Endoplasmatischen Retikulum hervorgerufen wurde.

Der Vergleich der Peptidtransportaktivität mit dem Auftreten der Zellkompartimente ergab in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration eine Überlappung mit unterschiedlichen Organellen (s. Abb. 24). Ausschließlich das ER Markerprotein Sec61p zeigte jedoch in beiden Gradienten eine eindeutige Kolo-kalisierung mit den Transport-aktiven Fraktionen. Dies bestätigte die Vermutung, dass das ER Ort der beobachteten Peptidtranslokation ist und kein anderes Zellkompartiment eine ATP-abhängige Anreicherung von Peptiden zeigt.

Bislang wurde der Transport von Peptiden in das Lumen des ER ausschließlich für den TAP-Transporter beschrieben, der in Säugerzellen zytosolisch gebildete Peptide in einer ATP-abhängigen Reaktion transportiert (Kelly *et al.*, 1992; Kleijmeer *et al.*, 1992), wo sie von MHC Klasse I Molekülen gebunden werden. Darüber hinaus wurde ein ATP- und Zytosol-abhängiger Export glykosilierter Peptide an Mikrosomen der Bäckerhefe (Römisch & Schekman, 1992) und aus Säugerzellen (Römisch & Ali, 1997) beobachtet. Dieser Peptidexport wird durch das Protein Sec61p vermittelt (Gillece *et al.*, 2000) und zeigt Parallelen zu dem für missgefaltete Proteine bekannten retrograden Transport ins Zytoplasma. Die untersuchte neuartige Transportaktivität für Peptide im ER ergänzt das bislang bekannte System von Peptidimport und -export im Endoplasmatischen Retikulum, über das im Gegensatz zum Transport von Proteinen bislang nur sehr wenig bekannt ist.

### **2.1.2 Der Peptidtransport ist Temperatur- und Konzentrations-abhängig**

Transportstudien an Mikrosomen bei unterschiedlichen Temperaturen zeigten, dass die Akkumulation von Peptiden temperatursensitiv ist. Eine Anreicherung von Membran-assoziiierter Radioaktivität fand bei 37°C und 30°C in vergleichbarem Ausmaß statt, während bei 20°C inkubierte Ansätze einen weniger effizienten Peptidtransport aufwiesen (Abb. 26). Bei 4°C konnte lediglich eine sehr geringe Transportaktivität beobachtet werden. Weiterhin konnte der Transport von Reporterpeptid durch einen Überschuss an unmarkiertem Peptid verhindert werden. Im Gegensatz zu TAP ließ sich für den Hefe eigenen Peptidtransporter nicht zwischen einer ATP-unabhängigen Bindung (Van Endert *et al.*, 1994) und einem ATP-abhängigen Transport von Peptiden unterscheiden, denn ohne Energetisierung kam es zu keiner Anreicherung von Reporterpeptiden.

Die reduzierte Transportaktivität bei 20°C wurde ausgenutzt, um initiale Transportraten bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen zu bestimmen. Es ergab sich eine deutliche Abhängigkeit zwischen der eingesetzten Peptidkonzentration und der Transportrate, wenn weniger als 400 µM Peptid eingesetzt wurde. Darüber hinaus beeinflusste eine Steigerung der Substrat-



konzentration die Transportrate nicht mehr. Der Hefe eigene Peptid-Transporter zeigt damit ähnlich wie auch TAP einen Transport, der durch das Substrat gesättigt (Uebel *et al.*, 1995) und durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden kann. Die zu 27  $\mu\text{M}$  R9L\* bestimmte Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) stimmte gut mit der von S. Urlinger (1997) ad 25  $\mu\text{M}$  ermittelten Peptidkonzentration bei halbmaximaler Transportrate überein.

Im Vergleich zum humanen TAP-Transporter, der für das Peptid R9L\* einen  $K_M$ -Wert von 0,3  $\mu\text{M}$  (Uebel *et al.*, 1995) aufweist, benötigt der Hefe-eigene Peptidtransport deutlich höherer Peptidkonzentrationen, um seinen halbmaximale Geschwindigkeit zu erreichen. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese eingesetzten Peptiden generell nicht das physiologische Substrat des Transporters darstellen.

### **2.1.3 Semi-intakte Hefezellen zeigen ATP-abhängige Peptidtransportaktivität**

Alle bislang geschilderten Untersuchungen des Peptidtransporters wurden an Mikrosomen durchgeführt. Das Endoplasmatische Retikulum ist ein ausgedehntes membranöses Netzwerk, das aufgrund seiner Größe während der Isolierung zerreißt. Die entstehenden Membransegmente schließen sich zu Vesikeln, den sog. Mikrosomen. Diese sind ein häufig eingesetztes *in vitro* System, um Funktionen des ER zu studieren. Es ist jedoch erstrebenswert, an Mikrosomen beobachtete Prozesse auch am intakten Organell nachzuweisen und gegebenenfalls das Zusammenspiel mit anderen Organellen wie z.B. dem Golgi-Komplex zu beobachten. Da Untersuchungen an intakten Säuger- oder Hefezellen jedoch häufig aufgrund der bestehenden Permeabilitätsbarrieren (Plasmamembran, Zellwand) für Inhibitoren, Peptide, Proteine etc. problematisch sind, werden für diese Untersuchungen semi-intakte Zellen eingesetzt. Die Herstellung perforierter Zellen wurde zunächst für Säugerzellen beschrieben (Simonis & Virta, 1987; Beckers *et al.*, 1987). Sie nutzte das adhärente, einschichtige Wachstum dieser Zellen aus. Baker und Kollegen entwickelten 1988 ein Protokoll mit dem auch als Suspensionskultur wachsende Hefezellen permeabilisiert werden können.

Durch enzymatischen Abbau der Zellwand wurden Sphäroplasten erzeugt und langsam in der Gasphase über flüssigem Stickstoff eingefroren. Beim Auftauen der sphäroplastierten Zellen wurde die Plasmamembran durch einen osmotischen Schock perforiert. Die elektronenmikroskopische Untersuchung semi-intakter Hefezellen und der immunologische Nachweis von Leitenzymen (Ruohola *et al.*, 1988) zeigten, dass das Zytoplasma durch Löcher in der Plasmamembran ausgetreten war, die zellulären Organellen jedoch unbeschädigt vorlagen. Das Endoplasmatische Retikulum dieser Präparationen war intakt, biologisch aktiv und für applizierte Substanzen zugänglich.

Die Inkubation semi-intakter Hefezellen mit radioaktiv markiertem Peptid ergab eine den Mikrosomen vergleichbare ATP-abhängige Akkumulation von Radioaktivität (Abb. 28), die durch einen Überschuss an nicht markiertem Peptid verhindert werden konnte. Damit konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem an isolierten Mikrosomen beobachteten Transport nicht um ein Artefakt, sondern um einen physiologischen Vorgang handelt. Semi-intakte Hefezellen akkumulierten mit ATP etwa 10-fach mehr Peptid als ohne Energetisierung, was vergleichbar mit der an Mikrosomen gemessenen Anreicherung um einen Faktor 5 bis 10 war. Die vergleichbare Peptidtransportaktivität von Hefe-Mikrosomen und semi-intakten Zellen stimmt gut mit den Untersuchungen von Androlewicz *et al.* (1993) und Neefjes *et al.* (1993) überein, die an Streptolysin O-permeabilisierten Säugerzellen die Funktion des TAP-Transporters nachweisen konnten.

Die Transportstudien an Mikrosomen und an den Zytosol-dezimierten permeabilisierten Zellen zeigen weiterhin, dass für den Peptidtransport ATP im Reaktionspuffer hinreichend ist und keine zytosolischen Faktoren benötigt werden.

#### **2.1.4 Orientierung des Peptidtransports**

Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Transportraten und dem intravesikulären Volumen zeigte, dass die Peptide in das Lumen der mikrosomalen Vesikel transportiert und nicht nur an die äußere Membranoberfläche gebunden werden (s. Abschn. 1.3.1).

Die Isolierung mikrosomaler Membranen birgt die Möglichkeit, dass sich die ER-Membranen zu sog. 'inside out'-Vesikeln schließen, die eine Umkehrung der Transporteigenschaften zeigen. Somit kann anhand von Mikrosomen nicht entschieden werden, ob es sich unter *in vivo* Bedingungen um einen Import oder Export von Peptiden am Endoplasmatischen Retikulum handelt.

Die an semi-intakten Zellen durchgeführten Untersuchungen sprechen dafür, dass der Transport der Peptide vom Zytosol in das Lumen des Endoplasmatischen

Retikulums gerichtet ist. Ein direkter Beweis für die Translokation von Proteinen oder Peptiden in das Lumen des ER ist ihre N-Glykosylierung an Asparaginresten in geeigneten Erkennungsmotiven (Baker *et al.*, 1987). Der Nachweis von Glykopeptiden und Glykoproteinen kann über die spezifische Bindung an Concanavalin A, ein Lektin, das Mannose-haltige Oligosaccharide erkennt, erfolgen. Im Fall des Hefe eigenen ATP-abhängigen Peptidtransporters konnte experimentell keine signifikante N-Glykosylierung der transportierten Peptide nachgewiesen werden (s. Abschn. 1.3.4). Lediglich rund 5% der nach dem Transport mit Membranen assoziierten Radioaktivität konnten durch Bindung an Con A-Agarose wiedergewonnen werden. Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Ansätzen mit und ohne ATP festgestellt werden. Auch semi-intakte Hefezellen, die ein voll funktionstüchtiges Endoplasmatisches Retikulum besitzen, wiesen für die getesteten Peptide R9L(QN) und R10T lediglich eine geringe, ATP-unabhängige Glykosylierungsrate auf. Diese konnte auch durch die Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems oder von Zuckervorstufen wie UDP-Glukose, UDP-Mannose nicht erhöht werden.

Für das Tripeptid NYT (Ac-NYT-NH<sub>2</sub>) ist bekannt, dass es durch passive Diffusion in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gelangt (Römisch & Schekman, 1992; Römisch & Ali, 1997) und dort N-glykosyliert wird. Die Inkubation von semi-intakten Hefezellen und Mikrosomen in Gegenwart und Abwesenheit von radioaktivem NYT\* zeigte wie erwartet in beiden Membransystemen eine ATP-unabhängige Akkumulation von Radioaktivität. Wurden die Zellen und Mikrosomen lysiert und anschließend die Con A-gebundene Peptidmenge bestimmt, so konnte für semi-intakte Zellen etwa 70% und für Mikrosomen 60% des transportierten Peptids in glykosylierter Form nachgewiesen werden.

Auch für den Peptidtransporter TAP konnte in Säuger- und Insektenzellen nur 1 bis 5% des eingesetzten Peptides in glykosylierter Form nachgewiesen werden (Van Endert *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1994; Uebel *et al.*, 1995), allerdings ergaben diese Studien für die Con A-gebundene Radioaktivität eine klare ATP-Abhängigkeit. Die für die Peptide R10T und R9L(QN) in Hefe beobachteten geringen Glykosylierungsraten stehen in einem deutlichen Widerspruch zu den Glykosylierungsstudien mit dem Tripeptid NYT\*.

Diese beweisen, dass sowohl isolierte Mikrosomen als auch die semi-intakten Zellen ein funktionstüchtiges Glykosylierungssystem besitzen, das auch Peptide effizient N-glykosyliert. Die hohe Glykosylierungseffizienz für NYT\* zeigt darüber hinaus, dass mit 5% des transportierten Peptides die Kapazität des Glykosylierungssystems nicht erschöpft ist.

Proteine werden durch den Sec61p-Komplex in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, wo sie vielfältig modifiziert werden. Der Transport und die Modifikation der Proteine sind dabei zeitlich und räumlich eng gekoppelt. So liegen der Signalpeptidase- und der Oligosaccharyltransferase-Komplex in Assoziation mit dem Sec61-Komplex vor (Kalies & Hartmann, 1998). Ein möglicher Grund für die mangelnde Glykosilierung könnte damit sein, dass Peptide, die unabhängig vom Sec61p-Komplex in das ER gelangen, keinen Zugang zu der Glykosilierungsmaschinerie haben. Auch diese Vermutung kann aufgrund der effektiven Glykosilierung von NYT, das unabhängig von Sec61p durch passive Diffusion in das ER-Lumen gelangt, ausgeschlossen werden.

Die Glykosilierungsexperimente wurden mit drei verschiedenen Peptiden (R9L(QN), R10T (diese Arbeit) und EEF (S. Urlinger) durchgeführt, die leicht unterschiedliche Akzeptorsequenzen für die N-Glykosilierung aufweisen. Da alle Peptide eine vergleichbar niedrige Glykosilierungseffizienz aufweisen, ist es unwahrscheinlich, dass dies auf eine unzureichende Erkennung zurückzuführen ist.

Eine mögliche Erklärung für die geringe Menge der an Con A-Agarose gebundenen Radioaktivität könnte eine schnelle Prozessierung der eingesetzten Peptide sein. Sowohl ein proteolytischer Abbau als auch eine Deglykosilierung der Peptide könnten diese dem Glykosilierungsnachweis entziehen.

Im Lumen des ER von Säugerzellen wurde eine Aminopeptidase identifiziert, die von TAP transportierte Peptide vor der Bindung an MHC Klasse I Moleküle prozessiert (Komlosch *et al.*, 2001). Eine ähnliche Peptidaseaktivität im ER der Hefe könnte möglicherweise einen Nachweis glykosilierter Peptide verhindern. Eine Deglykosilierung von Glykopeptiden wurde bislang nur nach dem ER-Export der Peptide im Zytosol beschrieben (Römisch & Ali, 1997). In Säugerzellen wurde diese enzymatische Aktivität einer Peptid:N-Glykanase (PNGase) zugeordnet (Seko *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1994), die mittlerweile auch in stationären Hefekulturen identifiziert wurde (Suzuki *et al.*, 1998). Da diese Glykanasen jedoch zytosolisch vorliegen, sind sie vermutlich nicht für den geringen Anteil glykosilierter Peptide verantwortlich.

Die geringe Glykosilierungseffizienz für Peptide, die durch den Hefe-eigenen Transporter oder durch TAP in das ER transportiert werden, bleibt ungeklärt. Die subzelluläre Fraktionierung in Kombination mit einem „ER-Shift“ bildet jedoch eine aussagekräftige Grundlage für die Lokalisierung der ATP-abhängigen Peptidtransportaktivität im Endoplasmatischen Retikulum von *S. cerevisiae*.

## 2.2 Mdl1p und Mdl2p sind in den Mitochondrien lokalisiert

Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* identifizierte 32 offene Leseraster für ABC-Transporter. Unter diesen finden sich auch die Sequenzen der „halben“ ABC-Transporter Mdl1p und Mdl2p (Kuchler *et al.*, 1992; Dean *et al.*, 1994), die untereinander und zu den Untereinheiten des TAP-Transporters (TAP1 und TAP2) über die gesamte Sequenz eine signifikante Ähnlichkeit (40 bis 43%) aufweisen (Abbildung 33). Aufgrund der engen Verwandtschaft zu TAP wurde der Einfluss der Proteine Mdl1p und Mdl2p auf den Transport von Peptiden ins ER getestet. Dazu wurden Hefestämme erzeugt, die für die einzelnen Gene bzw. beide Gene eine Deletion aufwiesen (Urlinger, 1997; Dean *et al.*, 1994). Die Gene MDL1 und MDL2 erwiesen sich als nicht essentiell für die Vitalität von *S. cerevisiae*. Darüber hinaus war in keiner der Mutanten die Peptidtransportaktivität beeinträchtigt.

Da die Proteine Mdl1p und Mdl2p zum Zeitpunkt der Arbeiten im Hinblick auf ihre Funktion und Lokalisierung uncharakterisiert waren, wurden gegen beide Proteine polyklonale Peptidantikörper erzeugt. Für Mdl1p konnte ein recht spezifisches Serum gewonnen werden, während anti-Mdl2p-Seren in Immunoblot Analysen stets einen hohen unspezifischen Hintergrund ergaben und für Analysen nur begrenzt einsetzbar waren.

Anhand von subzellulären Fraktionierungen mit „ER-Shift“ konnte für das Protein Mdl1p eine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum und Membranen des Golgi-Komplex eindeutig ausgeschlossen werden. Sowohl die Vakuole als auch die Mitochondrien kamen für eine subzelluläre Lokalisierung von Mdl1p in Frage. Um dies zu klären, wurden Mitochondrien untersucht, die von Prof. Lill (Marburg) zur Verfügung gestellt wurden. Mittels der hergestellten Peptidantikörper konnten sowohl Mdl1p als auch Mdl2p in den mitochondrialen Membranen nachgewiesen werden, während keine Reaktion mit den Mikrosomen detektiert wurde.

Damit konnte die aufgrund von Sequenzanalysen vermutete mitochondriale Lokalisation von Mdl1p und Mdl2p experimentell bestätigt werden. Zum gleichen Ergebnis führten auch die Untersuchungen von Young *et al.* (2001), die über den immunologischen Nachweis hinaus für beide Proteine einen mitochondrialen Import beobachten konnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass Mdl1p und Mdl2p in der inneren Mitochondrienmembran als Oligomere existieren und Mdl1p an dem Export von Peptiden aus Mitochondrien beteiligt ist.

Da an isolierten Mitochondrien keinerlei Import von radioaktiven Peptiden detektiert wurde (s. Abb. 32), kann sowohl für Mdl1p und Mdl2p als auch andere in den

Mitochondrien lokalisierte Proteinsysteme eine Beteiligung an dem ATP-abhängigen Peptidtransport in *S. cerevisiae* ausgeschlossen werden.

TAP1_HUMAN	PRVQKAVGSSEKIFEYLDRTP-RCPPSGLLTPLHLEGLVQFQDVSFAYPNRPDVLVLQGL	524
TAP2_HUMAN	GDMLSNVGAEEKVFSYMDRQP-NLPSPGTLAPTTLQGVVKFQDVSFAYPNRPDRPVLKGL	489
MDL1_YEAST	SELMKGAGAAARVFELNDRKPLIRPTIGKDPVSLAQKPIVFKNVSFYPTRPKHQIFKDL	453
MDL2_YEAST	SEIMQGAGAAASRLFELTRKPSISPTVG-HKYKPDGRGVIEFKDVSFSYPTRPSVQIFKNL	514
	<b>Walker A</b>	
TAP1_HUMAN	TFTLRPGEVTALVGPNGSGKSTVAALLQNLVYQPTGGQLLLDGKPLPQYEHRYLHRQVAAV	584
TAP2_HUMAN	TFTLRPGEVTALVGPNGSGKSTVAALLQNLVYQPTGGQVLLDEKPISQYEHCYLHSQVVSV	549
MDL1_YEAST	NITIKPGEHVCAVGPSSGSKSTIASLLLRYYDVNSGSIIEFGDEDIRNFNLRKYRRLLIGYV	513
MDL2_YEAST	NFKIAPGSSVCIVGPSSGRGKSTIALLLLRYYNPTTGTITIDNQDISKLNCKSLRRHIGIV	574
TAP1_HUMAN	GQEPQVFGFGRSLQENIAYGLT--QKPTMEEITAAAVKSGAHSFISGLPQGYDTEVDEAGSQ	642
TAP2_HUMAN	GQEPVLFSGSVRNNIAYGL---QSCEDDKVMAAAQAAHADDFIQEMEHGIYTDVGEKGSQ	606
MDL1_YEAST	QQEPLLFNGTILDNIIYCIPEEIAEQDDRIRRAIGKANCTKFLANFPDGLQTMVGARGAQ	573
MDL2_YEAST	QQEPVLMSTGRTIRDNITYGLT--YTPTKEEIRSVAKQCFCHNFITKFPNTYDVTIVGPHGTL	632
	<b>C-Motiv</b> <b>Walker B</b>	
TAP1_HUMAN	LSGGQRQAVALARALIRKPCVLIILDDATSALDANSQLQVEQLLYESPERYSRSVLLITQH	702
TAP2_HUMAN	LAAGQKQRLAIALARALVRDPRVLIILDEATSALDV---QCEQALQDWNDRGDRITVLVIAHR	662
MDL1_YEAST	LSGGQKQRIALARAFLLDPAVLILDEATSALDSQSEEVAKNLQRRVER-GFTTISIAHR	632
MDL2_YEAST	LSGGQKQRIALARALIKKPTILILDEATSALDVESEGAINYTFGQLMKSKSMTIVSIAHR	692
TAP1_HUMAN	LSLVEQADHILFLEGG-AIREGGTHQQLMEKKGCYWAMVQAPADAPE-----	748
TAP2_HUMAN	LQTVQRAHQILVLQE-----GKLQKLAQL-----	686
MDL1_YEAST	LSTIKHSTRVIVLGKHGSSVETGSRFDLIAIPNSELNALLAE-----	674
MDL2_YEAST	LSTIRRENVIVLGHGDSVEMGKFKELYANPTSALSQLLNEKAAPGSPDQLQIEKVIE	752

Abbildung 33: Sequenzvergleich der ABC-Motive von TAP1, TAP2, Mdl1p und Mdl2p

Ausschnitte der Aminosäuresequenzen der „halben“ ABC-Transporter TAP1 (As 464-748) und TAP2 (As 430-686) sowie Mdl1p (As 393-674) und Mdl2p (As 454-752) wurden mit dem Programm ClustalW verglichen. Die grau unterlegte Bereiche stellen die hochkonservierten Motive Walker A und B und das C-Motiv der ABC-Proteine dar.

## 2.3 Ausblick

Die Charakterisierung des in der Hefe *S. cerevisiae* entdeckten ATP-abhängigen Peptidtransports ergab, dass es sich um eine dem Endoplasmatischen Retikulum zuzuordnende Aktivität handelt. Die *in vivo* Funktion und die physiologischen Substrate dieses Prozesses sind bislang unklar und müssen Schwerpunkt zukünftiger Studien sein.

Das wichtigste Ziel ist dabei die Identifizierung des für den Peptidtransport verantwortlichen Proteins oder Proteinkomplexes. Ein möglicher experimenteller Ansatz dazu ist die chemische Vernetzung („crosslinking“) mit einem reaktiven Peptidsubstrat, das einen Affinitätstag trägt, der die Aufreinigung des vernetzten Komplexes zulässt. Durch eine Edman-Sequenzierung oder eine massenspektroskopische Untersuchung könnten Hinweise auf die Identität gewonnen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen sollte die Untersuchung der Substratspezifität des Transporters sein. Dabei muss z.B. geklärt werden wo das obere Größenlimit für transportierte Polypeptide liegt und ob auch andere Substanzen transportiert werden können. Eine denkbare physiologische Funktion könnte die Entsorgung von zytosolischen Polypeptiden sein, die unter bestimmten Wachstumsbedingungen durch vermehrte Degradation akkumulieren können und somit sezerniert oder zur Vakuole transportiert werden könnten.

Ferner besteht die Möglichkeit, dass der beobachtete ER-gerichtete Transport möglicherweise auch in umgekehrter Orientierung ablaufen kann und somit einen Export von Peptiden und eventuell Proteinen erlaubt. Auch für die zentrale Komponente des Proteintransports in das ER Sec61p wurde gezeigt, dass es Proteine bidirektional über die ER-Membran transportieren kann. Der retrograde Transport von Proteinen aus dem ER in das Zytosol dient der Entsorgung missgefalteter Proteine oder der Regulation von Proteinaktivitäten unter speziellen Wachstumsbedingungen. Möglicherweise ist das hier charakterisierte Proteinsystem ebenfalls an dieser sog. ER-assoziierten Degradation (ERAD) beteiligt.

## F. Literaturverzeichnis

- Abeijon, C., Orlean, P., Robbins, P. W., Hirschberg, C. B. (1989) Topography of glycosylation in yeast: characterization of GDP-mannose transport and luminal guanosine diphosphatase activities in Golgi-like vesicles. *PNAS (USA)* **86**, 6935 - 6939
- Ali, B. R. S., Tjernberg, A., Chait, B. T., Field, M. C. (2000) A microsomal GTPase is required for glycopeptide export from the mammalian endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **275**, 33222 - 33230
- Allen, S., Bulleid, N. J. (1997) Calnexin and calreticulin bind to enzymically active tissue-type plasminogen activator during biosynthesis and are not required for folding to the native conformation. *Biochem. J.* **328**, 113 - 119
- Androlewicz, M. J., Anderson, K. S., Cresswell, P. (1993) Evidence that transporters associated with antigen processing translocate major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *PNAS (USA)* **90**, 9130 - 9134
- Arthur, J. S. C., Crawford, C. (1996) Investigation of the interaction of M-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions. *Biochem. Biophys. Acta* **1293**, 201 - 206
- Bairoch, A. (1999) Amino acid composition (%) in the SWISS-PROT protein sequence bank. <http://expasy.org/tools/psscale/A.A.SWISS-PROT.html>
- Baker, D., Hicke, L., Rexach, M., Schleyer, M., Schekman, R. (1988) Reconstitution of SEC gene product-dependent intercompartmental protein transport. *Cell* **54**, 335 - 344
- Baki, A., Tompa, A., Alexa, A., Molnar, O., Friedrich, P. (1996) Autolysis parallels activation of  $\mu$ -calpain. *Biochem. J.* **318**, 897 - 901
- Barnoy, S., Zisper, Y., Glaser, T., Grimberg, Y., Kosower, N. S. (1999) Association of calpain ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependent thiol protease) with its endogenous inhibitor calpastatin in myoblasts. *J. Cell. Biochem.* **74**, 522 - 531
- Bauer, B. E., Wolfger, H., Kuchler, K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**, 217 - 236
- Beckers, C. J. M., Keller, D. S., Balch, W. E. (1987) Semi-intact cells permeable to macromolecules: use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the golgi complex. *Cell* **50**, 523 - 534
- Blanchard, H., Grochulski, P., Li, Y., Arthur, J. S. C., Davies, P. L., Elce, J. S., Cygler, M. (1997) Structure of a calpain  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain reveals a novel EF-hand and  $\text{Ca}^{2+}$ -induced conformational changes. *Nature Struct. Biol.* **4**, 532 - 538
- Bonifacio, J. S., Weissman, A. M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Dev. Biol.* **14**, 19 - 57
- Bootman, M. D., Lipp, P., Berridge, M. J. (2001) The organisation and functions of local  $\text{Ca}^{2+}$  signals. *J. Cell Sci.* **114**, 2213 - 2222
- Carafoli, E., Molinari, M. (1998) Calpain: a protease in search of a function. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **247**, 193 - 203
- Chapman, R., Sidrauski, C., Walter, P. (1998) Intracellular signaling from the ER to the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 459 - 485



- Chevet, E., Cameron, P. H., Pelletier, M. F., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J. M. (2001) The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 120 - 124
- Choi, Y. H., Lee, S. J., Nguyen, P. M., Jang, J. S., Lee, J., Wu, M. L., Takano, E., Maki, M., Nenkart, P. A., Trepel, J. B. (1997) Regulation of cyclin D1 by calpain protease. *J. Biol. Chem.* **272**, 28479 - 28484
- Chua, B. T., Guo, K., Li, P. (2000) Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J. Biol. Chem.* **275**, 5131 - 5135
- Corsi, A. K., Schekman, R. (1996) Mechanism of polypeptide translocation into the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **271**, 30299 - 30302
- Croall, D. E., McGrody, K. S. (1994) Domain structure of calpain: mapping the binding site for calpastatin. *Biochemistry* **33**, 13223 - 13230
- Crowley, K. S., Reinhart, G. D., Johnson, A. E. (1993) The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* **73**, 1101 - 1115
- D'Alessio, C., Fernández, F., Trombetta, E. S., Parodi, A. J. (1999) Genetic evidence for the heterotrimeric structure of glucosidase II. The effect of disrupting the subunit-encoding genes on glycoprotein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 35899 - 35905
- Dean, M., Allikmets, R., Gerrard, B., Stewart, C., Kistler, A., Shafer, B., Michaelis, S., Strathern, J. (1994) Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* **10**, 377 - 383
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156 - 1166
- Decottignies, A., Goffeau, A. (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nature Genet.* **15**, 137 - 145
- Després, N., Talbot, G., Plouffe, B., Boire, G., Ménard, H.A. (1995) Detection and expression of a cDNA clone that encodes a polypeptide containing two inhibitory domains of human calpastatin and its recognition by rheumatoid arthritis sera. *J. Clin. Invest.* **95**, 1891-1896
- Detmers, F. J. M., Lanfermeijer, F. C., Poolman, B. (2001) Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res. Microbiol.* **152**, 245 - 258
- Dunker, A. K., Garner, E., Guillot, S., Romero, P., Albrecht, K., Hart, J., Obradovic, Z., Kissinger, C., Villafranca, J. E. (1998) Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pac. Symp. Biocomput.* **3**, 473 - 484
- Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C. H., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., Obradovic, Z. (2001) Intrinsically disordered proteins. *J. Mol. Graph. Modell.* **19**, 26 - 59
- Elce, J. S., Hegadorn, C., Arthur, J. S. (1997) Autolysis, Ca<sup>2+</sup> requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* **272**, 1268 - 1275
- Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882 - 1888
- Esmon, B., Novick, P., Schekman, R. (1981) Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast. *Cell* **25**, 451 - 460

- Garner, E., Cannon, P., Romero, P., Obradovic, Z., Dunker, A. K. (1998) Predicting disordered regions from amino acids sequence: common themes despite different structural characterization. *Genome Informatics* **9**, 201 - 213
- Geesink, G. H., Nonneman, D., Koohmaraie, M. (1998) An improved purification protocol for heart and skeletal muscle calpastatin reveals two isoforms resulting from alternative splicing. *Arch. Bioch. Biophys.* **356**, 19-24
- Gething, M.-J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Sem. Cell Dev.Biol.* **10**, 465 - 472
- Gillece, P., Pilon, M., Römisch, K. (2000) The protein translocation channel mediates glycopeptide export across the endoplasmic reticulum membrane. *PNAS (USA)* **97**, 4609 - 4614
- Glading, A., Lauffenburger, D. A., Wells, A. (2002) Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility. *Trends in Cell Biol.* **12**, 46 - 54
- Goll, D.E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Christiansen, J. A. (1992) Role of the calpain system in muscle growth. *Biochimie* **74**, 225 - 237
- Hammond, C., Helenius, A. (1995) Quality Control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523 - 529
- Hampton, R. Y. (2000) ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr. Biol.* **10**, R518 - R521
- Hanahan, D. (1983) Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557 - 580
- Hanein, D., Matlack, K. E. S., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies K.-U., Miller, K. R., Rapoport, T. A., Akey, C. W. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87**, 721 – 732
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271 - 274
- Higgins, C. F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**, 67 – 113
- Higgins, C. F. (2001) ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res. Microbiol.* **152**, 205 - 210
- High, S., Lecomte, F. J. L., Russell, S. J., Abell, B. M., Oliver, J. D. (2000) Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett.* **476**, 38 - 41
- Hirai, S.-i., Kawasaki, H., Yaniv, M., Suzuki, K. (1991) Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS* **287**, 57 - 61
- Hitomi, K., Yokoyama, A., Maki, M. (1998) Expression of biologically active human calpastatin in baculovirus-infected insect cells and in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 136 - 141
- Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L., Jia, Z. (1999) Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* **18**, 6880 - 6889
- Huang, Y., Wang, K. K. W. (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* **7**, 355 – 362

- Hyde, S. C., Emsley, P., Harthorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., Higgins, C. F. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **346**, 362 - 365
- Ishima, R., Tamura, A., Kazuyuki, A., Hamaguchi, K., Makino, K., Murachi, T., Hatanaka, M., Maki, M. (1991) Structure of the active 27-residue fragment of human calpastatin. *FEBS* **294**, 64 - 66
- Jensen, T. J., Loo, M. A., Pind, S., Williams, D. B., Goldberg, A. L., Riordan, J. R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**, 129 - 135
- Johnson, G. V. W., Guttman, R. P. (1997) Calpains: intact and active? *BioEssays* **19**, 1011 - 1018
- Kalies, K.-U., Hartmann, E. (1998) Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER). Two similar routes with different modes. *Eur. J. Biochem.* **254**, 1 - 5
- Kaufman, R. J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & Dev.* **13**, 1211 - 1233
- Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S., Minami, Y., Suzuki, K. (1989) Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. *J. Biochem.* **106**, 274 - 281
- Kawasaki, H., Kawashima, S. (1996) Regulation of the calpain-calpastatin system by membranes (review). *Mol. Membr. Biol.* **13**, 217 - 224
- Kelly, A., Powis, S., Kerr, L.-A., Mockridge, I., Elliott, T., Bastin, J., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Trowsdale, J., Townsend, A. (1992) Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* **355**, 641 - 644
- Kleijmeer, M., Kelly, A., Genze, H. J., Slot, J. W., Townsend, A., Trowsdale, J. (1992) Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* **357**, 342 - 344
- Kneller, D. G., Cohen, F. E., Langridge, R. (1990) Improvements in protein secondary structure prediction by an enhanced neuronal network. *J. Mol. Biol.* **214**, 171 - 182
- Komlosch, A., Momburg, F., Weinschenk, T., Emmerich, N., Schild, H., Nadav, E., Shaked, I., Reiss, Y. (2001) A role for a novel luminal endoplasmic reticulum aminopeptidase in final trimming of 26 S proteasome-generated major histocompatibility complex class I antigenic peptides. *J. Biol. Chem.* **276**, 30050 - 30056
- Konno, T., Tanaka, N., Kataoka, M., Takano, E., Maki, M. (1997) A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I. *Biochem. Biophys. Acta* **1342**, 73 - 82
- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631 - 664
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J., Sambrook, J. (1988) The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**, 462 - 464

- Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I., Wright, P. E. (1996) Structural studies of p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *PNAS (USA)* **93**, 11504 - 11509
- Kubbutat, M. H. G., Vousden, K. H. (1997) Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 460 - 468
- Kuchler, K., Sterne, R. E., Thorner, J. (1989) *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**, 3973 - 3984
- Kukuruzinska, M. A., Bergh, M. L., E., Jackson, B. J. (1987) Protein glycosylation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 915 - 944
- Kusakawa, G. (2000) Calpain-dependent proteolytic cleavage of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator to p25. *J. Biol. Chem.* **275**, 17166 - 17172
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105 - 132
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 - 685
- Lankat-Buttgereit, B., Tampé, R. (2001) The transporter associated with antigen processing: function and implications in human diseases. *Physiol. Rev.* **82**, 187 - 204
- Lin, G. D. (1997) Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation and inhibitor binding. *Nature Struct. Biol.* **4**, 538 - 547
- Lidakis-Simantiris, N., Hutchinson, R. S., Betts, S. D., Barry, B. A., Yocum, C. F. (1999) Manganese stabilizing protein of photosystem II is a thermostable, natively unfolded polypeptide. *Biochemistry* **38**, 404 - 414
- Lowry, O. H., Roseborough, N. H., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 - 274
- Ma, H., Yang, H. Q., Takano, E., Hatanaka, M., Maki, M. (1994) Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24430 - 24436
- Maki, M., Bagci, H., Hamaguchi, K., Ueda, M., Murachi, T., Hatanaka, M. (1989) Inhibition of calpain by a synthetic oligopeptide corresponding to an exon of the human calpastatin gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 18866 - 18869
- Maki, M., Takano, E., Mori, H., Kannagi, R., Murachi, T., Hatanaka, M. (1987a) Repetitive region of calpastatin is a functional unit of the proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **143**, 300 - 308
- Maki, M., Takano, E., Mori, H., Sato, A., Murachi, T., Hatanaka, M. (1987b) All four internally repetitive domains of pig calpastatin possess inhibitory activities against calpains I and II. *FEBS Lett.* **223**, 174 - 180
- Maki, M., Takano, E., Osawa, T., Ooi, T., Murachi, T., Hatanaka, M. (1988) Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**, 10254 - 10261
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., Rapoport T. A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**, 553 - 564

- McConahey, P. J., Dixon, F. J. (1980) Radioiodination of proteins by the use of the chloramine T method. *Method. Enzymol.* **70**, 210 - 213
- McGrath, J. P., Varshavsky, A. (1989) The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* **340**, 400 - 404
- Mellgren, R. L. (1997) Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **236**, 555 - 558
- Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Minafra, R., Pontremoli, S. (1996) Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **229**, 193 -197
- Melloni, E., DeTullio, R., Aversa, M., Tedesco, I., Salamino, F., Sparatore, B., Pontremoli, S. (1998a) Properties of calpastatin forms in rat brain. *FEBS Lett.* **431**, 55- 58
- Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Sparatore, B., Pontremoli, S. (1998b) Mechanism of action of a new component of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolytic system in rat brain: the calpain activator. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **249**, 583 - 588
- Melloni, E., Michetti, M., Salamino, F., Pontremoli, S. (1998c) Molecular and functional properties of a calpain activator protein specific for m-isoforms. *J. Biol. Chem.* **273**, 12827 - 12831
- Melloni, E., Aversa, M., Salamino, F., Sparatore, B., Minafra, R., Pontremoli, S. (2000) Acyl-CoA-binding protein is a potent M-calpain activator. *J. Biol. Chem.* **275**, 82 - 86
- Melnick, J., Dul, J. L., Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* **370**, 373 - 375
- Ménard, H.-A., El-Amine, M. (1996) The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. *Imm. Today* **17**, 545 - 547
- Meyer, T. H., van Endert, P. M., Uebel, S., Ehring, B., Tampé, R. (1994) Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Letters* **351**, 43 - 447
- Meyer, T. H. (1996) Funktionale Expression und Charakterisierung des Antigenpeptid-Transporters (TAP). *Dissertation, TU München, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften*
- Michaelis, S. (1993) STE6, the yeast a-factor transporter. *Semin. Cell Biol.* **4**, 17 - 27
- Michetti, M., Viotti, P. L., Melloni, E., Pontremoli, S. (1991) Mechanism of action of the calpain activator protein in rat skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1177 - 1180
- Misselwitz, B., Staack, O., Rapoport, T. A. (1999) Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 20110 - 20115
- Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Elce, J. S., Jia, Z., Davies P. L. (2002) A Ca<sup>2+</sup> switch aligns the active site of calpain. *Cell* **108**, 649 - 660
- Mothes, W., Prehn, S., Rapoport, T. A. (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J.* **13**, 3973 - 3982

- Munro, S., Pelham, H. R. B. (1986) An Hsp70-like protein in the ER has identity with the 78kD glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291 - 300
- Neefjes, J. J., Momburg, F., Hämmerling, G. J. (1993) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**, 769 - 771
- Neumann, L., Tampé, R. (1999) Kinetic analysis of peptide binding to the TAP transporter complex: evidence for structural rearrangements induced by substrate binding. *J. Mol. Biol.* **294**, 1203 - 1213
- Nikawa, J. J., Yamashita, S. (1992) IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**, 1441 - 1446
- Nixon, R. A., Saito, K. I., Grynspan, F., Griffin, W. R., Katayama, S., Honda, T., Mohan, P. S., Shea, T. B., Beermann, M. (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 77 - 91
- Noiva, R. (1999) Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Sem. Cell Dev. Biol.* **10**, 481 - 493
- Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H., High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2573 - 2582
- Otsuka, Y., Goll, D. E. (1987) Purification of the Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase. *J. Biol. Chem.* **262**, 5839 - 5851
- Pahl, H. L., Baeuerle, P. A. (1995) A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* **14**, 2580 - 2588
- Pahl, H. L., Baeuerle, P. A. (1997) The ER-overload response: activation of NF-kB. *TIBS* **22**, 63 - 67
- Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J. Biol. Chem.* **270**, 244 - 253
- Parodi, A. J. (1999) Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta* **1426**, 287 - 295
- Pavletich, N. P. (1999) Mechanism of cyclin-dependent kinase regulation: structure of cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* **287**, 821 - 828
- Pariat, M., Carrillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debüssche, L., Bracco, L., Milner, J., Piechaczyk, M. (1997) Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2806 - 2815
- Plempner, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., Wolf, D. H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**, 891 - 895

- Plempner, R. K., Egner, R., Kuchler, K., Wolf, D. H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J. Biol. Chem.* **273**, 32848 - 32856
- Plempner, R. K., Wolf, D. H. (1999) Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 125 - 130
- Powell, K. S., Latterich, M. (2000) The Making and Breaking of the Endoplasmic Reticulum. *Traffic* **1**, 689 - 694
- Rapoport, T. A., Jungnickel, B., Kutay, U. (1996) Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 271 - 303
- Richard, I., Broux, O., Allmand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devand, C., Pasturan, P., Roudaut, C. *et al.* (1995) Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell* **81**, 27 - 40
- Roberg, K. J., Rowley, N., Kaiser, C. A. (1997) Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **137**, 1469 - 1482
- Römisch, K., Schekman, R. (1992) Distinct processes mediate glycoprotein and glycopeptide export from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS (USA)* **89**, 7227 - 7231
- Römisch, K., Ali, B. R. S. (1997) Similar processes mediate glycopeptide export from the endoplasmic reticulum in mammalian cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS (USA)*, **94**, 6730 - 6734
- Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C., Villafranca, J. E., Garner, E., Guilliot, S., Dunker, A. K. (1998a) Thousands of proteins likely to have long disordered regions. *Pac. Symp. Biocomput.* **3**, 437 - 448
- Romero, P., Obradovic, Z., Dunker, A. K. (1998b) Sequence data analysis for long distorted regions prediction in the calcineurin family. *Genome Informatics* **8**, 110 - 124
- Ruohola, H., Kabcenell, A. K., Ferro-Novick, S. (1988) Reconstitution of protein transport from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi complex in yeast: the acceptor Golgi compartment is defective in the sec23 mutant. *J. Cell Biol.* **107**, 1465 - 1476
- Saido, T. C., Sorimachi, H., Suzuki, K. (1994) Calpain: new perspective in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* **8**, 814 - 822
- Salamino, F., DeTullio, R., Mengotti, P., Viotti, P. L., Melloni, E., Pontremoli, S. (1993) Site-directed activation of calpain is promoted by a membrane-associated natural activator protein. *Biochem. J.* **290**, 191 - 197
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). A laboratory manual (second edition). New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkadi, B., Price, E. M., Boucher, R. C., Germann, U. A., Chakraborty, K. (1992) Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4854 - 4858
- Schweers, O., Schönbrunn Hanebeck, E., Marx, A., Mandelkow, E. (1994) Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for beta-structure. *J. Biol. Chem.* **269**, 24290 - 24297

- Seko, A., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S. (1991) Peptide:N-glycosidase activity found in the early embryos of *Oryzias latipes* (Medaka fish). The first demonstration of the occurrence of peptide:N-glycosidase in animal cells and its implication for the presence of a de-N-glycosylation system in living organisms. *J. Biol. Chem.* **266**, 22110 - 22114
- Sidrauski C., Walter, P. (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031 - 1039
- Simon, S. M., Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371 - 380
- Simonis, K., Virta, H. (1987) Perforated MDCK cells support intracellular transport. *EMBO J.* **6**, 2241 - 2247
- Sorimachi, H., Suzuki, K. (2001) The structure of calpain. *J. Biochem.* **129**, 653 - 664
- Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K. (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem. J.* **328**, 721 - 732
- Squier, M. K. T., Cohen, J. J. (1997) Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J. Immunol.* **158**, 3690 - 3697
- Stevens, F. J., Argon, Y. (1999) Protein folding in the ER. *Sem. Cell Dev. Biol.* **10**, 443 - 454
- Stoll, R. (2000) Multidimensional NMR studies on the structure, dynamics, and function of the human oncoprotein MDM2 and the human melanoma inhibitory activity (MIA) protein. *Herbert Utz Verlag, München*
- Strobl, S., Fernandez-Catalan, C, Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., Bode, W. (2000) The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *PNAS (USA)* **97**, 588 - 592
- Suzuki, T., Kitajima, K., Inoue, Y., Inoue, S. (1994) Occurrence and biological roles of 'proximal glycanases' in animal cells. *Glycobiology* **4**, 777 - 789
- Suzuki, T., Park, H., Kitajima, K., Lennarz, W. J. (1998) Peptides glycosylated in the endoplasmic reticulum of yeast are subsequently deglycosylated by a soluble peptide:N-glycanase activity. *J. Biol. Chem.* **273**, 21526 - 21530
- Suzuki, K., Sorimachi, H. (1998) A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* **433**, 1 - 4
- Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K., Ishiura, S. (1995) Calpain: novel family members, activation, and physiological function. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 523 - 529
- Takano, E., Ma, H., Yang, H. Q., Maki, M., Hatanaka, M. (1995) Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains. *FEBS Lett.* **362**, 93 - 97
- Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T., Murachi, T. (1988) Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behaviour in polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* **27**, 1964 - 1972
- Tompa, P., Muscsi, Z., Orosz, G., Friedrich, P. (2002) Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. *J. Biol. Chem.* **277**, 9022 - 9026



- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhardt, D. J., Weissman, J. S., Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249 - 258
- Trombetta, E. S., Bosch, M., Parodi, A. J. (1989) Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid microsomal membranes. *Biochemistry* **28**, 8108 - 8116
- Trombetta, E. S., Helenius, A. (1998) Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 587 - 592
- Tullio, R., Passalacqua, M., Averna, M., Salamino, F., Melloni, E., Pontremoli, S. (1999) Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochem. J.* **343**, 467 - 472
- Uebel, S., Meyer, T. H., Krass, W., Kienle, S., Jung, G., Wiesmüller, K.-H., Tampé, R. (1995) Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J. Biol. Chem.* **270**, 18512 - 18516
- Uemori, T., Shimojo, T., Asada, K., Asano, T., Kimizuka, F., Kato, J., Maki, M., Hatanaka, M., Murachi, T., Hanzawa, H., Arata, Y. (1990) Characterization of a functional domain of human calpastatin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **166**, 1485 - 1493
- Urlinger, S., Kuchler, K., Meyer, T. H., Uebel, S., Tampé, R. (1997a) Intracellular localization, complex formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. *Eur. J. Biochem.* **245**, 266 - 272
- Urlinger, S. (1997b) Funktionale Expression des Antigenpeptid-Transporters TAP und Charakterisierung eines ATP-abhängigen Transportsystems im Endoplasmatischen Retikulum von *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation, TU München, Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften*
- Uversky, V. N., Gillespie, J. R., Finke, A. L. (2000) Why are 'natively unfolded' proteins unstructured under physiological conditions? *Proteins* **41**, 415 - 427
- Uversky, V. (2002a) What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem* **269**, 2 - 12
- Uversky, V. (2002b) Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science* **11**, 739 - 756
- Van Endert, P. M., Tampé, R., Meyer, T. H., Tisch, R., Bach, J.-F., McDevitt, H. O. (1994) A sequential model for peptide binding and transport by the transporters associated with antigen processing. *Immunity* **1**, 491 - 500
- Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M. A., Williams, D. B. (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480 - 3490
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J. (1982) Distantly related sequences in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of ATP-synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**, 945 - 951
- Walter, P., Johnson, A. E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 87 - 119
- Wang K. K. W. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**, 20 - 26

- Wang, K. K. W., Posmantur, R., Ndimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., Talanian, R. V., Keegan, M., Herzog, L., Allen, H. (1998) Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* **356**, 187 - 196
- Wang, K. K. W., Yuen, P.-W. (1994) Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol. Sci.* **15**, 412 - 419
- Ward, C. L., Omura, S., Kopito, R. R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**, 121 - 127
- Ware, F. E., Vassilakos, A., Peterson, P. A., Jackson, M. R., Lehrman, M. A., Williams, D. B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> oligosaccharid as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 4697 - 4704
- Weinreb, P. H., Zhen, W., Poon, A. W., Conway, K. A., Lansbury, P. T. Jr. (1996) NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* **35**, 13709 - 13715
- Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999) Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* **293**, 321 - 331
- Yang, H. Q., Ma, H., Takano, E., Hatanaka, M., Maki, M. (1994) Analysis of calcium-dependent interaction between amino-terminal conserved region of calpastatin functional domain and calmodulin-like domain of  $\mu$ -calpain large subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 18977 - 18984
- Young, L., Leonhard, K., Tatsuta, T., Trowsdale, J., Langer, T. (2001) Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* **291**, 2135 - 2138
- Zapun, A., Petrescu, S. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J. M. (1997) Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell* **88**, 29 - 38
- Zapun, A., Thomas, C. A., Bergeron, J. J. (1999) Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* **7**, R173 - R182
- Zhang, W.; Lu, Q., Xie Z.-j., Mellgren, R. L. (1997) Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene* **14**, 255 - 263
- Zhou, M., Schekman, R. (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol. Cell.* **4**, 925 - 934

## G. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

$\gamma$	gyromagnetisches Verhältnis
$\mu$	magnetisches Moment
P	Eigendrehimpuls
$\hbar$	Plancksches Wirkungsquantum
I	Kernspinquantenzahl
m	magnetische Quantenzahl
$B_0$	magnetische Flussdichte
E	Energie
$\varepsilon$	Extinktionskoeffizient
$\nu$	Lamor Frequenz
$M_0$	makroskopische Magnetisierung
$T_1$	longitudinale Relaxationszeit
$T_2$	transversale Relaxationszeit
$\delta$	chemische Verschiebung
kDa	Kilodalton
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
Abb.	Abbildung
Abs	Absorption
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
bp	Basenpaar
CD	Zirkulardichroismus
cDNS	komplementäre DNS
CIAP	Alkalische Phosphatase
Con A	Concanavalin A
cpm	Zählpulse pro Minute
CSA	Anisotropie der chemischen Verschiebung
CTP	Cytidintriphosphat
DD	Dipol-Dipol-Wechselwirkung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FID	Free induction decay
FT	Fourier Transformation
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin"
NiNTA	Nickel-Nitriloacetat
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OD	Optische Dichte
Pa	Pascal
pAb	polyklonaler Antikörper
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pl	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
RT	Raumtemperatur
SAXS	Small Angle X-ray Scattering
SDS	Natriumdodekylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
UDP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Upm	Umdrehungen pro Minute

## Oligonukleotide

CstN	5' GGACCATATGAACCCCGCAGAAGCC 3'
CstC	5' GCGGATCCTCAACTTGCATTTTTTTC 3'
CstN108	5' GGACCATATGGCTGGTGGGAAGAGCGTCC 3'
CstN121	5' GGACCATATGCCTGGCAAAGCAGGCGACC 3'
CstN140	5' GGACCATATGGCTGAACCGAAGCCTGACG 3'
CstN154	5' GGACCATATGGATGCTGCTTTGGATGAC 3'
CstC304	5' GCGGATCCTCACCGGGTGCCAGCGAAGC 3'
CstC330	5' GCGGATCCTCACTTCTCTACTTTTTTCTTC 3'
CstnMut1	5' GACACCGGCGAAACGAACAGAACCAGAGAC3'
CstnMut2	5' GTCTCTGGTTCTGTTTCGTTTCGCCGGTGTC3'
CstnS1	5' CAAAATACAGGGAACCTTCTGG3'
CstnS2	5'GGAAGAGGCTAAGGATAAAGATGG3'

## Peptidsequenzen

R9L	RRYQKSTEL
R9L(QN)	RRYQNSTEL
R10T	RYWANATRST
NYT	NYT

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Anja Jestel  
geboren am: 27. 11. 1970 in Paderborn  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

08/77 – 08/81 Overbergschule Paderborn, Grundschule  
09/81 – 05/90 Gymnasium St. Michael, Paderborn

### Studium

10/90 – 04/93 Diplomstudiengang Biochemie Universität Tübingen,  
Vordiplom  
04/93 – 07/96 Diplomstudiengang Biochemie Universität Tübingen,  
Diplom  
11/95 – 07/96 Diplomarbeit am Physiologisch Chemischen Institut,  
Universität Tübingen, bei Prof. Dr. K.-U. Fröhlich

### Promotion

10/96 – 07/98 Max-Planck-Institut für Biochemie,  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Tampé  
08/96 – 01/00 Max-Planck-Institut für Biochemie,  
Abteilung Strukturforschung, Arbeitsgruppe Dr. T. A. Holak

seit 02/00 Wissenschaftliche Mitarbeiterin  
Proteros Biostructures GmbH, Martinsried

## Danksagung

Vor allen danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Robert Huber für die Aufnahme in seine Abteilung und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Dr. Tad A. Holak danke ich für die Überlassung des Calpastatin-Themas, viele anregende Diskussionen und den ersten Kontakt mit der Strukturbioogie.

Bei Prof. Dr. Robert Tampé möchte ich mich für seine engagierte Betreuung der Arbeiten zum ATP-abhängigen Peptidtransport in der Hefe und die Möglichkeit, eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten und Denken zu lernen, bedanken.

Prof. Dr. W. Baumeister sei gedankt für die Möglichkeit, einen Teil dieser Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Prof. Dr. Karl Kuchler möchte ich für seine unermüdliche Hilfestellung bei der Lösung von Problemen mit der Bäckerhefe zu danken.

Dr. Torsten Neuefeind danke ich für die Aufnahme bei Proteros und die Möglichkeit, meine Dissertation fertigzustellen während ich bereits „Industrieluft“ schnupperte.

Ein ganz besonderer Dank gilt all meinen Kollegen, die mich durch die Höhen und Tiefen der vergangenen Jahre begleitet haben, die die Laborarbeit abwechslungsreich und interessant machten, die ausserhalb des Labors für entspannende Stunden und unvergessliche Erlebnisse sorgten, die mir wissenschaftlich zur Seite standen und von denen viele über die Arbeit hinaus zu Freunden geworden sind:

In der Arbeitsgruppe Tampé waren dies: Stefanie Urlinger, Kurt Pawlitschko, Lars Neumann, Stefan Uebel, Stefan Ammer, Titia Plantinga, Ulf Rädler, Ingmar Dorn & Stefan Pettinger.

In der Arbeitsgruppe Holak zählten dazu: Raphael Stoll, Roland Baumgartner, Christoph Seger, Peter Mühlhahn, Christian Renner, Jana Köhler, Wenzel Kalus, Markus Seiffert, Till Rehm, Michael Brüggert & Julia Georgescu.

Bei Proteros unterstützten mich: Nediljko Budisa, Peter Mühlhahn, Roland Baumgartner, Stefano Pegoraro, Stefan Strobl, Tatjana van Dijk, Nils Ostermann, Andrea Schulze, Alexandra Hinniger, Gerlind Stoller, Dorothea Korte, Karin Grennrich, Andreas Nick, Martin Greller, Jens Kaiser, Reiner Kiefersauer, Clemens Scheufler, Désirée Störmer, Ursula Heunisch, Markus Walloschek, Mathias Bädeker, Christian Benda & Herr G. Hein.

Für das Korrigieren der Arbeit bedanke ich mich bei Isabel Benzel, Stefanie Urlinger, Roland Baumgartner, Alex Hinniger & Markus Walloschek. Danke auch all denen, die mich beim Kampf mit dem Computer vor der Kapitulation bewahrt haben: Peter Mühlhahn, Andreas Nick, Martin Greller, Lutz Zeitelmann und Mathias Bädeker.

Isabel Benzel, Pinar Sirim, Hans Zischka, Elena Rojo, Raphael Stoll, Corry Lang, Wolfgang Wybranietz, Babette Schade, Jutta Richter, Michael Sanatani, Carsten von Brock, Stefan Miller und Lutz Zeitelmann sage ich „Danke“ für ihre Freundschaft, Unterstützung, Aufmunterung und Hilfe in allen Lebenslagen. Ohne Euch gäbe es diese Arbeit nicht!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildung in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und auf die ich mich in jeder Situation verlassen konnte.